



Comparación de la producción de pigmentos carotenoides por
Haematococcus pluvialis y *Phaffia rhodozyma*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

PRESENTA

ALMA ROSA DOMÍNGUEZ BOCANEGRA

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-200-93.

El jurado designado por las División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Alma Rosa Domínguez Bocanegra

El día xx de xx del año xxxx

Comité Tutorial:

Tutor: Dra. Araceli Tomasini Campocosio.

Asesor: Dra. Isabel Guerrero Legarreta.

Asesor: Dr. Fernando Martínez Jerónimo.

Sinodal: Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva.

Sinodal: Frederic Thalasso Siret.

DEDICO ESTE TRABAJO

A Dios y a la Virgen María principalmente por darme la vida, la fuerza, la calma y el conocimiento necesaria para concluir una meta más en mi vida. Por estar cerca de mí en los momentos difíciles de mí vida y por darme la dicha de ser madre. Por darme una pareja que me apoya en todo momento, me tolera y me ama. Por mis preciosas hijas, mí adorable madre y hermanos. Por el padre que ya no esta conmigo físicamente pero que se encuentra en mí corazón. Por todo esto y mucho cosas más mil gracias.

A mí esposo Roberto López García y mis hijas Salma Abigail y Paola Fernanda por su apoyo, paciencia, cariño y comprensión que me brindaron en todo momento. Por los malos ratos y sufrimientos que pasamos juntos, pero que gracias a Dios nos encontramos juntos. Por que los amo.

A mí madre María del Refugio Bocanegra Curinzita por todos sus cuidados, sufrimientos y sacrificios que me ha brindado a lo largo de mí vida. Y por la fortaleza que siempre me ha transmitido.

A mis hermanos Germán, Ignacio, Alejandro, Armando y Nicolás. A mí sobrina Jessica Adriana que es como mí hermana pequeña. Por todo su apoyo brindado.

A mis sobrinos Israel, Berenice, Xiomara, Fernando Cibebe, Betsabe, Jesús, Alma, Eduardo, Viola, Pavel y Nicolás.

Agradezco a mis amigos Martín Sabino y al Dr. Jorge Torres por su amistad, cariño y apoyo incondicional brindado para la realización del presente trabajo .

Agradezco la Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva por transmitirme su experiencia y y al Dr. Frederick Talasso por su amistad y apoyo brindado.

A la Dra Araceli Tomasini Campocosio, Dra Isabel Guerrero Legarreta y el Dr. Fernando Martínez Jerónimo por su participación.

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana, al Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN por las instalaciones facilitadas para la realización del presente trabajo.

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico otorgado.

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABLAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCION	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	7
2.1 Generalidades de la astaxantina	7
2.1.1 Definición y propiedades químicas	7
2.2 Fuentes de astaxantina	10
2.2.1 Sintética	10
2.2.2 Crustáceos	10
2.2.3 Microbianas	11
2.2.3.1 Algas	11
2.2.3.2 Levaduras	19
2.3 Factores ambientales que afectan la biosíntesis de astaxantina en <i>Haematococcus pluvialis</i> y <i>Phaffia rhodozyma</i>	25
2.4 Usos y Funciones de los carotenoides	26
2.5 Demanda y Comercialización	29
2.6 Producción por fermentación	30

3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS	33
5. OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo General	34
5.2 Objetivos Particulares	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1 Microorganismos empleados	35
6.2 Medios de cultivo	35
6.2.1 Medios de conservación y propagación	35
6.2.2 Medios de producción	36
6.3 Preparación de inóculos	36
6.3.1 <i>Haematococcus pluvialis</i>	36
6.3.2 <i>Phaffia rhodozyma</i>	37
6.4 Producción	38
6.4.1 Evaluación de los diferentes medios de producción para <i>H. pluvialis</i>	38
6.4.2. Evaluación de los diferentes medios de producción para <i>Phaffia rhodozyma</i>	39
6.5 Métodos Analíticos	40
6.5.1 Evaluación del crecimiento celular	40
6.5.1.1 Peso seco	40
6.5.1.2 Número de células	41
6.5.1.3 Densidad óptica	41
6.5.2 Consumo de azúcares	41

6.5.3 Determinación de clorofila "a"	42
6.5.4 Determinación de astaxantina	43
6.5.4.1 <i>Haematococcus pluvialis</i>	43
6.5.4.2. <i>Phaffia rhodozyma</i>	44
6.6 Análisis estadístico	45
7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1 Ciclo de vida de <i>H. pluvialis</i>	46
7.2 Cinéticas de crecimiento de <i>H. pluvialis</i> variando condiciones ambientales y nutricionales para la producción de astaxantina	48
7.3 Cinéticas de crecimiento de <i>P. rhodozyma</i> variando condiciones nutricionales para la producción de astaxantina	71
7.4 Comparación de la producción de astaxantina por <i>H. pluvialis</i> y <i>P. rhodozyma</i> .	85
8.0 CONCLUSIONES	89
9.0 BIBLIOGRAFÍA	91
10.0 RECOMENDACIONES	106
11.0 ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

		Pagina.
Figura 1	Producción de pigmentos carotenoides por vías sintética y microbiana	3
Figura 2	Isopreno	5
Figura 3	Estructuras químicas de la astaxantina y cantaxantina	9
Figura 4a	Macrozoides biflagelados verdes	16
Figura 4b	Aplanosporas	16
Figura 5	Ruta biosintética para la producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> propuesta por Lorenz y Czsewskil (2000)	17 y 18
Figura 6	Ruta biosintética para la producción de astaxantina en <i>P. rhodozyma</i> propuesta por Fleno y col. (1994)	23 y 24
Figura 7	Célula verdes de <i>H. pluvialis</i> vista al microscopio marca Zeiss modelo AXIOSCOPE IIPLUS	Anexo 1
Figura 8	Quiste de <i>H. pluvialis</i> vista al microscopio marca Zeiss modelo AXIOSCOPE IIPLUS	Anexo 1
Figura 9	<i>Phaffia rhodozyma</i> (BMH-103) vista al microscopio marca Zeiss modelo AXIOSCOPE IIPLUS	Anexo 1

Figura 10	Crecimiento de <i>Phaffia rhodozyma</i> (BMH-103) en medio sólido YM	Anexo 1
Figura 11	Inóculo de <i>H. pluvialis</i> crecido en medio BG-11, 28°C y agitación manual	Anexo 1
Figura 12	Inóculo de <i>P. rhodozyma</i> crecido en medio líquido YM, 22°C y 150 rpm.	Anexo 1
Figura 13 a	Producción de células verdes de <i>H. pluvialis</i> con agitación manual una vez al día, 28°C sin aire en los diferentes medios	Anexo 1
Figura 13 b	Producción de células verdes de <i>H. pluvialis</i>, 28°C con suministro de aire en el medio BBM	Anexo 1
Figura 14 a	Producción de astaxantina a las 216 h en los medios BBM, BG-11 y BAR a partir de <i>H. pluvialis</i>, agitación manual una vez al día	Anexo 1
Figura 14 b	Producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> en los medios BBM y BAR a las 400 h de cultivo	Anexo 1
Figura 15	Medios de producción sin inocular: a) YM, b) YPG, c) agua de coco	Anexo 1
Figura 16	Curva Tipo de azúcares reductores	Anexo 1
Figura 17	Ciclo de vida de <i>H. pluvialis</i>	47

Figura 18	Cinética de crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en diferentes medios de cultivo a 28°C, agitación manual, luz continua e intensidad luminosa 177 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$.	49
Figura 19	Crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en el medio BBM a 28°C con aire (0.5 vvm) e intensidad luminosa (177 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$).	50
Figura 20	Crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en el medio BBM a 28°C con aire (0.5 vvm) e intensidad luminosa (177 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ajustado a un modelo exponencial.	52
Figura 21	Producción de astaxantina en diferentes medios a partir de <i>H. pluvialis</i>, agitación manual una vez al día sin aire y luz continua (177 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$).	54
Figura 22	Crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en base a peso seco en medio BBM y BAR con luz continua (177 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$).	58
Figura 23	Producción de clorofila <i>a</i> y astaxantina a partir de <i>H. pluvialis</i> en medio BAR a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ con iluminación continua e intensidad luminosa de 345 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y aireación (0.5 vvm)	60
Figura 24	. Producción de clorofila <i>a</i> y astaxantina a partir de <i>H. pluvialis</i> en medio BAR a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en fotoperiodo [12 h luz (345 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) /12h oscuridad] y aireación continua (0.5 vvm)	62

Figura 25	Producción de clorofila <i>a</i> y astaxantina a partir de <i>H. pluvialis</i> en medio BAR a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sin aire y con iluminación continua e intensidad luminosa de $(345 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1})$	63
Figura 26	Producción de clorofila <i>a</i> y astaxantina a partir de <i>H. pluvialis</i> en medio BAR a 28°C sin aire y en fotoperiodo [12h luz $(345 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1})$ /12h oscuridad]	64
Figura 27	Crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en base a peso seco en medio BAR. con aire y luz continua (CALC); con aire y fotoperiodo (CAFP); sin aire y luz continua (SALC); sin aire y fotoperiodo (SAFP)	65
Figura 28	Diferentes estadios de <i>H. pluvialis</i> en el medio BBM y BAR durante la cinética por lote de 2 etapas	66
Figura 29	Crecimiento de <i>Phaffia rhodozyma</i> a 22°C, 150 rpm y pH=4.5 en los diferentes medios de cultivo.	73
Figura 30	Consumo de azúcares reductores por <i>P. rhodozyma</i> (BMH-103) en los diferentes medios de cultivo a 22°C, 150 rpm y pH=4.5	74
Figura 31	Producción de astaxantina a partir de <i>P. rhodozyma</i> (BMH-103) a 22°C, 150 rpm y pH=4.5.	77
Figura 32	Crecimiento y producción de astaxantina por <i>P. rhodozyma</i> (R1) en agua de coco y YM a 150 rpm a 22°C.	80

Figura 33	Etapas de producción de astaxantina con <i>P. rhodozyma</i> (BMH-103) en agua de coco como sustrato.	81
Figura 34	Producción de astaxantina en los medios YM y agua de coco con las cepas silvestre BMH-103 y mutante R1 de <i>P. rhodozyma</i>.	82
Figura 35	Producción de astaxantina por <i>P. rhodozyma</i> (BMH-103 y R1) a las 120 h de cultivo en los medios YM, YPG y agua de coco.	83

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Composición de los medios de cultivo para <i>P. rhodozyma</i>	Anexo 1
Tabla 2	Composición de los medios de cultivo para <i>H. pluvialis</i>	Anexo 1
Tabla 3	Crecimiento de <i>H. pluvialis</i> (cél. X 10 ⁴ /mL) a 28°C, intensidad luminosa (177 μmol fotones m ⁻² s ⁻¹).	53
Tabla 4	Contenido de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> (mg/ g biomasa seca) a 28°C, intensidad luminosa (177 μmol fotones m ⁻² s ⁻¹) a las 168 horas.	55
Tabla 5	Comparación de Productividad celular y Productividad volumetrica de <i>H. pluvialis</i> y <i>P. rhodozyma</i>	88

Resumen

En el presente estudio se analizó el efecto de diferentes factores ambientales y nutricionales en la producción de pigmentos carotenoides, particularmente astaxantina, a partir de la microalga verde unicelular *Haematococcus pluvialis* y la levadura basidomiceta *Phaffia rhodozyma* NRLL-10921 (BMH-103)

Para la producción de carotenoides con *H. pluvialis* se empleó un cultivo por lote, en matraces Erlenmeyer de 1000 mL de capacidad total con 700 mL de medio de cultivo (BBM, FB, BG-11 y BAR) y 10% de inóculo v/v en fase exponencial de *H. pluvialis*. Se estudió el efecto de diferente composición de medios de cultivos, medios (BBM, FB, BG-11 y BAR) en la producción de astaxantina por *H. pluvialis*. Las condiciones de cultivo empleadas fueron: 1. luz continua con suministro de aire, 2. luz continua sin aire, 3. fotoperiodo (12 h luz/ 12 h oscuridad) con suministro de aire y 4. fotoperiodo (12 h luz/ 12 h oscuridad) sin aire. Intensidad luminosa de $177 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 28°C . Los resultados mostraron que el mayor crecimiento o producción de células verdes se obtuvo en el medio BBM con $35 \times 10^4 \text{ cel/mL}$. Mientras que la mayor producción de astaxantina se obtuvo en el medio BAR con 6 mg/g biomasa seca a las 216 h.

Por lo que seleccionó el medio BBM para el cultivo de células verdes y se uso como inóculo en el medio BAR para la producción de astaxantina. El medio BAR (700 ml) en matrices Erlenmeyer de 1000ml se inoculó con 20% de células cultivadas en medio BBM en fase exponencial.. Los cultivos se incubaron con mayor intensidad

luminosa, $345 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, luz continua con suministro de aire y sin aire y fotoperiodo 12 h luz / 12 h oscuridad con suministro de aire y sin aire. Observándose que conforme aumentaba la concentración de astaxantina el contenido de clorofila a fue disminuyendo hasta casi desaparecer, presentando una mayor concentración de astaxantina en los cultivos no aireados y con iluminación continua (98 mg/ g biomasa seca).

Los experimentos para la producción de carotenoides con *P. rhodozyma* se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer con mamparas de 250 mL de capacidad total con 50 mL de medio de cultivo y 10% de inóculo v/v en fase exponencial. Los cultivos se incubaron en agitación a 150 r.p.m, temperatura constante (22°C) y pH=4.5 durante 120 h. Se estudió el efecto de tres medios de cultivo YM, YPG y agua de coco, en la producción de astaxantina.

Los resultados obtenidos mostraron que *P. rhodozyma* alcanzó un mayor crecimiento y una mayor producción de astaxantina en el medio de agua de coco ya que se obtuvo 1.9 veces más concentración de astaxantina, $850 \mu\text{g /g lev}$ con respecto al medio YM ($450 \mu\text{g/glev}$) y 2.7 veces más que en el YPG ($310 \mu\text{g/glev}$). Los resultados reflejaron indudablemente que el agua de coco residual es un excelente medio de cultivo para la producción de astaxantina a partir de *P. rhodozyma* ya que se alcanzó mayor síntesis de astaxantina que en otros estudios. En cuanto a las dos cepas estudiadas se determinó que *H. pluvialis* es más eficiente para la producción de astaxantina.

Abstract

Different nutritional requirements and environmental conditions were evaluated for the green unicellular microalgae of sweet water *Haematococcus pluvialis* and the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* NRLL-10921 (BMH-103) in order to determinate the best cultivation growth conditions and carotenoids production, mainly astaxanthin.

Haematococcus pluvialis cultures were grown in 1000 mL Erlenmeyer flasks containing 700 mL of the following media: BBM, BG-11, FAB and BAR, temperature was regulated at 28°C and daily manual agitation or continuous aeration (0.5 v.v.m) continuous illumination ($177 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) or 12h light/12h dark cycle¹ ($177 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$), during 8 days. For the last medium, cultures were grown in 1000 mL Erlenmeyer flasks containing 700 mL BAR medium, incubated at 28°C, with continuous illumination ($345 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) or the 12h light /12h dark cycle² ($345 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$), and aeration or without aeration during 14 days. The cultures were inoculated with 140 mL BBM medium aerated in exponential phase. Kinetic experiments were carried out by triplicate. Maximum growth of *H. pluvialis* obtained ranged from 3.5×10^5 cells/mL in BBM medium at 28°C under continuous illumination ($177 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) of white fluorescent light, with continuous aeration (0.5 v.v.m). Meanwhile, maximal astaxanthin production was 98 mg/g biomass in BAR medium with continuous illumination ($345 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$), with 1g/L of sodium acetate and without aeration.

Phaffia rhodozyma cultures were grown in to 250 mL baffled Erlenmeyer flasks containing 50 mL of coconut milk or YM or YPG media and incubated in a gyrating shaker (Gyrating Water Batch Shaker model G76, New Brunswick Scientific. Edison, N.J. U.S.A.) at 150 rpm and 22°C, for 5 days. Kinetic experiments were carried out in triplicate. The cell inoculum was obtained from a conservation tube and then grown into a 250 mL baffled flask containing 50 mL of YM medium (1.0% glucose, 0.5% peptone, 0.3% malt extract, 0.3% yeast extract), at constant temperature of 22°C and stirrer speed of 150 r.p.m., for 48 h. Fresh medium was then inoculated with the seed culture at 10% volume. The yeast grew at the same culture conditions.

P. rhodozyma reaches a higher density and produced more pigment when is grown in medium containing coconut milk. The wild type strain, *P. rhodozyma* (NRRL-10921), reached a growth of 9.2 gL⁻¹, when grew in coconut milk at 22°C and 150 rpm. Meanwhile, the astaxanthin production was of 850 µg/g yeast., at 120 h. On the other hand, in the control medium YM, the yeast reached a lower growth of 4.6 gL⁻¹, with an astaxanthin production of 450 µg/g yeast. at 120 h. In a parallel experiment the mutant strain, *P. rhodozyma* R1, produced a biomass of 6.2 gL⁻¹ with coconut milk culture medium. Meanwhile, the astaxanthin production was of 1844 µg/g yeast, at 120 h. On the other hand, in the control medium YM, the yeast reached again a lower growth of 4.7 gL⁻¹, delivering an astaxanthin production of 1060 µg/g yeast at 120 h

1. | Introducción

El uso de colorantes en la industria alimentaria data de las primeras civilizaciones hace aproximadamente 3000 años. El término color esta basado en la percepción humana de la luz y se refiere a una banda angosta del espectro electromagnético llamado espectro visible; esta banda coincide con la radiación de la luz solar y se extiende desde las fronteras del ultravioleta al infrarrojo (Bartley y Scolnik, 1995).

El color, es uno de los principales criterios que utiliza el ser humano para la selección de un producto en el mercado y se considera como un indicador de la calidad y de frescura; dicho color es proporcionado por los pigmentos. En la industria alimentaria el color es una parte esencial de atracción para el consumidor y por tal motivo puede adicionarse al producto en forma de un pigmento puro, natural o sintético (Hendry, 1993).

Los carotenoides son los pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Tienen importantes funciones biológicas en animales como precursores de vitamina A, como estimulantes de la respuesta inmune (Shahaidi y col., 1998). En décadas pasadas los pigmentos se obtenían para su comercialización a partir de fuentes naturales como extractos de plantas, animales y minerales, disminuyendo el

consumo de los pigmentos naturales con el descubrimiento de los colorantes sintéticos en 1856. Pero desde que Newsome (1986) demostró que algunos de los colorantes sintéticos presentaban efectos carcinogénicos y embriotóxicos se aumentó la demanda por los pigmentos naturales (Fig. 1).

Los pigmentos son constituyentes normales de las células o tejidos y realizan una función fisiológica, además de que tienen propiedades que van más allá de las que presentan los colorantes, por ejemplo, como receptores de energía, transportadores de oxígeno o protectores contra radiaciones. Entre los pigmentos naturales que han adquirido mayor importancia se encuentran los carotenoides, debido a que éstos se han utilizado como una alternativa para sustituir a los colorantes sintéticos rojo y amarillo, prohibidos por la Food and Drug Administration (FDA) desde los años 80 (Tafuya y García, 1993).

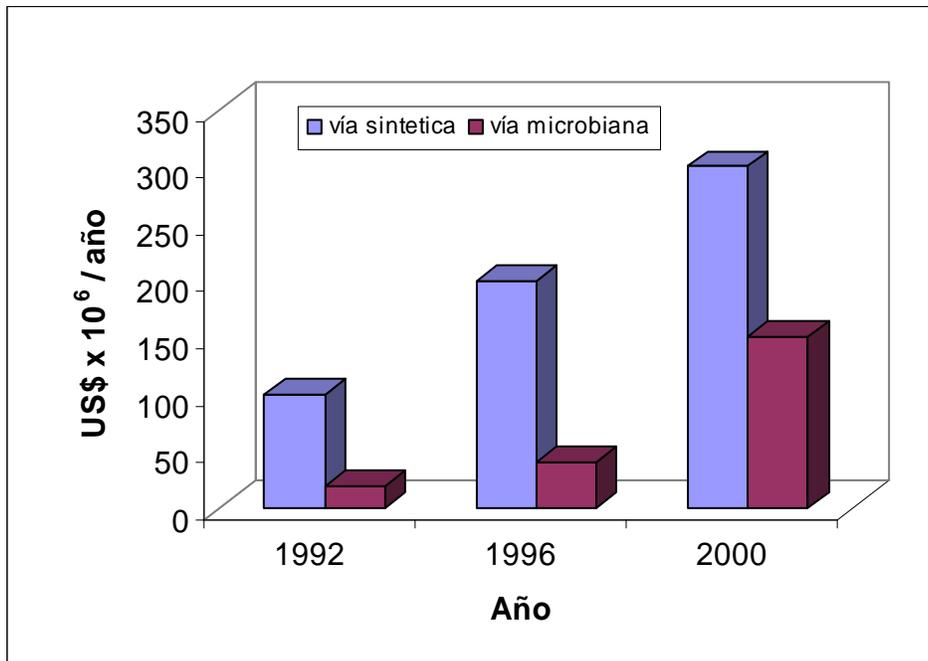


Figura 1. Producción de pigmentos carotenoides por vías sintética y microbiana.

Los carotenoides además de ser utilizados como aditivos para dar color a los alimentos, participan en diversas funciones en los animales y en el hombre, incluyendo su conversión a vitamina A, además de estimular la respuesta inmune al promover la proliferación de los linfocitos T y B, aumentando la actividad de los macrófagos y neutrófilos (Krinsky, 1987).

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides liposolubles, presentes en todos los organismos fotosintéticos, cuyo color va del amarillo al rojo. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y se han identificado más de 630 de ellos.

Según su naturaleza química se dividen en dos grupos principales, carotenos y xantofilas, donde el β -caroteno es el principal caroteno. Entre las principales xantofilas están la zeaxantina, luteína, cantaxantina y astaxantina (Lotan y Hirschberg, 1995) (Fig. 3). De los carotenoides conocidos, sólo un número reducido se utiliza comercialmente. Entre éstos se encuentran β -caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, criptoxantina, zeaxantina y luteína. La limitación en el número de carotenoides disponibles comercialmente se debe a la dificultad y elevado costo de su síntesis, más que a una falta de aplicación práctica. Las aplicaciones comerciales de los carotenoides son variadas. Se emplean como colorantes en la industria alimentaria. Algunas xantofilas, como luteína, cantaxantina y astaxantina se utilizan como aditivos para incrementar la pigmentación de pollos y yemas de huevo, así como para aumentar la fertilidad del ganado. También se utilizan en acuicultura para incrementar el color de salmónidos y crustáceos. Los carotenoides tienen también aplicación en la industria cosmética (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Haard, 1988; Borowitzka, 1999). Por otro lado se han descrito diversas propiedades terapéuticas de los carotenoides.

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que un alto consumo de carotenoides en la dieta, disminuye el riesgo de contraer determinadas enfermedades asociadas con la formación de radicales libres. Entre dichas enfermedades se encuentran diversos tipos de cáncer, enfermedades

cardiovasculares, cataratas y otros procesos degenerativos asociados con el envejecimiento.

Los carotenoides pertenecen a la clase de los polienos es decir, están formados por largas cadenas con dobles ligaduras conjugadas, cuya abundancia explica el color intenso de éstos y están contruidos con base en unidades de isopreno (Fig. 2).

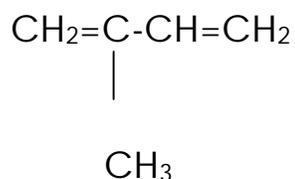


Figura 2. Isopreno

En años recientes se ha propuesto la producción de astaxantina por vía microbiana a partir de la levadura *Phaffia rhodozyma* y la microalga *Haematococcus pluvialis* así como su obtención a partir de crustáceos (Johnson y An, 1991). Cada fuente natural de astaxantina presenta sus limitaciones, debido principalmente a problemas técnicos de extracción y a los bajos rendimientos obtenidos. No obstante, los consumidores prefieren los pigmentos de origen natural por no estar sujetos a las restricciones que impone la FDA a los colorantes sintéticos.

Debido a los bajos rendimientos del exoesqueleto de crustáceos, se ha propiciado el desarrollo de procesos biotecnológicos utilizando microorganismos como *H. pluvialis* principalmente por su capacidad de acumular hasta un 3% de astaxantina en peso seco (Kobayashi y col., 1993) y *P. rhodozyma* ya que se conoce que las cepas silvestres contienen de 300 a 500 µg de carotenoides/ g lev, constituyendo la astaxantina hasta el 85% (Storebakken y col., 1985, 1987; Henmi y col., 1991; Soon y col., 1992; Vázquez y col., 1997).

Cabe mencionar que la astaxantina es un metabolito secundario (MS). La mayoría de los MS son moléculas orgánicas complejas que para su formación requieren un gran número de reacciones enzimáticas. Las enzimas implicadas en la producción del MS están reguladas separadamente de las enzimas del metabolito primario. Los MS, aparentemente no son esenciales para el crecimiento y la reproducción. La formación de MS es extremadamente dependiente de las condiciones de crecimiento, especialmente de la composición del medio. Con frecuencia, se produce la represión de la formación del MS y se producen como un grupo de estructuras estrechamente relacionadas. Por ejemplo, se ha visto que una sola cepa de una especie de *Streptomyces* produce 32 antibióticos distintos pero relacionados, del tipo antraciclina (Madigan y col., 1999).

2. *Revisión Bibliográfica*

2.1 GENERALIDADES DE LA ASTAXANTINA.

2.1.1 DEFINICIÓN Y PROPIEDADES QUÍMICAS.

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) es un oxicarotenoide y pertenece al grupo de las xantofilas. Al igual que otros carotenoides, este pigmento está formado por ocho unidades de isopreno (Fig. 2) que por condensación dan estructuras carbonadas de cuarenta átomos, llamados tetraterpenos. La fórmula molecular de este carotenoide es $C_{40}H_{52}O_4$ y posee un peso molecular aproximado de 596.86. Este pigmento fué identificado químicamente por Kühn y Sorenson (1983) y presenta forma de cristales de color violeta oscuro, su punto de fusión es de aproximadamente 224°C. Es insoluble en soluciones acuosas, pero soluble en diclorometano (30 g/L), en cloroformo (10 g/L), acetona (0.2 g/L), dimetilsulfóxido (0.5 g/L) y otros solventes polares. Es sensible a la luz, a la temperatura, a los ácidos, al oxígeno y a la presencia de álcalis. En condiciones de saponificación sufre una conversión a astaceno. La astaxantina presenta dos carbonos asimétricos en la posición 3 y 3' (Fig. 3) y puede existir en cuatro configuraciones, incluyendo los enantiómeros idénticos (3S,3'S; 3R,3'R) y formas meso (3R,3'S; 3'R,3S) (Müller y col., 1980).

El isómero configuracional 3S, 3'S, se encuentra presente en los huevos de la langosta (*Homarus gamarus*), al igual que en la microalga *H. pluvialis*, hecho que causó controversia y frenó el desarrollo comercial de la producción de astaxantina, utilizando como fuente natural a *P. rhodozyma*, por las restricciones que pudiera imponer la FDA al considerar que el isómero 3R, 3'R no se encontraba en la naturaleza por lo que fue prohibido el uso de astaxantina como aditivo para alimento de peces. Estudios posteriores demostraron que los isómeros meso y sus enantiómeros se encuentran en huevos de langosta, camarón, salmón en el zooplancton y el Krill del Atlántico. Por lo tanto, el isómero de astaxantina que ingiera el salmón carece de relevancia biológica (Johnson y col., 1980).

