Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

"MONITOREO DEL ESTADO FISIOLÓGICO DE LA LEVADURA *Xanthophyllomyces dendrorhous* DURANTE LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA POR MEDIO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ANÁLISIS DE IMÁGENES"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA PRODUCTIVA

PRESENTA

I.Q. ALLAN FRANCISCO SÁNCHEZ ORTIZ

Guadalajara, Jalisco, Febrero de 2015

CIENCIA Y TECNOLOGIA

Guadalajara, Jalisco, a 20 de Febrero de 2015

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **Allan Francisco Sánchez Ortiz**, una vez leída y revisada la Tesis titulada "MONITOREO DEL ESTADO FISIOLÓGICO DE LA LEVADURA *Xanthophyllomyces dendrorhous DURANTE LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ANÁLISIS DE IMÁGENES*" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Biotecnología Productiva durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 20 del mes de Febrero del año 2015

_____
Dr. Enrique Jaime Herrera López
Tutor

_____
Dra. Anne Christine Gschaedler Mathis
Tutor en Planta

_____
Dr. Jesús Cervantes Martínez
Asesor

CIENCIA Y TECNOLOGIA

Guadalajara, Jalisco a 20 de Febrero de 2015

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **Allan Francisco Sánchez Ortiz**, una vez leída y revisada la Tesis titulada "MONITOREO DEL ESTADO FISIOLÓGICO DE LA LEVADURA *Xanthophyllomyces dendrorhous DURANTE LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ANÁLISIS DE IMÁGENES*" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Biotecnología Productiva durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 20 del mes de Febrero del año 2015

_____
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga
Presidente

_____
Dr. Melchor Arellano Plaza
Secretario

_____
Dr. Enrique Jaime Herrera López
Vocal

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), bajo la dirección científica del Dr. Enrique Jaime Herrera López, al cual quiero agradecer su paciencia, sencillez y calidad humana. Agradezco infinitamente la oportunidad que me brindó de formar parte de su equipo de trabajo y por su apoyo para que esta tesis pudiera realizarse.

Además quiero agradecer a la Dra. Anne Christine Gschaedler Mathis y al Dr. Jesús Cervantes Martínez por sus acertados consejos y por haber contribuido a mi formación académica y científica. Así como a los miembros del jurado, por el tiempo dedicado a la lectura y corrección de este trabajo de investigación: al Dr. Melchor Arellano Plaza y a la Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga.

A las personas que forman parte fundamental e invaluable de mi vida. A mis padres Francisco y Carmen, por su amor, cariño y compresión. A mis hermanas Marysol y Cassandra, por estar siempre conmigo y por soportarme.

A mis amigos, Javier, Daniel y Mariana, por su amistad, por su apoyo incondicional tanto personal como profesional, gracias por sus consejos y por tantos momentos de risa y júbilo, indispensables para lidiar con los momentos complicados. A mis compañeros y profesores de la unidad de Biotecnología Industrial, gracias por su contribución a mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por el financiamiento de mis estudios de maestría, beca 283294.

Índice de Contenido

Agradecimientos……..4
Índice de Contenido……5
Índice de Tablas……...7
Índice de Figuras……..8
Resumen……12
Abstract……..13
Introducción……...14
1. Antecedentes……..16
1.1 Astaxantina……16
1.1.1 Fuentes de obtención de astaxantina……17
1.1.1.1 Astaxantina por vía química sintética……..17
1.1.1.2 Astaxantina de fuentes naturales……..17
1.2 *Xanthophyllomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma)*……19
1.2.1 Factores que influyen en el crecimiento y pigmentación de *Xanthophyllomyces dendrorhous*……...22
1.2.1.1 Influencia de la fuente de carbono……22
1.2.1.2 Influencia de la luz……23
1.2.1.3 Influencia del pH……24
1.2.1.4 Influencia de la temperatura……...24
1.2.1.5 Influencia de la aireación……...24
1.2.1.6 Efecto de los iones metálicos en la producción de astaxantina……25
1.2.1.7 Efecto de otros nutrientes en la producción de carotenoides……26
1.2.2 Sistema de producción de astaxantina con la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*……...27
1.2.2.1 Fermentación por lote……27
1.2.2.2 Fermentación por lote alimentado……28
1.2.2.3 Fermentación en continuo……..28
1.3 Monitoreo de bioprocesos……..30
1.4 Estado fisiológico……...31
1.5 Técnicas utilizadas para el monitoreo de la fisiología celular……...33
1.5.1 Espectroscopía dieléctrica……34
1.5.2 Microscopía de fluorescencia……...36
1.5.3 Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®)……38
1.5.4 Microscopía o análisis de imágenes……40
1.5.5 Espectroscopía Raman……..41
1.5.6 Análisis de sensibilidad paramétrica……42
2. Objetivos……44
2.1 Objetivo general……44
2.2 Objetivos específicos……44
3. Hipótesis……44
4. Materiales y métodos……45
4.1 Microorganismo……45
4.2 Medio de cultivo……...46
4.3 Cultivos realizados a nivel matraz……47

4.3.1 Preparación del inóculo……47
4.3.2 Preparación de materiales……48
4.4 Cultivos realizados a nivel biorreactor……48
4.4.1 Preparación del inóculo……48
4.4.2 Preparación de materiales e instrumentación……...49
4.5 Técnicas analíticas……51
4.5.1 Crecimiento celular……..51
4.5.2 Cuantificación de azúcares……..52
4.5.3 Cuantificación de carotenoides totales……54
4.5.4 Viabilidad celular……55
4.5.5 Tamaño y volumen celular……...57
4.5.6 Detección de astaxantina por espectroscopía Raman……..58
4.5.7 Análisis de sensibilidad paramétrica……58
4.5.7.1 Modelo cinético por lote……...60
4.5.7.2 Modelo cinético por lote alimentado……60
4.5.7.3 Procedimiento matemático……61
5. Resultados y discusiones……...66
5.1 Análisis de sensibilidad paramétrica……66
5.1.2 Modelo cinético por lote……..66
5.1.3 Modelo cinético por lote alimentado……...67
5.2 Cultivos realizados a nivel matraz……69
5.2.1 Crecimiento celular……..69
5.2.2 Cuantificación de azúcares……..71
5.2.3 Cuantificación de carotenoides totales……71
5.2.4 Viabilidad celular……72
5.2.5 Tamaño y volumen celular……..75
5.2.6 Detección de astaxantina por espectroscopía Raman……..80
5.3 Cultivos realizados a nivel biorreactor……83
5.3.1 Crecimiento celular……..83
5.3.2 Cuantificación de azúcares……...85
5.3.3 Cuantificación de carotenoides totales……86
5.3.4 Viabilidad celular……..…86
5.3.5 Tamaño y volumen celular……91
5.3.6 Detección de astaxantina por espectroscopía Raman……...98
6. Conclusiones……103
7. Perspectivas……..104
8. Referencias Bibliográficas……...105
9. Anexos……111

Índice de Tablas

Tabla 1. Desechos industriales utilizados como fuente de carbono para la producción de astaxantina con diferentes cepas de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous.*

Tabla 2. Diferentes estrategias para la producción de astaxantina con diferentes cepas de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous.*

Tabla 3. Compuestos que conforman el medio de cultivo químicamente definido utilizado en la experimentación de este trabajo de tesis.

Tabla 4. Reactivos y concentraciones utilizados en la preparación del DNS.

Tabla 5. Nomenclatura usada en el desarrollo del análisis de sensibilidad paramétrica.

Tabla 6. Variables y parámetros estudiados en el análisis de sensibilidad paramétrica.

Tabla 7. Valores numéricos para los parámetros estudiados en el análisis de sensibilidad paramétrica.

Índice de Figuras

Figura 1. Estereoisómeros de astaxantina.

Figura 2. Ruta metabólica de la astaxantina producida por la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous.*

Figura 3. Cinética de crecimiento microbiano en un cultivo por lote. 1) Fase de latencia, 2) Fase exponencial, 3) Fase estacionaria, 4) Fase de muerte.

Figura 4. Cinética de crecimiento microbiano en un cultivo por lote alimentado. 1) Fase de latencia, 2) Fase exponencial prolongada, 3) Fase estacionaria, 4) Fase de muerte.

Figura 5. Cinética de crecimiento microbiano en un cultivo continúo.

Figura 6. Tipos de monitoreo de bioprocesos.

Figura 7. Esquema del principio de medición de viabilidad celular con espectroscopía dieléctrica.

Figura 8. Sonda de espectroscopía dieléctrica.

Figura 9. Fotografía de microscopía de fluorescencia con el marcador de fluorescencia FUN-1 obtenida por Millard y col.

Figura 10. Microscopio de fluorescencia.

Figura 11. Esquema del principio de medición de tamaño celular con el sistema CASY®.

Figura 12. Sistema de análisis y conteo de células (CASY®).

Figura 13. Equipo de espectroscopía Raman.

Figura 14. Análisis de sensibilidad paramétrica del modelo por lote.

Figura 15. Análisis de sensibilidad paramétrica del modelo por lote alimentado.

Figura 16. Cinéticas de crecimiento celular registradas con diferentes técnicas durante la fermentación a nivel matraz.

Figura 17. Comparación entre las cinéticas de biomasa, consumo de sustrato y producción de carotenoides totales.

Figura 18. Cinética de viabilidad celular registrada mediante la técnica de espectroscopía dieléctrica durante las fermentaciones efectuadas a nivel matraz.

Figura 19. Cinética de viabilidad celular registrada mediante la técnica de microscopía de fluorescencia durante las fermentaciones realizadas a nivel matraz.

Figura 20. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel matraz (24 horas).

Figura 21. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel matraz (48 horas).

Figura 22. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel matraz (96 horas).

Figura 23. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel matraz (120 horas).

Figura 24. Cinética de distribución del diámetro celular registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante las fermentaciones efectuadas a nivel matraz.

Figura 25. Cinética de distribución del volumen celular registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante las fermentaciones efectuadas a nivel matraz.

Figura 26. Cinética de distribución del volumen celular total (área bajo la curva) registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante las fermentaciones efectuadas a nivel matraz.

Figura 27. Cinética del espectro de esparcimiento Raman obtenida mediante espectroscopía Raman durante las fermentaciones realizadas a nivel matraz.

Figura 28. Cinética de la intensidad Raman para cada uno de los tres enlaces representativos de la astaxantina obtenida por espectroscopía Raman durante las fermentaciones hechas a nivel matraz.

Figura 29. Cinéticas de crecimiento celular registradas con diferentes técnicas durante la primera fermentación por lote a nivel biorreactor.

Figura 30. Cinéticas de crecimiento celular registradas con diferentes técnicas durante la segunda fermentación por lote a nivel biorreactor.

Figura 31. Comparación entre las cinéticas de biomasa, consumo de sustrato y producción de carotenoides totales en la primera fermentación por lote a nivel biorreactor.

Figura 32. Comparación entre las cinéticas de biomasa, consumo de sustrato y producción de carotenoides totales en la segunda fermentación por lote a nivel biorreactor.

Figura 33. Cinética de viabilidad celular registrada mediante la técnica de espectroscopía dieléctrica durante la primera fermentación por lote.

Figura 34. Cinética de viabilidad celular registrada mediante la técnica de espectroscopía dieléctrica durante la segunda fermentación por lote.

Figura 35. Cinética de viabilidad celular registrada mediante la técnica de microscopía de fluorescencia durante la segunda fermentación por lote.

Figura 36. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel biorreactor (24 horas).

Figura 37. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel biorreactor (48 horas).

Figura 38. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel biorreactor (96 horas).

Figura 39. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel biorreactor (144 horas).

Figura 40. Cinética de distribución del diámetro celular registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante la primera fermentación por lote.

Figura 41. Cinética de distribución del diámetro celular registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante la segunda fermentación por lote.

Figura 42. Cinética de distribución del volumen celular registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante la primera fermentación por lote.

Figura 43. Cinética de distribución del volumen celular registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante la segunda fermentación por lote.

Figura 44. Cinética de distribución del volumen celular total (área bajo la curva) registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante la primera fermentación por lote.

Figura 45. Cinética de distribución del volumen celular total (área bajo la curva) registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante la segunda fermentación por lote

Figura 46. Cinética del espectro de esparcimiento Raman obtenida mediante espectroscopía Raman durante la primera fermentación por lote.

Figura 47. Cinética del espectro de esparcimiento Raman obtenida mediante espectroscopía Raman durante la segunda fermentación por lote.

Figura 48. Cinética de la intensidad Raman para cada uno de los tres enlaces representativos de la astaxantina obtenida por espectroscopía Raman durante la primera fermentación por lote.
Figura 49. Cinética de la intensidad Raman para cada uno de los tres enlaces representativos de la astaxantina obtenida por espectroscopía Raman durante la segunda fermentación por lote.
Figura 50. Comparación de la intensidad Raman obtenida por muestreo y por exposición directa del haz de luz monocromática directa al biorreactor.

Resumen

El presente trabajo tuvo como propósito principal el estudio fisiológico de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* por medio de técnicas espectroscópicas no convencionales y análisis de imágenes.

A partir de un estudio de sensibilidad paramétrica a un par de modelos matemáticos previamente reportados se determinaron los parámetros de mayor relevancia a tomar en cuenta durante la experimentación, esto permitió un estudio enfocado a la fisiología celular.

Después, se procedió a implementar los protocolos de los métodos espectroscópicos (Espectroscopía Raman, Espectroscopía dieléctrica, Microscopía de fluorescencia) y de análisis de imágenes para el monitoreo de la fisiología celular.

Posteriormente se utilizaron las técnicas descritas previamente para el monitoreo de fermentaciones a nivel matraz y a nivel biorreactor. Los resultados obtenidos por medio de estas técnicas fueron correlacionados entre sí y con técnicas convencionales para dilucidar los cambios tres variables que reflejan el estado fisiológico de la levadura *X. dendrorhous*: (1) viabilidad celular, (2) tamaño y volumen celular, (3) producción de astaxantina.

Abstract

This work mainly focused on physiological study of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* through non-conventional spectroscopic techniques and image analysis.

From a parametric sensitivity study to a pair of previously reported mathematical models most important parameters to consider during the experimentation were determined; this allowed a study focused on cell physiology.

Then, the spectroscopic methods protocols (Raman spectroscopy, dielectric spectroscopy, fluorescence microscopy) and image analysis for monitoring cell physiology were implemented.

Subsequently, the previously described techniques for motoring level flask and bioreactor fermentations were used. The results obtained through these techniques were correlated with each other and conventional techniques to elucidate the changes of the three variables that reflect the physiological state of the yeast *X. dendrorhous*: (1) cell viability, (2) cell size and volume, (3) astaxanthin production.

Introducción

La astaxantina es un carotenoide ampliamente distribuido en la naturaleza y es el principal pigmento en los crustáceos y los salmónidos, así como diversas aves como el flamingo, el ibis escarlata y algunos microorganismos.

Existe un creciente interés en el uso de astaxantina como pigmento para la acuicultura e industria de aves de corral, debido a que estos animales no pueden sintetizarla por sí mismos. Por lo tanto, esta deber ser incluida en sus alimentos para obtener un color atractivo para el consumidor. Por otra parte, la astaxantina tiene una alta actividad antioxidante, lo cual ha creado un creciente interés por parte de la industria farmacéutica para su implementación en tratamientos de algunos tipos de cáncer.

En términos económicos, la astaxantina sobresale debido a que su valor en el mercado genera ganancias mayores a los 100 millones de dólares al año.

Aunque el pigmento puede ser producido por tecnología química sintética, algunos de los subproductos resultantes pueden tener efectos secundarios para el consumidor. Es por esta razón que la producción de carotenoides mediante fuentes microbianas ha sido objeto de extensas investigaciones.
Uno de los microorganismo reconocidos como productor de astaxantina es la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, la cual sintetiza astaxantina como su principal carotenoide.

Principalmente se han utilizado tres enfoques para la optimización en la producción de astaxantina por *X. dendrorhous*: (i) obtención de astaxantina con cepas mutantes de sobreproducción; (ii) desarrollo de medios de cultivo industriales; (iii) implementación de diversos sistemas de producción.

Parte esencial de un bioproceso es el uso de instrumentación para el monitoreo de variables que permitan conocer el estado global del proceso fermentativo. De manera general las variables monitoreadas son de carácter físico o químico, tales como el pH, la temperatura, el porcentaje de

oxígeno disuelto, etc. Sin embargo, en la actualidad se ha vuelto imperiosa la necesidad de conocer, en tiempo real, variables bioquímicas como la producción de biomasa, el consumo de sustrato y la generación de producto.

En las últimas décadas, una nueva “variable” de monitoreo ha surgido en los procesos biotecnológicos: el estado fisiológico, su conocimiento se ha vuelto de vital importancia ya que dicho estado puede afectar en la producción de metabolitos, tanto en su velocidad como en su rendimiento, además de su calidad.

En este trabajo de tesis se monitoreó el estado fisiológico de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* durante la producción de astaxantina por medio de métodos espectroscópicos y análisis de imágenes

1. Antecedentes

1.1 Astaxantina

La astaxantina (3,3'- dihidroxi – β,β – caroteno – 4,4'- diona) es un carotenoide perteneciente a la familia de las xantófilas, es decir, presenta oxígeno en su estructura molecular, tiene un peso molecular de 596.86 g/mol y sus cristales presentan una coloración naranja oscuro con un punto de fusión de 217-219 °C [1]. Se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y es el pigmento principal en los crustáceos y los salmónidos [2], así como en diversas aves como el flamingo y el ibis escarlata [3].

Existe un creciente interés en el uso de astaxantina como pigmento para la acuicultura y en la industria de aves de corral, debido a que estos animales no pueden obtenerla dentro de las granjas y no son capaces de sintetizarla por sí mismos, por lo tanto, debe ser incluida en sus alimentos, no sólo porque provee un color atractivo al consumidor, sino también porque funciona como componente nutricional para su adecuado crecimiento y reproducción [2].

Por otra parte, la astaxantina tiene una alta actividad antioxidante, incluso mayor a la que presentan el β-caroteno y la vitamina E [4], ya que neutraliza radicales libres actuando como donador de electrones. Lo anterior ha generado interés en la industria farmacéutica para su uso como componente en el tratamiento de problemas cardiovasculares, enfermedades neuro e inmunodegenerativas [5], además de algunos tipos de cáncer [6].

En términos económicos, la astaxantina es el tercer carotenoide más importante a nivel mundial después del β-caroteno y la luteína. En 2007 se generaron 227 millones de dólares (29 % de la venta de carotenoides totales) y además se tiene estimado que alcance 253 millones de dólares para el 2018, con una tasa de crecimiento anual del 1.8% [7].

1.1.1 Fuentes de obtención de astaxantina

La astaxantina que se utiliza hoy en día en los distintos sectores industriales proviene de distintas fuentes, a continuación se enumeran algunas de ellas.

1.1.1.1 Astaxantina por vía química sintética

La síntesis química de astaxantina comienza desde el α-isoforona, la cual es convertida de manera secuencial en β-isoforona, oxo-isoforona y C_9-acetal. Después, una molécula de C_6-acetal, sintetizada del vinylbutanol es unida a la molécula de C_9-acetal para formar, sucesivamente, C_{15}-acetal y C_{15}-sal, la cual es transformada finalmente a astaxantina. Existen tres estereoisómeros de astaxantina dependiendo de la orientación espacial de los grupos hidroxilo en los carbonos quirales 3 y 3': (3R, 3'R), (3R, 3'S) y (3S, 3'S) (Figura 1). La astaxantina proveniente de esta vía de producción y se encuentra en una relación molar 1:2:1 aproximadamente [8].

En las últimas décadas, la astaxantina producida por esta vía ha representado cerca del 97% de las ventas totales [9]. Sin embargo, existen algunos factores que han estimulado la búsqueda de fuentes naturales de astaxantina con potencial para su industrialización. Lo anterior debido a que algunos de los subproductos resultantes de estos procesos pueden tener efectos secundarios para el consumidor, además de la creciente demanda por productos naturales y el alto costo de los productos sintéticos.

1.1.1.2 Astaxantina de fuentes naturales

a) Subproductos de crustáceos

Estos son generados durante el procesamiento de la porción comestible de cangrejos, camarones y langostas. Generalmente, estos subproductos se componen de sales minerales (15-35%), proteínas (25-50%), quitina (25-35%), lípidos y pigmentos [10]. El contenido de carotenoides en estos compuestos varía entre 119 y 148 μg/g. La astaxantina se encuentra principalmente en su forma libre o esterificada con ácidos grasos.

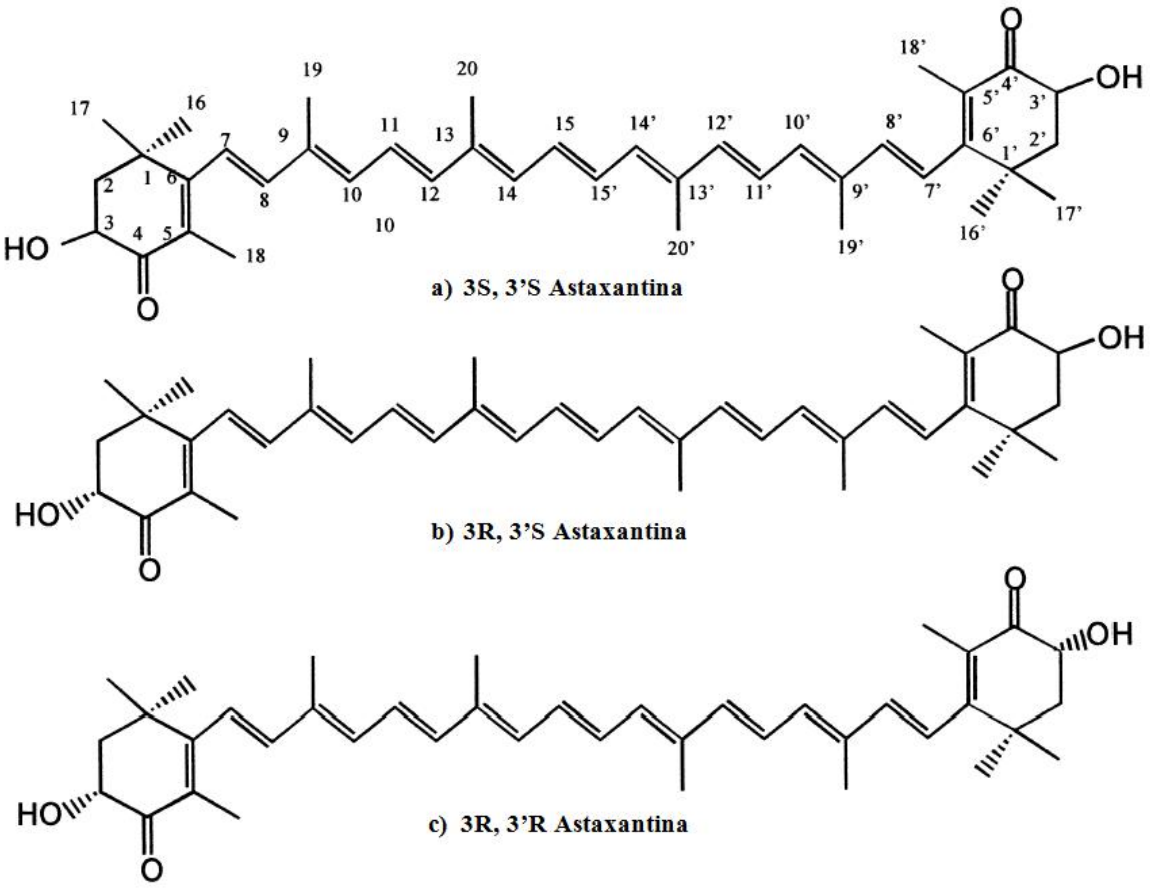

Figura 1. Estereoisómeros de astaxantina

La potencial utilización de estos subproductos para inducir la pigmentación en peces cultivados conlleva la incorporación de grandes cantidades en el alimento, debido a su bajo contenido de astaxantina (<150 µg/g). Más aún, los tratamientos de secado que dependen de la aplicación de calor no son adecuados debido a la alta susceptibilidad de los carotenoides a la degradación oxidativa provocada por las condiciones térmicas del proceso [11]. Una desventaja más, es el alto contenido de quitina, el cual decrece significativamente la digestibilidad del subproducto por parte del pez [12].

b) Microalgas

Numerosas investigaciones han sido enfocadas al empleo de microalgas, particularmente *Haematococcus pluvialis*, para el proceso de producción de astaxantina. El principal enfoque se ha centrado en ciertos factores y condiciones que afectan el crecimiento de este microorganismo

y la producción de astaxantina, como lo son: concentración de sustrato, presencia de elementos traza e intensidad de la luz. El avance en fotobiorreactores ha sido fundamental para alcanzar una factibilidad económica en la producción de astaxantina por este medio [13].

La microalga *Haematococcus pluvialis* produce principalmente el estereoisómero (3S, 3'S) [14], además que, de manera similar a los subproductos de crustáceos, la astaxantina se genera como mono y diésteres de ácidos grasos lo cual le confiere una alta estabilidad al ser utilizada en aplicaciones nutracéuticas. No obstante, la hidrólisis del enlace éster es un paso limitante en la biodisponibilidad de astaxantina para su uso en acuicultura [15].

c) Levaduras

Muchos estudios de producción de astaxantina han sido publicados utilizando la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (antes *Phaffia rhodozyma*), la cual sintetiza astaxantina como su principal carotenoide [16].

De manera general, se han utilizado tres enfoques para la mejora en la producción de astaxantina empleando esta levadura: (i) obtención de astaxantina con cepas mutantes sobreproductoras, (ii) desarrollo de medios de cultivo industriales, (iii) implementación de diversos sistemas de producción [17].

1.2 *Xanthophyllomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma)*

En la década de los 60's la levadura *Phaffia rhodozyma* fue aislada de exudados de árboles de abedul en las frías regiones de Alaska y Japón por Herman Phaff, quien describió que *P. rhodozyma* cumplía con ciertos criterios para ser considerada un basidiomiceto: pared celular ultraestructurada, reproducción por gemación, presencia de actividad ureasa, capacidad de sintetizar almidones y pigmentos.

Por más de tres décadas, elucidar el ciclo sexual de *P. rhodozyma* se volvió una tarea frustrante e infructuosa. Sin embargo, en 1995, Golubev, encontró el ciclo sexual de ciertas cepas aisladas cerca de Moscú, Rusia. La actividad sexual de dicha cepa involucraba el emparejamiento entre la

célula madre y su gema (pedogamia) bajo ciertas condiciones, y eventualmente, se observó la formación de largos holobasidios con basidioesporas terminales [18]. Golubev designó esto como un estado telemórfico y denominó a la nueva especie como *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Phaffia rhodozyma* quedó considerada como el estado anamórfico [19].

La levadura *X. dendrorhous* crece en un rango de temperatura que va de 0 a 27 °C, realizando la síntesis de pigmentos carotenoides entre 18 y 22 °C. Otra de sus características es la capacidad de asimilar compuestos carbonados incluyendo D-glucosa, maltosa, sacarosa, celobiosa, trealosa, rafinosa, almidón soluble, etanol, metilglucósido, D-manitol, salicilina, 2-cetogluconato, succinato y glicerol. Por otro lado, no tiene la capacidad de hidrolizar lactosa, galactosa, glucosamina, D-ribosa y D-arabinosa, además de utilizar urea como fuente de nitrógeno en lugar de nitratos [20].

La composición bioquímica de la levadura ha sido determinada previamente: en peso seco, contiene 6% de ceniza y 4.8% de nitrógeno total, 40% de carbohidratos totales (lo cual refleja una pared celular relativamente gruesa, además de presencia de cápsula) y 17% de lípidos totales (más alto que en la mayoría de las levaduras) [21]. Por otra parte, la levadura tiene un contenido balanceado de la mayoría de los aminoácidos esenciales pero es baja en metionina [22].

Los pigmentos que produce son principalmente xantofilas, donde la astaxantina representa la mayoría con 83-87% del total de carotenoides, seguida por fenicoxantina (5-7%), 3-hidroxiequinenona (3-4%), equinenona (2-4%) y β-caroteno (2-2.5%) [23].

La biosíntesis de astaxantina por parte de la levadura *X. dendrorhous* comienza por la activación del gen *idi*, el cual codifica la isopentenil pirofosfato isomerasa (IPP, por sus siglas en inglés), cuya función es catalizar la isomerización del IPP en dimetilalil pirofosfato (DMAPP, por sus siglas en inglés) [24]. La formación de este precursor isoprenoide en β-caroteno es catalizada por cuatro actividades enzimáticas: 1) Geranil-geranil pirofosfato sintasa (GGPP, por sus siglas en inglés), la cual es codificada por el gen *ctrE* y cataliza la adición secuencial de tres moléculas de IPP en DMAPP resultando un precursor GGPP con 20 carbonos (C-20) [25]. 2) Fitoeno sintasa, codificada por el gen *ctrYB*, que une dos moléculas de GGPP para formar un fitoeno [26]. 3)

Fitoeno desaturasa, codificada por el gen *ctrI*, introduce cuatro dobles enlaces dentro de la molécula de fitoeno para formar licopeno [27]. 4) Licopeno ciclasa, codificada también por el gen *ctrYB*, la cual convierte de manera secuencial los finales acíclicos φ del licopeno en anillos β, para formar γ-caroteno y β-caroteno [26].

Dos actividades enzimáticas adicionales convierten el β-caroteno en astaxantina a través de varios intermediarios biosintéticos: una cetolasa incorpora dos grupos 4-ceto en la molécula de β-caroteno y una hidoxilasa introduce dos grupos 3-hidroxi. En *X. dendrorhous*, ambas actividades pueden llevarse a cabo por sólo una enzima, astaxantina sintasa, codificada por el gen *ctrS*, la cual, de manera secuencial, cataliza la 4-cetolación del β-caroteno seguida por la 3-hidroxilación [28].

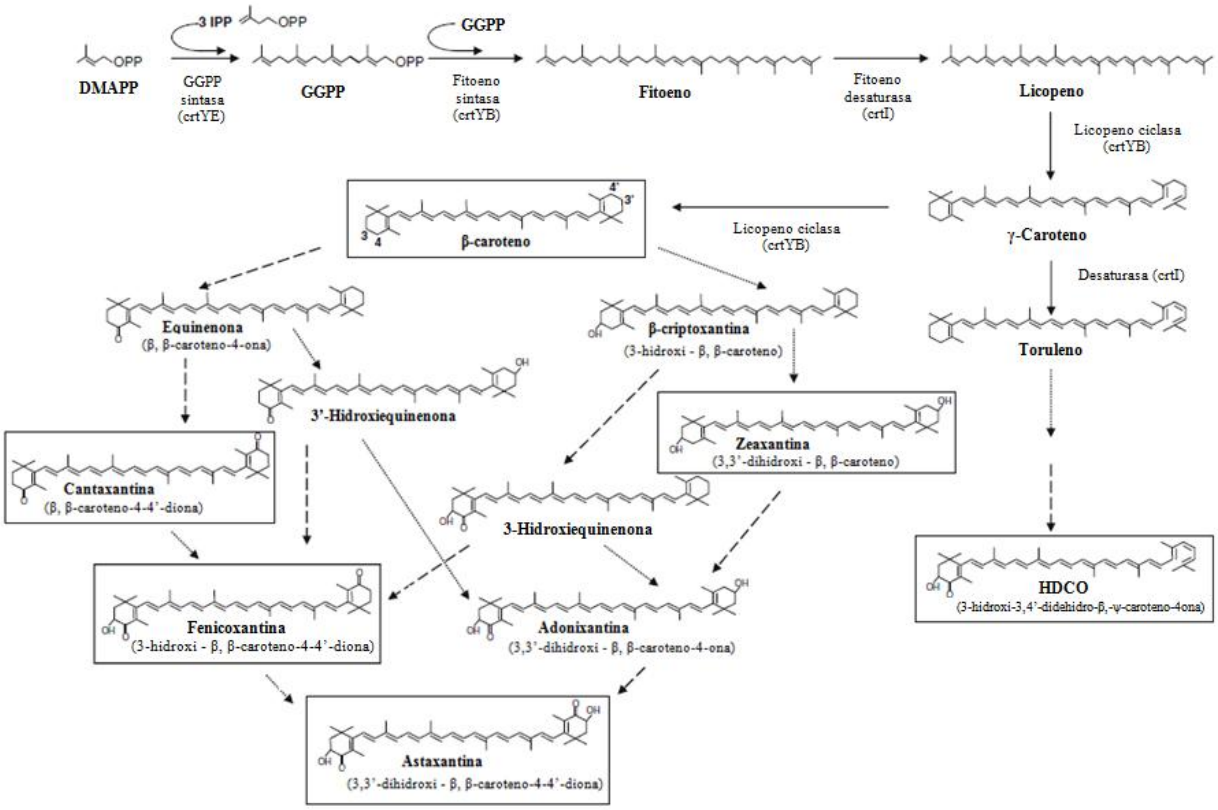

Figura 2. Ruta metabólica de la astaxantina producida por la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*

1.2.1 Factores que influyen en el crecimiento y pigmentación de *Xanthophyllomyces dendrorhous*

La producción de pigmentos carotenoides por parte de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* depende, en gran parte, de las condiciones de cultivo, entre las que destacan por su importancia: luz, aireación, pH, temperatura, composición de medio, entre otros.

