



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN  
DE CAROTENOIDES A PARTIR DE *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034

AUTORA

Jhommara Salomé Bautista Martínez

AÑO  
2020



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN  
DE CAROTENOIDES A PARTIR DE *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos  
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Docente guía

MSc. María Alejandra Cruz Salazar

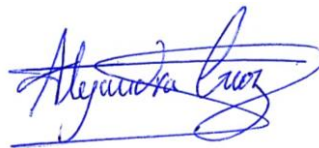
AUTORA

Jhommara Salomé Bautista Martínez

AÑO  
2020

## DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo, Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034, a través de reuniones periódicas con la estudiante Jhommara Salomé Bautista Martínez, en el semestre 202020, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.



---

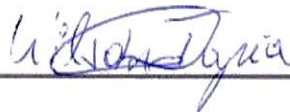
María Alejandra Cruz Salazar

Máster en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología

CI: 1719928572

## DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034, de la estudiante Jhommara Salomé Bautista Martínez, dando cumplimiento a todas las vigentes que regulan los Trabajos de Titulación"



---

Wilson David Tapia López

Máster en Gestión y Planificación Ambiental

C.I. 1714205281

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Salomé B. Martínez', is positioned above a horizontal line.

Jhommara Salomé Bautista Martínez

CI: 0502761943

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso un agradecimiento especial a la MsC. María Alejandra Cruz por ser mi mentora en el desarrollo de este trabajo. A la Ingeniera Erika Bodniza por su colaboración y amistad. A mi familia y amigos por su apoyo incondicional en el trayecto de mi carrera.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por darme el regalo más grandioso del universo, la vida, por su confianza plena y enseñanzas diarias.

A mis hermanas, por ser mi mayor referente de altruismo, resiliencia, amistad y amor infinito. Son la fuerza e inspiración que me mantiene aferrada a mis sueños.

A mi familia, por su cariño y sostenimiento, hacen que todo merezca la pena.

## RESUMEN

Los pigmentos son moléculas muy utilizadas en varias industrias para agregar color a diferentes sustratos, pueden ser naturales o sintéticos. En los últimos años se ha evidenciado que el uso de pigmentos sintéticos podría asociarse con la aparición de diversas enfermedades, una alternativa a estos son los biopigmentos como los carotenoides.

Se ha identificado que *Rhodotorula mucilaginosa* es uno de los microorganismos con mayor potencial para la producción biotecnológica de carotenoides, tiene la capacidad de asimilar sustratos que provienen de residuos agroindustriales como el suero de leche que es un subproducto secundario de la industria quesera considerado como una fuente de sustrato alternativo para el crecimiento de microorganismos debido a que aporta proteínas y carbohidratos.

En este trabajo se optimizaron las condiciones de cultivo para la producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034. Inicialmente, con un Diseño Univariado se identificó que el suero de leche permite una mayor generación de carotenoides. Los factores significativos se obtuvieron mediante un Diseño Plackett-Burman, posteriormente, se optimizaron las condiciones de cultivo mediante un Diseño Central Compuesto con superficie de respuesta en la cual se identificó que la concentración óptima de pH para producir carotenoides es de 7, dicho proceso permitió obtener una concentración celular de  $4,179 \text{ g L}^{-1}$  y una producción de carotenoides de  $55,748 \mu\text{g g}^{-1}$ . Durante la fase de crecimiento se pudo determinar que la formación del biopigmento se dio a lo largo de la fase exponencial y al cabo de las 72 h alcanzó la mayor concentración de carotenoides de  $20,352 \mu\text{g g}^{-1}$  y concentración celular de  $3,460 \text{ g L}^{-1}$  a escala de banco mientras que a escala de biorreactor la máxima producción de carotenoides fue de  $24,056 \mu\text{g g}^{-1}$  y una concentración celular de  $3,945 \text{ g L}^{-1}$ . Del mismo modo, se determinaron los rendimientos prácticos; a escala de banco fueron: biomasa/sustrato de  $0,14 \text{ g g}^{-1}$ ; producto/sustrato de  $0,38 \text{ g g}^{-1}$  y producto/biomasa de  $0,24 \text{ g g}^{-1}$  y a escala de biorreactor: biomasa/sustrato de  $0,14 \text{ g g}^{-1}$ ; producto/sustrato de  $0,38 \text{ g g}^{-1}$  y producto/biomasa de  $0,24 \text{ g g}^{-1}$ .



**Palabras clave:** carotenoides, Diseño Central Compuesto, Plackett-Burman, *Rhodotorula mucilaginosa*, superficie de respuesta, optimización.

## SUMMARY

Pigments are molecules widely used in various industries to add color to different substrates, they can be natural or synthetic. In recent years it has been shown that the use of synthetic pigments could be associated with the appearance of various diseases, an alternative to these are biopigments such as carotenoids.

It has been identified that *Rhodotorula mucilaginosa* is one of the microorganisms with the greatest potential for the biotechnological production of carotenoids, it has the ability to assimilate substrates that come from agro-industrial waste such as whey, which is a secondary by-product of the cheese industry considered as a source As an alternative substrate for the growth of microorganisms because it provides proteins and carbohydrates.

In this work, the culture conditions for the production of carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 were optimized. Initially, with a Univariate Design, it was identified that whey allows a greater generation of carotenoids. The significant factors were obtained by means of a Plackett-Burman Design, later, the cultivation conditions were optimized by means of a Central Compound Design with response surface in which it was identified that the optimal pH concentration to produce carotenoids is 7, this process allowed obtain a cell concentration of 4.179 g L<sup>-1</sup> and a carotenoid production of 55.748 µg g<sup>-1</sup>. During the growth phase, it could be determined that the formation of the biopigment occurred throughout the exponential phase and after 72 h it reached the highest carotenoid concentration of 20.352 µg g<sup>-1</sup> and cell concentration of 3.460 g L<sup>-1</sup> on a bench scale, while on a bioreactor scale, the maximum production of carotenoids was 24.056 µg g<sup>-1</sup> and a cell concentration of 3.945 g L<sup>-1</sup>. In the same way, the practical yields were determined; at the bench scale they were: biomass/substrate of 0.14 g g<sup>-1</sup>; product/substrate of 0.38 g g<sup>-1</sup> and product/biomass of 0.24 g g<sup>-1</sup> and at the bioreactor scale: biomass/substrate of 0.14 g g<sup>-1</sup>; product/substrate of 0.38 g g<sup>-1</sup> and product/biomass of 0.24 g g<sup>-1</sup>.

**Key words:** carotenoids, Central Composite Design, Plackett-Burman, *Rhodotorula mucilaginosa*, response surface, optimization.

## ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	3
1.3 Objetivo general y objetivos específicos.....	4
1.3.1 General:.....	4
1.3.2 Específicos:.....	5
1.4 Justificación de la investigación.....	5
2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Pigmentos.....	7
2.2 Biopigmentos.....	7
2.3 Carotenoides.....	7
2.4 Microorganismos productores de carotenoides.....	9
2.4.1 Bacterias.....	9
2.4.2 Levaduras y Hongos filamentosos.....	10
2.4.3 Microalgas.....	11
2.5 <i>Rhodotorula</i> sp.....	13
2.6 Propiedades de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	14
2.7 Pigmentos producidos por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	14
2.8 Suero de leche.....	15
2.8.1 El suero de leche como una alternativa de fuente de carbono.....	15
2.8.2 Implicaciones ambientales.....	15
3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS.....	17

3.1	Microorganismo.....	17
3.2	Reactivación de colonias puras de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ATCC 66034.....	18
3.3	Condiciones de cultivo.....	18
3.3.1	Medio de cultivo de mantenimiento.....	18
3.3.2	Medio de cultivo alternativo.....	18
3.3.3	Preparación de inóculo.....	19
3.4	Métodos analíticos.....	19
3.4.1	Determinación de biomasa.....	19
3.4.1.1	Método espectrofotométrico.....	19
3.4.1.2	Método peso seco.....	19
3.4.1.3	Curva de calibrado de biomasa.....	20
3.4.2	Consumo de sustrato.....	20
3.4.2.1	Método espectrofotométrico.....	20
3.4.2.2	Curva de calibrado de sustrato.....	21
3.4.3	Extracción de carotenoides.....	21
3.4.4	Cuantificación de carotenoides.....	22
3.4.5	Determinación de parámetros cinéticos.....	22
3.4.5.1	Crecimiento celular.....	23
3.4.5.2	Consumo de sustrato.....	24
3.4.5.3	Formación de producto.....	25
3.4.5.4	Rendimientos prácticos.....	26
3.4.6	Curva de crecimiento.....	27
3.4.7	Curva de sustrato.....	28
3.4.8	Curva de producto.....	28
3.5	Diseños experimentales.....	28

3.5.1	Diseño Univariado.....	28
3.5.2	Diseño experimental Plackett-Burman.....	29
3.5.3	Diseño Central Compuesto con superficie de respuesta.....	31
3.5.4	Validación del medio optimizado.....	33
3.5.5	Evaluación estadística de los resultados.....	34
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
4.1	Curvas de calibrado.....	35
4.1.1	Curva de calibrado de biomasa.....	35
4.1.2	Curva de calibrado de sustrato.....	35
4.2	Diseño Univariado.....	36
4.3	Diseño Plackett-Burman.....	38
4.4	Diseño Central Compuesto.....	46
4.4.1	Determinación de las condiciones óptimas de cultivo.....	46
4.4.2	DCC carotenoides.....	47
4.4.3	DCC concentración celular.....	54
4.4.4	Valores óptimos para las variables de respuesta: producción de carotenoides y concentración celular.....	58
4.5	Cinética a escala de laboratorio.....	60
4.5.1	Curva de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de producto.....	60
4.6	Cinética a escala de biorreactor.....	62
4.6.1	Curva de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de producto.....	62
4.7	Análisis de parámetros cinéticos.....	65

5.	CAPÍTULO	V.	CONCLUSIONES	Y
	RECOMENDACIONES.....			69
5.1	Conclusiones.....			69
5.2	Recomendaciones.....			70

# 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

Los pigmentos son moléculas utilizadas para agregar color a un material determinado como pinturas, algodón, alimentos, entre otros. Son utilizados en varias industrias como la alimentaria, textil, cosmética, farmacéutica y se clasifican en naturales y sintéticos. Los pigmentos naturales se obtienen a partir de material vegetal o animal, no obstante, la creciente demanda de la aplicación de colorantes originó la producción de pigmentos sintéticos, los cuales se generan a partir de la síntesis química (Agboyibor, Kong, Chen, Zhang, & Niu, 2018; Delgado, Jiménez, & Paredes, 2000).

La producción de pigmentos naturales puede ser de origen microbiano; los microorganismos son una fuente potencial para la producción de biopigmentos. La ventaja de dichos pigmentos respecto a los obtenidos a partir de vegetales es que presentan mayor productividad, facilidad del proceso de recuperación, costos de producción bajos, rendimientos altos y facilidad de procesamiento (Tuli, Chaudhary, Beniwal, & Sharma, 2014).

Se han identificado una gran variedad de pigmentos biológicos a partir de microorganismos, como betacarotenos, licopenos, clorofilas, ficocianinas, melaninas, flavinas, quininas y monascinas (Tuli et al., 2014). Los betacarotenos se encuentran presentes en varios alimentos como colorantes naturales que muestran una tonalidad amarilla o rojiza, además actúan como precursores de la vitamina A y son utilizados como aditivos y suplementos alimenticios (Dias, Weingart, & Zarur, 2011).



Los principales géneros de microorganismos empleados para la producción de betacarotenos son *Dunaliella*, *Blakeslea*, *Flavobacterium* (Dias et al., 2011). El tipo de alga más comúnmente utilizada debido a su eficiencia y fácil manejo durante la recuperación de biopigmentos ha sido *Dunaliella salina*.

(Xu, Ibrahim, Wosu, Ben-Amotz, & Harvey, 2018) en su estudio muestran que los parámetros más importantes a considerar durante el proceso es la temperatura, intensidad de luz y el tiempo de incubación. Por otra parte, (Durakli & Tirpanci, 2018) continuaron con el proceso de producción de carotenoides usando *Blakeslea trispora* y un residuo agroindustrial como sustrato, el permite alcanzar una alta productividad, similar e incluso mayor a la obtenida con sustratos comerciales.

Del mismo modo, *Rhodotorula mucilaginosa* es una de las levaduras con mayor potencial para la producción de pigmentos naturales como los carotenoides. Se caracteriza por ser una levadura aeróbica estricta, para su crecimiento tolera rangos de pH de 3-7 y temperaturas entre 25-30°C (Elsanhoty, Al-Turki, & El-razik, 2017).

La biosíntesis de betacarotenos mediante *Rhodotorula mucilaginosa* es de interés comercial para la producción a gran escala, debido a su alta tasa de crecimiento y naturaleza unicelular (Elsanhoty, Al-Turki, & El-razik, 2017). Este proceso incluye algunas etapas como la formulación de un medio de cultivo adecuado, escalado, multiplicación de la levadura, extracción y purificación (Banzatto, De Freitas, & Mutton, 2013).

En el estudio de los autores (Dhaliwal & Chandra, 2015) se han evaluado las variables influyentes para la producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula mucilaginosa* siendo la fuente de carbono, nitrógeno y pH las más significativas.

Esta levadura tiene la capacidad de asimilar sustratos que provienen de residuos agroindustriales como el suero de leche, melaza y glicerol (Elsanhoty, Al-Turki, &

El-razik, 2017). Resultados obtenidos por (Dias et al., 2011) para la producción de este biopigmento mediante *Rhodotorula mucilaginosa*, indican que la levadura tiene la capacidad de generar entre el 25-55% de carotenoides. Sin embargo, (Mata, Montañez, Méndez, & Aguilar, 2018) indican que el porcentaje de biopigmento varía según las condiciones de cultivo como: la fuente de carbono, nitrógeno, pH, temperatura, agitación, y el tiempo de incubación.

La investigación de (Husseiny, Abdelhafez, Ali, & Sand, 2017) determinaron que la sacarosa, Cloruro de sodio (NaCl), fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y el pH fueron las variables más significativas en la formación de carotenoides a partir de *Rhodotorula glutinis* ATCC 4054. Del mismo modo, (Marova et al., 2012) han determinado importantes parámetros cinéticos como el rendimiento máximo de biomasa-sustrato de 0,38 g g<sup>-1</sup> a partir de *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 20-7-31.

## **1.2 Planteamiento del problema**

El número de investigaciones realizadas sobre el uso de microorganismos para la producción de pigmentos son insuficientes, lo cual promueve la búsqueda de nuevos procesos de obtención de los mismos (Tuli et al., 2014).

El uso de pigmentos naturales está permitido para empresas productoras de alimentos, sin embargo, estas prefieren utilizar pigmentos sintéticos debido a su estabilidad, intensidad de color y precios más bajos. No obstante, se ha limitado el uso de colorantes sintéticos debido a que generan efectos tóxicos en el ser humano y se asocian a diversas enfermedades como asma, urticaria, entre otros (Farzianpour, Jahead, Younesian, Banaei, & Sadeghi, 2014)

La biosíntesis de carotenoides a partir de microorganismos como hongos, levaduras y bacterias mediante el uso de medios sintéticos incrementan los costos de fabricación, lo cual implica una baja producción (Mata et al., 2018).

El costo elevado de la producción y la falta de un protocolo de optimización para la producción de carotenoides utilizando residuos agroindustriales como posible fuente de nutrientes ha disminuido la generación de estos pigmentos. Además, el desecho de dichos residuos representa uno de los principales inconvenientes de las agroindustrias debido a su alto potencial contaminante. Tal es el caso de la industria quesera, donde se considera al suero de leche como un subproducto secundario el cual casi siempre es eliminado sin aprovechar el valor agregado que aporta a los bioproductos así como el valor nutricional que tiene este sustrato en el medio de cultivo para el crecimiento de levaduras y bacterias (Aguirre, Aguilar, Ramírez, & Alvarez, 2010; Tuli et al., 2014).

Aunque se han utilizado varios microorganismos para producir carotenoides, las bacterias han sido usadas ampliamente para la producción microbiana de estos. Sin embargo, en el estudio realizado por (Wang, Lin, Lu, & Chen, 2012) se ha identificado que la concentración de pigmento obtenido durante la optimización es baja. Dado esto, (Mata et al., 2018) mencionan que una alternativa de microorganismo productor son las levaduras. Sin embargo, (Elsanhoty, Al-Turki, & El-razik, 2017) indica que el porcentaje obtenido en la generación de biopigmentos continúa siendo una limitación para la producción a escala industrial.

### **1.3 Objetivo general y objetivos específicos**

#### **1.3.1 General:**

- Optimizar las condiciones de cultivo para la producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034

### **1.3.2 Específicos:**

- Seleccionar las condiciones de cultivo significativas para la producción de carotenoides a partir un diseño Plackett-Burman
- Validar las condiciones óptimas de cultivo mediante la determinación de parámetros cinéticos de crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa*, consumo de lactosa y formación de carotenoides a escala de banco

## **1.4 Justificación de la investigación**

El desarrollo de procesos biotecnológicos se ha convertido en un factor clave en la producción industrial global y se estima que en aproximadamente 10 años un tercio de esta se basará en los bioprocesos (Wellenbeck, Mampel, Naumer, Knepper, & Neubauer, 2017), por este motivo, es importante que en el país se impulse la ejecución de proyectos biotecnológicos para luego convertirlos en aplicaciones comerciales.

El interés de generar biopigmentos que reemplacen el uso de colorantes sintéticos se debe a que según estudios toxicológicos no los relacionan con enfermedades asociadas a su uso en alimentos, siempre y cuando se utilicen con la dosis máxima definida (Janiszewska, Pisarska, & Królczyk, 2016), es decir que conservan la seguridad alimentaria (Tuli et al., 2014). Actualmente, en el Ecuador no existe una empresa productora de biopigmentos, por lo cual la inversión en estudios en el área de biotecnología industrial para generar procesos eficientes y de bajo costo sería una alternativa para explotar el mercado de pigmentos.

(Elsanhoty, Al-Turki, & El-razik, 2017; Hussein, Abdelhafez, Ali, & Sand, 2017; Wellenbeck et al., 2017) afirman que optimizar un proceso para la obtención de un biocompuesto utilizando las ventajas que (Almeida, Diaz, Dos Santos, Veiga, & Fernandes de Medeiros, 2017) describe sobre los microorganismos altamente productores es de gran importancia industrial. Por esta razón, se enfatiza en la elaboración un protocolo de optimización que permitirá maximizar el rendimiento de la producción mediante el control de parámetros como la agitación, pH, temperatura, tiempo de incubación, concentración de la fuente de carbono, nitrógeno y la concentración molar de iones de  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y el uso de un medio de cultivo de bajo costo que incluya una fuente de carbono proveniente de un residuo agroindustrial, como el suero de leche, que es un sustrato rico en nutrientes comúnmente utilizado para producir biomasa, carotenoides, fuente de proteínas de valor agregado, entre otros (Elsanhoty, Al-Turki, & El-razik, 2017).