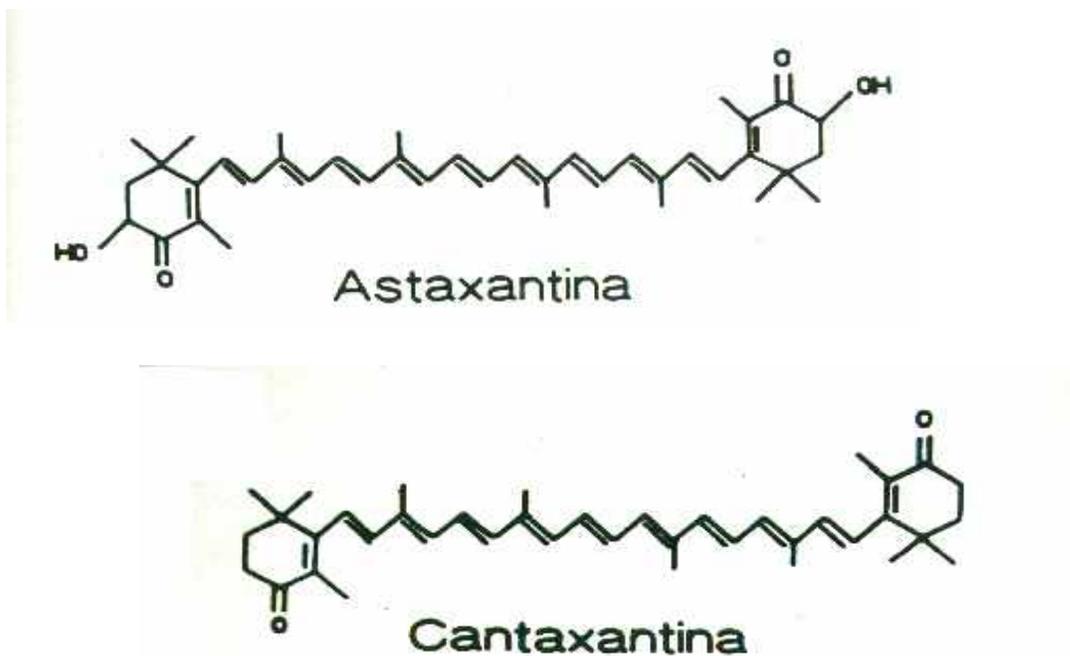


Figura. 3. Estructuras químicas de la astaxantina y cantaxantina.

La astaxantina es un pigmento carotenoide presente en animales marinos tales como los salmones y los crustáceos, ya que estos animales no pueden sintetizar astaxantina por sí solos la toman en sus alimentos naturales la cual es adicionada a la alimentación de los salmones, trucha y camarones cultivados para intensificar su color. La astaxantina posee una actividad antioxidante más alta que el β -caroteno y el α -tocoferol (Yamane y col., 1997). La función principal de este colorante es realizar una fotoprotección pasiva (como filtro), reduciendo la cantidad de luz disponible al complejo colector de luz del fotosistema II, minimizando el riesgo de fotoinhibición en cloroplastos (Linden, 1999).

2.2 FUENTES DE ASTAXANTINA.

2.2.1 SÍNTESIS QUÍMICA.

La empresa farmacéutica Hoffman-La Roche (Basel, Suiza), ha desarrollado varios procesos para la síntesis de carotenoides. En 1964 introdujo la cantaxantina (Fig. 3) como pigmento en alimentos ("Carophyll red^{MR}") (Johnson y An, 1991). Este pigmento fue utilizado con éxito en acuicultura hasta la aparición de la trans-astaxantina, recientemente lanzada al mercado por Roche, la cual comercialmente recibe el nombre de "Carophyll pink^{MR}". La astaxantina sintética es la principal fuente utilizada para pigmentar el músculo de salmón, la cual es preferida por los piscicultores sobre la cantaxantina, porque se absorbe más eficientemente y da una coloración más natural y homogénea a los alimentos procesados; la astaxantina sintética procesada tiene un costo de venta de \$2500 a \$3500 dólares americanos/Kg (Schroeder y Johnson, 1995; Olaizola, 2000).

2.2.2 CRUSTÁCEOS.

No solo el caparazón de los crustáceos es una fuente natural de astaxantina, que ha sido utilizada como alternativa para la pigmentación del salmón en granjas acuícolas (Johnson y col., 1980). Los niveles de carotenoides extraídos de esta fuente son bajos (hasta 200 mg/Kg) y para obtener una pigmentación satisfactoria se requiere la adición del 10 al 25% en peso en relación al total de la ración del alimento formulado. Sin embargo, esta fuente contiene altos niveles de ceniza, de quitina y

humedad, lo cual ocasiona un problema técnico en la formulación y en la elaboración del alimento. Además, el bajo contenido de nutrientes y proteínas no la hace útil como suplemento en el alimento para peces (Johnson y col., 1980). Otra desventaja se presenta en los costos de extracción de la astaxantina, los cuales pueden fluctuar entre 5000 y 15000 dólares americanos/Kg, lo que limita su uso (Johnson y An, 1991).

2.2.3 MICROBIANAS.

2.2.3.1 ALGAS.

Ciertas especies de algas verdes, incluyendo algunas algas que crecen en la nieve como *Chlamydomonas nivalis* sintetizan grandes cantidades de carotenoides secundarios bajo condiciones de estrés como limitación de nitrógeno y posiblemente irradiación solar elevada (Bidigare y col., 1993). La acumulación de los carotenoides secundarios frecuentemente es paralela a una reducción en la clorofila celular y en el contenido de carotenoides primarios, dando como resultando un cambio de color de verde a rojo. Este fenómeno es conocido comunmente como “nieve de sangre” y “lluvia de sangre” para las algas de nieve y de estanque respectivamente (Johnson y An, 1991).

Los carotenoides secundarios identificados en las clorofitas incluyen a la astaxantina, la cantaxantina, la equinenona, la hidroxiequinenona y el β -caroteno (Lee y Soh, 1991; Grung y Liaaen-Jensen, 1993).

Los hidroxicarotenoides, por ejemplo la astaxantina, se presentan usualmente cuando hay ésteres de ácidos grasos. Los carotenoides secundarios se sintetizan a partir del β -caroteno y se acumulan en los glóbulos lipídicos localizados en la parte externa de los cloroplastos (Lee y Ding, 1994). La síntesis de los carotenoides secundarios se activa comunmente por la reducción en la tasa de crecimiento originada por la limitación de nitrógeno (Bidigare y col., 1993).

Las cepas algales pertenecientes a la clase *Chlorococcales* (*Chlorophyceae*) muestran diferencias considerables en el metabolismo de los carotenoides. Estas diferencias se atribuyen a condiciones desfavorables de crecimiento, especialmente deficiencia de nitrógeno y/o hierro (Burczyk, 1987). Tales condiciones se presentan en la fase estacionaria de crecimiento, con la edad de los cultivos de algas. Se pueden distinguir dos grupos principales de algas que muestran cambios pigmentarios; un grupo son verdes, tanto en la fase logarítmica como en la fase estacionaria de crecimiento, y un poco antes de su decaimiento, las células se vuelven pálidas y posteriormente blancas, estas cepas están desprovistas de cetocarotenoides. Las células del segundo grupo cambian su coloración de verde durante la fase logarítmica de crecimiento, a amarillo-verde, naranja o rojo en la fase estacionaria. Este cambio de color es causado por la acumulación de carotenoides secundarios, principalmente cetocarotenoides (Burczyk, 1987). El aumento en el nivel de cetocarotenoides en las células de estas cepas está acompañado por la

desaparición de la clorofila y por una disminución en los carotenoides primarios que son típicos para los cloroplastos, por ejemplo α y β caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina y en algunas cepas cloroxantina (Burczyk, 1987).

Químicamente los carotenoides secundarios son derivados de carotenoides C_{40} , esto es xantofilas que poseen grupos hidroxilo y/o grupos carbonilo en uno o ambos anillos. Se ha reportado la presencia de los pigmentos en varias algas como la equinenona, cantaxantina y astaxantina así como de otros carotenoides menores relacionados (ejemplo: β -caroteno) (Burczyk, 1987).

La capacidad para formar carotenoides secundarios es específica de género en *Ankistrodesmus*, *Haematococcus* y *Scenedesmus*, pero específica de especie en el género *Chlorella*. Recientemente se ha incrementado el interés en la microalga verde *Haematococcus pluvialis* tanto desde un punto de vista taxonómico (Buchheim y Chapman, 1991; Buchheim y col., 1995) como por su capacidad para producir astaxantina, por consiguiente *H. pluvialis* se considera una fuente potencial de este pigmento (Olaizola, 2000). Sin embargo, se tienen problemas técnicos en la obtención de astaxantina a partir de *H. pluvialis*, ya que en principio el ciclo celular de la microalga está poco estudiado y en consecuencia se conoce solo parcialmente el proceso de carotenogénesis (Lee y Ding, 1994).

Tampoco existe homogeneidad de criterios en las metodologías empleadas para estimular la síntesis de astaxantina, puesto que existen dudas o

desconocimiento acerca de la naturaleza y las posibles interacciones de los factores abióticos que pueden ser los responsables de estimular la producción de este pigmento en *H. pluvialis* (Droop, 1954, 1955; Kobayashi y col., 1992a, 1992b; Harker y col., 1996b; Borowitzka y col., 1991; Boussiba y col., 1991, 1992, 1999).

Se tiene conocimiento de que *H. pluvialis* acumula niveles elevados de astaxantina en condiciones ambientales extremas como pueden ser la limitación de nutrientes (N o P) en el medio de cultivo (Zlotnik y col., 1993), concentraciones altas de sal (NaCl) (Cordero y col., 1996), variaciones en la temperatura (Fan y col., 1994) e incluso intensidades luminosas altas (Boussiba y Vonshak, 1991; Kobayashi y col., 1992b; Barbera y col., 1993) y más comunmente una combinación de algunas de estas condiciones (Hagen y col., 1994; Harker y col., 1996a,b; Gong y Chen, 1998; Hagen y col., 2001, Sarada y col., 2002).

H. pluvialis es una microalga verde de agua dulce del Phylum Clorophyta, Clase Clorofícea, Orden Volvocales, Familia Haematococacea, Género *Haematococcus* y especie *H. pluvialis*. El pigmento en *H. pluvialis* fue llamado “haematocromo” desde 1944 cuando Tisher identificó astaxantina como el carotenoide principal.

Esta alga puede existir en tres formas celulares: a) macrozoides biflagelados verdes con fototaxia positiva, es decir que poseen un movimiento orientado hacia la

fuente luminosa (Cantatore y col., 1989), b) etapa de palmela que contiene una pequeña cantidad de astaxantina en la región perinuclear y c) aplanosporas no móviles de paredes gruesas que se tornan completamente rojas (Figs.4a y 4b) debido a la gran acumulación de astaxantina en el citoplasma (Borowitzka y col., 1991; Lee y Ding, 1994).

En la figura 5 se presentan los diferentes pasos de la ruta biosintética de astaxantina en *H. pluvialis* propuesta por Lorenz y Cysewski, (2000).

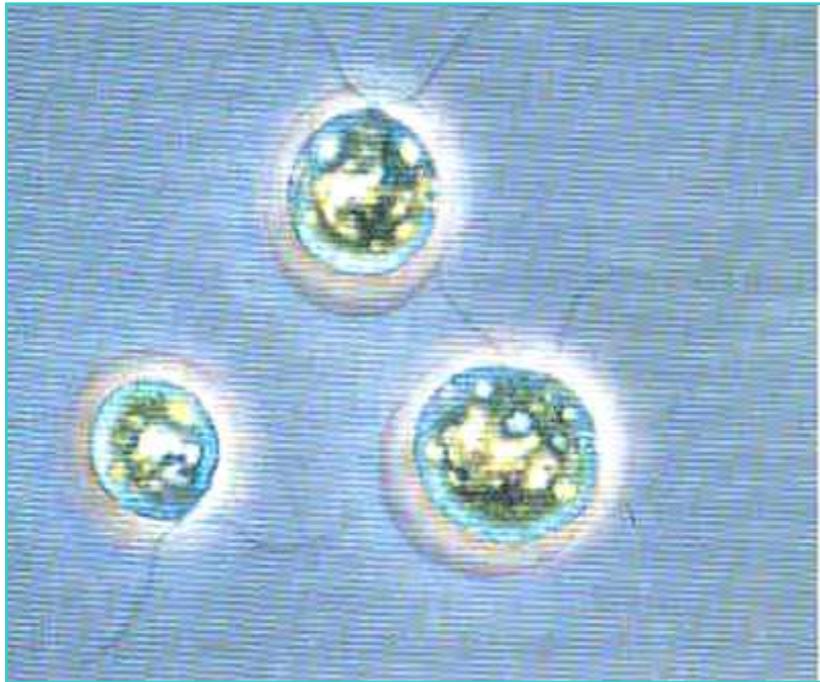


Figura 4a) macrozoides biflagelados verdes

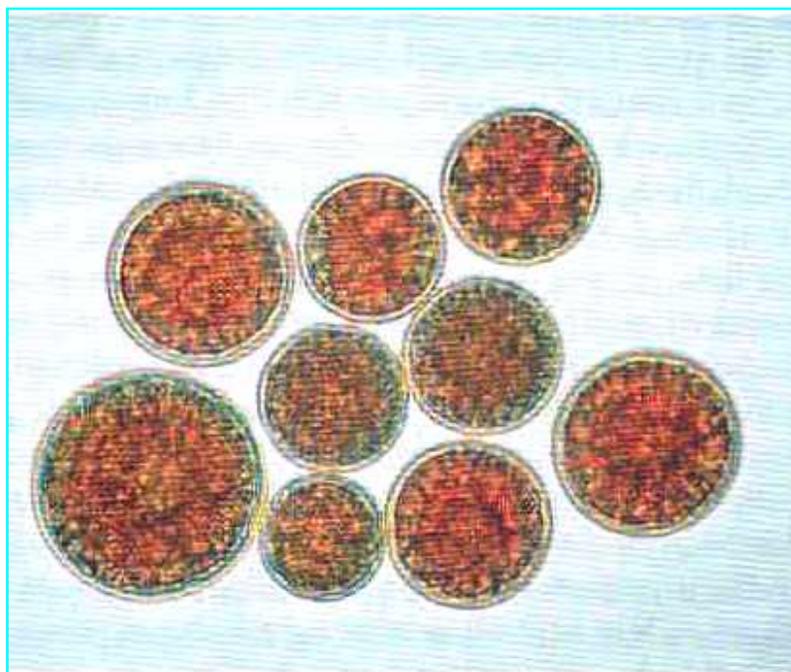


Figura 4b) aplanosporas

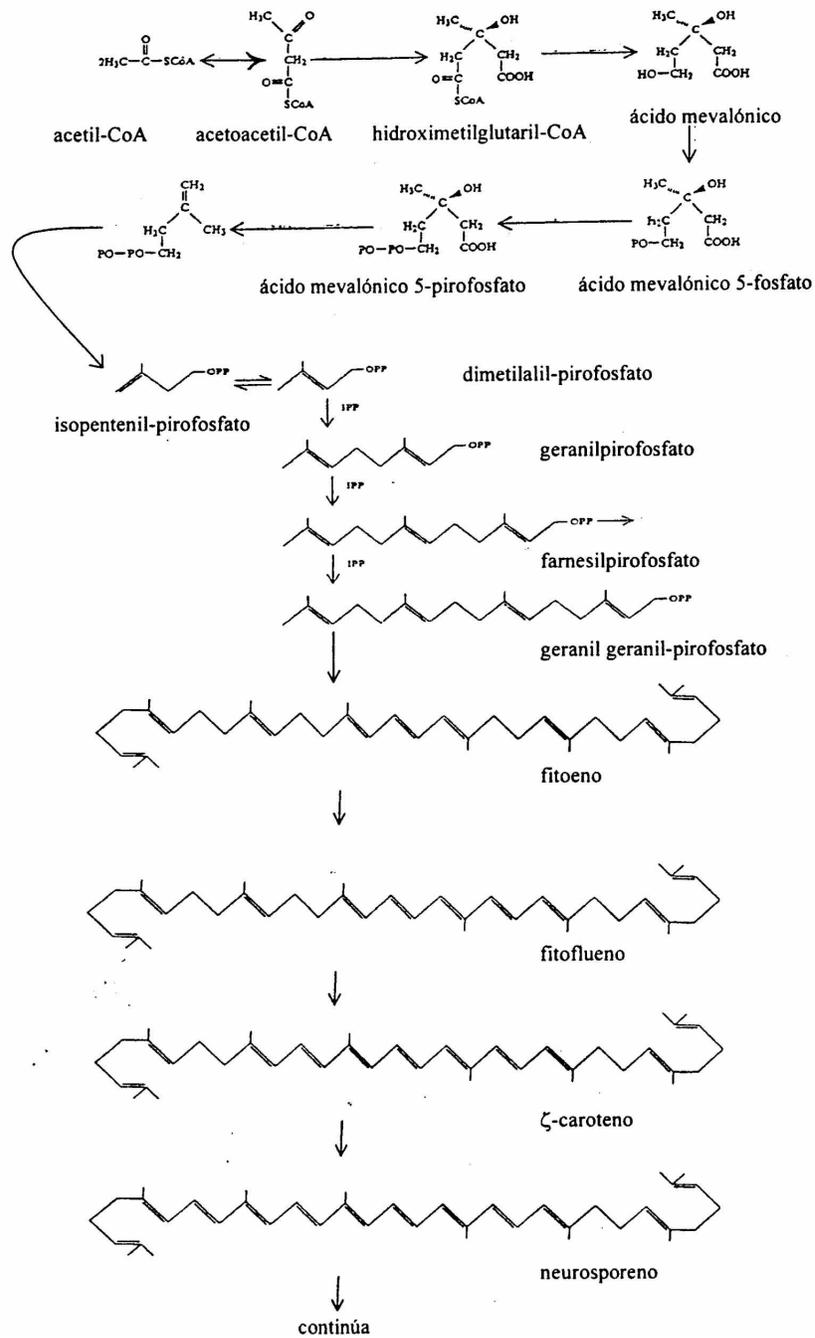


Figura 5. Ruta biosintética para la producción de astaxantina en *H. pluvialis* propuesta por Lorenz y Czsewski (2000).

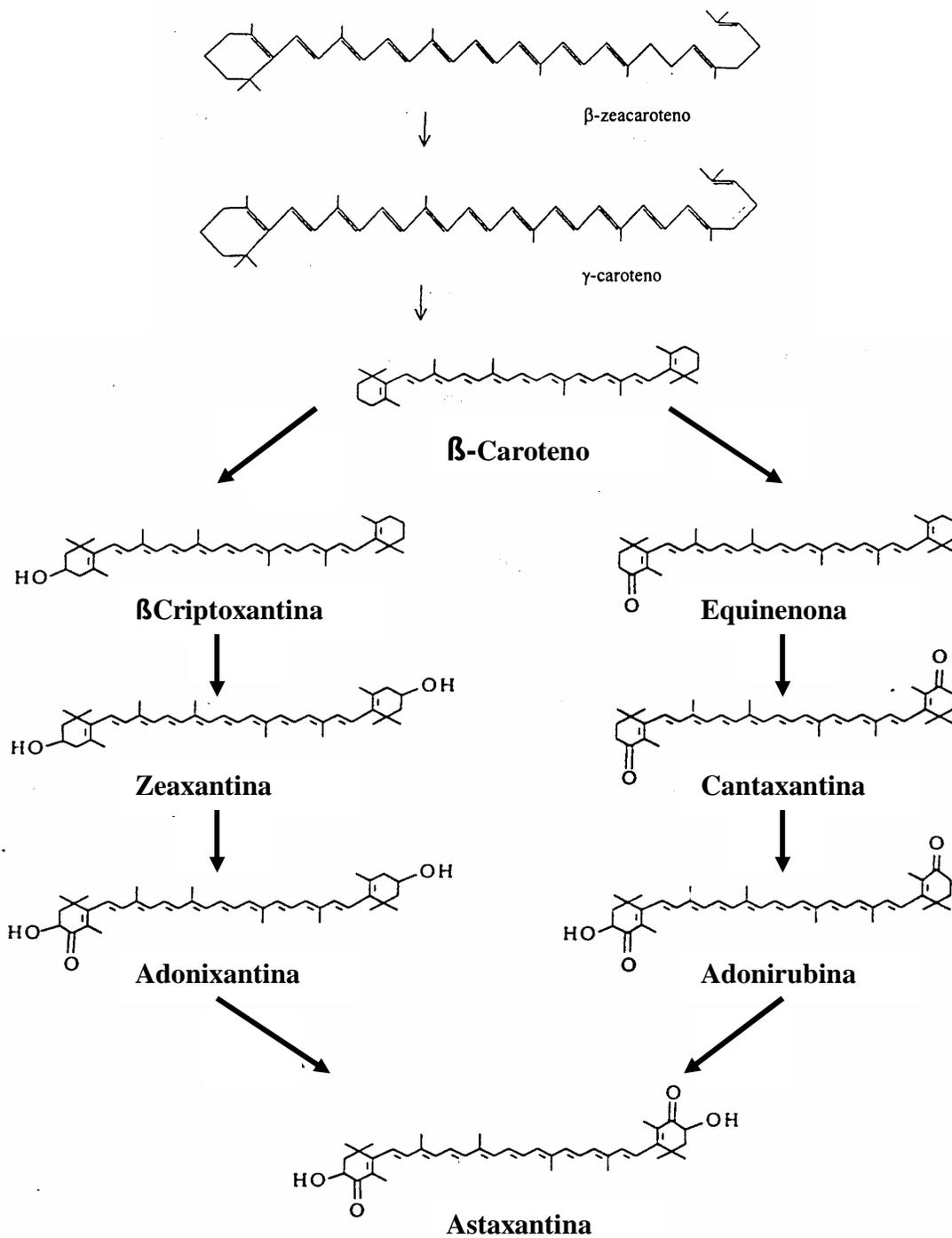


Figura 5. Ruta biosintética para la producción de astaxantina en *H. pluvialis* propuesta por Lorenz y Czsewski (2000).

2.3.2 LEVADURAS.

La levadura *P. rhodozyma*, que produce astaxantina, fue aislada al inicio de la década de los 70 a partir de los exudados de árboles de las regiones montañosas de Japón (9 cepas) y Alaska (una cepa) (An y col., 1989) y se designó originalmente como *Rhodozyma montanae*. Más tarde se le dio el género de *Phaffia* en honor de Herman Jean Phaff quién la describió primero (An y col., 1989).

Phaff en 1988 reconoció varias características inusuales en la levadura y estableció que las propiedades más remarcadas de este microorganismo es que las colonias son rojas o naranjas debido a la presencia de los pigmentos carotenoides. El color se debe a que sintetiza la astaxantina como su carotenoide principal. Fermenta glucosa y otros azúcares y puede ser aerobia o anaerobia (Johnson y An, 1991). *P. rhodozyma* es el estado asexual del microorganismo. Recientemente Golubev (1995) reportó el estado sexual y lo nombró *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Posteriormente los estudios moleculares de Fell y Blatt (1999) señalaron la existencia de más de una especie de *P. rhodozyma* por lo que no todas son *X. dendrorhous* (Flores- Coter., 2001).

P. rhodozyma está clasificada como un basidiomiceto (esporas formadas en el extremo de una hifa) por poseer ciertas propiedades metabólicas tales como la capacidad de utilizar urea, la cual es menos común en las levaduras ascomicetas y al modo de formación de la estructura de su pared celular así como de sus brotes. La evidencia más concluyente de su origen filogenético es la pared celular de múltiples

capas, cercana al área de formación de los brotes, lo cual es característico de las levaduras heterobasidiomicetas (An y col., 1989). *Phaffia* está relacionada filogenéticamente con otras levaduras imperfectas formadoras de carotenoides, incluyendo a *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y otras levaduras heterobasidiomicetas. Se puede distinguir a *Phaffia* del género *Rhodotorula* por su producción de compuestos amiloides asociados a las paredes superficiales, la presencia de un sistema de coenzima Q-10, por su capacidad para asimilar compuestos de carbono, incluyendo a la D-glucosa, la maltosa, la sacarosa, la celobiosa, la trealosa, la rafinosa, el almidón soluble (latente o negativo), el etanol (latente o negativo), la α -metilglucosida (latente o negativo), el D-manitol, la salicina (débil), el 2-cetogluconato, el DL-lactato (latente), el succinato y el glicerol (débil). La levadura no crece en lactosa, galactosa, glucosamida, D-ribosa o D-arabinosa y no utiliza nitrato. Crece de 0 a 27 °C. Su mol% G+C es 48.3 ± 0.18 (Johnson y An, 1991).

Las cepas silvestres de *P. rhodozyma* aisladas a la fecha, contienen hasta 500 $\mu\text{g/g}$ lev (0.05%) o menos en peso seco de carotenoides totales, de los cuales del 40 al 95% es astaxantina. Por lo que para hacer económicamente factible la producción comercial fue necesario obtener mutantes con un contenido mayor de astaxantina. Por ello, se ha dedicado un considerable esfuerzo de investigación a la obtención de cepas hiperproductoras (Flores-Cotera, 2001). El contenido de astaxantina varía considerablemente dependiendo de la cepa y del método de cultivo (An y col., 1989; Calo y col., 1995; Vázquez y col., 1997). Además de la astaxantina otros

carotenoides presentes en la levadura incluyen a la equinenona, 3-hidroxi equinenona y foenicoxantina (Andrewes y col., 1976; Andrewes y Starr, 1981).

Extensos estudios durante los últimos 50 años han establecido que los rasgos generales de la formación de carotenoides son similares en plantas superiores, algas, hongos y bacterias (Flores-Cotera, 2001). Los carotenoides comparten las etapas iniciales de síntesis con las vías biosintéticas de una gran variedad de isoprenoides incluyendo, sesquiterpenos, giberelinas y esteroides. El isopentil pirofosfato (IPP) es el precursor de todos ellos (Disch y col., 1998). La vía más conocida para la producción de astaxantina a partir de *P. rhodozyma* es la vía del mevalonato, que a partir del acetil-CoA produce IPP teniendo como intermediarios la hidroximetilglutaril CoA sintetasa y reductasa (HMGS y HMGR)(Fig. 6). La vía del mevalonato se encuentra regulada para proveer las cantidades necesarias de isoprenoides y para evitar una acumulación de intermediarios. El mevalonato sufre reacciones de fosforilación para formar el isopentil pirofosfato el cual se condensa con una molécula de dimetil-pirofosfato (DMAPP) para dar geranil-pirofosfato. Adiciones sucesivas de moléculas de isopentenil-pirofosfato dan origen a farnesil-pirofosfato. Este último sufre una segunda adición de isopentil-pirofosfato para formar geranil-geranil pirofosfato (GGPP), molécula que al condensarse forma fitoeno que es el primer precursor de los carotenoides. En organismos no fotosintéticos, una sola enzima lleva a cabo las desaturaciones para transformar el fitoeno en neurosporeno.

Después una ciclasa actúa sobre los extremos de ésta molécula para producir en varios pasos al β -caroteno (Goodwin, 1971).