Por otro lado, el creciente interés por parte de investigadores en procesos biotecnológicos para obtener metabolitos de alto valor agregado como carotenoides, ha propiciado el escalamiento a nivel industrial de estos procesos. Sin embargo, la síntesis microbiana de carotenoides depende tanto de los factores enumerados previamente como de factores operacionales, que puedan afectar los rendimientos y costos de producción.

1.2.1.1 Influencia de la fuente de carbono

De los parámetros que influencian la carotenogénesis, la fuente de carbono es el más estudiado. El metabolismo de las levaduras depende del tipo de fuente de carbono en el medio de cultivo. Glucosa y otros azúcares fermentables son metabolizados por la vía de la glucólisis, y después por fermentación alcohólica, aún con oxígeno [29]. Por otra parte, las fuentes de carbono no fermentables como el etanol y el succinato son llevados a través de la oxidación del acetil-CoA para entrar en el ciclo del ácido cítrico. Algunos autores han mencionado que el etanol como fuente de carbono provoca un incremento en la síntesis de carotenoides [30].

El espectro de asimilación de sustratos por la levadura *X. dendrorhous* es amplio, varios autores han reportado el uso de desechos industriales ricos en azúcares como fuentes de carbono en sus procesos de generación de astaxantina, lo anterior con la finalidad de reducir costos de producción y aumentar la factibilidad de producirla. En la Tabla 1 se muestra un resumen de los distintos sustratos alternativos utilizados previamente.

Tabla 1. Desechos industriales utilizados como fuente de carbono para la producción de astaxantina con diferentes cepas de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Cepa	Sustrato	Biomasa (g/L)	Astaxantina (mg/g)	Referencia
ATCC 24202	Hidrolizado de Turba	4.6	1.6	[31]
ATCC 24202	Jugo de Caña de Azúcar	19.3	0.4	[32]
N9	Jugo de Uva	7.5	1.3	[33]
R1	Leche de Coco	6.2	1.8	[34]
UCD-67-210	Melazas	14.1	1.1	[35]
25-2	Jugo de Dátil	39.0	0.6	[36]
TISTR 5730	Desechos de Mostaza	19.6	1.3	[37]
NRRLY-17268	Hidrolizado de *Eucaliptus*	30.6	1.0	[38]
2A2N	Melazas de Remolacha	36.0	1.1	[39]

1.2.1.2 Influencia de la luz

La intensidad de la luz es un factor importante a tener en cuenta durante la producción microbiana de carotenoides, ya que ésta incrementa la carotenogénesis [40]. A manera de protección los microorganismos deben prevenirse del daño causado por la intensidad de la luz y la generación de pigmentos carotenoides es un mecanismo fotoprotector [41]. La producción de carotenoides se ve afectada positivamente con la aplicación de luz blanca y la concentración de carotenoides depende del microorganismo utilizado.

En el caso de *X. dendrorhous*, se ha demostrado que la luz azul induce mayor pigmentación que la roja, amarilla o verde cuando la levadura crece sobre una superficie de medio agar YM a 7.5 °C durante un mes [33]. Un experimento previo demostró que la respuesta a la luz por parte de la levadura se incrementa cuando ésta se expone a antimicina, inhibidor de la cadena respiratoria que puede incrementar la formación de radicales oxígeno [20].

1.2.1.3 Influencia del pH

El pH del medio de cultivo es un factor clave para el crecimiento de la levadura *X. dendrorhous*. Se ha reportado que a un pH de 5.8 la levadura alcanza un máximo de crecimiento. Sin embargo, dentro del rango de pH 4 – 7 se observa una adecuada producción de carotenoides [42].

1.2.1.4 Influencia de la temperatura

La temperatura es un factor que debe tomarse en cuenta cuando se utilizan levaduras para la producción de carotenoides, debido a que afecta tanto el crecimiento celular como el metabolismo de producción de pigmentos. El efecto de la temperatura depende también de la cepa utilizada [43]. Más aún, se ha reportado que la temperatura influye en la concentración de enzimas involucradas en la carotenogénesis [44].

La levadura *X. dendrorhous* crece en un rango de temperatura de 0 a 27 °C, con su valor óptimo situado entre 20 y 22 °C. No obstante, se ha encontrado que el contenido de carotenoides se mantiene constante en un rango de temperatura de 14 a 26 °C [35]. De manera desafortunada, la incapacidad de la levadura para crecer a temperaturas mayores a 27 °C es una desventaja para su implementación a escala industrial.

1.2.1.5 Influencia de la aireación

Debido a que la carotenogénesis es un proceso aerobio, la aireación es otro parámetro de suma importancia. El flujo de aire suministrado a un cultivo con levaduras es esencial para la asimilación de sustrato y su transformación en biomasa y productos. Además, la disminución en los niveles de oxígeno influye en la conversión de los carotenos en xantofilas. Johnson y col. [42] utilizaron la levadura *Phaffia rhodozyma* y realizaron un trabajo de investigación en donde variaron la concentración de O_2 disuelto en el medio de cultivo, desde 3 hasta 108 mmol/lh, obteniendo mayor producción de carotenoides con altas concentraciones (40 – 108 mmol/lh). De igual forma, el efecto de la aireación depende del microorganismo empleado.

1.2.1.6 Efecto de los de iones metálicos en la producción de astaxantina

La efecto de los elementos traza sobre la carotenogénesis ha sido reportada previamente. En el caso del empleo de Al^{3+} y Zn^{2+} se ha observado un efecto estimulatorio en la producción de β-caroteno y γ-caroteno sobre el microorganismo *Rhodotorula graminis*, mientras que para su producción de toruleno y torularodina, el uso de Zn^{2+} y Mn^{2+} muestra un efecto inhibitorio [45]. El efecto de estos elementos traza se atribuye a que activan enzimas específicas participantes en la carotenogénesis.

Para el caso de la levadura *X. dendrorhous* se han efectuado pruebas variando la concentración de algunos iones metálicos para conocer cómo influyen en el crecimiento y producción de astaxantina de la levadura. Flores y col. [46] variaron las concentraciones de Cu^{2+} y Fe^{2+} encontrando que la limitación en la concentración de Cu^{2+} incrementa la producción de astaxantina. Por el contrario, a bajas concentraciones de Fe^{2+} la generación del carotenoide se vio disminuida.

En las levaduras existen al menos tres sistemas enzimáticos intracelulares que requieren Cu^{2+} como cofactor: (1) citocromo-c-oxidasa, (2) superóxido dismutasa y (3) factores de trascripción involucrados en la homeostasis del cobre [47]. La discusión se centra en las dos primeras debido a que estas se relacionan con el incremento en la producción de astaxantina observado a concentraciones por debajo de 3.2 μM. Una baja actividad de citocromo-c-oxidasa puede traer consigo un incremento en la tasa de NADH/NAD+ en las células, lo anterior puede ser fundamental para disparar la síntesis de carotenoides.

Más aún, la deficiencia de Cu^{2+} también decrece la actividad antioxidante de enzimas como CuZn-superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa [48, 49], lo anterior resulta en un estado de estrés oxidativo debido a la disminución de las defensas antioxidantes.

Por otro lado, el Fe^{2+} es un cofactor involucrado en la catálisis llevada a cabo por hidroxilasas y oxidasas requeridas para la síntesis de astaxantina [50]. Es probable que por este requerimiento la síntesis de carotenoides no se incremente a bajas concentraciones de Fe^{2+}.

1.2.1.7 Efecto de otros nutrientes en la producción de carotenoides

Existen diversos factores diferentes a los ya mencionados que influyen también en el crecimiento y producción de astaxantina de la levadura *X. dendrorhous*. Entre ellos se encuentra el citrato, el cual es un precursor de la carotenogénesis, dicho compuesto se considera una de las fuentes más importante del acetil-CoA citoplasmático necesario para la biosíntesis de ácidos grasos y carotenoides en levaduras ricas en lípidos [51]. Flores y col. [52] variaron las concentraciones iniciales de citrato en un medio de cultivo químicamente definido y encontraron que a una concentración mayor a 28.9 mM de citrato, la concentración de astaxantina y carotenoides totales se incrementaba de 160 μg/g a 215 μg/g.

Otro factor importante es el ácido mevalónico, que ha sido probado como precursor de la biosíntesis del pigmento astaxantina en una cepa silvestre de *X. dendrorhous*. La adición de 0.1% de ácido mevalónico al medio de cultivo estimuló en un 40% la síntesis de astaxantina [53].

Por otro lado, Kim y col. [54] reportaron que la producción de carotenoides se veía estimulada con la adición de etanol (10 g/L) y ácido acético (5 g/L) en cultivos por lote alimentado de *X. dendrorhous*, obtuvieron una concentración de 43.87 μg/L de carotenoides totales. De manera similar, Gu y col. [55] encontraron un incremento en la producción de carotenoides (de 1.65 μg/g a 2.65 μg/g) con la adición de 0.2% (v/v) de etanol.

1.2.2 Sistemas de producción de astaxantina con la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*

La levadura *X. dendrorhous* ha sido empleada en la industria alimenticia y farmacéutica para la obtención de astaxantina en los últimos años, en las siguientes secciones se presentan los diferentes sistemas de producción bajo los que se ha trabajado.

1.2.2.1 Fermentación por lote

Una fermentación por lote o discontinua puede ser considerada como un "sistema cerrado". Al inicio de la operación se añade el medio de cultivo y se inocula, incubando bajo condiciones óptimas. A lo largo de la fermentación sólo se añade oxígeno (aire), soluciones ácido y base para controlar el pH y un agente antiespumante. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia, como resultado del metabolismo de las células observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: (1) fase de latencia, (2) fase exponencial, (3) fase estacionaria y (4) fase de muerte (Figura 3). De esta manera, el fermentador se encuentra en un estado no estacionario, perfectamente mezclado y con condiciones uniformes dentro del biorreactor en cualquier tiempo de la fermentación [56].

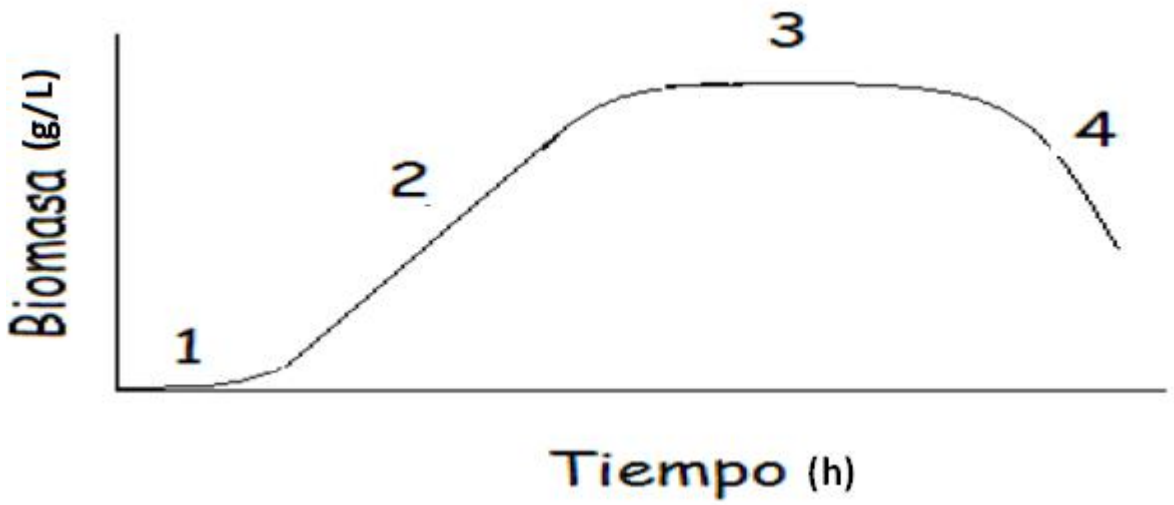

Figura 3. Cinética de crecimiento microbiano en un cultivo por lote. 1) Fase de latencia, 2) Fase exponencial, 3) Fase estacionaria, 4) Fase de muerte

1.2.2.2 Fermentación por lote alimentado

Es considerada también como una fermentación semicontinua, con un flujo de entrada pero sin un flujo de salida, este tipo de operación permite que la concentración de sustrato se pueda mantener en algún valor predeterminado.

Bajo este sistema las células crecen bajo un régimen por lote durante algún tiempo, normalmente hasta casi llegar al final de la fase exponencial, en este punto, el reactor es alimentado con una solución de sustrato y nutrientes, lo cual provoca una prolongación de la fase de crecimiento exponencial (Figura 4), así como también un aumento en el volumen y demanda de nutrientes. El flujo de alimentación puede controlarse de tal forma que mantenga el crecimiento del microorganismo a una velocidad específica y reducir de forma simultánea la producción de otros subproductos.

Una fermentación por lote alimentado es útil para alcanzar altas concentraciones de producto como resultado de una alta concentración de biomasa en un tiempo determinado. En este punto, dos casos pueden ser considerados: la producción asociada al crecimiento y la no asociada al crecimiento. Para el primero, es deseable extender la fase de crecimiento exponencial tanto como sea posible, optimizando la velocidad específica de crecimiento. Para la producción no asociada al crecimiento se mantiene una población celular deseada suministrando la fuente de carbono y otros requerimientos a una velocidad controlada, lo suficiente para prolongar la fase estacionaria y que la producción del metabolito de interés se incremente [57].

1.2.2.3 Fermentación en continuo

Esta técnica consiste en alimentar medio de cultivo nuevo al mismo tiempo que se remueve el medio de cultivo y biomasa del sistema [58]. Una característica particular del sistema es que después de un cierto tiempo de fermentación es posible llegar y mantenerse en un estado estacionario (Figura 5), lo que habilita la determinación de las relaciones del comportamiento del microorganismo (expresión genética y fenotípica) y las condiciones del medio que lo rodea [59]. El resumen de algunos trabajos previos con diferentes sistemas de producción se muestra en la

Tabla 2. Como se observa en la tabla, se aprecia que la mayor producción de biomasa fue utilizando un sistema de fermentación por lote alimentado, sin embargo, la producción de astaxantina es similar entre los diferentes sistemas de fermentación; la ventaja del lote alimentado, al generar mayor concentración de biomasa, es generar, en volumen, mayor concentración de astaxantina.

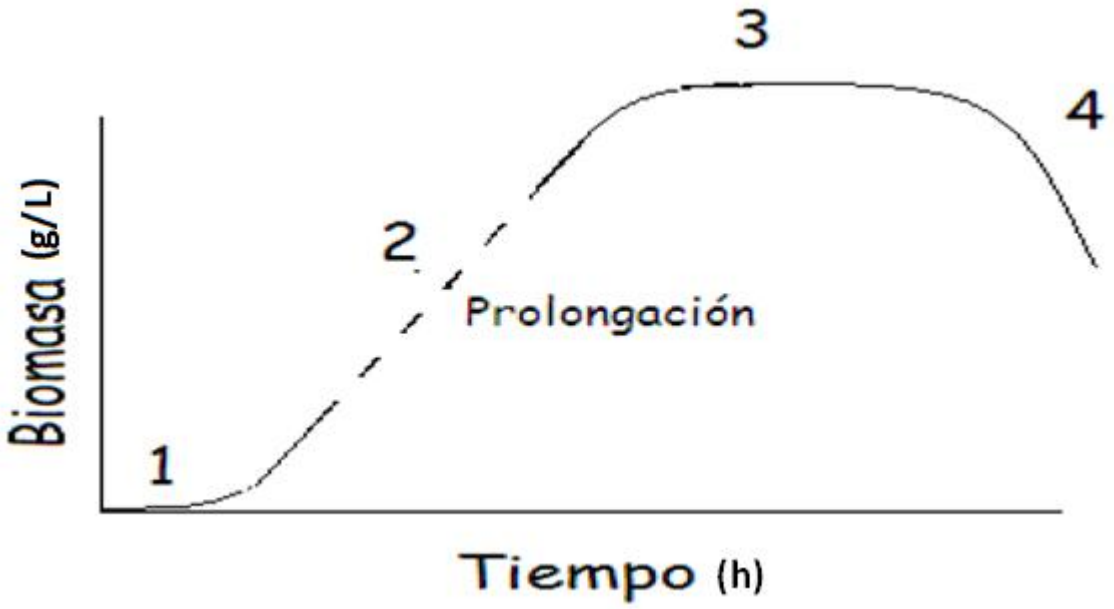

Figura 4. Cinética de crecimiento microbiano en un cultivo por lote alimentado. 1) Fase de latencia, 2) Fase exponencial prolongada, 3) Fase estacionaria, 4) Fase de muerte

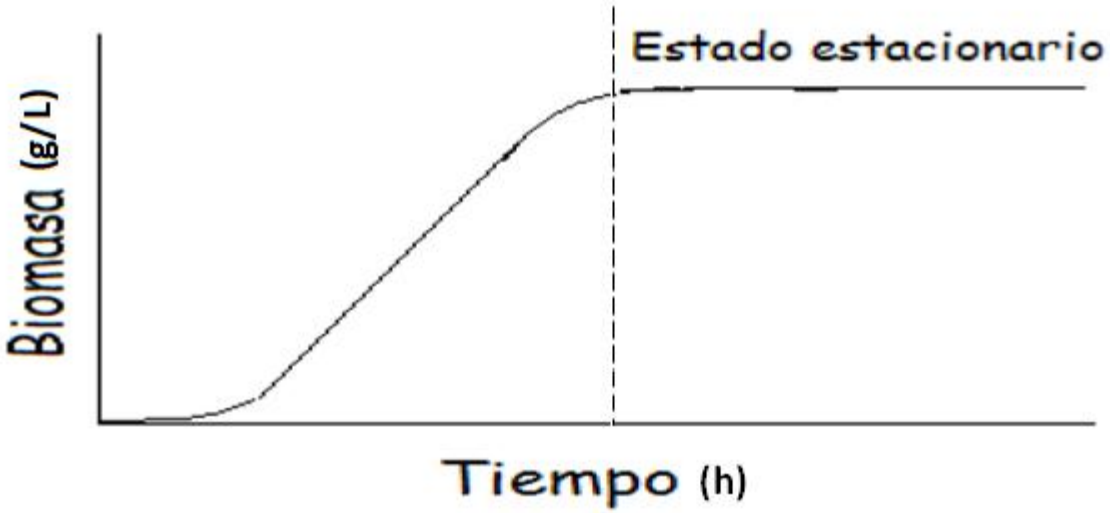

Figura 5. Cinética de crecimiento microbiano en un cultivo continúo.

Tabla 2. Diferentes estrategias para la producción de astaxantina con diferentes cepas de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Sistema de Producción	Cepa	Fuente de Carbono	Biomasa (g/L)	Astaxantina (mg/g)	Referencia
Lote	7B12	Glucosa	7.71	1.0	[60]
	ZJUT003		21.33	2.77	[61]
	ES042		30.7	2.51	[62]
	ZJUT46		15.8	1.39	[63]
Lote Alimentado	ATCC 24202		18.75	0.30	[64]
	HT-5FO1C		40.0	1.1	[65]
	ZJUT46		16.34	2.09	[63]
Continuo	ATCC 24202		4.6	0.7	[64]
	ATCC 24202		19.35	0.38	[32]
	ATCC 24202		4.95	0.54	[66]

1.3 Monitoreo de bioprocesos

Los procesos biotecnológicos son cruciales para el desarrollo de cualquier economía que busca asegurar una posición relevante en el mercado. Esto incluye un gran rango de sectores, desde el farmacéutico, agroindustrial, alimenticio, bebidas, tratamiento de aguas, etc.

A pesar de las diferencias en los objetivos de cada área, todos los procesos biotecnológicos incluyen, en cierto punto, el cultivo de microorganismo bajo condiciones de operación controladas, correspondientes a una combinación compleja de fenómenos físicos, químicos y biológicos [67]. El cultivo de microorganismos en un biorreactor es una de las operaciones más importantes del proceso y también la más compleja para el monitoreo y control del proceso. Más aún, los biorreactores son sistemas multivariables, puesto que durante su operación, sustratos son consumidos y productos y metabolitos intermediarios son generados en presencia de células vivas. Además, dichas células se encuentran en suspensión en el medio en cantidades que pueden variar desde la ausencia hasta la saturación.

En los últimos años, el monitoreo de bioprocesos se ha realizado con sensores y analizadores que pueden ser clasificados como: *fuera de línea (off-line), en la línea (on-line)* y *en línea (in-line)*, de acuerdo a la localización del sistema analítico en relación con el biorreactor. Las mediciones *fuera de línea* conllevan realizar un muestreo manual del fermentador para analizar la muestra utilizando un equipo externo, por lo cual la muestra tendrá un desfase de tiempo respecto al bioproceso. Las mediciones *en la línea* involucran muestreo automático pero la muestra es analizada fuera del biorreactor; por ejemplo, en un sistema de análisis de inyección secuencial. Por último, en el análisis *en línea* no se remueve una muestra sino que el sensor es insertado dentro del biorreactor (invasivo) o separado del biorreactor por una barrera de vidrio (no invasivo); otra posible configuración para mediciones *en línea* incluye un canal de muestreo donde la muestra es analizada y posteriormente regresada al biorreactor. La Figura 6 muestra las diferentes configuraciones de monitoreo de bioprocesos.

En la actualidad, el monitoreo *en línea* de un biorreactor es considerado una parte esencial de un control efectivo de bioprocesos, el cual puede desembocar en incrementos de eficiencia, productividad, reproducibilidad, calidad, reducción de la contaminación ambiental y optimización de costos globales de producción [68]. Sin embargo, sólo un pequeño número de variables son comúnmente monitoreadas *en línea*: temperatura, presión, pH, oxígeno disuelto, velocidad de agitación, velocidades de entrada y salida de líquidos y gases, entre otros [69]. Específicamente para fermentaciones se han usado sondas adicionales que determinan variables tales como dióxido de carbono disuelto, potencial oxido-reducción y densidad óptica [70].

1.4 Estado fisiológico

En las últimas décadas, una nueva “variable” de monitoreo ha surgido en los procesos biotecnológicos: el estado fisiológico. Konstantinov y col. [71] lo definieron como las características fisiológicas de una población celular las cuales reflejan cambios en las condiciones de cultivo, tales como la viabilidad, el tamaño y la morfología celular. Por otra parte, Axcell y col. [72] definieron el estado fisiológico como el conjunto de componentes celulares importantes para su actividad fermentativa, tales como los metabolitos y las enzimas que los microorganismos producen durante una fermentación.

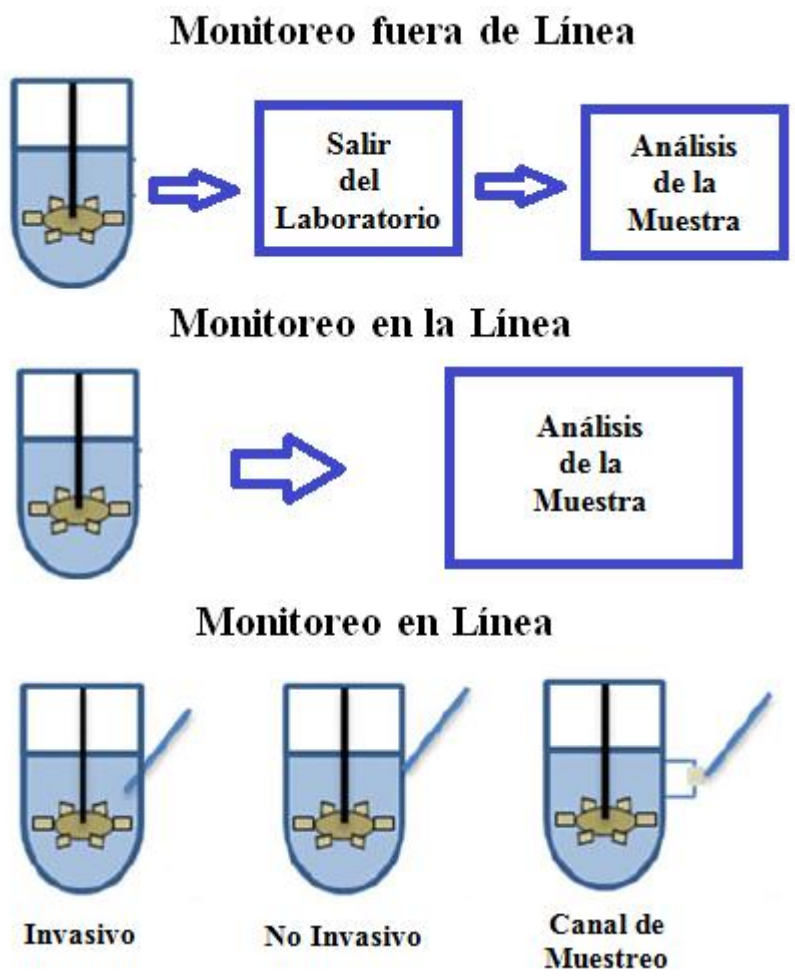

Figura 6. Tipos de monitoreo de bioprocesos.

El conocimiento del estado fisiológico de un microorganismo durante un proceso fermentativo es de vital importancia ya que dicho estado puede afectar en la producción de metabolitos, tanto en su velocidad como en su rendimiento [73], además de su calidad. Diversos autores, principalmente dentro de la industria cervecera, han determinado que el inocular medio de cultivo con células en diferentes estados o fases fisiológicas lleva a resultados diferentes en las producciones de diversos metabolitos.

Powell y col. [74] determinaron la edad celular de sus inóculos de *Saccharomyces cerevisiae* con ayuda de microscopía confocal y marcadores de fluorescencia, posteriormente inocularon medio de cultivo nuevo con células vírgenes, células viejas y una mezcla 50:50 de ambas. Encontraron que la velocidad de atenuación del medio de cultivo así como de generación de etanol, se

incrementó con las mezcla 50:50 de células vírgenes y viejas. Por otro lado, con sólo células vírgenes o viejas los resultados fueron menores. Cabe resaltar que en la industria cervecera se suelen utilizar células provenientes de un gran número de fermentaciones previas, lo cual puede ocasionar bajos rendimientos y baja calidad del producto, la pronta identificación de un estado desfavorable de las células es de gran valor para este sector industrial.

En otro estudio, Rezaei y col. [75] utilizaron células de *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes fases fisiológicas (fase exponencial, cambio diauxico, fase estacionaria) para la fermentación de masa para pan. Encontraron diferencias significativas entre las masas inoculadas con células en diferentes estados, los mejores resultados en cuanto a retención de CO_2 por parte de la masa así como la altura máxima y pH de ésta (factores deseables) y la producción de ácidos orgánicos como succínico y acético (factores indeseables) se dieron con células al inicio del cambio diauxico. Mientras que en las que se utilizaron células viejas los resultados fueron pobres, incluyendo una alta producción de ácido succínico y baja velocidad específica de crecimiento.

1.5 Técnicas utilizadas para el monitoreo de la fisiología celular

En un cultivo microbiano es deseable obtener la máxima producción de metabolitos. Este objetivo se puede lograr si se tiene suficiente información del microorganismo, del medio de cultivo y de las condiciones de operación. Generalmente, en un cultivo microbiano se mide en línea variables como el pH, dO_2 y temperatura; sin embargo, lo que es indispensable conocer son aspectos relacionados con el estado fisiológico de la levadura, por ejemplo las condiciones que favorecen o inhiben la producción de algún metabolito, o el consumo de sustratos de acuerdo a un estado fisiológico de las levaduras. A continuación se describe el estado del arte de algunos sensores que son utilizados para determinar el estado fisiológico de los microorganismos.

1.5.1 Espectroscopía dieléctrica

El equipo de espectroscopía dieléctrica consta de una sonda en línea que incorpora una serie de electrodos con cuatro terminales. Dos terminales externas generan un campo eléctrico de radiofrecuencia y otras dos terminales internas lo miden. El campo eléctrico produce iones suspendidos en el medio y ocasiona que algunos metabolitos del citoplasma de la levadura se muevan hacia uno de los electrodos. Puesto que la membrana plasmática no es conductora, los iones no pueden moverse libremente a través de ella, esto ocasiona una acumulación de carga que polariza las células. Las levaduras actúan como pequeños capacitores dentro del medio de cultivo. A dicha capacidad de acumular carga eléctrica se le llama capacitancia [76].

Las células no viables o que presenten daño en la membrana no interfieren con la señal producida por la sonda. Por lo tanto no se acumula carga eléctrica debido a que lo iones pueden moverse libremente a través de las membranas y las células no se polarizan.

Sin embargo, la magnitud física que mide la sonda de espectroscopía dieléctrica es la permitividad, la cual es directamente proporcional a la capacitancia y describe cómo un campo eléctrico afecta y es afectado por un medio.

La permitividad está determinada por la tendencia de un material a polarizarse ante la aplicación de un campo eléctrico, en nuestro caso, las células vivas en suspensión. Además, ésta depende de la frecuencia del campo eléctrico y decrece en una serie de pasos, llamados dispersión, conforme la frecuencia incrementa (Figura 7).

La medición de biomasa y viabilidad por medio de espectroscopía dieléctrica ha sido establecida como una técnica estándar para el monitoreo y control de la concentración de células de levadura vivas en procesos de producción de cerveza; y también es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica para el monitoreo de la masa celular viable durante fermentaciones microbianas con *Saccharomyces cerevisiae* [77, 78].

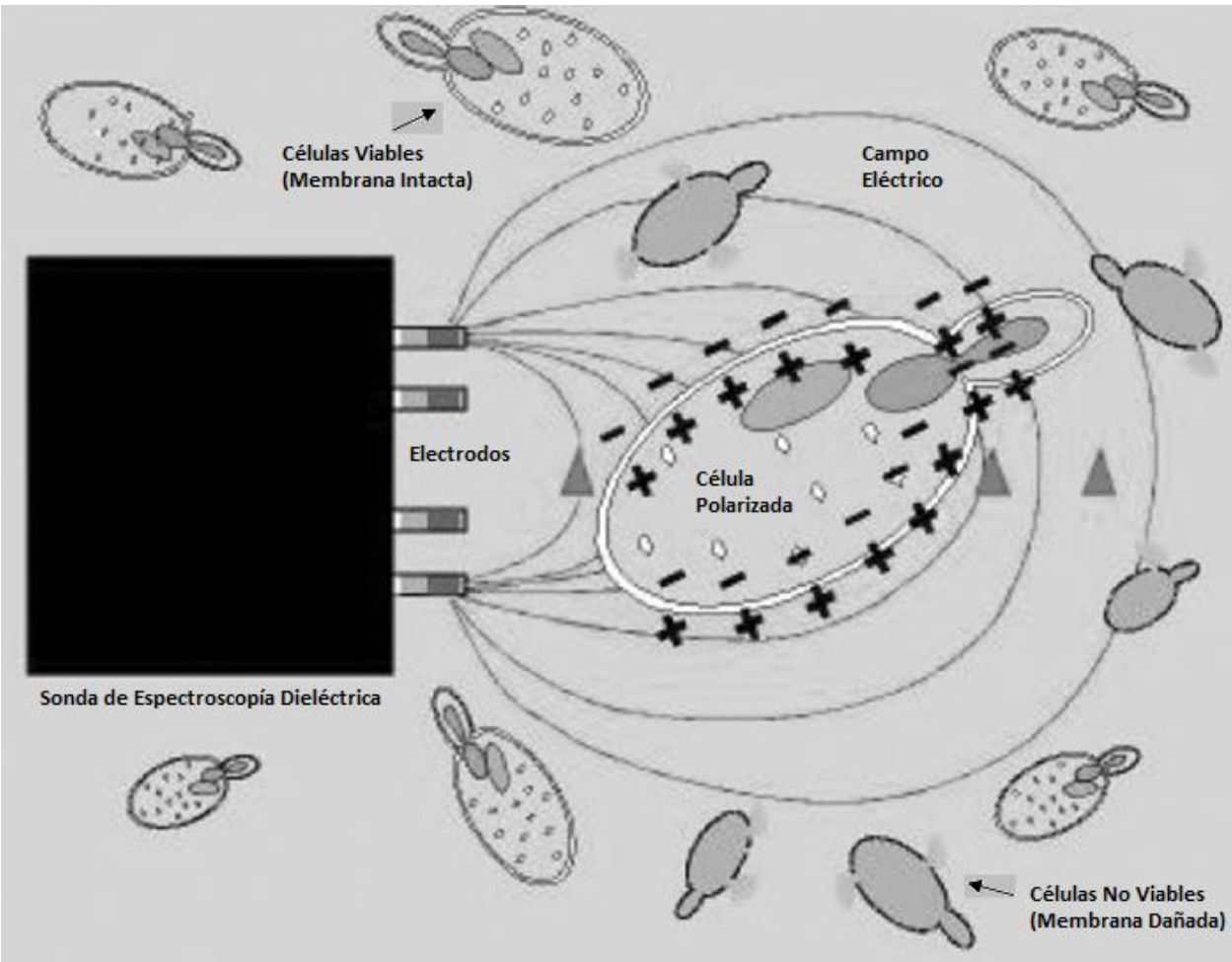

Figura 7. Esquema del principio de medición de viabilidad celular utilizando espectroscopía dieléctrica.

Olguín y col. [79] utilizaron este sistema en un rango de 20 Hz hasta 200 kHz para monitorear el crecimiento de *S. cerevisiae* en un medio de cultivo rico en nutrientes comparándolo con conteos al microscopio utilizando una cámara de Neubauer. Encontraron un índice de correlación de 0.95 entre los datos obtenidos con el conteo tradicional y el sistema de espectroscopía dieléctrica. Por lo tanto, el monitoreo de crecimiento de microorganismos en línea por este método resulta viable para el seguimiento y visualización de diferentes etapas de crecimiento con respecto al tiempo.

