

# **UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y AGROPECUARIAS**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN  
DE MUTANTES DE *Phaffia rhodozyma*  
SOBREPRODUCTORAS DE ASTAXANTINA  
Y RESISTENTES A METIRAPONA**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:  
EDITH MONROY AVENDAÑO**

**GUADALAJARA, JAL., JUNIO DE 2004**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

C. EDITH MONROY AVENDAÑO  
PRESENTE.

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción Tesis con el título: "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE *Phaffia rhodozyma* SOBREPDUCTORAS DE ASTAXANTINA Y RESISTENTES A METIRAPONA", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la DR. JOSÉ DE JESÚS RAMÍREZ CÓRDOVA y como asesor/a el/la DR. MARIO A. RUIZ.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jal., 1º de abril del 2004

DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

*Leticia Hernández López*  
M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. DR. JOSÉ DE JESÚS RAMÍREZ CÓRDOVA.-Director del Trabajo  
c.c.p. DR. MARIO A. RUIZ.-Asesor del Trabajo  
c.c.p. Archivo

MERL/LHL/mam

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

**C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**  
**DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**  
**DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**P R E S E N T E.**

Por medio de la presente nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Titulación modalidad TESIS con el título:

**Aislamiento y caracterización de mutantes de *Phaffia rhodozyma* sobreproductoras de astaxantina y resistentes a metirapona,**

que realizó la pasante **Edith Monroy Avendaño**, con número de código **193804651** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para la autorización de impresión y, en su caso, programación de fecha de examen respectivo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

Las agujas, Zapopan, Jal., a 9 de junio del 2004.



Director del trabajo

El asesor

Dr. José de Jesús Ramírez Cordova

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
TÉCNICO SUPERIOR UNIVERSITARIO  
EN CONTROL DE PLAGAS URBANAS  
Y AMBIENTALES

Dr. Mario Ruiz

1. M.C. Liberato Portillo

2. M.C. Patricia Castro

3.- Biol.. Sergio Fausto Guerra

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE  
 MUTANTES DE *Phaffia rhodozyma*  
 SOBREPRODUCTORAS DE ASTAXANTINA Y  
 RESISTENTES A METIRAPONA.**

**El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. (CIATEJ), bajo la Dirección del Dr. José de Jesús Ramírez Córdova y la Asesoría de la Bióloga Maria de la Luz Núñez Vallejo.**

## Dedicatoria

A tu lado aprendí a volar  
a encontrar las ganas de luchar  
Me enseñaste que la magia está  
al alcance de mi anhelo  
y tu amor me ha dado fe.

Y lo que tu me has dado  
lo llevo en la sangre y en mi ser  
Te sentiré a mi lado  
no importa donde estés  
Tu amor dejo una huella en mi existir  
te guardo dentro.

Si la vida nos separa hoy  
ya verás que para siempre estoy  
flotando en tu respiración  
me llevarás prendido al corazón  
igual que yo.  
Vives en mi!

**Para mis padres con todo mi amor.  
Gracias.**

## **Agradecimientos**

**Al Dr. José de Jesús Ramírez Córdova  
Por su dedicación y paciencia.**

**A la Biol. María de la Luz Núñez  
Por su apoyo y amistad.**

**A mi esposo por su tiempo, animo y cariño.  
Gracias Ricardo.**

# ÍNDICE

<b>I. ANTECEDENTES</b>	1
1.1 Pigmentos carotenoides	2
1.2 Estructuras de los carotenoides	2
1.3 Distribución de los carotenoides	2
1.4 Función de los carotenoides	4
1.5 Uso de los carotenoides	4
1.6 Fuentes microbianas	5
1.7 Fuentes de obtención de astaxantina	7
1.8 Características de la levadura <i>Phaffia rhodozyma</i>	9
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	15
<b>III. HIPÓTESIS</b>	16
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b>	17
<b>V. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	17
<b>VI. MATERIAL Y METODOS</b>	18
<b>VII. RESULTADOS</b>	25
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	52
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	56
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Estructura química de los compuestos carotenoides.	3
<b>Fig. 2.</b> Vía biosintética de la astaxantina en <i>Phaffia rhodozyma</i> .	12
<b>Fig. 3.</b> Gráfica de la curva patrón de astaxantina por HPLC.	38
<b>Fig. 4.</b> Crecimiento de las cepas mutantes derivadas de la cepa 25-2, crecidas en YM.	39
<b>Fig. 5.</b> Crecimiento de las cepas mutantes derivadas de la cepa 25-2, crecidas en medio de Yuca.	40
<b>Fig. 6.</b> Producción de pigmento en cepas mutantes derivadas de la cepa 25-2, en medio YM.	41
<b>Fig. 7.</b> Producción de pigmento en cepas mutantes derivadas de la cepa 25-2, en medio de Yuca.	42
<b>Fig. 8.</b> Crecimiento de las cepas mutantes derivadas de la fus 15-1, en medio YM.	43
<b>Fig. 9.</b> Crecimiento de las cepas mutantes derivadas de la fus 15-1, en medio de Yuca.	44
<b>Fig. 10.</b> Producción de pigmento de las cepas mutantes derivadas de la fus 15-1 en medio YM.	45
<b>Fig. 11.</b> Producción de pigmento de las cepas mutantes derivadas de la fus 15-1 en medio de Yuca.	46
<b>Fig. 12.</b> Cromatograma de la cepa met-28 por HPLC.	48
<b>Fig. 13.</b> Cromatograma de la cepa met-10 por HPLC.	48
<b>Fig. 14.</b> Cromatograma de la cepa met-25 por HPLC.	49
<b>Fig. 15.</b> Cromatograma de la cepa met-14 por HPLC.	49

<b>Fig. 16. Cromatograma de la cepa lej-14 por HPLC.</b>	<b>50</b>
<b>Fig. 17. Cromatograma de la cepa met-5 por HPLC.</b>	<b>50</b>
<b>Fig. 18. Cromatograma de la cepa 25-2 por HPLC.</b>	<b>51</b>
<b>Fig. 19. Cromatograma de la cepa parental fus 15-1 por HPLC.</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Carotenoides permitidos como aditivos en alimentos.	6
<b>Cuadro 2.</b> Ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria a metirapona, cepa 25-2.	26
<b>Cuadro 3.</b> Ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria a metirapona, cepa fus 15-1.	26
<b>Cuadro 4.</b> Tiempo óptimo de mutación de la cepa 25-2 y fus 15-1.	27
<b>Cuadro 5.</b> Parámetros cinéticos de las cepas mutantes derivadas de la cepa parental 25-2.	29
<b>Cuadro 6.</b> Parámetros cinéticos de las cepas mutantes derivadas de la cepa parental fus 15-1.	31
<b>Cuadro 7.</b> Parámetros cinéticos de la primer selección de las cepas mutantes derivadas de la cepa 25-2.	33
<b>Cuadro 8.</b> Parámetros cinéticos de la primer selección de las cepas mutantes derivadas de la cepa fus 15-1.	33
<b>Cuadro 9.</b> Parámetros cinéticos de las cepas mutantes sobreproductoras de astaxantina derivadas de la 25-2 YM.	36
<b>Cuadro 10.</b> Parámetros cinéticos de las cepas mutantes sobreproductoras de astaxantina derivadas de la cepa 25-2 en medio de Yuca.	36
<b>Cuadro 11.</b> Parámetros cinéticos de las cepas mutantes sobreproductoras de astaxantina derivadas de la cepa fus 15-1 en medio de YM.	37
<b>Cuadro 12.</b> Parámetros cinéticos de las cepas mutantes sobreproductoras de astaxantina derivadas de la cepa fus 15-1 en medio de Yuca.	37
<b>Cuadro 13.</b> Comparación de la concentración de astaxantina por HPLC y la concentración de pigmentos totales por espectrofotometría.	47

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMV	Ácido mevalónico
ATP	Adenosin trifosfato
ARN	Ácido ribonucleico
°C	Grados Celsius
CMI	Concentración mínima inhibitoria
D	Dextrógiro
DCD	3,3'-dihidroxi-g-caroteno-4,4'-diona
DiOC6	Yoduro de 3,3'-dihelixocarbocianina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNS	Dinitro salicílico
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Etilendiamina-ácido tetraacético
FDA	Administración de drogas y alimentos de Estados Unidos
g	Gramos
GGPP	Genarilgenaril pirofosfato
h	Horas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
JRA	Jugo residual de alfalfa
KCN	Cianuro de potasio
Kg	Kilogramo
L	Litro
LSD	Diferencia mínima significativa
mg	Miligramo
µg	Microgramo
µ	Velocidad específica de crecimiento
ml	Mililitro
µl	Micro litro
M	Molar
min.	Minuto
nm	Nanómetro
NTG	Nitrosoguanidina
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundo
sp	Especie
TLC	Cromatografía en capa fina
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
YNB	Base nitrogenada de levadura
Yp/x	Rendimiento producto/biomasa
Yx/s	Rendimiento biomasa/sustrato

## I. ANTECEDENTES

La calidad de los alimentos, además de sus características microbiológicas, esta determinada por sus propiedades organolépticas: color, sabor, textura y valor nutritivo. Dependiendo del alimento en particular, estos factores pesan en grado diverso al evaluar la calidad global del producto. Sin embargo, uno de los más importantes atributos de la calidad sensorial de un alimento es su color. El color de los alimentos es un factor importante para su aceptación, ya que la asociación entre el color y su preferencia por el consumidor es universal; aunque existen diferencias significativas dependiendo de las condiciones geográficas, étnicas, históricas y sociales, cambiando de esta manera los criterios de calidad (Baudi, 1990).

Debido al papel tan relevante que los colorantes han desempeñado como aditivos en los alimentos procesados, fue necesario crear medidas de control sobre su uso en alimentos de consumo humano. Fue así como a principios de siglo nació la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA). Organismo que hasta la fecha se encarga de regular la aplicación de los diversos compuestos entre ellos los colorantes tanto naturales como sintéticos. Sin embargo, las restricciones sobre el uso de los colorantes sintéticos va en aumento, debido a los efectos adversos que estos compuestos tienen sobre la salud humana, por lo que el interés se esta enfocando cada vez mas hacia los colorantes naturales (Dziezak, 1987).

Las principales clases de colorantes naturales que están permitidos como aditivos en la industria alimentaria son: carotenoides y sus derivados cetónicos o hidroxílicos, extractos de remolacha, antocianinas, riboflavinas, cochinilla, clorofila y sustancias alimenticias coloridas tales como pimientos, azafrán y otros.

Los carotenoides han despertado un gran interés en los últimos 25 años, como aditivos en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmetológica (Shane, 1980).

## 1.1 PIGMENTOS CAROTENOIDES

Es un grupo de compuestos principalmente lipídicos, distribuidos ampliamente en la naturaleza, tanto en el reino vegetal como el reino animal y responsables de una variedad de colores que van desde el amarillo hasta el rojo. Estas sustancias comprendidas bajo la denominación de carotenoides solo pueden ser sintetizadas en las plantas y llegan a los tejidos animales a través de los alimentos en donde pueden ser modificados o acumulados. Un ejemplo bien conocido es el huevo de gallina cuya yema debe su color a los carotenoides (Frederick, 1994).

## 1.2 ESTRUCTURA DE LOS CAROTENOIDES

Los carotenoides están formados por ocho unidades isopropenoides, que llegan a constituir esqueletos de 40 átomos de carbono, que pueden ser cíclicos o terminados por uno o dos grupos terminales acíclicos.

Los carotenoides se dividen en dos grupos principales: los carotenos que constituyen una clase de hidrocarburos no sustituidos y las xantofilas, que son compuestos sustituidos de funciones oxígeno (grupos hidroxilo, epoxi y oxo) (Figura 1) (Nelis y Leenher 1991).

## 1.3 DISTRIBUCIÓN DE LOS CAROTENOIDES

Los carotenoides pueden presentarse en forma libre en los tejidos vegetales (cristales o sólidos amorfos) o en disolución de lípidos, se encuentran también como ésteres de ácidos grasos como en el pimentón, en donde la capsantina se halla en forma de éster en el ácido láurico. La combinación de los carotenoides con azúcares ocurre mediante enlaces glucosídicos como la crocina que es el primer pigmento del azafrán. La asociación de carotenoides con proteínas es muy frecuente en invertebrados, la astaxantina, pigmento de color rojo-naranja, se encuentra presente en el caparazón de la langosta, cangrejo y camarón. También en animales superiores, es común encontrar complejos de caroteno-proteína en el músculo y en la piel de algunos peces como el salmón, trucha y el pez japonés *Carassius auratus* y en aves como los flamings y el iris escarlata (Romero y col., 1992).

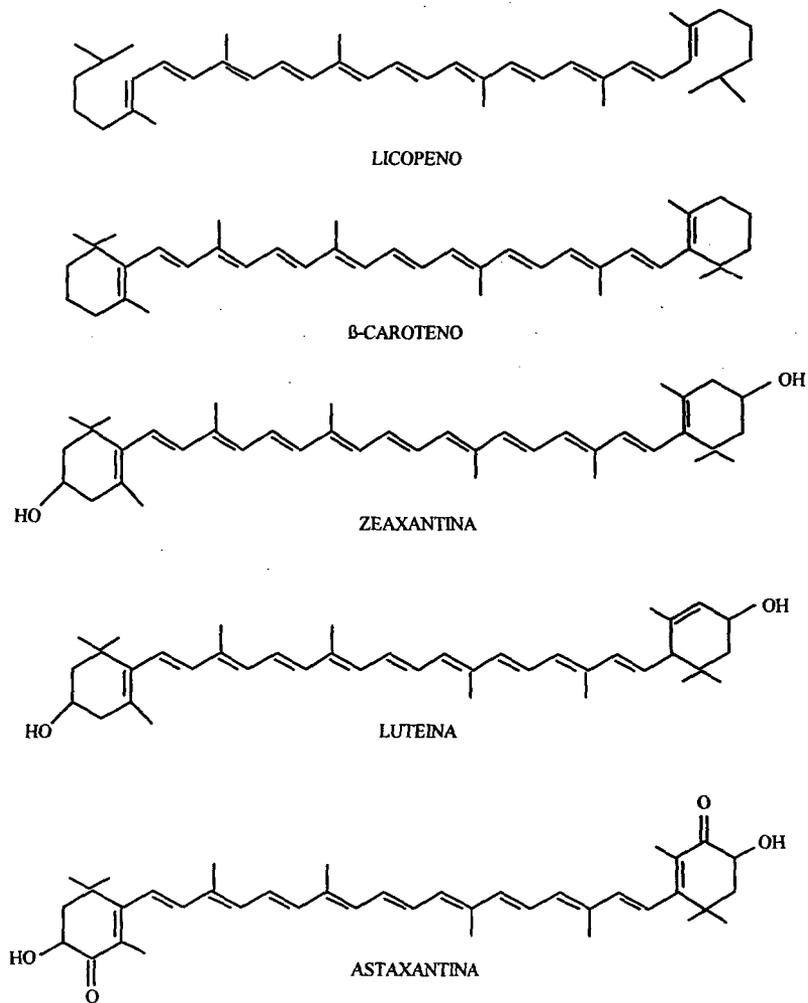


Figura 1. Estructuras de isómeros configuracionales de astaxantina.