## 2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Pigmentos

Los pigmentos se encargan de producir los colores que se observan diariamente, y esto se debe a que absorben la luz en un rango de longitud de onda de la región visible; cada color producido pertenece a una estructura específica del cromóforo en donde dicha estructura captura energía y aquella que no se ha absorbido es reflejada y/o refractada para ser capturada por el ojo y transmitida mediante impulsos neurales al cerebro, donde podría interpretarse como un color. (Delgado-Vargas, Jiménez, Paredes-López, & Francis, 2000).

En la revisión de (Delgado-Vargas et al., 2000) se describe que los pigmentos naturales y sintéticos se usan en medicamentos, alimentos, ropa, muebles, cosméticos y otros productos. Entre los pigmentos naturales más importantes están la clorofila y carotenoides, adicionalmente, los pigmentos de origen natural tienen funciones importantes en varios procesos como la fotosíntesis (Tuli et al., 2014).

### 2.2 Biopigmentos

Los pigmentos microbianos o también conocidos como biopigmentos son un conjunto de estructuras químicas que tienen la capacidad de captar luz en el rango visible (400–700 nm). Las moléculas de biopigmentos que se emplean industrialmente son las vitaminas, riboflavinas,  $\beta$ -carotenos, antioxidantes como carotenoides y xantofilas (De Carvalho et al., 2014).

### 2.3 Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de poliisoprenoides con pigmentación de color amarilla a rojo anaranjado que pueden sintetizarse por plantas, algas, cianobacterias, bacterias y hongos. Estos compuestos, debido a su gran versatilidad estructural y a las diferentes funciones que pueden desempeñar son considerados importantes en la naturaleza. Se puede destacar que los carotenoides tienen un rol importante en la recolección de luz, la transferencia de energía durante la fotosíntesis, brindan protección al aparato fotosintético por los daños causados en la fotooxidación ya que son capaces de neutralizar los radicales libres, actuando como agentes antioxidantes en las células. Por otro lado, los carotenoides presentan múltiples beneficios para la salud y son conocidos principalmente por sus características de coloración natural, estas moléculas son responsables de la pigmentación y colores en plantas y biomasa microbiana (Mussagy, Winterburn, & Carvalho, 2018).

Gran parte de los carotenoides han sido y continúan siendo utilizados en un sinnúmero de aplicaciones industriales, sin embargo, cuando se aplican en la industria alimentaria, los carotenoides se usan normalmente como aditivos, (Carocho, Barreiro, Morales, & Ferreira, 2014; Mussagy et al., 2018) mencionan que en los alimentos se agregan alrededor de 2500 aditivos para mantener y mejorar las propiedades organolépticas o incluso para extender su vida útil. El consumo de carotenoides, ya sea en alimentos o como suplemento nutricional, puede tener efectos positivos en la salud ya que al actuar como precursor de vitamina A previene enfermedades relacionadas con la edad como la señalización dependiente de retinoides o degenerativas (Sy, Dangles, Borel, & Caris-veyrat, 2015).

En la Figura 1 se muestra la clasificación de carotenoides, la estructura molecular de cada uno de ellos, así como sus aplicaciones y la forma de obtención mediante la aplicación de herramientas tecnológicas.

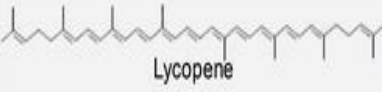
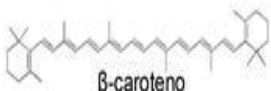


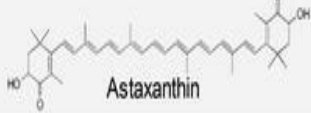
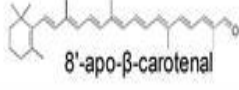
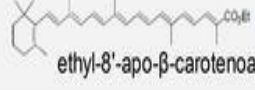

Carotenoid	Applications	Production Technology
 Lycopene	food coloration, nutritional supplement	chemical synthesis, biotechnology ( <i>Blakeslea trispora</i> ), isolation from tomato
 $\beta$ -caroteno	food coloration (margarine, juice), nutritional supplement, feed additive (fertility, cattle)	chemical synthesis, biotechnology ( <i>Dunaliella salina</i> )
 (3R,3'R) zeaxanthin	nutritional supplement (eye health)	chemical synthesis, isolation from natural sources
 Cantaxanthin	poultry (egg yolk and broiler pigmentation), aquaculture	chemical synthesis
 Astaxanthin	aquaculture (salmon pigmentation), dietary supplement, food coloration	chemical synthesis, biotechnology ( <i>Haematococcus pluvialis</i> )
 8'-apo- $\beta$ -carotenal	food coloration (cheese, dressings)	chemical synthesis
 ethyl-8'-apo- $\beta$ -carotenoate	feed additive (egg yolk and broiler pigmentation)	chemical synthesis
 Citranaxanthin	feed additive (egg yolk and broiler pigmentation)	chemical synthesis

Figura 1. Estructura molecular, aplicaciones y síntesis de los carotenoides

Tomada de: Silva Fernandes et al., 2018

## 2.4 Microorganismos productores de carotenoides

### 2.4.1 Bacterias

Se han estudiado varias bacterias debido al potencial biotecnológico para la producción de pigmentos, entre ellas las bacterias que pertenecen a las especies halófilas termófilas: *Halococcus morrhuae* y *Halobacterium salinarum* que presentan colonias rojas y anaranjadas, respectivamente. La bacterioruberina de *H. salinarum* es el carotenoide más encontrado. Por otro lado, (Masetto, Flores-cotera, Díaz,



Langley, & Sanchez, 2001) mencionan que *Flavobacterium* sp. es una bacteria marina conocida relacionada con la producción óptima de zeaxantina, mientras que (Asker & Ohta, 2002) aseguran que *Haloferax alexandrinus* tiene una buena perspectiva industrial para la producción de cantaxantina.

Otras bacterias como *Agrobacterium aurantiacum* y *Escherichia coli* modificada, *Mycobacterium brevicale*, *Mycobacterium lacticola*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodococcus maris*, *Streptomyces chrestomyces* y *Erwinia uredovora* también tienen la capacidad de sintetizar carotenoides (Cardoso, Feitosa, & Karp, 2017).

Es preciso mencionar que la producción de carotenoides por bacterias no fotosintéticas está influenciada directamente por la composición del medio de fermentación, así como de la temperatura, velocidad de agitación y una adecuada aireación. (Cardoso et al., 2017) señalan que varios estudios han demostrado que las fuentes de carbono y nitrógeno, sales inorgánicas, agentes químicos e iones metálicos inciden en una mayor o menor síntesis de pigmentos.

#### **2.4.2 Levaduras y Hongos filamentosos**

Entre los microorganismos capaces de sintetizar carotenoides se encuentran las levaduras y los hongos filamentosos. Los géneros más conocidos de levaduras productoras de carotenoides son *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, *Phaffia* y *Sporidiobolus* (Cardoso et al., 2020). Así mismo, (Cardoso et al., 2017) mencionan que las composiciones de carotenoides entre cada especie son casi siempre similares; en orden descendente se presenta el  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, toruleno y torularhodina.

Por otro lado, la producción de biopigmentos por hongos data de cientos de años (Mapari et al., 2005). El ascomiceto más comúnmente utilizado es el *Monascus purpureus*, fue llamado así por el color rojizo presente en el arroz contaminado por

este, los pigmentos producidos por *Monascus* van desde un color amarillo, naranja y rojo; los pigmentos rojos son más requeridos para aplicaciones industriales (Mukherjee & Singh, 2011).

### 2.4.3 Microalgas

La composición y productividad de los carotenoides en las algas depende de las condiciones ambientales (D'Alessandro & Antoniosi, 2016), como la salinidad y los nutrientes utilizados en el medio de cultivo. Las microalgas verdes son capaces de producir los siguientes carotenoides: xantina, violaxantina, neoxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, luteína y otros (Cardoso et al., 2017). Por otra parte, (Spolaore, Joannicassan, Duran, & Isambert, 2006) describen que las principales microalgas comercializadas son *Arthrospira* (*Spirulina*), *Chlorella*, *Dunaliella salina* y *Aphanizomenon flos-aquae*.

En la Tabla 1 se describen los diferentes tipos de carotenoides provenientes de microorganismos y la fuente de obtención.

Tabla 1.

*Ejemplos de carotenoides microbianos que se encuentran en la naturaleza y sus fuentes de producción.*

Source	Microorganism	Pigment
Microalgae	<i>Dunaliella salina</i> , <i>Scenedesmus almeriensis</i> , <i>Coelastrella strolata</i> var. <i>multistriota</i>	$\beta$ - Carotene

	<i>Haematococcus pturvatis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Coelastrella strolata</i> var. <i>multistriota</i>	Astaxanthin Cantaxanthin Lutein
	<i>Undaria pinnatifida</i> , <i>Hizikia fusiforme</i> , <i>Laminaria japónica</i> , <i>Sargassum</i> sp, <i>Fucuss</i> sp.	Fucoxanthin
	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Lutein
Levaduras y hongos filamentosos	<i>Phycomyces blakesleeasmus</i> , <i>Blakeslea trispora</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Rhodosporidium</i> sp, <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Sporidiobolus pararoseus</i> , <i>Ustilago maydis</i> , <i>Aspergillus giganteus</i> , <i>Cercospora nicotianae</i> , <i>Penicillum</i> sp, <i>Aschersonia aleyroides</i> , <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodotorula rubra</i> NRRL Y-168	$\beta$ - Carotene
	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Sporobolomyces ruberrimus</i> H110, <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Torularhodin Torulene
Bacteria	<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxanthin
	<i>Rhodococcus maris</i> , <i>Mycobacterium brevicale</i> , <i>Rhodococcus maris</i>	Cantaxanthin

	<i>Mycobacterium acticola</i>	Astaxanthin
	<i>Arthrobacter glacialis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp. M3, <i>A. arilaitensis</i> Re117	Decapronoxanthin
	<i>G. alkanivorans</i> strain 1B, <i>Bacillus circulans</i>	Astaxanthin Cantaxanthin Lutein

Tomada de: Mussagy et al., 2018

## 2.5 *Rhodotorula* sp.

Dentro de la familia de *Sporidiobolaceae* (*Phylum Basidiomycota*) se ubica a la levadura *Rhodotorula*. El *Phylum Basidiomycota* tiene una distribución extendida en el medio ambiente y con frecuencia se encuentran en el suelo y sus componentes (Seifi, Zarei Mahmoudabadi, & Hydrinia, 2013).

Las especies de *Rhodotorula* son hongos contaminantes presentes en el aire, también se consideran habitantes normales de la piel, los pulmones, la orina y las heces en humanos. En un estudio realizado por (Seifi et al., 2013), *Rhodotorula glutinis* fue la especie más comúnmente aislada tanto en muestras clínicas como en ambientales, seguida de *Rhodotorula minuta* y *Rhodotorula mucilaginosa*.

El género *Rhodotorula* incluye 34 tipos de especies, entre las más comunes se incluyen a: *R. glutinis*, *R. mucilaginosa* y *R. minuta*. Se puede destacar de *Rhodotorula mucilaginosa* que es utilizada en controles biológicos para proteger cultivos contra la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* y para formar compuestos orgánicos de biodegradación, adicionalmente se ha identificado que estas levaduras son altamente productoras de carotenoides (Elsanhoty, Al-Turki, & Abd El-Razik, 2017)

(Elsanhoty et al., 2017) se refieren a las especies de *Rhodotorula* como levaduras aeróbicas que tienen propiedades metabólicas como: la capacidad de producir glucógeno durante la fase exponencial, mientras que en la fase estacionaria de su crecimiento celular producen grandes cantidades de lípidos y pigmentos carotenoides. Por otro lado, mencionan que varias cepas de *Rhodotorula* son usadas para la producción de proteínas unicelulares de etanol, ácido acético, lípidos y acetaldehído.

## **2.6 Propiedades de *Rhodotorula mucilaginosa***

*Rhodotorula mucilaginosa* es considerada como una de las levaduras productoras de pigmentos más importantes por lo cual es una levadura con potencial para la producción biotecnológica de carotenoides. La producción de carotenoides por *R. mucilaginosa* puede ser económicamente rentable mediante el uso de subproductos industriales y desechos baratos como fuentes de nutrientes durante la fermentación. Entre las alternativas de sustratos menos costosos está el jugo de uva, el jarabe de glucosa, el extracto de turba y el hidrolizado de turba, la melaza y el jarabe de maíz (Elsanhoty, Al-Turki, & El-razik, 2017). A pesar de ser un potencial productor la información publicada sobre la producción de carotenoides por *R. mucilaginosa* aún continúa siendo insuficiente (Aksu & Tuğba Eren, 2007).

## **2.7 Pigmentos producidos por *Rhodotorula mucilaginosa***

Se ha identificado que durante la producción de carotenoides con la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* se obtienen torularhodina, toruleno y betacarotenos (Kanzly, Nasr, El-shazly, & Barakat, 2015; Maldonado, Rodríguez, & Scamparini, 2012). Siento este último el más importante debido, que es responsable de la actividad de la provitamina A y sus diversas tonalidades atractivas en las industrias (Xian et al., 2018).

## **2.8 Suero de leche**

Las industrias productoras de lácteos y quesos generan altos volúmenes de desechos líquidos, dentro de los cuales se incluye al "suero de leche". Este se conoce como la porción líquida generada como subproducto durante la coagulación de la caseína de la leche o durante la elaboración del queso (Yadav et al., 2015).

### **2.8.1 El suero de leche como una alternativa de fuente de carbono**

Tras la precipitación de la caseína de la leche durante la fabricación de queso, el subproducto secundario resultante es el suero de leche, el cual se caracteriza por ser un líquido amarillento debido a la presencia de vitamina B12. Una de las características más importantes del suero de leche es que después de la elaboración de quesos, alrededor del 90% de lactosa permanece intacta, lo cual lo convierte en una opción atractiva para usarse como sustrato (Aksu & Tugba, 2005; Prazeres, Carvalho, & Rivas, 2012). Adicionalmente, el contenido de grasas y proteínas muestran valores relativamente altos; desde 0,99 – 10,58 kg m<sup>-3</sup> y 1,4 – 8,0 kg m<sup>-3</sup>, respectivamente. Las sales minerales presentes en el suero de leche oscilan entre el 0,46 y 10% (principalmente NaCl y KCl) y sales de calcio (Prazeres et al., 2012).

### **2.8.2 Implicaciones ambientales**

Como consecuencia de la fabricación de productos lácteos y la falta de tratamiento en los desechos se generan efluentes de aguas residuales contaminadas. Entre los parámetros que caracterizan a dichos efluentes lácteos está la carga orgánica relativamente alta, la cual se monitorea por la DBO (demanda biológica de oxígeno) que oscila entre 27 y 60 kg m<sup>-3</sup>, la DQO (demanda química de oxígeno) que presenta valores de 50 a 102 kg m<sup>-3</sup>, con un rango del índice de biodegradabilidad (DBO<sub>5</sub> / COD) del 0,4 – 0,8 (Prazeres et al., 2012). En cuanto al contenido de materia

orgánica, este se debe principalmente a la presencia de carbohidratos como lactosa y proteínas como la caseína de la leche, a esto se suma el contenido de grasa, sólidos en suspensión y nutrientes (Prazeres et al., 2012).

### 3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS

En el diagrama que se muestra en la Figura 2 se describen de manera general los procedimientos realizados para la producción de carotenoides a partir de *R. mucilaginosa* ATCC 66034.

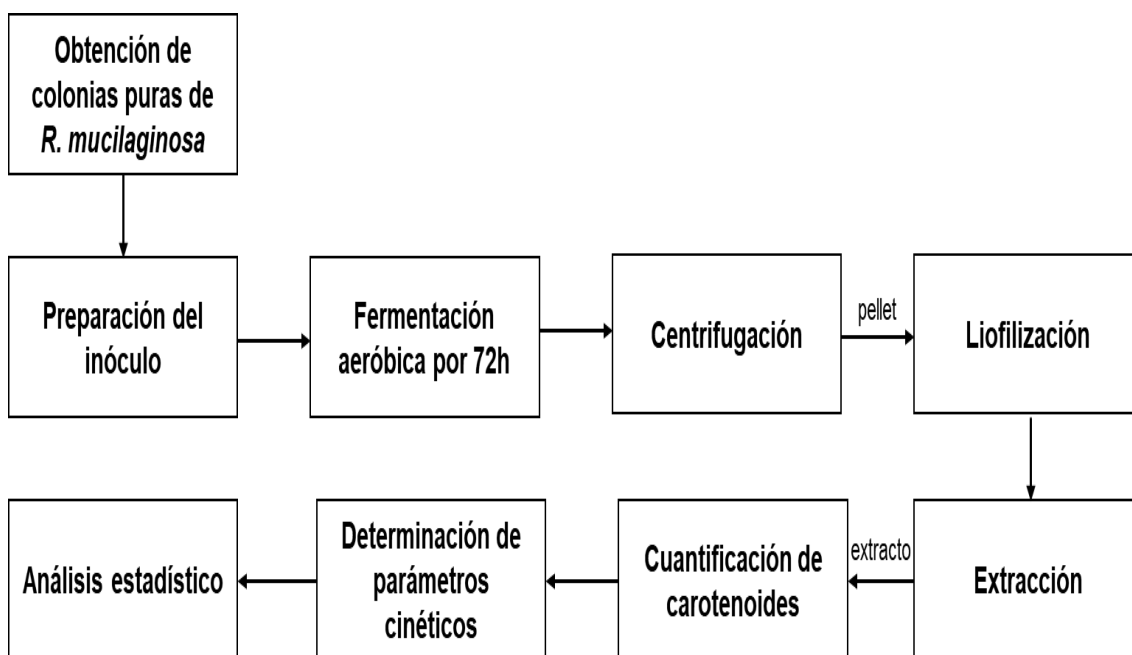


Figura 2. Proceso de producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034

#### 3.1 Microorganismo

Se utilizó una cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034, la cual fue proporcionada por el banco de cepas del laboratorio de Biotecnología Industrial de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de Las Américas.



### **3.2 Reactivación de colonias puras de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034**

La reactivación de la cepa se realizó mediante el cultivo 20 µL del microorganismo en Agar PDA, se incubó a 30°C por 72 h.