En la figura 6 se presentan los diferentes pasos de la ruta biosintética de astaxantina en *Phaffia rhodozyma* propuesta por Fleno y col. (1994).

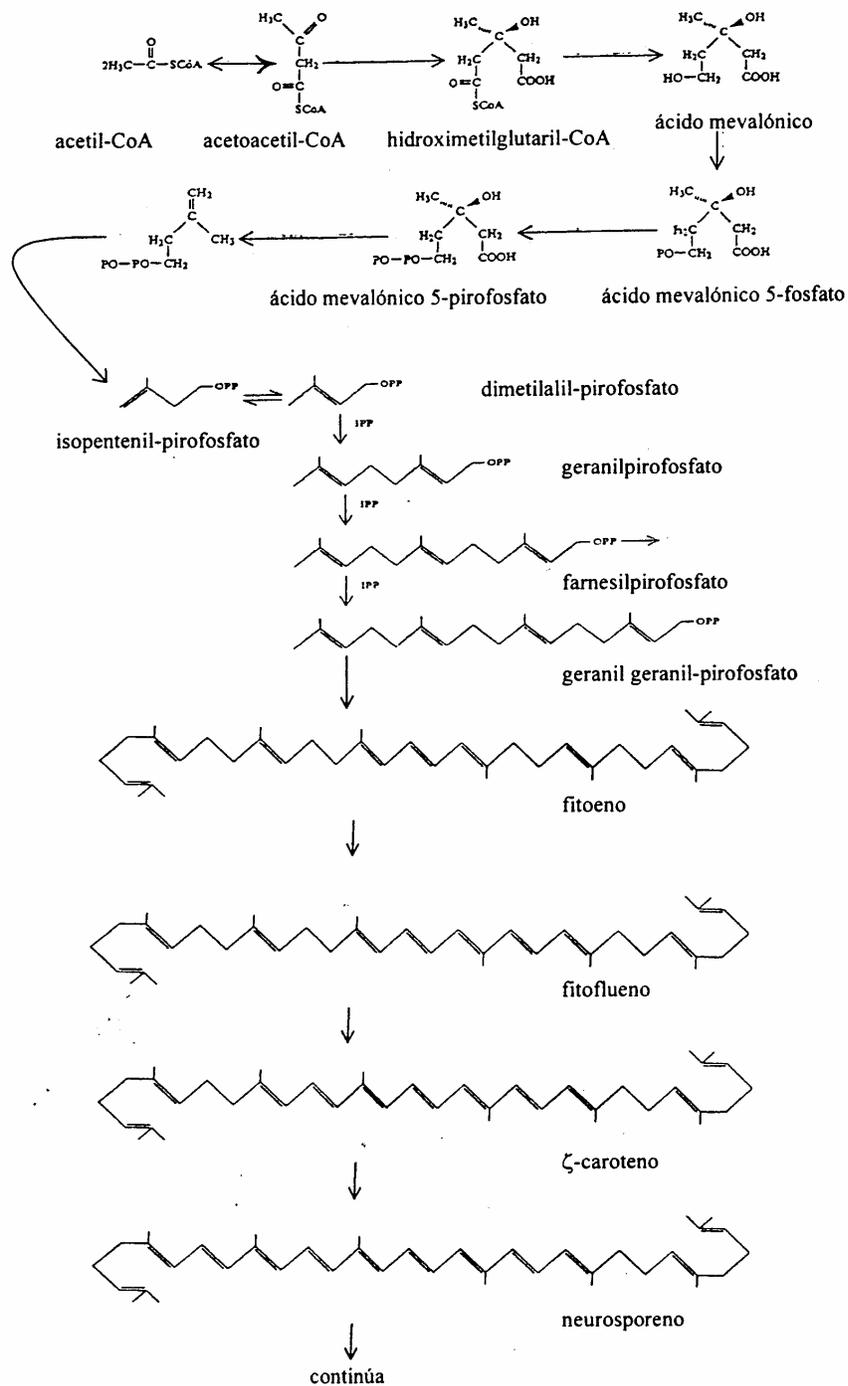


FIGURA 6. Ruta biosintética para la producción de astaxantina en *Phaffia rhodozyma* propuesta por Fleno y col.(1994).

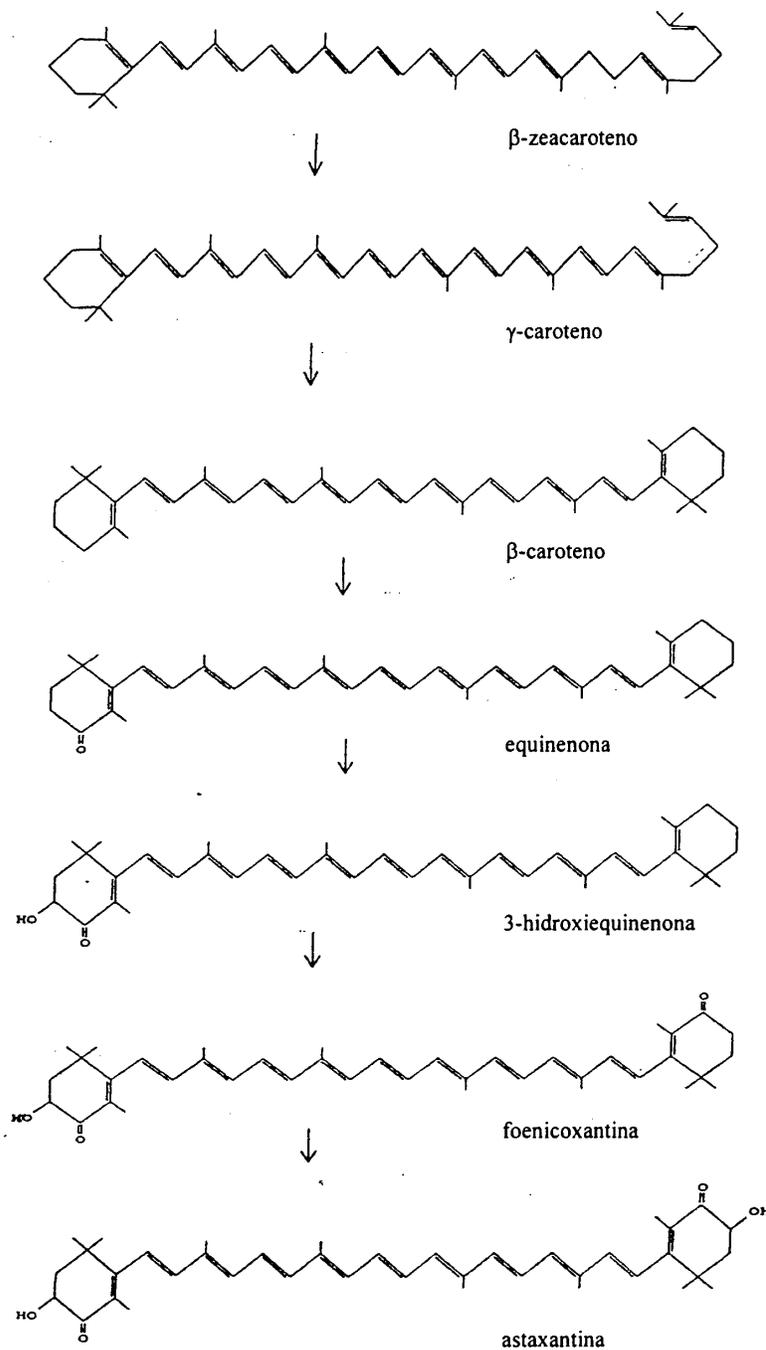


FIGURA 6. Ruta biosintética para la producción de astaxantina en *Phaffia rhodozyma* propuesta por Fleno y col. (1994).

En la síntesis de astaxantina a partir de β -caroteno propuesta por Fleno y col. (1994) en *Phaffia rhodozyma*, se aprecia que el β -caroteno es convertido a equinona directamente, el paso de hidroxiequinona a foenicoxantina supone la presencia de cantaxantina como intermediario. An y col., (1991) (Fig. 6), detectaron toruleno y 3-3 dihidroxi- β -caroteno-4-4-diona en mutantes por lo que se propuso una vía alternativa de síntesis.

2.3 FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN LA BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA EN *Haematococcus pluvialis* Y *Phaffia rhodozyma*.

Los carotenoides específicos producidos por *P. rhodozyma* y *H. pluvialis* así como su contenido celular están controlados genéticamente, aunque pueden ser alterados por cambios en la composición del medio de cultivo y por la influencia de factores ambientales (Droop, 1954, 1955, 1961; Borowitzka y col., 1991; Boussiba y Vonshak, 1991, 1992, 1999; Johnson y An, 1991; Kobayashi y col., 1992a, 1992b; Meyer y col., 1993; Johnson y col., 1994; Meyer y col., 1994a; 1994b; Lee y Ding, 1994; Calo y col., 1995; Harker y col., 1996b; Gong y Chen, 1998; Hagen y col., 2001; Sarada y col., 2002). Muchos de estos factores son no específicos y los cambios se deben a alteraciones del metabolismo celular en general. Algunos compuestos químicos se sabe que afectan la carotenogénesis principalmente en *P. rhodozyma*, tales como los terpenos, iononas, aminas alcaloides y antibióticos como la penicilina (Bramley y Mackenzie, 1988; Meyer y du Preez, 1993; Calo y col., 1995).

Los factores que se han reportado como estimuladores de la formación de carotenoides en diferentes microorganismos incluyen: aumento creciente en la concentración de fuente de carbono (orgánico o inorgánico) durante la fase estacionaria; limitación de nitrógeno; presencia de aminoácidos como metionina, valina, glicina, triptófano, fenilalanina, tirosina y leucina; diferentes fuentes de carbono orgánico como glicerol, acetato, succinato y citrato de sodio; nivel de oxígeno disuelto; intensidad luminosa; agitación, aireación, adición de piridoxina; residuos de tomate; sistema de cultivo (lote alimentado), niveles de fosfato altos o bajos, limitación de Fe, Cu, Zn o Mn; pH; inhibidores de fosfatasas (NaF); α pineno y limoneno (Bramley y Mackenzie, 1988; Fleno y col., 1988; Johnson y An, 1991; Fleno y col., 1994; Johnson y col., 1994; Kobayashi y col., 1993; Fan y col., 1994; Boussiba, 2000; Kobayashi y Okada, 2000) entre otros.

2.4 USOS Y FUNCIONES DE LOS CAROTENOIDES.

Debido a la importancia comercial de los colorantes en varias industrias como la cosmética, alimentaria, avícola y la piscícola, se han realizado muchas investigaciones en el uso de los carotenoides sintéticos y naturales. Las xantofilas que han adquirido mayor relevancia como aditivos en la industria de alimentos balanceados para aves, son la capsantina, que se encuentra como principal pigmento rojo, la zeaxantina y la luteína, que se localizan en la flor de Cempasúchil

(*Tzompa xochitl*) (Cerdá-Olmedo, 1985). Los pigmentos rojos tienen mayor capacidad pigmentante y pueden ser combinados con pigmentos amarillos, por ejemplo 1 mg de astaxantina puede sustituir a 30 mg de luteína; este uso potencial de la astaxantina representa una ventaja económica para la industria avícola, por la disminución de la cantidad de pigmento que requiere ser utilizado (Nelson y Baptist, 1968).

En la industria acuícola las principales xantofilas utilizadas son la cantaxantina y la astaxantina. La astaxantina es un constituyente importante de los alimentos para peces, debido a que el salmón y otros animales marinos no pueden sintetizarlos *de novo*, por lo que se requiere incluirlas en las dietas para obtener un color muscular rojizo, esencial en la aceptación del consumidor (Johnson y An, 1991). Las concentraciones de astaxantina en el salmón van de 3 a 37 mg/kg; su importancia como aditivo radica en proporcionar la pigmentación característica a la carne y a la piel de los peces participando como agente protector en contra de factores fisicoquímicos, durante el desarrollo embrionario. Otra función importante es la de actuar como precursor de las vitaminas A1 y A2 en dietas carentes de esta vitamina. Existen estudios donde se relaciona a la astaxantina con el sabor característico del salmón, al ser cocinado (An y col., 1991).

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

A últimas fechas se le atribuyen propiedades nutraceuticas a la astaxantina (Kobayashi y Okada, 2000) ya que presenta un alto valor nutricional. Por ser precursor de vitamina A, presenta efectos antioxidantes por lo que protege de los daños causados por los rayos UV (Kobayashi y Sakamoto, 1999) y estimula el sistema inmunológico. Por ello en los últimos 10 años, se ha generado un interés considerable en la astaxantina y otros carotenoides al considerárseles posibles preventivos de cáncer, arteriosclerosis, cataratas y otras enfermedades degenerativas producidas por daño foto-oxidativo.

Una de las funciones más importantes de los carotenoides en organismos fotosintéticos es proteger los tejidos celulares contra radicales libres oxigenados que se producen mediante la interacción del oxígeno con la luz visible o UV, y moléculas fotosensibles como bacterioclorofila o clorofila. En las plantas la ausencia de carotenoides induce la muerte celular por daño foto-oxidativo, de manera que son indispensables para la función fotosintética. En los microorganismos no fotosintéticos, los carotenoides también protegen a las células contra daño foto-oxidativo, en este caso mediante radicales libres producidos con la participación de otras moléculas fotosensibles como protoporfirina IX y hemo (Flores-Cotera, 2001).

2.5 DEMANDA Y COMERCIALIZACIÓN.

El mercado de la astaxantina se centra principalmente como fuente de pigmentación en acuicultura, para salmones, truchas, camarones, langostas, cangrejos y peces de ornato. Se emplea en alimento de pollos para tener carne y huevos con yemas con una apariencia más agradable. En un menor grado se emplea también en la industria cosmética, por su poca estabilidad a la luz y al O₂. También es usado como un conservador natural en alimentos procesados (Neils y Leenheer, 1991).

Según datos estadísticos publicados en 1990, se calcula que del 10 al 15% de los alimentos marinos consumidos en el mundo está representado por los peces. Se ha convertido en práctica común cultivar en granjas acuícolas peces de importancia comercial como trucha, mojarra, salmón, etc. La producción ha llegado a tal grado que, por ejemplo, se ha calculado que por cada 10 salmones consumidos en el mundo, 3 provienen de granjas acuícolas (Johnson y An, 1991). Los productores de salmón utilizan astaxantina y cantaxantina sintéticas como aditivos en niveles que van de 35 a 75 mg/Kg de alimento, lo cual ocasiona que este aditivo constituya el componente más costoso en la formulación del alimento, representando del 10 al 15% del costo total. La astaxantina ha sido producida principalmente por el método químico sintético a una escala industrial. Teniendo un valor comercial de 2,500 a 3,500 dólares americanos por kilogramo (Olaizola, 2000).

Se ha observado un incremento en la demanda mundial de astaxantina ya que en 1986 se requirieron más de 6000 Kg de pigmentos carotenoides en alimentos para la producción de salmón, pronosticándose una demanda mayor a 15,000 Kg para 1990, lo cual indica un incremento de 2.5 veces más en 4 años. La venta estimada de astaxantina en 1993 fue de aproximadamente 90,000 dólares americanos de los cuales el 90% fue de astaxantina sintética producida principalmente por Hoffman-La Roche y a fines del siglo XX la venta aumentó considerablemente a 140,000,000 dólares americanos anuales con una producción de astaxantina natural del 40% de las ventas. Por lo anterior, compañías como Aquaserch^{MR}, la Roche^{MR} y una Israelita están produciendo astaxantina natural, pero el suministro actual no puede hacer frente a la demanda del pigmento natural (Lorenz, y Cysewski, 2000, Boussiba, 2001).

2.6 PRODUCCIÓN POR FERMENTACION.

Se ha determinado que ciertos parámetros afectan la síntesis de astaxantina en *H. pluvialis* como son la composición del medio de cultivo, la aireación, la temperatura y la intensidad luminosa, mientras que para la producción de astaxantina por fermentación con *P. rhodozyma* entre los parámetros más importantes están la temperatura, el pH, el nivel de oxígeno y la composición del medio de cultivo.

Estudios realizados por Johnson y Lewis (1979), demostraron que a pH de 4.5, la velocidad de crecimiento de *P. rhodozyma* aumentó, al igual que la producción de biomasa, siendo la astaxantina el principal pigmento sintetizado. En contraste a un pH de 3.5 se acumuló principalmente β -caroteno. La temperatura óptima para la producción de astaxantina por *P. rhodozyma*, independientemente del medio de cultivo, es de 20-22°C.

Mientras que para *H. pluvialis* existe mucha controversia respecto a las condiciones ideales para la producción de astaxantina, por ejemplo altas temperaturas, concentraciones elevadas de sal, deficiencia de nitrógeno, presencia de acetato, aireación, etc. En el presente trabajo se estudio el efecto de diferente composición del medio de cultivo, aireación e intensidad luminosa en la producción de astaxantina por *H. pluvialis*. Así como la composición del medio YM, YPG y agua de coco en la producción de astaxantina por *P. rhodozyma*.

3. Justificación

En los últimos años ha aumentado el interés por el uso de pigmentos carotenoides de origen natural, ya que presentan un elevado potencial para prevenir o retardar enfermedades degenerativas tales como la arteriosclerosis y el cáncer. Además de servir como precursores de vitamina A en el organismo humano, cumplen una función biológica protectora contra la formación y acción de los radicales libres ya que presentan una alta actividad antioxidante retardando el envejecimiento (Baduí, 1994).

La astaxantina sintética ha sido producida principalmente por métodos químicos a escala industrial, y su valor comercial es alto (2,500 a 3,500 dólares americanos por kilogramo). Por otro lado, el uso de compuestos químicos sintéticos como aditivos para alimentos ha sido estrictamente limitado, ya que se ha demostrado que pueden provocar cáncer (Schroeder y Johnson, 1995).

Por estas razones, es importante poder proponer procesos eficientes para la producción de pigmentos naturales. Para la astaxantina, estos procesos pueden ser empleando la levadura *Phaffia rhodozyma* y la microalga *Haematococcus pluvialis*.

4. Hipótesis

Se espera que la levadura basidiomiceta *Phaffia rhodozyma* sea más eficiente para la producción de pigmentos carotenoides, ya que presenta un metabolismo heterotrófico y su tasa de crecimiento es mayor que la de la microalga *Haematococcus pluvialis*.

5. Objetivos

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de algunos parámetros de cultivo en la capacidad de producción de pigmentos carotenoides por *Haematococcus pluvialis* y *Phaffia rhodozyma*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Determinar el efecto de parámetros ambientales (intensidad luminosa, agitación, luz, aireación) en diferentes medios de cultivo en la producción de pigmentos carotenoides por *Haematococcus pluvialis*.

2.- Seleccionar un medio de cultivo donde se obtenga la mayor producción de pigmentos carotenoides por *Phaffia rhodozyma*.

3.- Estandarizar las técnicas de extracción y cuantificación de los pigmentos carotenoides.

4.- Comparar la capacidad de producción de pigmentos carotenoides de *Haematococcus pluvialis* y *Phaffia rhodozyma*.

6. Materiales y Métodos

6.1 MICROORGANISMOS EMPLEADOS.

Haematococcus pluvialis (NIES-144) obtenida del National Institute for Environmental Studies (NIES), Japón y *Paffia rhodozyma* (BMH-103) obtenida del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y una mutante denominada R1 del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV-IPN obtenida por la Dra. Teresa Ponce Loyola.

6.2 MEDIOS DE CULTIVO.

6.2.1 MEDIOS DE CONSERVACIÓN Y PROPAGACIÓN.

H. pluvialis se conservó en tubos con tapón de rosca en medio mineral BG-11 (Vonshak y Boussiba, 1991), incubando a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con iluminación continua provista de 4 lámparas fluorescentes ($177 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante 120 h y agitación manual una vez al día durante 10 segundos (Figs. 7 y 8, anexo 1).

P. rhodozyma fue conservada en tubos de ensaye con tapón de rosca y medio sintético YM (Tabla 2), incubando a 22°C durante 48 h (Figs. 9 y 10, anexo 1).

La resiembra de ambos cultivos se efectúa con una periodicidad de cada dos meses y se guardan en refrigeración a 4°C .

6.2.2 MEDIOS DE PRODUCCIÓN.

Se utilizaron los medios químicamente definidos YM (extracto de levadura, malta), YPG (extracto de levadura, peptona, glucosa) y agua de coco (Tabla 1, anexo 1) para la producción de carotenoides principalmente astaxantina a partir de la levadura *P. rhodozyma*. y los medios BBM, BG-11, FB y BAR (Tabla 2, anexo 1) para *H. pluvialis*. Estos medios fueron tomados de la literatura reportados por diferentes autores tanto para *P. rhodozyma* como para *H. pluvialis* a excepción del agua de coco, ya que la idea de utilizar el agua de coco partió de que anteriormente se obtuvo β -caroteno a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (Domínguez-Bocanegra y col., 1998).

6.3 PREPARACIÓN DE INÓCULOS.

6.3.1 *H. pluvialis*.

Se inoculó 1 mL de la cepa tipo (*H. pluvialis*) en un volumen total de 10 mL de medio BG-11 empleando tubos de ensaye. Estos cultivos se mantuvieron con luz continua durante 120 h y temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Después de este tiempo los cultivos se transfirieron a un volumen de 100 mL de medio manteniendo las mismas condiciones de cultivo por 120 h y agitando manualmente 1 vez al día

durante 10 segundos. Posteriormente se tomó 10% v/v de inóculo en fase exponencial para propagar la cepa en un segundo matraz de 250 mL de capacidad total con 100 mL de medio BG-11 a 28°C y 1.5 vvm de aireación con iluminación continua ($177 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 120 h (Fig. 11, anexo 1). De esta forma se estandarizó el inóculo para los medios de producción de *H. pluvialis*.

6.3.2 *P. rhodozyma*.

La suspensión de células obtenida a partir de un tubo de conservación se hizo crecer en un matraz con mamparas de 250 mL con 50 mL de medio YM, en una agitadora orbital (Gyratory Water Batch Shaker modelo G76, New Brunswick Scientific^{MR}. Edison, N.J. Estados Unidos) a temperatura controlada de 22°C y una velocidad de agitación de 150 rpm por 48 horas. El crecimiento celular obtenido bajo estas condiciones, se pasó a un segundo matraz en una relación al 10% v/v en fase exponencial manteniéndolo durante 48 h bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura. La figura 12 del anexo 1, muestra el inóculo estandarizado de *P. rhodozyma* el cual va ser el inóculo para los medios de producción (YM, YPG y agua de coco).

6.4 PRODUCCIÓN.

6.4.1 EVALUACIÓN DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE PRODUCCIÓN PARA *H. pluvialis*.

Se llevó a cabo en dos etapas. Las figuras 13 a y 13 b del anexo1 muestran cultivos de células verdes sin aire y agitación manual una vez al día con aire, e intensidad luminosa de $177 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las figuras 14 a y 14 b del anexo 1 muestran producción de carotenoides a partir de *H. pluvialis* en los medios BBM, BG-11 y BAR sin aire a mayor intensidad luminosa.

En la primera etapa se utilizaron matraces Erlenmeyer de 1000 mL de capacidad total con 700 mL de medio de cultivo (FB, BG-11, BBM o BAR) y 10% de inóculo v/v en fase exponencial. Las condiciones de incubación para cada medio de cultivo fueron: fotoperiodo 12 h luz ($177 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/12 h oscuridad sin aire y agitación manual una vez al día 10 segundos, fotoperiodo 12 h luz ($177 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/12 h oscuridad con aire (0.5 vvm), luz continua ($177 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sin aire y agitación manual una vez al día 10 segundos, luz continua ($177 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con aire, los experimentos tuvieron una duración de 216 h. Una vez seleccionado el medio donde se tuvo un mayor número de células verdes (crecimiento vegetativo) de *H. pluvialis* (BBM) y las condiciones ambientales óptimas para tal efecto; se procedió a estudiar la producción de pigmentos. El objetivo de esta primera etapa era establecer las condiciones óptimas para la producción de un mayor número de células verdes de *H. pluvialis* (Figs. 13a, 13b, anexo 1).

En la segunda etapa *H. pluvialis* se cultivó en medio BAR con mayor intensidad luminosa e incubando: fotoperiodo 12 h luz ($345 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/12 h oscuridad con aire, luz continua ($345 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con aire, fotoperiodo 12 h luz ($345 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/12 h oscuridad sin aire, luz continua ($345 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sin aire con el propósito de inducir la formación de aplanosporas y de ser posible con un alto contenido astaxantina (Fig. 14b, anexo 1). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y de manera independiente. Se determinaron concentración de carotenoides totales, clorofila a, astaxantina y crecimiento celular. Se aplicó análisis de varianza multifactorial (ANOVA) a los experimentos para determinar diferencias significativas en los resultados de crecimiento (Anexo 2).

6.4.2 EVALUACIÓN DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE PRODUCCIÓN PARA *P. rhodozyma*.

Los cultivos fueron crecidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL con mamparas de capacidad total con 50 mL de medio de producción (YM, YPG, agua de coco) y 10% de inóculo v/v en fase exponencial, incubando a una velocidad de agitación de 150 rpm, 22°C y pH=4.5, tomando muestras durante 120 h. Se determinaron carotenoides totales, crecimiento celular, densidad óptica, azúcares reductores, y astaxantina.

En la fig. 15 del anexo 1, se muestra el color de los medios de producción antes de ser inoculados por *P. rhodozyma*.

6.5 METODOS ANALÍTICOS.

6.5.1 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO.

6.5.1.1 PESO SECO.

El crecimiento celular se determinó por peso seco expresado en gL^{-1} . Para *H. pluvialis* se tomaron 5 mL de muestra y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min en una centrífuga clínica marca SOLBAT, se resuspendió el paquete celular y se lavó con 3 mL de agua destilada y se centrifugó nuevamente esta operación se realizó 2 veces más, posteriormente se filtró el paquete celular en membranas de acetato de celulosa (Millipore^{MR}) 0.45 μm de diámetro de poro puestas previamente a peso constante, dejándolas secar por 24 h a 60°C.

Para *P. rhodozyma* se tomó un mL de muestra y se centrifugó 2 veces a 5000 rpm por 5 min en una microcentrifuga (Centrifuga Eppendorf mod. 5415 Brikmann Instruments, Inc^{MR}. N.Y. Estados Unidos). El paquete celular fue resuspendido y lavado en cada paso con agua destilada. Finalmente el paquete se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se filtró, utilizando membranas de acetato de celulosa

(Millipore^{MR}) 0.45 μm de diámetro de poro puestas previamente a peso constante, dejándolas secar por 24 h a 60°C.

6.5.1.2 NÚMERO DE CÉLULAS.

Se utilizó una pipeta Pasteur para tomar la muestra la cual se colocó en la cámara de Neubauer sin diluir y se realizó el conteo celular en la cuadrícula central en los 2 pozos de la cámara y se promedió. Se utilizó un microscopio de luz marca Zeiss. El conteo se efectuó cada 24 horas.

6.5.1.3 DENSIDAD ÓPTICA

Se tomaron 5 mL de muestra y se leyó en un espectrofotómetro marca Bausch & Lomb^{MR} a una longitud de onda de 650 nm para *H. pluvialis* y 470 nm para *P. rhodozyma*.