#### **1.4 FUNCIÓN DE LOS CAROTENOIDES**

La función mejor conocida de los carotenoides  $\alpha$ ,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina es la de actuar como precursores de la vitamina A. Los humanos y los animales convierten estos derivados en retinal y posteriormente a retinol (vitamina A). De la misma manera la astaxantina y la zeaxantina actúan como precursores de la vitamina A en la trucha arco-iris y la luteína es un precursor del 3-dehidroretinol que es la vitamina A en peces y el 3-hidroretinol en insectos (Schiedt y col., 1985).

También los carotenoides son efectivos antioxidantes al atrapar radicales libres de oxígeno que generalmente se producen por las radiaciones solares, los cuales son irreversibles y pueden causar epidermitis, fotoenvejecimiento y cáncer en la piel. También sirven para proteger a las plantas, a algunas bacterias y hongos del daño foto-oxidativo, actuando como una pantalla, protegiendo macromoléculas vitales y elementos celulares de los efectos dañinos de la luz ultravioleta y la luz visible (Terao, 1989).

#### **1.5 USO DE LOS CAROTENOIDES**

Debido a las excelentes propiedades pigmentantes y la amplia variedad de carotenos y xantofilas existentes en la naturaleza, estos compuestos tienen diversas aplicaciones tanto en la industria alimentaria como suplementos nutricionales y en la industria farmacéutica, como constituyentes de productos cosméticos.

Uno de los carotenos más importantes es el  $\beta$ -caroteno, precursor de la vitamina A, pero también tiene una capacidad pigmentante aunque limitada en el ganado lechero, ya que solo una parte de este se convierte en vitamina A y el resto es almacenado en los depósitos del tejido graso del cuerpo del animal, por esta razón, la manera más conveniente para mantener el color estándar de la manteca es agregando el pigmento durante el proceso de elaboración. (Bauernfeind y col., 1971).

Para las aves de corral los compuestos que poseen un alto valor pigmentante son algunos hidroxí y cetocarotenoides como la zeaxantina, la luteína y la astaxantina (Xantofilas), ya que el  $\beta$ -caroteno es convertido en vitamina A como en los mamíferos. Torrisen y col., (1989) observaron un mayor aumento en el crecimiento del salmón atlántico cuando su dieta fue suplementada con astaxantina.

Schiedt y col. (1985) utilizaron la astaxantina, cantaxantina y zeaxantina en la trucha arco-iris *Salmo gairdneri* y en el salmón atlántico *Salmo salar* con el objeto de determinar su capacidad pigmentante, ellos encontraron una mayor capacidad de fijación de la astaxantina comparada con la zeaxantina y cantaxantina, además estos pigmentos son precursores de la vitamina A1 y A en la trucha arco-iris.

## 1.6 FUENTES MICROBIANAS DE LOS CAROTENOIDES

1)  $\beta$ -caroteno: Se encuentra abundantemente en hongos pertenecientes a los Ficomycetos del orden Mucorales, estos microorganismos tienen la habilidad de acumular este pigmento en capacidades poco usuales. El segundo grupo más importante de microorganismos que contiene  $\beta$ -caroteno son las microalgas verdes como la *Dunaliella salina*.

2) Licopeno: El licopeno es un intermediario muy importante en la vía de síntesis de carotenoides. Este es metabolizado a xantófilos acíclicos o bien puede sufrir ciclización para dar lugar a  $\beta$ -caroteno y sus derivados oxigenados.

3) Luteína: Carotenoide típico de organismos fotosintéticos mayores, siendo abundante en algas verdes y plantas, pero no es encontrado en cianobacterias y bacterias fototrópicas. Por lo tanto entre los microorganismos solo las microalgas verdes se pueden considerar útiles en la producción de la luteína.

4) Zeaxantina: Así como la luteína, la zeaxantina, también es un pigmento cloroplastídico típico, pero su diferencia radica en que esta se encuentra en las cianobacterias y bacterias fototrópicas.

5) Cantaxantina: Este pigmento se descubrió en *Cantharellus cinnabarinus*, pero como este organismo no puede ser cultivado artificialmente, su potencial biotecnológico es virtualmente inexistente, por lo cual solo se considera con valor histórico.

6) Rodoxantina: Se ha identificado tentativamente en los metilótrofos no fotosintéticos como la *Pseudomonas extorquens*.

7) Astaxantina: Carotenoide que se muestra en el plumaje de muchas aves como el flamenco y el ibis escarlata, también en invertebrados marinos tales como el camarón, langosta, cangrejo y en los peces salmón y trucha, donde es el responsable del color de su carne (Goodwin, 1980).

En el Cuadro 1 se lista los principales carotenoides que son permitidos legalmente como aditivos en los alimentos para humanos y animales, con sus principales fuentes de obtención y áreas de aplicación.

**Cuadro 1.- PRINCIPALES CAROTENOIDES PERMITIDOS COMO ADITIVOS EN ALIMENTOS**

<b>Pigmento</b>	<b>Origen no microbiano</b>	<b>Origen Microbiano</b>	<b>Uso</b>
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	Zanahorias síntesis	<i>Blakeslea t.</i> <i>Dunaliella s.</i>	Colorante en alimentos
<b>Licopeno</b>	Tomates	<i>Blakeslea t.</i>	Colorante en alimento
<b>Luteína</b>	Alfalfa, maíz, girasol.	<i>Spongiooccume</i> <i>Chlorella p.</i>	Alimento de aves
<b>Zeaxantina</b>	Luteína	<i>Flavobacterium, sp.</i>	Alimento de aves y peces
<b>Cantaxantina</b>	Crustáceos, plumas de aves síntesis	<i>C. cinnabarinus</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Rhodococcus m.</i>	Alimento de aves y peces
<b>Astaxantina</b>	Crustáceos, plumas de aves síntesis	<i>Mycobacterium l.</i> <i>Brevibacterium 103,</i> <i>Phaffia rhodozyma,</i> <i>Peniophora sp.</i>	Alimento de peces
<b>Rodoxantina</b>	Hojas de otoño, peces (Tilapia)	<i>Protomonas e.</i>	_____
<b>Capaxantina</b>	Capsicum annuum	_____	Colorante en alimentos y alimentos de aves
<b>Bixina</b>	Bixa orellana (anato)	_____	Colorante en alimentos y alimento de aves

Goodwin (1980, 1984); Klaui y Bauernfied (1981); Marusich y Bauernfied (1981).

## 1.7 FUENTES DE OBTENCIÓN DE ASTAXANTINA:

Las principales formas de obtención de astaxantina son a partir de la síntesis química o de fuentes naturales.

### 1.7.1 Síntesis Química:

Hoffman-La Roche comercializa desde hace muchos años la trans-astaxantina, la cual es vendida bajo el nombre comercial Carophyll pink, la astaxantina sintética es ahora la principal fuente usada en la alimentación para peces.

### 1.7.2 Fuentes Naturales

Crustáceos y sus derivados: Algunos investigadores han evaluado a los crustáceos y sus derivados como fuentes de astaxantina. Actualmente en Noruega se están utilizando los desperdicios del camarón de la especie *Pandalus borealis* como fuente de pigmento para la coloración de la carne de la trucha y el salmón. La astaxantina es obtenida por un método de secado; pero los niveles de carotenoides en estas preparaciones son bastante bajas (un máximo 200µg/k de astaxantina), teniendo un alto nivel de desperdicios como ceniza, quitina y humedad, con pocos nutrientes y proteínas (Lambertsen y Brackkan, 1971).

Algas: ciertas algas verdes del subphylum Chlorophyceae poseen astaxantina como su principal carotenoide, pero presentan una forma enquistada rodeada por una pared celular gruesa la cual limita su aplicación (Johnson y An, 1991).

Levaduras: La cepa silvestre *Phaffia rhodozyma* contiene arriba de 300 µg de carotenoides por gramo de levadura seca, siendo de esta del 40 a 95% astaxantina. El contenido de la astaxantina varía considerablemente dependiendo de la cepa y del método de cultivo (Johnson y col. 1980).

Bacterias: Recientemente se aisló la bacteria marina *Agrobacterium aurantiacum*, este organismo produce astaxantina y 4-cetozeaxantina como sus principales carotenoides (Yokoyama y col. 1994).

Otros organismos: Se ha reportado que algunas bacterias como *Micobacterium lacticola* y *Brevibacterium* sp y algunos hongos del genero *Pheniophora* contienen astaxantina. Las xantofilas más importantes industrialmente son la cantaxantina y la zeaxantina producidas por los microorganismos *Brevibacterium* y *Flavobacterium*, pero la productividad es baja para el desarrollo de un proceso comercial (Nelis y Leenher 1989).

### 1.7.3 Producción industrial de Astaxantina

Los pigmentos carotenoides poseen variadas aplicaciones en la industria alimenticia, como suplementos nutricionales, mientras que en la industria cosmetológica y farmacéutica son utilizados como antioxidantes.

La producción de peces acuacultivados representó en 1988 entre el 10 y 15% de los alimentos marinos consumidos en el mundo (Rumsey, 1988), y el salmón es uno de los más importantes.

En la alimentación de la mayoría de los peces de granja se esta utilizando astaxantina y cantaxantina sintéticas, sin embargo los costos de estos pigmentos son muy elevados. Hoffman-La Roche produce cantaxantina sintética, la cual se vende alrededor de \$ 1500 dólares americanos/kg, mientras que la astaxantina sintetizada químicamente se vende entre \$ 2000 y \$ 2500 dólares americanos/Kg (base seca), en gránulos que contienen 5% de astaxantina la cual es estabilizada agregando gelatina, sacarosa, fécula de maíz, palmitato de ascorbilo, entre otros (Bernhard, 1991).

Normalmente el rango del contenido de astaxantina que se encuentra en los salmónidos es de 3 a 37 mg/k. Niveles mayores de 3 mg de astaxantina han sido reportados como los mas adecuados para causar una impresión visual satisfactoria en la carne de pescado pero el nivel de los carotenoides puede disminuir debido a la oxidación o isomerización durante el manejo (Johnson y An, 1991).

La utilización de los pigmentos del salmón es una práctica cara, la astaxantina es uno de los componentes más costosos de la alimentación de los salmones conformando de un 10 a un 15% del costo total de la alimentación. Se ha reportado que más de 6,000 kg de pigmentos carotenoides fueron utilizados en la alimentación de salmónidos criados en granjas en 1986 y más de 15,000 en 1990; basándose en la tendencia de producción es de suponerse que posiblemente más de 100,000 kg serán requeridos para el año 2000 (Torrissen y col. 1999). Esta demanda potencial puede abrir un gran mercado para la producción microbiana de astaxantina. Es por ello que varias compañías están investigando la producción de astaxantina por medio de fuentes naturales.

## 1.8 CARACTERISTICAS DE LA LEVADURA *Phaffia rhodozyma*

La levadura *P. rhodozyma* fue aislada durante los años 70' por Phaff y col. (1972) de las hojas secas de los árboles de Japón y Alaska, estos autores reconocieron en la levadura varias características muy peculiares, la mas importante era que las colonias presentaban una coloración que variaba del rojo al naranja, debido a los pigmentos carotenoides presentes.

El genero *Phaffia* se caracteriza por la síntesis de pigmentos carotenoides, por su capacidad de fermentar azucares, por la producción de compuestos amiloides asociados a la superficie celular, además de que crece en un rango de temperatura de 0 a 27°C, mientras que la síntesis del pigmento las realiza entre 18 y 22°C. Otras propiedades pertinentes incluye la capacidad para asimilar compuestos de varias fuentes de carbono incluyendo la D-glucosa, maltosa, sacarosa, celobiosa, trealosa, refinosa, almidón soluble, etanol, metil glucósido, D-manitol, salicina, 2-cetogluconato, succinato y glicerol. La *P. rhodozyma* no crece en lactosa, galactosa, glucosalina, D-ribosa o D-arabinosa y no utiliza nitrato, pero hidroliza la urea (Millar y col., 1976).

*Phaffia rhodozyma* es una levadura de origen basidiomiceto, aunque su ciclo sexual no se ha demostrado aun, este genero también se relaciona filogenéticamente con otras levaduras imperfectas formadoras de carotenoides como la *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y otras levaduras heterobasidiomicetas. *Phaffia* puede distinguirse del genero *Rhodotorula* por su producción de compuestos amiloides y su capacidad de fermentar azucares. Del genero *Cryptococcus* también por la fermentación de azucares, pero la mayor propiedad que mas distingue a *Phaffia* es la composición de sus carotenoides ya que presenta a astaxantina como su principal pigmento, por lo tanto *P. rhodozyma* es potencialmente útil para la industria de la acuicultura como una fuente natural de astaxantina, lípidos insaturados, proteínas, vitaminas y otros nutrientes requeridos para el crecimiento (Miller y col., 1976).

### 1.8.1 Composición química

Johnson y col. (1991) determinaron en *P. rhodozyma* el contenido de aminoácidos presentes, así como la identificación de ácidos oleico y linoleico siendo los ácidos grasos predominantes. Además de que esta levadura contiene el 6% de ceniza y el 4.8% de nitrógeno, el 40% de carbohidratos totales (un valor muy alto, lo que refleja una pared celular gruesa) y el 17% de lípidos (un porcentaje mucho mayor que lo contenido en la mayoría de las levaduras).

### 1.8.2 Biosíntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*

La astaxantina es un tetraterpenoide producido a partir de la vía metabólica de mevalonato, donde el ácido mevalónico es el primer precursor de la unidad isopreno, convirtiéndose a farnesil pirofosfato a través de una serie de tres activaciones sucesivas mediante la aceptación de 3 grupos fosfatos donados por el adenosin trifosfato (ATP).

Generalmente, las vías que se han propuesto se basan en una secuencia lógica de eventos biosintéticos: desaturación, ciclización y oxigenación. Las enzimas que catalizan estos pasos aun no han sido aisladas de los organismos productores de astaxantina, por lo que la secuencia actual de reacciones y formación de precursores continua siendo desconocida. Al parecer la levadura *P. rhodozyma* sintetiza astaxantina a partir del  $\beta$ -caroteno utilizando diferentes intermediarios. Adrewes y col. (1976), propusieron la formación de astaxantina a partir del neurosporeno, donde fiteno se convierte a neurosporeno al ocurrir tres deshidrogenizaciones sucesivas, así el neurosporeno se convierte a licopeno mediante una deshidrogenización mas, en el licopeno se presentan dos ciclizaciones de ordenación  $\beta$  y se transforma en  $\beta$ -caroteno. El  $\beta$ -caroteno se convierte primeramente a equinona y la equinona es hidroxilada a 3-hidroxi equinona (3-hidroxi- $\beta$ , $\beta$ -caroteno-4-ona), este intermediario es oxidado a fenicoxantina (3-hidroxi- $\beta$ , $\beta$ -caroteno-4,4-diona), el cual es hidroxilado en el C3' para formar astaxantina (Figura 2).