Mediante diluciones seriadas se obtuvieron colonias individuales, para lo cual se realizó un cultivo madre de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 en caldo YPD, el cual fue incubado a 30° C y 120 rpm. Una vez transcurridas 72 h, se realizaron diluciones con el inóculo y agua destilada esterilizada (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000). Luego, cada una se cultivó en diferentes cajas Petri con agar PDA mediante un estriado por agotamiento, por triplicado. Se incubaron a 30° C durante 72 h (Kanzky et al., 2015).

### **3.3 Condiciones de cultivo**

#### **3.3.1 Medio de cultivo de mantenimiento**

Se prepararon 100 mL de medio de cultivo de mantenimiento en caldo YPD para la adaptación de *Rhodotorula mucilaginosa*.

#### **3.3.2 Medio de cultivo alternativo**

Se elaboró un medio alternativo de 250 mL con algunas modificaciones en base a las condiciones de cultivo propuestas por (Dhaliwal & Chandra, 2015; Maldonade et al., 2012). El medio de cultivo alternativo presenta la siguiente formulación: Lactosa 20 g L<sup>-1</sup>, Cloruro de sodio (NaCl) 0,4 g L<sup>-1</sup>; Sulfato de manganeso (MnSO<sub>4</sub>) 0,1 g L<sup>-1</sup>; Sulfato de zinc (ZnSO<sub>4</sub>) 0,1 g L<sup>-1</sup>; Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1 g L<sup>-1</sup>; Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 2 g L<sup>-1</sup>; Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) 0,25 g L<sup>-1</sup>; Sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>; Extracto de Levadura 0,45 g L<sup>-1</sup>.

### **3.3.3 Preparación de inóculo**

Para la preparación del inóculo, se añadió el 10% del medio de cultivo de mantenimiento. La levadura creció en condiciones estables de temperatura (30°C), pH (7) y agitación (120 rpm). Este medio se incubó (Shaking Incubator BJPX- 2012 BioBase) por 72 h.

Para todos los diseños experimentales se manejaron las condiciones descritas anteriormente. Para cada diseño se elaboraron tratamientos de manera aleatoria y por triplicado (Aksu & Tugba, 2005).

## **3.4 Métodos analíticos**

### **3.4.1 Determinación de biomasa**

#### **3.4.1.1 Método espectrofotométrico**

Se prepararon 50 mL de caldo YPD, el cual sirvió como inóculo. Luego, en 250 mL de medio de cultivo alternativo se agregó el 10% del inóculo. Se incubó durante 72 h. A continuación, se tomó una alícuota de 1 mL cada hora y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm (Kanzky et al., 2015).

#### **3.4.1.2 Método peso seco**

Se tomaron alícuotas del medio alternativo inoculado para realizar diluciones, como se describen en la Tabla 2, se centrifugaron y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. La muestra obtenida se resuspendió y homogenizó en 1 mL de agua destilada; esta se añadió en un capuchón y se dejó secar en la estufa a 80°C

durante 24 h. Cada muestra fue pesada luego de colocarse en el desecador por 30 min (Almeida et al., 2017).

### 3.4.1.3 Curva de calibrado de biomasa

La curva de calibrado de la biomasa relaciona la concentración del crecimiento celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) y la absorbancia de la muestra (nm) mediante una regresión lineal; a partir de esto se genera una ecuación de la recta y el coeficiente de determinación  $R^2$  entre las dos variables (Elsanhoty et al., 2017).

Tabla 2.

*Diluciones para la curva de calibrado de Rhodotorula mucilaginosa ATCC 66034*

Dilución	Inóculo (mL)	Agua (mL)
1	1	9
2	2	8
3	3	7
4	4	6
5	5	5
6	6	4
7	7	3
8	8	2
9	9	1
10	10	0

### 3.4.2 Consumo de sustrato

#### 3.4.2.1 Método espectrofotométrico

La medición de sustrato se realizó utilizando la técnica de determinación de azúcares reductores, para lo cual se tomó una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  de medio alternativo inoculado y se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de DNS. La muestra se colocó en un

termobloque (Thermo Scientific) durante 5 min. Luego, se midieron 200  $\mu\text{L}$  de la muestra en un *Micro-plate reader* (BioTek ELX800) a 540 nm (Miller, 1959)

### 3.4.2.2 Curva de calibrado de sustrato

En la curva de calibrado de lactosa se representa la concentración de lactosa ( $\text{g L}^{-1}$ ) respecto a la absorbancia de la muestra (nm) mediante una regresión lineal, a partir de la cual se obtiene el coeficiente de determinación  $R^2$  y la ecuación de la recta que relaciona a las dos variables (Aksu & Tugba, 2005; Elsanhoty et al., 2017). En la Tabla 3 se muestran las diluciones realizadas para elaborar la curva de calibrado.

Tabla 3.

*Diluciones para la curva de calibrado de lactosa*

Dilución	Lactosa ( $\text{g L}^{-1}$ )	Agua (mL)
1	1	9
2	2	8
3	3	7
4	4	6
5	5	5
6	6	4
7	7	3
8	8	2
9	9	1
10	10	0

### 3.4.3 Extracción de carotenoides

Una vez transcurridas 72 h de fermentación, se tomaron 15 mL de muestra de un medio de cultivo, se centrifugaron (SIGMA ® 3-18KS) a 4370 rpm y se realizaron tres lavados con agua estéril. Posteriormente, se resuspendió el pellet con 1 mL de agua estéril y se liofilizó (SP Scientific) la biomasa previamente congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$

durante 24 h y a una temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$ . Se pesaron 0,1 g de biomasa liofilizada y se añadieron 1,2 mL de acetona; se aplicaron cuatro ciclos ultrasónicos utilizando un sonicador con punta (Fisher Scientific FB-705) de 40 KHz por 10 min. La muestra fue centrifugada a 4370 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante, se agregaron 2 mL de una solución de cloruro de sodio al 20% y 2 mL de éter de petróleo. Luego, se centrifugó nuevamente a 4370 rpm por 10 min y se recogió la fase polar. Se evaporó el disolvente orgánico restante en un termobloque (Thermo Scientific) a  $50^{\circ}\text{C}$  por 1 min (Almeida et al., 2017).

#### 3.4.4 Cuantificación de carotenoides

Para medir la concentración de carotenoides totales (TC), se colocó 1 mL de la muestra obtenida luego del proceso de extracción en una celda espectrofotométrica y se analizó en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Evolution 201) a una absorbancia de 448 nm (Almeida et al., 2017). Además, la cantidad de carotenoides totales se calcularon mediante la Ecuación 1 descrita por (Almeida et al., 2017), donde:

TC: concentración de carotenoides totales ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

A: absorbancia (nm)

V: volumen (mL)

$A_{cm}^{1\%}$ : capacidad de absorción específica

m: masa biomasa liofilizada (g)

$$\text{TC} = \frac{A * V * 10^6}{A_{cm}^{1\%} * 100 * m}$$

Ecuación 1

#### 3.4.5 Determinación de parámetros cinéticos

La determinación de la cinética de *Rhodotorula mucilaginosa* se realizó a partir de la medición de parámetros cinéticos, entre ellos:

### 3.4.5.1 Crecimiento celular

El crecimiento celular se relaciona con la correcta adaptación del microorganismo a las condiciones de cultivo (Dutta, 2008). Se puede determinar a través de ecuaciones como:

#### Velocidad específica de crecimiento

A partir de los datos que se encuentran en la fase exponencial de la curva de crecimiento del microorganismo. Se puede determinar la velocidad específica de crecimiento “ $\mu$ ”, cuyo cociente relaciona el logaritmo natural de la variación de biomasa y la variación del tiempo (Dutta, 2008).

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \quad (\text{h}^{-1}) \quad \text{Ecuación 2}$$

#### Velocidad volumétrica

Para determinar la productividad máxima del crecimiento celular, es preciso calcular la velocidad volumétrica máxima de crecimiento ( $r_x$ ) que se indica en la Ecuación 3; está relacionada la variación de la concentración de la biomasa y el tiempo en la fase exponencial.

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \frac{x_2 - x_1}{t_2 - t_1} \quad (\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad \text{Ecuación 3}$$

Al mismo tiempo, se puede obtener el valor de la productividad global mediante el cálculo de la velocidad volumétrica total de crecimiento ( $r_x$ ) que obtiene al relacionar la diferencia de la concentración final e inicial de biomasa entre el tiempo final de la producción (Dutta, 2008). (Ecuación 4).

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \frac{x_f - x_i}{t_f - t_i} \quad (\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad \text{Ecuación 4}$$

### Productividad horaria total

Al considerar la productividad global de crecimiento celular y el volumen total de fermentación se puede obtener el valor de la productividad horaria total, como se muestra en la Ecuación 5 (John, Crowley, & Bomble, 2016).

$$r_x * V = \frac{dx}{dt} * V \quad (\text{g h}^{-1}) \quad \text{Ecuación 5}$$

### Tiempo de duplicación

La Ecuación 6 describe el tiempo que tarda la levadura en dividirse durante la producción de carotenoides; está relaciona el logaritmo natural de 2 y la velocidad específica de crecimiento (Doran, 2013).

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{h}) \quad \text{Ecuación 6}$$

#### 3.4.5.2 Consumo de sustrato

Una de las condiciones de cultivo que favorecen la división celular de los microorganismos es el consumo de sustrato. Para determinar el consumo eficiente del mismo se aplican las siguientes ecuaciones (Monod, 1958).

### Velocidad volumétrica de consumo de sustrato

El consumo máximo de sustrato ( $r_s$ ) indica la cantidad máxima que el microorganismo utiliza del sustrato para su crecimiento, en la Ecuación 7 se representa la relación entre la diferencia de la concentración de sustrato y el tiempo en la fase exponencial (John et al., 2016; Kovárová-Kovar & Egli, 1998).

$$r_s = \frac{ds}{dt} = \frac{s_2 - s_1}{t_2 - t_1} \quad (\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad \text{Ecuación 7}$$

### Velocidad específica de consumo de sustrato

Para calcular el consumo de sustrato en un tiempo determinado ( $q_s$ ) se usa la Ecuación 8, la cual resulta del producto del consumo máximo de sustrato y la concentración celular en x tiempo (John et al., 2016; Monod, 1958).

$$q_s = \frac{dp}{dt} * \frac{1}{x} \quad (\text{h}^{-1}) \quad \text{Ecuación 8}$$

### 3.4.5.3 Formación de producto

Para evaluar la producción obtenida a lo largo del tiempo de fermentación (Doran, 2013; Dutta, 2008), se usaron las siguientes ecuaciones:

#### Velocidad volumétrica

La productividad máxima ( $r_p$ ) se puede calcular mediante la Ecuación 9 que considera la variación de la formación de producto y el tiempo en la fase exponencial (Doran, 2013).

$$r_p = \frac{dp}{dt} = \frac{p_2 - p_1}{t_2 - t_1} \quad (\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad \text{Ecuación 9}$$



Del mismo modo, la velocidad volumétrica total del producto o también conocida como productividad global ( $r_p$ ) se puede determinar con la Ecuación 10, la cual relaciona el producto y tiempo final de producción (Doran, 2013; Dutta, 2008).

$$r_p = \frac{dp}{dt} = \frac{p_f - p_i}{t_f - t_i} \quad (\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad \text{Ecuación 10}$$

### Velocidad horaria total

La Ecuación 11 que corresponde al cálculo de la productividad horaria global ( $r_p * V$ ), la cual considera la productividad global y el volumen total de la fermentación (Doran, 2013).

$$r_p * V = \frac{dp}{dt} * V \quad (\text{L h}^{-1}) \quad \text{Ecuación 11}$$

### Velocidad específica máxima de formación de producto

Al relacionar la productividad máxima y la concentración celular en un determinado tiempo se puede calcular la velocidad específica máxima de formación de producto ( $q_p$ ), como se detalla en la Ecuación 12 (Doran, 2013; Kovárová-Kovar & Egli, 1998).

$$q_p = \frac{dp}{dt} * \frac{1}{x} \quad (\text{h}^{-1}) \quad \text{Ecuación 12}$$

#### 3.4.5.4 Rendimientos prácticos

Los coeficientes de rendimiento en un instante particular en el tiempo pueden calcularse como la relación de tasas evaluadas en ese instante, estos cálculos puede ser de biomasa, sustrato y producto (Doran, 2013). En las siguientes ecuaciones se describe como calcular cada una.

### Rendimiento biomasa-sustrato

Para evaluar la relación existente entre el crecimiento celular y la variación de sustrato durante la fase exponencial se calcula el rendimiento biomasa sustrato como se indica en la Ecuación 13 (Doran, 2013; Dutta, 2008).

$$Y \frac{x}{s} = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{x_2 - x_1}{s_1 - s_2} \quad (\text{g g}^{-1}) \quad \text{Ecuación 13}$$

### Rendimiento producto-sustrato

El cálculo del rendimiento producto-sustrato se realiza mediante la Ecuación 14, la cual relaciona la variación de la formación de producto y consumo de sustrato en la fase exponencial (Doran, 2013).

$$Y \frac{x}{s} = \frac{\Delta p}{\Delta s} = \frac{p_2 - p_1}{s_2 - s_1} \quad (\text{g g}^{-1}) \quad \text{Ecuación 14}$$

### Rendimiento producto-biomasa

En el caso de que los productos obtenidos sean intracelulares, estos están directamente relacionados con el crecimiento celular, por lo cual se debe determinar el rendimiento producto-biomasa, como se indica en la Ecuación 15. Esta relaciona la variación de la formación de producto y biomasa en la fase exponencial (Doran, 2013).

$$Y \frac{p}{x} = \frac{\Delta p}{\Delta x} = \frac{p_2 - p_1}{x_2 - x_1} \quad (\text{g g}^{-1}) \quad \text{Ecuación 15}$$

#### 3.4.6 Curva de crecimiento

Se preparó un medio alternativo de 250 mL basado en las condiciones de cultivo de (Dhaliwal & Chandra, 2015; Maldonade et al., 2012). A este añadió el 10% de inóculo. El medio se incubó por 72 h a 30°C y 120 rpm.

Se midió la densidad óptica celular de cada muestra cada 2 h a 600 nm mediante espectrofotometría, para lo cual se colocó 1 mL de muestra y se midió en el espectrofotómetro. Los resultados de absorbancia obtenidos sirvieron para determinar la concentración celular en función del tiempo (Almeida et al., 2017). Los datos de absorbancia se transformaron a concentración mediante la ecuación de la recta de calibrado de biomasa.

#### **3.4.7 Curva de sustrato**

El consumo de lactosa se midió utilizando el sobrenadante obtenido después del proceso de centrifugación, el cual se indica en el punto 3.4.2.1 (Miller, 1959). Los valores de absorbancia se convirtieron en concentración mediante el uso de la curva de calibrado de lactosa y estos datos se representaron en función del tiempo.

#### **3.4.8 Curva de producto**

Se midieron los carotenoides totales en función del tiempo mediante el proceso y utilizando la Ecuación 1 para transformar los datos a concentración. (Almeida et al., 2017).

### **3.5 Diseños experimentales**

#### **3.5.1 Diseño Univariado**

Inicialmente, se realizó un Diseño Univariado para determinar la mejor fuente de carbono que se utilizó en la elaboración del medio de cultivo alternativo. En cada experimento se usaron diferentes concentraciones de los sustratos: melaza y suero

de leche como se muestra en la Tabla 4. Además, se suplementaron con: Extracto de levadura,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ . Se añadió el 10% de inóculo, se mantuvo a una temperatura constante de  $30^\circ\text{C}$ , agitación de 120 rpm y pH 7. Cada experimento se realizó por triplicado.

Tabla 4.

*Diseño Univariado: variaciones de las concentraciones de sustrato*

<b>Melaza (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Suero de leche (%)</b>
2,5	15
5	30
7,5	45
10	60
12,5	75
15	90
20	100

### 3.5.2 Diseño experimental Plackett-Burman

Con el objeto de evaluar el efecto de las variables sobre la producción de carotenoides se utilizó un Diseño Plackett-Burman  $11 \times 16$ , es decir que, se analizaron 11 factores: Extracto de levadura ( $X_1$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $X_2$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $X_3$ ),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_4$ ),  $\text{NaCl}$  ( $X_5$ ),  $\text{MgSO}_4$  ( $X_6$ ),  $\text{MnSO}_4$  ( $X_7$ ),  $\text{ZnSO}_4$  ( $X_8$ ), Ph ( $X_9$ ), Suero de leche ( $X_{10}$ ), Agitación ( $X_{11}$ ) y dos niveles: valor positivo (+) y valor negativo (-), generando así 16 tratamientos de acuerdo con la matriz de la Tabla 5. Dichos valores se generaron utilizando el software Statistica <sup>TM</sup> y se emplearon para elaborar tratamientos por triplicado.

Se prepararon 100 mL por cada uno utilizando las concentraciones de acuerdo con la matriz que se indica en la Tabla 6. Además, se añadió el 10% de inóculo y se mantuvieron en agitación de 120 rpm y pH 7 durante 72 h. Las variables de respuesta fueron: concentración celular y producción de carotenoides.

Seguido de esto se midió la concentración celular por espectrofotometría a 600 nm, además, se determinó el consumo de sustrato mediante la técnica descrita por (Miller, 1959). A continuación, se determinó la cantidad de carotenoides utilizando la formula descrita por (Almeida et al., 2017).

Finalmente, los resultados se analizaron con el software Statistica <sup>TM</sup> y se determinaron los factores que influyen significativamente en la producción de carotenoides.

Tabla 5.

*Matriz del Diseño Plackett-Burman*

Tratamientos/ Factores	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
T1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
T2	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
T3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
T4	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
T5	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1
T6	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
T7	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
T8	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
T9	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1
T10	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
T11	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
T12	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
T13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T14	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1

<b>T15</b>	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
<b>T16</b>	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1

Tabla 6.

*Factores experimentales del Diseño Plackett-Burman*

	Valor máximo (+)	Valor mínimo (-)
<b>Extracto de levadura (g L<sup>-1</sup>)</b>	0,45	0,225
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	1	0,5
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	2	1
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	1	0,5
<b>NaCl (g L<sup>-1</sup>)</b>	0,4	0,2
<b>MgSO<sub>4</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	0,25	0,13
<b>MnSO<sub>4</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	0,05	0,1
<b>ZnSO<sub>4</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	0,05	0,1
<b>pH</b>	7	5,5
<b>Suero de leche (%)</b>	75	30
<b>Agitación (rpm)</b>	120	80

### 3.5.3 Diseño Central Compuesto con superficie de respuesta

A partir de los factores estadísticamente significativos obtenidas en el Diseño Plackett-Burman, se aplicó el Diseño Central compuesto (DCC) para obtener los valores óptimos de cada factor para la producción de carotenoides.

Las variables independientes analizadas fueron el extracto de levadura ( $X_1$ ), pH ( $X_2$ ) y suero de leche ( $X_3$ ), mientras que las dependientes fueron la concentración celular y la producción de carotenoides.