6.5.2 DETERMINACIÓN DE AZUCARES.

Para la determinación de azúcares reductores (glucosa) en los diferentes medios de cultivo, se siguió la técnica del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Se tomó 1 mL de muestra y se centrifugó a 5000 r.p.m. por 5 min en una microcentrífuga, al sobrenadante se le adicionó 1 mL del reactivo DNS, se taparon los tubos y se calentaron a ebullición durante 5 min, posteriormente se enfriaron

rápidamente en baño de hielo y se les adicionaron 8 mL de agua destilada. Se agitaron con un vortex (mod. G-560 Scientific, Inc^{MR}. N.Y. E.E.U.U.) y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 575 nm. La lectura de densidad óptica se interpoló en la curva estándar para conocer la concentración de glucosa que tenía cada muestra (Fig. 16 del anexo 1).

6.5.3 DETERMINACIÓN DE CLOROFILA *a* (APHA, 1992).

La clorofila *a* se determinó usando el procedimiento de la APHA, 1992. Se tomaron 5 mL de muestra la cual se centrifugó y se lavó a 12,000 r.p.m. durante 5 min. Posteriormente al paquete celular se le agregó 5 mL de metanol al 90% y se calentó durante 10 min a 60°C. Se centrifugó y se leyó la absorbancia a 665 nm y 750 nm en un espectrofotómetro marca Bausch & Lomb^{MR}.

Cálculo de la concentración de clorofila

$$\text{Clorofila } a \text{ (mgL}^{-1}\text{)} = 13.9 \text{ (DO}_{665} \text{ - DO}_{750} \text{) U/V}$$

Donde: U = volumen del metanol

V = volumen de la muestra

6.5.4 DETERMINACIÓN DE ASTAXANTINA

6.5.4.1 A PARTIR DE CULTIVOS DE *H. pluvialis*.

En la extracción de pigmentos carotenoides a partir de *H. pluvialis* se probaron diferentes técnicas reportadas en la literatura (Sedmak y col., 1990 y Briton, 1985) para obtener la mayor extracción del pigmento. Lo anterior se logró con la de Briton (1985) realizando las siguientes modificaciones: un mL de muestra (medio de cultivo con células) se sometió a rompimiento celular empleando un homogenizador vortex (mod. G-560 Scientific, Inc^{MR}. N.Y. E.E.U.U.) y perlas de vidrio de 0.45-0.50 mm de diámetro durante 3 min en presencia de una mezcla de solventes (hexano: acetona: alcohol etílico en una relación de 42%:29%:29%). Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. quedando en la epifase el hexano con la astaxantina disuelta, la cual se recuperó con una pipeta Pasteur. Esta operación se repitió hasta obtener un precipitado de color blanco. El volumen total del extracto fue medido y leído en un espectrofotómetro a 474 nm y cuantificado por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, siglas en inglés) utilizando astaxantina comercial de Hoffmann-La Roche^{MR}, como estándar. Para la cuantificación por HPLC se utilizó un cromatógrafo (LDC Analytical) con detector de UV de longitud variable y una columna C₁₈ fase inversa de 25 cm de longitud y 3.4 mm de diámetro interno. La fase móvil fue metanol/agua/hexano (95%/4%/1%) y un flujo de 0.5 ml/min. Una vez que se tuvo el extracto, se evaporó la muestra con nitrógeno, se aforó a 10 ml con metanol y se inyectaron 20µL de muestra en el cromatógrafo. El tiempo de retención de la astaxantina fue de 7.08 min. Los cromatogramas se muestran en el anexo 3.

Cálculo de la concentración de astaxantina:

$$\text{Astaxantina } (\mu\text{g/g}) = (\text{D.O})(V)(100)/ 0.16 (W)$$

donde:

W = peso seco de la muestra

V = ml de hexano con el pigmento (extracto)

100 = factor de corrección.

6.5.4.2 A PARTIR DE CULTIVOS DE *P. rhodozyma*.

Para la extracción de pigmentos con *P. rhodozyma* se emplearon las técnicas de Sedmak y col., 1990 y Briton, 1985. Se tuvo una mejor extracción con la técnica de Sedmak y col. Se tomó 1 mL de muestra (medio de cultivo con células), se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm, el paquete celular se lavó 2 veces con 1 mL de agua destilada y con 1 mL de acetona y se evaporó la acetona a temperatura ambiente. Se agregó un volumen igual de perlas de vidrio y 1 mL de dimetil sulfóxido caliente a 60°C, se agitó con un vortex (mod. G-560 Scientific, Inc^{MR}. N.Y. E.E.U.U.) durante 5 min para romper las células y liberar el colorante, posteriormente se agregó 1 mL de acetona, 1 mL de éter de petróleo y 1 mL de NaCl al 20%, se centrifugó nuevamente para separar el éter de petróleo con el colorante y se leyó la absorbancia a 474 nm utilizando un coeficiente de extinción de 1% = 2100 para

carotenoides totales y de 1%= 1600 para astaxantina (Sedmak,1990). Se cuantificó la astaxantina por HPLC del mismo modo que para *H. pluvialis* (Anexo 3).

Cálculo de la concentración de astaxantina:

$$\text{Astaxantina } (\mu\text{g/g}) = (\text{D.O})(V)(100)/ 0.16 (W)$$

donde:

W = peso seco de la muestra

V = mL de hexano con el pigmento (extracto)

100 = factor de corrección

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En todos los experimentos se contó con cultivo testigo y tres réplicas de todos los tratamientos. A los resultados se les determinó la media, desviación estandar e intervalo de confianza (P=0.05). Para las tendencias de crecimiento se aplicó un ajuste al modelo de crecimiento exponencial, la cual se presenta para los casos en los que se logró un buen ajuste a los datos experimentales.

Adicionalmente se aplicó análisis de varianza multifactorial (ANOVA) para determinar diferencias significativas en los resultados de crecimiento en tiempos relacionados (Sokal y Rohlf ,1981., anexo 3).

7. Resultados y Discusión

7.1 CICLO DE VIDA DE *H. pluvialis*.

En la figura 17 se pueden observar las fotografías tomadas durante el ciclo celular de *H. pluvisalis* durante la síntesis de astaxantina: células verdes, palmelas y quistes o aplanosporas. Las fotografías fueron tomadas durante las diferentes etapas de la experimentación utilizando un microscopio óptico marca Zeiss mod Axioskop II plus. Se observó que la células vegetativas presentaron un par de flagelos por lo que son móviles, en etapa madura pierden los flagelos formando células redondas con una pared celular resistente estas células se llaman palmelas, posteriormente se forman los quistes o aplanosporas que aún son redondas, de pared gruesa pero de mayor tamaño debido a la presencia de astaxantina.



Figura 17. Ciclo de vida *H. pluvialis*

La acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* está asociada con la transformación morfológica de células vegetativas a rojo intenso, ricas en astaxantina llamadas quistes (Droop, 1954), y están rodeadas por una pared celular gruesa y resistente compuesta de biopolímeros llamados esporoleninas. La pared celular está separada del protoplasma por una región llena con yema acuosa y atravesada por trazos citoplásmicos (Santos y Mesquita, 1984).

7.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE *H. pluvialis* VARIANDO CONDICIONES AMBIENTALES Y NUTRICIONALES.

Cultivos de *H. pluvialis*, en diferentes medios se incubaron a temperatura ambiente ($28 \pm 2^{\circ}$ C) con agitación manual una vez al día durante 10 segundos con luz continua y ciclos de 12 h luz / 12 h oscuridad e intensidad luminosa de $177 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sin aire. El mayor crecimiento de células verdes, 18×10^4 cél/mL, se obtuvo en luz continua a las 168 h en el medio BBM. En el medio BG-11 se obtuvieron 14×10^4 cél/mL a las 198 horas y en el FB 9×10^4 cél/mL a las 120 h. En cuanto al medio BAR solo se alcanzó un crecimiento de 6×10^4 cél/mL después de 220 h de cultivo (Fig. 18). Cabe señalar que el medio BG-11 contiene 1.5 veces más nitrato que el medio BBM y FB y 6 veces más que el medio BAR (Tabla 3, anexo 1). En cuanto el contenido de micronutrientes el medio FB no tiene y el medio BBM

presenta el doble de concentración que el BG-11. El nitrato es utilizado como fuente de nitrógeno en los cultivos de *H. pluvialis*, por lo que probablemente la disminución de células a partir de las 168 h y 192 h, se debe al agotamiento de uno o más nutrientes, para el caso del FB y de un exceso en los medios BBM y BG-11, y como consecuencia en ese momento comienza aparecer las células en estado de palmela o quistes (Figs.18, 19).

En condiciones de fotoperiodo, ciclos de 12 h luz ($177\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 12 h oscuridad el crecimiento de *H. pluvialis* disminuyó ligeramente teniendo 14×10^4 cél/mL a las 168 h en el medio BBM, 13×10^4 cél/mL en el medio BG-11 a las 198 horas y 9×10^4 cél/mL y 5×10^4 cél/mL en el FB y BAR a las 120 h respectivamente (Tabla 3).

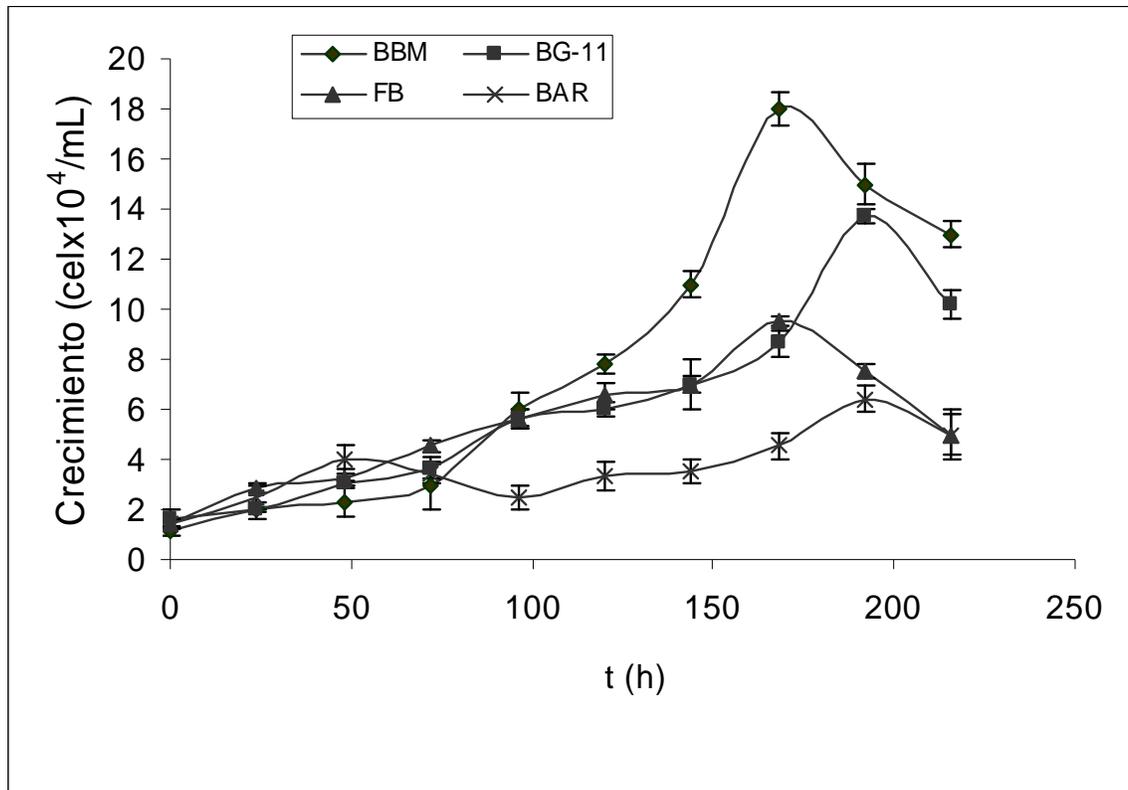


Figura 18. Cinética de crecimiento de *H. pluvialis* en diferentes medios de cultivo a 28°C, agitación manual una vez al día, luz continua e intensidad luminosa 177 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Quando los cultivos fueron aireados se incrementó el número de células verdes significativamente ($P = 6.59\text{E}-09$) en todos los casos, observando que a las 168 h en el medio BBM se obtuvo el doble de células verdes ($35 \times 10^4 \text{ cél/mL}$) que es significativamente mayor ($P = 8.96\text{E}-06$) con respecto al cultivo no aireado con luz continua y 1.4 veces más ($23 \times 10^4 \text{ cél/mL}$) en fotoperiodo con la misma intensidad luminosa (fig. 19, Tabla 3).

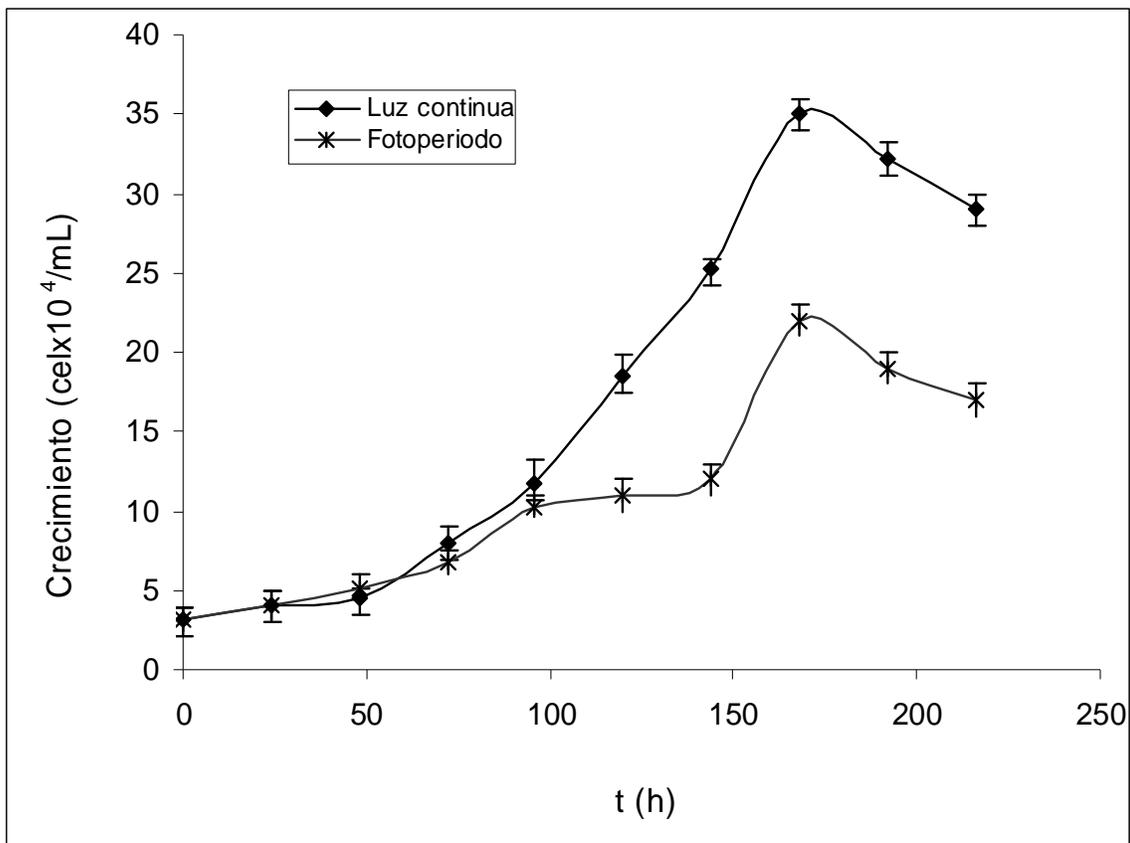


Figura 19. Crecimiento de *H. pluvialis* en el medio BBM a 28°C con aire (0.5 vvm) e intensidad luminosa ($177 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Los resultados de la figura 19 se ajustaron a un modelo de crecimiento exponencial hasta las 168 h, tiempo en el que se ajustan los puntos a este tipo de crecimiento (Fig. 20). Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo exponencial descrito por la ecuación: $N_t = N_0 e^{(rt)}$. Para hacer el ajuste, se linealizó esta ecuación mediante transformación de los valores de Y, a los cuales se les calculó su logaritmo natural, para hacer la regresión lineal de $\ln N$ vs t. mediante el método de mínimos

cuadrados. Este ajuste se aplicó ya que la tendencia de crecimiento de especies sencillas, como bacterias, levaduras e incluso microalgas, cuando crecen en condiciones adecuadas, se realiza a un ritmo exponencial que en cultivos por lote normalmente conducen a un máximo crecimiento y un posterior declive que generalmente es abrupto como se presentó en las figuras 18 y 19. La idea de aplicar ese ajuste fue para determinar si había diferencias significativas en las formas de crecimiento poblacional entre las dos condiciones probadas.

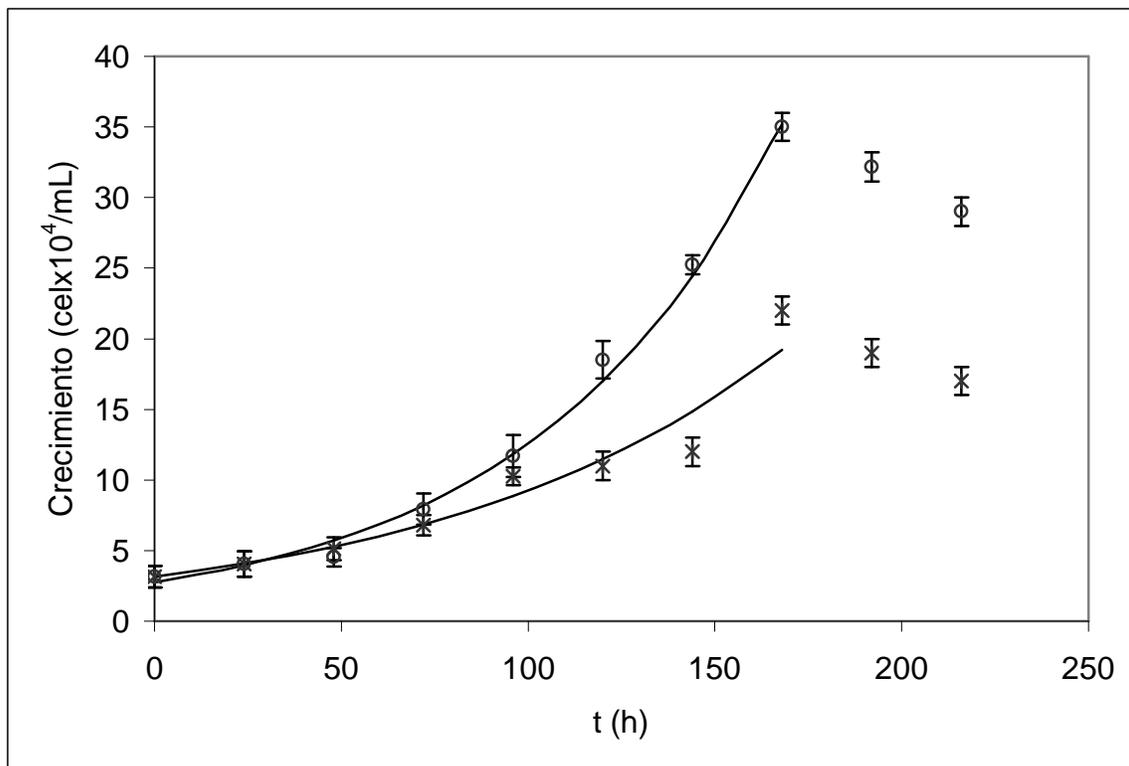


Figura 20. Crecimiento de *H. pluvialis* en el medio BBM a 28°C con aire (0.5 vvm) e intensidad luminosa (177 μmol fotones m⁻²s⁻¹) ajustado a un modelo exponencial.

En la tabla 3 se muestra el crecimiento de *H. pluvialis* con las diferentes condiciones ambientales en los diferentes medios de cultivo (16 experimentos), observando que en todos los casos con inyección de aire se incrementó el número de células significativamente en el medio BBM y BG-11. En los medios FB y BAR el aumento de células verdes no fue tan significativo. Este comportamiento se podría explicar ya que si observamos la tabla 2 del anexo 1, se puede apreciar que la cantidad de microelementos presentes en el medio BBM es el doble que en el medio BG-11 y el medio FB no presenta microelementos. Por lo que se podría concluir que el medio BBM tiene la cantidad de nitrato (fuente de nitrógeno) necesaria, como de microelementos para alcanzar un mayor crecimiento vegetativo con respecto al medio BG-11 donde al parecer presenta exceso de nitrato y al medio FB donde no hay presencia de microelementos.

Tabla 3. Crecimiento de *H. pluvialis* (cél. X 10⁴/mL) a 28°C, intensidad luminosa (177 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Iluminación	Aire	MEDIOS DE CULTIVO			
		BBM	BAR	FB	BG-11
Luz continua	No	18	6	9	9
Luz continua	Si	35	7	12	27

12 h luz/12 h oscuridad	No	14	5	9	13
12 h luz/12 h oscuridad	Si	23	6	11	19

La producción de astaxantina por *H. pluvialis* con agitación manual una vez al día a 28°C sin aire e intensidad luminosa de 177 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue significativamente mayor ($2.74\text{E-}06$) con luz continua que en fotoperiodo ya que se tuvo 5.5 mg/g biomasa seca en el medio BAR a las 250 h; en el medio BG-11 y FB fue de 1.3 mg/g biomasa seca y de 1.53 mg/g biomasa seca para BBM (Fig. 21). Cabe mencionar que la producción de astaxantina en el medio BAR bajo estas condiciones y a ese tiempo fue 4 veces mayor que en los demás medios. Por otro lado se observó que desde las 120 h la síntesis de astaxantina en el medio BAR por *H. pluvialis* es significativamente mayor ($P=1.52\text{E-}07$) con respecto a los otros medios, por lo que para fines prácticos a partir de ese momento se podría parar el proceso de producción bajo estas condiciones.

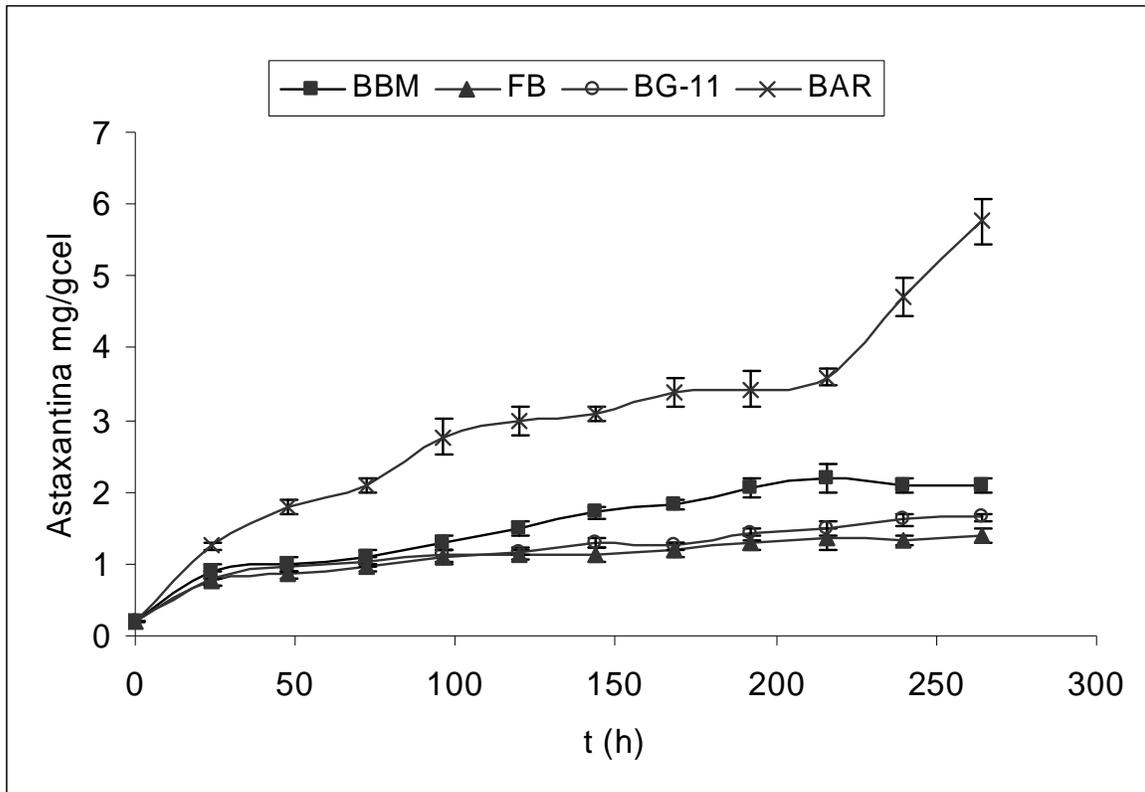


Figura 21. Producción de astaxantina en diferentes medios a partir de *H. pluvialis*, agitación manual una vez al día sin aire y luz continua ($177 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Si observamos los valores de crecimiento (Tabla 3) y los de producción de astaxantina (Tabla 4) nos podremos dar cuenta que en el medio donde se presentó un mayor número de células verdes de *H. pluvialis* es donde hay menor producción de astaxantina, lo que quiere decir que en las células verdes se encuentra presente mayor cantidad de metabolitos primarios, pigmentos característicos de la mayoría de las algas verdes y las plantas superiores como es la clorofila. Mientras que en el medio BAR al parecer se detiene la reproducción de células verdes y se induce la

formación de palmelas o quistes con la producción de metabolito secundario como es el caso de la astaxantina.

Tabla 4. Contenido de astaxantina en *H. pluvialis* (mg/ g biomasa seca) a 28°C, intensidad luminosa (177 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a las 168 horas.

MEDIOS DE CULTIVO

Iluminación	aire	BBM	BAR	FB	BG-11
Luz continua	no	1.5	3.3	1.3	1.98
Luz continua	si	1.1	2.2	1.0	1.3
12 h luz/12 h oscuridad	no	1.6	3	1.4	1.4
12 h luz/12 h oscuridad	si	1.3	1.6	1.2	1.2

Por otra parte, cuando a los cultivos se les inyectó aire se incrementó la cantidad de células verdes en los medios BBM, FB y BG-11 (Tabla 4) con luz continua y fotoperiodo, excepto en el medio BAR donde prácticamente no hay aumento en el número de células. Podría pensar que en el medio BAR se inhibió el crecimiento celular debido muy probablemente a la presencia de acetato en el medio; pero por otro lado se indujo la síntesis de astaxantina en *H. pluvialis* (Tabla 4).

El aire presenta un doble efecto en los cultivos de *H. pluvialis*, ya que mantiene las células en movimiento provocando que incida más tiempo la luz en ellas, la cual es utilizada como fuente de energía para el crecimiento fotosintético y por otro lado utiliza el CO₂ del aire como fuente de carbono inorgánico (Moya y col.,1997) por lo que se estimuló la producción de clorofila *a* no así la síntesis de astaxantina.

Bajo condiciones óptimas de crecimiento los pigmentos antena absorben la luz y la convierten a energía química formando ATP y NADPH a través de la cadena de transporte fotosintético de electrones, esta energía es finalmente almacenada como almidón mediante la fijación del CO₂ a través del ciclo de Calvin (Boussiba, 2000).