An y col. (1989) aislaron dos carotenoides que no habían sido detectados en *P. rhodozyma*, los cuales fueron identificados como 3,3-dihidroxi- $\gamma$ -caroteno-4,4-diona (DCD) y toruleno. El aislamiento de estos carotenoides sugiere una vía biosintética alterna partiendo del HDCO: toruleno, 4-cetotoruleno en mutantes amarillas de *P. rhodozyma*, indica que estos componentes muestran dos vías de biosíntesis de xantofilas, una de las cuales tiene un precursor bicíclico y otro precursor monocíclico.

Jonhson y Lewis (1979), detectaron  $\beta$ -zeacaroteno en esta levadura, pero solo en condiciones estresantes de cultivo utilizando un pH bajo, ellos propusieron una vía metabólica partiendo del neurosporeno para formar  $\beta$ -caroteno (Figura 2).

### 1.8.3 Localización celular de la astaxantina

Es de considerable importancia la localización de los carotenoides para el desarrollo de mutantes que produzcan altas cantidades de estos. Los carotenoides son productos intracelulares localizados en organelos que están expuestos a altas intensidades de luz como los cromoplastos, mitocondrias y membranas. Por lo tanto, la concentración máxima de astaxantina depende de la

localización celular.

En algunos organismos, los carotenoides se localizan en glóbulos de lípidos y en las mitocondrias, en otros como *Neurospora crassa* se localizan en una fracción del retículo endoplásmico (Mitzka y Rau 1981).

En el caso de la *P. rhodozyma* la localización celular de la astaxantina es desconocida, aunque se ha reportado que esta no se encuentra en mitocondria o en retículo endoplasmático, esto fue demostrado por tinción de ioduro de 3,´dihexilcarbocianina (DiOC6) seguido por fotoblanqueado y por comparación de patrones de fluorescencia antes y después del blanqueado (Butt y col., 1989).

Otros estudios de análisis de microscopia electrónica de transmisión en mutantes sobreproductoras de carotenoides en *P. rhodozyma* sugieren que estos compuestos están asociados con las mitocondrias y con los glóbulos lipídicos en los pasos iniciales de la carotenogénesis, los cuales se dispersan a la membrana celular con la edad de la células (Johnson y An 1991).

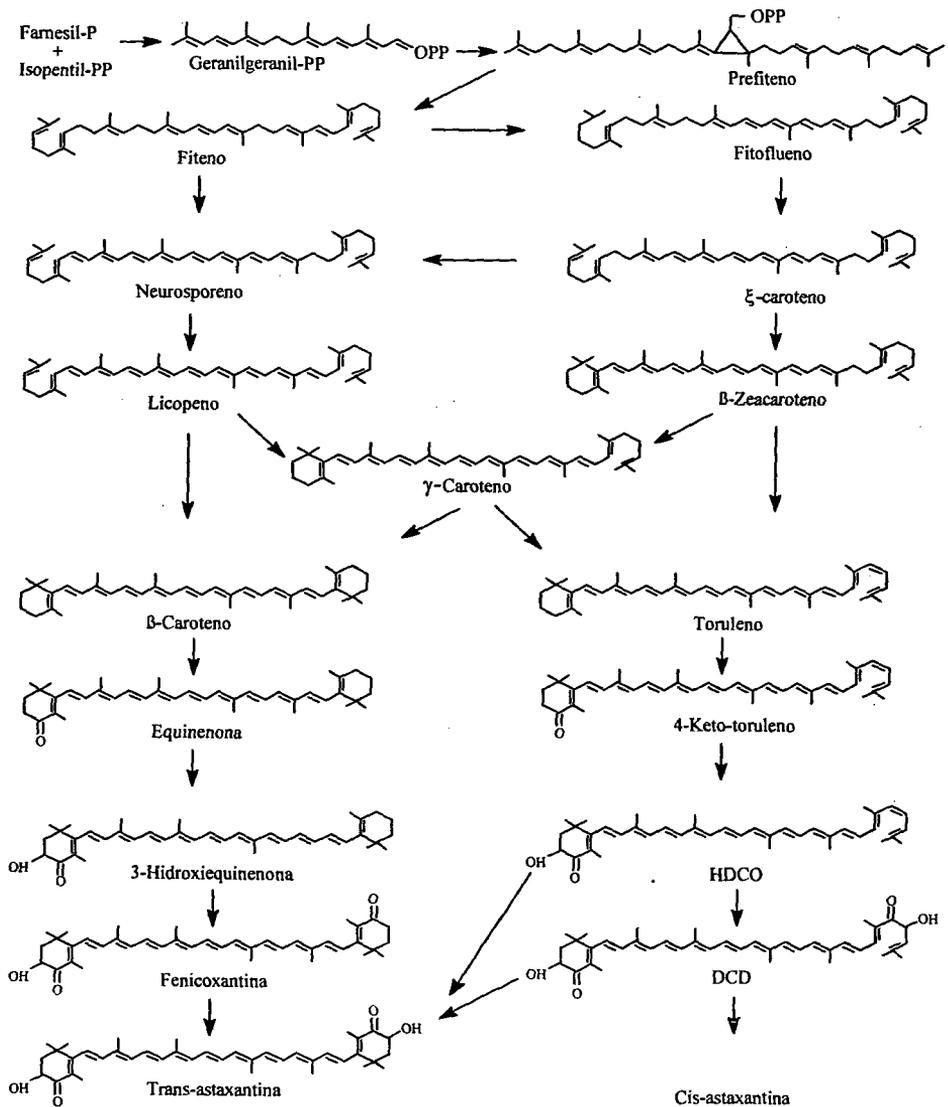


Figura 2. Vía biosintética de astaxantina en *Phaffia rhodozyma*. El diagrama de la izquierda representa la vía originalmente propuesta por Andrews (1976), para la cepa 67-210. El esquema de la derecha representa una posible vía alterna.

#### 1.8.4 Inhibición química de la biosíntesis de astaxantina

Las principales enzimas de la vía de la síntesis de astaxantina, son inhibidas por la acción de diversos compuestos químicos que provocan un bloqueo en la vía y la consecuente acumulación del precursor.

El uso de inhibidores de la vía carotenogénica no solo ha sido muy importante para la comprensión de la secuencia de eventos biosintéticos que ocurren durante la síntesis de los carotenoides, sino que además han sido utilizados exitosamente como agentes selectivos para aislar mutantes sobreproductoras de astaxantina.

Las principales enzimas de la vía de síntesis de los carotenoides son afectadas por la acción de diversos inhibidores (Johnson y An 1991).

- 1.- Fiteno desaturasa es inhibida por: norflurazona, difenilamina y  $\beta$ -ionona.
- 2.-  $\gamma$ -caroteno desaturasa inhibido por: amitrol, N-metil-carbamato y metoxifenona.
- 3.- Licopeno ciclasa inhibido por:  $\alpha$ -picolina, nicotina e imidazoles.
- 4.-  $\beta$ -caroteno hidroxilasa afectada por: piperonilbutoxido y metirapona.

La metirapona es (2-metil-1,2-di-3-piridil-1-propanona) es un compuesto que actúa inhibiendo la acción de la  $\beta$ -caroteno hidroxilasa última enzima de la vía de la síntesis de astaxantina, la cual cataliza la conversión de  $\beta$ -caroteno a astaxantina (Johnson y col., 1991). Las levaduras en presencia de metirapona muestran una coloración amarilla, producto de la acumulación del  $\beta$ -caroteno.

#### 1.8.5 Mejoramiento genético

Comúnmente la producción industrial de *Phaffia rhodozyma* esta limitada debido a las bajas temperaturas de crecimiento de esta levadura y especialmente a los pobres rendimientos de astaxantina obtenidos por la cepa silvestre, por lo cual se han desarrollado un gran número de estudios para mejorar la eficiencia de este organismo como pigmentador en las dietas de salmónidos y crustáceos, así como la alimentación de aves de corral. Entre las líneas de investigación más importantes que se han desarrollado se encuentra el mejoramiento genético de la levadura (Fang y Cheng 1993).

Actualmente existen tres métodos que pueden ser utilizados para el mejoramiento genético de levaduras asexuales como lo es *P. rhodozyma*, estos son: mutagénesis, recombinación de mutantes e ingeniería genética.

La mutación génica implica que el material genético pueda sufrir algún tipo de cambio que da por resultado la producción de un fenotipo alterado.

La mutación puede definirse, por lo tanto, como el evento que da lugar a una alteración en el ADN, el cual es heredable. Las mutaciones pueden dividirse en dos clases principales, las que involucran un cambio en la estructura o en el número de cromosomas y las que involucran el cambio en un solo gen, esta última representa cambios a nivel de unos pocos nucleótidos dentro de la molécula de ADN. Las mutaciones pueden ser inducidas por una gran variedad de agentes físicos como la luz ultravioleta y radiaciones gamma. Los agentes químicos son la nitrosoguanidina y el etil etano sulfonato, estos dos compuestos producen mutaciones al azar dentro del genoma del microorganismo.

Prácticamente todos los mutantes producidos después del tratamiento con el agente mutagénico, tienen efectos genotípicos no adaptativos o nocivos. Sin embargo, en raras ocasiones un mutágeno produce mutantes con una ventaja adaptativa lo cual puede ser transmitida a otras generaciones.

La Mutagénesis en *P. rhodozyma* puede producir mutantes con niveles de astaxantina mucho más altos. Johnson y col. (1989) reportaron una producción de más de 1000 µg de astaxantina por gramo de levadura. Lewis y col. (1990), obtuvieron cepas mutantes sobreproductoras de astaxantina resistentes a β-ionona. Fang y Cheng en 1993, aislaron cepas mutantes resistentes a β-ionona, las cuales produjeron hasta tres veces más astaxantina que la cepa parental. Chumpolkulwong y su grupo de investigadores (1997) obtuvieron mutantes con una producción de astaxantina de más de 2 veces con respecto a la parental, utilizando como agente selectivo a la difenilamina. Tjanono y col., (1994) obtuvieron una serie de mutantes resistentes a inhibidores de la biosíntesis de carotenoides en el alga verde *Hematococcus pluvialis*, usando como agentes selectivos a los inhibidores norflurazona, fluridona y nicotina.

Girard y col., (1994) identificaron los compuestos carotenoides existentes en *P. rhodozyma* como el β-caroteno, fiteno y algunos otros compuestos carotenoides, estas cepas son el resultado de las alteraciones en algún nivel de la vía para la formación de astaxantina.

## II. JUSTIFICACIÓN

El rápido crecimiento de la industria acuícola, avícola y la estricta regulación en la utilización de pigmentos sintéticos impuesta por la FDA, han incrementado la búsqueda de nuevas fuentes de obtención de pigmentos naturales, por lo tanto es necesario desarrollar procesos de producción industrial mediante el uso de microorganismos. *P. rhodozyma* se destaca por ser una de las mejores fuentes microbianas para proveer astaxantina, sin embargo la producción industrial de astaxantina en *P. rhodozyma* aun no es factible económicamente, debido al bajo nivel de síntesis del pigmento (300 µg de astaxantina por gramo de levadura). De aquí la importancia de desarrollar procesos para incrementar la producción de astaxantina en *P. rhodozyma* utilizando técnicas de mutación para la obtención de cepas sobreproductoras.

### III. HIPÓTESIS

La mutagénesis de *P. rhodozyma* y la utilización de un agente selectivo (metirapona), permitirá obtener cepas con mayor capacidad de producción de astaxantina.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Obtener cepas mutantes de *Phaffia rhodozyma* resistentes a metirapona y sobreproductoras de astaxantina.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 4.1 Obtener por lo menos 30 cepas mutantes de *P. rhodozyma* resistente a metirapona.
- 4.2 Caracterizar cada una de las cepas mutantes de acuerdo a la producción de astaxantina y biomasa.
- 4.3 Caracterizar los pigmentos producidos por las cepas mutantes sobreproductoras de astaxantina seleccionadas.

## V. MATERIAL Y METODOS

### 5.1 MICROORGANISMOS

Se trabajo con las cepas mutantes 25-2 y fus 15.1 de *Phaffia rhodozyma*, ambas pertenecientes a la colección de microorganismos del Departamento de Biotransformación Microbiana del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

### 5.2 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para la propagación de las levaduras se utilizaron como medios de cultivo caldo YM y medio de Yuca, la temperatura del microorganismo en incubación fue de 22°C y la velocidad de fijación de 300 rpm.

El caldo YM fue compuesto de extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, peptona bacteriológica 5 g/L, dextrosa anhidra 10 g/L.

El medio de Yuca fue constituido por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/L, como fuente de carbono se utilizo el jarabe de datil de la palma china (*Yucca fillifera*) a una concentración de azucars reductores de 15 g/L. Este medio solo se utilizo para la caracterización de las cepas mutantes sobreproductoras de astaxantina.

La esterilización de los medios de cultivo y del material se realizo en autoclave a 1 k/cm<sup>2</sup> de presión por 15 min.

Para la conservación de las cepas mutantes, las levaduras fueron sembradas en cajas con agar YM el cual fue constituido de extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, peptona bacteriológica 5 g/L, dextrosa anhidra 10 g/L y agar 20 g/L. Incubadas a 22°C durante 5 días, las cuales transcurrido este tiempo fueron almacenadas a 4°C y resembradas cada 20 días.

### 5.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA A METIRAPONA (CMI)

Previo a la mutación y selección de mutantes en presencia del inhibidor se desarrollo un ensayo de la concentración mínima inhibitoria a metirapona (CMI). Se preparo una solución de metirapona en etanol anhidro a una concentración de 50 µg/mL, la cual sirvió como solución madre para la

preparación de las cajas. Se inoculo una azada de la cepa 25-2 y fus 15.1 en tubos con 10 mL de caldo YM. Se incubaron durante 24 h y posteriormente se tomo una alícuota (100  $\mu$ L) de cada suspensión celular y se sembró en placas de agar YM con concentraciones crecientes del inhibidor desde 200 hasta 2,000  $\mu$ g/mL, con aumentos de 200  $\mu$ g/mL.

#### **5.4 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE EXPOSICIÓN CON LA N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG)**

Se determino el tiempo óptimo de incubación de las levaduras con el NTG para obtener una mortalidad del 90 al 95%. La mutagénesis se realizo según la técnica de An y col., (1989). Se crecieron las levaduras por 24 h el cultivo fue ajustado a una densidad óptica de 1.5 a 2.0 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2. Se tomo una muestra de 6.7 mL y se sedimento a 15,000 rpm durante 3 min en una microcentrífuga Eppendorf, las células se lavaron dos veces con citrato de sodio 0.01 M, con un pH de 5.5 y al final de los lavados se ajusto la muestra a 6.7 mL con esta misma solución. Después se añadió 280  $\mu$ L de la solución de NTG a una concentración de 1 mg/mL en citrato de sodio (0.1 M), y un pH de 5.5. El tiempo máximo de exposición de las levaduras con el mutágeno fue de 15 min, cada 5 min se tomo una muestra de 1 mL, la cual se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se centrifugo por 3 min a 15,000 rpm. Las células fueron descontaminadas con caldo YM, al final de los lavados, las levaduras expuestas al NTG fueron sembradas en placas con agar YM e incubadas de 5 a 7 días para el conteo de las colonias con las condiciones ya mencionadas.