En la Tabla 7. se detallan las variaciones de concentración del extracto de levadura, pH y suero de leche para cada tratamiento. Además, a estos se añadieron sales como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ , 10% de inóculo y se incubaron durante 72 h a 120 rpm.

A continuación, se midió el crecimiento celular y el consumo de sustrato mediante los protocolos detallados en los apartados 3.4.1.1 y 3.4.2.1, respectivamente. El cálculo de carotenoides se realizó utilizando el proceso descrito por (Almeida et al., 2017).

Se utilizó el software Statistica <sup>TM</sup> para determinar el valor óptimo de cada variable significativa y para identificar la relación que existe entre estas, lo cual se puede identificar mediante un análisis estadístico y un gráfico de superficie de respuesta, respectivamente. Para esto, se realizó una regresión multivariable para obtener una ecuación de segundo orden que permita relacionar los coeficientes de regresión y de los factores ( $X_1$ ), ( $X_2$ ) y ( $X_3$ ) sobre la producción de los carotenoides. La ecuación que describe (Elaziz, Hanini, Kasbadji, & Tassalit, 2016) se expresa mediante:

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_{12}X_1X_2 + A_{13}X_1X_3 + A_{23}X_2X_3 + A_{11}X_1^2 + A_{22}X_2^2 + A_{33}X_3^2$$

Ecuación 16

La matriz generada para determinar la concentración de carotenoides y el crecimiento celular se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7.

*Matriz del Diseño Central Compuesto*

No. Experimento	Extracto de levadura (g L <sup>-1</sup> )		Suero de leche (%)		pH	
	Codificado	Decodificado	Codificado	Decodificado	Codificado	Decodificado
1	-1	0,30	1	63,75	1	8,00
2	1	0,60	-1	48,75	-1	6,00
3	0	0,45	0	56,25	0	7,00
4	-1,68	0,20	0	56,25	0	7,00
5	-1	0,30	-1	48,75	-1	6,00
6	0	0,45	0	56,25	0	7,00
7	1	0,60	-1	48,75	1	8,00
8	1	0,60	1	63,75	1	8,00
9	-1	0,30	1	63,75	-1	6,00
10	0	0,45	-1,68	43,65	0	7,00
11	0	0,45	0	56,25	-1,68	5,32
12	0	0,45	0	56,25	0	7,00
13	1,68	0,70	0	56,25	0	7,00
14	0	0,45	0	56,25	0	7,00
15	1	0,60	1	63,75	-1	6,00
16	-1	0,30	-1	48,75	1	8,00
17	0	0,45	0	56,25	1,68	8,68
18	0	0,45	0	56,25	0	7,00
19	0	0,45	1,68	68,85	0	7,00
20	0	0,45	0	56,25	0	7,00

### 3.5.4 Validación del medio optimizado

Una vez que se ha optimizado el medio de cultivo, se escaló en biorreactor con un volumen final de 4 L en condiciones de cultivo tipo batch, se usó el 10% del inóculo del volumen total. Se controló de forma específica la aireación, la temperatura (30°C), el pH (7) y la agitación (120 rpm). Al mismo tiempo, se realizó una curva de crecimiento de la levadura durante 72 h, la medición del crecimiento celular, consumo de sustrato y formación del producto con los protocolos detallados anteriormente. A partir de esto se calcularon los parámetros cinéticos.



### **3.5.5 Evaluación estadística de los resultados**

Los análisis estadísticos de los resultados de diseños propuestos en esta investigación para la producción de carotenoides y concentración celular utilizaron un nivel de significancia de 0,05%.

La selección de las fuentes de carbono se realizó mediante un análisis de gráficos de barras y un ANOVA donde se identificó la mejor fuente de carbono, lo cual sirvió para ejecutar la corrida del diseño experimental Plackett-Burman. El análisis del diseño Plackett-Burman y el Diseño Central Compuesto se desarrolló con los algoritmos estadísticos procesados por el software Statistica®.

A través de diagramas de Pareto y tablas de análisis de varianza (ANOVA), estas herramientas estadísticas permitieron extrapolar los datos con mayor significancia estadística en la concentración celular y la producción de carotenoides. Además, una vez obtenidos los resultados del Diseño Central Compuesto el software permitió generar un diagrama de superficie de respuesta para determinar la interacción de los factores con la variable de respuesta.

## 4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Curvas de calibrado

#### 4.1.1 Curva de calibrado de biomasa

Se realizó una curva de calibrado para obtener una ecuación de la recta que relacione la concentración celular de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 y la absorbancia de cada muestra. De esta manera los datos de absorbancia se transformaron a concentración celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (Maldonade et al., 2012). En la Figura 3 se muestra la ecuación de la recta obtenida que describe la relación lineal entre ambos parámetros que fue:  $y = 0,6696x - 0,72$  y un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,9879 que indica que el 98,7 % de los datos se ajustan a la regresión lineal.

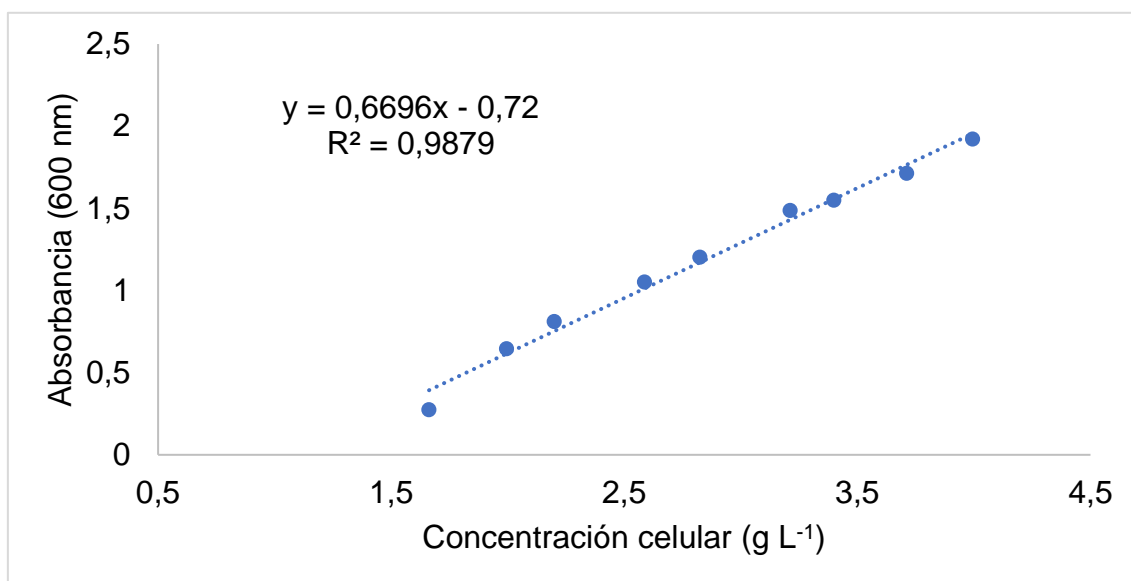


Figura 3. Curva de calibrado del crecimiento celular *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034

#### 4.1.2 Curva de calibrado de sustrato

Se realizó una curva de calibrado para obtener una ecuación de la recta que relacione la concentración de lactosa y la absorbancia de cada muestra cómo se indica en la Figura 4. Además, la ecuación de la recta  $y = 0,9402x + 0,2519$  que describe la relación lineal entre ambos parámetros. El  $R^2$  de 0,9803 indica que el 98,03 % de los datos obtenidos se ajustan a la regresión lineal. A partir de esto, los datos de absorbancia se transformaron a concentración ( $\text{g L}^{-1}$ ) (Maldonade et al., 2012).

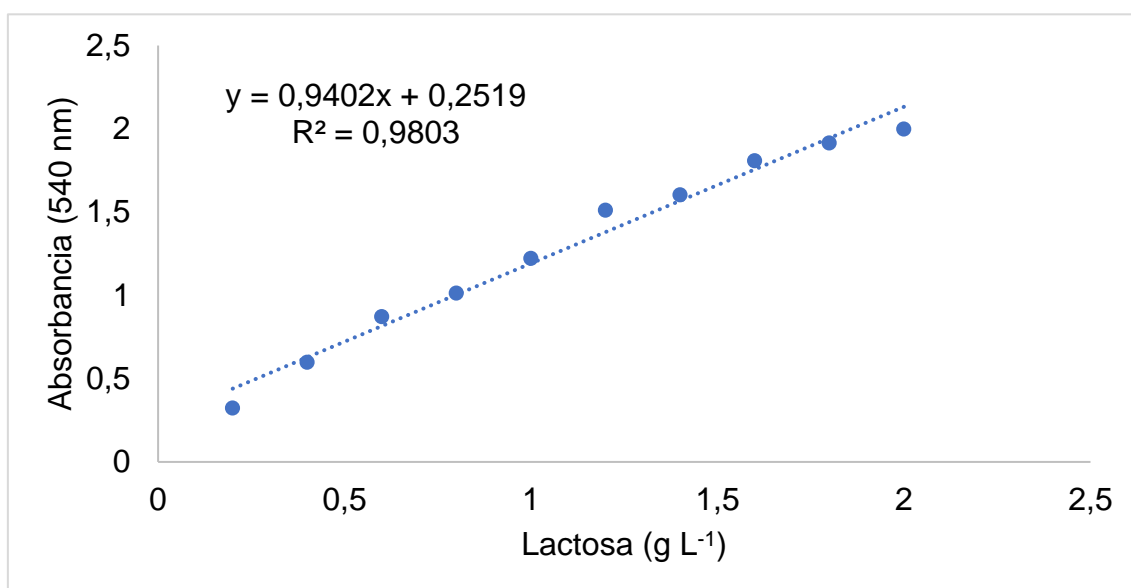


Figura 4. Curva de calibrado de lactosa

#### 4.2 Diseño Univariado

Para determinar la mejor fuente de carbono en el crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 y la producción de carotenoides, se estudiaron dos fuentes diferentes, tales como melaza y suero de leche.

De acuerdo con el ANOVA se obtuvo un valor P de 0,195 mayor que  $\alpha = 0,05$  como se muestra en la Tabla 8. Debido al resultado obtenido para la fuente de carbono

melaza no existe diferencia significativa en la producción de carotenoides entre las concentraciones evaluadas.

Se determinó que la concentración de 15 g L<sup>-1</sup> de melaza es la que mayor cantidad de carotenoides produjo, dando una concentración promedio de 9,746 µg g<sup>-1</sup>, como se muestra en la Figura 5a.

Tabla 8.

*Análisis de varianza del Diseño Univariado con melaza (X<sub>1</sub>) como fuente de carbono*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	0,957	6	0,159	1,980	0,195	3,865
Dentro de los grupos	0,563	7	0,080			
Total	1,521	13				

En el estudio del suero de leche como fuente de carbono, la concentración del 75% dio como resultado una producción máxima de carotenoides con un total 30,672 µg g<sup>-1</sup> (Figura 5b). El ANOVA generó un valor P de 1,97E-9 menor que α=0,05; por lo que se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa en la obtención de carotenoides en las distintas concentraciones de suero de leche, como se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

*Análisis de varianza del Diseño Univariado con suero de leche (X<sub>2</sub>) como fuente de carbono*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	1058,335	6	176,389	733,35	1,97E-9	3,865
Dentro de los grupos	1,683	7	0,240			
Total	1060,018	13				

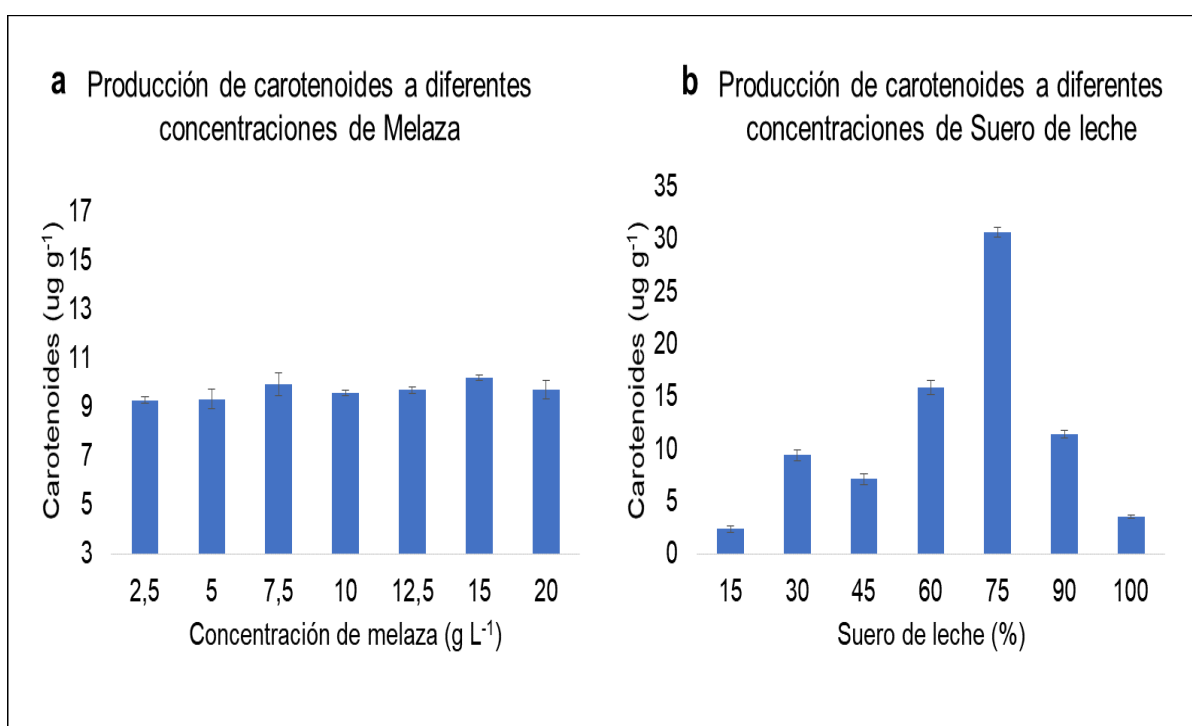


Figura 5. Selección de la fuente de carbono y de la concentración para la producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034. (a) Melaza (b) Suero de leche

#### 4.3 Diseño Plackett-Burman

En la Tabla 10 se muestra un compendio de los resultados obtenidos de los factores influyentes respecto a la producción máxima de carotenoides de 47,356  $\mu\text{g g}^{-1}$  y una concentración celular máxima de 3,711  $\text{g L}^{-1}$ .

Tabla 10

*Producción de carotenoides y concentración celular resultantes de los factores influyentes del Diseño Plackett-Burman*

N° Experimento	Extracto de levadura ( $\text{g L}^{-1}$ )		pH		Suero de leche %		Carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Concentración celular ( $\text{g L}^{-1}$ )
	-1	0,225	-1	5,5	1	75		
1	-1	0,225	-1	5,5	1	75	42,341	2,549
2	1	0,45	1	7,0	-1	30	23,212	1,904
3	1	0,45	1	7,0	-1	30	47,356	1,669
4	1	0,45	-1	5,5	1	75	29,771	2,233
5	-1	0,225	1	7,0	1	75	41,409	1,581
6	-1	0,225	-1	5,5	1	75	3,472	1,942
7	-1	0,225	-1	5,5	-1	30	9,388	3,653
8	1	0,45	-1	5,5	1	75	5,337	2,695
9	1	0,45	-1	5,5	-1	30	6,816	3,461
10	1	0,45	1	7,0	1	75	36,973	2,723
11	1	0,45	-1	5,5	-1	30	4,244	3,370
12	-1	0,225	1	7,0	-1	30	6,237	2,983
13	1	0,45	1	7,0	1	75	2,501	1,726
14	-1	0,225	1	7,0	1	75	16,139	3,593
15	-1	0,225	1	7,0	-1	30	45,424	3,101
16	-1	0,225	-1	5,5	-1	30	39,056	3,711

La evaluación de las variables relacionadas con las condiciones de cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 para la producción de los carotenoides y concentración celular se realizó de acuerdo con un diseño Plackett-Burman; el análisis de las variables de respuesta se realizó mediante gráficos de Pareto y tablas ANOVA.

Los factores extracto de levadura, pH y suero de leche fueron estadísticamente significativos para la producción de carotenoides debido a que los valores P fueron menores al  $\alpha=0,05$ ; como se señala en la Tabla 11, lo cual sugiere que dichos factores tienen influencia en la producción de carotenoides.

El  $R^2$  del análisis fue de 0,928; lo que indica que los datos se ajustan al modelo propuesto en un 92,8%. El valor de  $R^2$  se encuentra entre 0 y 1; cuando el valor del coeficiente de determinación supera el valor de 0,75; se puede decir que se realizó un buen diseño experimental (Kim, Choi, & Han, 2014).

En el trabajo realizado por (Maldonade et al., 2012) en la optimización de la producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula mucilaginosa* las variables que tuvieron significancia estadística fueron pH, fuente carbono: glucosa, fuente de nitrógeno: extracto de levadura,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $KH_2PO_4$ , con las cuales alcanzaron  $162 \mu g g^{-1}$  de concentración máxima de carotenoides con un  $R^2$  del 99%. Este resultado permite contrastar que las variables significantes obtenidas en esta investigación son adecuadas para la formación de carotenoides.

Tabla 11.

*Análisis de varianza del Diseño Plackett-Burman para la variable dependiente: producción de carotenoides*

<b>Factor</b>	ANOVA; Var.:Carotenoides $\mu g g^{-1}$ ; R-sqr=,92887; Adj.,73326 (Spreadsheet1)				
	11 Factor Screening Design; MS Residual=239,5244 DV: Carotenoides $\mu g g^{-1}$				

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
(1)Extracto de levadura g L <sup>-1</sup>	5396,14	1	5396,139	22,52855	0,008995
(2)KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> g L <sup>-1</sup>	161,68	1	161,678	0,67500	0,457462
(3)K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> g L <sup>-1</sup>	0,03	1	0,031	0,00013	0,991470
(4)(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> g L <sup>-1</sup>	75,23	1	75,225	0,31406	0,605101
(5)NaCl g L <sup>-1</sup>	5,97	1	5,970	0,02492	0,882204
(6)MgSO <sub>4</sub> g L <sup>-1</sup>	14,41	1	14,414	0,06018	0,818290
(7)MnSO <sub>4</sub> g L <sup>-1</sup>	110,61	1	110,606	0,46177	0,534087
(8)ZnSO <sub>4</sub> g L <sup>-1</sup>	3,22	1	3,218	0,01343	0,913313
(9)pH	2154,48	1	2154,476	8,99481	0,039976
(10)Suero de leche %	3774,19	1	3774,193	15,75703	0,016545
(11)Agitación rpm	589,36	1	589,359	2,46054	0,191816
Error	958,10	4	239,524		
Total SS	13469,46	15			



En la Figura 6 se muestra un diagrama de Pareto en el que se puede analizar el valor  $t$  de los factores estudiados, se muestra que el extracto de levadura, suero de leche y pH tienen valores  $t$  positivos. Esto indica que los factores influyen positivamente en la producción (Montgomery, 2013), por lo cual dicho valor se utilizó para continuar al siguiente nivel, el Diseño Central Compuesto.