En otro trabajo publicado, Tibayrenc y col. [80] reportaron el uso de espectroscopía dieléctrica (Figura 8) en línea para monitorear el efecto de estresar con cambios de temperatura la levadura *S. cerevisiae* durante una fermentación alcohólica. Partiendo de la premisa que las propiedades dieléctricas de las células en suspensión dependen de diferentes variables relacionadas con el

estado fisiológico de la célula: concentración celular, viabilidad y tamaño celular, estado de la membrana plasmática (capacitancia de la membrana) y estado del citoplasma (conductividad intracelular), los autores encontraron diferentes valores de permitividad en las diferentes fases de crecimiento, valores altos en la fase exponencial de la fermentación y menores en la fase estacionaría. Tal comportamiento denotó los diferentes estados fisiológicos del microorganismo durante el proceso fermentativo

Figura 8. Sonda de espectroscopía dieléctrica.

1.5.2 Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es del rango UV-Visible, consiste en la excitación de las moléculas por un láser a niveles mayores de energía y posteriormente decaen a niveles bajos emitiendo radiación (fluorescencia), involucrando transiciones entre los estados electrónicos.

La intensidad de emisión de una sustancia es linealmente proporcional a la concentración del analito a bajas concentraciones. Por lo tanto, la fluorescencia molecular es útil para cuantificar compuestos emisores de radiación. Generalmente fluorescen las sustancias que tienen diversos dobles enlaces conjugados tales como las moléculas orgánicas y los compuestos aromáticos.

En los últimos años, los trabajos donde se utilizó microscopía de fluorescencia reportan el uso de marcadores de fluorescencia como DAPI o bromuro de etidio. El primero es un colorante nuclear fosforescente, se excita con luz ultravioleta para producir una fuerte fluorescencia azul cuando se

encuentra unido al ADN, por lo general se utiliza para marcar e identificar células vivas. El segundo se intercala en el ADN y le otorga un color rojo naranja fluorescente, se utiliza normalmente para identificar células que se encuentran en las etapas finales de la apoptosis, ya que tales células poseen membranas más permeables.

Otros trabajos de investigación se han desarrollado con la finalidad de buscar nuevos y más efectivos marcadores de fluorescencia con posibilidad de ser utilizados en microscopía. En 1997, Millard y col. [81] desarrollaron un compuesto, comercialmente denominado como FUN-1, el cual es permeable a la membrana plasmática, dicho compuesto puede ser metabolizado y transportado a las vacuolas por las células metabólicamente activas, mientras que las células metabólicamente no activas no lo transportan. Una vez en las vacuolas, el FUN-1 es compactado en estructuras cilíndricas de aproximadamente 0.5 – 0.7 µm de diámetro. Las células marcadas con el FUN-1 pueden ser analizadas exponiéndolas a un haz de luz azul (480 nm) y se obtendrá en respuesta una fluorescencia verde, las células vivas tendrán una fluorescencia tenue, mientras que las células muertas fluorescerán con mayor intensidad. Además, si se expone dichas células a un haz de luz verde (540 nm) se visualizarán las estructuras cilíndricas intravacuolares de las células vivas, debido a que estas fluorescerán de color rojo intenso (Figuras 9 y 10).

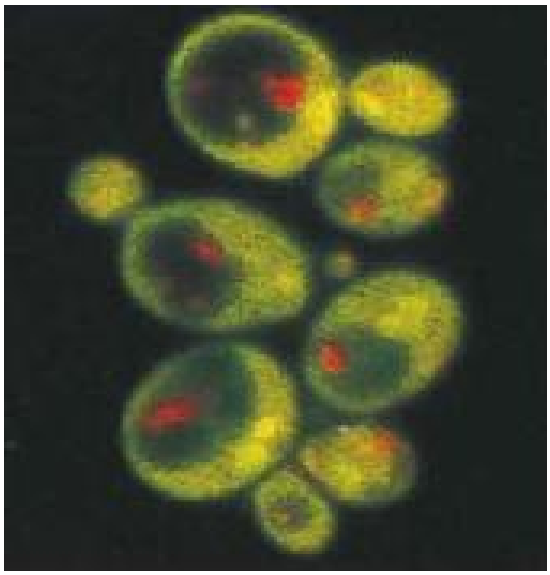

Figura 9. Fotografía de microscopía de fluorescencia con el marcador de fluorescencia FUN-1 obtenida por Millard y col. [81].

Figura 10. Microscopio de fluorescencia.

1.5.3 Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®)

La tecnología CASY® (por sus siglas en inglés) combina una técnica de medición de partículas, llamada "Principio de Medición de Resistencia", con un método moderno de evaluación de señales conocido como "Análisis de Pulso de Área".

La medición se lleva acabo suspendiendo una muestra de células en una solución buffer llamada CASY®ton, que es un electrolito diseñado específicamente para conteo de células. Dichas células son bombeadas a través de un poro de medición de una geometría definida y a una velocidad de flujo constante. Durante el proceso de medición, un pulso de bajo voltaje es aplicado al poro de medición por medio de dos electrodos de platino. El poro de medición electrificado representa una resistencia eléctrica definida. Puesto que las células intactas pueden ser consideradas como compuestos aislantes, se alcanza un alto nivel de resistencia en el poro de medición, dicha resistencia se correlaciona con el volumen de las células. Además, cada irrupción a través del campo eléctrico el sistema lo registra como un "conteo", es decir, una célula, determinando así la concentración de células en la muestra (Figura 11).

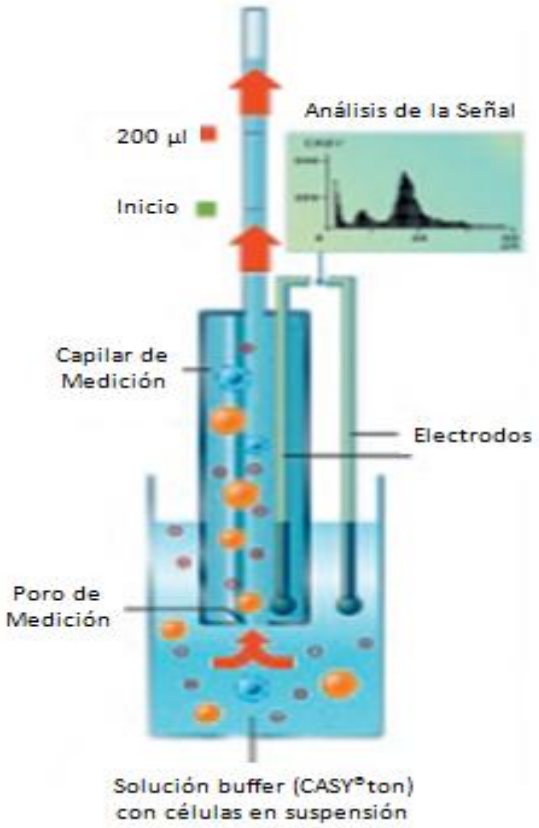

Figura 11. Esquema del principio de medición de tamaño celular con el sistema CASY®.

Tibayrenc y col. [80] utilizaron el sistema CASY® (Figura 12) para determinar el volumen celular de las células viables en un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, dicho procedimiento fue realizado con el propósito de calcular algunas propiedades dieléctricas como lo son: la capacitancia de la membrana y la conductividad interna de las células, estas propiedades dependen de la fracción volumen de las células metabólicamente activas. Los autores encontraron una disminución en el volumen celular conforme avanzaba la fermentación, lo cual coincide con una disminución en la permitividad registrada en el cultivo.

Figura 12. Sistema de análisis y conteo de células (CASY®).

1.5.4 Microscopía o análisis de imágenes

Otra técnica interesante para determinar características importantes de un cultivo microbiano es a través del análisis de imágenes; es decir, capturar una imagen del cultivo y de los microorganismos y mediante descomposición espectral, análisis de patrones y cambios de color, es posible determinar cómo evoluciona un cultivo. Diferentes estudios han reportado el análisis de imágenes como una importante herramienta en la caracterización de cultivos de microorganismo, como levaduras

De Carvalho y col. [82], utilizaron el análisis de imágenes para detectar cambios en la morfología celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* dibujando el contorno de cada célula en una imagen y registrando patrones de cambio en su forma geométrica.

1.5.5 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman se encuentra en el rango del ultravioleta-infrarrojo (UV-IR) (Figura 13), se basa en el esparcimiento inelástico, donde existe un pequeño cambio de la frecuencia de la luz que interactúa con la materia, a este fenómeno se le conoce como esparcimiento de Raman: la frecuencia de la luz sufre un corrimiento con respecto a la frecuencia de excitación, pero la magnitud del corrimiento es independiente de la frecuencia de excitación y es una propiedad intrínseca de la muestra.

Cada enlace diferente dentro de cada molécula orgánica presente en la muestra expuesta al laser Raman de luz monocromática tiene un modo vibracional característico, eso hace que podamos identificar los diversos tipos de enlace que se encuentran en la muestra y dilucidar de qué molécula orgánica se trata.

En la última década se ha utilizado la espectroscopía Raman para la identificación y cuantificación de distintas moléculas orgánicas, entre ellas diversos carotenoides. Papaioannou y col. [83] monitorearon el incremento en la producción de carotenoides totales del hongo filamentoso *Blakeslea trispora*. Encontrando una adecuada correlación lineal del máximo de intensidad Raman con el contenido de carotenoides de una muestra obtenido por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y por espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis).

De manera similar, Cannizaro y col. [84] monitorearon en línea la aparición de astaxantina en un proceso por lote alimentado con la levadura *Phaffia rhodozyma*. Encontraron los tres picos de máxima intensidad Raman característicos de los carotenoides: enlace C = C a 1523 cm^{-1}, enlace C – C a 1157 cm^{-1} y enlace C – H a 10103 cm^{-1}.

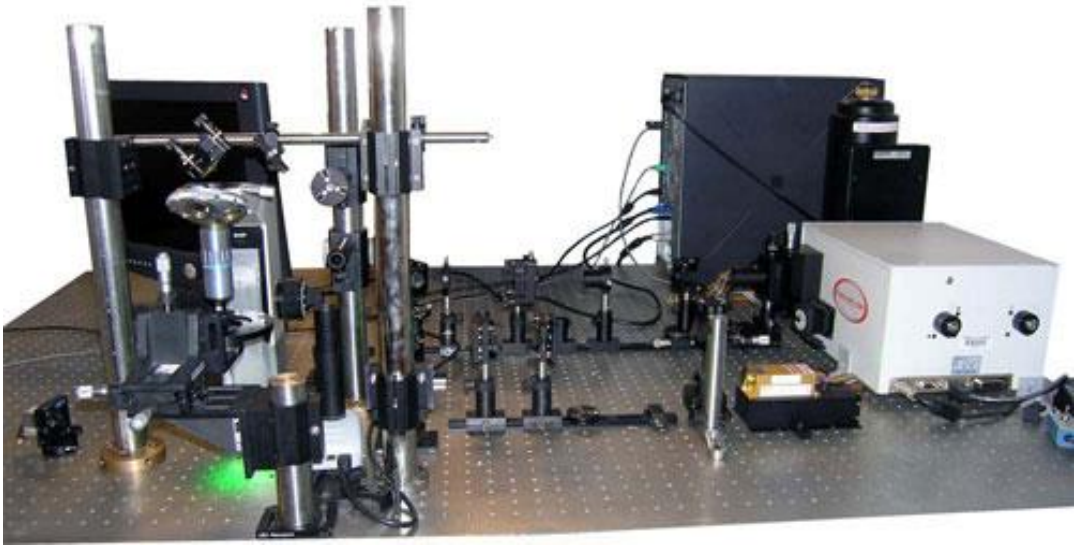

Figura 13. Equipo de espectroscopía Raman.

1.5.6 Análisis de sensibilidad paramétrica

En la actualidad, el monitoreo y control de bioprocesos se han vuelto indispensables para el desarrollo científico e industrial. Un conocimiento más detallado del biosistema permitirá una mejor comprensión del fenómeno y, eventualmente, la optimización del proceso. Una herramienta para desarrollar lo anterior es el uso de modelos cinéticos que describan el crecimiento microbiano, el consumo de sustrato y la formación de producto. Estos modelos pueden ser usados para identificar los parámetros y condiciones óptimas de operación y posteriormente como base para un sistema de control [85].

Sin embargo, de la teoría de ecuaciones diferenciales ordinarias es sabido que sus coeficientes tienen repercusión en su solución, y que los modelos cinéticos no pueden ser considerados exactos, por esta razón, la certidumbre del modelo requiere de un estudio de sensibilidad paramétrica, el cual investiga, de manera sistemática, como influyen los parámetros de las ecuaciones diferenciales sobre las variables de estado que describen el proceso.

Puesto que el objetivo principal de esta tesis es monitorear el estado fisiológico de la levadura, resultaba de suma importancia conocer los parámetros que resulten de mayor importancia dentro del proceso de producción de carotenoides con la levadura *X. dendrorhous*, así como también las

condiciones de operación óptimas para comenzar el trabajo. Por tal motivo se analizó un par de modelos cinéticos previamente propuestos por el equipo de trabajo que describen el comportamiento de las tres variables bioquímicas de mayor relevancia en un bioproceso: producción de biomasa, consumo de sustrato y generación de producto.

En el presente trabajo de tesis se monitoreó en línea el estado fisiológico de un microorganismo, en este caso el de la levadura *X. dendrorhous* durante la producción de astaxantina en un cultivo por lote. Para realizar esta tarea se tomarán en cuenta tres variables que representan el estado fisiológico de dicho microorganismo: (1) viabilidad celular, (2) tamaño celular y (3) producción de astaxantina.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Monitorear en tiempo real el estado fisiológico de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* durante el crecimiento en un cultivo por lote.

2.2 Objetivos específicos

1- Realizar un análisis de sensibilidad paramétrica a dos modelos matemáticos, publicados en la literatura, que describen el proceso de producción de astaxantina con *Xanthophyllomyces dendrorhous* utilizando diferentes estrategias de producción.

2- Implementar los protocolos de los métodos espectroscópicos (Espectroscopía Raman, Espectroscopía dieléctrica, Microscopía de Fluorescencia) y de análisis de imágenes para él monitoreo de la fisiología celular de *X. dendrorhous*.

3- Implementar las técnicas espectroscópicas y de análisis de imágenes para el monitoreo de fermentaciones utilizando la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a nivel matraz y posteriormente a nivel biorreactor.

4- Correlacionar la información obtenida por medio de las técnicas espectroscópicas y microscopía de fluorescencia con el estado fisiológico de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* durante la producción de astaxantina.

3. Hipótesis

Por medio de técnicas espectroscópicas y análisis de imágenes es posible monitorear en tiempo real el estado fisiológico de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* durante la producción de astaxantina.

4. Materiales y métodos

4.1 Microorganismo

En este trabajo de tesis se utilizó la cepa mutante sobreproductora de astaxantina, denominada 25-2, de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Dicha cepa pertenece a la colección de microorganismos de la División de Biotecnología Industrial del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

Para mantener la cepa en un estado viable se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1- La levadura fue cultivada en cajas Petri con medio Agar YM, obtenido de SIGMA-ALDRICH®, el cual contenía: 15 g/L de agar, 30 g/L de extracto de malta y 5 g/L de peptona micológica. La cepa cultivada fue incubada por 72 horas a 20 °C. Posteriormente se colocó en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

2- Se procedió a una primera fase de inóculo en la cual se usaron matraces de 125 mL con 25 mL de medio YM, dicho medio de cultivo fue ajustado a un pH de 5.5 y contenía: 20 g/L de glucosa (SIGMA-ALDRICH®), 5 g/L de peptona bacteriológica (BD Biosciences®), 3 g/L de extracto de malta (SIGMA-ALDRICH®) y 1 g/L de extracto de levadura (SIGMA-ALDRICH®). Se inoculó con dos asadas de la cepa mutante *X. dendrorhous* 25-2 previamente crecida en medio agar YM mencionado anteriormente, los matraces fueron colocados en un orbital rotatorio New Brunswick® Innova 44 por 48 horas a una temperatura de 20 °C y una velocidad de agitación de 250 rpm.

3- Se ejecutó una segunda fase de inóculo, se utilizaron dos matraces de 500 mL con 100 mL del medio YM descrito previamente. Se inoculó con 10% del volumen final de la primera fase de inóculo y los matraces fueron colocados en un orbital rotatorio New Brunswick® Innova 44 por 48 horas a una temperatura de 20 °C y una velocidad de agitación de 250 rpm.

4- Por último, se procedió a llenar crioviales CORNING® de 2 mL con una relación 1:1 de glicerol estéril (SIGMA-ALDRICH®) y medio de cultivo con células, proveniente del inóculo anterior. Dichos crioviales con la cepa fueron introducidos en un ultracongelador Thermo Scientific® 88000 y almacenados a una temperatura de -80 °C para su conservación.

4.2 Medio de cultivo

Para todos los experimentos realizados en esta tesis se utilizó un medio de cultivo químicamente definido, esto con la finalidad de conocer a detalle la composición completa del medio y ser capaces de dilucidar qué elementos dentro de este podrían causar efectos sobre el estado fisiológico de la levadura *X. dendrorhous*. Dicho medio de cultivo fue ajustado a un pH de 5.5 y los compuestos que lo conforman se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Compuestos que conforman el medio de cultivo químicamente definido utilizado en la experimentación de este trabajo de tesis

Compuesto	Concentración (g/L)
Fuente de Carbono	
Glucosa	20.00
Oligoelementos	
$MgCl_2,6H_2O$	0.4122
$ZnCl_2$	0.0192
$CuCl_2$, $2H_2O$	0.0006
$MnCl_2$, $4H_2O$	0.0044
$CoCl_2$, $6H_2O$	0.0005
$CaCl_2$	0.0174
$FeCl_2$, $4H_2O$	0.0116
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $4H_2O$	0.0003
H_3BO_3	0.0030
Vitaminas	

Ácido 4-aminobenzoico	0.001
Mioinositol	0.125
Ácido nicotínico	0.005
Ácido pantoténico	0.005
Piridoxina	0.005
Tiamina HCl	0.005
Biotina	0.000012
Sales	
KH_2PO_4	3.00
$(NH_4)_2SO_4$	3.00
Na_2HPO_4, $2H_2O$	1.49
Glutamato	1.00

4.3 Cultivos realizados a nivel matraz

4.3.1 Preparación del inóculo

Los inóculos utilizados en las fermentaciones con matraces constaron de dos fases que se describen a continuación:

1) Se inocularon dos matraces de 125 mL con 25 mL de medio químicamente definido con dos crioviales de la cepa mutante sobreproductora de astaxantina, denominada 25-2, de la levadura *X. dendrorhous*. Dichos matraces fueron colocados en un orbital rotatorio New Brunswick® Innova 44 por 48 horas a una temperatura de 20 °C y una velocidad de agitación de 250 rpm.

2) Se inocularon dos matraces de 500 mL con 100 mL de medio químicamente definido con 10 ml (10% del volumen total) del inóculo de la fase anterior. Dichos matraces fueron colocados en un orbital rotatorio New Brunswick® Innova 44 por 48 horas a una temperatura de 20 °C y una velocidad de agitación de 250 rpm.

4.3.2 Preparación de materiales

Para la experimentación a nivel matraz se utilizaron matraces de 250 mL, dichos matraces fueron lavados con agua corriente y jabón, enjuagados con agua destilada para posteriormente dejarlos secar. Una vez secos, se les introdujeron 50 mL de medio químicamente definido y se procedió a esterilizar los matraces en una autoclave Yamato® SM510 a una temperatura de 121 °C por 15 minutos.

Cuando el ciclo de esterilización terminó, los matraces fueron sacados del autoclave y se dejaron enfriar a temperatura ambiente; después, los matraces fueron inoculados con 10% del volumen total y se incubaron en un orbital rotatorio New Brunswick® Innova 44 a una temperatura de 20 °C y una velocidad de agitación de 250 rpm. La duración de la fermentación varió para cada experimento realizado y el muestreo consistió en tomar un par de matraces en cada tiempo.

4.4 Cultivos realizados a nivel biorreactor

4.4.1 Preparación del inóculo

Los inóculos utilizados en las fermentaciones con biorreactor constaron de tres fases que se describen a continuación:

1) Se inocularon dos matraces de 125 mL con 25 mL de medio químicamente definido con 2 crioviales de la cepa mutante sobreproductora de astaxantina, denominada 25-2, de la levadura *X. dendrorhous*. Dichos matraces fueron colocados en un orbital rotatorio New Brunswick® Innova 44 por 48 horas a una temperatura de 20 °C y una velocidad de agitación de 250 rpm.

2) Se inocularon dos matraces de 500 mL con 100 mL de medio químicamente definido con 10 ml (10% del volumen total) del inóculo de la fase anterior. Dichos matraces fueron colocados en un orbital rotatorio New Brunswick® Innova 44 por 48 horas a una temperatura de 20 °C y una velocidad de agitación de 250 rpm.

3) Se inocularon dos matraces de 1 litro con 200 mL de medio químicamente definido con 20 ml (10% del volumen total) del inóculo de la fase anterior. Dichos matraces fueron colocados en un orbital rotatorio New Brunswick® Innova 44 por 48 horas a una temperatura de 20 °C y una velocidad de agitación de 250 rpm. El volumen total de uno de estos dos matraces se utilizó para inocular el biorreactor.

4.4.2 Preparación de materiales e instrumentación

Para la preparación del biorreactor de las distintas cinéticas desarrolladas se realizó lo siguiente: Primero, el biorreactor Applikon® con capacidad de 3L fue lavado con agua corriente y enjuagado con agua destilada para finalmente dejarlo secar. Una vez seco, al fermentador se le adicionó 1.7L del medio de cultivo químicamente definido, se colocó la tapa, cuya parte inferior lleva consigo las propelas, baffles, tubo aireador, tubo de toma de muestra y orificios de alimentación para distintas soluciones; en la parte superior, se encuentran los puertos donde pueden ser conectados los diferentes electrodos (pH, oxígeno disuelto, temperatura, espectroscopía dieléctrica).

Después, se procedió a calibrar el electrodo de pH con soluciones buffer de pH 4 y 7, dicho electrodo es el único que se calibra antes de esterilizar todo el sistema. Posteriormente, se colocaron las distintas mangueras Masterflex® L/S 16 usadas para: alimentar soluciones ácido y base (HCl y NaOH al 1M) para controlar el pH, entrada y salida del aire, además de adquisición de muestras; a cada una de estas mangueras se les colocó un filtro Millipore® de 0.2 μm con el fin de mantener la esterilidad dentro de biorreactor. Como último paso antes de esterilizar, se colocaron pinzas Mhor a cada una de las mangueras y los tornillos del cierre hermético del fermentador no se apretaron totalmente, esto para evitar derrames dentro de la autoclave a causa de las altas presiones. Finalmente, se procedió a esterilizar el biorreactor en una autoclave Yamato® SM510 a una temperatura de 121 °C por 15 minutos.

Terminado el ciclo de esterilización, el biorreactor fue extraído del autoclave y colocado en el área de trabajo. Después, se conectó un recirculador Julabo® F25, el cuál mantuvo al fermentador

a una temperatura de 20°C. Durante el enfriamiento del biorreactor, se conectó la manguera de alimentación de aire y ésta se fijó a un flujo de 1 vvm; posteriormente, se encendieron las propelas y se estableció una velocidad de agitación de 900 rpm. Por último, se conectaron las mangueras de alimentación de las soluciones ácido y base a dos bombas peristálticas Masterflex® L/S.

Una vez que el biorreactor se enfrió por completo, se procedió a conectar los siguientes electrodos:

1) El sensor de pH, calibrado antes del ciclo de esterilización, se conectó a un biocontrolador Applikon® ADI 1030, dicho controlador monitoreó y controló el pH del medio de cultivo en un valor de 5.5.

2) El detector de temperatura resistivo (RTD, por sus siglas en inglés) se calibró en un rango entre 0 y 75°C y se conectó a un biocontrolador Applikon® ADI 1030, este electrodo monitoreó la temperatura con el fin de que el operador ejerciera alguna acción correctiva si el valor de la temperatura se desviaba de los 20°C deseados.

3) El electrodo de oxígeno disuelto se conectó a un biocontrolador Applikon® ADI 1030 y se dejó polarizando por 12 horas, antes de iniciar la fermentación el porcentaje de oxígeno disuelto se calibró al 100% y en el controlador se fijó como setpoint el valor de 75%, con el objetivo de que la cepa tenga suficiente oxígeno para su crecimiento y procesos vitales.

4) La sonda de espectroscopía dieléctrica FOGALE® nanotech se conectó a su terminal EVO® Box y se ejecutó el software EVO® 400 para registrar los datos obtenidos en línea; por último, se ajustó el cero en la permitividad y conductividad del medio de cultivo antes de iniciar la fermentación.

4.5 Técnicas analíticas

4.5.1 Crecimiento celular

Para todos los experimentos, el crecimiento de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* se cuantificó por tres métodos:

a) **Densidad óptica:** Se determinó la absorbancia, de las muestras obtenidas en las fermentaciones, a 600 nm en un espectrofotómetro de microplacas xMark™ de Bio-Rad®. Para realizar la medición se agregaban 200 µL de la muestra en un micropozo, si la absorbancia estaba por encima de 1 UO, la muestra se diluyó como fuera necesario. Cabe mencionar que cada determinación se realizó por duplicado.

b) **Conteo en Cámara Neubauer:** Se utilizó una Cámara Neubauer Marienfeld®, dicha cámara fue llenada, en cada medición (duplicado), con 10 µL de muestra para realizar el conteo celular. Se contó la cantidad de células en 5 cuadros de la Cámara, los cuatro cuadros de las esquinas y el central, esto con el fin de evaluar de forma estadística el experimento. El conteo celular se llevó a cabo en un microscopio Leica® CME. Para realizar el cálculo de la población celular total en la muestra analizada se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Población Celular (Mcells/mL)} = (C/5)*0.25*D \qquad (1)$$

donde:

C= Conteo de células en los 5 cuadros

D= Dilución utilizada en la medición

c) **Peso seco:** Para esta prueba se utilizaron microtubos Axygen®, los cuales fueron introducidos en un horno Felisa® a 50°C por 24 horas, dichos microtubos fueron marcados y pesados de forma individual en una balanza analítica AND® hasta obtener

peso constante. Después, los microtubos fueron colocados en un desecador hasta su utilización en los diferentes muestreos.

Se utilizó 1 mL de muestra para realizar cada determinación (duplicado), los microtubos con las muestras fueron colocados en una centrifuga Labnet® Prismir durante 5 minutos a 13,000 rpm; el sobrenadante fue almacenado en un congelador Torrey® para ser utilizado en pruebas posteriores. La pastilla celular fue lavada dos veces con 1 mL de agua destilada con el propósito de eliminar todo residuo del medio de cultivo. Después del segundo lavado, se removió el agua destilada y los microtubos fueron colocados en un horno Felisa® a 50°C por 48 horas. Pasado este periodo, los microtubos fueron pesados en una balanza analítica AND® y la diferencia entre el peso sin muestra del microtubo y con muestra libre de humedad representó el peso seco de la biomasa en gramos por litro:

$$\text{Peso Seco (g/L)} = (P2-P1)*1000 \qquad (2)$$

donde:

P1= Peso del microtubo a peso constante

P2= Peso del microtubo y la muestra seca a peso constante

4.5.2 Cuantificación de azúcares

Para la cuantificación de azúcares consumidos se utilizó el método del ácido 3-5, dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller y col. [86], el cual mide la cantidad de azúcares reductores totales presentes en una muestra. El DNS tiene capacidad reductora en uno de los extremos de los azúcares y se convierte en ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico, cuya presencia es detectada por absorción de luz a 550 nm.

Los reactivos utilizados para la preparación del reactivo DNS se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Reactivos y concentraciones utilizados en la preparación del DNS

Reactivo	Concentración (g/L)
NaOH	10
Ácido 3-5, Dinitrosalicílico	10
Tartrato de Sodio y Potasio	200
Fenol	2
Metabisulfito de Sodio	0.5

Los reactivos mencionados fueron disueltos en aproximadamente 600 mL de agua destilada, dejando al final el ácido 3-5 dinitrosalicílico, el cual se adicionó poco a poco hasta lograr su completa disolución. Por último, se aforó a un litro con agua destilada.

La curva de calibración para la solución DNS preparada se realizó de la siguiente manera: se preparó una solución de glucosa a 20 g/L, de esta solución se hicieron diluciones, tomando alícuotas con concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 g/L. En microtubos Axygen®, se colocó 0.5 mL de cada alícuota y 0.5 mL de DNS, estos se agitaron suavemente en un agitador vortex Selected Vortexer® y se colocaron en baño María por 5 minutos. Finalizado el tiempo, se retiraron del baño María y se colocaron en agua fría para detener la reacción. Por último, se agregaron 300 µL de agua destilada y se agitó en el vortex. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro de microplacas xMark™ de Bio-Rad® a 550 nm.

De acuerdo con las absorbancias obtenidas de las diluciones de la solución patrón, se realizó una regresión lineal de la gráfica Absorbancia vs Concentración para determinar cuantitativamente los azúcares reductores. Cabe mencionar que para cada experimento se realizó una nueva curva de calibración, con diferentes valores de pendiente e intercepto pero con valores de constante de correlación siempre superiores a 0.98.

4.5.3 Cuantificación de carotenoides totales

Para la determinación de la concentración de carotenoides totales en las muestras obtenidas durante la experimentación realizada en este trabajo se siguieron los pasos a continuación:

Se tomó 0.5 mL de muestra (duplicado) en un microtubo y se colocó en una centrifuga Labnet® Prismir durante 5 minutos a 13,000 rpm, el sobrenadante fue recuperado y almacenado en un congelador Torrey® para ser utilizado en pruebas posteriores, la pastilla celular fue lavada dos veces con 0.5 mL de agua destilada con el propósito de eliminar todo residuo del medio de cultivo. Una vez hechos los dos lavados, se retira el sobrenadante y el exceso es removido con papel absorbente. La extracción de los carotenoides totales fue realizada de acuerdo a la técnica descrita por Sedmark y col. [87], con algunas modificaciones.

Con el propósito de romper la pared celular, al microtubo con la pastilla celular se le agregó 0.5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a una temperatura de 55°C y se le aplicó un pulso con un sonicador de vástago Ultrasonic Processor® GEX130 para reafirmar el rompimiento de la pared celular. Después, se homogenizó por 1 minuto con ayuda de un vortex e inmediatamente se le adicionó 0.1 mL de buffer fosfato de sodio (10 mM, pH 7) y 0.8 mL de una mezcla de acetato de etilo: hexano 1:1 (v/v), se volvió a homogenizar por un periodo de 1 minuto.

La fase orgánica y la fase acuosa fueron separadas centrifugando el microtubo en durante 1 minuto a 13,000 rpm. Posteriormente, la fase orgánica fue trasvasada a un nuevo microtubo y se colocó en un concentrador a vacío Thermo Scientific® DNA 120 por 20 minutos, para remover el solvente donde los carotenoides están disueltos. Posteriormente, el microtubo fue extraído del concentrador a vacío y los carotenoides se resuspendieron en 0.5 mL de isopropanol. Finalmente, se midió la absorbancia de los carotenoides suspendidos en isopropanol a 480 nm en un espectrofotómetro de microplacas xMark™ de Bio-Rad.

La concentración de carotenoides totales fue calculada de la siguiente forma:

$$\text{Concentración de Carotenoides } (\mu g/L) = (A*V1*1x10^{7}) / (E*L*V2) \quad (3)$$

donde:

A= Absorbancia de la muestra a 480 nm

V1= Volumen del sobrenadante (mL)

V2= Volumen inicial de la muestra (mL)

L= Trayecto Óptico (0.625 cm)

E= Coeficiente de Extinción Molar (2150)

4.5.4 Viabilidad celular

Para la determinación de la viabilidad celular durante las fermentaciones realizadas en esta tesis se utilizaron dos técnicas:

a) **Espectroscopía dieléctrica**

Para la medición de la viabilidad celular dentro de un cultivo de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* con esta técnica se utilizó una sonda de espectroscopía dieléctrica FOGALE® nanotech, la cual fue utilizada de diferente manera dependiendo del tipo de fermentación: nivel matraz o nivel biorreactor.

Para las fermentaciones a nivel matraz se colocó la sonda en un soporte universal a una altura suficiente que garantizó se mantuviera sumergida 3 cm dentro de la muestra, contenida en un matraz de 125 mL. Después, se conectó a su terminal EVO® Box y se ejecutó el software EVO® 400 para registrar los datos obtenidos; la muestra se mantuvo a una agitación constante de 200 rpm con ayuda de un agitador magnético CORNING® durante 1 hora. Por último, se tomaron un promedio de las mediciones de permitividad arrojadas por la sonda de espectroscopía dieléctrica. Todo lo anterior se realizó para cada tiempo de muestreo durante la fermentación.

En las fermentaciones a nivel biorreactor la sonda se colocó en un puerto en la tapa del fermentador la cual se enroscó herméticamente para mantener la esterilidad, la sonda se conectó a su terminal EVO® Box y se ejecutó el software EVO® 400 para registrar en línea los datos generados.

b) **Microscopía de fluorescencia**

Para la determinación de la viabilidad celular por medio de microscopía dieléctrica se utilizó un marcador de fluorescencia, cuyo nombre comercial es FUN-1®. Dicho marcador de fluorescencia fue obtenido de Life Technologies® como una solución en dimetilsulfóxido anhidro a una concentración de 10 mM.