En la figura 22 se determinó el crecimiento en base a peso seco de *H. pluvialis* en los medios BBM y BAR con aire y luz continua, sin aire y luz continua. Se observó que el peso seco aumentó durante las primeras 48 h obteniéndose aproximadamente 0.12 gL⁻¹ en todos los casos. A partir de ese momento en el medio BBM sin aire el peso seco se mantuvo constante hasta las 150 h, momento en el que se incrementó alcanzando 0.29 gL⁻¹ a las 264 h. En el medio BAR sin aire y con aire se presentó un incremento gradual significativo ($P=6.13E-04$) en el peso obteniéndose 0.37 gL⁻¹ y 0.40 gL⁻¹ respectivamente a las 264 h. En el medio BBM con aire, el incremento también fue significativo alcanzando un peso de 0.37 gL⁻¹ a las 264 h. El comportamiento en el medio BAR era de esperarse, ya que la síntesis de astaxantina

en *H. pluvialis* empezó a partir de la fase estacionaria por tratarse de un metabolito secundario. La síntesis de astaxantina incrementa el tamaño de las células de *H. pluvialis* significativamente ($P=6.13E-04$) de acuerdo a la cantidad de pigmento presente en cada célula. El incremento de peso en el medio BBM con aire se debe principalmente a la presencia de un mayor número de células verdes con alto contenido de clorofila. De acuerdo a estos resultados se podría concluir que el peso seco no sólo depende del número de células verdes presentes en el medio sino del estado celular en que se encuentren (Fig. 17) y de la cantidad de astaxantina presente en las células de *H. pluvialis* (Fig. 22), resultados que coinciden con los reportados por Kakizono y col., 1992.

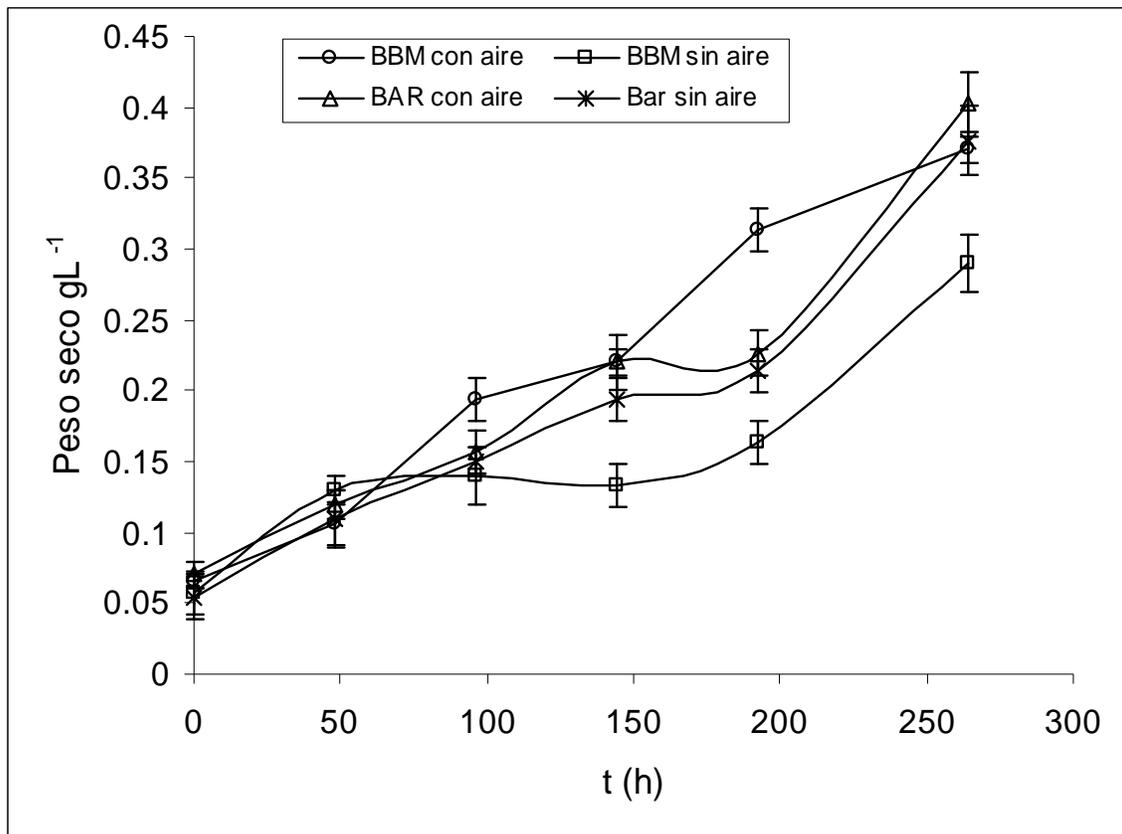


Figura 22. Crecimiento de *H. pluvialis* en base a peso seco en medio BBM y BAR con luz continua ($177 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

De acuerdo a los resultados de las Tablas 3 y 4, el mayor número de células verdes se obtuvo en el medio BBM con aire y la mayor producción de astaxantina en el medio BAR sin aire, aunque la síntesis del pigmento aún fue muy pobre bajo estas condiciones. Por lo anterior, se planteó en una segunda etapa experimental utilizar el doble de concentración de inóculo (20% v/v) de *H. pluvialis* en fase exponencial crecido en medio BBM con aire. Se montaron 4 experimentos simultáneos e

independientes, en matraces Erlemeyer de 1000 mL con 700 mL de medio BAR y mayor intensidad luminosa ($345 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Las condiciones de incubación fueron: 1. luz continua con suministro de aire, 2. luz continua sin aire, 3. fotoperiodo 12 h luz/ 12 h oscuridad con suministro de aire y 4. fotoperiodo 12 h luz/ 12 h oscuridad sin aire. Estos experimentos se realizaron con el objeto de ver en cuál de ellos se inducía más rápidamente la formación de quistes y de ser posible con mayor contenido de astaxantina. Los resultados a continuación:

En la figura 23 se muestra la producción de pigmentos (clorofila y astaxantina) con luz continua ($345 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y aire, observándose que cuando se inyectó aire los cultivos presentaron un aumento gradual en la cantidad de clorofila *a* hasta 3.4 mgL^{-1} a las 240 h con una producción de astaxantina de 4.9 mg/g biomasa seca. A partir de ese momento la clorofila presentó una caída abrupta hasta 0.556 mgL^{-1} y se mantuvo prácticamente constante hasta las 350 h. Por otro lado, la cantidad de astaxantina aumentó hasta 6 mg/g biomasa seca en ese mismo tiempo. El peso seco obtenido bajo estas condiciones fue de aproximadamente 0.92 gL^{-1} (Fig. 27). La caída abrupta que presenta la clorofila en el cultivo, puede estar relacionada con el cambio del estado vegetativo de *H. pluvialis* a palmelas o quistes, ya que a partir del paso a quiste se observa un incremento significativo de astaxantina.

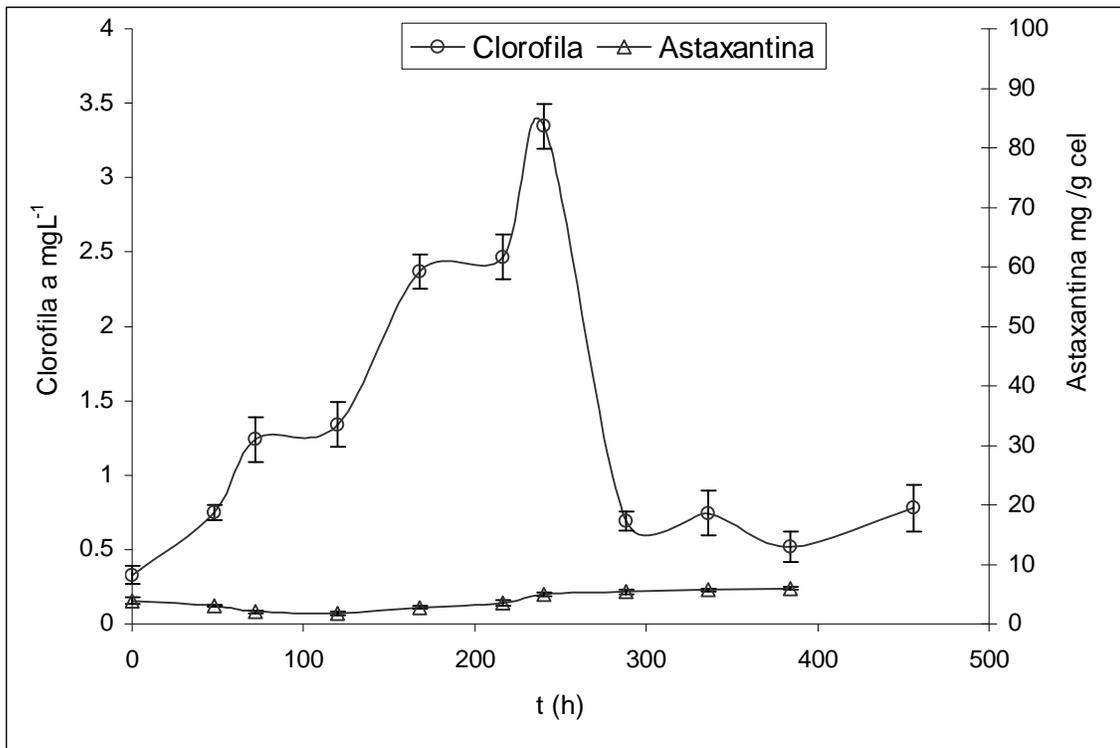


Figura 23. Producción de clorofila *a* y astaxantina a partir de *H. pluvialis* en medio BAR a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ con iluminación continua e intensidad luminosa de $345 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y aireación (0.5 vvm).

La producción de clorofila *a* en el medio BAR con aire fue menor con fotoperiodo (Fig. 24) que con luz continua. Su concentración aumentó durante las primeras horas, observándose una fase lag de 50 h y una fase estacionaria a las 92 h. Se tiene una producción de 2.06 mgL^{-1} de clorofila *a* a las 216 h con una producción de astaxantina de 2.67 mg/g biomasa seca, la cual continuó aumentando durante las siguientes horas alcanzando un máximo de 8 mg/g biomasa seca a las 288 h que equivale a 1.5 veces más que con luz continua en ese mismo tiempo y la

clorofila *a* disminuyó hasta prácticamente llegar a cero. Una razón por la cual la concentración de clorofila *a* ya no se pudo cuantificar probablemente sea debido a que su concentración en las células sea tan baja que no se puede detectar por el método utilizado. De acuerdo a los resultados de las figuras 23 y 24, el fotoperiodo favoreció la producción de astaxantina, ya que en menor tiempo se tuvo una mayor cantidad de astaxantina.

En los siguientes experimentos los cultivos se incubaron con luz continua $345 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sin aire. Mostrando en la figura 25 que la producción de astaxantina se incrementó significativamente hasta 39.0 mg/g cél a las 288 h lo que representa 7.3 veces más pigmento con respecto a los cultivos aireados y luz continua en medio BAR (Fig. 23) y 4.8 veces más en fotoperiodo (Fig. 24) al mismo tiempo, 288h. La concentración de astaxantina aumentó durante las siguientes horas hasta alcanzar $96.52 \text{ mg/g biomasa seca}$ a las 456 h de cultivo. El contenido de clorofila *a* fue de 0.69 mgL^{-1} la cual aumentó en las primeras 72 h, para disminuir posteriormente hasta 0 mgL^{-1} . El peso seco en este caso fue de aproximadamente 0.82 gL^{-1} a las 336 h (Fig. 27).

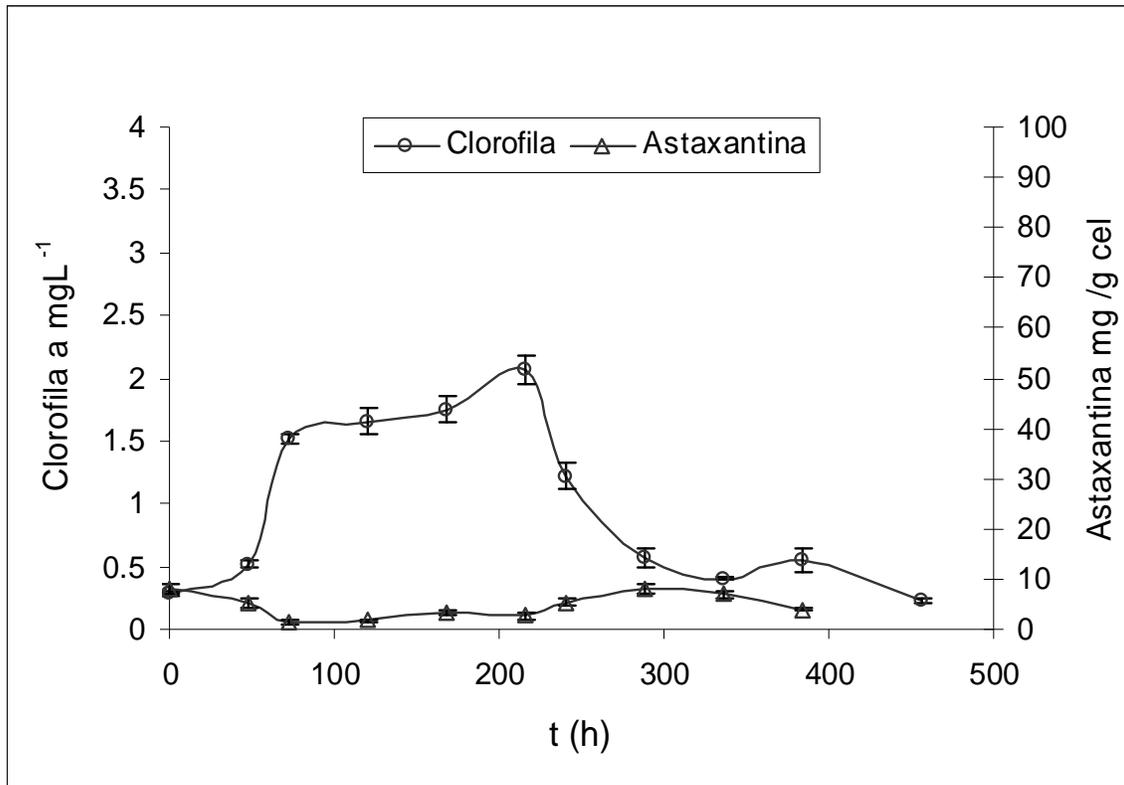


Figura 24. Producción de clorofila *a* y astaxantina a partir de *H. pluvialis* en medio BAR a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en fotoperiodo [12 h luz ($345 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) /12h oscuridad] y aireación continua (0.5 vvm).

En los cultivos en fotoperiodo sin aire (Fig. 26) la producción de astaxantina por *H. pluvialis* se mantuvo casi constante durante las primeras horas alcanzando 17.48 mg/g biomasa seca a las 288 h que equivale a 1.5 veces más que con luz y aire continuos (Fig. 23) y 2.1 veces más pigmento que en fotoperíodo con aire (Fig. 24). A partir de las 300 h prácticamente ya no se detecta clorofila (0.125 mgL^{-1}).

Durante las siguientes horas al igual que con luz continua se presenta un incremento de astaxantina en los cultivo hasta 80 mg/g biomasa seca a las 456 h. El peso seco aumentó exponencialmente durante las primeras 220 h, después se mantuvo casi constante con una concentración de 0.43 gL⁻¹ (Fig. 27).

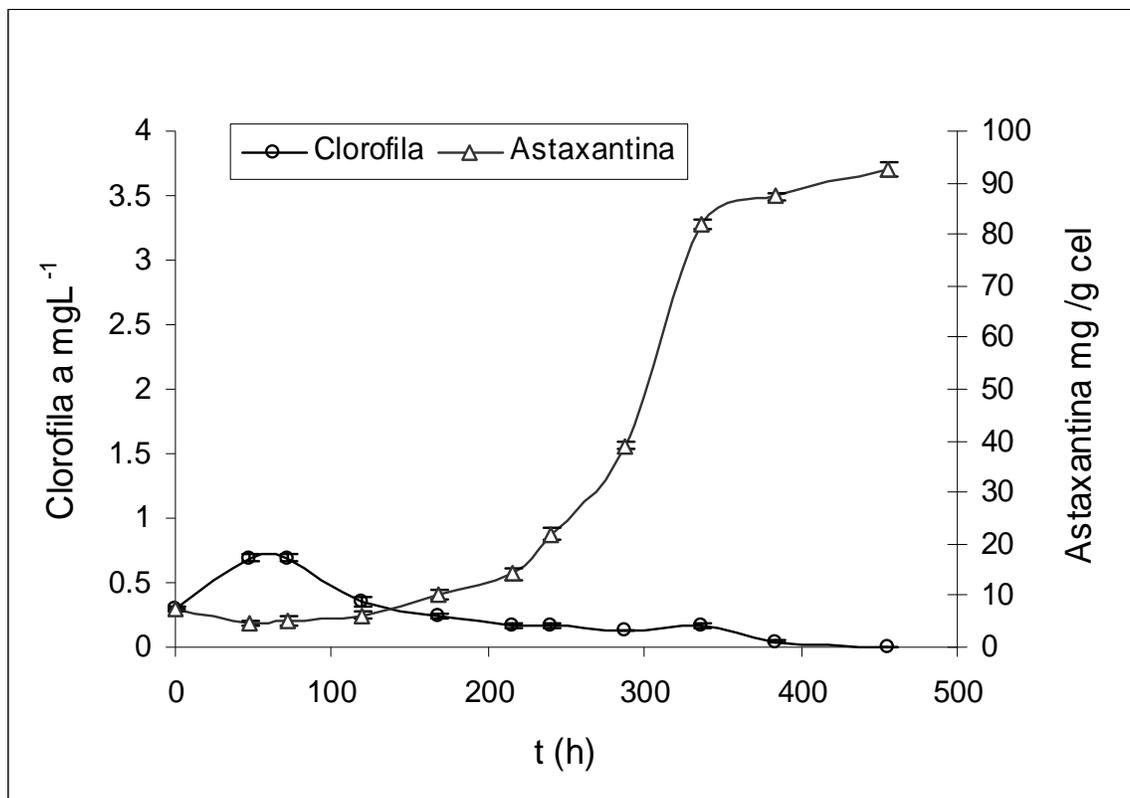


Figura 25. Producción de clorofila a y astaxantina a partir de *H. pluvialis* en medio BAR a 28 ± 2°C sin aire y con iluminación continua e intensidad luminosa de (345 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

En base a los resultados y para fines prácticos se podría sugerir que a partir de las 350 h de cultivo, detener la cinética, ya que a partir de ese momento la producción de astaxantina es significativamente mayor (200%) en los cultivos sin aire con luz continua (Fig. 25) con respecto a los cultivos en fotoperiodo sin aire (Fig. 26).

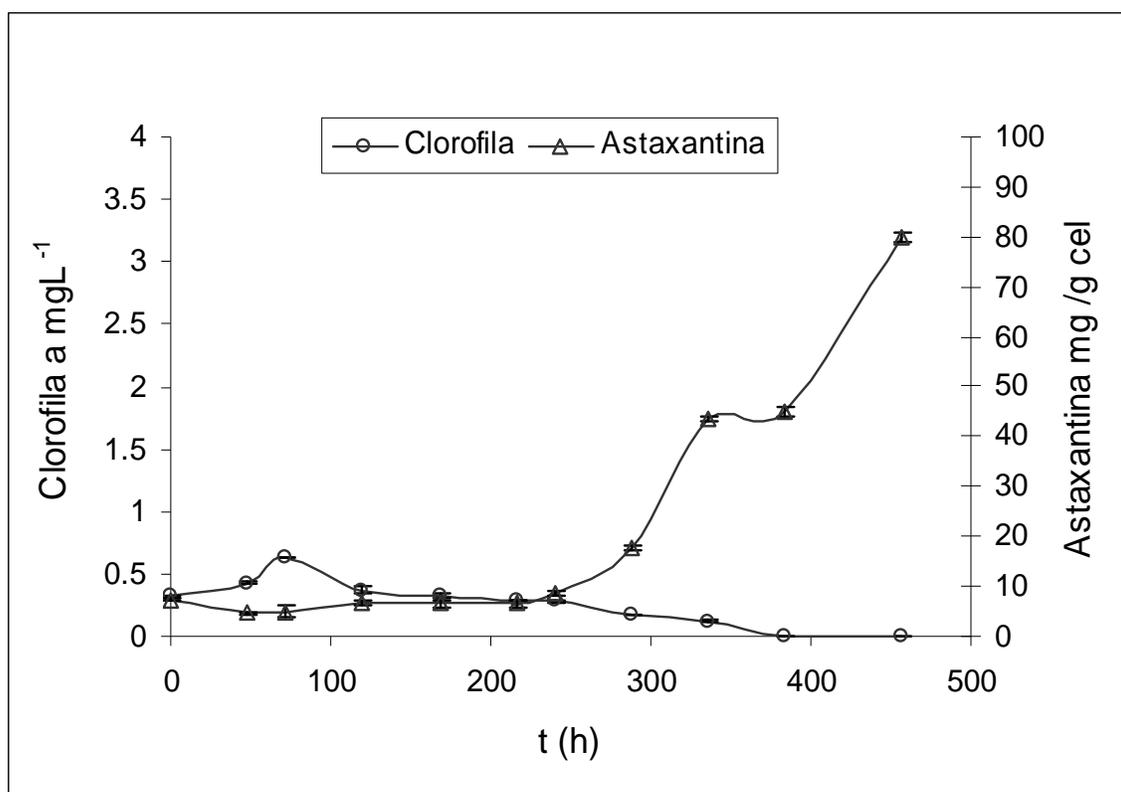


Figura 26. Producción de clorofila a y astaxantina a partir de *H. pluvialis* en medio BAR a 28°C sin aire y en fotoperiodo [12h luz ($345 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) /12h oscuridad].

En la figura 28 se muestran matraces con los diferentes colores observados durante la biosíntesis de los pigmentos con *H. pluvialis*. Observando que en el matraz de

color verde se tiene la fase de células verdes de *H. pluvialis* en el medio BBM a las 168 h de cultivo donde el principal pigmento que se produce es la clorofila y en los otros dos matraces la fase de quistes con diferentes concentraciones de astaxantina en el medio BAR sin aire.

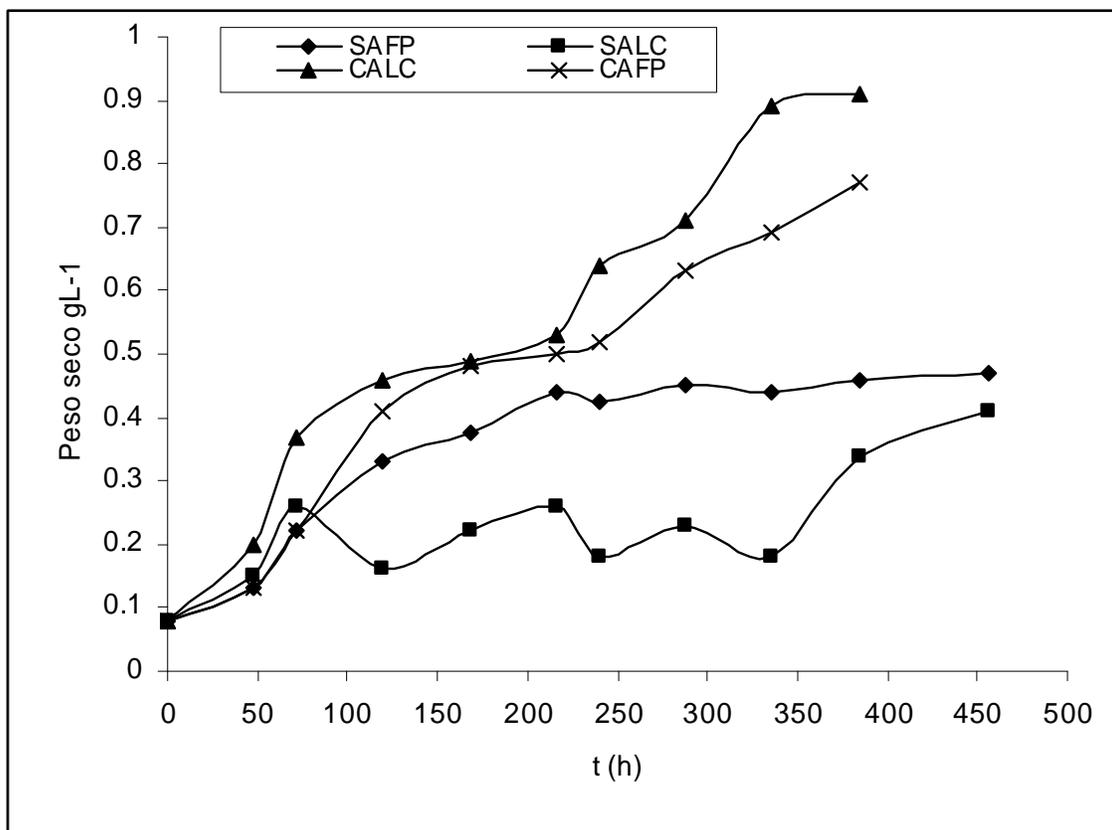


Figura 27. Crecimiento de *H. pluvialis* en base a peso seco en medio BAR. con aire y luz continua (CALC); con aire y fotoperiodo (CAFP); sin aire y luz continua (SALC); sin aire y fotoperiodo (SAFP).



Figura 28. Diferentes estadios de *H. pluvialis* en el medio BBM y BAR durante la síntesis de astaxantina.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las figuras 25 y 26 podemos decir que los cultivo sin suministro de aire principalmente, y mayor intensidad luminosa ($345 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) las células de *H. pluvialis* se someten a estrés por luz induciendo la producción de astaxantina, ya que como se mencionó anteriormente la astaxantina es un metabolito secundario que se produce en condiciones de estrés como protección de la célula. Por otro lado, la presencia de acetato de sodio en el medio BAR al parecer detiene la reproducción de células verdes e induce la

formación de astaxantina. Asimismo se observó que el aire favoreció la formación de células verdes y por consiguiente el contenido de clorofila aumentó significativamente. En los cultivos no aireados las células no se encuentran en movimiento dinámico por lo que detienen su crecimiento fotosintético pero aceleran la formación de astaxantina. Por lo que se puede concluir que la combinación de parámetros ambientales (intensidad luminosa alta ,sin aire) como la presencia de un factor nutricional (acetato de sodio) influyen directamente en la síntesis de astaxantina (Domínguez- Bocanegra y col., 2002). Resultados que coinciden con estudios efectuados por Zlotnik y col. (1993); Harker y col. (1996 a, b); Gong y Chen (1998); Tripathi y col. (1999); Boussiba y col. (1999) y Hagen y col. (2001) donde indican que los parámetros nutricionales y ambientales influyen directamente en la formación de astaxantina en células de *H. pluvialis*.

Bajo condiciones ambientales óptimas para la producción de células verdes de *H. pluvialis* se indujo la formación de clorofila *a* y los carotenoides primarios, especialmente β -caroteno y luteína (Boussiba, 2000). En estas condiciones las células verdes y elipsoidales con dos flagelos presentan movilidad y una tasa de crecimiento alta (Fig. 19).

La presencia de acetato de sodio como fuente de carbono orgánico adicional en el medio BAR y una mayor intensidad luminosa interfirieron en el ciclo de vida de

H. pluvialis, limitando el crecimiento y el proceso fotosintético y estimulando la formación de quistes. Lo anterior coincide con estudios previos donde se reporta que una relación de C/N elevada estimuló la producción de astaxantina (Kakizono y col., 1992; Kobayashi y col., 1992a).