Al estimar el efecto de los factores y su influencia sobre la variable de respuesta, en este estudio se muestra que al usar la mayor concentración de extracto de levadura se generó un efecto positivo y un incremento en la producción de carotenoides, esto se puede contrastar con el estudio de (Voaides & Dima, 2011), en el cual se afirma que el uso de una fuente de nitrógeno para alcanzar niveles máximos de producción de carotenoides es fundamental. Por otro lado, (Maldonade et al., 2012) señalan que la adición de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  generó un efecto negativo en la producción de carotenoides, sin embargo, en este estudio el efecto de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  no fue negativo y su adición no tuvo influencia sobre las variables de respuesta; a pesar de que su rol es acidificar el medio de cultivo, su acción no es primordial dado que la acidificación se da espontáneamente durante la producción de metabolitos primarios y secundarios (Bhosale & Gadre, 2001; Doran, 2013). Cabe señalar que la fuente de carbono y el pH no mostraron influencia en la producción de carotenoides en la investigación de (Maldonade et al., 2012), mientras que los resultados de este trabajo evidencian que la fuente de carbono y pH tienen incidencia sobre la producción de carotenoides, esto se debió a que al usar un pH neutro inicial se evitó la acidificación del medio de cultivo, adicionalmente, al suplementarlo con lactosa se estimuló la formación de carotenoides (Doran, 2013; Kanzy et al., 2015).

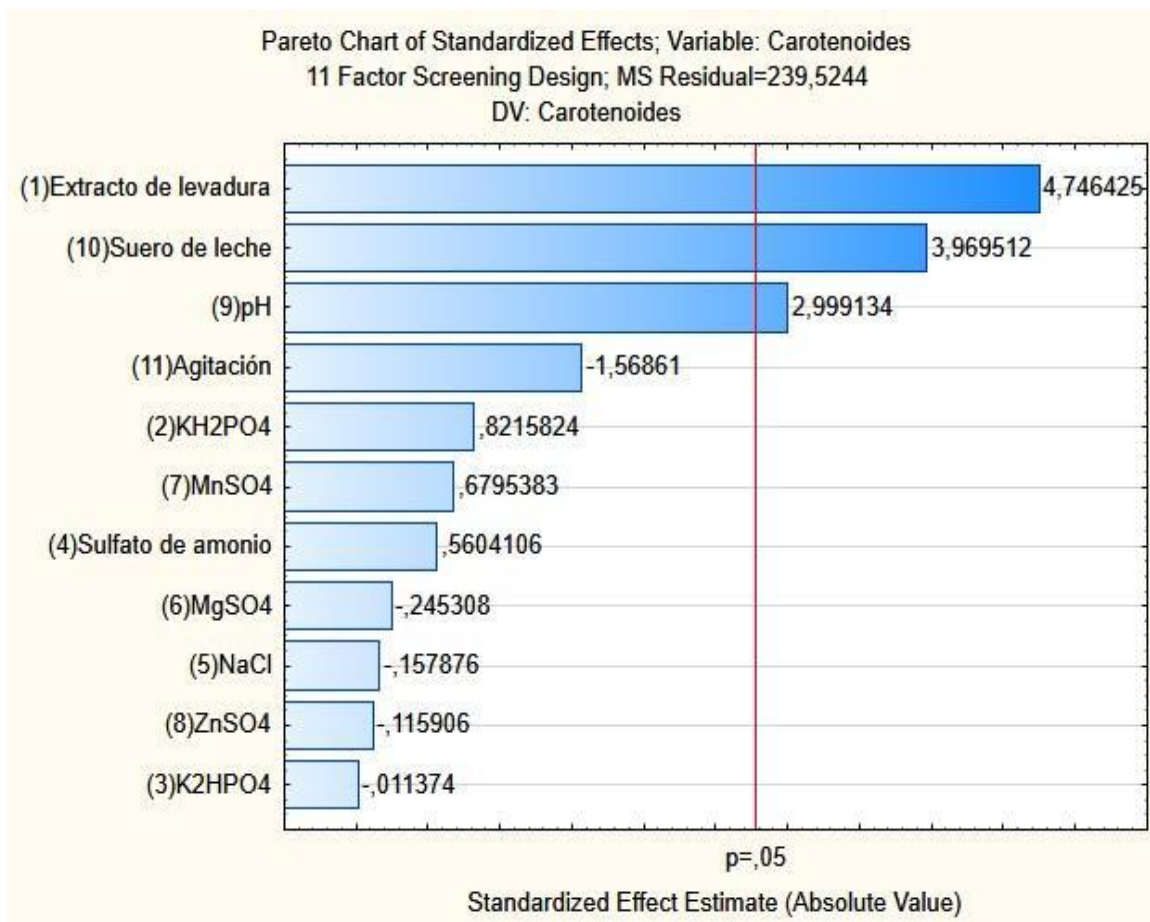


Figura 6. Diagrama de Pareto para la variable de respuesta: carotenoides  $\mu\text{g g}^{-1}$

Adicionalmente, se evaluó la segunda variable de respuesta: concentración celular  $\text{g L}^{-1}$ . En la Tabla 12 se detalla un ANOVA, el cual señala que ninguno de los factores fueron estadísticamente significativos para la concentración celular ya que los valores P fueron mayores que  $\alpha=0,05$ .

(Husseiny, Abdelhafez, Ali, & Ali, 2017) mencionan que al usar los factores que resultaron estadísticamente significativos; como la sacarosa, pH, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaCl durante la optimización de la producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula glutinis* ATCC 4054S se favorece el crecimiento celular. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación respecto a la concentración celular de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 demuestran que ninguna variable ejerce un efecto significativo sobre la formación de biomasa. (Doran, 2013; Dutta, 2008) sugieren

que esto se debe a que el metabolismo de los microorganismos es diverso y que, además, los componentes del medio de cultivo pueden ser utilizados en el mantenimiento celular y otros procesos de la ruta metabólica.

Tabla 12

*Análisis de varianza del Diseño Plackett-Burman para la variable dependiente: concentración celular*

Factor	ANOVA; Var.:Concentración celular g L <sup>-1</sup> ; R-sqr=,7825; Adj:,18439 (Spreadsheet1). 11 Factor Screening Design; MS Residual=,4732332 DV: Concentración celular g L <sup>-1</sup>				
	SS	df	MS	F	P
(1)Extracto de levadura g L <sup>-1</sup>	0,635491	1	0,635491	1,342871	0,310997
(2)KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> g L <sup>-1</sup>	0,446937	1	0,446937	0,944433	0,386171
(3)K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> g L <sup>-1</sup>	0,042170	1	0,042170	0,089110	0,780176
(4) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> g L <sup>-1</sup>	0,004212	1	0,004212	0,008900	0,929377
(5)NaCl g L <sup>-1</sup>	0,512552	1	0,512552	1,083085	0,356775
(6)MgSO <sub>4</sub> g L <sup>-1</sup>	0,573938	1	0,573938	1,212802	0,332591
(7)MnSO <sub>4</sub> g L <sup>-1</sup>	0,436106	1	0,436106	0,921547	0,391432
(8)ZnSO <sub>4</sub>	1,313423	1	1,313423	2,775424	0,171051

g L <sup>-1</sup>					
(9)pH	1,093106	1	1,093106	2,309867	0,203185
(10)Suero de leche %	1,486888	1	1,486888	3,141977	0,150988
(11) Agitación rpm	0,030207	1	0,030207	0,063832	0,812991
Error	1,892933	4	0,473233		
Total SS	8,703303	15			

El diagrama de Pareto que se muestra en la Figura 7, obtenido al evaluar la variable dependiente de concentración celular señala que los valores t de los factores: suero de leche, ZnSO<sub>4</sub>, pH, extracto de levadura, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> presentan valores negativos; lo cual demuestra que influyen negativamente durante la producción (Montgomery, 2013), por lo cual se tomaron los valores mínimos de concentración de los factores anteriormente mencionados para el desarrollo del DCC. Por otro lado, el (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el suero de leche tienen valores t positivos, de modo que se tomaron los valores máximos de su concentración para el siguiente nivel, al DCC.

(Maldonade et al., 2012) sugieren que debido a que la fuente de carbono es esencial para el crecimiento celular; la glucosa y el extracto de levadura influyeron positivamente en el crecimiento de la levadura. Por otro lado, señalan que la adición de sulfato de magnesio generó un efecto positivo en la formación de biomasa, mientras que el pH no tuvo influencia. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio indican que ningún factor tuvo un efecto estadísticamente significativo en la concentración celular, como se muestra en la Figura 7, lo cual denota que los

nutrientes del medio de cultivo están siendo utilizados en para procesos celulares y formación de producto (Doran, 2013).

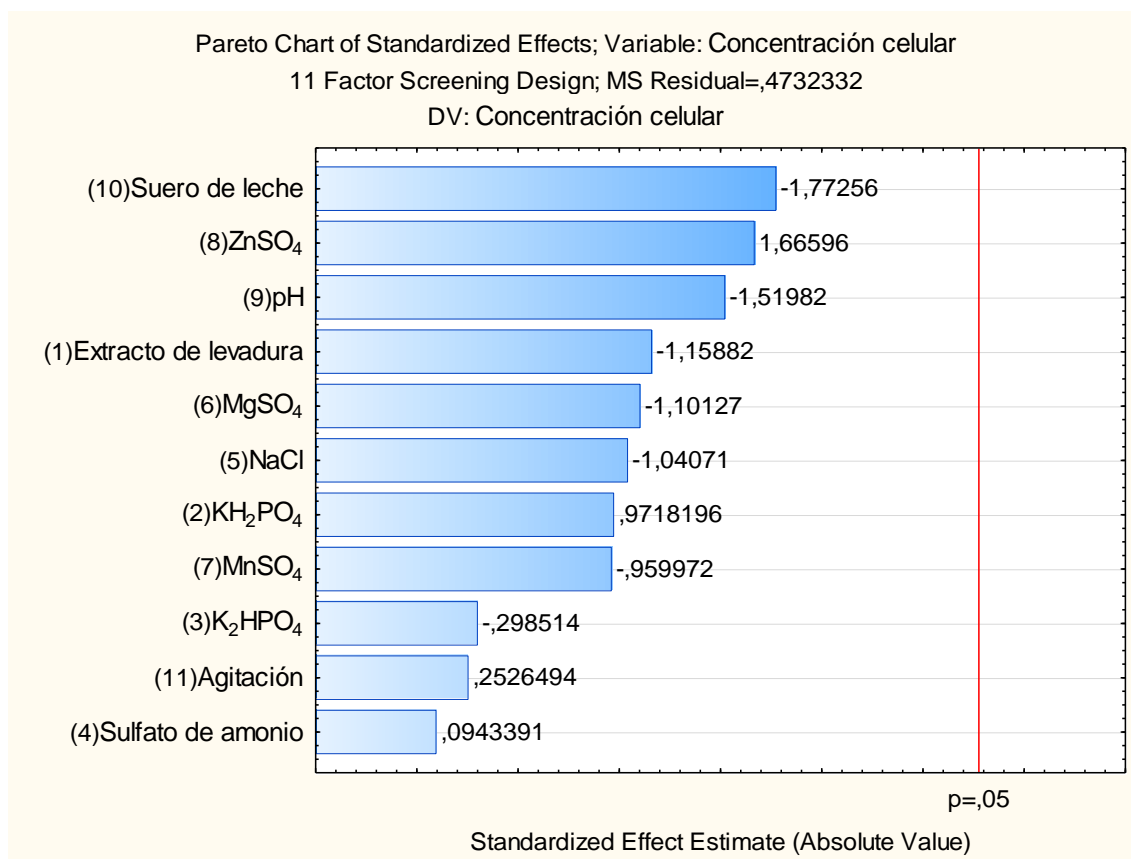


Figura 7. Diagrama de Pareto para la variable de respuesta: concentración celular  $g L^{-1}$

#### 4.4 Diseño Central Compuesto

##### 4.4.1 Determinación de las condiciones óptimas de cultivo

En la Tabla 13 se observan los valores óptimos de concentración celular y producción de carotenoides de los factores: extracto de levadura, suero de leche y pH. La concentración celular máxima obtenida fue de  $4,179 g L^{-1}$ . Adicionalmente,

se observa el valor óptimo de pH donde se obtuvo la mayor producción de carotenoides ( $55,748 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

Tabla 13

*Optimización de los factores estadísticamente significativos para las variables de respuesta*

No. Experimento	Extracto de levadura ( $\text{g L}^{-1}$ )		Suero de leche (%)		pH		Carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Concentración celular ( $\text{g L}^{-1}$ )
1	-1	0,30	1	63,75	1	8,00	14,85 3	3,657
2	1	0,60	-1	48,75	-1	6,00	29,707	3,835
3	0	0,45	0	56,25	0	7,00	48,032	4,046
4	-1,68	0,20	0	56,25	0	7,00	19,097	3,693
5	-1	0,30	-1	48,75	-1	6,00	22,377	3,774
6	0	0,45	0	56,25	0	7,00	42,245	4,041
7	1	0,60	-1	48,75	1	8,00	15,818	3,665
8	1	0,60	1	63,75	1	8,00	13,310	3,647
9	-1	0,30	1	63,75	-1	6,00	24,884	3,792
10	0	0,45	-1,68	43,65	0	7,00	55,748	4,179
11	0	0,45	0	56,25	-1,68	5,32	7,137	3,504
12	0	0,45	0	56,25	0	7,00	41,281	3,935
13	1,68	0,70	0	56,25	0	7,00	40,123	3,922
14	0	0,45	0	56,25	0	7,00	42,631	4,034
15	1	0,60	1	63,75	-1	6,00	4,823	3,468
16	-1	0,30	-1	48,75	1	8,00	32,022	3,865
17	0	0,45	0	56,25	1,68	8,68	10,031	3,554
18	0	0,45	0	56,25	0	7,00	45,332	4,020
19	0	0,45	1,68	68,85	0	7,00	35,301	3,852
20	0	0,45	0	56,25	0	7,00	40,702	4,037

#### 4.4.2 DCC carotenoides

El pH fue el único factor estadísticamente significativo para la producción de carotenoides (Tabla 14) en donde su valor P fue de 0,0015 menor que  $\alpha=0,05$ ; lo

cual demuestra que este tuvo influencia sobre la variable de respuesta, producción de carotenoides.

El  $R^2$  obtenido indica que los datos se ajustan al modelo propuesto en un 75,8%, como se observa en la Tabla 14. (Kim et al., 2014) sugieren que cuando el valor del coeficiente de determinación  $R^2$  es mayor a 0,75; se puede decir que el diseño experimental es válido.

Tabla 14.

*Análisis de varianza de las superficie de respuesta obtenida de la variable dependiente: producción de carotenoides*

Factor	ANOVA; Var.:Carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ); R-sqr=,75812; Adj:54043 (Spreadsheet80 final) 3 factors, 1 Blocks, 20 Runs; MS Residual=101,6682 DV: Carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )				
	SS	df	MS	F	P
(1)Extracto de levadura ( $\text{g L}^{-1}$ )(L)	64,062	1	64,062	0,630	0,445
Extracto de levadura ( $\text{g L}^{-1}$ )(Q)	242,434	1	242,434	2,38456	0,153
(2)Suero de leche %(L)	150,414	1	150,414	1,47946	0,251
Suero de leche %(Q)	31,959	1	31,959	0,31435	0,587
(3)pH(L)	109,754	1	109,754	1,07953	0,323
pH(Q)	<b>1883,154</b>	<b>1</b>	<b>1883,154</b>	<b>18,52255</b>	<b>0,0015</b>

1L by 2L	15,406	1	15,406	0,15153	0,705
1L by 3L	185,755	1	185,755	1,82707	0,206
2L by 3L	126,598	1	126,598	1,24520	0,290
Error	1016,682	10	101,668		
Total SS	4203,240	19			

Los gráficos de superficie de respuesta tridimensional se utilizaron para ilustrar la interacción de los factores con las variables de respuesta. Mediante un DCC se extrapoló a un gráfico de superficie de respuesta que se ajusta a un modelo cuadrático como se muestra en la Figura 8.

En la Figura 8a se identificó que la concentración más cercana a la óptima de extracto de levadura para la producción de carotenoides fue de  $0,45 \text{ g L}^{-1}$ , mientras que para el suero de leche la concentración más adecuada fue de 43,65% ( $20,2 \text{ g L}^{-1}$  de lactosa), al usar dichos valores se obtuvo una concentración de carotenoides de  $55,748 \mu\text{g g}^{-1}$ . Por otro lado, se observa que al usar la concentración de  $0,45 \text{ g L}^{-1}$  para el extracto de levadura y 68,85% ( $31,9 \text{ g L}^{-1}$  de lactosa) de suero de leche la concentración de carotenoides disminuye notablemente. (Aksu & Tugba, 2005) señalan que al usar  $13,2 \text{ g L}^{-1}$  de lactosa obtuvieron una concentración máxima de carotenoides de  $35 \text{ mg g}^{-1}$ , la diferencia se encuentra en que el medio de cultivo para la cepa de *R. mucilaginosa* que utilizaron estaba suplementada adicionalmente con glucosa y dos fuentes de nitrógeno; este medio mixto favorece el crecimiento celular y por ende la producción de carotenoides (Sabra, 2014).

En la Figura 8b se puede observar que la máxima concentración de carotenoides es de  $42,245 \mu\text{g g}^{-1}$ , dicho valor se observa en la zona de color rojo oscuro en la



gráfica. Además, la figura muestra que la concentración óptima de extracto de levadura es de  $0,45 \text{ g L}^{-1}$  y pH igual a 7. (El-banna, El-razek, & El-mahdy, 2012) en su estudio para la producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* determinó que al utilizar una concentración de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de extracto de levadura se obtuvo una concentración de carotenoides de  $1,9 \text{ mg L}^{-1}$ , al comparar dicho resultado con el valor de la concentración en este estudio se identifica que no hay similitud, esta variación se debe a la diferencia entre especies de microorganismos y a la suplementación adicional de una alta concentración de una fuente de nitrógeno (Dutta, 2008). Por otro lado, (Almeida et al., 2017) menciona que la concentración más alta de carotenoides de  $197 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  mediante *Rhodotorula mucilaginosa* se obtuvo al usar  $3 \text{ g L}^{-1}$  de extracto de levadura; la concentración obtenida de carotenoides fue superior a la obtenida en el presente estudio debido a que adicionalmente se añadieron tres fuentes de nitrógeno al medio de cultivo, y estas favorecen la formación de producto (Voaides & Dima, 2011).