#### **5.5 OBTENCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES A METIRAPONA**

Una vez encontrado el tiempo optimo de exposición al mutágeno, se procedió a realizar la mutagénesis. Se crecieron las levaduras en 10 mL en caldo YM por 24 h y se ajusto su densidad óptica de 1.5 a 2.0 (600 nm), después se tomo 6.7 mL del cultivo y se lavo dos veces con citrato de sodio (0.01 M y pH 5.5), al final de los lavados se ajusto el volumen a 6.7 con esta misma solución y se adiciono el NTG durante el tiempo de exposición optimo encontrado. Al finalizar este tiempo las levaduras fueron descontaminadas con caldo YM, sembradas en tubos que contenían 5 mL de caldo YM y crecidas durante 24 h. Posteriormente la levaduras mutantes se resembraron en las placas de agar YM que contenían la concentración mínima de metirapona y se incubaron por 7 días para la selección de las mismas.

## 5.6 SELECCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES A METIRAPONA

Las colonias mutantes que presentaron pigmentación rojo-naranja sobre las placas de agar YM con metirapona fueron seleccionadas como posibles cepas sobreproductoras de astaxantina y sembradas en agar YM para su posterior caracterización.

## 5.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS PIGMENTOS PRODUCIDOS POR LAS CEPAS MUTANTES SELECCIONADAS

Todas las cepas seleccionadas como posibles sobreproductoras de astaxantina fueron estudiadas para evaluar su capacidad de crecimiento y producción de astaxantina. Se realizaron cinéticas de crecimiento y producción de pigmento en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo YM, inoculados con 5 mL de suspensión celular, crecida por 24 h.

En cada cinética se realizaron los siguientes técnicas analíticas:

### 5.7.1 Cuantificación de crecimiento celular.

La formación de biomasa fue cuantificada por dos métodos.

- a) El crecimiento fue monitoreado midiendo la absorbancia de cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro.
- b) La cuantificación de peso seco se realizó tomando 10 mL de la muestra y se sedimentó por centrifugación a 5,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se decantó y la pastilla celular se lavó con 5 mL de agua destilada, previo a este procedimiento se colocaron las charolas de aluminio en una estufa a 65°C por 24 h para obtener el peso constante, después se transfirieron a un desecador y se pesaron en una balanza analítica. Posteriormente, se les añadió la suspensión celular y se regresaron las charolas a la estufa por 24 h más, a la misma temperatura. Transcurrido el tiempo se volvió a pesar las charolas con las células secas. La diferencia entre el peso de la charola con las células secas y el peso constante representa el peso seco de las células en gramos por litro.

$$\text{PESO SECO (g/L)} = [Y/10]1000$$

Y = peso de la charola con la muestra - peso constante de la charola.

### 5.7.2 Cuantificación de los azúcares reductores por el Método del ácido dinitrosalicílico.

Fundamento del análisis: Miller (1959), utilizó la reacción del 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS) para determinar cuantitativamente los azúcares reductores. El DNS tiene la capacidad de reducir uno de los extremos de azúcar durante el proceso reductor el 3,5 ácido dinitrosalicílico se transforma en ácido 3-amino, 5 nitrosalicílico, esta transformación va acompañada de un cambio en la coloración la cual es cuantificada por su absorbancia a 550 nm.

Reactivos:	g/L
NaOH	10
3,5 Dinitrosalicílico	10
Tartrato de Na y K	200
Fenol	2
Metabisulfito de Na	0.5

#### Preparación:

Los reactivos se disolvieron en 700 ml de agua destilada, dejando al final el 3,5 dinitrosalicílico, el cual se adicione poco a poco para evitar la saturación de la solución, una vez que los componentes estuvieron bien disueltos se aforo a 1000 ml con agua destilada.

#### Solución patrón de glucosa:

Se peso exactamente 1.0 g de glucosa anhidra, se diluyo en 700 ml de agua destilada y se aforo a 1000 ml con agua destilada.

#### Curva Patrón:

De la solución de glucosa se prepararon varias concentraciones de glucosa desde 0.1 a 1.0 g/L en tubos de ensayo.

#### Procedimiento de la prueba de DNS:

Se adicione en tubos de ensayo 0.5 ml de muestra con 1.5 ml de la solución de DNS, la mezcla se agito y los tubos fueron colocados en un baño de agua a punto de ebullición, durante 15 min. Después de este tiempo, se dejo enfriar las muestras a temperatura ambiente y se agrego 8 ml de agua destilada. Se leyó a una absorbancia de 550 nm.

#### Calculo:

De acuerdo a la curva patrón de glucosa se realizo un análisis de regresión lineal para determinar cuantitativamente los azúcares reductores.

### 5.7.3 Extracción, cuantificación y caracterización de los carotenoides producidos

5.7.3.1 Cuantificación por espectrofotometría de la astaxantina (Sedmak y col., 1990).

5.7.3.2 Cuantificación de Astaxantina por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

La extracción de los pigmentos carotenoides presentes en las levaduras se realizó de acuerdo a la técnica reportada por Sedmak y Jolly (1990).

Reactivos:

Dimetil sulfóxido (DMSO)

Fosfato de Sodio 0,01 M, pH 7.0

Solución de Acetato de etilo y hexano 1:1

Procedimiento:

Al tiempo final de cada cinética de crecimiento se tomo una muestra de 0.5 ml, la cual se transfirió a un tubo eppendorf y se lavaron las células con agua destilada dos veces (15,000 rpm por 3 min). El sobrenadante se decanto y el exceso de agua presente en el tubo se removió con papel absorbente.

Posteriormente se agrego 0.5 ml de DMSO previamente calentado a 55°C, homogenizando la muestra por 1 min en vortex, después se le añadió 0.1 ml de fosfato de sodio y 1 ml de acetato de etilo y hexano, la muestra se agito por 1 min y se centrifugo por 30 segundos para la separación de la fase orgánica y la acuosa, los pigmentos carotenoides presentes en la fase orgánica fueron cuantificados midiendo la absorbancia a un longitud de onda de 480 nm en celdas de cuarzo y sustituyendo el valor de la absorbancia en las siguientes ecuaciones:

$$\mu\text{g de astaxantina / L de medio de cultivo} = [A] [V_1] [1 \times 10^9] / [E] [L] [V_2]$$

A: Absorbancia de muestra (480 nm)

V<sub>1</sub>: Volumen de sobrenadante (L)

E: Coeficiente de extinción (215)

L: Longitud de la celda (1 cm)

V<sub>2</sub>: Volumen inicial de la muestra (0.5 ml)

$$\mu\text{g de astaxantina / g de levadura} = [V_i] [A] [100] / [E] [P]$$

- V<sub>i</sub>: Volumen de sobrenadante (L)  
P: Gramos de levadura seca que equivale al volumen de la muestra (0.5 ml)  
E: Coeficiente de extinción (215)  
A: Absorbancia de muestra (480 nm)

#### 5.7.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS PIGMENTOS PRODUCIDOS POR LAS CEPAS MUTANTES SOBREPDUCTORAS DE ASTAXANTINA

Para este objetivo se utilizaron las técnicas cromatografías de HPLC.

La cromatografía de HPLC se realizó en un cromatógrafo 126 dual pump module, Beckman 166 variable detector, UV 210A inyector automático, porta muestras y programador para la alimentación automática de la columna y determinación cromatográfica. Se utilizó una columna C-18 de fase reversa (ultrasphere ODS 5  $\mu$  de 4.6 mm x 25 cm). Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo-agua (9:1) e Isopropanol mezcladas en una proporción 80:20, a una velocidad de flujo 1 ml /min y una longitud de onda de 480 nm.

Extracción de los pigmentos carotenoides:

Se crecieron las levaduras por 72 h, en matraces de 250 ml. Se utilizó 50 ml de medio de Yuca con una concentración de 15 g/L de azúcares, después de este tiempo de crecimiento, se tomó 10 ml de muestra y se lavó dos veces con 5 ml de agua destilada, centrifugándose a 5,000 rpm durante 10 min.

La pastilla se resuspendió en 3 ml de acetona y en 2 g de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro) para el rompimiento celular con agitación durante 15 min en vortex. Una vez que las células fueron rotas, el sobrenadante se recolectó en otro tubo y el sedimento fue reextraído con otros 2 ml de acetona, hasta que el paquete celular quedó totalmente blanco. La solución con los extractos carotenoides en acetona fueron reextraídos con 5 ml de hexano y para una mejor separación de las fases acetona/hexano se adicionó 2 ml de agua destilada, los extractos de hexano fueron filtrados a través de un Swinnex y un filtro de millipore tipo GV (0.22  $\mu$ m) y aforados a un volumen de 10 ml, posteriormente se colocó la muestra final en viales de vidrio de 2ml de capacidad con tapa cubierta de teflón.

**Curva patrón:**

Se preparo una solución estándar de astaxantina con 5mg/100 ml de hexano, de esta se hicieron diluciones de 1:1 a 1:20, las cuales se filtraron y se colocaron en viales de vidrio.

## **5.8 ANÁLISIS ESTADISTICO**

Para el análisis de los datos se utilizo como herramienta el programa Statgraphics, como estadísticos de prueba se utilizo el análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples Least Statistical Differences (LSD), con un nivel de confiabilidad de 95%.

## VII. RESULTADOS

### 6.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

La concentración mínima inhibitoria a metirapona se determino creciendo las levaduras 25-2 y fus 15-1 en placas de agar YM, con concentraciones crecientes de metirapona desde 0 - 2,000  $\mu\text{g/ml}$ . Los Cuadros 2 y 3 muestran los efectos de la metirapona sobre el crecimiento y la síntesis de los carotenoides.

En la cepa mutante 25-2, la síntesis de astaxantina fue inhibida gradualmente a medida que se incremento la concentración de la metirapona, en la concentración de 1,400  $\mu\text{g/ml}$  las colonias de la levadura presentaron color amarillo, el numero de colonias también fue inhibido conforme se incremento la concentración de la metirapona. Sin embargo, las colonias no mostraron cambios morfológicos. La inhibición total del crecimiento se observo en la concentración de 1,800  $\mu\text{g/ml}$  (Cuadro 2).

La cepa fus 15-1 presento inhibición del pigmento a partir de la concentración de 600  $\mu\text{g/ml}$  de metirapona. En la concentración de 1,200  $\mu\text{g/ml}$  la inhibición de los pigmentos rojo-naranja fue total, observándose colonias amarillas. El número de colonias disminuyo levemente en esta concentración y no se detectaron cambios morfológicos.

CUADRO 2. ENSAYO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA A METIRAPONA. CEPA 25-2

CONCENTRACION DE METIRAPONA (µg/ml)	No. DE COLONIAS	COLOR DE LAS COLONIAS	CAMBIOS MORFOLOGICOS
0	153	Rojo-naranja	Ninguno
200	90	Rojo-naranja	"
600	88	Rojo-naranja	"
800	66	anaranjadas	"
1000	100	anaranjadas	"
1200	19	Amarillo-naranja	"
1400	6	Amarillas	"
1600	7	Amarillas	"
1800	0	-----	-----
2000	0	-----	-----

1x10<sup>6</sup> células de las cepa 25-2, crecidas durante 24 h en caldo YM, fueron sembradas en placas de agar YM con metirapona, después de 7 días de incubación a 22°C las colonias fueron cuantificadas.

CUADRO 3. ENSAYO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA A METIRAPONA CEPA FUS 15-1

CONCENTRACION DE METIRAPONA (µg/ml)	No. DE COLONIAS	COLOR DE LAS COLONIAS	CAMBIOS MORFOLOGICOS
0	65	Anaranjadas	Ninguno
200	34	Anaranjadas	"
600	35	Anaranjadas	"
800	37	Naranja-amarillo	"
1000	45	Naranja-amarillo	"
1200	16	Amarillas	"
1400	25	Amarillas	-----
1600	0	-----	-----
1800	0	-----	-----
2000	0	-----	-----

1x10<sup>6</sup> células de las cepa fus 15-1, crecidas durante 24 h en caldo YM, fueron sembradas en placas de agar YM con metirapona, después de 7 días de incubación a 22°C las colonias fueron cuantificadas.

## 6.2 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE MUTACIÓN

Se determino el tiempo óptimo de exposición de las levaduras con N-metil-N'-nitrosoguanidina (NTG) como se describe en material y métodos, con el cual se obtuvo un 90-95% de muerte.

Como se muestra en la Cuadro 4, a los 15 minutos de incubación con el mutágeno (1 mg/ml), la cepa 25-2 presento un 90% de muerte celular, mientras que en la cepa fus 15-1 en este mismo tiempo solo se obtuvo un 80% de muerte.

CUADRO 4. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE MUTACIÓN DE LAS CEPAS 25-2 Y FUS 15-1 EN PRESENCIA DE NTG

Tiempo de mutación (minutos)	MUERTE CELULAR (%)	MUERTE CELULAR (%)
	Cepa 25-2	Cepa fus 15-1
0	0	0
5	76	26
10	82	65
15	90	81

## 6.3 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS MUTANTES

Después de haber determinado la concentración mínima inhibitoria a metirapona y el tiempo de mutación de cada cepa, se procedió a hacer varios ensayos de mutagénesis, hasta obtener colonias que pigmentaban de color rojo-naranja sobre las placas de agar YM conteniendo metirapona en concentraciones inhibitorias. Las colonias resistentes fueron aisladas y sembradas en placas con agar YM sin metirapona e incubadas por 5 días. Posteriormente, se realizaron experimentos para determinar su capacidad de crecimiento y producción de pigmentos a nivel matraz.

Los Cuadros 5 y 6 muestran la producción de pigmentos expresada tanto en  $\mu\text{g}$  de astaxantina/L de medio de cultivo, como en  $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de levadura, así como la biomasa producida Y p/s que es el pigmento producido por cada gramo de sustrato consumido (g/g) y el Y x/s que son los gramos de biomasa producidos por cada gramo de sustrato producido. De estas cinéticas, se hizo una primera selección empleando como criterio las cepas que presentaron una producción de pigmento similar o mayor que la parental.

Se aislaron 46 colonias derivadas de la cepa 25-2, de las cuales solo 11 cepas mostraron mayor síntesis de astaxantina que la cepa parental.

Las cepas seleccionadas fueron: met-3, met-4, met-5, met-10, met-12, met-13, met-14, met-25, met-28, met-38 y met-43 (Cuadro 5). El 69% de las cepas mostraron un crecimiento similar de 4 – 4.9 g/L al de la cepa parental 25-2. Solo 5 cepas (10.8%) presentaron una formación de biomasa arriba de 5 g/L y 9 (19.5%) cepas un crecimiento inferior a los 3 g/L. El 95% de las cepas mostró un incremento del 19.5% en la producción de pigmento por gramo de sustrato consumido en comparación con la cepa parental.