Estudios realizados por Kakizono y col. (1992) mostraron que el cambio morfológico del alga se encuentra asociado tanto con el incremento del contenido de ADN como con la disminución del contenido de proteína en las células, lo que coincide con la naturaleza general de las células quísticas. Además el aumento en el número de células hijas, en las células quísticas y la disminución de la actividad metabólica es debido a la etapa de pausa que presenta *H. pluvialis* durante su ciclo de vida. Sin embargo, con la adición de acetato, el contenido intracelular de ADN permanece constante y el contenido de proteína se incrementa considerablemente indicando que hay enquistamiento.

Cuando se cultivó en BBM, *H. pluvialis* se conservó más tiempo en estado vegetativo o en palmela, lo que estimuló la producción de clorofila *a*, con la edad de los cultivos y el agotamiento de nutrientes tales como nitratos se limitó el crecimiento y se favoreció la forma de quistes (aplanosporas)(Fig. 28) y por lo tanto la acumulación de astaxantina; como se presentó en el medio BAR. Este hecho se contrapone con estudios realizados por Boussiba y col. (1992), quien reportó que el nitrógeno es un requerimiento importante para la síntesis de astaxantina en esta

alga. En los cultivos sin aire y en presencia de acetato de sodio como fuente de carbono se estimuló la producción de astaxantina (Figs. 25, 26) lo que coincidió con los estudios realizados por Kobayashi y col. (1992a y 1993).

El no suministro de aire a los cultivos, indujo eficientemente la carotenogénesis junto con la presencia del acetato de sodio, favoreciendo la formación de quistes de *H. pluvialis* con un elevado contenido de astaxantina (Figs. 25, 26). Por otra parte la presencia de fierro también estimuló la síntesis de carotenoides después del periodo de maduración (Figs. 25, 26) lo que coincide con los estudios efectuados por Kobayashi y col. (1997).

Lee y Soh (1991) reportaron que el contenido más elevado de astaxantina se obtuvo en células crecidas en un medio limitado en nitrógeno (0.25 gL^{-1}) y a un nivel alto ($345 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de radiación lo que coincide con nuestros estudios, pero los resultados obtenidos en el presente trabajo son 5 veces más altos que los obtenidos por estos autores.

La disminución de la clorofila durante la formación de aplanosporas puede estar asociada con la transición del cultivo a la deficiencia de nitrógeno, que da como resultado una degradación moderada de las enzimas asociadas con las reacciones de oscuridad de la fotosíntesis (Falkowski y col., 1989). Nuestros resultados

confirman la hipótesis de Czygan (1970) que menciona que las fuentes de carbono que estimulan la biosíntesis de carotenoides secundarios provienen de los metabolitos formados durante la descomposición de la clorofila *a* (Figs. 23, 24, 25 y 26).

En las aplanosporas de *H. pluvialis* se cree que la función primaria de la astaxantina es como protector “pasivo” (filtro), ya que reduce la cantidad de luz disponible para los complejos proteicos pigmentarios del fotosistema II (PSII), disminuyendo el riesgo de fotoinhibición (Yong y Lee, 1991; Hagen y col., 1994).

Cualquier factor que interfiera con ciertos procesos celulares dentro del alga y que por lo tanto limite el crecimiento o la fotosíntesis, puede actuar como un activador del proceso de enquistamiento y formación de astaxantina (Fábregas y col., 2001; Domínguez-Bocanegra y col., 2002). Parecería que las microalgas sintetizan y almacenan la astaxantina en respuesta a factores ambientales como una alta intensidad luminosa, así como nutricionales como el acetato de sodio y bajo contenido de nitrato (Domínguez-Bocanegra y col., 2002).

7.3 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE *P. rhodozyma* (BMH-103) VARIANDO CONDICIONES NUTRICIONALES PARA LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA.

En la figura 29 se muestra el aumento de biomasa (base seca) de *P. rhodozyma* (BMH-103) en los medios YPG, YM y agua de coco. De manera general se observa una tendencia exponencial, la velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.011 h^{-1} en agua de coco, 0.013 h^{-1} en YPG y en el medio YM de 0.009 h^{-1} . Los resultados muestran que el crecimiento en el agua de coco fue significativamente mayor ($1.20\text{E-}06$) con respecto a los otros dos medios, ya que se obtuvo 1.6 veces más biomasa a las 120 h de fermentación que en los medios YM y YPG. También se observa que aproximadamente hasta las 72 h de fermentación el crecimiento es muy similar en el medio YM y en el agua de coco, presentando un crecimiento significativo ($1.13\text{E-}04$) con respecto al medio YPG. A partir de ese momento comienza una fase de desaceleración del crecimiento en los cultivos con los medios YM y YPG. Los rendimientos ($Y_{x/s}$) obtenidos con respecto al sustrato fueron de 0.51 para agua de coco, 0.45 para YM y 0.28 para YPG.

En la figura 30 se observa el comportamiento del consumo de azúcares durante la cinética de crecimiento de *P. rhodozyma* en los diferentes medios de cultivo. Tenemos que durante las primeras 72 h se tiene un consumo del 85% en el agua de coco y de 70% en el YM y YPG, tiempo en el que se alcanzó la fase exponencial de crecimiento de *P. rhodozyma* en los diferentes medios de cultivo (Fig.

29), y durante las siguientes 48 h el consumo de sustrato alcanzó un 92.5% en agua de coco, 88% en YM y 85% en YPG, lo que indica que hubo mayor consumo de azúcares en el agua de coco que en los medios YM y YPG. Cabe señalar que el máximo crecimiento de *P. rhodozyma* en agua de coco es de 9.2 gL^{-1} , en el medio YPG de 4.6 gL^{-1} a las 120 h y de 5.2 gL^{-1} a las 72 h (Fig. 29). Estos resultados nos permiten afirmar que la cantidad de azúcares presente en el medio influye directamente sobre la velocidad de crecimiento, lo que coincide con los estudios realizados por Petrus y Meyer (1994) pero no así en el caso del medio YPG, ya que se presentó inhibición por sustrato con respecto al crecimiento.

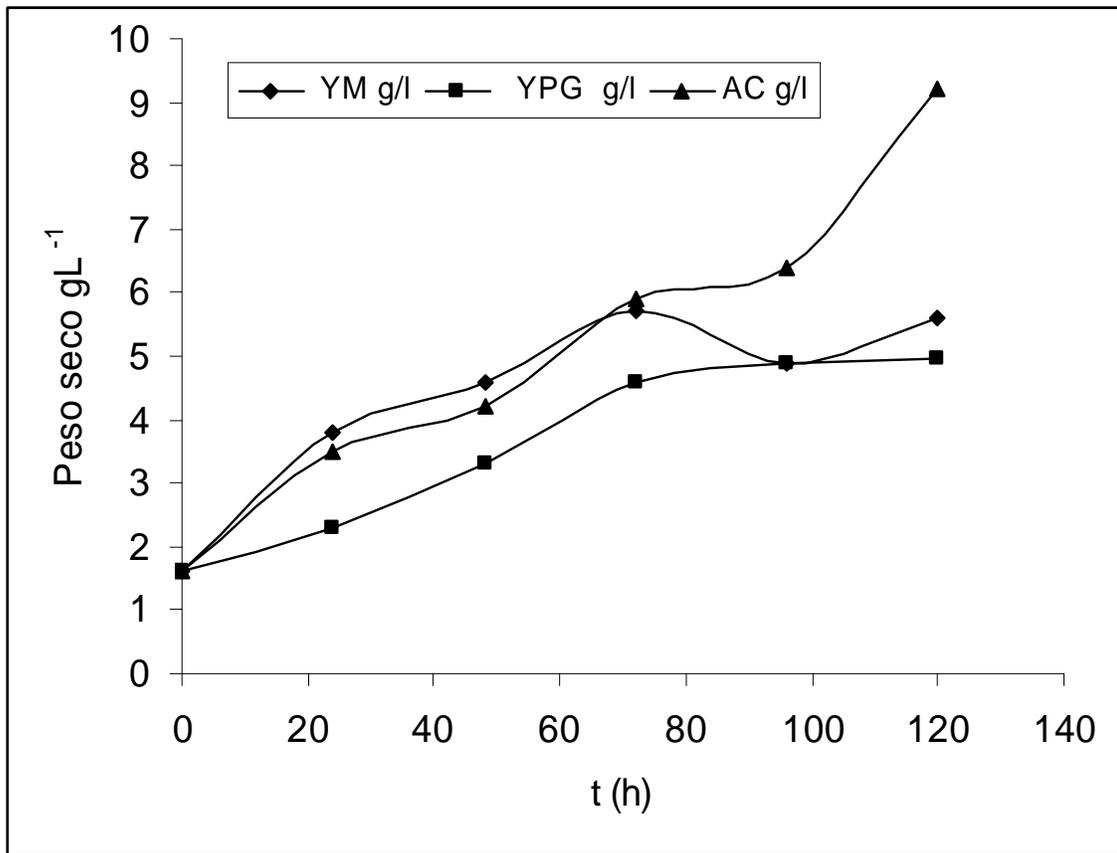


Figura 29. Crecimiento de *Phaffia rhodozyma* a 22°C, 150 rpm y pH=4.5 en los diferentes medios de cultivo.

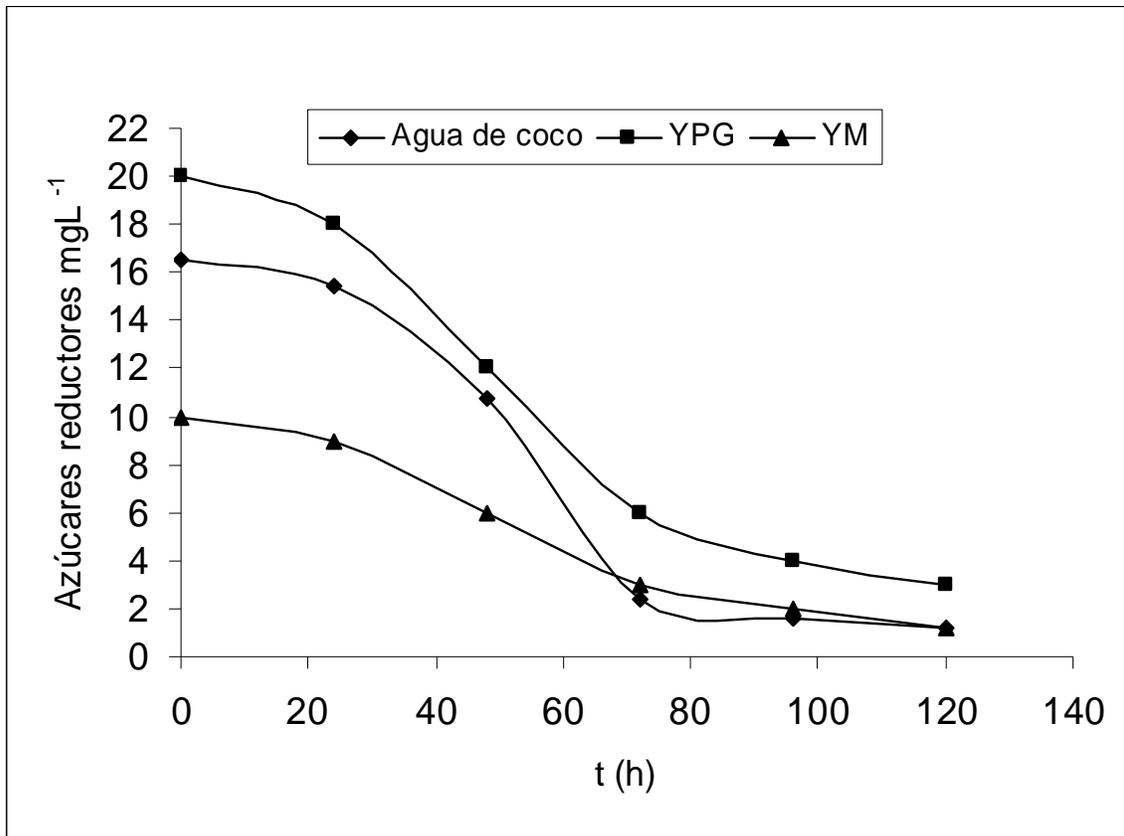


Figura 30. Consumo de azúcares reductores por *P. rhodozyma* (BMH-103) en los diferentes medios de cultivo a 22°C, 150 rpm y pH=4.5.

En la figura 31 se muestra la producción de astaxantina a partir de *P. rhodozyma* en los distintos medios de cultivo observando que en el agua de coco se alcanzó una mayor producción de pigmentos, obteniendo una mayor síntesis de astaxantina (850 µg/glev) con un rendimiento (Yp/x) de 0.346. Lo que significa aproximadamente el doble de concentración que el obtenido en el medio YM donde se obtuvo únicamente 450 µg/g lev. con un rendimiento de 0.21 y en YPG se obtuvo

310 $\mu\text{g/g}$ lev con un rendimiento de 0.146. Los resultados indican que la síntesis de astaxantina está parcialmente asociada al crecimiento y que se continúa produciendo después de que el crecimiento ha cesado. Esto es debido probablemente a que *P. rhodozyma* excreta algunos intermediarios extracelulares de carbono durante el crecimiento, los cuales son aprovechados más tarde, estimulando la carotenogénesis (Johnson y An, 1991).

La concentración de 20 gL^{-1} de azúcares presente en el medio YPG (Fig. 30), presentó un efecto negativo tanto en la producción de astaxantina como en el crecimiento, mientras que con una cantidad menor (10 gL^{-1}) de glucosa como en el medio YM aumentó el crecimiento y la síntesis de astaxantina. Por otro lado, en el agua de coco se obtuvo mayor crecimiento y mayor síntesis de astaxantina, a pesar de tener una mayor cantidad de azúcares que el medio YM. De acuerdo a estos resultados se podría decir que la fuente de carbono (azúcares) presente en el agua de coco (16 gL^{-1}) no es de fácil asimilación sometiendo a las células a estrés induciendo una mayor producción de astaxantina en *P. rhodozyma* por tratarse de un metabolito secundario.

En experimentos realizados en fermentador por Velázquez (1995), también se observó que el incremento de la síntesis de carotenoides coincide con el agotamiento de la fuente de carbono y con el aumento en la concentración de oxígeno disuelto (OD) ya que se produce un estrés oxidativo en las células. Como se mencionó

anteriormente, en organismos no fotosintéticos los carotenoides ofrecen protección contra daño foto-oxidativo mediado por radicales libres (Flores-Cotera, 2001).

En las levaduras, el aumento de la concentración de oxígeno disuelto (OD) al agotarse los azúcares en el medio de cultivo, generalmente va acompañado con un drástico cambio en el patrón global de expresión de genes de procesos celulares fundamentales del metabolismo de carbono, síntesis de proteínas y almacenamiento de carbohidratos. En *P. rhodozyma* la reasimilación del etanol es uno de los procesos que se inicia poco después de elevarse la concentración de OD al disminuir la concentración de azúcares (Flores-Cotera, 2001).

El metabolismo del etanol podría contribuir a la inducción de la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*, ya que la oxidación de etanol produce un aumento de la relación NADH/NAD⁺, por consiguiente, la actividad del ciclo de Krebs y la respiración se inhiben. Previamente An y Johnson (1990), demostraron que la inhibición con antimicina de la cadena respiratoria principal, estimula la producción de carotenoides en *P. rhodozyma* por un mecanismo en el que posiblemente está implicada una mayor formación de MOR y la actividad de una vía respiratoria alterna.

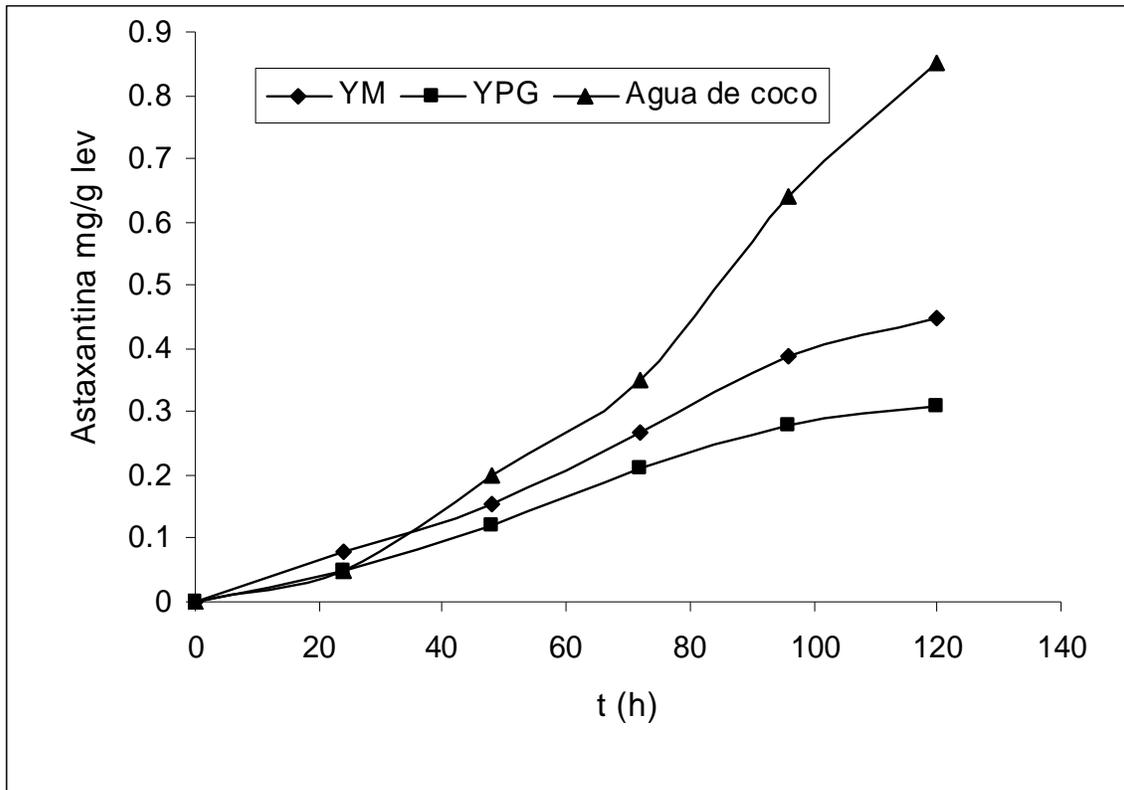


Figura 31. Producción de astaxantina a partir de *P. rhodozyma* (BMH-103) a 22°C, 150 rpm y pH=4.5.

El efecto de diversas fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de astaxantina a partir de *P. rhodozyma* ha sido estudiado por varios autores (An y col., 1989; Fang y Cheng, 1993; Meyer y col., 1993, 1994a, 1994b; Meyer y du Preez, 1994a; Parajó y col., 1997). que han reportado que con fuentes de carbono no refinadas tales como melaza de caña, jugo de uva, turba hidrolizada, jugo de alfalfa residual etc, se ha incrementado la síntesis de astaxantina en cepas silvestres o mutantes de *P. rhodozyma*; por lo que surgió la idea de utilizar agua de coco como

medio de cultivo para la producción de astaxantina con *P. rhodozyma*. Además de que anteriormente ya se había desarrollado a la levadura *Sacharomyces cerevisiae* en agua de coco, como sustrato para la producción de β -caroteno (Domínguez-Bocanegra y col., 1998).

Actualmente existen empresas en el D.F. (Delegación Iztapalapa) que utilizan la pulpa de coco y desechan el agua, la cual va a parar a los drenajes convirtiéndose en un contaminante del ambiente. Utilizar esta agua como medio de cultivo para la producción de pigmentos se obtiene un triple beneficio: (1) se soluciona un problema de contaminación ambiental, (2) se utiliza como sustrato para la obtención de carotenoides (β -caroteno y astaxantina) de alto valor agregado y (3) se bajan los costos de producción de este tipo de pigmentos.

De acuerdo a los resultados, el agua de coco (Fig. 31) resultó ser un excelente medio de cultivo para la producción de pigmentos carotenoides y particularmente de astaxantina con *P. rhodozyma*, ya que permitió obtener concentraciones superiores a las reportadas por otros autores que han utilizado fuentes de carbono alternas para disminuir los costos de producción, por ejemplo; melaza de caña de azúcar (Haard,1988), jugo de caña de azúcar (Fontana y col., 1996), subproductos de maíz macerado (Hayman y col., 1995), jugo de alfalfa

(Okagbue y Lewis, 1984), jugo de uva (Meyer y du Preez, 1994) y turba hidrolizada (Martín y col., 1993; Acheampong y Martín, 1995)(Tabla 6, anexo 1).

Se determinó la producción de astaxantina en agua de coco y melazas de caña de azúcar con la mutante R1 de *P. rhodozyma* (Domínguez-Bocanegra y col., 1999). Los experimentos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de incubación que con la cepa silvestre de *P. rhodozyma* (BMH-103).

En la figura 32 se puede observar que el crecimiento y la producción de astaxantina tanto con la cepa silvestre (BMH-103) como con la mutante R1 de *P. rhodozyma* siguieron un mismo comportamiento durante las primeras 72 h. El incremento en el peso seco se pudo deber primero al número de células presentes y a la acumulación del pigmento presente en cada célula. Después de 72 h la mutante R1 de *P. rhodozyma* aumentó su producción de astaxantina hasta 1.8 mg/g lev a las 120 h, lo que es significativamente mayor que la alcanzada en el medio YM por la mutante R1, ya que representa aproximadamente un 200% de aumento en la síntesis de astaxantina en ese mismo tiempo.

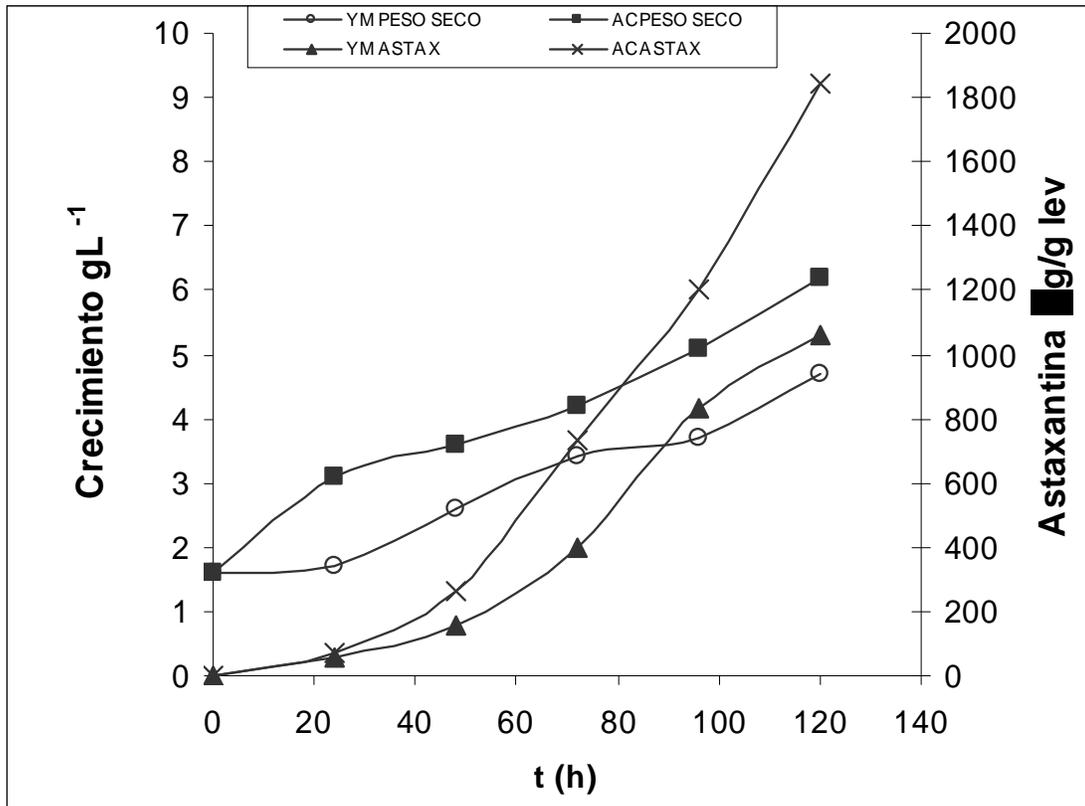


Figura 32. Crecimiento y producción de astaxantina por *P. rhodozyma* (R1) en agua de coco y YM a 150 rpm a 22°C.

En la figura 33 se muestra la coloración roja en la etapa temprana del periodo de crecimiento (72 h) de un cultivo líquido de *P. rhodozyma* (BMH-103), el cual es indicativo del contenido de astaxantina. La concentración de astaxantina en *P. rhodozyma* se incrementa en los estadíos tempranos del crecimiento hasta llegar a la fase exponencial, después de esta etapa aún se sigue incrementando después de la fase estacionaria por tratarse de un metabolito secundario.



Figura 33. Etapas de producción de astaxantina con *P. rhodozyma* (BMH-103) en agua de coco como sustrato.

En la figuras 33 y 34 se observa el color característico de la astaxantina a las 120 h de cultivo en los medios YM, YPG y agua de coco; en ambas cepas de *P. rhodozyma* (BMH-103 y mutante R1). La producción de astaxantina fue significativamente superior, (200% más) cuando se trabajó con la cepa mutante R1 en los diferentes medios, y aún mayor cuando se trabajó con la combinación agua de coco y la cepa mutante R1 ya que se alcanzó casi un 400% más astaxantina con respecto al medio YM y la cepa silvestre BMH-103. Los resultados obtenidos confirmaron que el agua

de coco es un buen medio para la producción de astaxantina, además de que abarata los costos de producción.



a) YM (R1) b) Agua de coco (BMH-103) c) Agua de coco (R1).

Figura 34. Síntesis de astaxantina en los medios YM y agua de coco con las cepas silvestre BMH-103 y mutante R1 de *P. rhodozyma*.

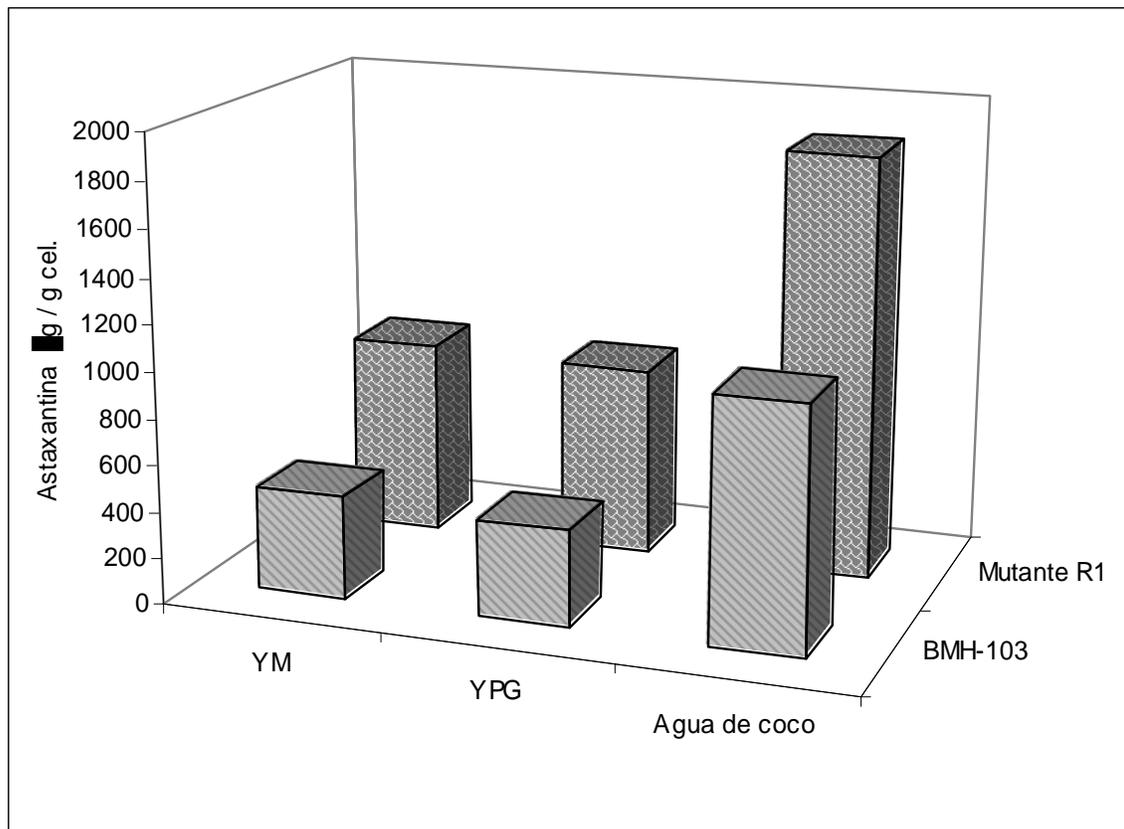


Figura 35. Producción de astaxantina por *P. rhodozyma* (BMH-103 y R1) a las 120 h de cultivo en los medios YM, YPG y Agua de coco.