Por otro lado, (Aksu & Tugba, 2005) señala que las tasas de producción de carotenoides con *Rhodotorula mucilaginosa* aumentaron y alcanzaron un nivel máximo de  $69,8 \text{ mg L}^{-1}$  a pH 7, al usar valores de pH superiores a este significaron un descenso en la productividad. Al comparar con los resultados obtenidos en esta investigación, se pudo determinar que a pH 7 *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 también alcanzó la máxima concentración de carotenoides de  $42,245 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ , sin embargo, al usar un pH mayor a 7 se observó que la concentración del producto disminuyó substancialmente, esto ratifica que el ascenso de pH está directamente relacionado con la disminución de la concentración de carotenoides.

En la Figura 8c se puede observar que la concentración de carotenoides es superior a  $44 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  cuando se añade suero de leche de 43,65%. Además, se observa un rango óptimo de pH de 7. (Aksu & Tugba, 2005) indican que la concentración de lactosa en suero debe ser de  $13,2 \text{ g L}^{-1}$  para alcanzar una concentración máxima de carotenoides, sin embargo, la superficie de respuesta

del presente estudio indica que dicho valor debe ser de 20,2 g L<sup>-1</sup> de lactosa. La diferencia de concentraciones óptimas va a diferir entre microorganismos por sus rutas metabólicas, el tiempo de adaptación al medio alternativo y la duplicación celular. Estas diferencias se confieren a la capacidad de sintetizar metabolitos por parte de los microorganismos con el fin de romper azúcares y utilizarlos en sus ciclos metabólicos (Doran, 2013).

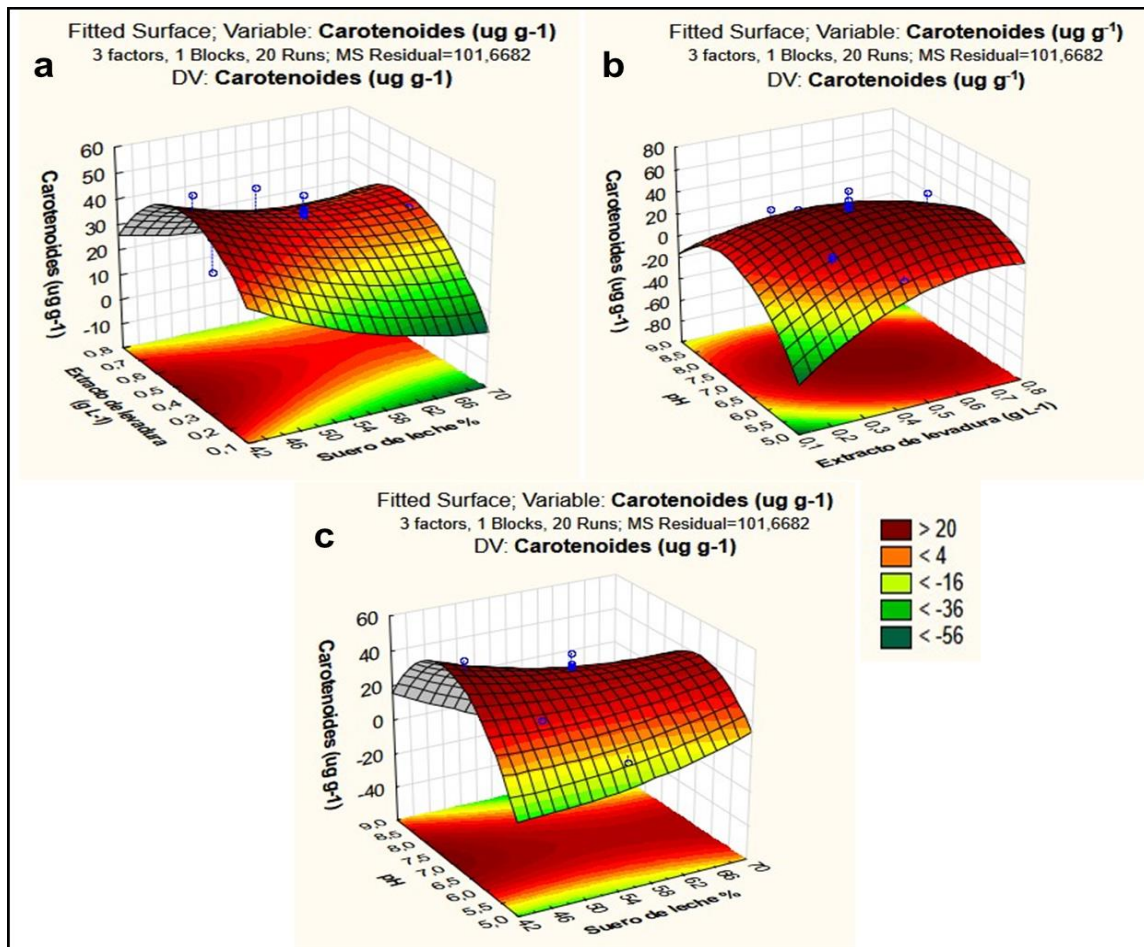


Figura 8. Diagrama de superficie de respuesta para la producción de carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). **a)** interacción extracto de levadura  $\text{g L}^{-1}$  y suero de leche %. **b)** interacción del pH y extracto de levadura  $\text{g L}^{-1}$ . **c)** interacción del pH y suero de leche %.

En la Figura 9 se puede evidenciar que al utilizar los valores óptimos de concentración de cada variable independiente que influyó significativamente en la producción de carotenoides, la única variable que influyó en el DCC fue el pH, en la Tabla 14 se muestra que el valor P de 0,0015 inferior a 0,05. Adicionalmente, se puede evidencia que el valor t de la variable de pH tiene un signo negativo (-); esto según (Montgomery, 2013) quiere decir que el factor tiene influencia negativa sobre la producción, por lo cual se debe tomar el valor mínimo de su concentración.

Debido a que factores como la fuente de carbono y pH podrían afectar la producción total de carotenoides en la cepa de *Rhodotorula mucilaginosa*, (Dhaliwal & Chandra,

2015) manifiestan que la optimización es un proceso importante para obtener las condiciones óptimas de cultivo.

En el estudio realizado por (Kanzky et al., 2015), señalan que la producción de carotenoides aumentó significativamente y alcanzó el nivel máximo a pH 6,6; se obtuvo una concentración máxima de  $469 \mu\text{g g}^{-1}$  para *R. glutinis*  $758 \mu\text{g g}^{-1}$  para *R. mucilaginosa* (Y 17485), además, se mostró que un aumento en el pH entre 6,6 - 7,2 dio como resultado una reducción insignificante en la concentración de carotenoides totales, mientras que en un rango de pH de 7,2 - 7,8 la cantidad de carotenoides disminuyó drásticamente. Esto difiere con los hallazgos de este estudio, dado que se observó que a pH 7, *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 produce una concentración máxima de carotenoides de  $55,748 \mu\text{g g}^{-1}$ , sin embargo, se observó un comportamiento de disminución similar en la formación de carotenoides de  $31,022 \mu\text{g g}^{-1}$  al usar un pH de 8.

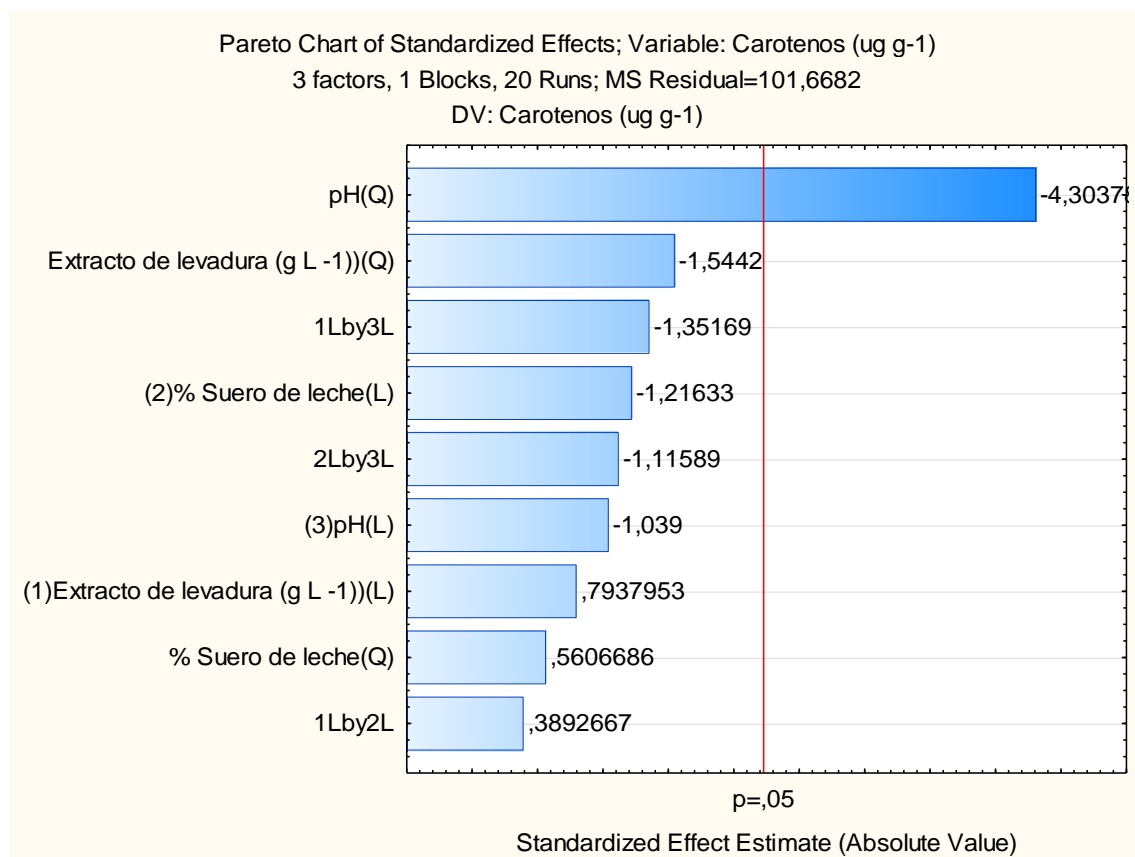


Figura 9. *Diagrama de Pareto de la concentración de carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) a escala de laboratorio*

#### 4.4.3 DCC concentración celular

La concentración celular está influenciada por factores estadísticamente significativos como el extracto de levadura, suero de leche y pH como se observa en la Tabla 15. Los valores P obtenidos para el extracto de levadura, el suero de leche y pH fueron menores que  $\alpha=0,05$ ; por lo cual se puede destacar que existió influencia de estos factores el crecimiento celular (Montgomery, 2013).

El  $R^2$  del análisis fue de 0,886; lo que indica que los datos se ajustan al modelo propuesto en un 88,6%. Los investigadores (Kim et al., 2014) describen que cuando se obtiene un valor del coeficiente de determinación  $R^2 > 0,75$ ; se puede decir que el diseño experimental es realizable.

Tabla 15.

*Análisis de varianza de las superficie de respuesta obtenida de la variable dependiente concentración celular.*

Factor	ANOVA; Var.:Concentración celular (g L-1); R-sqr=,88692; Adj:78514 (Spreadsheet8 biomasa) 3 factors, 1 Blocks, 20 Runs; MS Residual=,0088425 DV: Concentración celular (g L-1)				
	SS	df	MS	F	P
(1)Extracto de levadura (g L-1)(L)	0,002	1	0,002	0,219	0,649
	0,089354	1	0,089354	10,10511	0,009839

Extracto de levadura (g L <sup>-1</sup> )(Q)					
(2)Suero de leche %(L)	0,045976	1	0,045976	5,19946	0,045768
Suero de leche %(Q)	0,000470	1	0,000470	0,05319	0,822257
(3)pH(L)	0,012128	1	0,012128	1,37156	0,268694
pH(Q)	0,445754	1	0,445754	50,41056	0,000033
1L by 2L	0,000499	1	0,000499	0,05640	0,817082
1L by 3L	0,018297	1	0,018297	2,06919	0,180854
2L by 3L	0,012925	1	0,012925	1,46174	0,254463
Error	0,088425	10	0,008842		
Total SS	0,781934	19			

En la Figura 10a se muestra la relación entre el suero de leche y el extracto de levadura. La superficie de respuesta generada para estas dos variables muestra que al usar 43,65% (20,2 g L<sup>-1</sup> de lactosa) de suero de leche y 0,45 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura se obtiene una concentración máxima de biomasa de 4,179 g L<sup>-1</sup>. (Aksu & Tugba, 2005) mencionan que al usar 6 g L<sup>-1</sup> de lactosa obtuvo una concentración máxima de biomasa de *R. mucilaginosa* de 2,4 g L<sup>-1</sup>. A partir de esto se puede afirmar que concentraciones mayores de lactosa incrementan la concentración celular.

La superficie de respuesta generada para observar la interacción entre el pH y el extracto de levadura se observa en la Figura 10b. La máxima concentración celular

obtenida fue de 4,179 g L<sup>-1</sup> al usar 0,45 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura a pH 7. En el estudio realizado por (Aksu & Tugba, 2005) se puede identificar que a medida que incrementa el valor de pH en los ensayos, el crecimiento específico y las tasas de producción de carotenoides aumentaron, este nivel máximo se logró a pH 7,0; a pH más altos la concentración de biomasa disminuyó levemente; la máxima concentración celular obtenida en dicho estudio fue de 5.1 g L<sup>-1</sup>. Del mismo modo, (Voaides & Dima, 2011) señalan que el valor del pH del medio de crecimiento influye tanto en la actividad de biosíntesis del cultivo como en la tasa de crecimiento, es así que considera adecuado utilizar un pH inicial de 6,8 a 7,0 para maximizar la producción de biomasa y carotenoides a partir de *Rhodotorula*, lo que se corrobora con el presente estudio.

En la Figura 10c se muestra una superficie de respuesta que señala la relación existente entre el pH y el suero de leche en la concentración celular, que alcanza un valor de 4,179 g L<sup>-1</sup>. Los valores de los factores analizados son de 43,65% (20,2 g L<sup>-1</sup> de lactosa) para suero de leche y 7 de pH. El estudio realizado por (Aksu & Tugba, 2005) sugiere que la concentración óptima de suero de leche está entre un rango de 6,6 g L<sup>-1</sup> a 13,2 g L<sup>-1</sup>, con estos valores se obtuvieron concentraciones celulares máximas de *R. mucilaginosa* que oscilan entre 1,8 a 2,4 g L<sup>-1</sup>; al contrastar estos resultados con los obtenidos en este estudio se pudo asentar que al usar altas concentraciones de la fuente de carbono lactosa, se obtuvo una concentración celular más elevada. Por otro lado, (Dhaliwal & Chandra, 2015) señalan que durante la optimización de la producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC11835 se utilizó un pH de 6,5 para incrementar la concentración de biomasa y producto, dicho valor se asemeja al pH óptimo obtenido en este estudio.

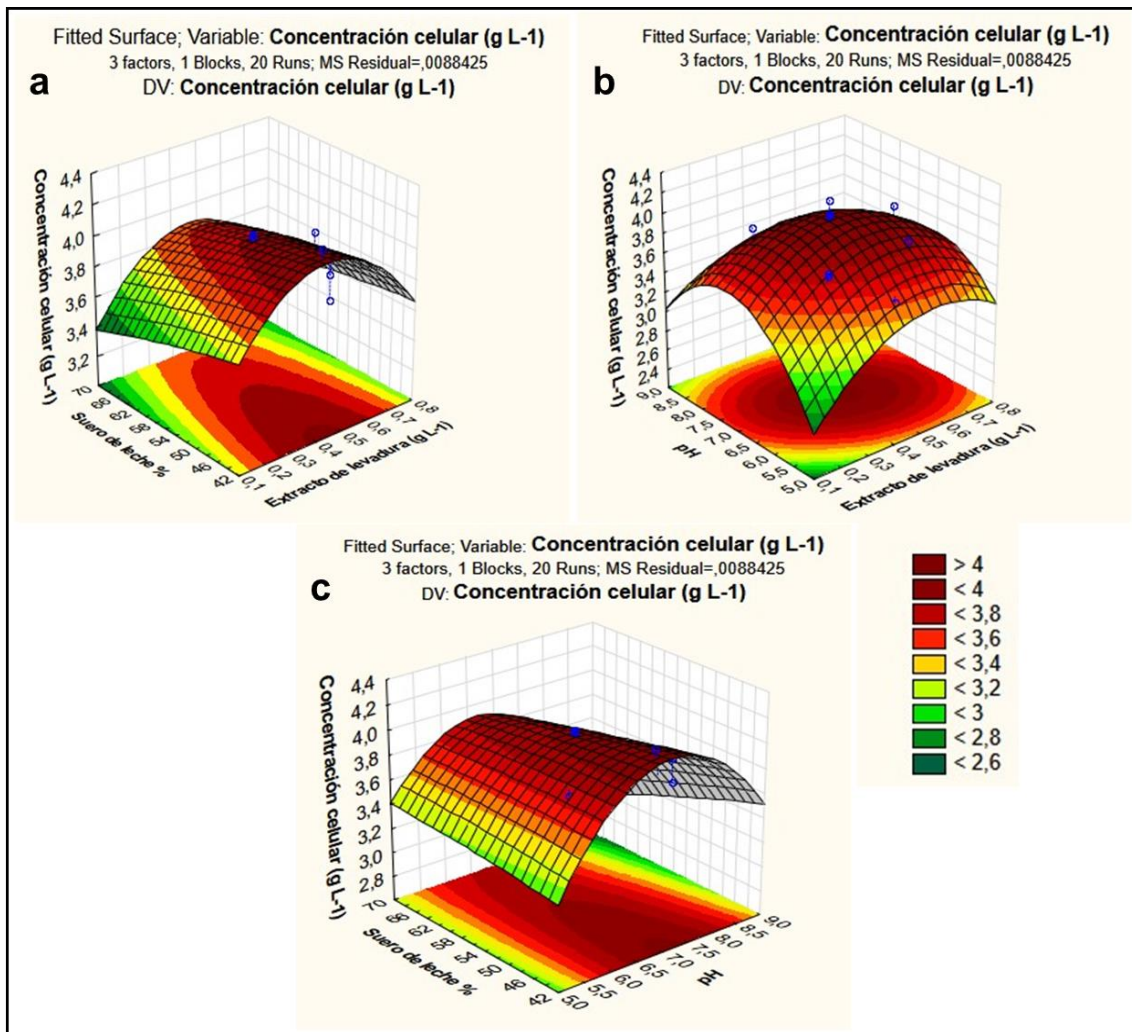


Figura 10. Diagrama de superficie de respuesta en durante el crecimiento celular (g L<sup>-1</sup>). **a)** interacción extracto de levadura g L<sup>-1</sup> y suero de leche. **b)** interacción del pH y extracto de levadura g L<sup>-1</sup>. **c)** interacción del pH y suero de leche %.