Por otro lado se aislaron 35 cepas a partir de la cepa fus 15-1 de las cuales se seleccionaron 18 cepas como sobreproductoras: lej-1, lej-2, lej-3, lej-6, lej-7, lej-14, lej-15, lej-17, lej-18, lej-21, lej-23, lej-25 lej-26, lej-33, lej-34, lej-35 (Cuadro 6). El 51% de las cepas mostraron un crecimiento menor a la cepa parental. Mientras que solo el 55% presentaron una producción de astaxantina superior a los 2,000 µg/L.

CUADRO 5. PARAMETROS CINÉTICOS DE LAS CEPAS MUTANTES DERIVADAS DE LA CEPA PARENTAL 25-2

CEPA	µg de ast/L	µg de ast/g de levadura	Peso seco (g/L)	Y p/s (µg de pigmento/g sustrato)	Y x/s (g de biomasa/g sustrato)
25-2	2359	524	4.5	27.17	0.387
met-1	1570	365	4.3	34.40	0.383
met-2	1667	341	5.3	29.18	0.417
met-3	2210	409	5.4	25.90	0.451
met-4	2314	482	4.8	28.47	0.396
met-5	1466	287	5.1	25.99	0.434
met-6	1354	323	4.2	29.97	0.365
met-7	1704	396	4.3	32.53	0.360
met-8	1503	320	4.6	28.63	0.388
met-9	1949	415	4.7	38.30	0.411
met-10	2002	476	4.2	42.97	0.368
met-11	1920	417	4.6	33.79	0.380
met-12	2259	490	4.6	42.58	0.380
met-13	2039	443	4.6	39.61	0.390
met-14	2761	575	4.8	49.88	0.400
met-15	1756	358	4.9	30.90	0.408
met-16	1473	398	3.7	34.60	0.308
met-17	1503	395	3.8	34.54	0.316
met-18	1949	487	4.0	42.34	0.333
met-19	1771	402	4.4	35.15	0.366
met-20	1920	426	4.5	36.74	0.375
met-21	1741	424	4.1	36.96	0.341
met-22	1562	332	4.6	29.06	0.383
met-23	1637	390	4.2	34.15	0.350
met-24	1384	322	4.3	28.14	0.358
met-25	3244	559	5.8	47.70	0.483
met-26	1637	467	3.5	40.49	0.291
met-27	1704	387	4.4	33.73	0.366
met-28	2009	427	4.9	37.23	0.408
met-29	1853	378	4.9	33.17	0.408
met-30	1920	436	4.4	38.93	0.366
met-31	1029	242	4.3	21.25	0.358
met-32	1801	418	4.3	39.28	0.385
met-33	1983	308	4.1	53.38	0.408
met-34	1875	420	3.6	52.83	0.344
met-35	1942	539	3.6	54.16	0.341

met-36	1741	458	3.8	49.49	0.349
met-37	1592	398	4.0	39.10	0.371
met-38	3110	545	5.7	53.56	0.540
met-39	1503	367	4.1	32.67	0.341
met-40	1875	468	4.0	39.10	0.315
met-41	1793	460	3.9	37.36	0.302
met-42	1800	461	3.9	41.12	0.341
met-43	2503	632	4.0	50.20	0.309
met-44	1488	402	3.7	34.06	0.299
met-45	1674	400	4.2	34.47	0.342
met-46	1696	394	4.3	32.96	0.339

Estas cinéticas se realizaron en caldo YM, incubadas por 72 h a 22°C con una velocidad de agitación de 300 rpm. Los valores representan el promedio de 2 experimentos sin replica.

**CUADRO 6. PARAMETROS CINÉTICOS DE LAS CEPAS MUTANTES DERIVADAS DE LA CEPA FUS 15-1**

CEPA	µg de ast/L	µg de ast/g de levadura	Peso seco (g/L)	Y p/s (µg de pigmento/g sustrato)	Y x/s (g de biomasa/g sustrato)
Fus 15-1	2322	455	5.1	46.27	0.497
lej-1	2039	522	3.9	53.79	0.380
lej-2	2138	388	5.5	41.22	0.562
lej-3	2076	399	5.2	40.08	0.505
lej-4	1883	409	4.7	45.37	0.499
lej-5	2173	443	4.9	50.45	0.535
lej-6	2507	447	5.6	47.64	0.570
lej-7	2440	488	5.0	40.04	0.396
lej-8	2069	504	4.1	48.65	0.380
lej-9	1882	482	3.9	43.37	0.357
lej-10	1890	511	3.7	51.09	0.350
lej-11	1741	497	3.5	53.04	0.352
lej-12	1867	373	5.0	36.84	0.473
lej-13	1920	391	4.9	33.32	0.401
lej-14	3438	636	5.4	33.24	0.448
lej-15	2671	460	5.8	54.79	0.505
lej-16	1622	318	5.1	41.42	0.567
lej-17	2113	422	5.0	47.76	0.538
lej-18	2083	393	5.3	40.34	0.520
lej-19	2091	380	5.5	34.37	0.483
lej-20	1949	368	5.3	36.43	0.510
lej-21	2128	394	5.3	34.75	0.451
lej-22	1949	397	4.9	35.71	0.429
lej-23	2190	378	5.8	32.97	0.486
lej-24	2001	454	4.4	39.76	0.370
lej-25	2031	390	5.2	34.63	0.447
lej-26	2147	512	4.2	45.86	0.361
lej-27	1882	362	5.2	32.15	0.404
lej-28	1845	392	4.6	34.35	0.387
lej-29	1949	406	4.8	35.04	0.400
lej-30	1944	376	5.3	31.93	0.434
lej-31	1897	387	4.9	32.24	0.393
lej-32	1860	404	4.7	31.64	0.348
lej-33	2359	481	4.9	38.54	0.378
lej-34	2016	428	4.7	28.69	0.370
lej-35	2284	466	7.9	39.66	0.376

Cinéticas realizadas en caldo YM, incubadas por 72 h a 22°C, con una velocidad de agitación de 300 rpm. Los valores representan el promedio de 2 experimentos sin replica.

### 6.3.1 Cinéticas de la primera selección de cepas mutantes sobreproductoras de astaxantina

Las levaduras seleccionadas se sometieron una vez más a experimentación, en las mismas condiciones que las cinéticas anteriores, para observar si su crecimiento y producción de pigmento eran estables.

De 11 cepas seleccionadas por sus fenotipos de sobreproducción de pigmento, solo las cepas mutantes met-5, met-10, met-12, met-14, met-25 y met-28 fueron estables después de más de 5 resiembras, nuevamente la cepa met-25 mostró la mayor producción de astaxantina (3438  $\mu\text{g/L}$ ) y de biomasa (5.9 g/L), así como el más alto  $Y_{x/s}$  de 0.54 g/g. En lo que respecta al rendimiento  $Y_{p/s}$  fue superada por la cepa met-12 y met-14 (Cuadro 7).

Otras cepas que pueden ser promisorias para futuros estudios son la met-12, met-14 y met-28, las dos primeras con una buena producción de astaxantina de más de 600  $\mu\text{g/g}$  de levadura.

Solo 5 cepas derivadas de la fus 15-1 fueron estables en sus fenotipos, mientras que las cepas restantes produjeron menos astaxantina que la cepa parental con rendimientos menores (Cuadro 8).

Al igual que en la primera selección, la cepa lej-14 mostró los rendimientos más altos de astaxantina (2448  $\mu\text{g/L}$  y 556  $\mu\text{g/g}$  de levadura). Esta cepa al igual que la lej-2, lej-15, lej-17 y lej-23 fueron seleccionadas para posteriores ensayos.

Las cepas mutantes met-3, met-4, met-38, lej-2, lej-3, lej-8, lej-18, lej-19, lej-33, lej-34 y lej-35 no fue posible caracterizarlas en la cinéticas de primer selección debido a que mostraron incapacidad para crecer después de varias resiembras.

CUADRO 7. PARAMETROS CINÉTICOS DE LA PRIMER SELECCIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES SOBREPDUCTORAS DE ASTAXANTINA, DERIVADAS DE LA CEPA 25-2

CEPA	µg de ast/L	µg de ast/g de levadura	Peso seco (g/L)	Y p/s (µg de pigmento/g sustrato)	Y x/s (g de biomasa/g sustrato)
25-2	2076	495	4.2	49.59	0.399
met-5	2440	554	4.4	44.53	0.343
met-10	1986	484	4.1	48.54	0.390
met-12	2426	622	3.9	63.99	0.387
met-13	1592	398	4.0	42.07	0.380
met-14	2820	673	4.2	68.95	0.399
met-25	3437	590	5.9	56.19	0.543
met-28	2515	571	4.4	44.71	0.333
met-43	1674	478	3.4	47.32	0.321

Cinéticas realizadas en caldo YM, incubadas por 72 h a 22°C, con una velocidad de agitación de 300 rpm. Los valores representan el promedio de 2 experimentos sin replica.

CUADRO 8. PARAMETROS CINÉTICOS DE LA PRIMER SELECCIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES SOBREPDUCTORAS DE ASTAXANTINA, DERIVADAS DE LA CEPA fus 15-1

CEPA	µg de ast/L	µg de ast/g de levadura	Peso seco (g/L)	Y p/s (µg de pigmento/g sustrato)	Y x/s (g de biomasa/g sustrato)
fus 15-1	1845	335	5.5	27.08	0.429
lej-2	2009	386	5.2	31.05	0.406
lej-6	1733	333	4.9	25.53	0.368
lej-7	1421	258	5.5	19.78	0.404
lej-14	2448	556	4.4	45.52	0.363
lej-15	2284	415	5.5	33.09	0.426
lej-17	1927	393	4.9	29.28	0.429
lej-21	1332	283	4.6	21.43	0.335
lej-23	2083	443	4.6	38.85	0.386
lej-25	1466	325	4.5	24.96	0.333
lej-26	1667	340	4.9	28.69	0.392

Cinéticas realizadas en caldo YM, incubadas por 72 h a 22°C, con una velocidad de agitación de 300 rpm. Los valores representan el promedio de 2 experimentos sin replica.

### **6.3.2 Cinéticas de crecimiento y producción de astaxantina en medio YM y medio de Yuca**

Con el fin de comparar la producción de astaxantina en un medio rico (YM) contra un medio mínimo (Yuca), las cepas mutantes resultantes de la primera selección fueron crecidas nuevamente en matraces conteniendo medio YM y medio de Yuca.

#### **Cepas mutantes derivadas de la cepa parental 25-2**

##### Medio YM

Todas las cepas derivadas de la 25-2 mostraron una fase de crecimiento similar, el periodo de latencia se observo entre las 8 y 12 h aproximadamente, la fase de máximo crecimiento se alcanzo entre las 16 y 48 h, mientras que la fase estacionaria se presento a partir de las 56 h (Figura 3). Las cepas que presentaron una mayor velocidad de crecimiento fueron la met-5 y la met-28 con una  $\mu$  de  $0.12 \text{ h}^{-1}$ . Sin embargo, la mayor formación de biomasa y pigmento se obtuvo en la cepa met-25, con  $5.7 \text{ g/L}$  y  $3306 \text{ }\mu\text{g/L}$  respectivamente (Cuadro 9). La producción de astaxantina por esta cepa represento un 47% más que la obtenida por la cepa parental (Cuadro 9 y Figura 6).

##### Medio de Yuca

La figura 5 muestra la cinética de crecimiento de estas cepas mutantes, las cuales tuvieron un periodo de latencia de 8 a 10 h aproximadamente, su crecimiento máximo fue entre las 48 y 54 h. Al igual que lo observado con el medio YM, la cepa met-25 mostró la mayor producción de biomasa de  $5.8 \text{ g/L}$  y un coeficiente de conversión del sustrato ( $Y_{x/s}$ ) de  $0.49 \text{ g/g}$  (Cuadro 10). La cepa met-12 mostró los mejores rendimientos de astaxantina de  $4026 \text{ }\mu\text{g/L}$ , mientras que la cepa met-28 represento el más alto valor de  $662 \text{ }\mu\text{g/g}$  de levadura y  $68.9 \text{ }\mu\text{g/g}$  (Figura 7 y Cuadro 10). En forma general se puede observar que el medio mínimo incremento la producción de astaxantina en comparación con el medio YM.

#### **Cepas mutantes derivadas de la cepa parental fus 15-1**

##### Medio YM

La figura 8 presenta el crecimiento de las cepas mutantes lej-2, lej-14, lej-15, lej-17, lej-23 y la parental, las cuales tuvieron un periodo de latencia durante las primeras 8 h, con una fase máxima de crecimiento a las 36 h y su periodo estacionario de 12 h aproximadamente. Las velocidades específicas de crecimiento fueron muy similares en la mayoría de las cepas (Cuadro 11). La cepa lej-14 mostró la mas alta producción de pigmento y producción de biomasa

(3806  $\mu\text{g/L}$  y 5.9  $\text{g/L}$  respectivamente), como resultado el rendimiento con respecto al sustrato consumido fue muy alto de 0.459  $\text{g/g}$  (Figura 10). Sin embargo, la cepa lej-23 tuvo la mayor producción de astaxantina por gramo de levadura con 600  $\mu\text{g/g}$  y un rendimiento de 48.9  $\mu\text{g/g}$ .

### Medio de Yuca

En las gráficas de la figura 9 se observa el crecimiento de las cepas mutantes derivadas de la cepa fus 15-1, las cuales tuvieron un comportamiento similar al obtenido en medio YM. La cepa lej-2 mostró la máxima velocidad de crecimiento de 0.09  $\text{h}^{-1}$ . Con este medio se observó un incremento en la producción de biomasa en las cepas fus 15-1, lej-2, lej-17 y lej-23 (Cuadro 12). En cuanto a la producción de pigmento el medio mínimo favoreció la síntesis de astaxantina en todas las cepas analizadas. La cepa lej-14 fue la mejor con un incremento de hasta 14 % más en la producción con respecto a la cepa parental (figura 11).

CUADRO 9. PARAMETROS CINÉTICOS DE LAS CEPAS MUTANTES SOBREPDUCTORAS DE ASTAXANTINA DERIVADAS DE LA CEPA PARENTAL 25-2 EN MEDIO YM

CEPA	µg/L	µg/g	Y p/s	Y x/s	Peso seco (g/L)	µ(h <sup>-1</sup> )
25-2	2247±74 <sup>c</sup>	580±4 <sup>a</sup>	52.3	0.37	4.6±0.25 <sup>b</sup>	0.10
met-5	2444±190 <sup>c</sup>	556±61 <sup>a</sup>	52.0	0.37	4.0±0.10 <sup>b</sup>	0.12
met-10	2187±174 <sup>c</sup>	571±77 <sup>a</sup>	52.0	0.35	3.9±0.2 <sup>b</sup>	0.11
met-12	2507±334 <sup>ab</sup>	576±19 <sup>a</sup>	57.7	0.34	3.9±0.25 <sup>b</sup>	0.11
met-25	3307±100 <sup>a</sup>	552±19 <sup>a</sup>	47.3	0.49	5.7±0.15 <sup>a</sup>	0.09
met-28	2399±58 <sup>b</sup>	662±41 <sup>a</sup>	57.8	0.36	3.6±0.15 <sup>b</sup>	0.12

Estas cinéticas se realizaron en caldo YM incubadas por 72 h, a 22°C, con una velocidad de agitación de 300 rpm. Los valores son expresados como la media de dos experimentos por duplicado ± desviación estándar. Letras iguales indican diferencias no significativas, alfa=0.05.