Johnson y Lewis (1979), establecieron que la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* está asociada al crecimiento, pero que no coincide exactamente con el incremento de biomasa. Sin embargo en base a los resultados obtenidos (Figs. 29,31 y 32) se puede inferir que la síntesis de astaxantina en las cepas silvestre (BMH-103) y mutante R1 estuvo parcialmente asociada al crecimiento, lo que coincide con estudios realizados por Johnson y An (1991) donde se reporta que la astaxantina

continúa sintetizándose aún después de que el crecimiento ha cesado y la glucosa prácticamente ha sido consumida.

La producción de astaxantina a partir de *P. rhodozyma* depende del tipo de cepa (silvestre o mutante) y de la composición del medio de cultivo (Fig. 35) así como de las condiciones de cultivo establecidas y de las concentraciones utilizadas de fuente de carbono y nitrógeno, como se comprobó en nuestros experimentos, ya que los valores de producción de astaxantina por *P. rhodozyma* en agua de coco son superiores (el doble) a los reportados por Fleno y col. (1988) y An y col. (1989) para sus cepas silvestres y mutantes (Meyer y col., 1993).

Por otra parte, se ha reportado que la producción de carotenoides en *Sporobolomyces roseus* (Bobkova, 1965) y *Rhodotorula glutinis* (Vecher y Kulikova, 1968) ocurre solo después de que la levadura ha detenido su crecimiento, lo que sugiere que el agotamiento de nutrientes o un cambio en la fisiología del microorganismo disparan en estos casos la producción de metabolitos secundarios. De igual manera Goodwin (1972), reporta que la carotenogénesis en *Rhodotorula rubra*, ocurre principalmente después de que el crecimiento ha cesado. Sin embargo, autores como Meyer y Du Preez (1994b), observaron que los pigmentos totales y la producción de astaxantina estuvieron claramente asociados al crecimiento

incrementándose en la fase exponencial de crecimiento, alcanzando niveles máximos de producción después del consumo total de la fuente de carbono.

Cabe señalar que los parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento, rendimiento) de la cepa mutante fueron menores que los de la cepa silvestre. Este comportamiento ha sido observado también para diferentes mutantes de *P. rhodozyma* de acuerdo a estudios realizados por Johnson y An (1991), Meyer y col. (1993); Fang y Chiou (1996) donde las tasas de crecimiento y el rendimiento celular de las mutantes hiperproductoras de astaxantina, disminuyen con el incremento del contenido de astaxantina. La disminución del rendimiento celular puede ser consecuencia de una producción elevada de astaxantina, ya que menos carbono y energía pueden estar disponibles para la biosíntesis celular. Además, la baja tasa de crecimiento en tales mutantes, podría ser un indicio de que la producción de carotenoides retarda el crecimiento.

7.1.1 COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA POR *H. pluvialis* y *P. rhodozyma*.

La producción de pigmentos carotenoides por ambas cepas es distinta pero no totalmente, ya que ambas requieren de condiciones de estrés para inducir la síntesis de astaxantina en las células por ser un metabolito secundario. Además,

como se puede observar en las figuras 5 y 6 presentan la misma ruta biosintética hasta la producción del β -caroteno.

Por otro lado, la diferencia principal entre *H. pluvialis* y *P. rhodozyma* es que el primero es un organismo fotosintético, por lo que requiere de luz para poder reproducirse y el segundo no es fotosintético.

La velocidad específica de crecimiento de *H. pluvialis* es lenta por lo que el tiempo de duplicación es más largo. En contraste, *P. rhodozyma* presenta mayor velocidad de crecimiento.

El proceso de producción de astaxantina en *H. pluvialis* es más complicado que en *P. rhodozyma*, ya que se requiere de diferentes condiciones de cultivo para inducir una mayor producción del pigmento. En cuanto a *P. rhodozyma* el proceso no es tan complicado, pero la síntesis de astaxantina es pobre en comparación con *H. pluvialis* (Tabla 5).

La composición del medio de cultivo para *H. pluvialis* lo hace significativamente costoso en comparación con el agua de coco, la cual fue colectada y obsequiada por la empresa que utiliza la pulpa para la elaboración de diferentes productos y desecha el agua al drenaje. No obstante, se debe tomar en

cuenta que debido al alto contenido de azúcares en el agua de coco, se hace necesario su refrigeración antes de ser utilizada como medio de cultivo.

En la tabla 5 se presenta la productividad específica y volumétrica para *H. pluvialis* y *P. rhodozyma* (BMH-103 y R1). Cabe señalar que la productividad volumétrica fue 3.6 y 2.6 veces más grande para *P. rhodozyma* (BMH-103 y R1) respectivamente en agua de coco, que el medio YM. La productividad celular es mayor con la cepa silvestre (BMH-103) de *P. rhodozyma* con respecto a la mutante R1.

Sí comparamos la productividad específica de *H. pluvialis* y *P. rhodozyma*, se ve claramente que *H. pluvialis* es más productiva (0.21 mg astaxantina/g cel h) que *P. rhodozyma* (0.015 mg astaxantina/ g cel h).

Tabla 5. Productividad volumétrica y Productividad específica de *P. rhodozyma* y *H. pluvialis*.

Cepa	Medios de cultivo	Productividad específica mg astax./g cel h	Productividad volumétrica mg astax./lh
<i>P. rhodozyma</i> (BMH-103)	YM	0.0037	.014
<i>P. rhodozyma</i> (R1)	YM	0.007	.026
<i>P. rhodozyma</i> (BMH-103)	Agua de coco	0.0083	.053
<i>P. rhodozyma</i> (R1)	Agua de coco	0.015	.070
<i>H. pluvialis</i>	BAR	0.21	0.26

8.0 Conclusiones

1.- La síntesis de astaxantina en *H. pluvialis* estuvo asociada a cambios en la morfología, y la fisiología de la microalga. Estos cambios incluyeron la pérdida de los flagelos y posteriormente la formación de quistes. Se acumularon cuerpos lipídicos en el protoplasma los cuales contienen la astaxantina (Lang, 1963), la presencia de pared celular gruesa de esporopolenina resistente a la degradación oxidativa (Burczyk, 1987) y tasas fotosintéticas más bajas (Hagen y col., 1992).

2.- Bajo las condiciones de crecimiento óptimas de *H. pluvialis* las células vegetativas persisten y el alga posee principalmente carotenoides primarios (β -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina y zeaxantina).

3.- Las células quísticas de *H. pluvialis* con alta concentración de astaxantina, se indujeron en presencia de acetato de sodio (1 gL^{-1}), intensidad luminosa alta ($345 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y sin aire.

4. Las condiciones óptimas de crecimiento vegetativo de *H. pluvialis* no estimularon la producción de astaxantina.

5- El agua de coco resultó ser un excelente medio de cultivo para la producción de pigmentos, ya que se obtuvo mayor producción de astaxantina a partir de *P. rhodozyma* crecida en este sustrato.

6 Se obtuvo 100% más astaxantina al trabajar con el agua de coco y la cepa mutante R1 con respecto a la silvestre BMH-103.

7. En comparación con otros estudios donde se utilizó una fuente de carbono alterna para la producción de pigmentos, con *P. rhodozyma* obtuvimos 80% más pigmento comparado con los estudios de du Preez (1994a) quien utilizó jugo de uva y la cepa mutante CBS 5905T y obtuvo una producción máxima de astaxantina de 1.140 µg /g lev en cultivo por lote a las 120 h.

8.- La síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* es un proceso menos complicado y al parecer menos costoso que con *H. pluvialis* pero la producción de astaxantina es baja con respecto a la microalga, ya que la productividad específica de *H. pluvialis* es significativamente mayor (0.21 mg astax./g cel h) que la de obtenida por la mutante R1 de *P. rhodozyma* (0.015 mg astax./g cel h) crecida en agua de coco.

9.0 Bibliografía

Acheampong, E. A. y Martín, A. M. (1995) Kinetic studies on the yeast *Phaffia rhodozyma*. **J Basic Microbiol.** 35: 147-155.

-
- An, G. H., Schuman, D. B. y Johnson E. A. (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. **Appl Environ Microbiol.** 55: 116-124.
- An, G. H., Bielich, J., Auerbach, R. y Johnson, E. A. (1991) Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. **Biotechnology.** 9:70-73.
- Andrews, A. G., Starr, M. P. (1981) 3R, 3R'- astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Phytochemistry.** 20: 2561-1266.
- Andrews, A. G, Phaff, H. J. y Starr, M. P.(1976) Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. **Phytochemistry.** 15:10003-10007.
- APHA, WCPF., (1992) Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewaters. Ed. 17.
- Badu, S. D. (1994) Química de los alimentos, Alambra, México. pp 271-288.
- Barbera, E., Tomás X., Moya, M., Ibaez, A., y Molins, M. (1993) Significance tests in the study of the specific growth rate of *Haematococcus lacustris*: Influence of Coal Source and Light Intensity. **J. Ferment. Bioeng.** 5: 403-405.
- Bartley, G. E; Scolnik, P. A. (1995) Pigments for photoprotection visual attraction and human health. **Plant Cell.** 7:1027-1038.
- Bidigare, R. B., Ondrusek, M.E., Kennicutt II, M.C., Iturriaga, R., Harvey, H.R., Hohan, R.W. y Macko, S.A. (1993) Evidence for photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. **J Phycol.** 29:427-434.

-
- Bobkova, T. S. (1965) Carotenoid pigments of mycobacteria and yeast. **Mikrobiologiya** (English Translation). 34:229-233.
- Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. (1988) *Dunaliella*. En: Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. (Eds.), Micro-algal biotechnology, Cambridge University Press, Cambridge.
- Borowitzka, M. A.; Huisman, J. M. y Osborn, A. (1991) Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. 1. Effects of nutrients on growth and cell type. **J Appl Phycol.** 3:295-304.
- Borowitzka, M. A. (1999) Comercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **J Biotechnol.** 70:313-321.
- Boussiba, (2001) Procedure for large scale production of astaxanthin from *Haematococcus*. Patente en E.E.U.U. No. 6,022,701.
- Boussiba, S. (2000) Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. **Physiol Plantarum.** 108: 111-117.
- Boussiba, S.; Bing W, Jian-Ping Y., Zarka, A. y Chen F. (1999) Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. **Bitech Lett** 21:601-604.
- Boussiba, S., Fan,L. y Vonshak, A. (1992) Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Meth Enzymol.** 213: 386-391.

-
- Boussiba, S. y Vonshak, A. (1991) Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Plant Cell Physiol.** 7:1077-1082.
- .Bramley, P. M. y Mackenzie, A. (1988) Regulation of carotenoid biosynthesis. En Horecker, B. L. and Stadtman E. R. (Eds), Current topics in cellular regulation. Vol 29. Academic Press, San Diego, Cal. E.E.U.U.
- Britton, G., (1985) General Carotenoids. **Meth Enzymol.** 111: 115-149.
- Buchheim, M.A., y Chapman, R.L. (1991) Phylogeny of the colonial green flagellates: a study of 18S and 26S rRNA sequence data. **Biosystems.** 25:85-100.
- Buchheim, M.A., Mauley, M.A., Zimmer, E.A., Theriot, E.C. y Chapman, R.L. (1995) Multiple origins of colonial green flagellates from unicells . Evidence from molecular and organism characters. **Mol Phylogen Evol.** 4:322-343.
- Burczyk, J. (1987) Cell wall carotenoids in green algae which from sporopollenins. **Phytochemistry.** 26:121-128.
- Cantatore, G., Ascoli, C., Colombetti, G. y Frediani, C. (1989) Doppler velocimetry measurements of phototatic response in flagellated algae. **Bioscience Reports.** 4:475-480.
- Calo, P., De Miguel, T., Velázquez, J. B. y Villa, T. J. (1995) Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol Lett.** 17: 575-578.

-
- Cerda-Olmedo, E. (1985) Carotene mutants of *Phycomyces*. **Meth Enzymol.** 11: 220-243.
- Cordero, B., Otero, A. Patiño, M., Arredondo, B. O. y Fábregas, J. (1996) Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. **Biotechnol Lett.** 18: 213-218.
- Czygan, F.-C. (1970) Sekundar-Carotinoide in Grunalgen. I. Chemie, Vorkommen und Faktoren, welche die Bildung dieser Polyene beeinflussen. **Arch Mikrobiol.** 61:81-102.
- Disch, A., Schewender, J., Müller, C., Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M. (1998) Distribution of the mevalonate and glyceraldehydes phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6714. **Biochem J.** 333:381-388.
- Droop, M.R. (1954) Conditions governing haematochrome formation and loss in the alga *Haematococcus pluvialis*. **Arch Mikrobiol.** 20: 391-397.
- Droop, M.R. (1955) Carotenogenesis in *Haematococcus*. **Nature.** 175: 42.
- Droop, M.R. (1961) *Haematococcus pluvialis* and its allies. III. Organic nutrition. **Rev Algol N S.** 4: 247-258.
- Domínguez-Bocanegra A. R., Castro Briones M. A., Morales Q. R. (1998) Producción de β -carotenos a partir de *Sacharomyces cerevisiae*. XII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Acapulco, Guerrero, México.

Domínguez Bocanegra A. R., Jiménez S. R., Quezada, V. M., Ponce N. T. (1999) Obtención de pigmentos a partir de *Phaffia* utilizando agua de coco y melaza como sustrato. VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Huatulco, Oaxaca, México.

Domínguez-Bocanegra A. R., Guerrero-Legarreta, I. Martínez-Jerónimo, F. Y Tomassini- Campocosio, A. (2002) Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Biores Technol.**

Fábregas J, Domínguez A, Regueiro M, Maseda A y Otero A. (2001) Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **J Biotechnol.** 89:65-71.

Fan, L., Vonshak, A. y Boussiba, S. (1994) Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **J Phycol.** 30:829-833.

Fang, T. J. y Cheng, Y. S. (1993) Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. **J Ferment Bioeng.** 75:466-469.

Fang, T. J. y Chiou, T. Y. (1996) Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the net yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. **J Ind Microbiol.** 16:175-181.

-
- Falkowski, P.G., Sukenik, A., y Herzig, R. (1989) Nitrogen limitation *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). II Relative abundance of chloroplast proteins. **J Phycol.** 25:471-478.
- Fell, J. W., Blatt, G. M. (1999) Separation of strains production of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA, IGS and ITS sequence analysis. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 23:677-681.
- Fleno, B., Christensen, Y. y Larsen, R. (1988) Astaxanthin producing yeast cells, methods for their preparation and their use. WO 88/08025.
- Fleno, B., Christensen, Y., Larsen, R., Johansen, S. R. y Johnson, E. A. (1994). Astaxanthin producing yeast cells, methods for their preparation and their use. US Pat. 5, 356, 810.
- Flores-Cotera, L.B. (2001) Influencia de factores nutricionales en la producción de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
- Fontana, J.D., Guimaraes, M.F., Martins, N.T., Fontana, C.A. y Baron, M. (1996) Cultures of the astaxanthin genic yeast *Phaffia rhodozyma* in low-cost media. **Appl Biochem Biotechnol.** 57-58: 413-422.
- Goodwin, T. W. (1971) Biosynthesis En: Isler, O.,. (Ed) Carotenoids. Birkhauser-Verlag, Basel. 577.
- Goodwin, T. W. (1972) Carotenoids in fungi and non-photosynthetic bacteria. **Prog Ind Microbiol.** 11-29.

-
- Golubev, W.I. (1995) Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Yeast**. 11:101-110.
- Gong, X. y Chen, F. (1998) Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. **Process Biochem**. 4:395-391.
- Gu, W.L., An, G.H. y Johnson, E.A. (1997) Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 19:114-117.
- Grung, M. y Liaan-Jensen, S. (1993) Algal carotenoids; secondary carotenoids of algae 3; carotenoids in a natural bloom of *Euglena sanguinea*. **Biochem Syst Ecol**. 21: 757-763.
- Haard, N. (1988) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. **Biotechnol Lett**. 10:609-614.
- Hagen, C., Braune, W. y Bjorn, L. O. (1994) Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Volvocales). III. Action as a "sunshade". **J Phycol**. 30:241-248.
- Hagen, C., Grünwald, K., Xyländer, M., Rothe, E. (2001) Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*. **J Appl Phycol**. 13: 79-87.
- Harker, M., Tsavalos, A. J. y Young, A. J. (1996a) Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* into 30 liter air-lift photobioreactor. **J Ferment Bioeng**. 2:113-118.

Harker, M., Tsavalos, A. J. y Young, A. J. (1996b) Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. **Biores Technol.** 55:207-214.

Hayman, T. G., Mannarelli, B. N. y Leathers, T. D. (1995) Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products. **J Ind Microbiol.** 115: 173-183.

Hendry G.A.F. (1993) Plant Pigments. Plant Biochemistry and Molecular Biology, 181-196.

Henmi, H., Hata, M. y Takeguchi, M. (1991) Studies on the carotenoids in the muscle of salmon. V. Combination of astaxanthin and cantaxanthin with bovine serum albumin and egg albumin. **Comp Biochem Physiol.** 3: 609-612.

Johnson, E. A. y Lewis, M. J. (1979) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **J Gen Microbiol.** 115:173-183.

Johnson, E. A., Villa, T. G. y Lewis, M. J. (1980) *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. **Aquaculture.** 20:123.

Johnson, E. A. y An, G. H. (1991) Astaxanthin from microbial sources. **Crit Rev Biotechnol.** 11: 297-326.

Johnson, E. A., Yang, H. H., Geldiay-Tuncer, B., Hall, W. T., Schreiber, D. y Ho, K. (1994) Process for in vivo production of astaxanthin and *Phaffia rhodozyma* yeast of enhanced astaxanthin content. US Pat. 5, 356, 809 (Ingene

Biotechnology Inc).

Kakizono, T., Kobayashi, M. y Nagai, S. (1992) Effect of carbon/nitrogen ratio on the encystment accompanied with astaxanthin formation in the green alga, *Haematococcus pluvialis*. **J Ferment Bioeng** 74: 403-405.

Katsuyama, M., Hagi, M. y Yamamoto (1993) Cosmetic application of astaxanthin .10th. International Symposium on Carotenoids. Oslo Noruega.

Kobayashi, M., Kakizono, T., Yamaguchi, K., Nishio, N. y Nagai, S. (1992a) Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. **J Ferment Bioeng.** 1:17-20.

Kobayashi, M., Kakizono, T. y Nagai, S. (1992b) Effects of light intensity, light quality and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. **J Ferment. Bioeng.** 74:61-63.

Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. (1993) Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate induced cyst cells of to green alga *Haematococcus pluvialis*. **Appl Environ Microbiol.** 59:867-873.

Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y., Tsuji, Y. (1997) Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 48:351-356.

Kobayashi, M. y Sakamoto Y. (1999) Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnol Lett.** 21:265-269.

-
- Kobayashi M; y Okada, T. (2000) Protective role of astaxanthin against U.V.-B irradiation in the green alga *Haematococcus pluvialis* **Biotechnol Lett.** 22(3): 177-181.
- Krinsky, N. I. (1987) Overview of carotenoids in medicine. 8th. International Symposium on Carotenoids in medicine. Boston Massachusetts. USA. Jul 27-31. pp. 42A.
- Kühn, R. y Sorenson, N. A. (1983) Über astaxanthin and ovoerdin. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 71:1879.
- Lee, Y.K., y Soh, C. W. (1991) Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). **J Phycol.** 27: 575-577.
- Lee, Y.K. y Ding, S.Y. (1994) Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). **J Phyco.** 30:445-449.
- Lee, Y.K. y Ding, S.Y. (1995) Effect of dissolved oxygen partial pressure on the accumulation of astaxanthin in chemostat cultures of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). **J Phycol.** 31:922-924.
- Linden, H. (1999) Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. **Biochim Biophys Acta.** 1446:203-212.

-
- Lorenz R. T; Cysewski G. R. (2000) Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnol.** 18:160-167
- Lotan, T. y Hirschberg, J. (1995) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4-oxygenates, that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. **FEBS Lett.** 364:125-128.
- Madigan, M. T., Martiniko, J. M., Parker, J. (1999) Brock Biología de los microorganismos. 8ª Edición. Madrid, España. Pp. 234-245.
- Martín, A. M., Acheampong, E. y Patel, T. R. (1993). Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate. **J Chem Tech Biotechnol.** 58: 223-230.
- Meyer, P. S., du Preez, J.C. y Kilian, S. G. (1993) Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. **World J Microbiol Biotechnol.** 9:514-520.
- Meyer, P. S. y du Preez, J.C. (1994a) Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. **World J Microbiol Biotechnol**10:178-183.
- Meyer PS y JC du Preez. (1994b) Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. **Appl Microbiol Biotechnol.** 40:780-785.
- Miller G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing

-
- sugars. **Anal Chem.** 31: 426-428.
- Moya, M.J., Sanchez-Guardamino M.L., Vilavella A., y Barbera E. (1997) Growth of *Haematococcus lacustris*: A contribution to kinetic modelling. **J Chem Tech Biotechnol.** 68:303-309.
- Muller, R. K., Bernhard, K., Mayer, H., Ruttimann, A. y Vecchi, M. (1980) Beitrag zur analytische und synthese von 3-hydroxy-4-oxocarotinoiden. **Helv Chim Acta.** 63: 1654.
- Neils H.J. De Leenheer AP (1991) Microbial sources of carotenoid pigments use in foods and feeds. **J Appl Bacteriol.** 70:181-191
- Nelson, T.S. y Baptist, N. (1968) Feed pigments. The influence of feeding single and combined sources of red and yellow pigments on egg yolk color. **Poultry Sci.** 47: 924-931.
- Newsome, R.L. (1986) Food colors. En :**Food Techl** 49-56.
- Nichols, H.W. y Bold. H.C (1969) *Trichsarcina polyinorpha* gene. et sp. nov. **J Phycol** 1: 34-38.
- Okagbue, R. N. y Lewis, M. W. (1984) Autolysis of the red yeast *Phaffia rhodozyma*: a potential tool to facilitate extraction of astaxanthin. **Biotechnol Lett.** 6:247.
- Olaizola, M. (2000) Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. **J Appl Phycol.** 12: 499-506.

-
- Parajó, J. C., Santos, V. y Vázquez, M. (1997) Co- production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Biotechnol Lett.** 19:139-141.
- Santos, M.F. y Mesquita, J.F. (1984) Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod) Rostafinski (Volvocales). I. Some aspects of carotenogenesis. **Cytologia.** 49: 215-228.
- Sarada, R., Tripathi, U., Ravishankar, G.A. (2002) Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. **Process Biochem.** 37: 623-627.
- Schroeder, W. A. y Johnson, E.A. (1995) Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. **J Ind Microbiol.** 14: 502-507
- Sedmak, J. J., Weerasinghe, D. K., y Jolly S.O.(1990) Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* . **Biotechnol Tech.** 4:107-112.
- Shahaidi, F., Metusalach, S., Brown, J.A. (1998) Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 38:1-67.
- Sokal, R. R., Rohlf, F.J. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd Ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco, USA. pp. 208-262.
- Storebakken, T., Foss, P. Schiedt, K. Austreng, E., Liaeen-Jensen, S., Manz, V. (1987) Carotenoids in diets for salmonids. IV. Pigmentation of Atlantic salmon with astaxanthin, astaxanthin dipalmitate and canthaxanthin. **Aquaculture.** 65:279-292.

-
- Storebakken, T., Foss, P., Austreng, E y Liaann-Jensen, S. (1995) Carotenoids in diets for salmonids. II. Epimerization studies with astaxanthin in Atlantic salmon. **Aquaculture**. 44:259-269.
- Soon, B. C., Chin, J. E. y An, G. H. (1992) Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. **FEMS Microbiol Lett**. 139:907-912.
- Tafoya, A. y García, F. (1993) Colorantes. En: Biotecnología Alimentaria. García Garibay, Quintero Ramírez y López Murguía Pp. 479-517. Ed. Limusa Noriega Editores.
- Tripathi, U., Sarada, R., Ramachandra, R., Ravishankar, G.A. (1999) Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. **Biores Technol**. 68:197-199.
- Vázquez, M., Santos, V., Parajó, J.C. (1997) Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 19:263-268.
- Vecher, A. S. y Kulikova, A. (1968) Changes in the polyene compounds at various stages of carotenoid development of *Rhodotorula glutinis*. **Mikrobiologiya** (English Translation). 37: 558-560.
- William, L. An, G.H., Johnson, E.A. (1996) Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 19:114-117.

Yamane, Y., Higashida, k. y Nishio, N. (1997) Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-bath cultures. Kinetic and stoichiometric analysis. **Appl Environ Microbiol.** 63:4471-4478.

Yong, R. y Lee Y-K. (1991) Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)?. **Phycologia.** 30:257-261.

Zlotnik (Shmerler), I., Sukenik, A., Dubinsky, Z., (1993) Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. **J Phycol.** 29: 463-469.