Se tomó en un microtubo una muestra con una concentración celular de entre 10^7 – 10^8 células/mL. El microtubo se colocó en una centrifuga Labnet® Prismir durante 5 minutos a 13,000 rpm, el sobrenadante fue desechado y la pastilla celular fue resuspendida en una solución buffer 2% glucosa y 10 mM de Na_2HPO_4. El volumen de buffer a agregar fue calculado de tal manera que la concentración final de FUN-1® fuera de entre 5 y 20 μM. Una vez agregado el marcador de fluorescencia, la muestra se colocó en un termo agitador para microtubos Eppendorf® a 30°C y 700 rpm durante 30 minutos. Concluido este tiempo, 5 μL de la muestra fueron colocados en un portaobjetos y después se colocó un cubreobjetos encima de la muestra. La preparación se visualizó en un microscopio Leica® DMRA2, con fluorescencia.

Para visualizar la fluorescencia se utilizaron dos espejos dicroicos, el primero de ellos deja pasar luz con una longitud de onda de 480 nm (luz azul) proveniente de la lámpara de mercurio y permite el paso de regreso de fluorescencia de emisión de 540 nm (luz verde); el segundo espejo dicroico permite el paso de luz con longitud de onda de 540 nm (luz verde) y deja pasar de regreso fluorescencia de emisión de 610 nm (luz roja). Estas dos fluorescencias permitieron conocer la viabilidad de las células analizadas en la muestra.

Las fotografías fueron tomadas por una cámara Leica® incorporada al microscopio y visualizadas en el software Image-Pro® Plus, en dicho programa las imágenes pueden ser convertidas a

distintos tipos de extensiones para archivos de imagen (jpg, png, tif) con la finalidad de mejorar la resolución.

4.5.5 Tamaño y volumen celular

Para la determinación de viabilidad durante las fermentaciones realizadas en este trabajo de tesis se utilizaron dos técnicas:

a) Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY)

Se utilizó un CASY TT® de INNOVATIS® para determinar el tamaño y volumen celular de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* presente en las muestras obtenidas durante una fermentación. Dicha muestra fue resuspendida en 10 mL de una solución buffer CASYton® puesta dentro de un recipiente cilíndrico llamado CASYcup®, el cual está libre de toda partícula que puedan interferir con la medición. Cabe mencionar que la cantidad de muestra adicionada se calcula de tal forma que haya un máximo de $1x10^5$ células en los 10 mL de CASYton®

La muestra en suspensión fue colocada en el equipo, el cual lleva a cabo tres mediciones, succionando 200 μL cada vez. Una vez concluidas las tres determinaciones, el equipo generó los resultados de la distribución de diámetros celulares en la muestra. De manera simultánea, con ayuda del programa CASY Excel® 2.4, fue posible almacenar, visualizar y graficar los resultados obtenidos en cada medición.

b) Microscopía

Para determinar el tamaño y volumen celular por medio de esta técnica se utilizaron las muestras ya preparadas para las pruebas de microscopía de fluorescencia, dichas muestras fueron visualizadas en un microscopio Leica® DMRA2 utilizando sólo una lámpara de halógeno, sin encender la lámpara de mercurio para fluorescencia. Se utilizó también el software Image-Pro® Plus para analizar las imágenes. Dentro de dicho programa, existe una función con la cual fue

posible medir el diámetro celular, trazando una línea transversal a cada célula en una fotografía y especificando al software el aumento con el cual se tomó la imagen.

Las mediciones efectuadas con el programan permiten determinar tamaño y volumen celular promedio de las muestras provenientes de una fermentación.

4.5.6 Detección de astaxantina por espectroscopía Raman

Para la detección de astaxantina en las muestras producidas en las fermentaciones a lo largo de este trabajo de tesis se utilizó la técnica de espectroscopía Raman.

Se tomó 1 mL de muestra y fue colocada en un vial de vidrio transparente Agilent® de 1.5 mL, dicho vial fue colocado frente a un haz de luz monocromática (Edmunds Optics® - 532 nm) de espectroscopía Raman a 7 mm de distancia. La señal de respuesta proveniente de la muestra fue recibida y procesada por un transformador Ocean Optics® QE65000 y fue enviada al software especializado SpectraSuite®, en el cual fue posible visualizar el espectro de esparcimiento Raman de cada una de las muestras analizadas.

Posteriormente, dichos espectros fueron procesados en el programa Excel™ y posteriormente fueron normalizados con la herramienta Curve Fitting® de MATLAB®, con la finalidad de bajar la línea base a cero, de eliminar el ruido provocado por la fluorescencia de la muestra y de ser capaces de visualizar de manera más acertada la altura de los picos de los enlaces representativos de la astaxantina (enlace C = C a 1520 cm^{-1}, enlace C – C a 1157 cm^{-1} y enlace C – H a 1010 cm^{-1}).

4.5.7 Análisis de sensibilidad paramétrica

Para el análisis de sensibilidad paramétrica realizado en este trabajo de tesis se utilizaron dos modelos cinéticos que describen la producción de biomasa, el consumo de sustrato y la generación de producto con respecto al tiempo. Dichos modelos cinéticos fueron reportados por Luna y col. [88]. En la Tabla 5 se describen las variables y parámetros utilizados.

Tabla 5. Nomenclatura usada en el desarrollo del análisis de sensibilidad paramétrica

Nomenclatura	
x_1	Concentración de biomasa (gL^{-1})
x_2	Concentración de sustrato (gL^{-1})
x_3	Concentración de producto (μgL^{-1})
x_4	Volumen (L)
~	Coeficiente de formación de producto asociado al crecimiento (μgg^{-1})
	Coeficiente de formación de producto no asociado al crecimiento ($\mu gg^{-1}h^{-1}$)
¥	Término exponencial para el modelo de inhibición por producto
D	Tasa de dilución (h^{-1})
F	Velocidad de flujo (Lh^{-1})
K_i	Constante de inhibición por sustrato (gL^{-1})
K_p	Constante de inhibición por producto (μgL^{-1})
K_s	Constante de saturación de sustrato (gL^{-1})
m_s	Coeficiente de mantenimiento celular ($gg^{-1}h^{-1}$)
S_f	Concentración de sustrato de entrada (gL^{-1})
«	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
$«_{max}$	Máxima velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
$Y_{X/S}$	Rendimiento de biomasa sobre sustrato (gg^{-1})

Para estos modelos se tomaron en cuenta los siguientes supuestos:

1- Aunque el jugo de dátil se compone principalmente de fructosa y glucosa, la concentración de azúcar en el medio se trató como un sustrato único.
2- No existe limitación de oxígeno en el cultivo.
3- No existe limitación de nitrógeno.
4- La producción de etanol y glicerol son despreciables.

4.5.7.1 Modelo cinético por lote

Un balance diferencial para describir la biomasa está dado por:

$$\frac{dx_1}{dt} = «x_1 \qquad (4)$$

donde « es la velocidad específica de crecimiento. El balance de masa de sustrato rige la producción de biomasa, así como el mantenimiento celular y está dado por:

$$\frac{dx_2}{dt} = -\left(m_s + \frac{«}{Y_{X/S}} \right) x_1 \qquad (5)$$

La levadura *X. dendrorhous* produce carotenoides en la fase de crecimiento exponencial y en la fase estacionaria, por lo tanto, la producción de carotenoides puede ser descrita por la ecuación de Luedeking-Piret [89].

$$\frac{dx_3}{dt} = (\sim« + \quad) x_1 \qquad (6)$$

Las ecuaciones diferenciales (4) - (6) describen la cinética de crecimiento de biomasa, consumo de sustrato, y la producción de carotenoides en un cultivo por lote.

4.5.7.2 Modelo cinético por lote alimentado

Las ecuaciones diferenciales (4)-(6) pueden ser modificadas para describir una fermentación por lote alimentado, el modelo incluye los efectos del sustrato de alimentación, el factor de dilución y el cambio de volumen:

$$\frac{dx_1}{dt} = (« - D) x_1 \qquad (7)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = -\left(m_s + \frac{«}{Y_{X/S}} \right) x_1 + D(S_f - x_2) \tag{8}$$

$$\frac{dx_3}{dt} = (\sim « + \quad) x_1 - D x_3 \tag{9}$$

$$\frac{dx_4}{dt} = F \tag{10}$$

donde $D = F / x_4$ representa la tasa de dilución.

La velocidad de crecimiento de *X. dendrorhous* se inhibe por altas concentraciones de sustrato [90]. También ha sido reportado que el aumento en la acumulación intracelular de carotenoides ejerce un grado de inhibición [91]. Una opción directa para representar la velocidad específica de crecimiento es la combinación de la inhibición por sustrato y producto:

$$« = \frac{«_{\max} x_2}{K_s + x_2 + (x_2^2 / K_i)} \left(1 - \frac{x_3}{K_p} \right)^{¥} \tag{11}$$

4.5.7.3 Procedimiento matemático

Se realizó el análisis de sensibilidad paramétrica con el propósito de establecer los parámetros ‘sensibles’, es decir, aquellos que tienen un mayor impacto en cada una de las ecuaciones diferenciales que forman los modelos cinéticos. Las variables y parámetros analizados en los modelos cinéticos se muestran en la Tabla 6. Los valores utilizados para los parámetros (Tabla 7) fueron idénticos a los utilizados por Luna y col. [88].

Tabla 6. Variables y parámetros estudiados en el análisis de sensibilidad paramétrica

Modelo	Variables	Parámetros
Lote	x_1, x_2, x_3	$Y_{X/S}$, m_s, ~ , , $«_{\max}$, K_s, K_i, K_p, ¥
Lote Alimentado	x_1, x_2, x_3, x_4	$Y_{X/S}$, m_s, ~ , , $«_{\max}$, K_s, K_i, K_p, ¥, S_f, D, F

Tabla 7. Valores numéricos para los parámetros estudiados en el análisis de sensibilidad paramétrica

Parámetro	Lote	Lote Alimentado
$Y_{X/S}$	0.3941 ($gg^{-1}h^{-1}$)	0.3713 ($gg^{-1}h^{-1}$)
m_s	0.005 ($gg^{-1}h^{-1}$)	0.005 ($gg^{-1}h^{-1}$)
~	371.45 (μgg^{-1})	536.92 (μgg^{-1})
	1.5502 ($\mu gg^{-1}h^{-1}$)	1.0184 ($\mu gg^{-1}h^{-1}$)
«$_{max}$	0.1450 (h^{-1})	0.1258 (h^{-1})
K_s	1.6607 (gL^{-1})	1.3463 (gL^{-1})
K_i	50.3151 (gL^{-1})	57.5259 (gL^{-1})
K_p	8798.15 (μgL^{-1})	8466.25 (μgL^{-1})
¥	3.6558	1.2109
S_f	-	65 (gL^{-1})
F	-	0.00021 (Lh^{-1})
D	-	F/x_4

Partimos de un modelo matemático descrito por:

$$\frac{dx}{dt} = f(x, t, °) \tag{12}$$

donde x, son las variables de estado, t es el tiempo y ρ representa los parámetros del sistema.

La matriz de sensibilidad paramétrica S está dada por:

$$\frac{dS}{dt} = \left(\frac{\partial f}{\partial x}\right) S + \frac{\partial f}{\partial °} \tag{13}$$

donde,

$$S = \begin{bmatrix} S_{11} & \cdots & S_{1j} \\ \vdots & \cdots & \vdots \\ S_{i1} & \cdots & S_{ij} \end{bmatrix} \tag{14}$$

$$S_{ij} = \frac{\partial x_i}{\partial p_j} \tag{15}$$

Entonces $\partial f/\partial x$ está dada por la derivada parcial de cada una de las ecuaciones diferenciales con respecto a cada una de las variables. El primer subíndice corresponde al número de ecuación a evaluar y el segundo a la variable evaluada.

$$\frac{\partial f}{\partial x} = \begin{bmatrix} s_{11} & s_{12} & s_{13} \\ s_{21} & s_{22} & s_{23} \\ s_{31} & s_{32} & s_{33} \end{bmatrix} \tag{16}$$

Por ejemplo, "s_{12}" corresponde a la ecuación diferencial que representa el cambio en la concentración de biomasa con respecto al sustrato, tal como se muestra a continuación:

$$\frac{\partial x_1}{\partial x_2} = \left(\frac{x_1 «_{\max} \left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{x_2^{\,2}}{K_i} + x_2 + K_s} \right) - \frac{x_2 x_1 «_{\max} \left(\frac{\left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s} \right)}{\left(\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s \right)^2} \tag{17}$$

De esta forma se genera una matriz de derivadas parciales con respecto a cada uno de los parámetros. Cada fila en la matriz representa una variable analizada y la derivada se determinó para cada uno de los 9 parámetros del sistema por lote y 12 parámetros para el sistema por lote alimentado.

De esta forma se generan un total 30 ecuaciones diferenciales para el modelo cinético por lote y 52 para el modelo por lote alimentado; dichas ecuaciones fueron evaluadas con el programa MATLAB 7®. Como ejemplo se muestra la ecuación diferencial ubicada en la fila 2 y columna 2 del modelo por lote:

$$\dot{S}_{22} = ¤_1 - ¤_2 + ¤_3 - ¤_4 \tag{18}$$

donde,

$$¤_1 = S_{22}\left(\frac{x_1 «_{\max}\left(1-\frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{x_2^2}{K_i}+x_2+K_s}\right) \tag{19}$$

$$¤_2 = \left(\frac{x_2 x_1 «_{\max}\left(\frac{\left(1-\frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{2x_2}{K_i+1}}\right)}{\left(\frac{x_2^2}{K_i}+x_2+K_s\right)^2}\right) \tag{20}$$

$$¤_3 = \left(\frac{S_{12} x_2 «_{\max}\left(1-\frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{x_2^2}{K_i}+x_2+K_s}\right) \tag{21}$$

$$¤_4 = \left(\frac{S_{32} x_2 x_1 ¥ «_{\max} \left(1 - \frac{x_3}{K_p} \right)^{¥ -1}}{K_p \left(\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s \right)} \right) \qquad (22)$$

En este capítulo se describió la metodología utilizada para la experimentación de este trabajo de tesis, desde el microorganismo y el medio de cultivo empleados, hasta la descripción detallada de las técnicas analíticas montadas y usadas en las diferentes fermentaciones. Además, se explicó el procedimiento matemático para llevar a cabo el análisis de sensibilidad paramétrica, así como la puntualización de las variables y parámetros a estudiar.

5. Resultados y discusiones

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos en este trabajo de investigación. Primero, se exponen los parámetros llamados “sensibles” resultantes del análisis de sensibilidad; posteriormente, se presentan los datos obtenidos de las fermentaciones ejecutadas a nivel matraz y a nivel biorreactor, así como también el análisis, discusión y comparación de los resultados con datos provenientes de diferentes trabajos de investigación reportados previamente.

5.1 Análisis de sensibilidad paramétrica

Con el propósito de conocer los valores numéricos de los parámetros de mayor importancia dentro del proceso de producción de carotenoides con la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* se realizó un análisis de sensibilidad paramétrica a un par de modelos cinéticos previamente propuestos por Luna y col. [92]. Dichos modelos cinéticos describen los cambios con respecto al tiempo de variables bioquímicas críticas en cualquier proceso biotecnológico: crecimiento del microorganismo, consumo de sustrato y generación de producto.

5.1.2 Modelo cinético por lote

La Figura 14 muestra los resultados del análisis de sensibilidad paramétrica para cultivo por lote. En el inciso ‘a’ se puede observar que el único parámetro que impactó de manera positiva en la generación de biomasa fue la máxima velocidad específica de crecimiento ($«_{max}$); esto concuerda con el estudio en cultivo continuo de este microorganismo reportado por Calderón y col., [93]. En el inciso ‘b’ se detectaron tres parámetros con influencia significativa sobre el consumo de sustrato. $«_{max}$ y el coeficiente de mantenimiento celular (m_s) tienen un efecto negativo sobre el sustrato, mientras que el rendimiento de biomasa sobre sustrato ($Y_{x/s}$) lo afectó de manera positiva. En el inciso ‘c’ se puede apreciar que el parámetro “sensible” durante la generación de astaxantina fue de nueva cuenta $«_{max}$, esto positivamente. Cabe señalar que el resto de los parámetros no tuvieron una influencia significativa sobre el sistema.

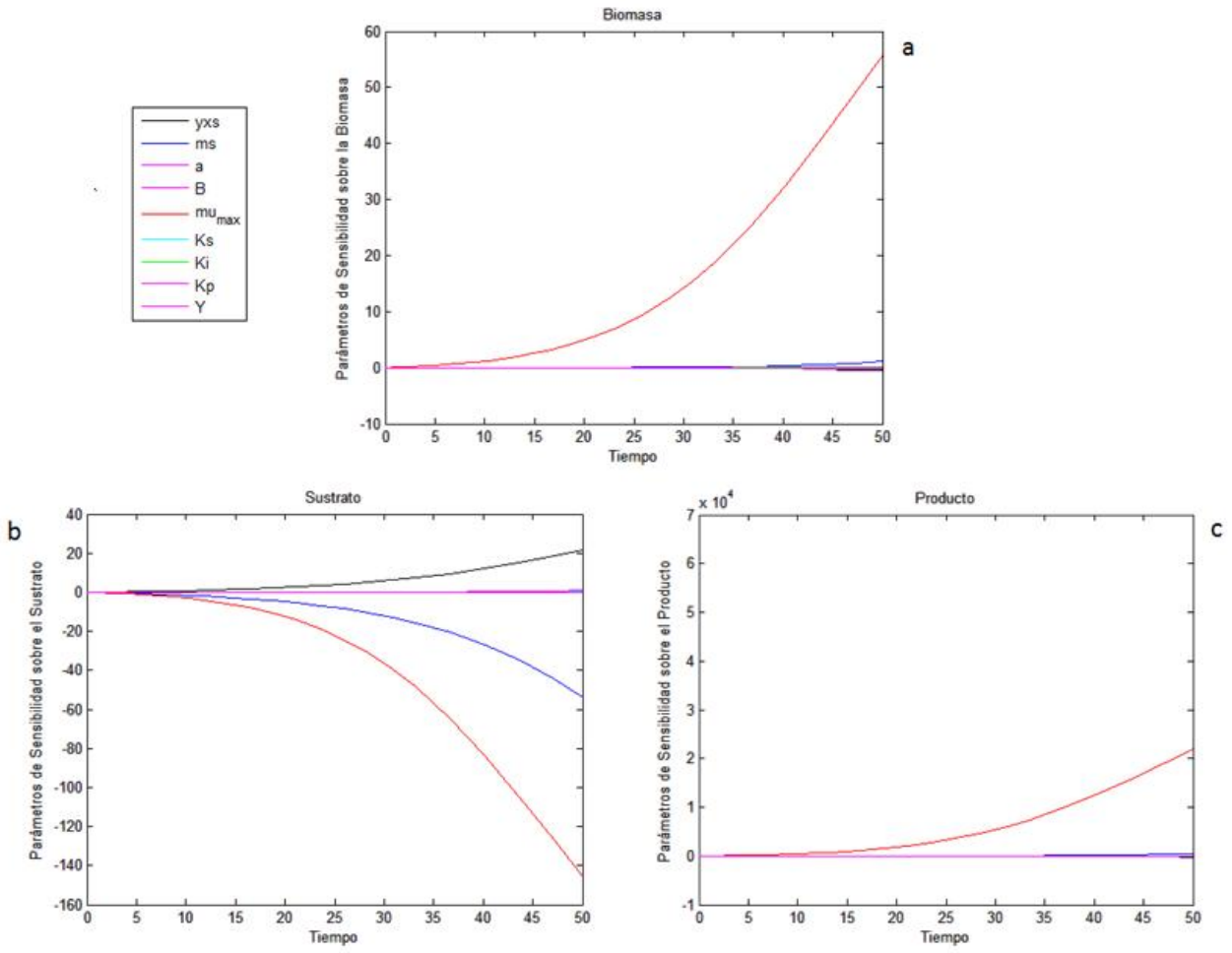

Figura 14. Análisis de sensibilidad paramétrica del modelo por lote

5.1.3 Modelo cinético por lote alimentado

Los resultados arrojados por el análisis de sensibilidad paramétrica para el sistema por lote alimentado se muestran en la Figura 15. En el inciso 'a' se aprecia la existencia de dos parámetros "sensibles" sobre la generación de biomasa, el de mayor impacto y de manera negativa es la tasa de dilución (*D*) y el segundo, de forma positiva, es la $«_{max}$. En el inciso 'b' se observa que sólo *D* tiene influencia negativa sobre el consumo de sustrato. En el inciso 'c' se detectó la presencia de dos parámetros con repercusión sobre la generación de astaxantina, el de mayor relevancia y de forma negativa fue la *D* y posteriormente de carácter positivo la $«_{max}$. Por último, en el inciso 'd' se observa que sólo la velocidad de flujo (*F*) tuvo influencia sobre el

cambio de volumen (x_4) en el biorreactor, esto de modo positivo. Para todos los casos anteriores, los parámetros restantes no tuvieron un impacto mayor sobre el desarrollo del proceso.

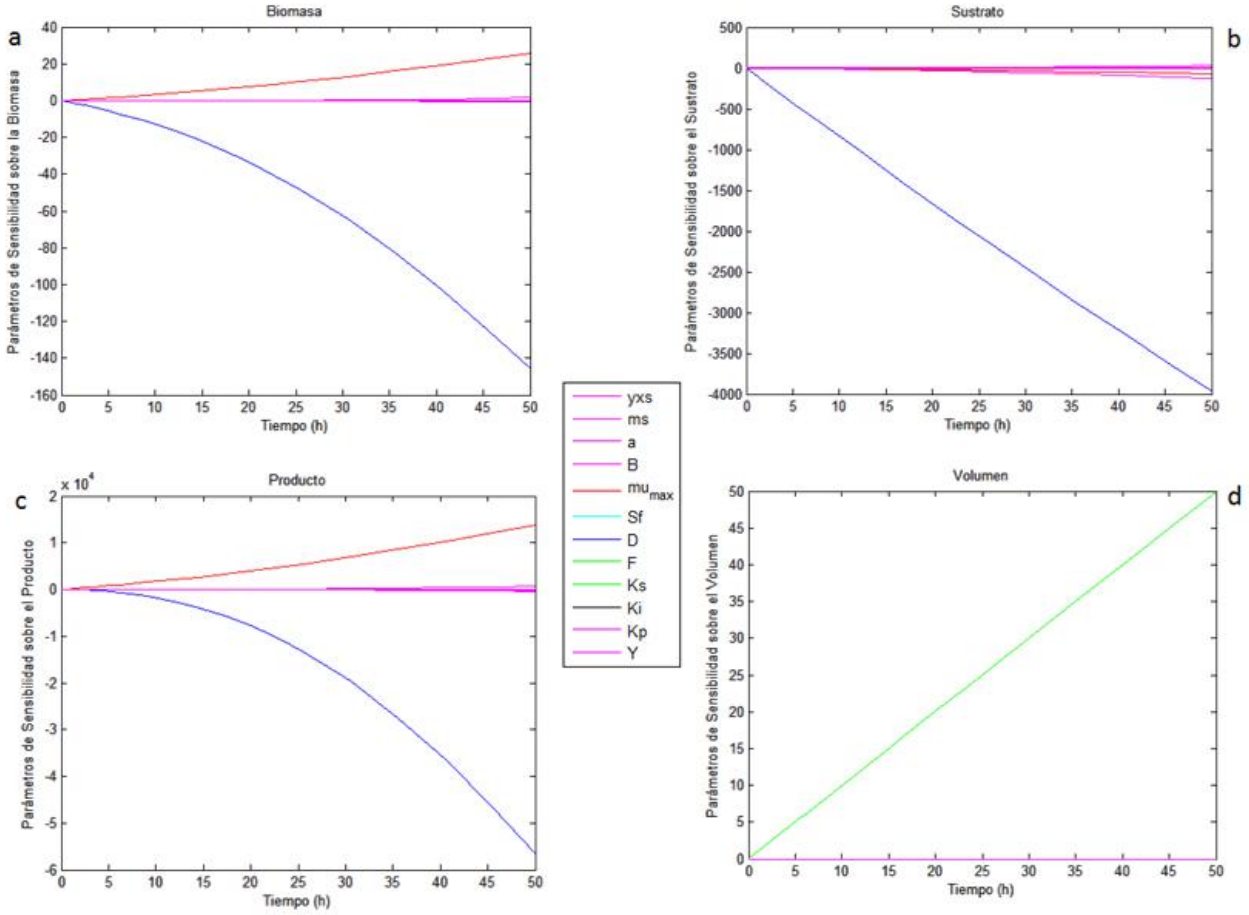

Figura 15. Análisis de sensibilidad paramétrica del modelo por lote alimentado

El valor de «$_{max}$ es inherente y específico para cada microorganismo. Además, depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, y de la presencia de inhibidores. En el análisis de sensibilidad paramétrica realizado sobre el modelo por lote se observó que el parámetro con más influencia es la «$_{max}$; aún más, es visto que la presencia de inhibidores, representada por las constantes de inhibición por sustrato y producto (K_i, K_p), al parecer no mostraron mayor influencia en el sistema.

Del análisis de sensibilidad paramétrica realizado sobre el modelo por lote alimentado se puede dilucidar la influencia de la tasa de dilución no sólo para la formación de biomasa, sino también para el consumo del sustrato y la formación de astaxantina [36]. Lo que significa que el determinar una tasa de dilución correcta permitirá incrementar la producción de biomasa e incrementar la velocidad de consumo de sustrato.

5.2 Cultivos realizados a nivel matraz

5.2.1 Crecimiento celular

Una vez obtenidos los parámetros más importantes a tener en cuenta durante la experimentación de este trabajo de tesis, se procedió a realizar una serie de fermentaciones, primero a nivel matraz, con la levadura *X. dendrorhous* con el medio de cultivo y condiciones de operación descritas previamente (Secciones 4.2 y 4.3).

En la Figura 16 podemos observar las cinéticas de crecimiento celular obtenidas con diferentes técnicas, en los tres casos presentados es posible ver el comportamiento clásico de una cinética de crecimiento microbiano, donde existe una fase de latencia, corta en los tres casos (0-6 horas); una fase exponencial relativamente prolongada (6-60 horas) y una fase estacionaria hasta el tiempo final de los experimentos realizados (120 horas).

Sin embargo, existen detalles a resaltar, es posible observar la existencia, de dos etapas durante la fase exponencial. La primera (6-30 horas) donde la levadura *X. dendrorhous* crece metabolizando el sustrato primario suministrado desde el comienzo de la fermentación (glucosa) y la segunda (30-60 horas) donde se aprecia un segundo crecimiento, a menor velocidad y por un lapso de tiempo menor. Dicho crecimiento, se presume, ocurre por el metabolismo de algún sustrato secundario producido durante las primeras horas de la fermentación, por ejemplo etanol o algún ácido orgánico. Yamane y col. [94] demostraron que el uso de etanol como sustrato optimiza la producción de astaxantina y además contribuye en el crecimiento celular de la levadura *Phaffia rhodozyma*.

Otro elemento a destacar sucede en la fase estacionaria (60-120 horas) donde se observó una tendencia descendente de la densidad óptica y el peso seco; no obstante, el conteo celular realizado con cámara Neubauer se mantuvo constante hasta el final de la fermentación. Lo anterior nos lleva a pensar en dos situaciones, expresadas en las siguientes notas:

Nota 1: Un decremento en el tamaño y volumen celular por parte de la levadura *X. dendrorhous*, esto explicaría el descenso en la cantidad de biomasa (g/L) sin una disminución en el conteo de población celular; además, si se considera un rompimiento en la membrana celular de la levadura, dicha ruptura ocasionaría un descenso en la absorbancia registrada debido al mayor paso de la luz a través de las células que se encuentren dañadas.

Nota 2: Si se considera una ruptura o daño en la membrana plasmática de la levadura *X. dendrorhous*, es posible pensar en una disminución en la capacidad metabólica (viabilidad) de las células presentes en el cultivo.

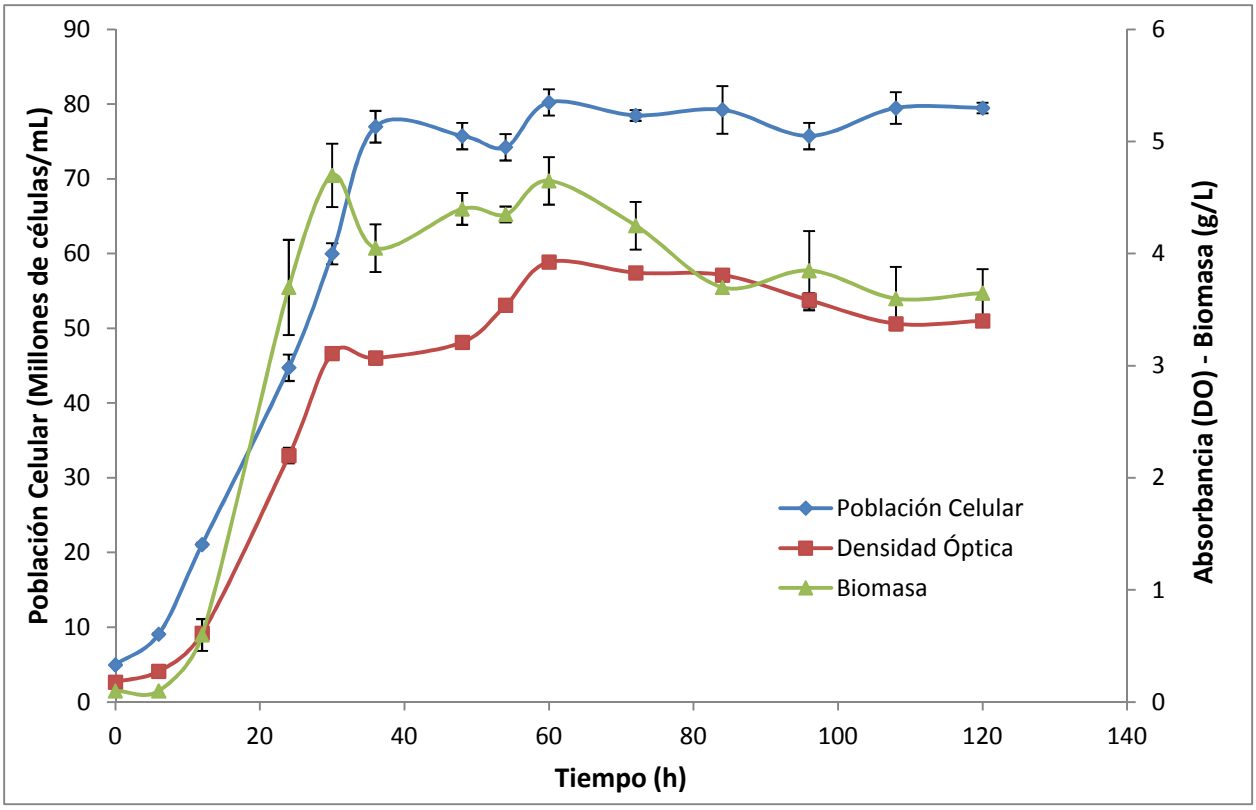

Figura 16. Cinéticas de crecimiento celular registradas con diferentes técnicas durante las fermentaciones a nivel matraz

5.2.2 Cuantificación de azúcares

En la Figura 17 se muestra la cinética de consumo de sustrato (glucosa) en las fermentaciones realizadas a nivel matraz. Al comienzo de la cinética se tuvo la totalidad del sustrato suministrado, es decir, alrededor de 20 g/L y la concentración de éste comenzó a disminuir conforme avanzó la fermentación y el microorganismo comenzó a crecer. Es de gran importancia destacar que alrededor de las 30 horas el sustrato estuvo prácticamente consumido dentro del cultivo, por lo tanto, existió un periodo prolongado (30-120 horas) en donde la levadura *X. dendrorhous* estuvo en un estado de estrés sin el sustrato primario.

5.2.3 Cuantificación de carotenoides totales

De igual forma, la cinética de producción de carotenoides por parte de la levadura *X. dendrorhous* se muestra en la Figura 17, donde se observa un incremento contante en la generación de carotenoides hasta las 72 h de la fermentación, a partir de ese tiempo el aumento en la producción de carotenoides cesó y tiende a estacionarse. Sin embargo, cabe resaltar que el aumento en la concentración de carotenoides totales fue mayor una vez que el microorganismo entró a la fase estacionaria (después de las 30 horas). Esto coincide con lo reportado previamente [95], ya que los carotenoides, entre ellos la astaxantina, son metabolitos secundarios, no relacionados con el crecimiento del microorganismo, y son metabolizados como mecanismo de defensa ante el estrés oxidativo.