En la Figura 11 se muestra el diagrama de Pareto para evaluar las variables que tienen influencia en el crecimiento celular. Se puede observar que el pH, el extracto de levadura y el suero de leche tienen influencia sobre la formación de biomasa. (Maldonado et al., 2012) señalan que el extracto de levadura es una buena opción como fuente de nitrógeno tanto para la producción de carotenoides y formación celular, dado que estos tienen proporcionalidad directa, esto explica que este factor sea estadísticamente significativo en la concentración celular. Debido al aumento del azúcar residual en el medio, al costo energético celular y rendimiento del proceso, las concentraciones de la fuente de carbono no deben ser elevadas, en



este estudio se recomienda que sea de 43,65% (20,2 g L<sup>-1</sup> de lactosa). Por otro lado, (Aksu & Tugba, 2005) mencionan que el pH inicial de la fermentación afecta significativamente el crecimiento y las propiedades de producción de carotenoides totales de *R. mucilaginosa*, por lo cual se considera importante emplear el valor óptimo de este factor.

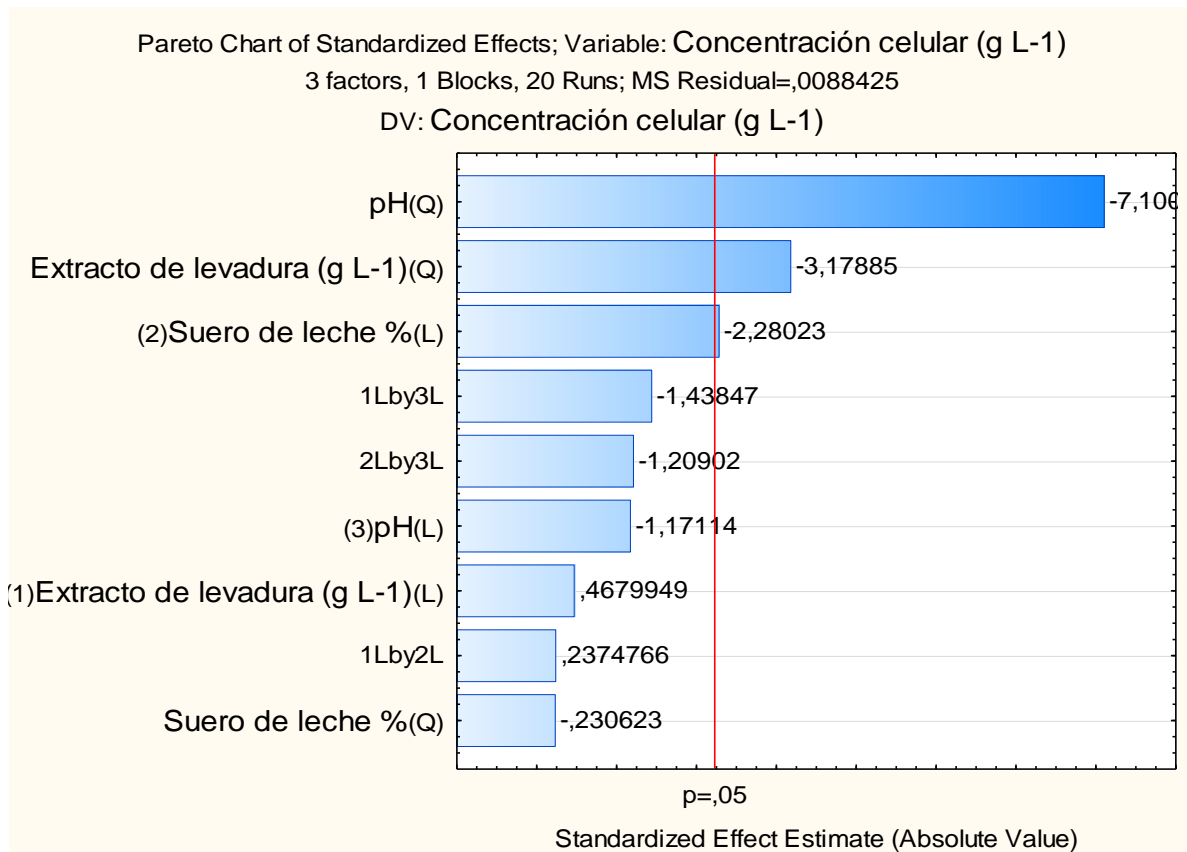


Figura 11. Diagrama de Pareto de la concentración celular g L<sup>-1</sup> a escala de laboratorio

#### 4.4.4 Valores óptimos para las variables de respuesta: producción de carotenoides y concentración celular

La ecuación de segundo orden utilizada para el DCC se expresa en la siguiente expresión:

$$Y = -760,193_0 + 363,135X_1 + 0,131X_2 - 209,834X_3 + 1,403X_1X_2 - 36,849X_1X_3 - 0,608X_2X_3 - 187,125X_1^2 + 0,027X_2^2 - 11,580X_3^2$$

Ecuación 17

Mediante el valor del coeficiente monomial obtenido de la regresión lineal aplicada a la Ecuación 16, se obtuvo que:  $X_1$  (pH) = -209,834.

A continuación, se derivó la Ecuación 17 con respecto a los factores independientes y se reemplazó en la siguiente expresión:

$$\text{Nivel: } \frac{\text{Valor no codificado} - \text{Valor central}}{\text{Salto}}$$

Ecuación 18

Los valores óptimos obtenidos para la producción de carotenoides y concentración celular se describen en la Tabla 16.

Tabla 16.

*Valores óptimos de las variables independiente para la producción de carotenoides y concentración celular.*

<b>Variable independiente</b>	<b>Variable dependiente</b>	<b>Valor óptimo</b>	<b>Unidades</b>
pH	Carotenoides	7	
Extracto de levadura		0,45	g L <sup>-1</sup>

Suero de leche	Concentración celular	43,65	%
pH		7	

#### 4.5 Cinética a escala de laboratorio

##### 4.5.1 Curva de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de producto

La relación del crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 con la formación intracelular de carotenoides se puede evidenciar en la Figura 12. Adicionalmente, se representa el consumo de lactosa durante la producción del biopigmento.

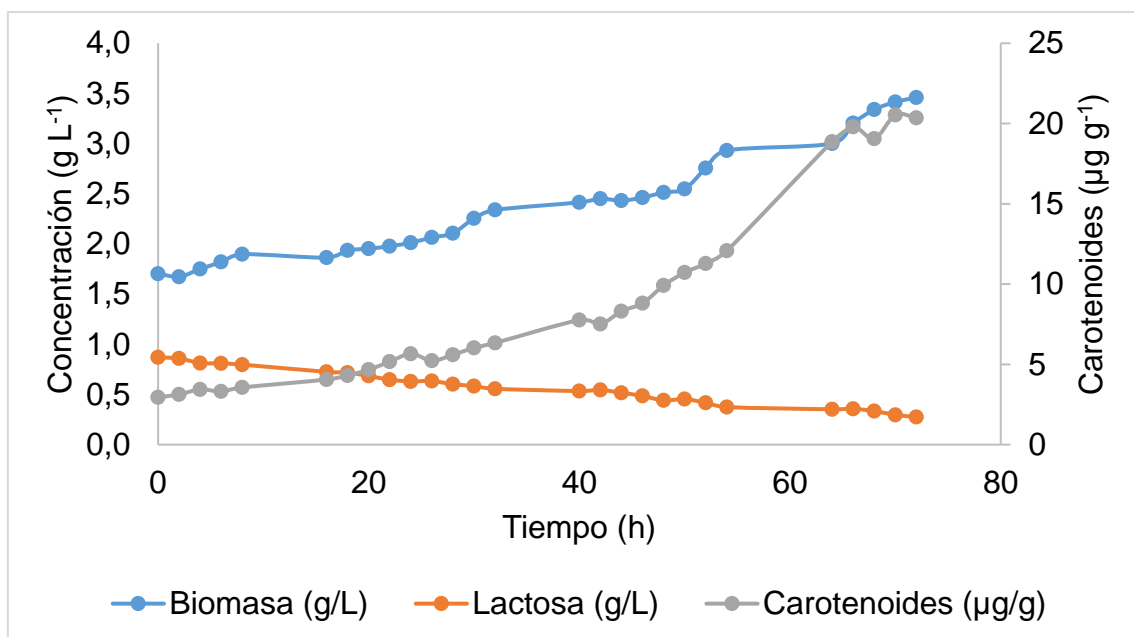


Figura 12. Curva de crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034, consumo de lactosa, producción de carotenoides a escala de laboratorio

La curva de crecimiento de la levadura que se realizó con la finalidad de conocer la cinética del microorganismo. La curva de crecimiento se realizó utilizando las variaciones de la Tabla 6 para la formulación del medio alternativo, además se

mantuvo a una temperatura de 30°C, 120 rpm por 72 h, de modo que sea posible identificar las etapas de crecimiento: fase de latencia, fase exponencial. A partir de esto se calcularon los parámetros cinéticos: velocidad volumétrica total de crecimiento, productividad horaria total, tiempo de duplicación y rendimientos prácticos, velocidad específica de crecimiento, velocidad volumétrica máxima de crecimiento (Doran, 2013).

Se puede observar que, en la curva de crecimiento celular, la fase de adaptación es relativamente larga puesto que duro 6 h como se muestra en la Figura 12. Según (Kanzky et al., 2015) esta fase de adaptación puede durar de 6 a 12 h, esto se debe a que no se produjo crecimiento celular por la suplementación directa de lactosa, lo que se corrobora con en el presente estudio. En contraste al crecimiento observado, *R. glutinis* muestra un comportamiento similar, también entra a una fase *lag* de 5-10 h (Aksu & Tuğba Eren, 2007). Adicionalmente, se evidencia que la producción de carotenoides coincide con el inicio del crecimiento exponencial de la biomasa.

(Kanzky et al., 2015) señalan que a la fase exponencial de *Rhodotorula mucilaginosa* puede durar alrededor de 120 h, lo cual muestra una fase exponencial muy larga y en donde se puede aprovechar la extracción de metabolitos de interés como los carotenoides. (Ferraio & Garg, 2012) muestran que la fase exponencial de *Rhodotorula graminis* RC04 dura únicamente 96 h, demostrando su baja productividad en contraste a la fase exponencial de *Rhodotorula mucilaginosa*. Además, en el estudio realizado por (Husseiny, Abdelhafez, Ali, & Sand, 2017) se puede determinar que *Rhodotorula glutinis* ATCC 4054 puede tener una fase exponencial de hasta 120 h, dicho valor es similar al lapso de la fase exponencial de *R. mucilaginosa*. Sin embargo, en este estudio se evaluó un tiempo de fermentación de 72 h, dentro de las cuales se pudieron determinar 56 h de fase exponencial.

Por otro lado, en la curva de crecimiento se pueden notar ciertas anomalías en el comportamiento, la fase exponencial muestra periodos de crecimiento rápidos y

retardados durante la división celular, específicamente en 32 - 50 h. Estos errores relativos pueden estar sujetos a parámetros inherentes del laboratorio y los equipos de incubación ya que son compartidos con otras investigaciones. De esta manera se interrumpen parámetros que deberían mantenerse continuos como la agitación, la oxigenación del medio de cultivo y la temperatura, así, limitando así el crecimiento (Doran, 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que la galactosa se acumula en el medio de cultivo, lo cual indica que la glucosa actúa el sustrato primordial para el crecimiento celular al usar suero de leche como fuente de carbono (Aguirre et al., 2010; Kanzy et al., 2015)

En la Figura 12 se puede observar el comportamiento de la formación de producto, la cual se encuentra asociada al crecimiento celular (Kanzy et al., 2015). Durante el período de 40 a 72 h se observó un crecimiento exponencial del contenido de carotenoides. La concentración máxima de producto se obtuvo al cabo de 72 h de  $20,537 \mu\text{g g}^{-1}$ . Este valor concuerda con la concentración máxima de crecimiento celular a esa hora, por lo cual en este estudio se asumió que el punto máximo sería en este lapso. No se observó una etapa estacionaria, puesto que (Kanzy et al., 2015) mencionan que la fase estacionaria en una cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* inicia a las 120 h de fermentación y puede durar hasta las 168 h, en este trabajo la fermentación duró únicamente 72 h.

## **4.6 Cinética a escala de biorreactor**

### **4.6.1 Curva de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de producto**

En la Figura 13 se puede visualizar la cinética del microorganismo durante una fermentación en biorreactor para la producción de carotenoides. Se pueden denotar que a medida que la concentración celular incrementa, la concentración de producto también lo hace y al mismo tiempo disminuye la cantidad de lactosa.

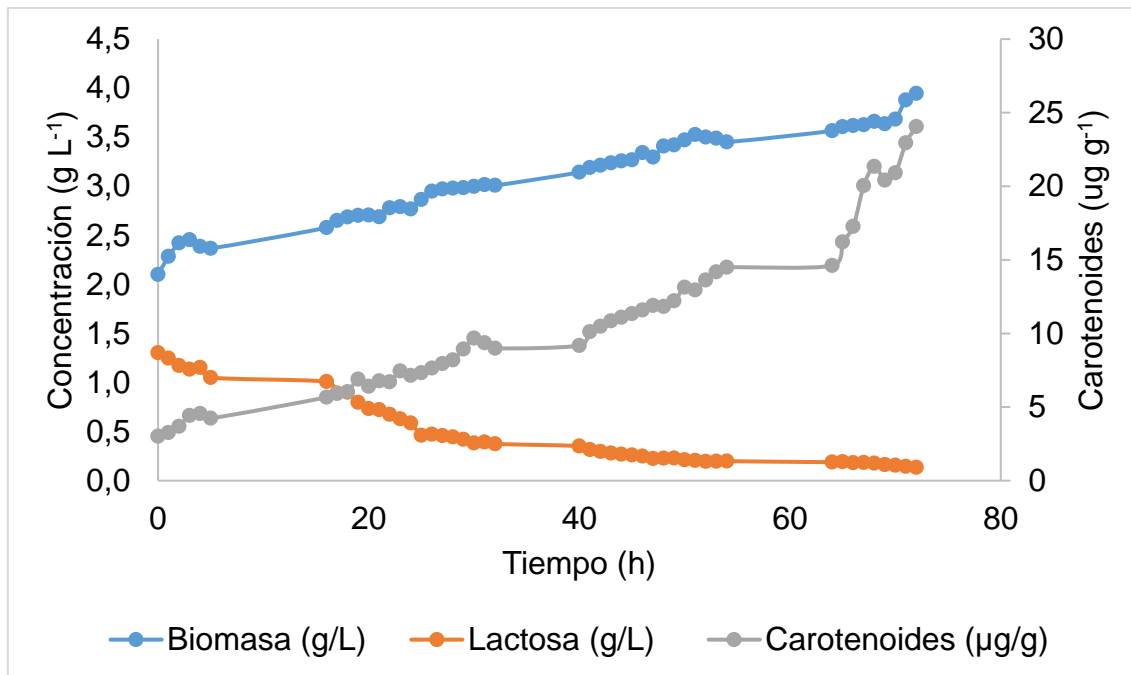


Figura 13. Curva de crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034, consumo de lactosa, producción de carotenoides a escala de banco

La curva de crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 que se muestra en la Figura 13 se realizó una vez obtenidos los valores óptimos de las variables que estadísticamente influyentes en la producción del biopigmento. Adicionalmente se pudo determinar la cinética de la levadura. La curva de crecimiento se realizó utilizando las variaciones de la Tabla 15 para la formulación del medio alternativo, además se mantuvo a una temperatura de 30°C, 120 rpm por 72 h. Durante este periodo de tiempo fue posible identificar las etapas de crecimiento: fase de latencia, fase exponencial. A partir de esto se calcularon los parámetros cinéticos (Doran, 2013; Dutta, 2008), tales como: velocidad específica de crecimiento, velocidad volumétrica máxima de crecimiento, velocidad volumétrica total de crecimiento, productividad horaria total, tiempo de duplicación y rendimientos prácticos.

Se puede observar que, en la curva de crecimiento celular, la fase de adaptación duró 5 h como se muestra en la Figura 13. Se conoce que la fase *lag* de adaptación del microorganismo puede durar de 6 a 12 h (Kanzky et al., 2015), esto se debe a

que el crecimiento celular no se relaciona directamente con la suplementación de la concentración de lactosa del suero de leche, lo que se corrobora con el presente estudio. Por otro lado, *R. glutinis* muestra un comportamiento similar durante la producción de carotenoides, entra a una fase *lag* de 5-10 h (Aksu & Tuğba Eren, 2007). En este trabajo de investigación se identificó que desde las 16 hasta las 72 h se observó un crecimiento exponencial de crecimiento celular.

Un estudio anterior realizado por (El-banna et al., 2012) describe que la **producción de carotenoides** por *R. glutinis* comenzó después del final de la fase de crecimiento exponencial y luego aumentó durante la fase estacionaria para alcanzar su máximo al cabo de 72 h, a pesar de que en esta investigación no se evidencio una fase estacionaria, el valor máximo de **concentración celular** de 3,94 g L<sup>-1</sup> también se obtuvo a las 72 h.

Adicionalmente, se puede observar la curva de formación de producto, la cual se encuentra asociada al crecimiento celular (Kanzky et al., 2015). Durante el período de 40 a 72 h se observó un crecimiento exponencial del contenido de carotenoides. La concentración máxima de producto (62,165 µg g<sup>-1</sup>) se obtuvo al cabo de 72 h.

En el desarrollo de esta investigación no se observó una etapa estacionaria debido a que al cabo de las 72 h de fermentación se continuó evidenciando un comportamiento exponencial, esto se explica con el estudio realizado por (Kanzky et al., 2015), el cual revela que una cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* alcanza la máxima concentración de producto en su fase exponencial al cabo de las 120 h, la fase exponencial inicia después de este lapso de tiempo y podría durar hasta 7 días, por esta razón no se identificó la fase estacionaria. Por otro lado, (Marova et al., 2012) señalan que la producción máxima de carotenoides por *R. glutinis* se obtuvo después de 80 h mientras que (Aksu & Tugba, 2005) mencionan que este valor se alcanza después de 240 h. Las diferencias entre los intervalos de tiempo de crecimiento en cada fase se atribuyen al metabolismo de cada microorganismo y a su adaptación a las condiciones de cultivo (Dutta, 2008).