Anexo 1

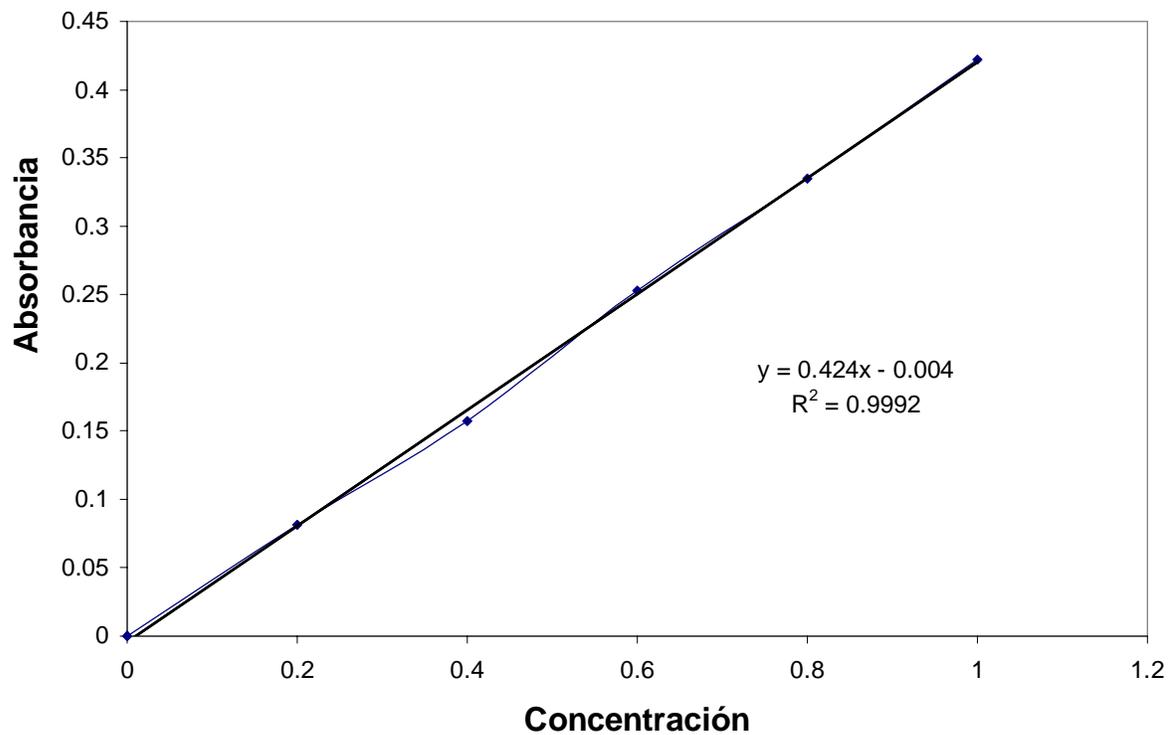


Figura 16. Curva Tipo de Azúcares Reductores ().

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo para *P. rhodozyma*

Componentes	YM	YPG	Agua de coco
-------------	----	-----	--------------

<i>Dextrosa (glucosa)</i>	10 gL^{-1}	20 gL^{-1}	*
<i>Melaza (Glucosa)</i>	*	*	*
<i>Carbohidratos totales</i>	*	*	16 gL^{-1}
<i>Extracto de levadura</i>	3 gL^{-1}	3 gL^{-1}	*
<i>Bacto-peptona</i>	5 gL^{-1}	10 gL^{-1}	*
<i>Extracto de malta</i>	3 gL^{-1}	*	*
<i>Sodio</i>	*	*	$0.025 \text{ g} / 0.1 \text{ L}$
<i>Magnesio</i>	*	*	$0.01 \text{ g} / 0.1 \text{ L}$
<i>Potasio</i>	*	*	$0.294 \text{ g} / 0.1 \text{ L}$
<i>Calcio</i>	*	*	$0.1 \text{ g} / 0.1 \text{ L}$
<i>Agua destilada</i>	1000 ml	1000 ml	

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo para *H. pluvialis*

<i>Componentes</i>	<i>BBM</i>	<i>BG-11</i>	<i>FAB</i>	<i>BAR</i>
--------------------	------------	--------------	------------	------------

	<i>g/l</i>	<i>g/l</i>	<i>g/l</i>	<i>g/l</i>
<i>NaNO₃</i>	1.0	1.5	1.0	0.25
<i>CaCl₂·2H₂O</i>	0.025	0.036	0.025	0.025
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	0.075	0.075	0.075	0.075
<i>K₂HPO₄</i>	0.075	0.4	0.075	0.075
<i>KH₂PO₄</i>	0.175	*	0.175	0.175
<i>NaCl</i>	0.025	*	0.025	0.025
<i>EDTA</i>	*	0.001	*	0.025
<i>Citric Acid</i>	*	0.006	*	*
<i>Na₂CO₃</i>	*	0.2	*	*
<i>FeCl₃·6H₂O</i>	0.005	*	*	0.0025
<i>NaMoO₄</i>	4.2X10 ⁻⁵	2.1X10 ⁻⁵	*	3.5X10 ⁻⁴
<i>ZnSO₄·7H₂O</i>	4.4X10 ⁻⁴	2.2X10 ⁻⁴	*	4.4X10 ⁻³
<i>MnCl₂·4H₂O</i>	3.6X10 ⁻³	1.8X10 ⁻³	*	7.3X10 ⁻⁴
<i>CuSO₄·5 H₂O</i>	1.6X10 ⁻⁵	0.8X10 ⁻⁵	*	7.7X10 ⁻⁴
<i>H₃BO₄</i>	5.7X10 ⁻³	2.8X10 ⁻³	*	*
<i>CoCl₃</i>	*	*	*	2.3X10 ⁻⁴
<i>CH₃COONa</i>	*	*	*	1.0

BBM (Nichols y Bold, 1969), BG-11 (Boussiba y Vonshak, 1991). El medio FAB es el mismo que el medio BBM pero sin microelementos, BAR (Barbera y col., 1993).

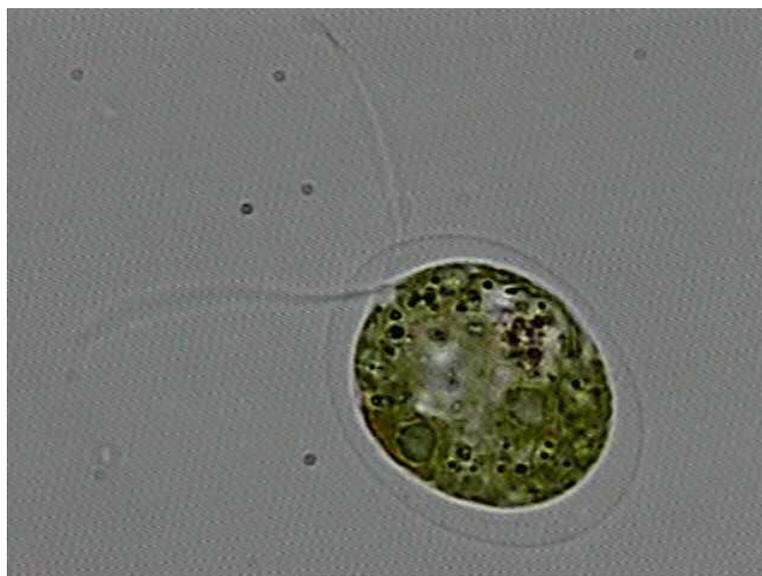


Figura 7. Célula verde de *Haematococcus pluvialis* vista al microscopio marca Zeiss modelo AXIOSCOPEIPLUS..

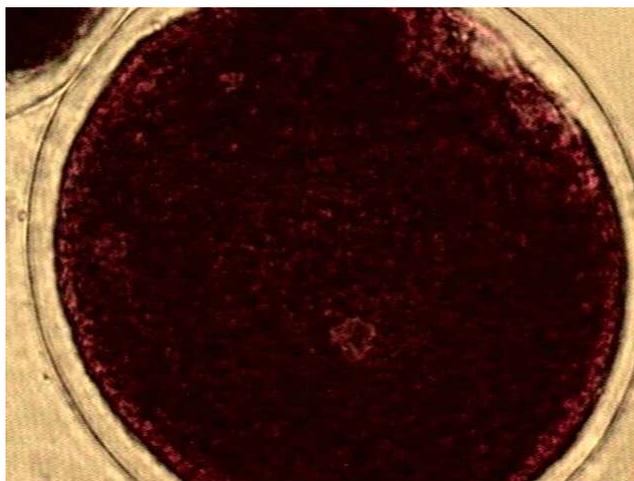


Figura 8. Quiste de *Haematococcus pluvialis* visto al microscopio marca Zeiss modelo AXIOSCOPEIPLUS.

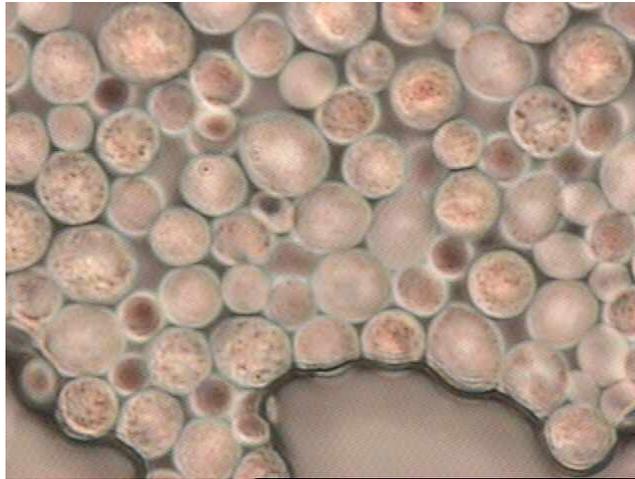


Figura 9. *Phaffia rhodozyma* (BMH-103) vista al microscopio marca Zeiss modelo AXIOSCOPE I PLUS.

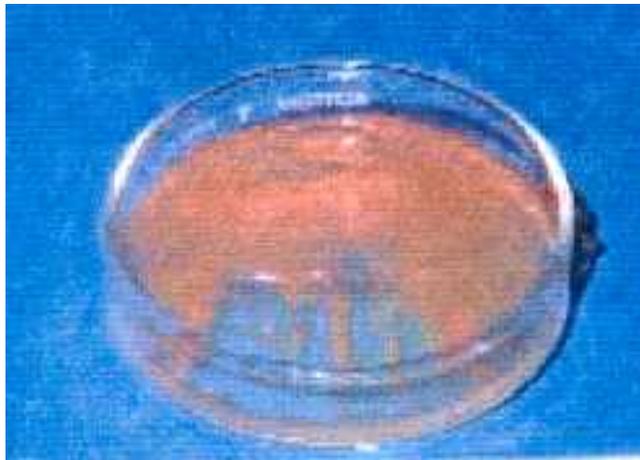


Figura 10. Crecimiento de *Phaffia rhodozyma* (BMH-103) en medio sólido YM



Figura 11. Crecimiento del inóculo de *H. pluvialis* en medio BG-11 a 28°C y agitación manual.



Figura 12. Crecimiento del inóculo de *P. rhodozyma* en medio líquido YM a 22°C y 150 rpm.



Figuras 13a. Producción de células verdes de *H. pluvialis* con agitación manual una vez al día, 28°C sin aire en los diferentes medios.



Figuras 13b. Producción de células verdes de *H. pluvialis*, a 28°C con suministro de aire en medio BBM.

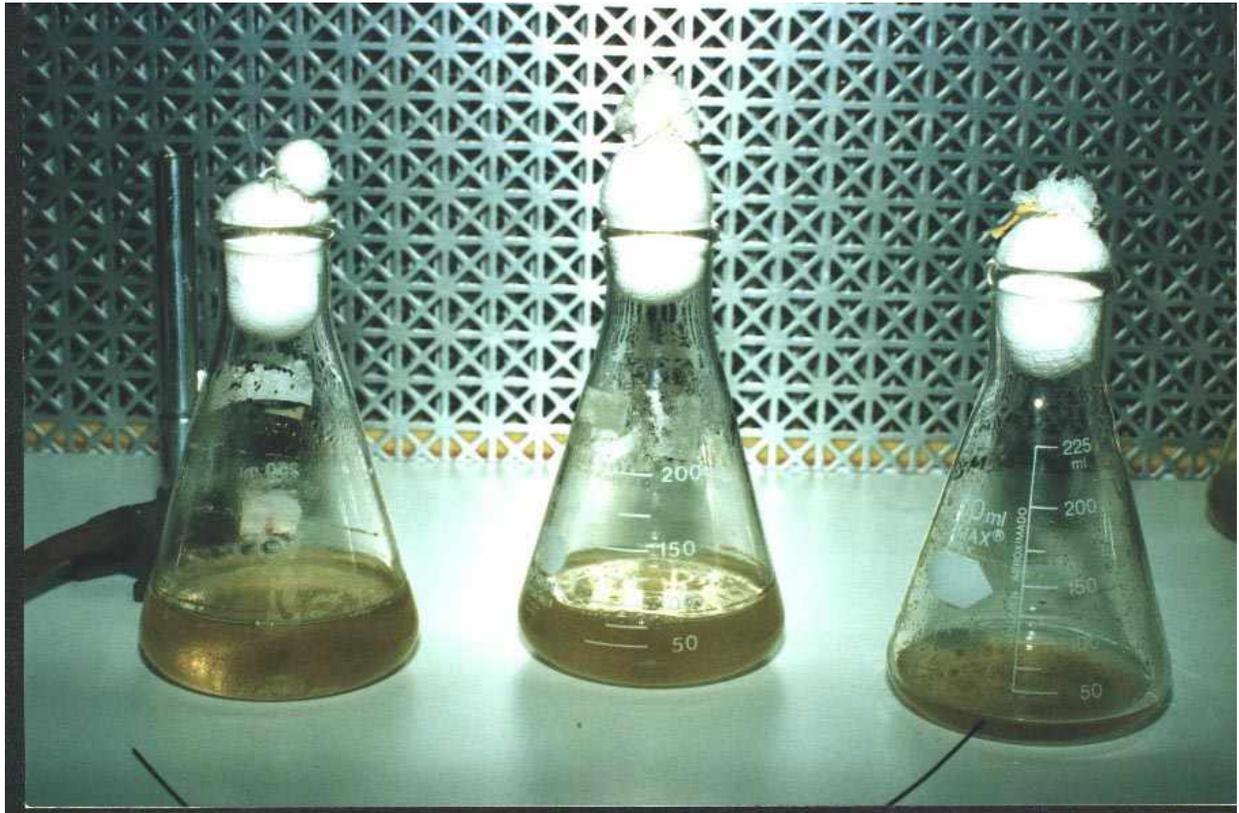


Figura 14a. Producción de astaxantina en los medios BBM, BG-11 y BAR a partir de *H. pluvialis*, agitación manual una vez al día a las 264 h.

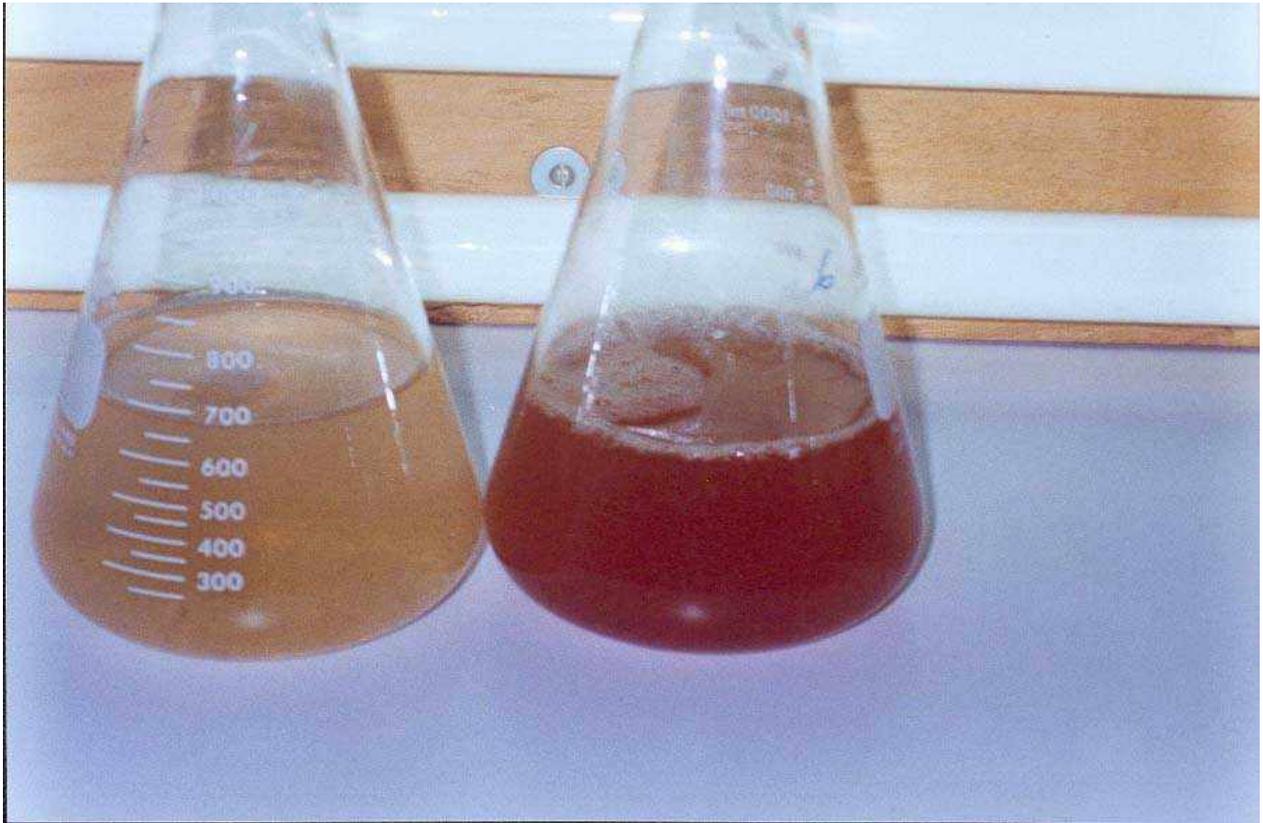


Figura 14b. Producción de carotenoides en *H. pluvialis* en los medios BBM y BAR a las 400 h de cultivo.



a)

b)

c)

Figura 15. Medios de producción sin inocular :a) YM, b) YPG c) Agua de coco.

Anexo 1I

CÁLCULO DE ANOVA.

ANOVA A LAS 168 h.

ANOVA al tiempo 168

	1	2	3
BBM	18	17	18.3
BG-11	8.2	8.5	9.2
FB	9.5	9.4	9.7
BAR	4.6	4	5

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
BBM	3	53.3	17.7666667	0.46333333
BG-11	3	25.9	8.63333333	0.26333333
FB	3	28.6	9.53333333	0.02333333
BAR	3	13.6	4.53333333	0.25333333

ANÁLISIS DE VARIANZA

n de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	276.71	3	92.2366667	367.72093	6.5932E-09	4.06618028
Dentro de los grupos	2.00666667	8	0.25083333			
Total	278.716667	11				

Análisis a 216 h

	1	2	3
BBM	2	2.2	2.4
FB	1.37	1.5	1.2
BG-11	1.41	1.5	1.6
BAR	3.49206349	3.7	3.6

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
	3	6	2	1
BBM	3	6.6	2.2	0.04
FB	3	4.07	1.35666667	0.02263333
BG-11	3	4.51	1.50333333	0.00903333
BAR	3	10.7920635	3.5973545	0.01081465

ANÁLISIS DE VARIANZA

n de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para
Entre grupos	9.49702188	4	2.37425547	10.9667273	0.00111828	3.47804985
Dentro de los grupos	2.16496263	10	0.21649626			
Total	11.6619845	14				

Análisis a 264 h

	1	2	3
BBM	2	2.1	2.2
FB	1.42	1.3	1.5
BG-11	1.6	1.65	1.7
BAR	5.41125541	5.9	6

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
	3	6	2	1
BBM	3	6.3	2.1	0.01
FB	3	4.22	1.40666667	0.01013333
BG-11	3	4.95	1.65	0.0025
BAR	3	17.3112554	5.77041847	0.09924858

ANÁLISIS DE VARIANZA

n de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para
Entre grupos	38.9611032	4	9.7402758	43.4104326	2.74237E-06	3.47804985
Dentro de los grupos	2.24376382	10	0.22437638			
Total	41.204867	14				

Analisis a las 120 h

	1	2	3
BBM	1.5	1.6	1.4
FB	1.08	1.2	1.1
BG-11	1.12	1.2	1.2
BAR	2.8	3	3.2

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
BBM	3	4.5	1.5	0.01
FB	3	3.38	1.12666667	0.00413333
BG-11	3	3.52	1.17333333	0.00213333
BAR	3	9	3	0.04

ANÁLISIS DE VARIANZA

n de las variables	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para
Entre grupos	7.00826667	3	2.33608889	166.07267	1.5253E-07	4.06618028
Dentro de los grupos	0.11253333	8	0.01406667			
Total	7.1208	11				

Anova al tiempo 96 horas

	1	2	3
BBM con aire	0.18	0.19	0.21
BBM sin aire	0.14	0.12	0.16
BAR con aire	0.16	0.14	0.17
BAR sin aire	0.16	0.14	0.15

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
BBM con aire	3	0.58	0.19333333	0.00023333
BBM sin aire	3	0.42	0.14	0.0004
BAR con aire	3	0.47	0.15666667	0.00023333
BAR sin aire	3	0.45	0.15	1E-04

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>n de las variacma de cuadracados de libertad</i>	<i>di</i>	<i>o de los cua</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>lor crítico para</i>
Entre grupos	0.00486667	3	0.00162222	6.71264368	0.01412747 4.06618028
Dentro de los	0.00193333	8	0.00024167		
Total	0.0068	11			

Anova al tiempo 264 horas

	1	2	3
BBM con aire	0.37	0.36	0.38
BBM sin aire	0.29	0.27	0.31
BAR con aire	0.41	0.38	0.42
BAR sin aire	0.38	0.35	0.4

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
BBM con aire	3	1.11	0.37	0.0001
BBM sin aire	3	0.87	0.29	0.0004
BAR con aire	3	1.21	0.40333333	0.00043333
BAR sin aire	3	1.13	0.37666667	0.00063333

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>n de las variacma de cuadracados de libertad</i>	<i>di</i>	<i>o de los cua</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>lor crítico para</i>
Entre grupos	0.02146667	3	0.00715556	18.2695035	0.00061379 4.06618028
Dentro de los	0.00313333	8	0.00039167		
Total	0.0246	11			

Anova al tiempo 192 horas

	1	2	3
BBM con aire	0.3	0.33	0.31
BBM sin aire	0.16	0.18	0.15
BAR con aire	0.23	0.21	0.24
BAR sin aire	0.21	0.23	0.2

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
BBM con aire	3	0.94	0.31333333	0.00023333
BBM sin aire	3	0.49	0.16333333	0.00023333
BAR con aire	3	0.68	0.22666667	0.00023333
BAR sin aire	3	0.64	0.21333333	0.00023333

ANÁLISIS DE VARIANZA

n de las variables	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para
Entre grupos	0.035025	3	0.011675	50.0357143	1.5801E-05	4.06618028
Dentro de los grupos	0.00186667	8	0.00023333			
Total	0.03689167	11				

ANOVA al tiempo 72 h

	1	2	3
YM	5.7	5.8	5.5
YPG	4.6	5	4.4
Agua de coco	5.9	6.2	5.4

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
	3	6	2	1
YM	3	17	5.66666667	0.02333333
YPG	3	14	4.66666667	0.09333333
Agua de coco	3	17.5	5.83333333	0.16333333

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>n</i> de las variables	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para
Entre grupos	28.2291667	3	9.40972222	29.4053819	0.00011363	4.06618028
Dentro de los grupos	2.56	8	0.32			
Total	30.7891667	11				

ANOVA al tiempo 120 h

	1	2	3
YM	5.6	5.5	5.7
YPG	4.95	5.1	4.8
Agua de coco	9.2	9	9.4

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
	3	6	2	1
YM	3	16.8	5.6	0.01
YPG	3	14.85	4.95	0.0225
Agua de coco	3	27.6	9.2	0.04

ANÁLISIS DE VARIANZA

n de las variables	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para
Entre grupos	78.710625	3	26.236875	97.8531469	1.2059E-06	4.06618028
Dentro de los grupos	2.145	8	0.268125			
Total	80.855625	11				

Tiempo	Fotoperiodo		Promedio	SD	IC	LnN	N calcul.		
0	2.5	3	4	3.16666667	0.76376262	0.86426235	1.15267951	3.15233304	
24	3.2	4	5	4.06666667	0.90184995	1.02051992	1.402823663	4.08044717	
48	4.4	5	6	5.13333333	0.80829038	0.9146493	1.635755221	5.28181791	
72	7.4	6	7	6.8	0.72111026	0.81599758	1.916922612	6.83689783	
96	9.8	11	10	10.2666667	0.64291005	0.7275074	2.328902401	8.84982647	
120	10	12	11	11		1	1.13158504	2.397895273	11.4554043
144	12	13	11	12		1	1.13158504	2.48490665	14.8281198
168	22	21	23	22		1	1.13158504	3.091042453	19.1938347
192	18	19	20	19		1	1.13158504	2.944438979	
216	16	17	18	17		1	1.13158504	2.833213344	

Tiempo	luz continua		promedio	sd	IC	LnN	N calcul.		
0	2.5	3	4	3.16666667	0.76376262	0.86426235	1.15267951	2.75751022	
24	3.2	4	5	4.06666667	0.90184995	1.02051992	1.402823663	3.96716819	
48	3.8	5	4.8	4.53333333	0.64291005	0.7275074	1.511457504	5.70747601	
72	6.8	8	9	7.93333333	1.10151411	1.24645689	2.071073292	8.21121789	
96	10.1	12	13	11.7	1.47309199	1.66692886	2.459588842	11.8132953	
120	17.5	18	20	18.5	1.32287566	1.49694631	2.917770732	16.9955233	
144	24.7	26	25	25.2333333	0.68068593	0.77025402	3.228165872	24.4510786	
168	35	36	34	35		1	1.13158504	3.555348061	35.1772192
192	32.5	31	33	32.1666667	1.040833	1.17779105	3.47093072		
216	30	29	28	29		1	1.13158504	3.36729583	

Ajuste al modelo exponencial
 Fotoperiodo
 Resumen

<u>Estadísticas de la regresión</u>	
Coefficiente de	0.98463512
Coefficiente de	0.96950632
R ² ajustado	0.96442404
Error típico	0.12108925
Observaciones	8

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2.79706989	2.79706989	190.76211	8.9642E-06
Residuos	6	0.08797564	0.01466261		
Total	7	2.88504553			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	1.14814283	0.07816278	14.6891254	6.2524E-06	0.95688526	1.33940039	0.95688526	1.33940039
Variable X 1	0.01075266	0.00077852	13.8116657	8.9642E-06	0.00884769	0.01265763	0.00884769	0.01265763

Luz continua
 Resumen

<u>Estadísticas de la regresión</u>	
Coefficiente de	0.99267614
Coefficiente de	0.98540591
R ² ajustado	0.98297357
Error típico	0.11711224
Observaciones	8

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Valor crítico de F
Regresión	1	5.55640719	5.55640719	405.125412	9.7672E-07
Residuos	6	0.08229166	0.01371528		
Total	7	5.63869885			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	1.01432818	0.07559563	13.4178157	1.0613E-05	0.82935221	1.19930415	0.82935221	1.19930415
Variable X 1	0.01515518	0.00075295	20.1277274	9.7672E-07	0.01331278	0.01699759	0.01331278	0.01699759

Anexo 1II

CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC.



RECOMENDACIONES

1.- Continuar trabajando con *H. pluvialis* a nivel de fotobiorreactores para la producción de células verdes. Los fotobiorreactores airlift son una alternativa para la producción de microalgas (Molina, y col., 1996; García, y col., 1999; Sánchez, y col., 2000). Estos biorreactores son agitados neumáticamente pueden ser de tubo externo o de tubo concéntrico. Los reactores airlift permiten un mejor intercambio de gases, un flujo de líquido más ordenado y una mayor exposición eficiente de células a la luz (García, y col., 1999), además causan menor daño celular, sobre todo en el caso de las células que presentan flagelos como *Haematococcus pluvialis*.

2.- Continuar trabajando con *P. rhodozyma* a nivel de biorreactor con el fin de buscar incrementar la producción de astaxantina manejando otros parámetros como oxígeno disuelto.

3.- Continuar con un mejoramiento genético para ambas cepas.