Una comparación entre los resultados sobre las diferentes variables bioquímicas se muestra también en la Figura 17, podemos ver como se relacionan el crecimiento celular, el consumo de sustrato y la producción de carotenoides en un cultivo a nivel matraz de la levadura *X. dendrorhous.*

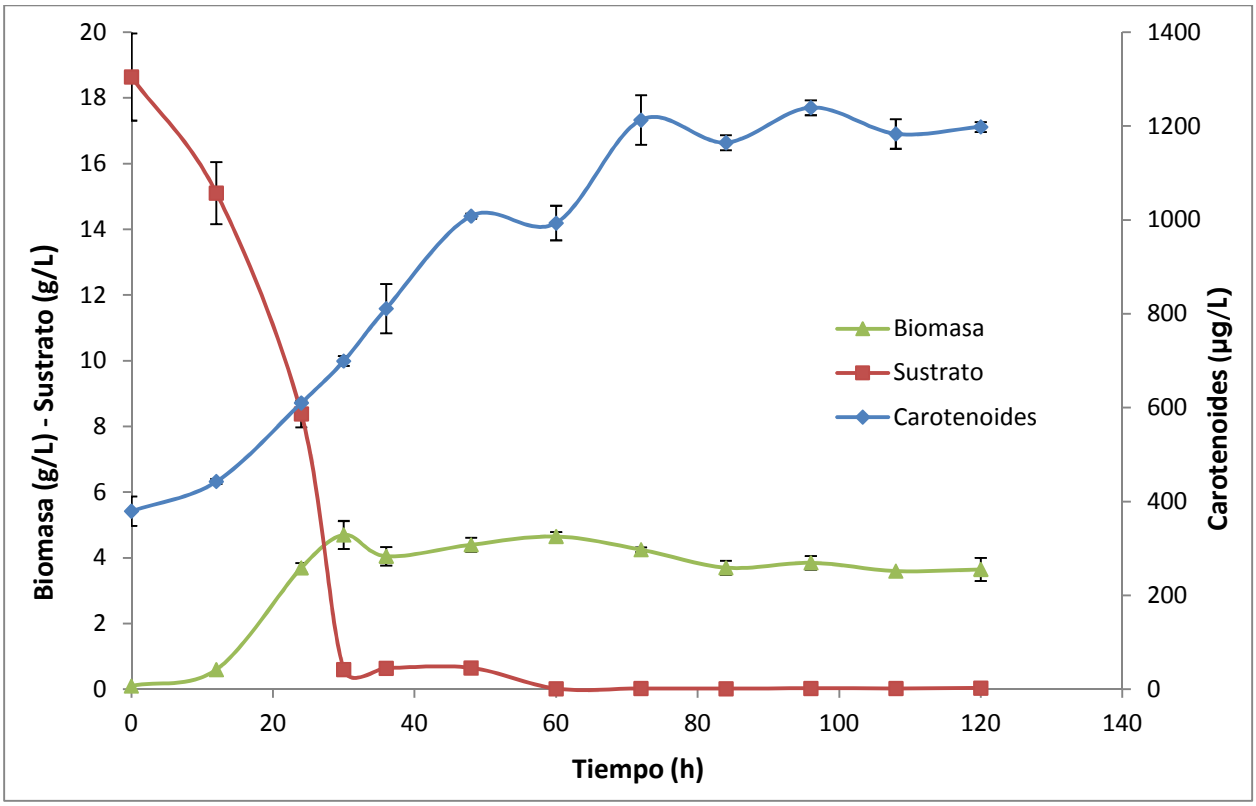

Figura 17. Comparación entre las cinéticas de biomasa, consumo de sustrato y producción de carotenoides totales

5.2.4 Viabilidad celular

En la Figura 18 se puede observar la evolución de la viabilidad celular detectada por medio de la técnica de espectroscopía dieléctrica durante las fermentaciones realizadas a nivel matraz. Se puede ver que la permitividad inició con valores negativos, lo cual se entiende por la baja concentración celular en el cultivo, conforme la fermentación avanzó y la levadura *X. dendrorhous* entró en su fase exponencial los valores de la permitividad aumentaron; a partir de las 24 y hasta las 48 horas observamos que la permitividad registrada se mantuvo constante y coincidió con la fase estacionaria del microorganismo. No obstante, a partir de las 54 horas los valores en la permitividad comenzaron a descender, alcanzando incluso valores negativos, lo anterior indica que las células en el cultivo perdieron la capacidad de polarizarse al entrar en contacto con el campo eléctrico creado por la sonda de espectroscopía dieléctrica, la membrana plasmática de dichas células estaba permeable y, por lo tanto, la viabilidad del cultivo celular disminuye.

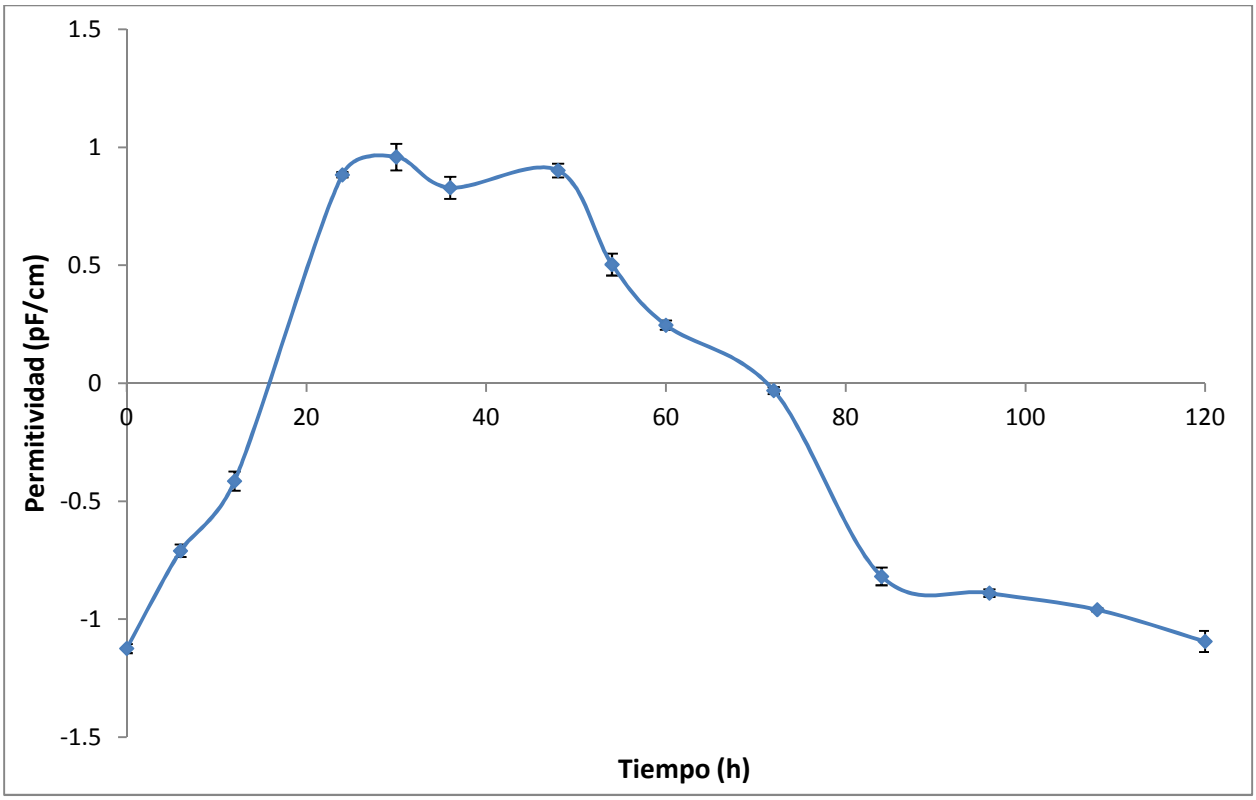

Figura 18. Cinética de viabilidad celular registrada mediante la técnica de espectroscopía dieléctrica durante las fermentaciones efectuadas a nivel matraz

La segunda técnica utilizada con el propósito de dilucidar la viabilidad celular dentro de un cultivo con la levadura *X. dendrorhous* fue la microscopía de fluorescencia con el marcador de fluorescencia FUN-1. En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos con dicha técnica en las fermentaciones efectuadas a nivel matraz. Se puede notar que al comienzo de la fermentación se tuvo aproximadamente un 50% de células metabólicamente activas (viables), conforme avanza el tiempo en la fermentación el porcentaje de células viables aumentó hasta alcanzar valores mayores al 75%. Sin embargo, una vez que el cultivo llegó a la fase estacionaria (30 horas) el porcentaje de células metabólicamente activas comenzó a decrecer e incluso, a partir de las 72 horas, dicho porcentaje alcanzó valores de 0%, lo cual indica la pérdida total de la viabilidad del cultivo celular.

Estos resultados coinciden con las mediciones realizadas con la sonda de espectroscopía dieléctrica. Ya que en los mismos tiempos la permitividad alcanzó valores cercanos al cero y conforme avanzó la fermentación se obtuvieron valores negativos. Además, estas mediciones de

la viabilidad coinciden con los tiempos en que los valores de la biomasa en g/L (Figura 16), comenzaron a decrecer, dicho descenso puede ser también un indicativo de la perdida de viabilidad dentro del sistema.

La posibilidad del uso de espectroscopía dieléctrica en línea para la determinación del porcentaje de viabilidad y como una herramienta de monitoreo y control de un bioproceso industrial ya ha sido analizado previamente [96].

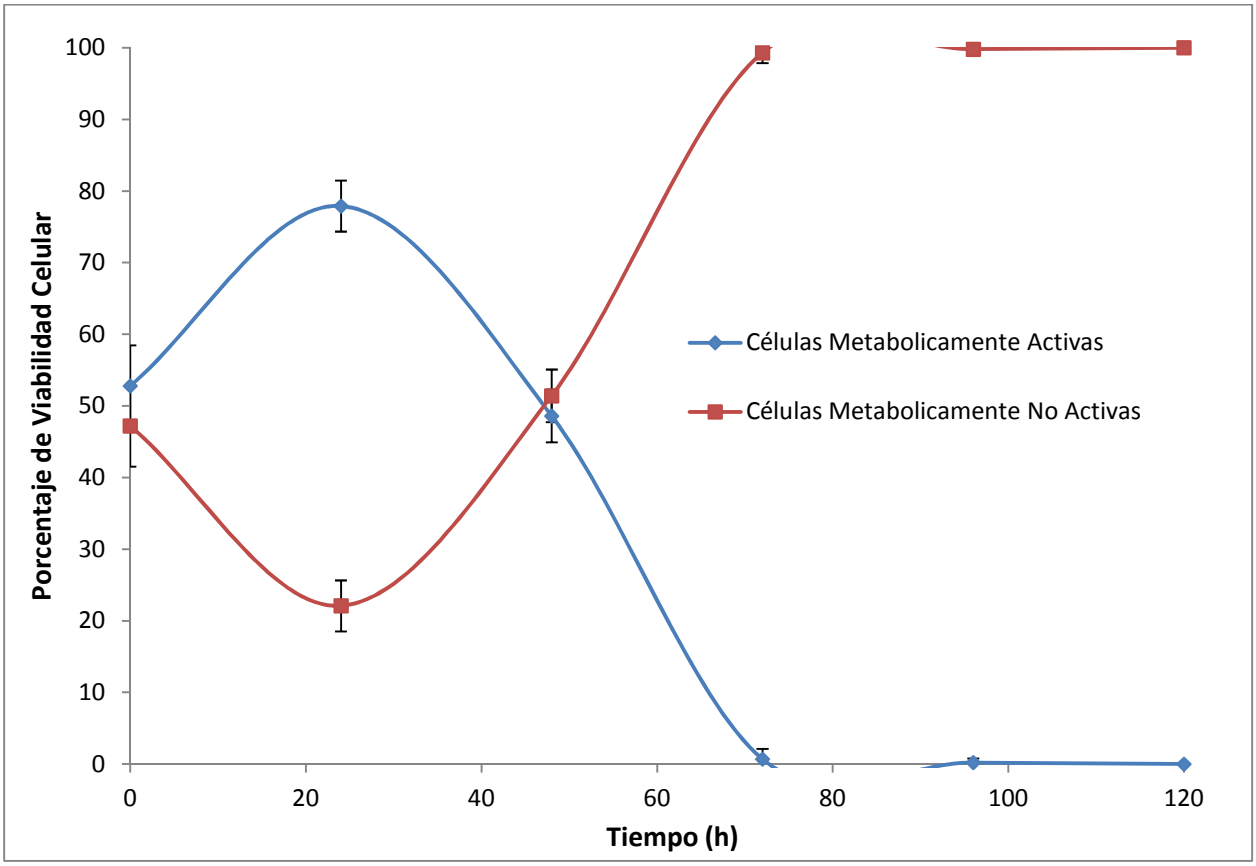

Figura 19. Cinética de viabilidad celular registrada mediante la técnica de microscopía de fluorescencia durante las fermentaciones realizadas a nivel matraz

En las Figuras 20-23 se presenta una serie de fotografías obtenidas con microscopía de fluorescencia las cuales representan la viabilidad celular, es posible observar como a las 24 horas las células metabólicamente activas (células con puntos rojos) representaron la mayoría; no obstante, conforme la fermentación avanzó el número de células metabólicamente no activas (células verdes) comenzó a aumentar, a las 48 horas se puede ver que células vivas y muertas se

encontraron en la misma cantidad y, por último, cuando el bioproceso llegó a los tiempos finales (96 y 120 horas) el número de células metabólicamente activas fue prácticamente nulo.

5.2.5 Tamaño y volumen celular

El tamaño y volumen celular fueron monitoreados utilizando el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®), en la figura 24 se observa la cinética de la distribución del diámetro celular de la levadura *X. dendrorhous* durante las fermentaciones a nivel matraz. Se puede ver que al inicio de la fermentación las células tuvieron un diámetro promedio alrededor de 6 μm y conforme la fermentación siguió su curso, dicho diámetro celular promedio tendió a disminuir llegando a valores alrededor de 4.5 μm.

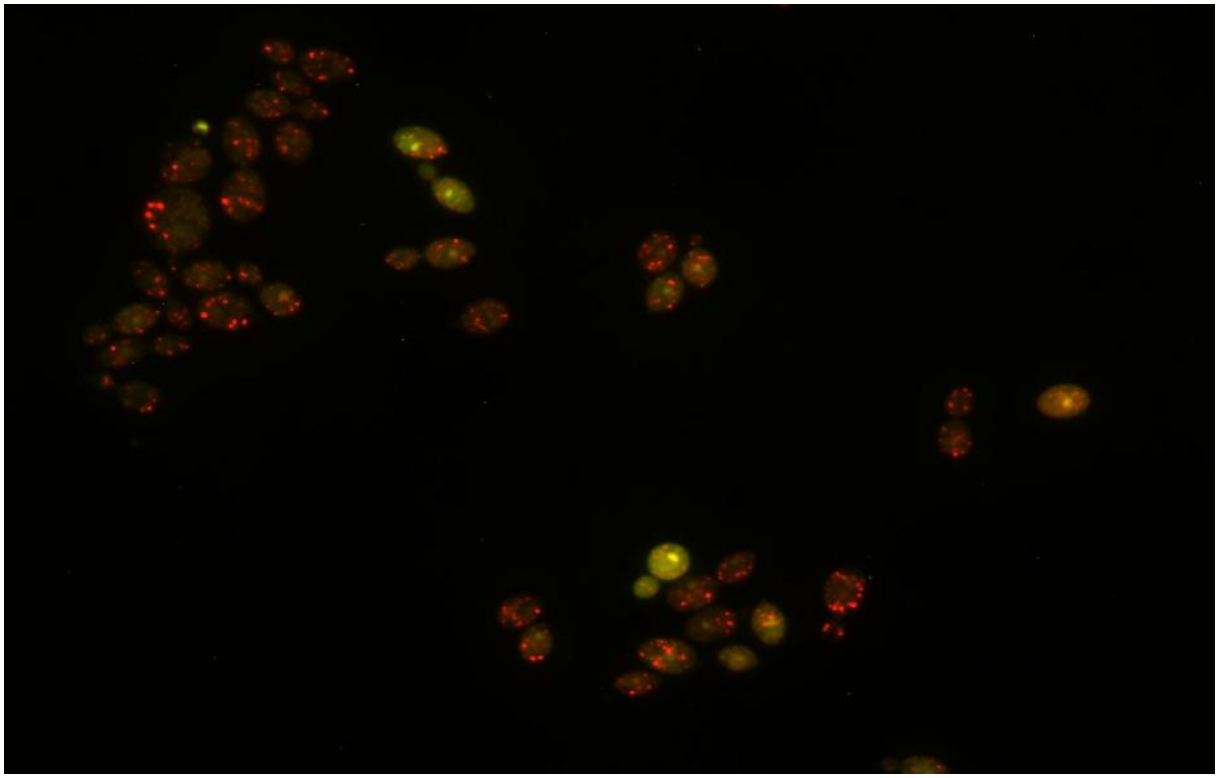

Figura 20. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel matraz (24 horas)

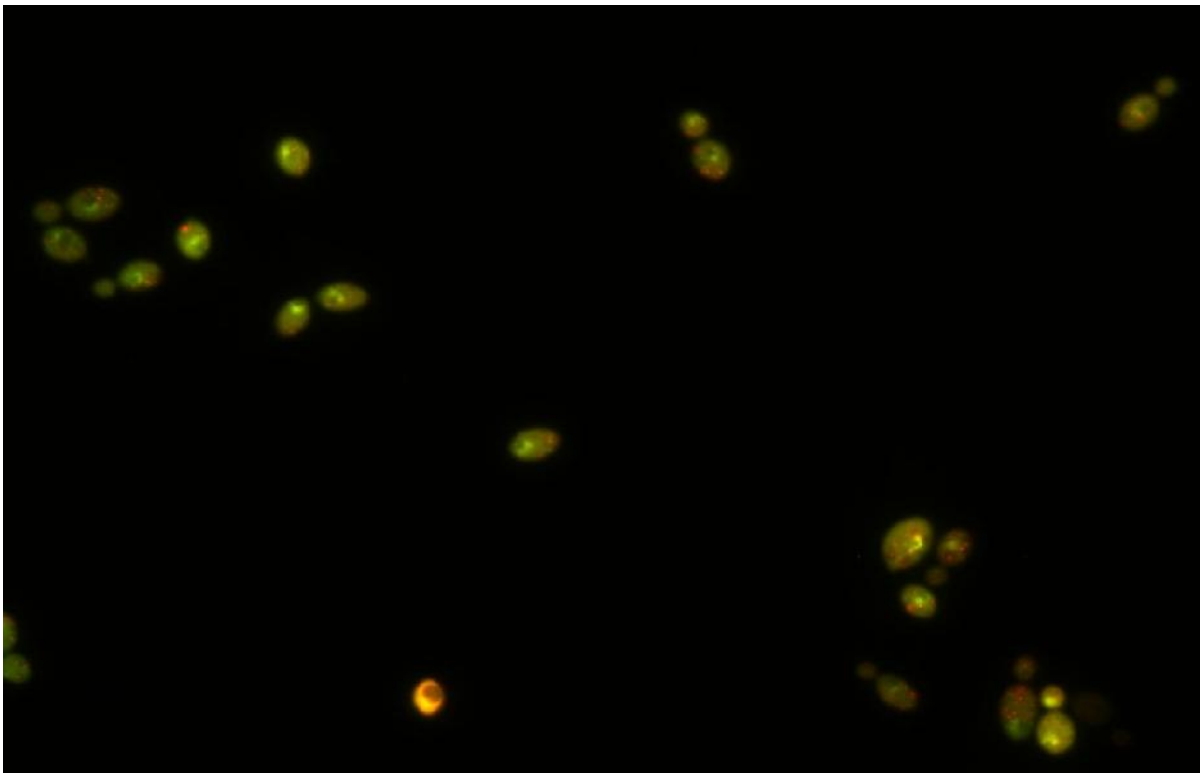

Figura 21. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel matraz (48 horas)

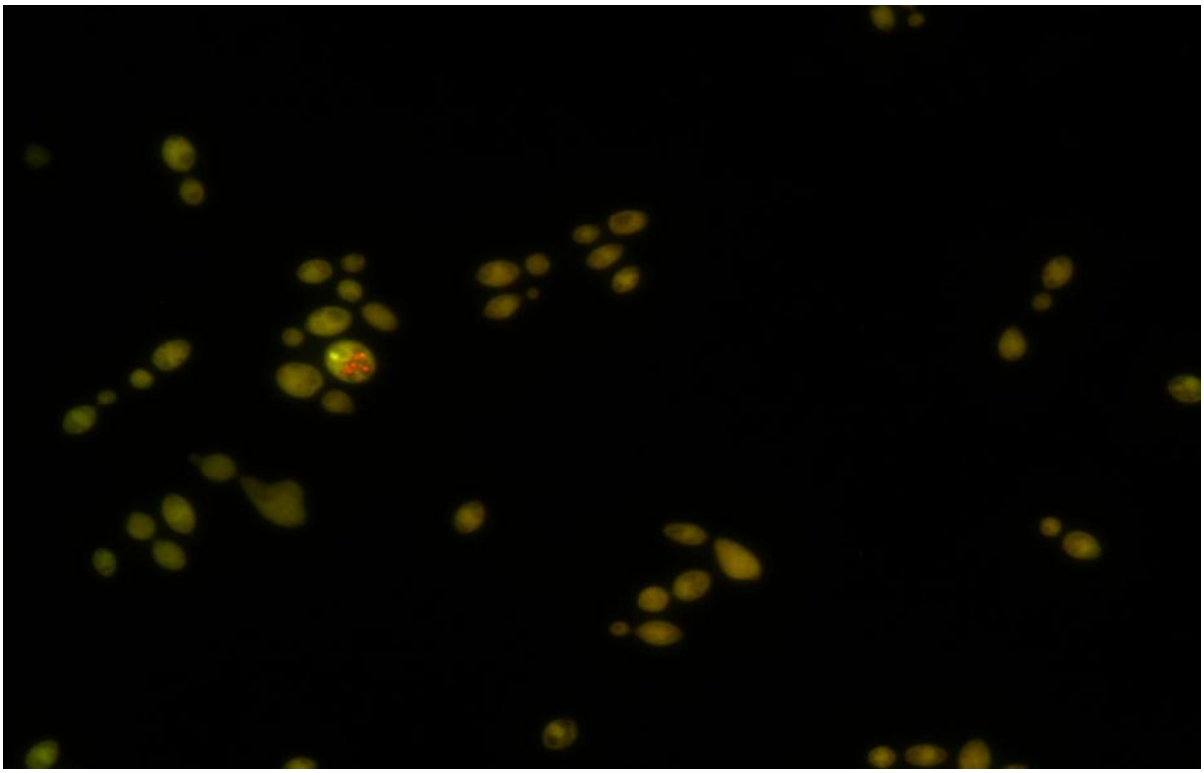

Figura 22. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel matraz (96 horas)

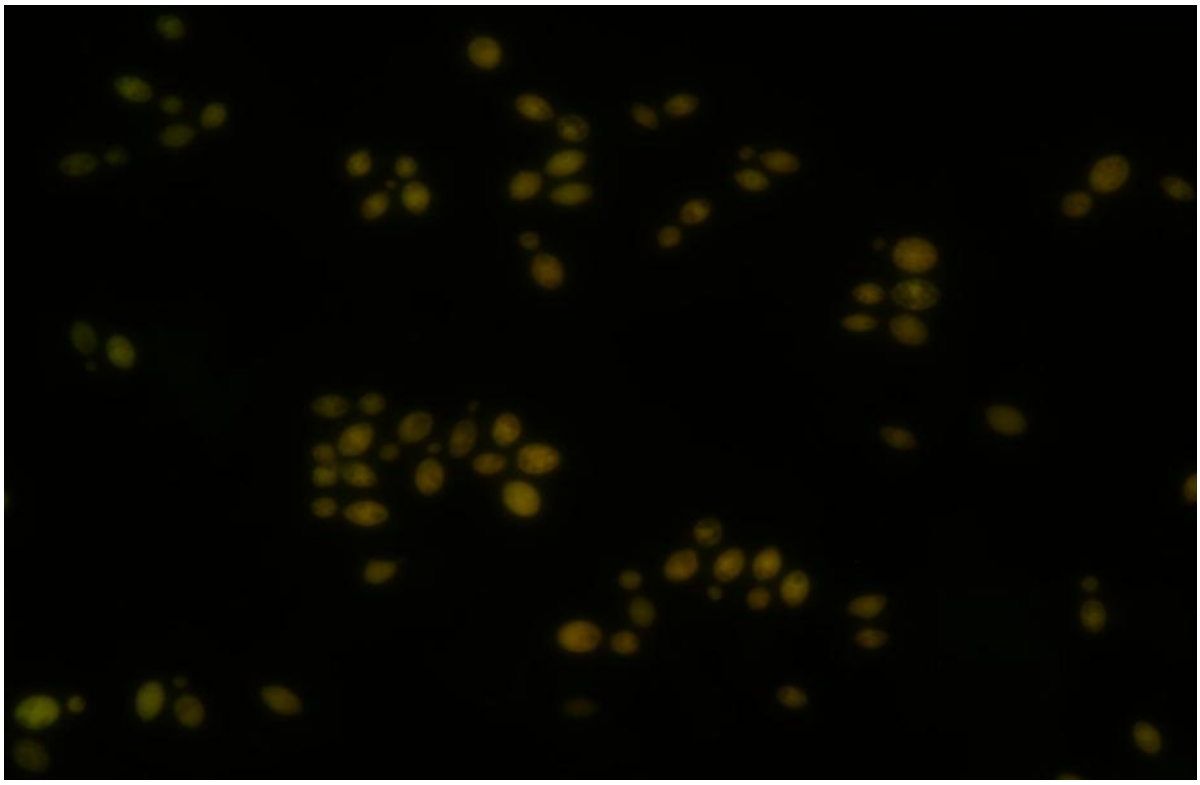

Figura 23. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel matraz (120 horas)

En la Figura 25 se muestra la cinética de distribución celular obtenida durante la fermentación a nivel matraz, dicha cinética se obtuvieron asemejando cada célula a una esfera perfecta teniendo en cuenta su diámetro; de esta forma, para cada diámetro celular registrado por el CASY (0-40 μm) existe un volumen determinado (μm^3). Posteriormente se multiplica la cantidad de células registradas para cada diámetro con su respectivo volumen para conocer el volumen que representa cada grupo de células.

En la Figura ya mencionada se observa que al inicio de la fermentación el volumen celular alcanzó un valor máximo de 7×10^4 μm^3 con valores de diámetro celular entre 7 y 8 μm, lo cual refleja el estado de las células provenientes del inóculo. Después, a las 24 h el volumen celular llegó a un valor máximo alrededor de 1.6×10^5 μm^3 con un diámetro celular todavía entre 7 y 8 μm, el aumento en el volumen celular refleja que la levadura entró en la fase exponencial de su crecimiento y esto sin afectar significativamente su diámetro celular. No obstante, conforme el cultivo entró en fase estacionaria el valor máximo del volumen celular disminuyó, hasta valores cercanos a 1×10^5 μm^3 (72 y 120 h) con valores de diámetro celular entre 5 y 6 μm, lo anterior

expresa que la disminución en el volumen celular está directamente relacionada con el decremento en los valores del tamaño celular.

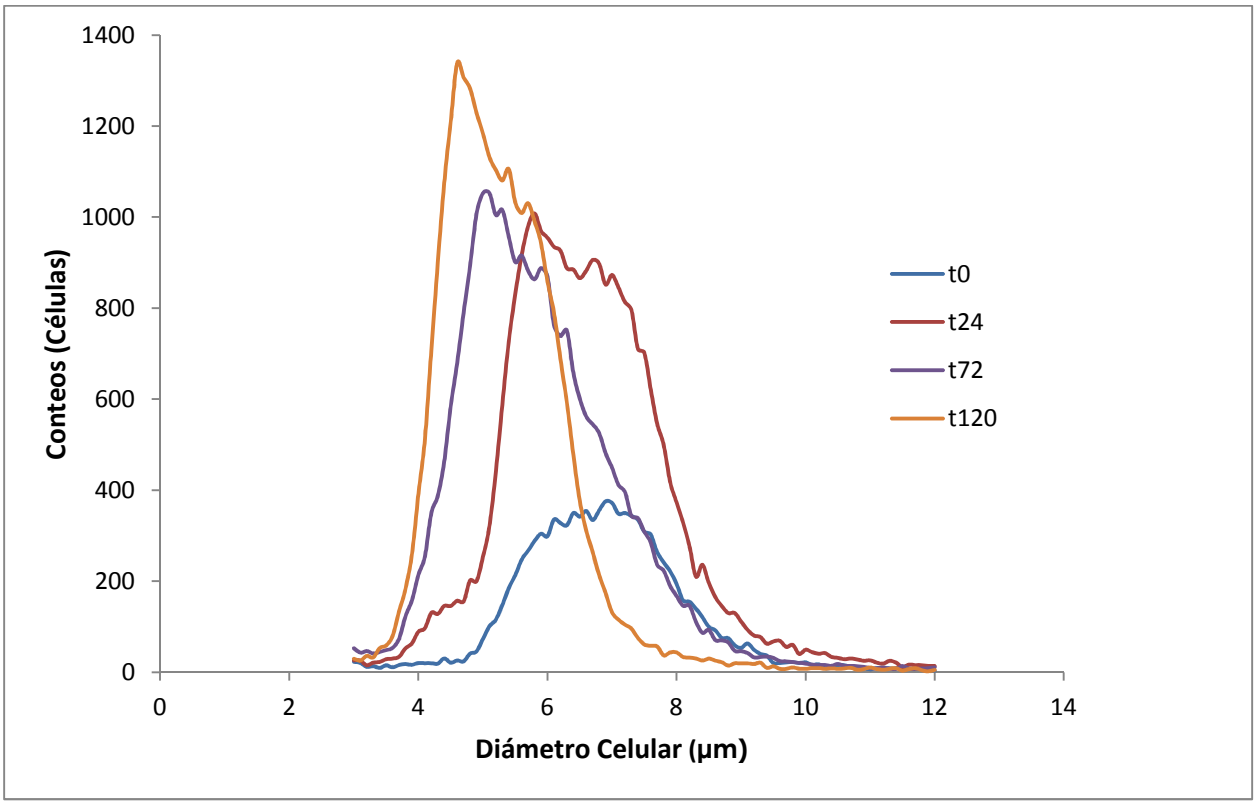

Figura 24. Cinética de distribución del diámetro celular registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante las fermentaciones efectuadas a nivel matraz

Para reforzar lo expuesto anteriormente se calculó el área bajo la curva de las gráficas presentadas en la Figura 25 para determinar el volumen celular total para cada tiempo de la fermentación. En la Figura 26 se ve como al inicio del proceso fermentativo las células registradas por el CASY representaban un volumen celular total de 2×10^5 µm^3, a las 24 h dicho volumen celular total alcanza un valor alrededor de 4.7×10^5 µm^3, esto se entiende por el crecimiento acelerado del microorganismo en la fase exponencial. Sin embargo, en tiempos finales de la fermentación el volumen celular total disminuyó de manera significativa, a las 72 h alcanzó un valor de 3.2×10^5 µm^3 y para el final del bioproceso (120 h) llegó a 2.2×10^5 µm^3.

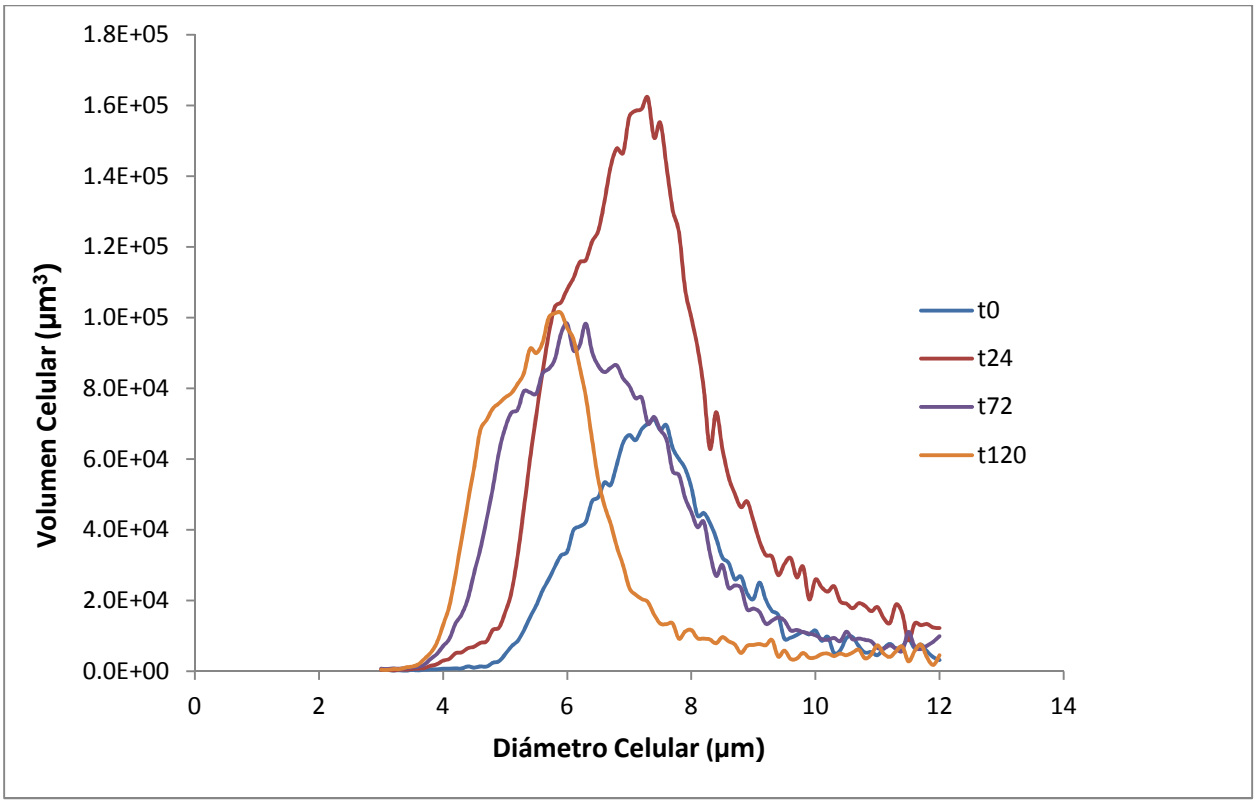

Figura 25. Cinética del volumen celular máximo registrado mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante las fermentaciones efectuadas a nivel matraz

Si se tiene en cuenta que la población celular no disminuyó a lo largo de la fase estacionaria (30-120 h) esta disminución en el volumen celular total concuerda con lo expuesto anteriormente donde se propuso que la disminución en la cantidad de biomasa detectada por peso seco se debió a una disminución también en el tamaño y volumen celular.