CUADRO 10. PARAMETROS CINÉTICOS DE LAS CEPAS MUTANTES SOBREPDUCTORAS DE ASTAXANTINA DERIVADAS DE LA CEPA PARENTAL 25-2 EN MEDIO DE YUCA

CEPA	µg/L	µg/g	Y p/s	Y x/s	Peso seco (g/L)	µ (h <sup>-1</sup> )
25-2	3162±442 <sup>ab</sup>	576±11 <sup>a</sup>	42.2	0.337	4.2±0.4 <sup>a</sup>	0.11
met-5	3393±383 <sup>abc</sup>	687±24 <sup>a</sup>	46.4	0.317	4.3±0.3 <sup>a</sup>	0.11
met-10	2887±431 <sup>a</sup>	848±158 <sup>a</sup>	59.1	0.278	3.8±0.1 <sup>a</sup>	0.99
met-12	4026±726 <sup>bc</sup>	614±27 <sup>a</sup>	44.7	0.335	4.1±0.4 <sup>a</sup>	0.10
met-25	3899±331 <sup>c</sup>	660±6.5 <sup>a</sup>	43.0	0.397	5.8±0.5 <sup>b</sup>	0.03
met-28	2708±383 <sup>a</sup>	866±130 <sup>a</sup>	68.9	0.334	3.8±0.6 <sup>a</sup>	0.10

Estas cinéticas se realizaron en medio con jarabe de yuca como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno en sulfato de amino. Incubadas por 72 h a 22°C con una velocidad de agitación de 300 rpm. Los valores son expresados como la media de dos experimentos por duplicado ± desviación estándar. Letras iguales indican diferencias no significativas, alfa=0.05

CUADRO 11. PARAMETROS CINÉTICOS DE LAS CEPAS MUTANTES SOBREPDUCTORAS DE ASTAXANTINA DERIVADAS DE LA CEPA PARENTAL fus 15-1 EN MEDIO YM.

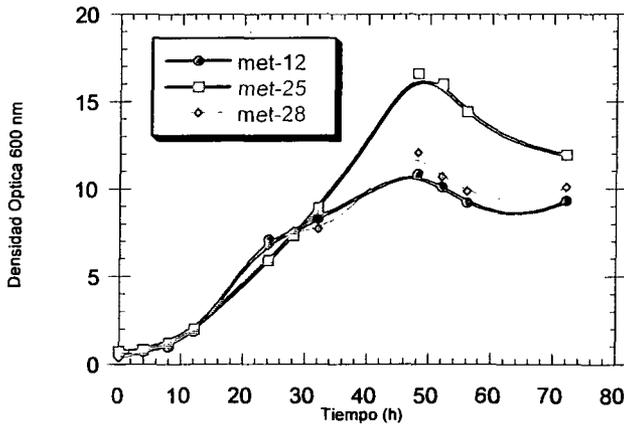
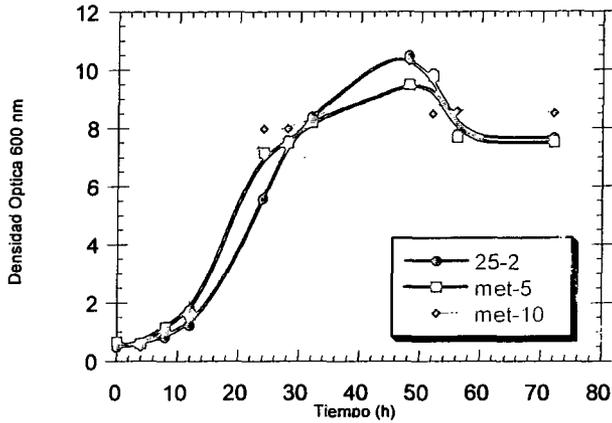
CEPA	µg/L	µg/g	Y p/s	Y x/s	Peso seco (g/L)	µ(h <sup>-1</sup> )
fus 15-1	2438±465 <sup>abc</sup>	508±60 <sup>ab</sup>	42.5	0.401	4.8±0.5 <sup>bc</sup>	0.10
lej-2	2307±77 <sup>ab</sup>	603±6.5 <sup>c</sup>	47.1	0.379	3.9±1 <sup>bc</sup>	0.09
lej-14	3326±104 <sup>d</sup>	564±8 <sup>c</sup>	42.8	0.459	5.9±0.05 <sup>c</sup>	0.08
lej-15	2656±171 <sup>bc</sup>	473±13 <sup>a</sup>	37.8	0.446	5.6±0.35 <sup>a</sup>	0.09
lej-17	2176±336 <sup>a</sup>	494±31 <sup>ab</sup>	35.0	0.349	4.4±0.2 <sup>abc</sup>	0.09
lej-23	2909±290 <sup>cd</sup>	570±60 <sup>c</sup>	48.9	0.405	5.1±0.1 <sup>ab</sup>	0.07

Estas cinéticas se realizaron en caldo YM incubadas por 72 h, a 22°C, con una velocidad de agitación de 300 rpm. Los valores son expresados como la media de dos experimentos por duplicado ± desviación estándar. Letras iguales indican diferencias no significativas, alfa=0.05.

CUADRO 12. PARAMETROS CINÉTICOS DE LAS CEPAS MUTANTES SOBREPDUCTORAS DE ASTAXANTINA DERIVADAS DE LA CEPA PARENTAL fus 15-1 EN MEDIO DE YUCA.

CEPA	µg/L	µg/g	Y p/s	Y x/s	Peso seco (g/L)	µ(h <sup>-1</sup> )
fus 15-1	3330±212 <sup>b</sup>	602±104 <sup>bc</sup>	40.7	0.360	5.5±0.05 <sup>a</sup>	0.08
lej-2	3177±11 <sup>ab</sup>	662±36 <sup>bc</sup>	42.7	0.309	4.8±0.1 <sup>a</sup>	0.09
lej-14	3806±232 <sup>c</sup>	704±28 <sup>c</sup>	45.1	0.345	5.4±5.4 <sup>a</sup>	0.08
lej-15	2981±156 <sup>c</sup>	539±25 <sup>a</sup>	37.3	0.381	5.5±0.55 <sup>a</sup>	0.08
lej-17	3262±140 <sup>ab</sup>	604±50 <sup>abc</sup>	40.8	0.358	5.4±0.55 <sup>a</sup>	0.08
lej-23	3385±171 <sup>b</sup>	616±14 <sup>ab</sup>	40.7	0.395	5.5±0.4 <sup>a</sup>	0.06

Estas cinéticas se realizaron en medio con jarabe de yuca como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno en sulfato de amino. Incubadas por 72 h a 22°C con una velocidad de agitación de 300 rpm. Los valores son expresados como la media de dos experimentos por duplicado ± desviación estándar. Letras iguales indican diferencias no significativas, alfa=0.05



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Figura 3. Crecimiento de las cepas mutantes derivadas de la cepa 25-2, sembradas en medio de cultivo YM.

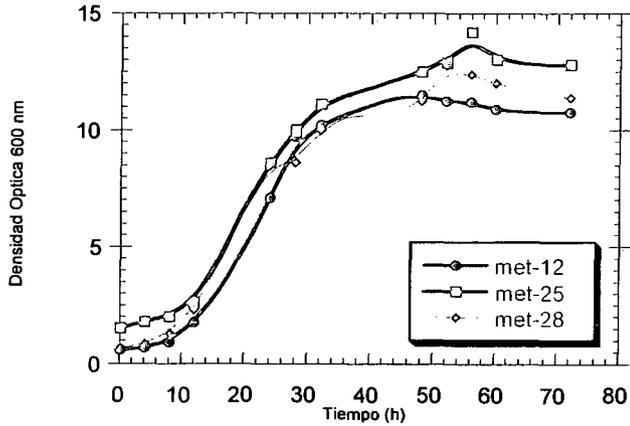
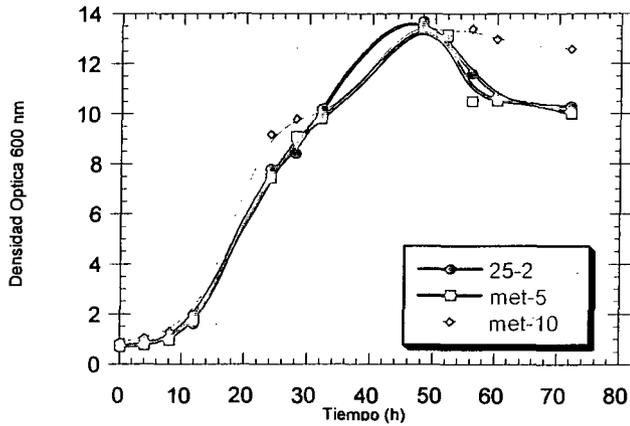


Figura 4. Crecimiento de las cepas mutantes derivadas de la cepa 25-2, sembradas en medio Yuca.

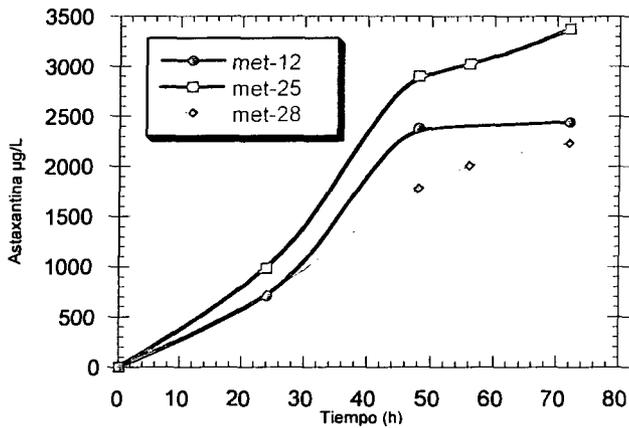
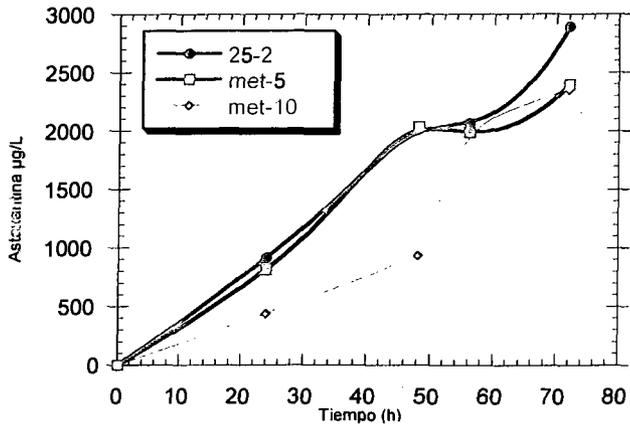
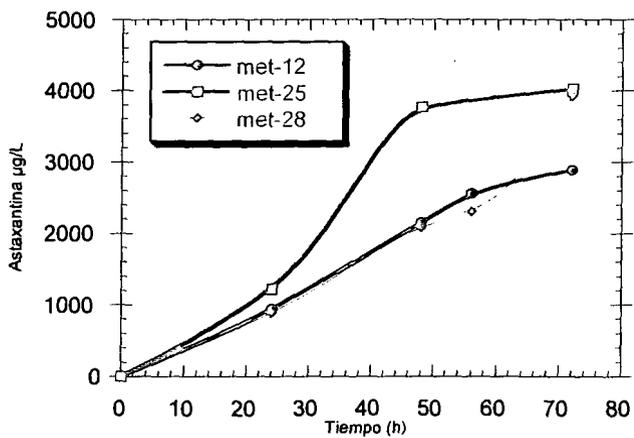
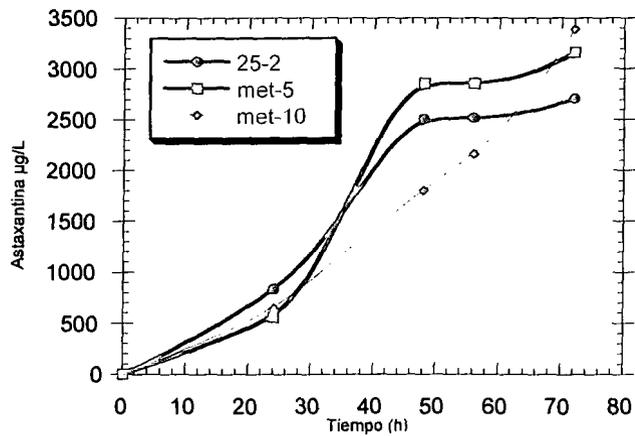


Figura 5. Producción de astaxantina de las cepas mutantes derivadas de la cepa 25-2, sembradas en medio de cultivo YM.



**Figura 6. Producción de astaxantina de las cepas mutantes derivadas de la cepa 25-2, sembradas en medio Yuca.**

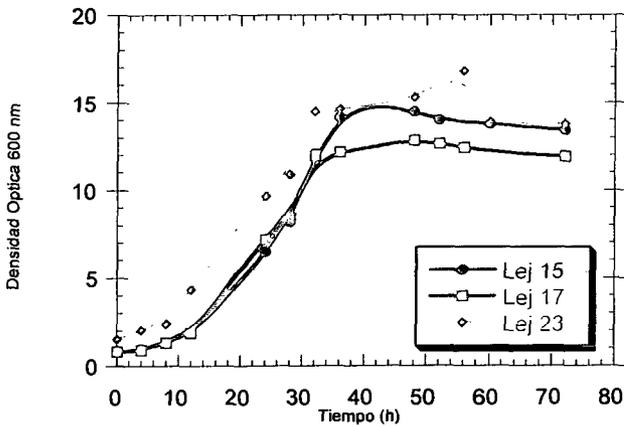
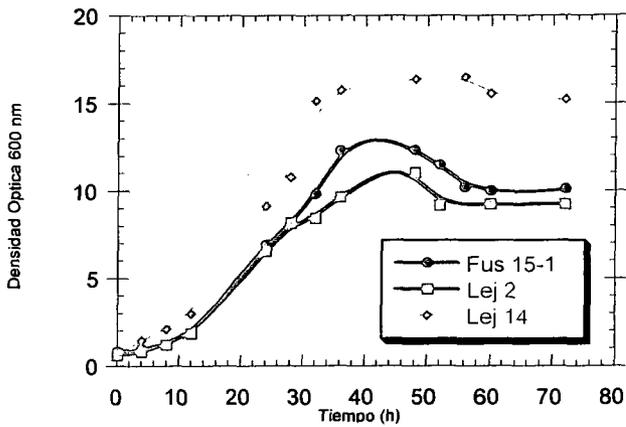


Figura 7. Crecimiento de las cepas mutantes derivadas de la cepa fus 15-1, sembradas en medio de cultivo YM.