#### 4.7 Análisis de parámetros cinéticos

Se pueden definir a los parámetros cinéticos como una herramienta para poner en práctica procesos biotecnológicos, los cuales son previamente evaluados a escala de laboratorio, su importancia deriva en que permite desarrollar fermentaciones para generar productos y a la par evaluar el rendimientos y productividad que tiene dicho procesos (Doran, 2013).

Al comparar los parámetros cinéticos obtenidos a escala de laboratorio y a escala de banco, se pueden observar diferencias en cuanto a los parámetros cinéticos. En la Tabla 16 se puede observar que la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en el biorreactor fue menor en un 66% en comparación con la ( $\mu$ ) de matraz, lo cual explica porque la concentración celular a esta escala fue menor, dado que el crecimiento se encuentra asociado a la producción de biomasa, la formación de producto en biorreactor fue superior a la de escala de laboratorio en un 35%, como se muestra en la Tabla 17.

Del mismo modo la productividad máxima y global del crecimiento celular incrementó en un 33,7% y 37% respectivamente, respecto a las obtenidas a escala de laboratorio. Esto se explica mediante la curva de crecimiento de la Figura 13, en la cual se pudo evidenciar que el crecimiento celular en biorreactor sucede en menor tiempo y a mayor concentración (Dutta, 2008; Monod, 1958); (Doran, 2013) señala que esto se debe a que las condiciones de cultivo como: temperatura, pH, aireación, agitación se encuentran automatizadas; lo cual significa un mayor control sobre la fermentación, esto favorece que el proceso de división celular se de en un lapso menor. En el estudio desarrollado por (Park, Cho, Kim, & Chu, 2005) señalan que la productividad máxima para *R. glutinis* fue de 6,3 g L<sup>-1</sup> durante 120 h mientras que en este estudio se obtuvo una concentración máxima celular de 3,945 g L<sup>-1</sup> a las 72 h de la fermentación en biorreactor, por lo que se puede deducir que el valor obtenido es considerablemente aceptable. Por otro lado, (Buzzini & Martini, 1999)



mencionan que al cabo de 72 h de la formación de carotenoides, una cepa de *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 alcanza una productividad máxima de crecimiento de  $0,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y una productividad horaria total de  $0,26 \text{ g d}^{-1}$ ., mientras que en este trabajo experimental para la producción de carotenoides mediante *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034 presenta una productividad máxima de crecimiento de  $0,270 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y una productividad horaria total de  $0,0922 \text{ g h}^{-1}$  como se detalla en la Tabla 17, este efecto ocurre debido a la diferencia de los medios de cultivo utilizados para la formación del biopigmento, para el estudio de (Buzzini & Martini, 1999) se usó un medio mixto suplementado con sustratos químicos mientras que para esta investigación se utilizó un medio alternativo, el cual reemplazó la fuente de carbono comercial por un residuo agroindustrial. La adaptación a esta fuente de carbono pudo repercutir en la disminución del crecimiento y formación de producto, rendimiento y productividad (Doran, 2013; Dutta, 2008).

(Marova et al., 2012) afirma que el rendimiento de carotenoides está directamente relacionado con el rendimiento total de biomasa, por lo cual, para mantener altas tasas de crecimiento y una alta eficiencia de flujo de la fuente de carbono para crear condiciones óptimas de cultivo, es importante lograr la máxima productividad del pigmento. En el estudio desarrollado por (Aksu & Tugba, 2005) se obtuvo un rendimiento biomasa/sustrato de  $0,36 \text{ g g}^{-1}$  y un rendimiento producto/biomasa de  $0,21 \text{ g g}^{-1}$  para *R. mucilaginosa*. En la Tabla 17 se observa que el rendimiento biomasa/sustrato es de  $0,14 \text{ g g}^{-1}$  y un rendimiento producto/biomasa de  $0,24 \text{ g g}^{-1}$  para *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 66034. Los hallazgos de ambos estudios permiten identificar que la diferencia de cepas tiene influencia sobre el rendimiento obtenido durante la producción de carotenoides, además, también interviene la rapidez de adaptación de cada microorganismo a los condiciones de cultivo (Doran, 2013; Mata et al., 2018)

Luego de comparar con los resultados obtenidos con investigaciones utilizando otras cepas de levaduras anteriormente descritas, la productividad de carotenoides de la *Rhodotorula mucilaginosa* también sugiere un proceso factible, por lo cual se

puede decir que la levadura *R. mucilaginosa* será uno de los microorganismos promisorios para la producción de carotenoides mediante el uso de desechos agrícolas (Buzzini & Martini, 1999; Marova et al., 2012).

Tabla 17.

*Valores calculados de los parámetros cinéticos para la producción de carotenoides a escala de laboratorio y biorreactor*

	Parámetro	Abreviatura	Escala Laboratorio	Escala Biorreactor	Unidades
Cinética de crecimiento celular	Velocidad específica de crecimiento	$\mu$	0,13417	0,08936	$h^{-1}$
	Velocidad volumétrica máxima de crecimiento	$r_x \frac{dx}{dt}$	0,009120	0,02706	$g L^{-1} h^{-1}$
	Velocidad volumétrica total de crecimiento	$r_x \frac{dx}{dt}$	0,0085402	0,02306	$g L^{-1} h^{-1}$
	Productividad horaria total	$r_x \cdot V$	0,17512	0,09224	$g h^{-1}$
	Tiempo de duplicación	$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$	13,52182	7,75988	h
Cinética de consumo de sustrato	Velocidad volumétrica máxima de consumo de sustrato	$r_s = \frac{ds}{dt}$	0,008231	0,02294	$g L^{-1} h^{-1}$
	Velocidad específica a las 72 h fermentación	$q_s = \frac{ds}{dt} * \frac{1}{x}$	0,01711	0,05814	$h^{-1}$
Cinética de formación de producto	Velocidad volumétrica máxima de producto	$r_p = \frac{dp}{dt}$	0,26104	0,73605	$g L^{-1} h^{-1}$
	Velocidad volumétrica total de producto	$r_p = \frac{dp}{dt}$	0,52781	0,91384	$g L^{-1} h^{-1}$
	Velocidad horaria total	$r_p \cdot V$	0,12119	0,36553	$g^{-1} h^{-1}$

	Velocidad específica máxima de producción	$qp = \frac{dp}{dt} * \frac{1}{x}$	0,00979	0,02341	$h^{-1}$
Rendimientos prácticos	Rendimiento biomasa/ sustrato	$Y \frac{x}{s}$	0,09	0,14	$g g^{-1}$
	Rendimiento producto/ sustrato	$Y \frac{p}{s}$	0,17	0,38	$g g^{-1}$
	Rendimiento producto/ biomasa	$Y \frac{p}{x}$	0,09	0,24	$g g^{-1}$

## 5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

Al comparar sustratos de residuos agroindustriales como la melaza y el suero de leche se concluyó que el suero de leche permite una mayor generación de carotenoides y concentración celular al cabo de 72 h.

Mediante el análisis del diseño Plackett-Burman se determinó que las variables más influyentes durante la producción de carotenoides y concentración celular son el extracto de levadura, suero de leche y pH; lo cual se contrastó con revisión bibliográfica. Sin embargo, se evidenció que la suplementación de sales y el control de parámetros como la agitación y temperatura es indispensable.

El Diseño Central Compuesto y el análisis del gráfico de superficie de respuesta indicaron que los valores óptimos de los factores significativos para la concentración celular producción de carotenoides fueron: 4,5 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura; 43,65 % de suero de leche y 7 de pH.

El cálculo de los parámetros cinéticos a escala de biorreactor permitió evidenciar que, al utilizar factores optimizados en el medio de fermentación permite una velocidad volumétrica máxima de crecimiento de 0,02706 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y una velocidad volumétrica máxima de formación de producto de 0,73605 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Del mismo modo, la productividad biomasa/sustrato; producto/sustrato; producto/biomasa incrementó en un 64%; 44%; 37% respectivamente.

Se evidencio que la formación de producto se encuentra asociada al crecimiento celular.

## 5.2 Recomendaciones

Para futuras investigaciones se podría utilizar un sistema tipo *continuo o semi-alimentado* para evaluar si la productividad máxima de crecimiento celular y de formación de producto incrementa al utilizar los valores optimizados.

Se recomienda probar nuevas alternativas de fuentes de carbono y diferentes sales para optimizar la producción de carotenoides, así como diferentes valores de concentración.

En una etapa posterior a la optimización de la generación de carotenoides se recomienda aplicar un bioproceso *aguas abajo* como la purificación del biopigmento.

## Referencias:

- Agboyibor, C., Kong, W., Chen, D., Zhang, A., & Niu, S. (2018). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Monascus pigments production , composition , bioactivity and its application : A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 433–447. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.012>
- Aguirre, E., Aguilar, J., Ramírez, A., & Alvarez, M. (2010). Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei* ) in goat milk whey: Comparison of batch , continuous and fed-batch cultures. *Bioresource Technology*, 101(8), 2837–2844. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.047>
- Aksu, Z., & Tugba, A. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* : Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 40, 2985–2991. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.011>
- Aksu, Z., & Tuğba Eren, A. (2007). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 40(9), 2985–2991. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.011>
- Almeida, N., Diaz, R., Dos Santos, C., Veiga, C., & Fernandes de Medeiros, J. (2017). Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporodiobolus pararoseus* and *Rhodothorula mucilaginosa*. *Food Sci Biotechnol*, 26, 759–766. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0098-y>
- Asker, D., & Ohta, Y. (2002). *Haloferax alexandrinus* sp . nov ., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria ( Egypt ). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 729–738. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.01999-0>
- Banzatto, D., De Freitas, L., & Mutton, M. (2013). Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. *ISSN 0101-2061 Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2012, 14–18. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000500003>
- Bhosale, P., & Gadre, R. (2001). Optimization of carotenoid production from hyper-

- producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. *Applied Microbiology*, 12–16.
- Buzzini, P., & Martini, A. (1999). Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin, 71, 6–9.
- Cardoso, L., Feitosa, K., & Karp, S. (2017). Microbial production of carotenoids – A review. *African Journal of Biotechnology*, 16(January). <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15763>
- Cardoso, L., Jäckel, S., Karp, S. G., Framboisier, X., Chevalot, I., & Marc, I. (2020). Bioresource Technology Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol. *BIORESOURTECHNOLOGY*, 200(2016), 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.108>
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding Molecules to Food , Pros and Cons : A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Institute Of Food Technologists*, 13, 377–399. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>
- D'Alessandro, E., & Antoniosi, N. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 832–841. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>
- De Carvalho, J. C., Cardoso, L., Ghiggi, V., Lorenci, A., Porto de Souza, L., & Soccol, C. R. (2014). Microbial Pigments. In *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals* (pp. 73–73). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1>
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O., & Francis, F. J. (2000). *Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 40). <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>
- Delgado, F., Jiménez, A., & Paredes, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains. Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 173–180.

<https://doi.org/10.1080/10408690091189257>

- Dhaliwal, M., & Chandra, N. (2015). Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula Mucilaginosa*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(3), 1161–1165. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(3\).1161-65](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(3).1161-65)
- Dias, B., Weingart, D., & Zarur, M. (2011). Technological Aspects of  $\beta$  -Carotene Production. *Food Bioprocess Technol*, 4, 693–701. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0545-3>
- Doran, P. M. (2013). *Bioprocess Engineering Principles* (2nd ed.). Elsevier.
- Durakli, S., & Tirpanci, G. (2018). Optimizing  $\beta$ -carotene Production by *Blakeslea trispora* using bug damaged wheat. *Pigment & Resin Technology*, 47(May), 189–195. <https://doi.org/10.1108/PRT-05-2017-0055>
- Dutta, R. (2008). *Fundamentals of Biochemical Engineering*. Ane Books India.
- El-banna, A. A., El-razek, A. M. A., & El-mahdy, A. R. (2012). Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var . *glutinis*. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 64–71. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/fns.2012.31011> Published
- Elaziz, A., Hanini, S., Kasbadji, N., & Tassalit, D. (2016). Using Central Composite Experimental Design to Optimize the Degradation of Tylosin from Aqueous Solution by Photo-Fenton Reaction. *Materials*, 4–11. <https://doi.org/10.3390/ma9060428>
- Elsanhoty, R., Al-Turki, A., & Abd El-Razik, M. (2017). Production of carotenoids from *rhodotorula mucilaginosa* and their applications as colorant agent in sweet candy. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 15(2), 21–26.
- Elsanhoty, R., Al-Turki, A., & El-razik, M. (2017). Production of carotenoids from *rhodotorula mucilaginosa* and their applications as colorant agent in sweet candy. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 15(May), 21–26.
- Farzianpour, F., Jahead, G., Younesian, M., Banaei, B., & Sadeghi, M. (2014). Evaluation of food color consumption and determining color evaluation of food



- color consumption and determining color. *American Journal of Applied Sciences*, 10(July), 172–178. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2013.172.178>
- Ferrao, M., & Garg, S. (2012). Shake flask optimization of  $\beta$  -carotene production in *Rhodotorula graminis* RC04, 11(52), 11431–11437. <https://doi.org/10.5897/AJB12.421>
- Husseiny, S. M., Abdelhafez, A. A., Ali, A. A., & Ali, A. A. (2017). Optimization of b - Carotene Production from *Rhodotorula glutinis* ATCC 4054 Growing on Agro-industrial Substrate Using Plackett – Burman Design. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0908-2>
- Husseiny, S. M., Abdelhafez, A. A., Ali, A., & Sand, H. M. (2017). Optimization of  $\beta$  -Carotene Production from *Rhodotorula glutinis* ATCC 4054 Growing on Agro-industrial Substrate Using Plackett – Burman Design Optimization of b - Carotene Production from *Rhodotorula glutinis* ATCC 4054 Growing on Agro-industrial Substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0908-2>
- Janiszewska, E., Pisarska, A., & Królczyk, J. (2016). Natural food pigments application in food products. *Nauka Przyroda Technologie*, 51(December), 1–11. <https://doi.org/10.17306/J.NPT.2016.4.51>
- John, P. C. S., Crowley, M. F., & Bomble, Y. J. (2016). Efficient estimation of the maximum metabolic productivity of batch systems. *ArXiv*, 1–18.
- Kanzy, H., Nasr, N., El-shazly, H., & Barakat, O. (2015). Optimization of Carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(1), 456–469.
- Kim, H., Choi, J., & Han, S. J. (2014). ptimization of Medium for Carotenoids Production by *Arthrobacter* sp . PAMC 25486 Using Response Surface Methodology. *Korean Chem*, 52(6), 834–839.
- Kovárová-Kovar, K., & Egli, T. (1998). Growth Kinetics of Suspended Microbial

- Cells : From Single- Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62(3), 646–666.
- Maldonado, I., Rodriguez, D., & Scamparini, A. (2012). Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 109–115.
- Mapari, S. A. S., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., Meyer, A. S., & Thrane, U. (2005). Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.03.004>
- Marova, I., Carnecka, M., Halienova, A., Certik, M., Dvorakova, T., & Haronikova, A. (2012). Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, 95, S338–S342. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.018>
- Masetto, A., Flores-cotera, L., Díaz, C., Langley, E., & Sanchez, S. (2001). Application of a Complete Factorial Design for the Production of Zeaxanthin by *Flavobacterium* sp. *Bioscience and Bioengineering*, 92(1), 55–58.
- Mata, L., Montañez, J., Méndez, A., & Aguilar, C. (2018). Biotechnological production of carotenoids by yeasts : an overview. *Microbial Cell Factories*, 13, 1–11. Retrieved from <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/12%0APage>
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. In *Analytical Chemistry* (pp. 426–428).
- Monod, J. (1958). *Recherches Sur la croissance des cultures bactériennes: thèse de 1942* (2ème éd.). Hermann, Paris.
- Montgomery, D. C. (2013). *Design and Analysis of Experiments Eighth Edition* (8th ed.). John Wiley & Sons.
- Mukherjee, G., & Singh, S. K. (2011). Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 46(1), 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.006>

- Mussagy, C. U., Winterburn, J., & Carvalho, V. (2018). Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (Yabuzaki 2017). <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9557-5>
- Park, P. K., Cho, D. H., Kim, E. Y., & Chu, K. H. (2005). Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design, 429–434. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-1891-3>
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management : A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- Sabra, W. (2014). Mixed Microbial Cultures for Industrial Biotechnology : Success, Chance and Challenges. In *Microbial Community and Biochemical Diversity* (pp. 200–210). Pan Stanford.
- Seifi, Z., Zarei Mahmoudabadi, A., & Hydrinia, S. (2013). Isolation, identification and susceptibility profile of *rhodotorula* species isolated from two educational hospitals in Ahvaz. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(6). <https://doi.org/10.5812/jjm.8935>
- Silva Fernandes, A., Casagrande, T., Jacob-Lopes, E., De Rosso, V., Zepka, L. (2018). Introductory Chapter: Carotenoids - A Brief Overview on Its Structure, Biosynthesis, Synthesis, and Applications. 10.5772/intechopen.79542.
- Spolaore, P., Joannis-cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Sy, C., Dangles, O., Borel, P., & Caris-veyrat, C. (2015). Stability of bacterial carotenoids in the presence of iron in a model of the gastric compartment – Comparison with dietary reference carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 572, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.030>
- Tuli, H., Chaudhary, P., Beniwal, V., & Sharma, A. (2014). Microbial pigments as natural color sources : current trends and future perspectives. *J Food Sci Technol*, 52(August), 4669–4678. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1601-6>

- Voaides, C., & Dima, R. (2011). Effect of carbon source on carotenoid production by *Rhodotorula* sp ., 75–83.
- Wang, B., Lin, L., Lu, L., & Chen, W. (2012). Optimization of  $\beta$  -carotene production by a newly isolated *Serratia marcescens* strain. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15. <https://doi.org/10.2225/vol15-issue6-fulltext-4>
- Wellenbeck, W., Mampel, J., Naumer, C., Knepper, A., & Neubauer, P. (2017). Fast-track development of a lactase production process with *Kluyveromyces lactis* by a progressive parameter-control workflow. *Engineering in Life Sciences*, 1185–1194. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600031>
- Xian, W., Carvajal-Zarrabal, O., Nolasco-Hipólito, C., Kohei, M., Gregory, Z. A. A., Abdullah, M. O., ... Lihan, S. (2018). Production of pigments by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 14(2), 344–350. <https://doi.org/10.21161/mjm.144188>
- Xu, Y., Ibrahim, I., Wosu, C., Ben-Amotz, A., & Harvey, P. J. (2018). Potential of New Isolates of *Dunaliella Salina* for Natural  $\beta$  -Carotene Production. *Biology*, 1–18. <https://doi.org/10.3390/biology7010014>
- Yadav, J., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: a potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>