Más aún, los tiempos de la fermentación donde el volumen celular comenzó a disminuir coinciden con aquellos donde la viabilidad celular detectada por la sonda de espectroscopía dieléctrica alcanzó valores de permitividad cercanos a cero o inclusive negativos. Por lo tanto la disminución del volumen celular podría ser un indicador adicional de la pérdida de viabilidad celular en este cultivo microbiano.

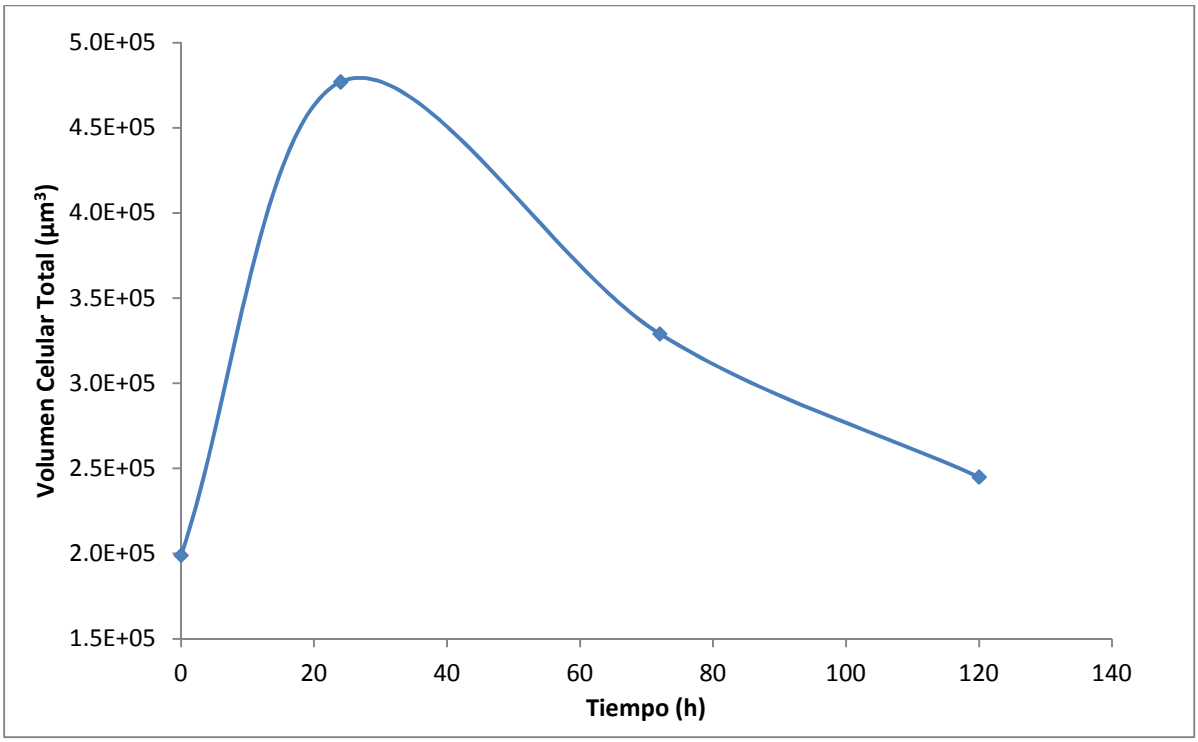

Figura 26. Cinética de distribución del volumen celular total (área bajo la curva) registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante las fermentaciones efectuadas a nivel matraz

Lo mencionado previamente concuerda con el estudio realizado por Tibayrenc y col. [80], en el cual obtuvieron un comportamiento similar en el tamaño y volumen celular con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; en dicho trabajo, demostraron que el tamaño y volumen celular disminuyen conforme el porcentaje de viabilidad decrece. El diámetro de la levadura *S. cerevisiae* tiene un promedio de 5 µm al 100% de viabilidad celular. Conforme avanza la fermentación, la viabilidad celular disminuye hasta 0% teniendo células con un diámetro promedio de 3.5 µm.

5.2.6 Detección de astaxantina por espectroscopía Raman

En la Figura 27 se muestra el espectro de esparcimiento Raman obtenido en fermentaciones a nivel matraz con la levadura *X. dendrorhous*. Se puede ver el aumento de la intensidad Raman de los tres picos representativos de la astaxantina, el primero de ellos indica la detección del enlace C-H a los 1010 números de onda, el segundo pico que señala al enlace sencillo C-C a los 1157 números de onda y por último el tercer pico a los 1520 número de onda que denota al enlace

doble C=C. Se observa como la intensidad de los tres picos aumentó conforme avanza la fermentación (0-72 horas), esto coincide con el incremento en la producción de carotenoides totales presentada previamente (Figura 18).

La detección de los tres picos característicos de la astaxantina por espectroscopía Raman ha sido reportada previamente por Cannizaro y col. [84]. Ellos monitorearon en línea un proceso por lote alimentado de producción de astaxantina con la levadura *Phaffia rhodozyma*.

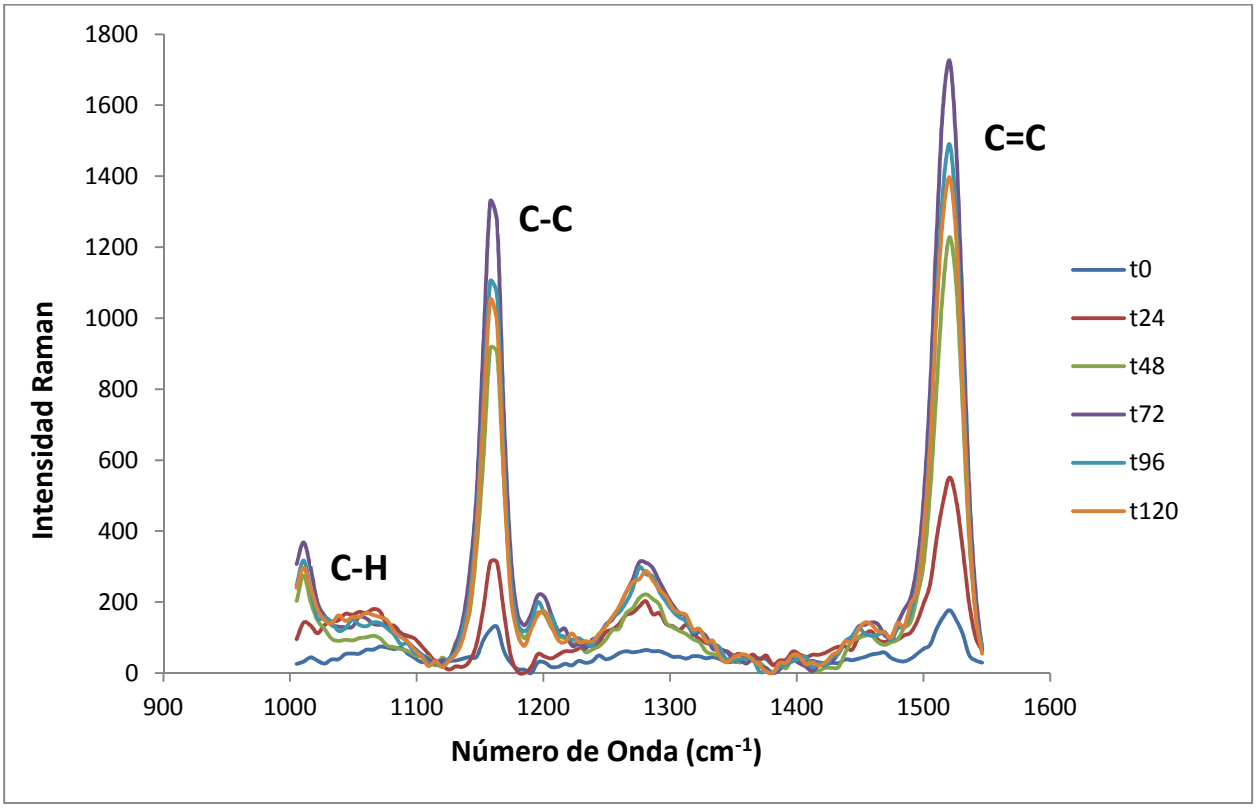

Figura 27. Cinética del espectro de esparcimiento Raman obtenida mediante espectroscopía Raman durante las fermentaciones realizadas a nivel matraz

En la Figura 28 se puede visualizar la cinética de cada uno de los tres enlaces con respecto al tiempo de la fermentación, tanto en esta figura como en la Figura 24 se puede observar un descenso a partir de las 72 horas en la intensidad Raman de los tres picos representativos de la astaxantina, esto denotaría una disminución en la concentración de astaxantina dentro del cultivo.

Por otra parte, lo anterior contrasta con el comportamiento encontrado en la producción de carotenoides totales (Figura 18) donde se muestra una tendencia estacionaria a partir de las 72 h. Este hecho se puede interpretar como el momento donde se detuvo la producción de astaxantina y un desvío de la ruta metabólica hacía otro carotenoide. Este momento crítico podría ser la etapa tardía de la fase estacionaria cuando tanto la viabilidad como el volumen celular comienzan a disminuir.

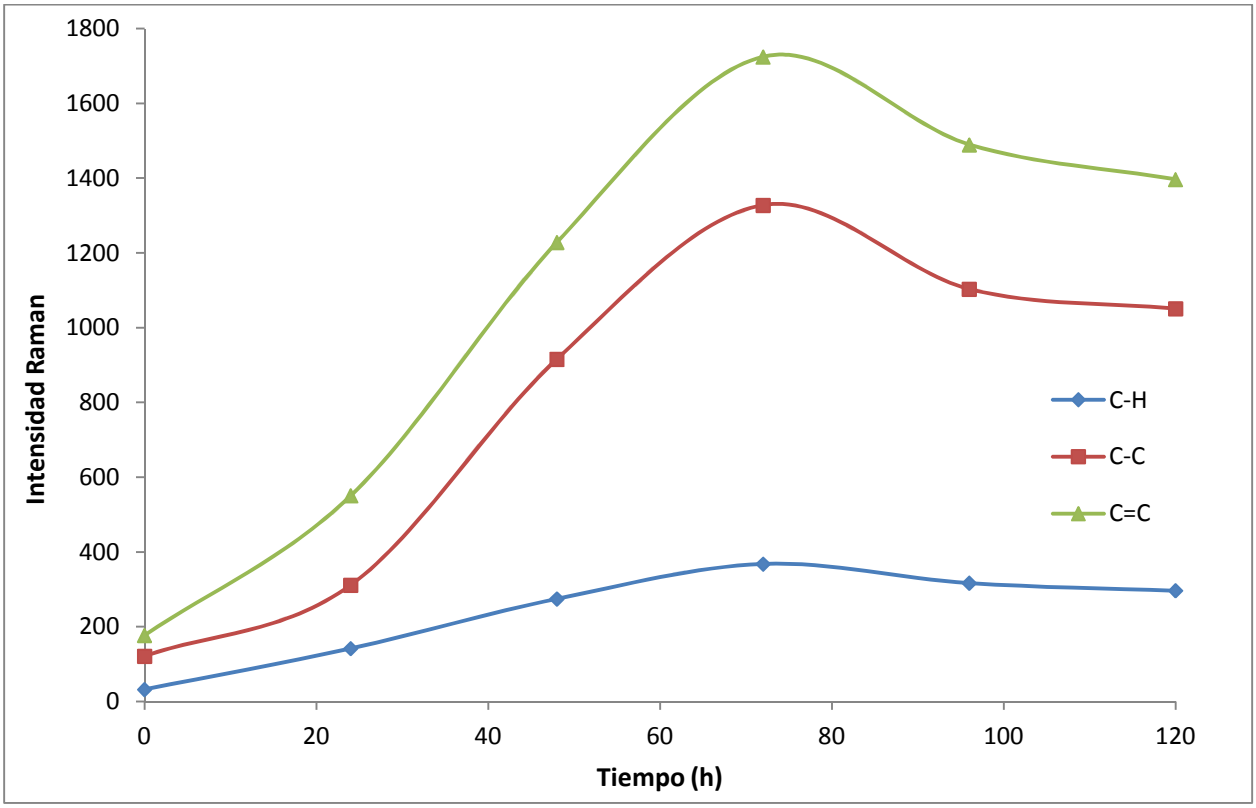

Figura 28. Cinética de la intensidad Raman para cada uno de los tres enlaces representativos de la astaxantina obtenida por espectroscopía Raman durante las fermentaciones hechas a nivel matraz

5.3 Cultivos realizados a nivel biorreactor

Una vez realizados los experimentos a nivel matraz y observado que las técnicas analíticas pueden ser utilizadas para el monitoreo del estado fisiológico de las levaduras, se procedió a ejecutar una serie de experimentos a nivel biorreactor en cultivos por lote de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* con el medio de cultivo y condiciones de operación descritas anteriormente (Secciones 4.2 y 4.4). Cabe mencionar que para esta primera fermentación por lote se utilizó el mismo tiempo final que para los experimentos a nivel matraz, 120 horas.

5.3.1 Crecimiento celular

En las Figuras 29 y 30 se puede visualizar las cinéticas de crecimiento celular obtenidas con diferentes técnicas en dos cultivos por lote realizados a nivel biorreactor. En el primero se observa un tiempo de cultivo de 120 horas y en el segundo una duración de 168 horas, el incremento en el tiempo tuvo como finalidad evaluar el estado fisiológico de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* en un cultivo por lote de larga duración.

Para ambos casos se observa el comportamiento clásico reportado para una cinética de crecimiento microbiano, se registró una fase de latencia de 6 y 9 horas respectivamente, una fase exponencial hasta las 48 h en el primer experimento y hasta las 36 horas en el segundo y por último una fase estacionaria hasta el final de la fermentación (120 h y 168 h).

Si se observa con atención se puede distinguir, dentro de la fase exponencial, la existencia de dos etapas, la primera de ellas (6-30 horas) donde la levadura *X. dendrorhous* crece consumiendo el sustrato suministrado al inicio de la fermentación (glucosa) y la segunda etapa (30-48 horas) donde el microorganismo presentó un nuevo crecimiento, pero lento y por menor tiempo que el anterior. Este crecimiento, podría suceder cuando la levadura metaboliza algún sustrato secundario producido en las primeras horas de la fermentación, por ejemplo etanol, glicerol o algún ácido orgánico. Yamane y col. [94] demostraron que el uso de etanol como sustrato optimiza la producción de astaxantina y además contribuye en el crecimiento celular de la levadura *Phaffia rhodozyma*.

Otro detalle a resaltar es la tendencia decreciente por parte de la densidad óptica y el peso seco. Esta tendencia sucede durante la fase estacionaria. Sin embargo, es posible observar que el conteo de la población celular por cámara Neubauer se mantuvo constante hasta el final de la fermentación.

Lo anterior coincide con la ya plasmado en las Notas 1 y 2 (sección 5.2.1), en donde se plantean dos escenarios referentes a lo que acontece con el tamaño, volumen y viabilidad celular durante la fermentación.

Estos resultados resaltan la importancia de medir el crecimiento celular por varias técnicas analíticas, puesto que permite detectar datos importantes como la disminución gradual de la biomasa durante la fermentación, y esto puede ser relacionado con otras variables como el tamaño, volumen y viabilidad celular (secciones 5.2.4 y 5.2.5).

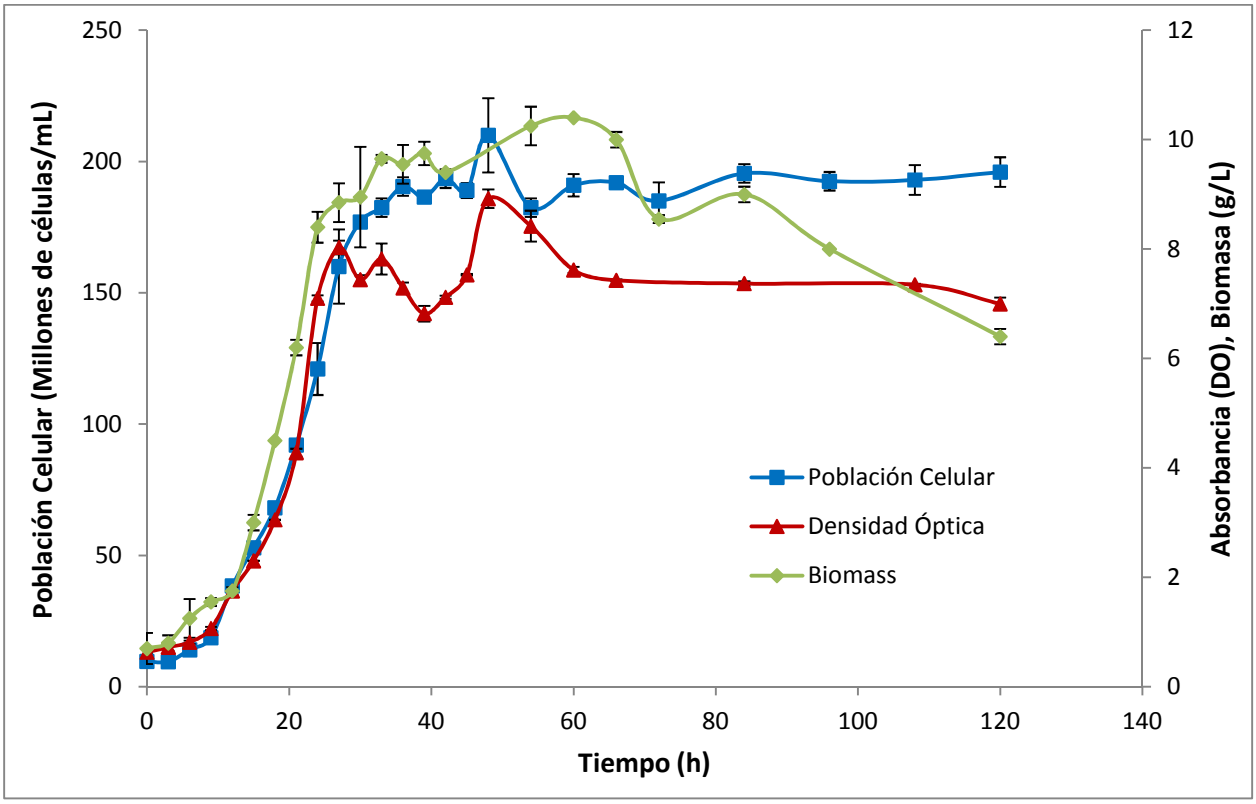

Figura 29. Cinéticas de crecimiento celular registradas con diferentes técnicas durante la primera fermentación por lote a nivel biorreactor

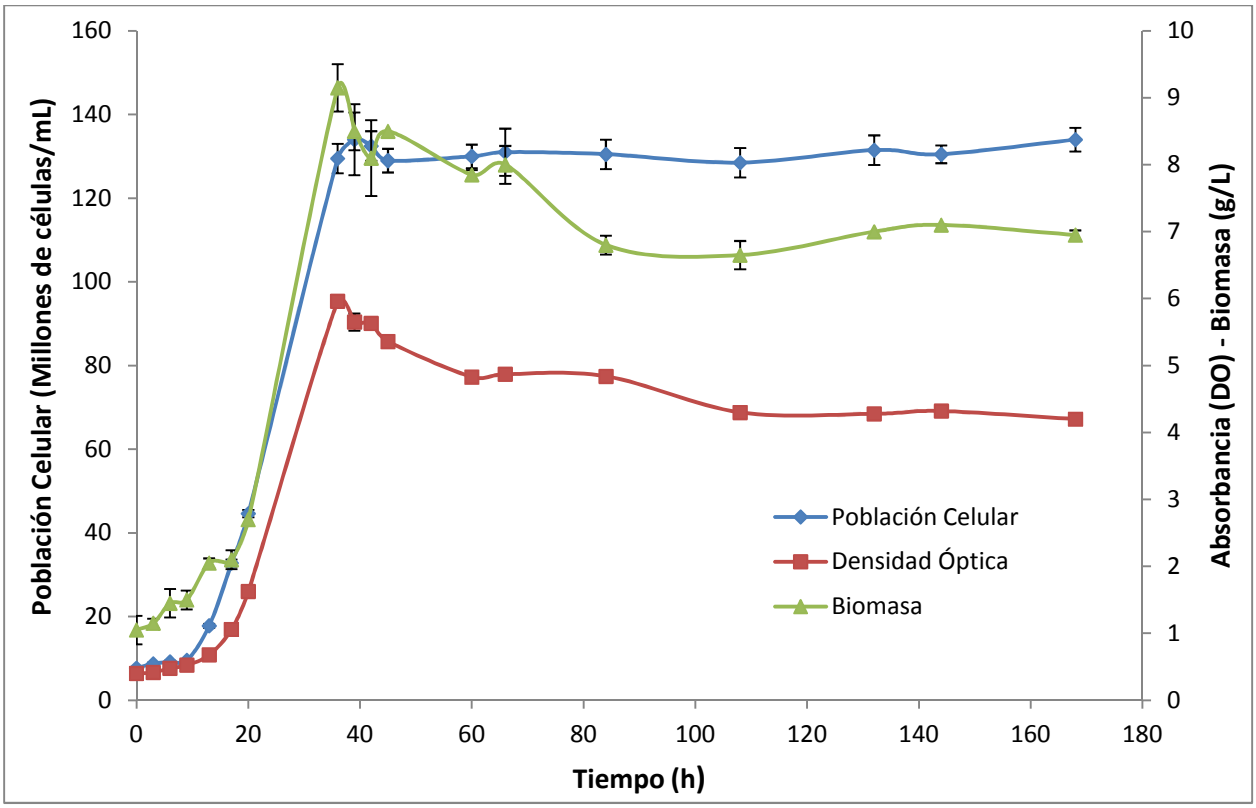

Figura 30. Cinéticas de crecimiento celular registradas con diferentes técnicas durante la segunda fermentación por lote a nivel biorreactor

5.3.2 Cuantificación de azúcares

En las Figuras 31 y 32 se puede contemplar la cinética de consumo de sustrato (glucosa) en las fermentaciones realizadas por lote a nivel biorreactor. Al inicio de ambos bioprocesos se tuvo prácticamente la totalidad del sustrato suministrado, alrededor de 20 g/L y esta concentración comenzó a disminuir conforme avanza la fermentación y el microorganismo entró en fase exponencial. Cabe señalar que cerca de las 24 h de fermentación no existía concentración de sustrato remanente en el cultivo y como consecuencia, existieron periodos largos (a partir de las 24 h) en la levadura *X. dendrorhous* se encontraba posiblemente en un estado de estrés sin el sustrato suministrado al inicio de la fermentación lo que puede influir en su capacidad metabólica y en la viabilidad celular.

5.3.3 Cuantificación de carotenoides totales

De igual forma, las cinéticas de producción de carotenoides por parte de la levadura *X. dendrorhous* se muestran también en las Figuras 31 y 32, es posible observar, en ambos casos, un incremento en la producción de carotenoides totales hasta las 48 horas de la fermentación. Posteriormente ocurre un fenómeno interesante, dado que la generación de carotenoides no sólo cesó, sino que tendió a descender, durante la fase estacionaria y hasta el final de la fermentación.

Además, se debe mencionar que el aumento en la concentración de carotenoides totales es mayor a partir del momento en que la levadura entra en su fase estacionaria (después de las 24 horas), lo anterior coincide con lo reportado por diversos autores [97-99], ya que los carotenoides, entre ellos la astaxantina, son metabolitos secundarios, no relacionados con el crecimiento del microorganismo, y son generados como mecanismo de defensa ante el estrés oxidativo.

Sin embargo, cabe resaltar que aunque los carotenoides son considerados metabolitos secundarios, ha sido reportado previamente [92] que su producción puede comenzar en la parte final de la fase exponencial.

5.3.4 Viabilidad celular

En la Figuras 33 y 34 se pueden observar las cinéticas de la viabilidad celular detectada por medio de la técnica de espectroscopía dieléctrica durante las fermentaciones por lote a nivel biorreactor. Se detecta que la permitividad comienza con valores bajos, cercanos a 1 y 0 pF/cm respectivamente, lo cual se entiende por la baja concentración celular en el cultivo. Conforme la fermentación avanza y la levadura *X. dendrorhous* entra en su fase exponencial los valores de la permitividad comienzan a aumentar hasta llegar a valores alrededor de 5 pF/cm en el primer experimento y 3.5 pF/cm en el segundo. A partir de las 30 horas observamos que la permitividad registrada entra en un comportamiento estacionario, esto coincide con los tiempos en los que el microorganismo cesa su crecimiento (Figuras 31 y 32). No obstante, en la segunda mitad de la fase estacionaria, los valores en la permitividad comienzan a tener un comportamiento

descendente, llegando alrededor de los 4 y 1.5 pF/cm, de manera respectiva, al final de la fermentación (120 y 168 horas).

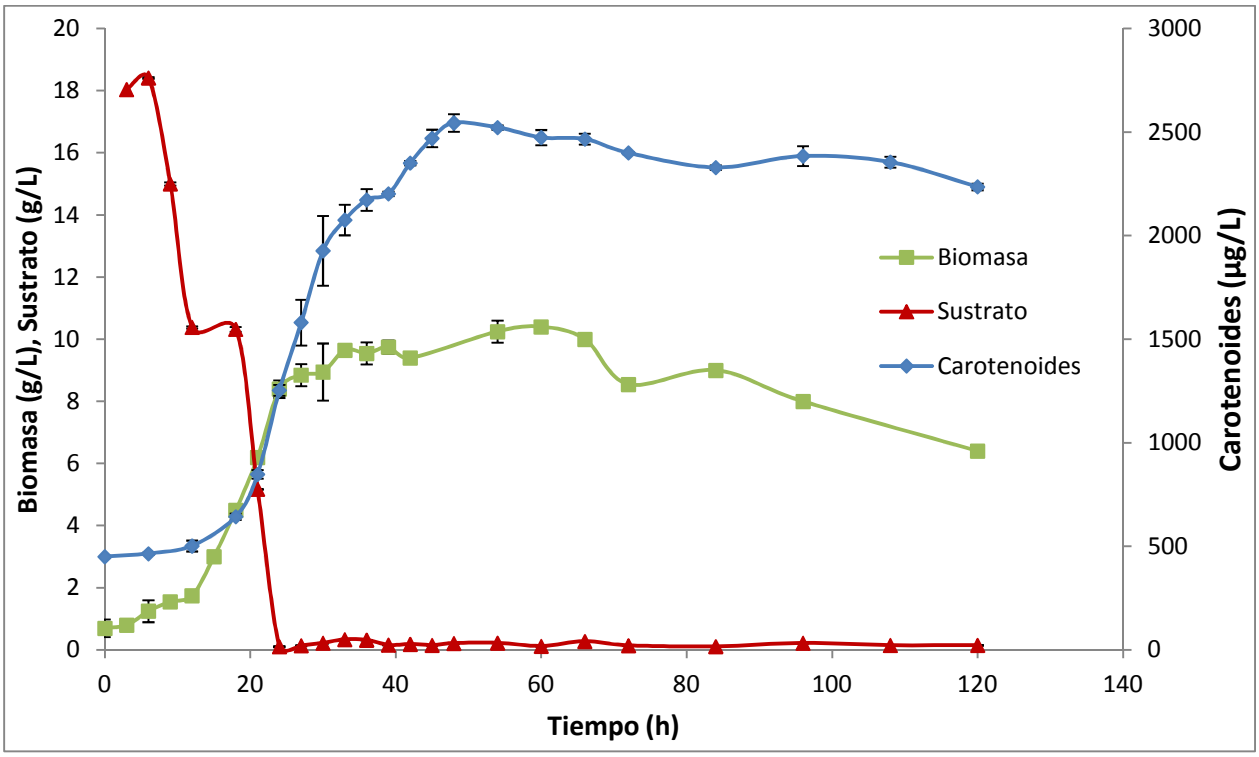

Figura 31. Comparación entre las cinéticas de biomasa, consumo de sustrato y producción de carotenoides totales en la primera fermentación por lote a nivel biorreactor

Lo anterior demuestra que un determinado porcentaje de las células en los cultivos perdieron la capacidad de polarizarse al entrar en contacto con el campo eléctrico creado por la sonda de espectroscopía dieléctrica, la membrana plasmática de dichas células estaba permeable y, por lo tanto, la viabilidad del cultivo celular disminuye [80].

Cabe mencionar que el uso de espectroscopía dieléctrica para monitorear y controlar un bioproceso ya ha sido empleado anteriormente con otras levaduras [100].