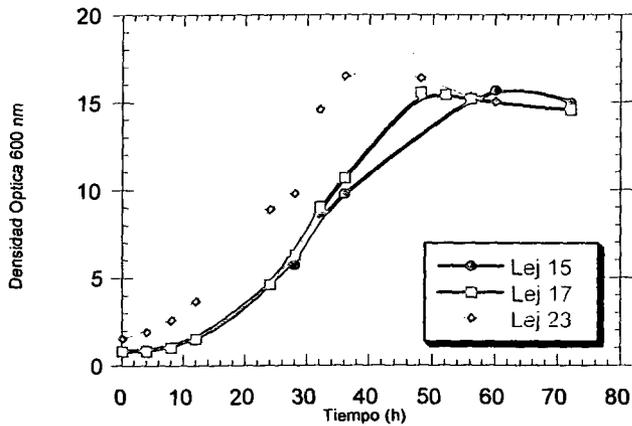
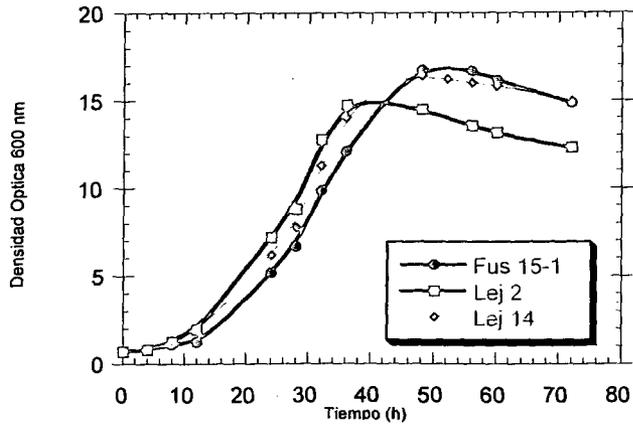


Figura 8. Crecimiento de las cepas mutantes derivadas de la cepa 25-2, sembradas en medio Yuca.

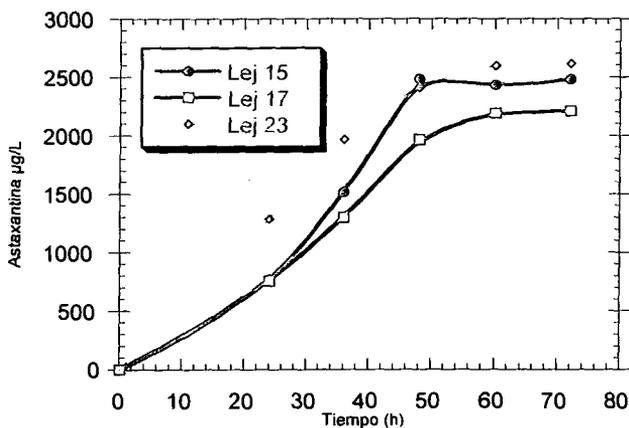
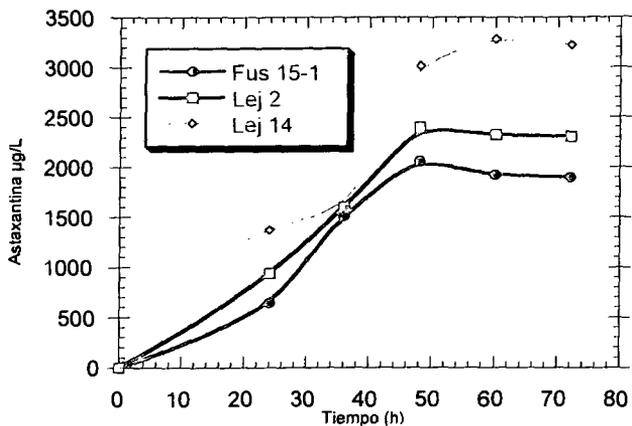


Figura 9. Producción de astaxantina de las cepas mutantes derivadas de la cepa 15-1, sembradas en medio de cultivo YM.

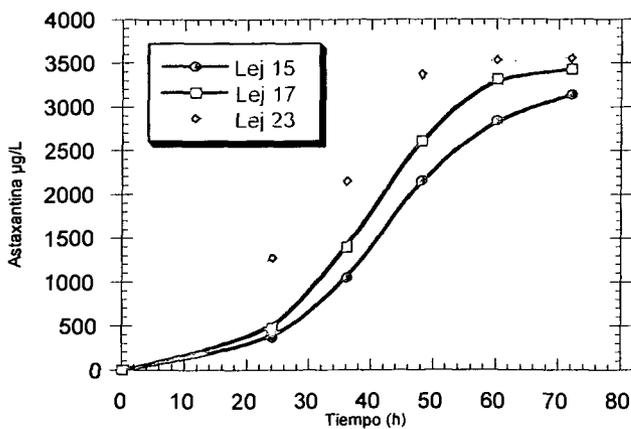
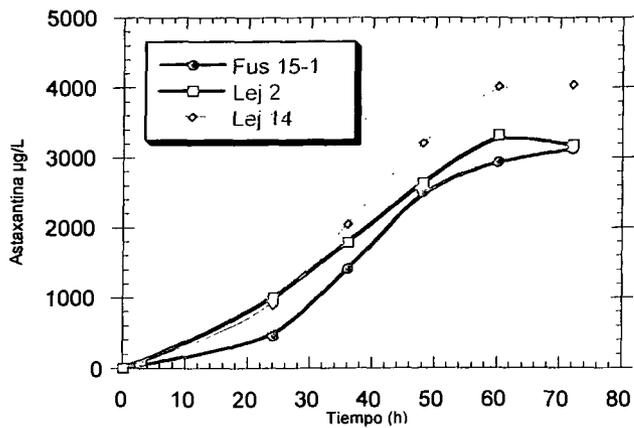


Figura 10. Producción de astaxantina de las cepas mutantes derivadas de la cepa fus 15-1, sembradas en medio Yuca.

## 6.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS PIGMENTOS PRODUCIDOS POR LAS CEPAS SOBREPDUCTORAS DE ASTAXANTINA

### 6.4.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

De acuerdo a la curva patrón de astaxantina, se realizó un análisis de regresión lineal para calcular la concentración de astaxantina que presentaron cada una de las cepas mutantes (Figura 11).

Las cepas mutantes met-5, met-10, met-12, met-25 y met-28 derivadas de la cepa parental 25-2 y la cepa mutante lej-14 derivada de la cepa fus 15-1 fueron seleccionadas como sobreproductoras de astaxantina, las cuales se sometieron a un análisis por HPLC, con el fin de identificar y cuantificar los pigmentos carotenoides presentes en cada una de las cepas mutantes.

Todas las cepas presentaron un pico mayoritario con un tiempo de retención de 3.53 minutos, el cual coincidió con el estándar de astaxantina con concentraciones de 4172, 2744, 3536, 4483, 2906, 2301  $\mu\text{g/L}$  respectivamente (Figura12-17).

En estos mismos cromatogramas se observaron otros picos minoritarios con tiempos de retención de 3.2, 3.3, 5.7 y 7.8 min aproximadamente, no fue posible identificar estos pigmentos por falta de los correspondientes estándares.

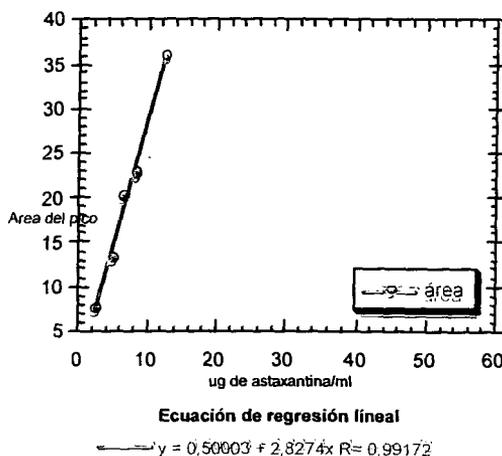


Figura 11. Gráfica de la curva patrón de astaxantina por HPLC

El Cuadro 13 presenta una comparación de la concentración de astaxantina medida por HPLC y la Concentración de pigmentos totales obtenida por la técnica de Sedmak (1990).

Cuadro 13. Comparación de la concentración de astaxantina obtenida por HPLC y la concentración de pigmentos totales

CEPA	Cuantificación de astaxantina por HPLC ( $\mu\text{g}$ de astaxantina/L)	Cuantificación de astaxantina por espectrofotometría ( $\mu\text{g}$ de astaxantina/L)
25-2	2301	2969
met-5	4172	2902
met-10	2744	2731
met-12	3536	3162
met-25	4483	3683
met-28	2906	3378
fus 15-1	4764	3356
lej-14	5295	3743

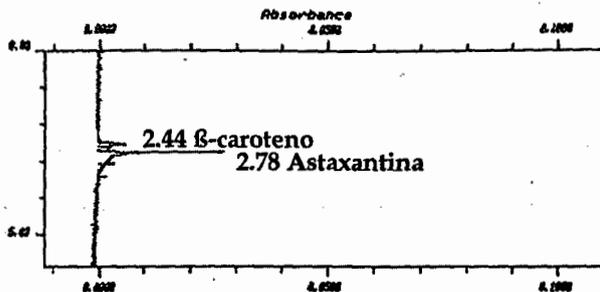


Figura 12. Perfil cromatográfico por HPLC de los pigmentos de la cepa met-28.

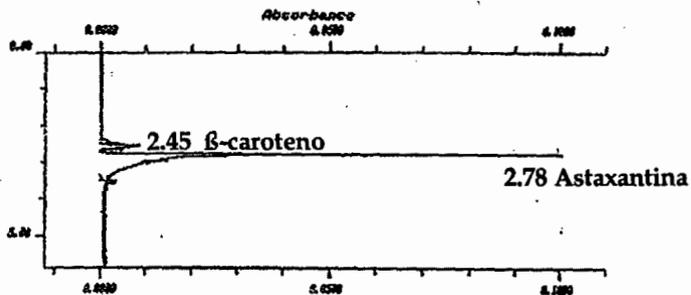


Figura 13. Perfil cromatográfico por HPLC de los pigmentos de la cepa met-10.

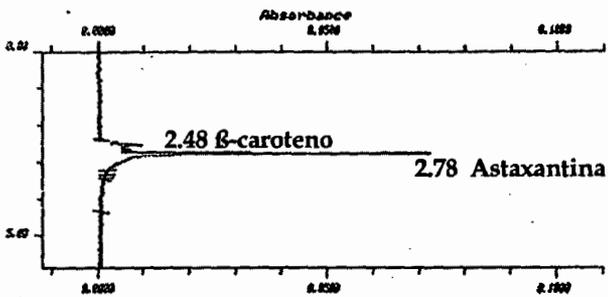


Figura 14. Perfil cromatográfico por HPLC de los pigmentos de la cepa met-25

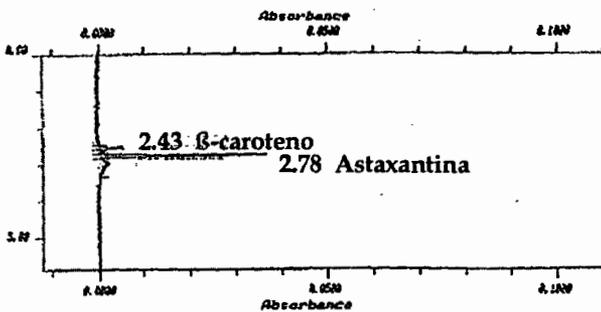


Figura 15. Perfil cromatográfico por HPLC de los pigmentos de la cepa met-14

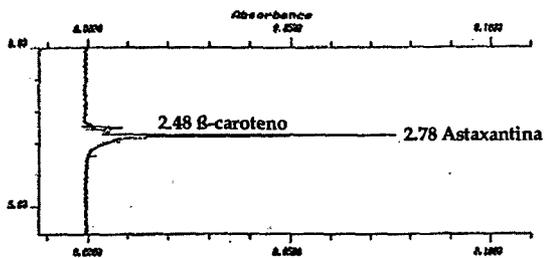


Figura 16. Perfil cromatográfico por HPLC de los pigmentos de la cepa lej-14

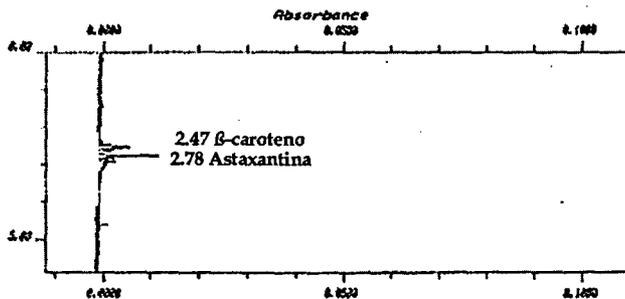


Figura 17. Perfil cromatográfico por HPLC de los pigmentos de la cepa met-5

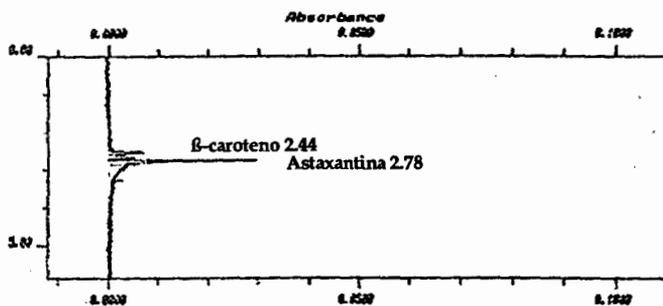


Figura 18. Perfil cromatográfico por HPLC de los pigmentos de la cepa 25-2

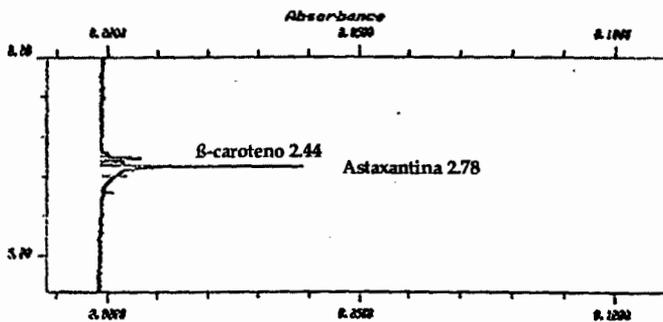


Figura 19. Perfil cromatográfico por HPLC de los pigmentos de la cepa fus 15-1

## VII. DISCUSION

### 7.1 Ensayo para determinar la Concentración mínima inhibitoria a metirapona

Las cepas mutantes 25-2 y fus 15-1 mostraron inhibición de la síntesis de astaxantina en presencia de metirapona, las colonias en presencia de este inhibidor mostraron una coloración amarilla resultado de la acumulación del  $\beta$ -caroteno. Sin embargo, la cepa 25-2 presento una mayor resistencia al inhibidor con respecto a la cepa fus-15-1.