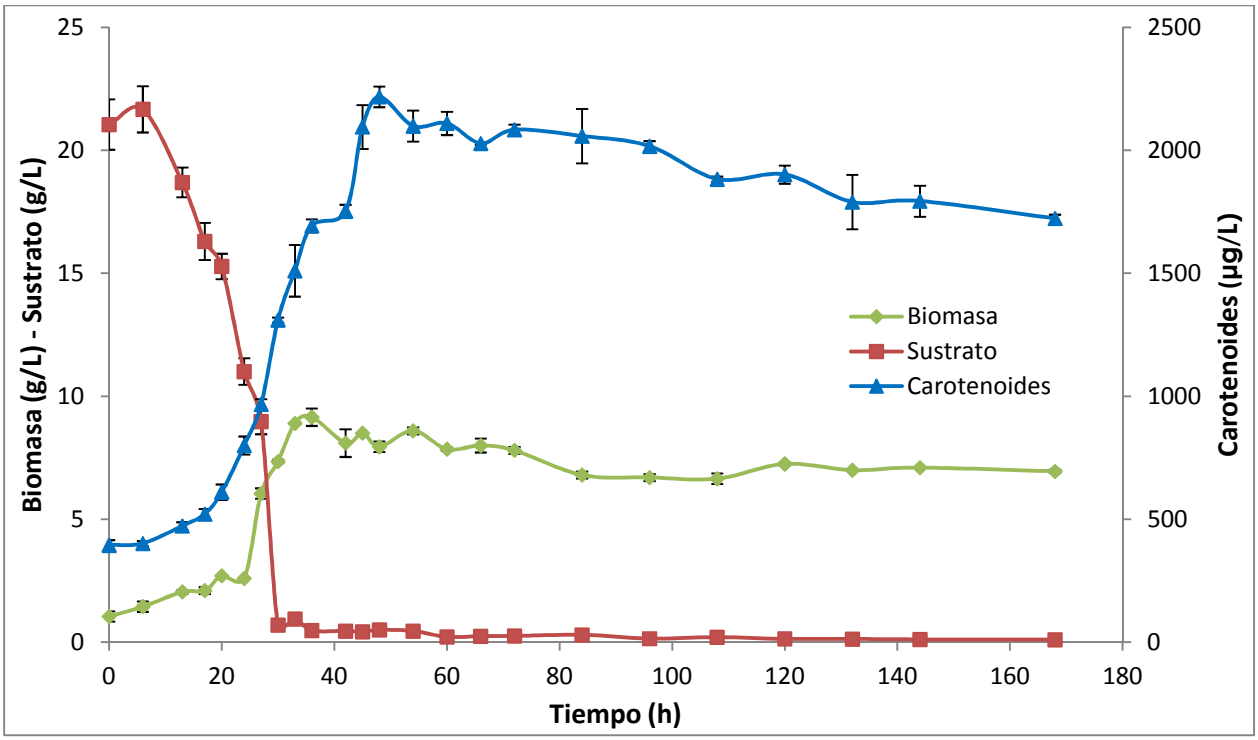

Figura 32. Comparación entre las cinéticas de biomasa, consumo de sustrato y producción de carotenoides totales en la segunda fermentación por lote a nivel biorreactor

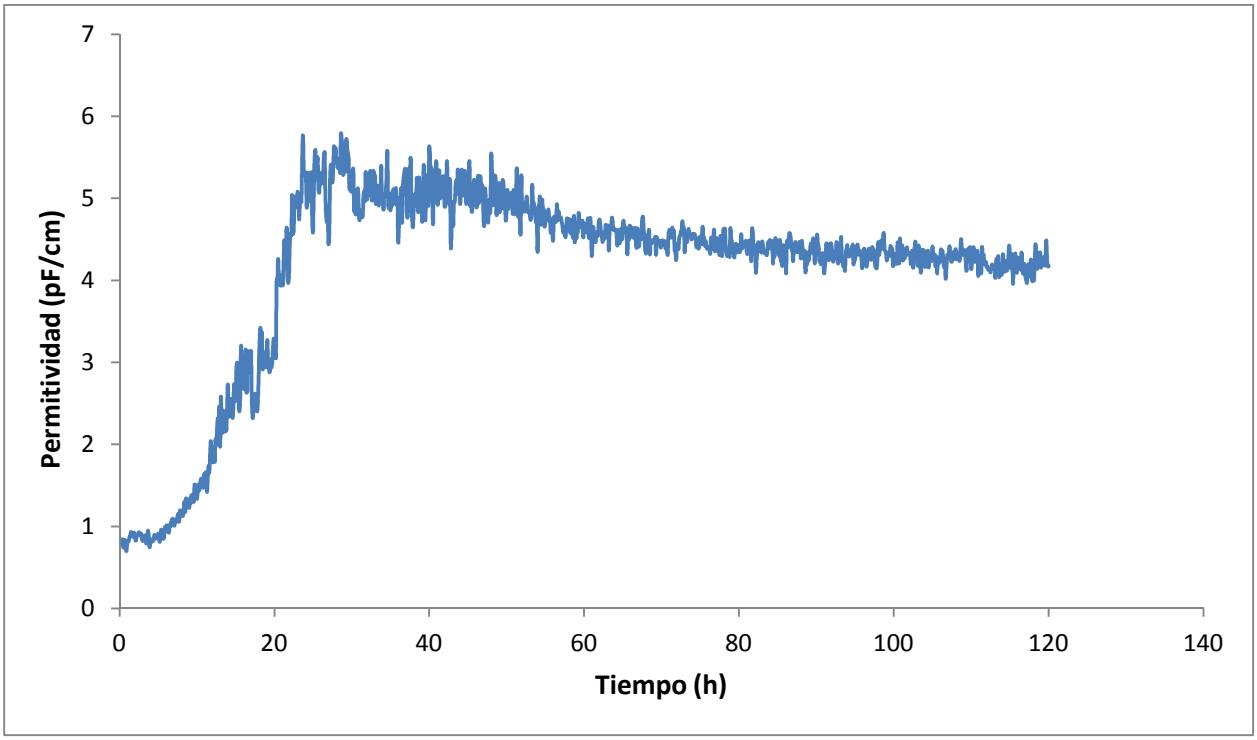

Figura 33. Cinética de viabilidad celular registrada mediante la técnica de espectroscopía dieléctrica durante la primera fermentación por lote

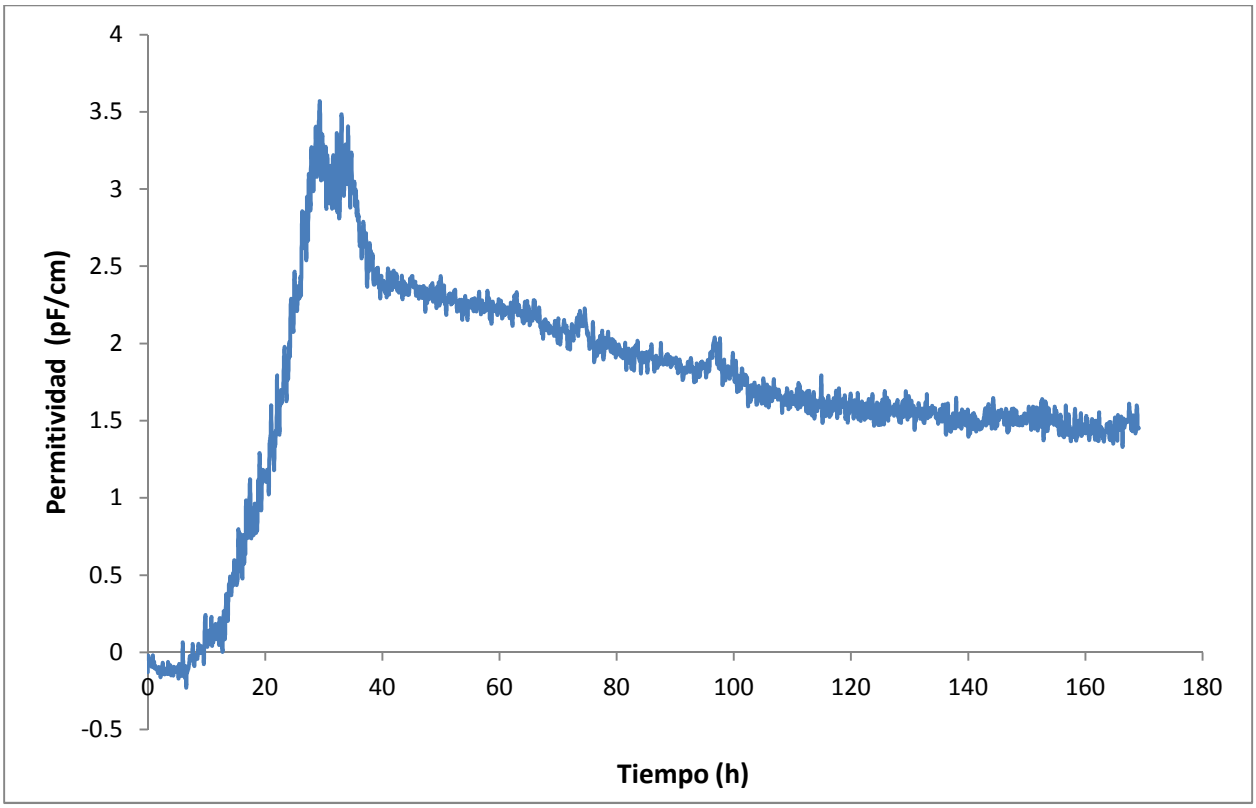

Figura 34. Cinética de viabilidad celular registrada mediante la técnica de espectroscopía dieléctrica durante la segunda fermentación por lote

La segunda técnica utilizada con el propósito de determinar la viabilidad celular dentro de un cultivo con la levadura *X. dendrorhous* es la microscopía de fluorescencia con el marcador de fluorescencia FUN-1. En la Figura 35 observamos los resultados obtenidos con dicha técnica en las fermentaciones por lote a nivel biorreactor, es posible notar que al comienzo de la fermentación se tiene aproximadamente sólo un 20% de células metabólicamente activas (viables). Conforme el tiempo en la fermentación avanza el porcentaje de células viables aumenta hasta alcanzar valores mayores al 95%; no obstante, cuando el cultivo llega a su fase estacionaria (36 horas) el porcentaje de células metabólicamente activas comienza disminuir hasta llegar alrededor del 10% al final de la fermentación.

Estos resultados coinciden con las mediciones realizadas con la sonda de espectroscopía dieléctrica, puesto que, en los mismos tiempos, la permitividad comienza a descender de forma constante. Además, estas mediciones de la viabilidad coinciden con los tiempos en que los valores en g/l de la biomasa, determinada por la técnica de peso seco (Figura 32), comienzan a

disminuir, dicho descenso puede ser también un indicativo de la perdida de viabilidad dentro del sistema.

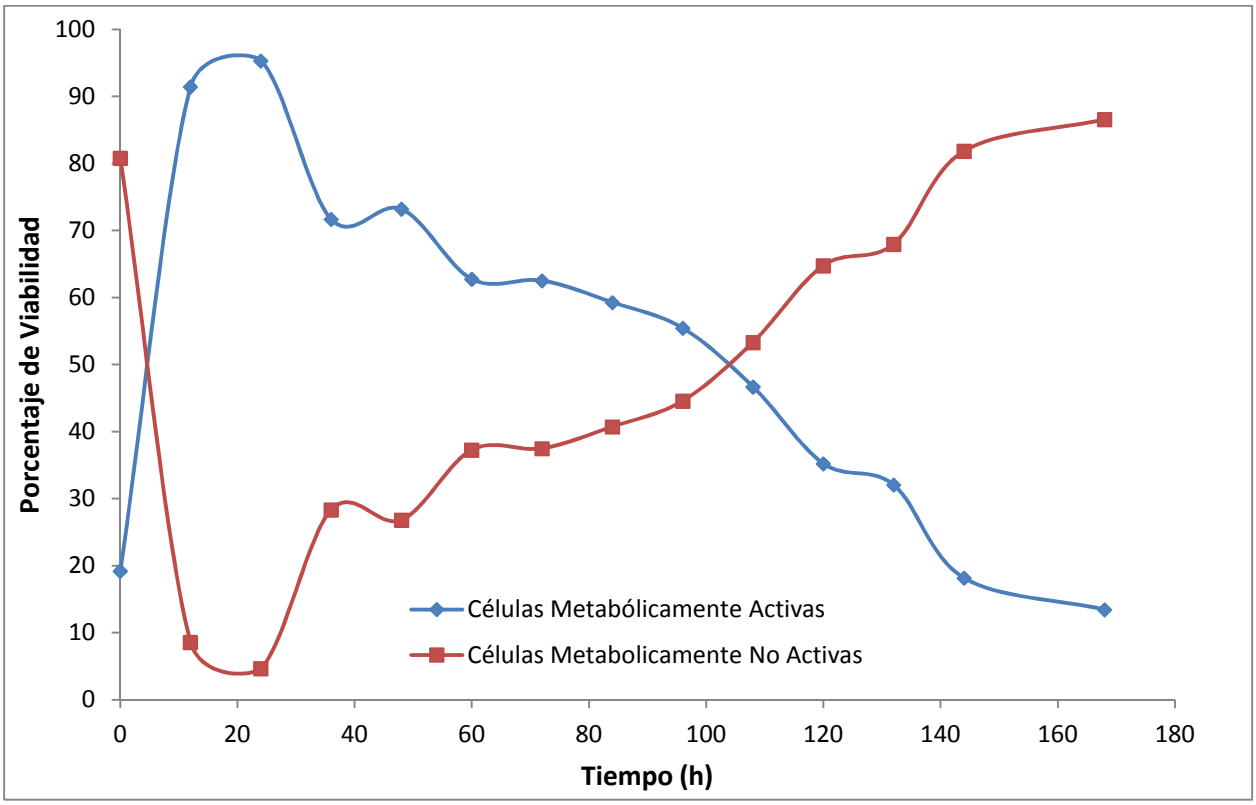

Figura 35. Cinética de viabilidad celular registrada mediante la técnica de microscopía de fluorescencia durante la segunda fermentación por lote

Millard y col. [81] reportaron un comportamiento similar al detectado en este trabajo de tesis, ya que en una fermentación realizada por lote con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* monitorean una disminución en la intensidad de la fluorescencia de emisión de color rojo (característico de células metabólicamente activas) conforme la fermentación avanza. Para los tiempos finales la emisión de color rojo es más pequeña en comparación con la emisión de fluorescencia verde (característica de células metabólicamente no activas).

Para ilustrar lo explicado anteriormente, se presenta una serie de fotografías obtenidas con microscopía de fluorescencia (Figuras 36-39) las cuales demuestran el desarrollo de la viabilidad celular, se puede ver como a las 24 horas las células metabólicamente activas (células con puntos rojos) representan la mayoría; sin embargo, conforme la fermentación sigue su curso el número

de células metabólicamente no activas (células verdes) comienza a aumentar, a las 48 horas se puede ver que la cantidad de células vivas comienza a disminuir. A las 96 horas el número de células muertas es mayor que el de las células vivas y, por último, a las 144 horas las células activas metabólicamente representan la minoría.

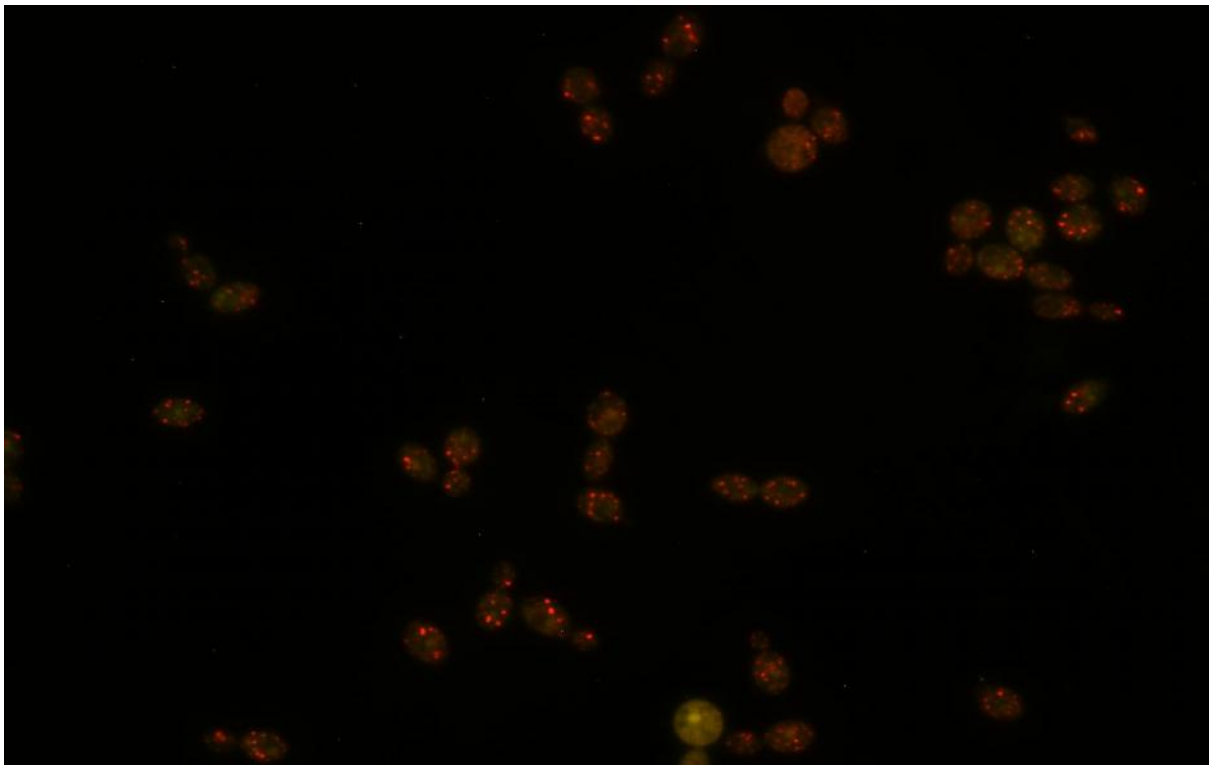

Figura 36. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel biorreactor (24 horas)

5.3.5 Tamaño y volumen celular

El tamaño y volumen celular fueron monitoreados utilizando el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®). En la figuras 40 y 41 se observan las cinéticas de la distribución del diámetro celular de la levadura *X. dendrorhous* durante las fermentaciones por lote. Se puede ver que al inicio de la fermentación las células tienen un diámetro promedio alrededor de 7 y 6.5 μm respectivamente y conforme la fermentación sigue su curso dicho diámetro celular promedio tiende a disminuir llegando a valores alrededor de 5.5 μm en la primera experimentación y 5 μm en la segunda.

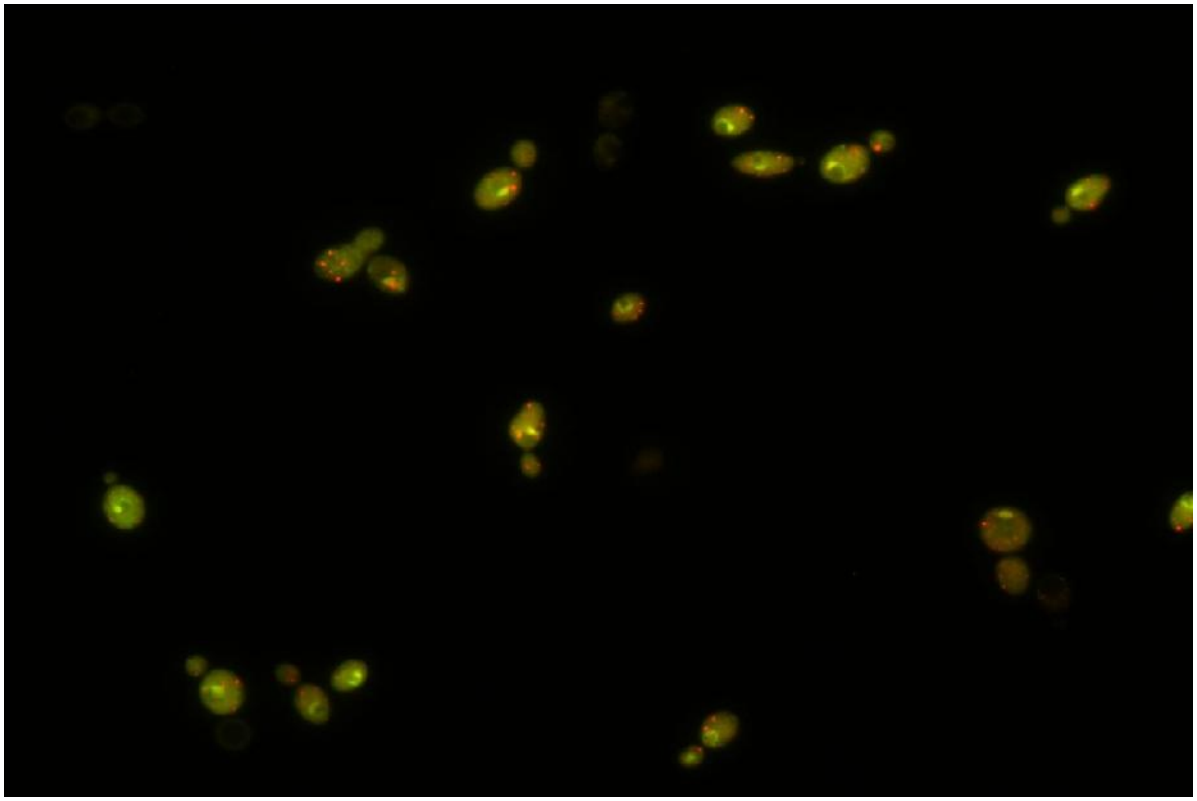

Figura 37. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel biorreactor (48 horas)

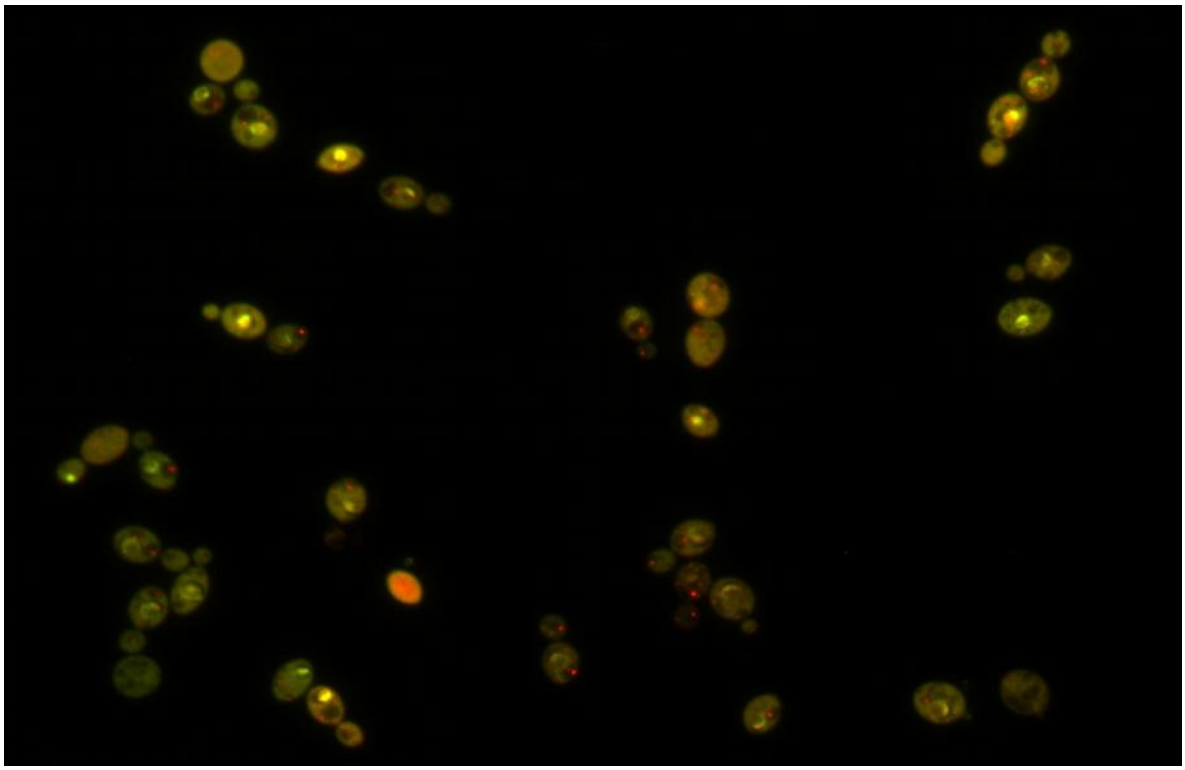

Figura 38. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en las fermentaciones a nivel biorreactor (96 horas)

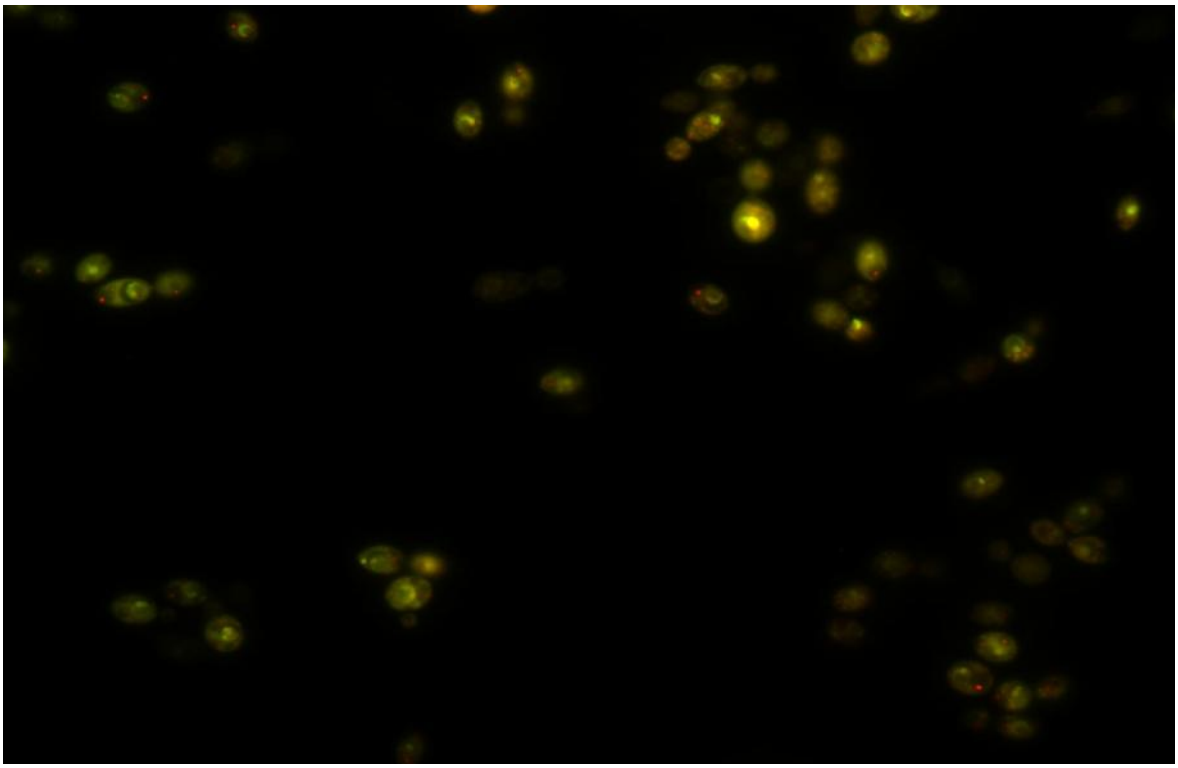

Figura 39. Fotografía obtenida con microscopía de fluorescencia en fermentaciones a nivel biorreactor (144 horas)

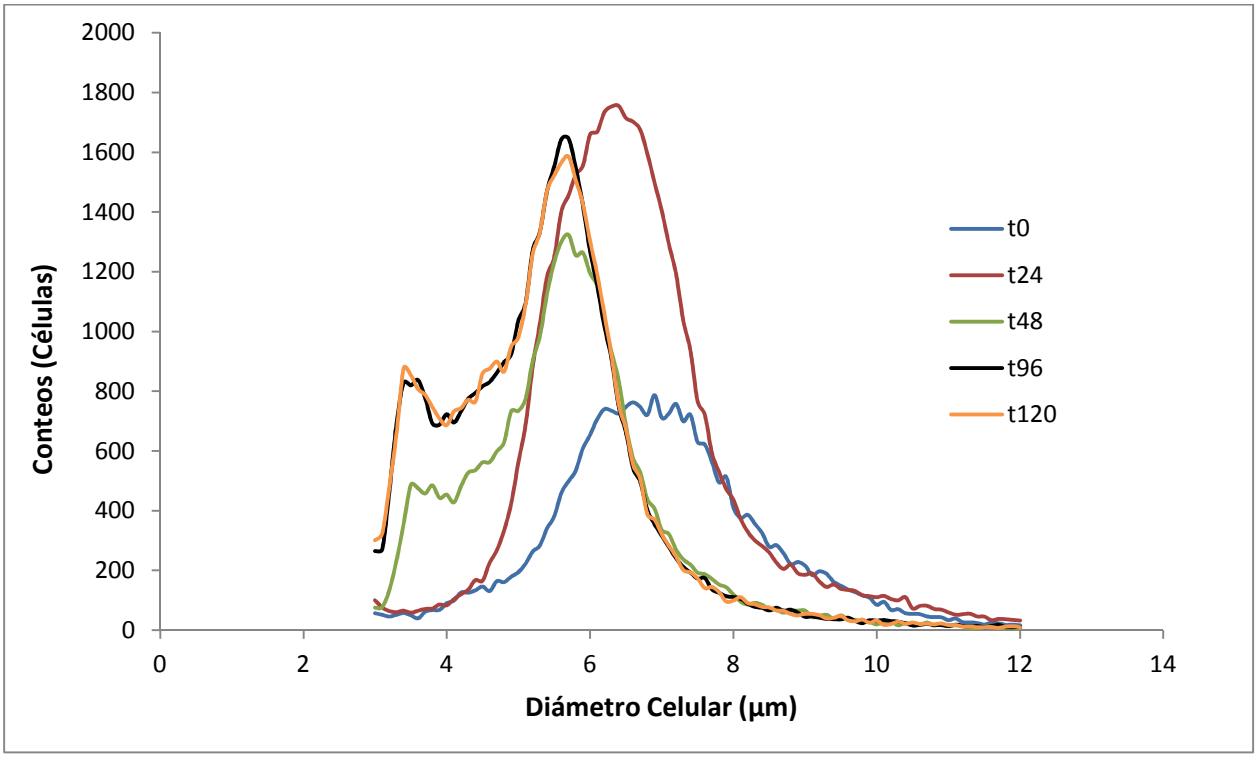

Figura 40. Cinética de distribución del diámetro celular registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante la primera fermentación por lote

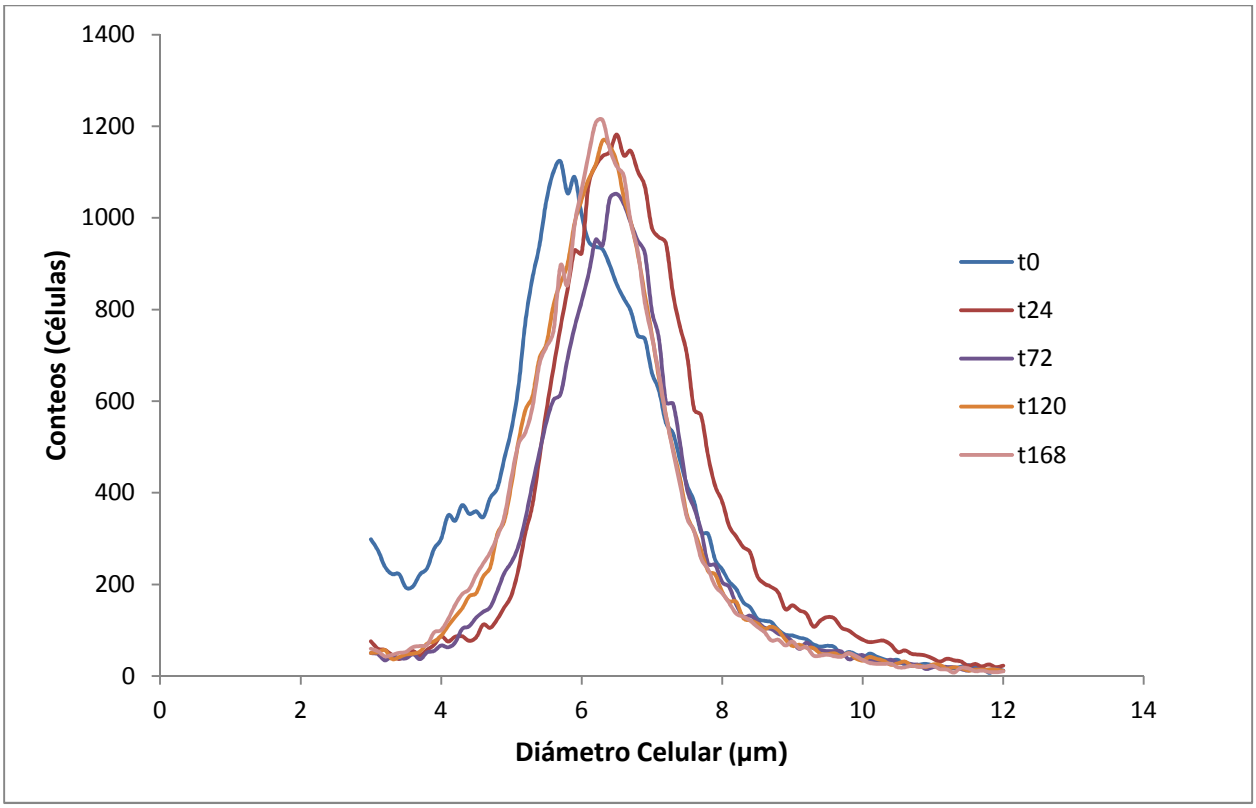

Figura 41. Cinética de distribución del diámetro celular registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante la segunda fermentación por lote

En las figuras 42 y 43 se muestran las cinéticas de distribución celular obtenidas durante las fermentaciones por lote a nivel biorreactor, tales cinéticas se obtuvieron asemejando cada célula a una esfera perfecta teniendo en cuenta su diámetro; de esta forma, para cada diámetro celular registrado por el CASY (0-40 µm) existe un volumen determinado (μm^3). Posteriormente se multiplica la cantidad de células registradas para cada diámetro con su respectivo volumen para conocer el volumen que representa cada grupo de células.

En las Figuras antes mencionadas se observa que al inicio de la fermentación el volumen celular alcanzó un valor máximo de 1.5×10^5 μm^3 con valores de diámetro celular entre 7 y 8 µm, lo cual refleja el estado de las células provenientes del inóculo. Después, a las 24 h el volumen celular llegó a un valor máximo alrededor de 2.5×10^5 μm^3 con un diámetro celular todavía alrededor de los 7 µm, el aumento en el volumen celular refleja que la levadura entró en la fase exponencial de su crecimiento y esto sin afectar significativamente su diámetro celular. No obstante,

conforme el cultivo entró en fase estacionaria el valor máximo del volumen celular disminuyó, hasta valores cercanos a los iniciales (1.5×10^5 µm^3) con valores de diámetro celular entre 5 y 6 µm, lo anterior expresa que la disminución en el volumen celular está directamente relacionada con el decremento en los valores del tamaño celular.

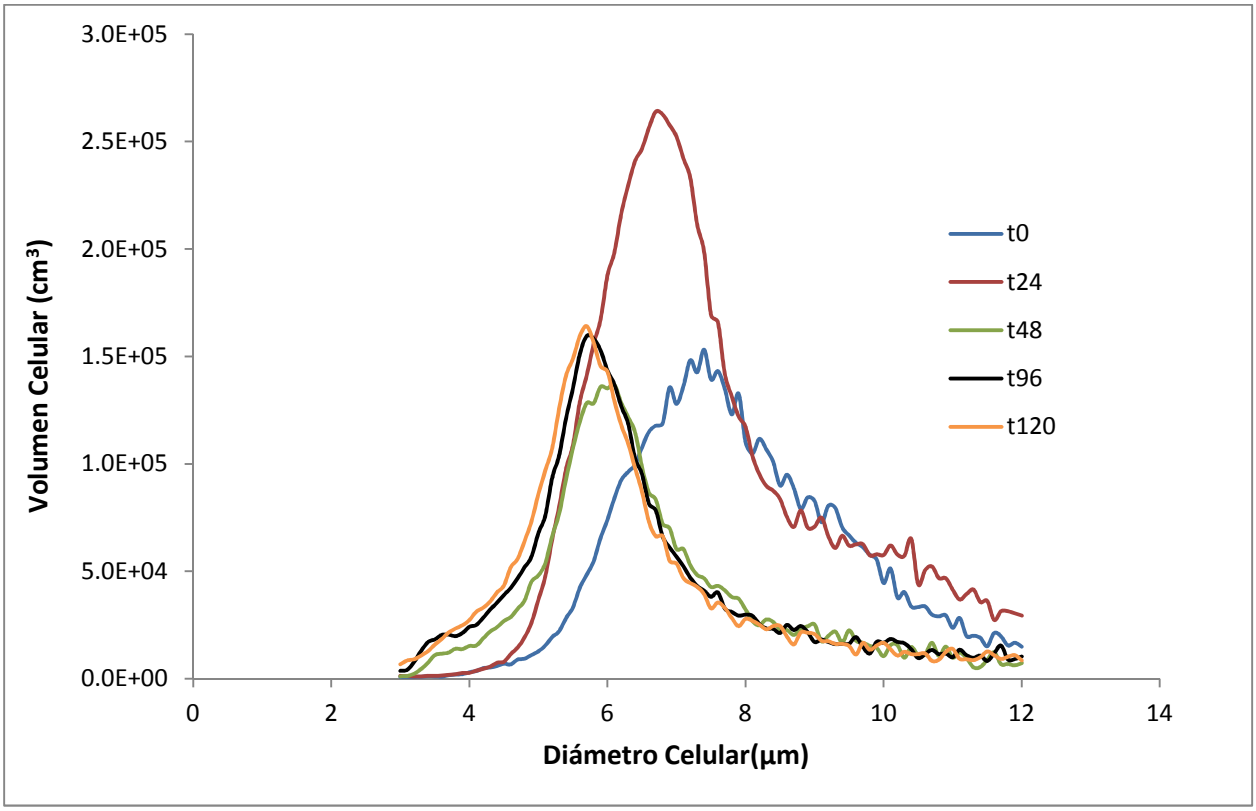

Figura 42. Cinética de distribución del volumen celular registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante la primera fermentación por lote

Para reforzar lo expuesto anteriormente se calculó el área bajo la curva de las gráficas presentadas en las Figuras 42 y 43 para determinar el volumen celular total para cada tiempo de la fermentación. En la Figura 44 y 45 se ve como al inicio del proceso fermentativo las células registradas por el CASY representaban un volumen celular total de 4.7×10^5 y 4.2×10^5 µm^3 respectivamente; a las 24 h dicho volumen celular total alcanza un valor alrededor de 7.8×10^5 µm^3 en la primera fermentación y 5.4×10^5 µm^3 en la segunda, lo anterior se entiende por el crecimiento acelerado del microorganismo en la fase exponencial. Posteriormente a las 48 horas, el volumen celular total comienza a disminuir alcanzando valores alrededor de 6×10^5 y 4.5×10^5

μm^3 de manera respectiva. Finalmente, en los últimos tiempos del bioproceso (120 y 168 horas) se tienen valores de volumen celular total cercanos a $4x10^5$ μm^3.