### 7.2 Obtención de las cepas mutantes resistentes a metirapona

El empleo de inhibidores de la carotenogénesis ha sido utilizado por diversos grupos de investigación como una herramienta muy útil para seleccionar mutantes sobreproductoras de astaxantina (Tjahjono, 1994. Lewis, 1990 y Nagai, 1997). Actualmente no existen reportes en la literatura sobre la utilización de la metirapona como un agente para seleccionar mutantes sobreproductoras de astaxantina. Se sabe que este compuesto inhibe a la enzima  $\beta$ -caroteno hidroxilasa pero se desconoce su mecanismo de acción, aunque en humanos este agente inhibe la biosíntesis de esteroides cortico suprarrenales, bloqueando la actividad de las enzimas que contienen el citocromo P450. La metirapona reduce la producción de cortisol por inhibición de la reacción 11- $\beta$  hidroxilación. También inhibe la 18-hidroxilación y el rompimiento de la cadena lateral, pero este ultimo efecto es bloqueado cuando la glándula es estimulada con esteroides adrenocorticales (ACTH) (Goodman y Gilman 1982).

An y col. (1990) reportaron la obtención de mutantes sobreproductoras de astaxantina seleccionadas por su resistencia a antimicina A, un potente inhibidor de la cadena respiratoria específicamente entre el citocromo b y c. La adición de antimicina provoca la reducción de los citocromos b la cual puede influir en la reducción del citocromo P450 con un consecuente incremento en la hidroxilación y la desaturación de carotenoides. El citocromo P450 participa en varios pasos de la biosíntesis de esteroides en *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras (An y col., 1989), por lo que se podría esperar que esta molécula estuviera involucrada en reacciones similares como en la transformación de los carotenoides.

Al parecer, otro punto importante de control dentro de la vía de síntesis de los

carotenoides ocurre a nivel de la enzima fiteno desaturasa, esta enzima ha sido utilizada como blanco para la obtención de mutantes resistentes a  $\beta$ -ionona, las cuales presentan una sobreproducción de astaxantina (Lewis y col., 1990). Fang y Cheng (1996), obtuvieron mutantes que produjeron alrededor de 1500  $\mu\text{g/g}$  de pigmento. Posiblemente las enzimas como fiteno desaturasa,  $\gamma$ -caroteno desaturasa, licopeno ciclasa y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa sean sitios de control en la vía de la síntesis de astaxantina y los inhibidores como  $\beta$ -ionona, difenilamina, nicotina, metirapona y otros actúen como análogos del sustrato (Lewis, 1990).

En este trabajo el uso de la metirapona condujo a la selección de mutantes sobreproductoras de astaxantina. Sin embargo, solo el 7.2% del total de las cepas aisladas sobreprodujeron el pigmento en comparación con las cepas parentales (25-2 y fus 15-1), el resto presentó una producción del pigmento igual o menor de las cepas parentales. La deficiente producción del pigmento en estas cepas podría deberse a la alteración de otros genes necesarios del metabolismo celular causado por la NTG.

### **7.3 Comparación de la producción de astaxantina en medio YM contra el medio de Yuca**

En los experimentos cinéticos donde se utilizaron las cepas mutantes derivadas de la cepa parental 25-2 crecidas en los dos diferentes medios de cultivo, medio rico YM y medio mínimo de Yuca, el medio de Yuca soportó la mejor producción de astaxantina, dando rendimientos de hasta un 60% más de astaxantina en  $\mu\text{g/L}$  y en  $\mu\text{g/g}$  de levadura hasta un 30% más que en medio YM. En lo que respecta a las cepas mutantes derivadas de la cepa parental fus 15-1, mostraron un aumento en la producción de pigmento de un 49% más en la producción de astaxantina en  $\mu\text{g/L}$  y un 24% más de  $\mu\text{g/g}$  de levadura. En cuanto a la producción de la biomasa se observó un ligero incremento en el medio de Yuca, mientras que el rendimiento  $Y_{x/s}$  fue superior en el medio YM. El medio de Yuca contiene fructuosa como principal fuente de carbono sin embargo, no se conoce con certeza su composición, probablemente se encuentren diferentes metabolitos como vitaminas, aminoácidos, intermediarios del metabolismo, precursores de la carotenogénesis que influyeron favorablemente en la pigmentación de las cepas mutantes.

Valdivia y col. (1995) probaron cinco fuentes de carbono como la manosa, sacarosa, manitol, dextrosa y jarabe de *Yucca fillifera* en las levaduras *P. rhodozyma* y 25-2. Siendo la mejor fuente de carbono el jugo de datil, tanto para la producción de astaxantina y biomasa, mostraron un aumento del 40% en la

producción de astaxantina en  $\mu\text{g/g}$  de levadura y un 80% más de  $\mu\text{g/L}$  por la cepa 25-2.

#### 7.4 Análisis del pigmento carotenoide por HPLC

El estudio de los carotenoides por HPLC permitió la identificación y cuantificación de los pigmentos presentes en cada una de las cepas mutantes resistentes a metirapona. En todas las cepas el principal carotenoide encontrado fue la astaxantina, teniendo un tiempo de retención de 3.53 min, después de aparecer tres picos consecutivos con un tiempo de retención de 4.0 a 8.0 min, los cuales no fueron identificados por la ausencia de los estándares correspondientes.

Según Andrews y col. (1976) la síntesis de astaxantina puede lograrse a partir del neurosporeno y a través del licopeno se convierte en  $\beta$ -caroteno. El  $\beta$ -caroteno tiene varias transformaciones antes de convertirse en astaxantina por la acción de la enzima  $\beta$ -caroteno hidroxilasa como la formación de equinona, 3-hidroequinona y foenicoxantina antes de astaxantina. Al observar la estructura química de estos precursores, se observa un gran parecido estructural entre ellos. Posiblemente estos pigmentos son los picos no identificados que se muestran en los cromatogramas.

La ausencia de  $\beta$ -caroteno detectada en los cultivos nos indica la transformación de este compuesto en los intermediarios directos de astaxantina y finalmente en astaxantina. La acumulación de  $\beta$ -caroteno en la célula generalmente esta relacionada con una deficiente aireación del cultivo, tal como lo observaron Johnson y Lewis en 1979, Estos autores trabajaron con medios de cultivo en condiciones de baja aireación, obteniendo pequeñas cantidades de astaxantina, un 26% del total de los carotenoides comparado con un 90% de los carotenoides totales obtenidos en medios de cultivos en condiciones óptimas de crecimiento. Concluyeron que la baja aireación en los medios de cultivo influyen en la concentración de los carotenoides en *P. rhodozyma*.

Fang y Cheng (1993), en su experimento de optimización de medios de cultivo para levaduras mutantes de *P. rhodozyma*, observaron que la baja aireación de estos causo una significativa reducción en la eficiencia de la producción de pigmento.

## PERSPECTIVAS A FUTURO

En todos los estudios realizados en *P. rhodozyma*, tendientes a incrementar la producción de astaxantina, no ha sido posible obtener una cepa de levadura cuya sobreproducción del pigmento sea costeable a gran escala. Las dos estrategias que tradicionalmente se han utilizado para obtener un proceso de producción de astaxantina a nivel industrial, han sido la obtención de cepas sobreproductoras y la optimización de las condiciones de cultivo, que incluye entre otros aspectos el diseño de medios de cultivo baratos.

Si bien, la obtención de mutantes sobreproductoras de astaxantina (ya sean seleccionadas por su incremento en el color naranja o bien por su resistencia a inhibidores) ha aumentado los rendimientos de astaxantina; esta técnica presenta fuertes limitaciones sobretodo cuando se realizan mutaciones sucesivas sobre una cepa en particular con el fin de incrementar en cada paso la producción del pigmento.

En todos los trabajos reportados sobre este tema (An y Johnson 1989, Fang y Cheng 1993, Lewis y col., 1990, Vázquez y col., 1994) La capacidad de crecimiento de las cepas mutantes disminuyo como consecuencia de las mutaciones.

Otra no menos importante línea de investigación tendiente a incrementar la factibilidad económica de cualquier proceso microbiano, se refiere al diseño de los medios de cultivo a partir de sustratos baratos, así como la optimización de las condiciones de cultivo. El medio de cultivo a base de jugo de dátil (medio de Yuca), estimulo significativamente el crecimiento de la levadura en comparación con el medio rico YM, el cual además es un medio muy costoso.

Un aspecto muy interesante para trabajar en el futuro será la optimización de las condiciones de cultivo en medios de cultivo por lote y lote alimentado, esto definitivamente permitirá aumentar aun más los rendimientos obtenidos en matraz.

La obtención de cepas mutantes sobreproductoras de astaxantina, así como el diseño de un medio de cultivo barato representan un buen inicio en el desarrollo de un proceso de producción industrial de astaxantina a partir de *P. rhodozyma*.

## VIII. CONCLUSIONES

- 1.- En total se aislaron 45 cepas mutantes derivadas de la cepa parental 25-2 y 35 cepas mutantes de la fus 15-1, seleccionadas por su resistencia a metirapona.
- 2.- Se seleccionaron cinco cepas sobreproductoras de astaxantina derivadas de la cepa parental 25-2: met-5, met-12, met-25, met-28 y la cepa lej-14 derivada de la fus 15-1.
- 3.- La cepa met-25 crecida en medio YM presento la mejor producción de pigmento, 47% más que la cepa parental 25-2, mientras que el crecimiento se incrementó en un 23%.
- 4.- El medio de Yuca favoreció en un 25% el crecimiento de la levadura y la producción de pigmento en un 17% en comparación con el medio YM.
- 5.- En todas las cepas mutantes seleccionadas sobreproductoras de carotenoides, la astaxantina represento del 90 al 95% de los pigmentos totales.

## X. BIBLIOGRAFIA

- An, G.H., Schuman, D.B. y Johnson, E.A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content, Appl. Envirom. Microbiol., 55:116.
- Andrewes, A.G., Phaff H.J. y Starr, M.P. (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma* a red pigmented fermenting yeast, Phytochemistry, 15:1003-1007.
- Baudi D.S. (1990). Química de los alimentos, Alhambra Mexicana: 123-132.
- Bauernfeind, J.C., Brubacher, G.B., Klaui, H.M. y Marusich, W.L. (1971). Use of carotenoids: 743-770. In carotenoids. O. Isler, ed. Birkhiuser Verlag, Basel, Stuttgart.
- Butt, T.M., Hoch, H.C., Staples, R.C. y St. Leger, R.J. (1989). Use of fluorochromes in the study of fungal cytology and differentiation, Exp. Mycol., 13:303.
- Dziezak, J.D. (1987). Applications of food colorants. Food Technology, 78-88.
- Fang y Cheng (1993). Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. Journal of fermentation and bioengineering 74 (6): 466-469.
- Frederick J.F. (1993). Química de los alimentos. Pigmentos y otros colorantes. Ed. Acribia. Zaragoza, España: 615-647.
- Goodwin, T.W. (1980). The biochemistry of the carotenoids, Vol. I, Plants 2<sup>nd</sup> edn. London: Chapman & Hall: 356-387.
- Goodman, B. y Gilman, H. (1982). Bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Panamericana, Santa Fe de Bogota, Colombia: 1365-1371.
- Girard, P., Falconnier, B., Bricout, J. y Vladescu, B. (1994).  $\beta$ -carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. Microbiology 41: 183-191.
- Johnson, E.A. y Lewis, M.J. (1979). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. J. Gen. Microbiol. 115: 173-183.

- Johnson, E.A., Lewis, M.J. y Grau, C.R. (1980).** Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Poultry Science* 59:1777-1982.
- Klauri, H. y Bauernfeind, J.C. (1981).** Carotenoids as food color. In carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Chap 2:48-317 New York Academic Pres.
- Lambertsen, G. y Brackkan, O.R. (1971).** Method of analysis of astaxanthin and its occurrence in some marine products. *J. Sci. Food Agric.*, 22:99
- Lewis, M.J., Ragut, N., Berlant, M.C. y Miranda, M. (1990).** Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with  $\beta$ -ionona. *Applied and Environmental Microbiology*: 2944-2945.
- Marusich, W.L. y Bauernfiend, J.C. (1981).** Oxycarotenoids in poultry feeds. In carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Chap 3:319-462. Academic Press, Inc., N.Y.
- Miller G.L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Miller, M.U., Yoneyama, M. y Soneda, M. (1976).** *Phaffia* a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes) *Inst J. Syst. Bacteriol.*, 26:286.
- Nagai, S., Chunpolkulwong, N., Kakizono, T. y Nishio, N. (1997).** Increased astaxanthin mutants isolated as resistant to Diphenylamine. *Journal of fermentation and bioengineering* 83 (5): 429-434.
- Nelis, H.J. y Leenher, A.P. (1991).** Microbial sources of carotenoid pigments used in food and feeds. *Journal of Applied Bacteriology* 70:181-191.
- Nelis, H.J. y Leenher, A.P. (1989).** Reinvestigation of *Brevibacterium* sp. strain KY-4313 as source of canthaxanthin. *Appl. Environmental Microbiol.* 55:2502.
- Neupert, W. Y Ludwing, G.D. (1971).** Sites of biosynthesis of outer and inner membrane proteins of *Neurospora* mitochondria, *Eur. J. Biochem.*, 19: 523.
- Phaff. H.j., Miller, M.W., Yoneyama, M. y Soneda M. (1972).** A comparative study of the yeast flora associated with trees in Japanese islands and the west coast of North America, *Proc. 4<sup>th</sup> IFS: Ferment Technol. Today* 759.

Romero, A., Fregoso, C., Auro, O., Ocampo, C. (1992) Efecto pigmentante de la cantaxantina y la capsina en el pez japonés (*Carassius auratus*). VEI. Mex. XXIII: 1

Rumsey, G.L. (1988). Fish farming as a form of animal agriculture: recent advances in fish nutrition, in Proc. Alltechs 4<sup>th</sup> Annus. Symp. Biotechnology in feed industry. All tech Technical Publications, Nicholasville, K.Y. 235.

Sedmak, J., Weerasinghe, K. y Jolly, S. (1990). Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. Biotechnology Techniques 4(2): 107-112.

Shane S.M. (1980). El uso de pigmentantes en alimentos para aves. Tecnología avipecuaria, 72:5-7.

Shiedt, K., Leuenberger, F.J., Veechi, M y Glinz, E. (1985). Absorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken. Pure&Appl. Chem. 57 (5): 685-692.

Terao, J. (1989). Antioxidant activity of B-carotene related carotenoids in solution, Research. Institute for food science: 659-661.

Torrisen, O.J., Hardy, R.W. y Shearer, K.D. (1989). Pigmentation of salmonids, carotenoid deposition and metabolism in salmonids. Crit Rev. Aquatic Sci. 1, 209.

Tjahjono, E. A., Kakimo, T., Hayama, Y., Nisio, N. Y Nagai, S. (1994). Isolation of resistant mutants against carotenoid biosynthesis inhibitors for a green alga *Haematococcus pluvialis* and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers. Journal of fermentation and bioengineering 77 (4): 352-357.

Valdivia, J.R. (1995). Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de astaxantina por una cepa mutante de *Phaffia rhodozyma*. Tesis de licenciatura. Centro Universitario Ciencias Exactas e Ingeniería. U de G.

Yokohama, A., Izumida, H. and Miki W. (1994). Production of astaxanthin and 4-Ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. Biosci. Biotech. Biochem. 58 (10): 1842-1844.

CUCBA