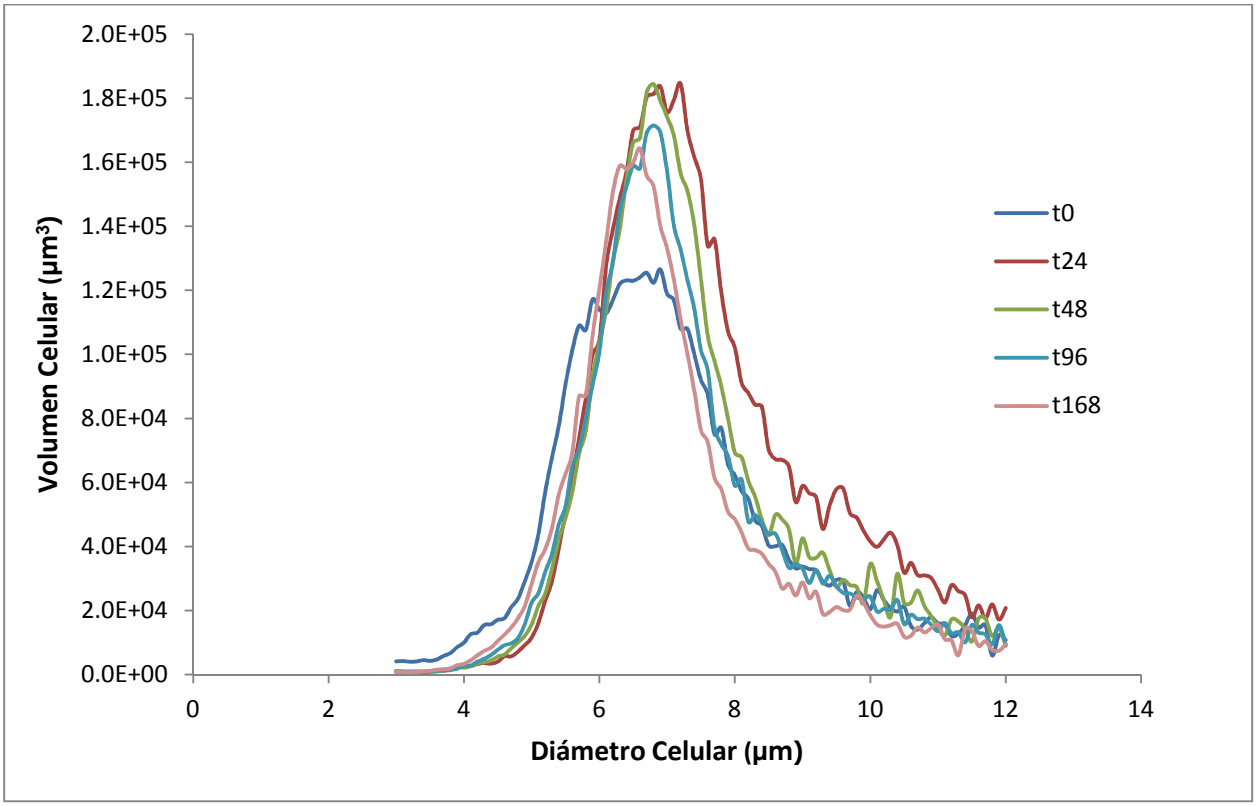

Figura 43. Cinética de distribución del volumen celular registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante la segunda fermentación por lote

Si se observa con atención el último resultado, es posible apreciar que dicho valor de volumen celular total es menor al que se tenía al inicio de la fermentación. Además, si se considera que la población celular no disminuyó a lo largo de la fase estacionaria, esta disminución en el volumen celular concuerda también con lo expuesto anteriormente donde se propuso que la disminución en la cantidad de biomasa detectada por peso seco se debía a una disminución en el tamaño y volumen celular.

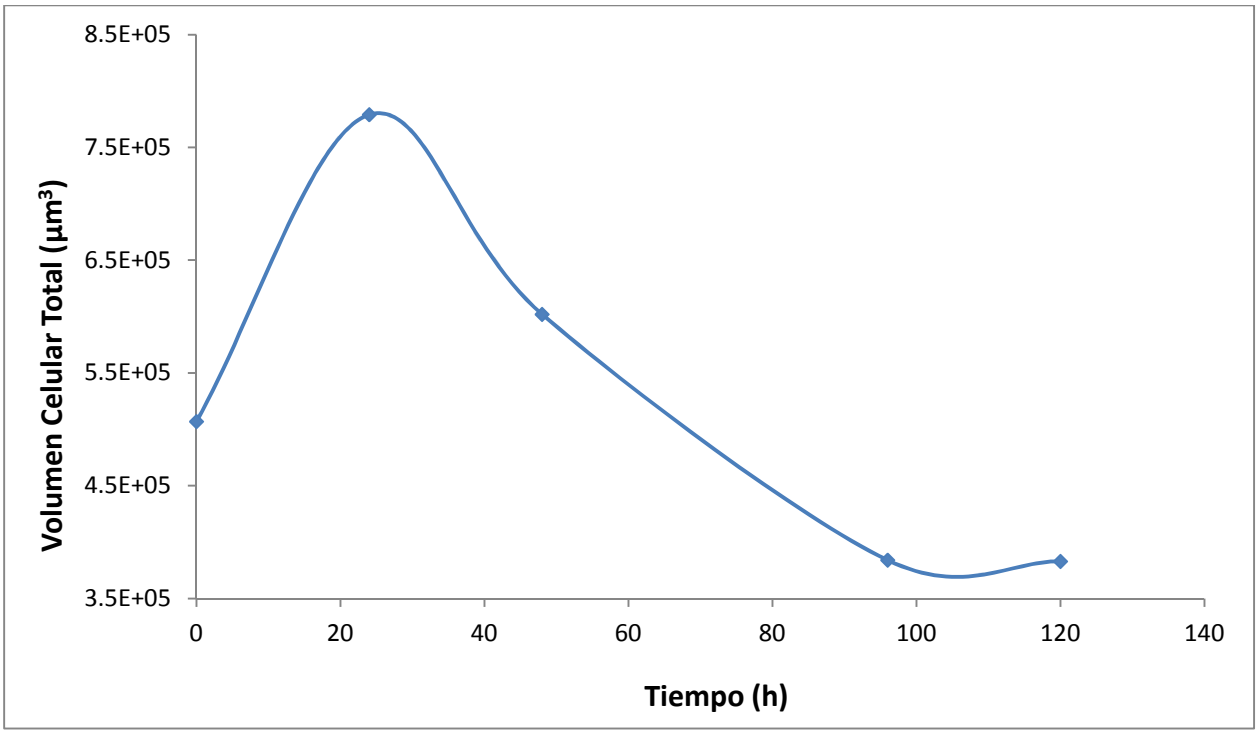

Figura 44. Cinética de distribución del volumen celular total (área bajo la curva) registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante la primera fermentación por lote

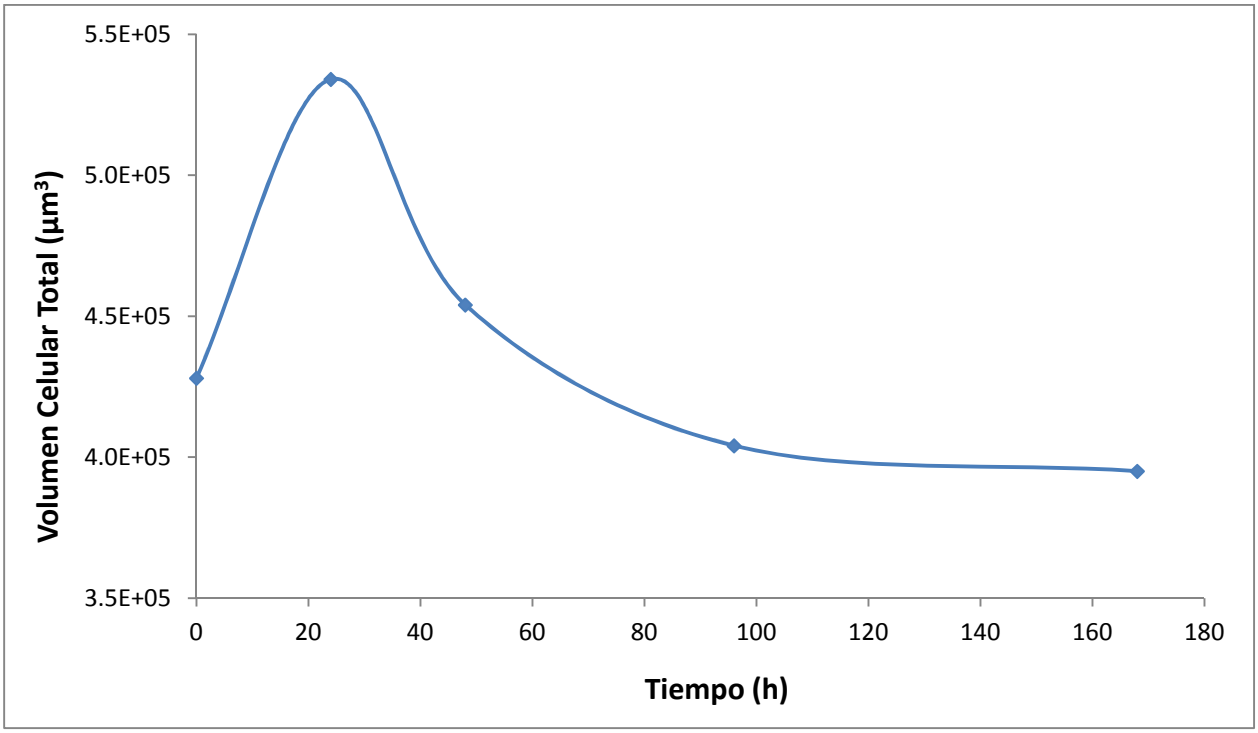

Figura 45. Cinética de distribución del volumen celular total (área bajo la curva) registrada mediante el Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) durante la segunda fermentación por lote

Más aún, los tiempos de la fermentación donde el volumen celular comenzó a descender coinciden con aquellos donde la viabilidad celular detectada por la sonda de espectroscopía dieléctrica comenzó a disminuir, lo cual lleva a pensar que la disminución del volumen celular es un indicador más de la pérdida de viabilidad celular en un cultivo microbiano.

5.3.6 Detección de astaxantina por espectroscopía Raman

En las Figuras 46 y 47 se visualiza la cinética del espectro de esparcimiento Raman obtenida en las fermentación por lote a nivel biorreactor con la levadura *X. dendrorhous*. En ambas, se puede contemplar el aumento de la intensidad Raman de los tres picos representativos de la astaxantina, el primero de ellos corresponde al enlace C-H a los 1010 números de onda, el segundo pico al enlace sencillo C-C a los 1157 números de onda y por último el tercer pico a los 1520 número de onda que denota el enlace doble C=C [84]. Se observa como la intensidad de los tres picos aumenta conforme la fermentación sigue su curso, 0-72 horas, para el primer biorreactor y 0-96 horas para el segundo, esto coincide con los incrementos en la producción de carotenoides totales presentados anteriormente (Figuras 31 y 32).

De igual forma, en las Figuras 48 y 49 se puede visualizar las cinéticas de cada uno de los tres enlaces con respecto al tiempo, tanto en estas figuras como en la Figuras 46 y 47 se puede observar que a partir de un tiempo determinado en la fermentación la intensidad Raman de los tres picos representativos de la astaxantina comenzó a descender, esto denota una disminución en la concentración de astaxantina dentro del cultivo microbiano.

Más aún, lo anterior coincide con el comportamiento encontrado en la producción de carotenoides totales (Figuras 31 y 32) donde se muestra una tendencia estacionaria sólo por un periodo corto de tiempo (48-72 horas). Posteriormente la concentración de carotenoides totales tiende a disminuir conforme avanza la fermentación hasta las 120 y 168 horas respectivamente.

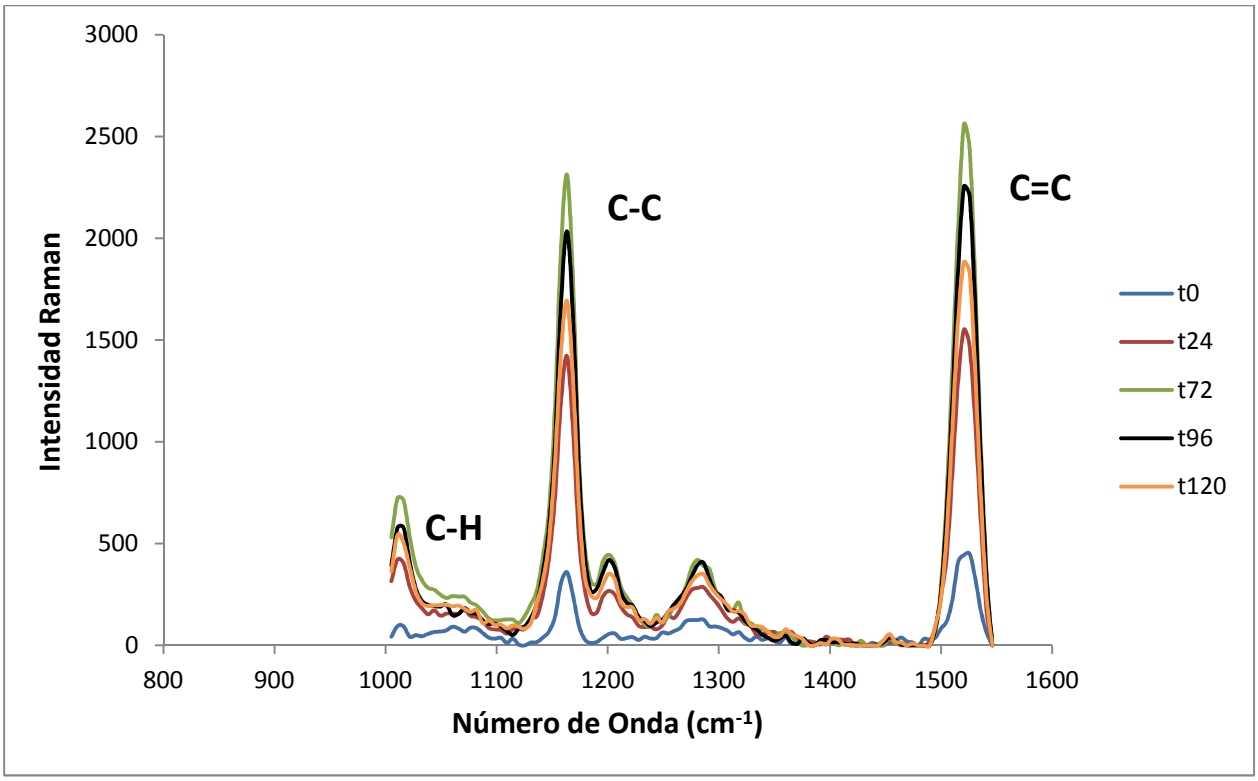

Figura 46. Cinética del espectro de esparcimiento Raman obtenida mediante espectroscopía Raman durante la primera fermentación por lote

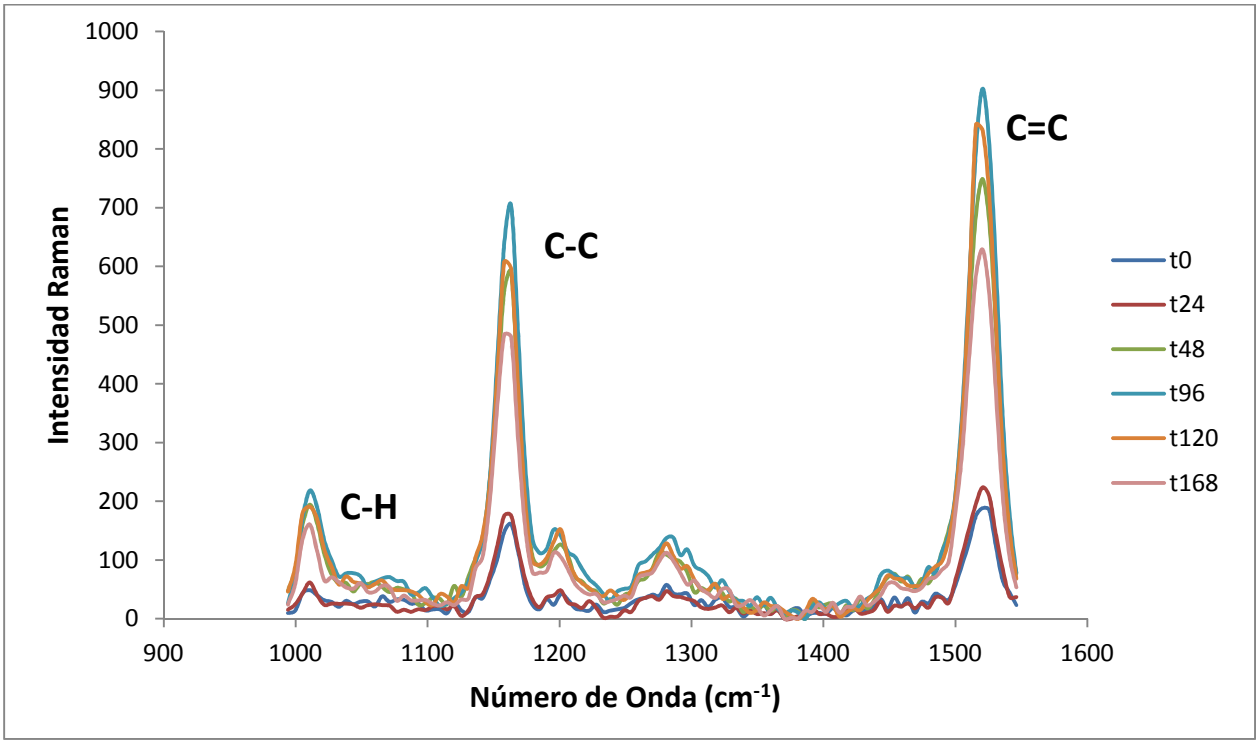

Figura 47. Cinética del espectro de esparcimiento Raman obtenida mediante espectroscopía Raman durante la segunda fermentación por lote

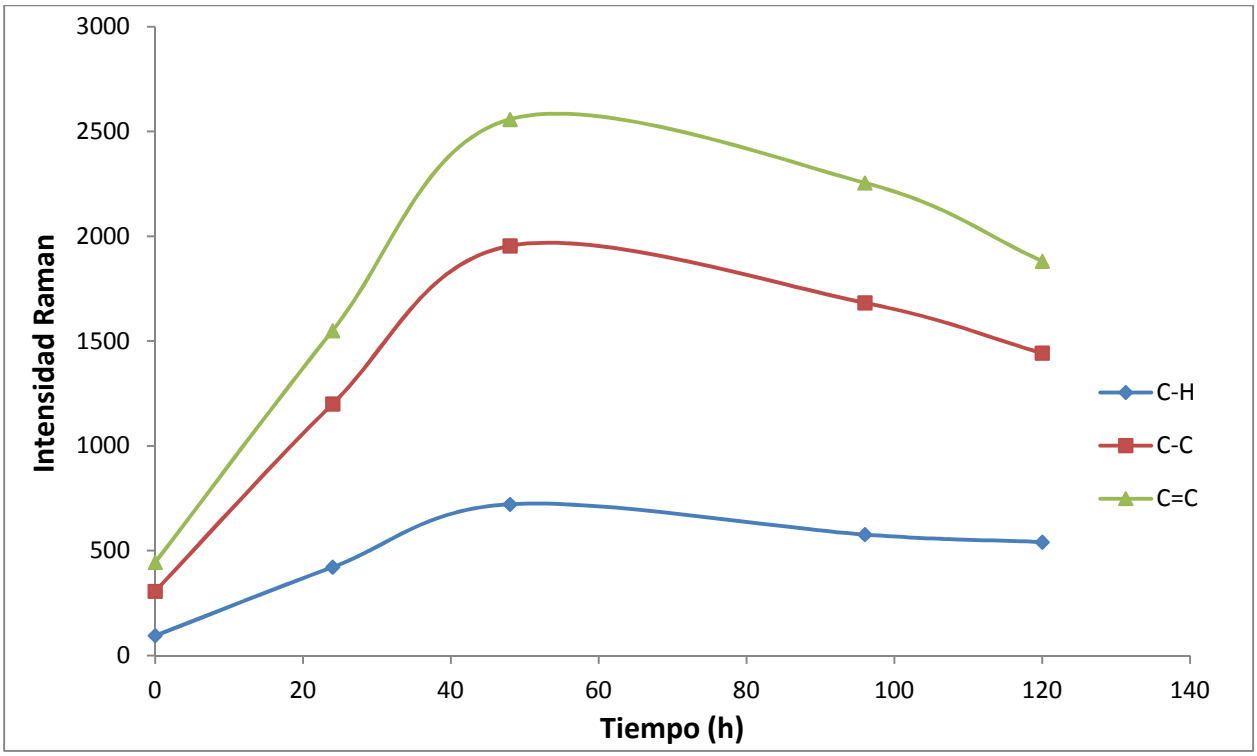

Figura 48. Cinética de la intensidad Raman para cada uno de los tres enlaces representativos de la astaxantina obtenida por espectroscopía Raman durante la primera fermentación por lote

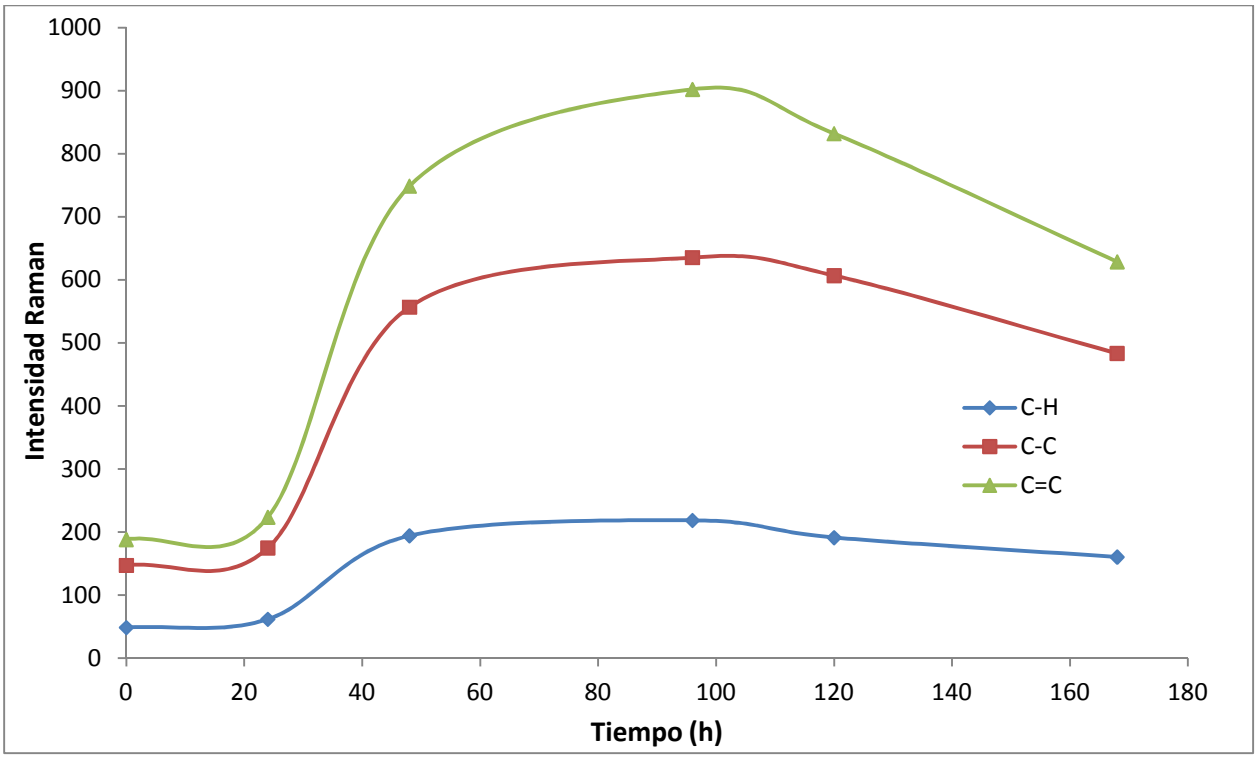

Figura 49. Cinética de la intensidad Raman para cada uno de los tres enlaces representativos de la astaxantina obtenida por espectroscopía Raman durante la segunda fermentación por lote

Es conveniente mencionar que dicho comportamiento descendente concuerda también con los tiempos en la fermentación en los cuales tanto los valores de la biomasa, la permitividad y el volumen celular comenzaron a disminuir; esto nos lleva a pensar en que la degradación de los carotenoides, incluyendo la astaxantina, producidos por la levadura *X. dendrorhous* es también un indicador de la viabilidad celular.

Con la finalidad de explorar la posibilidad de utilizar la espectroscopía Raman directo en el biorreactor y así propiciar una medición en línea de la producción de astaxantina, se trasladó, al final de la fermentación, el biorreactor, así como también algunos aditamentos como el controlador de la agitación y la bomba de aireación, al laboratorio donde se encontraba el equipo de espectroscopía dieléctrica.

La Figura 50 muestra la medición obtenida efectuando el muestreo normal (Sección 4.5.6) y la medición adquirida directo del biorreactor, se puede ver que la intensidad Raman es mayor, en los tres picos característicos de la astaxantina, para el muestreo normal que para el directo en el biorreactor, esto se puede entender considerando que en el muestreo normal (Sección 4.5.6) el haz de luz monocromática Raman pasa a través de la pared delgada de cristal de un vial y en cambio directo en el biorreactor, la pared de vidrio es mucho más gruesa y absorbe parte de la potencia del haz de luz.

Otro aspecto a tener en cuenta es la agitación dentro del biorreactor (900 rpm), esto puede interferir en la medición y, con el propósito de comprobar esta interferencia, se efectuó una medición deteniendo la agitación. En la Figura 50 se puede observar que la intensidad Raman aumentó con estas condiciones, sin embargo no de manera significativa con respecto a la obtenida en el muestreo normal.

No obstante la disminución en la intensidad Raman, este experimento demuestra que la implementación directa de espectroscopía Raman en el biorreactor arrojaría datos en línea muy valiosos para el monitoreo del estado fisiológico de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

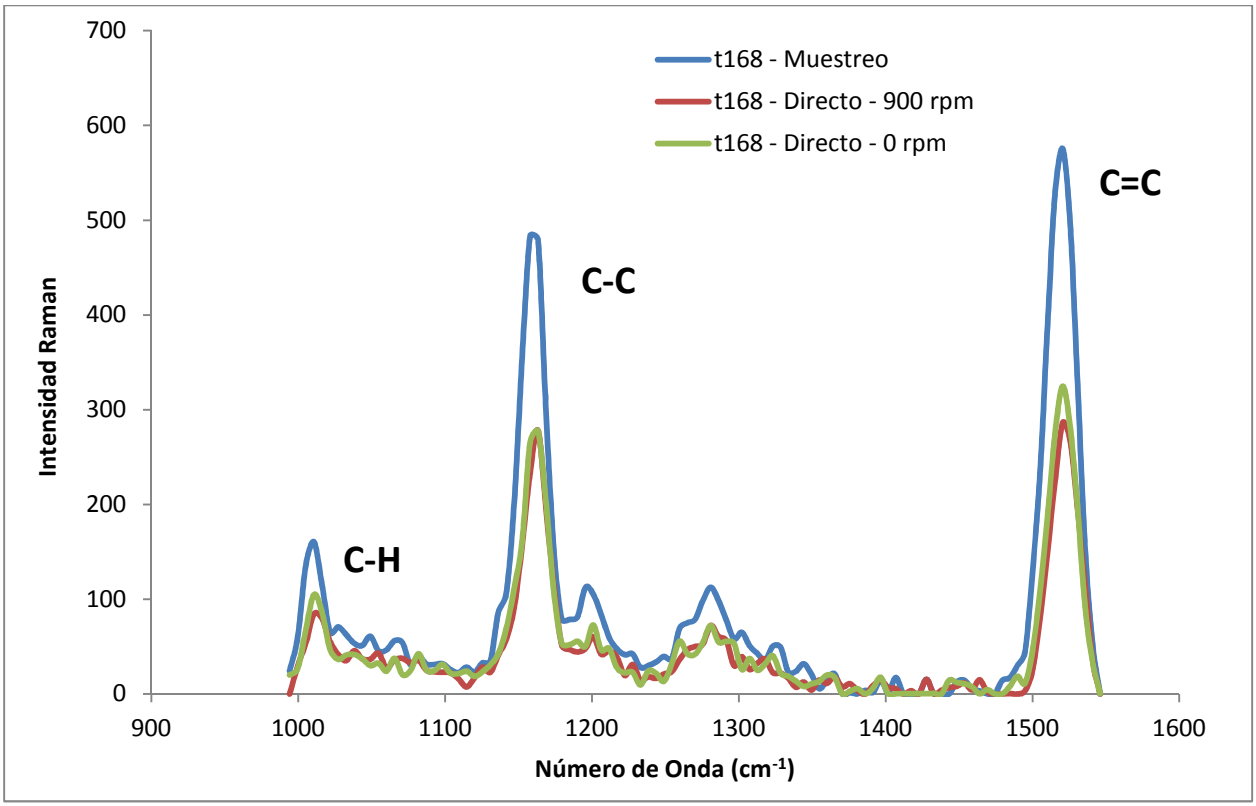

Figura 50. Comparación de la intensidad Raman obtenida por muestreo y por exposición del haz de luz monocromática directa al biorreactor

6. Conclusiones

- La aplicación del análisis de sensibilidad paramétrica permitió visualizar lo parámetros de mayor importancia a tener en cuenta durante la experimentación de este trabajo de tesis.

- La utilización de diversas técnicas para cuantificación de crecimiento celular fue importante para visualizar diferencias significativas como lo son la disminución en la biomasa y en la densidad óptica.

- El empleo de espectroscopía dieléctrica permitió la detección en línea de los cambios en la viabilidad celular en cultivos de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

- La implementación de microscopía con el marcador de fluorescencia denominado FUN-1, permitió determinar el porcentaje de viabilidad celular en cultivos de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

- La aplicación del Sistema de Análisis y Conteo de Células (CASY®) permitió ver la evolución en el tamaño y volumen celular de un cultivo con la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

- El uso de espectroscopía Raman permitió la detección de uno se los factores que influyen en el estado fisiológico de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*: la producción de astaxantina.

- Los resultados obtenidos mediante las técnicas utilizadas en este trabajo de tesis fueron correlacionados entre sí, así como con datos adquiridos por métodos convencionales, tales como cuantificación de azúcares por DNS y extracción de carotenoides totales por DMSO.

7. Perspectivas

- Utilización de una técnica alterna para comprobar si las células metabólicamente no activas detectadas por microscopía de fluorescencia son realmente incapaces de replicarse (células no cultivables) si se les suministra sustrato de nueva cuenta.

- Aplicación de espectroscopía Raman directamente al biorreactor para lograr una determinación en línea de la cinética de producción de astaxantina en un cultivo con la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

- Clasificación de varios estados fisiológicos específicos a partir de la información obtenida de las diferentes técnicas utilizadas en este trabajo de tesis.

- Implementación de un sistema de producción en continuo, con el objetivo de controlar por un tiempo prolongado un estado fisiológico específico.

- Diseño e implementación de un sistema de control automático a partir de las técnicas en línea: espectroscopía dieléctrica y espectroscopía Raman.

8. Referencias Bibliográficas

1. Chávez-Cabrera C., Flores-Bustamante Z.R. and Flores-Cotera L.B., *Una vista integral de la síntesis de astaxantina en Phaffia rhodozyma.* BioTecnología, 2010. 14(3).
2. Higuera-Ciapara I., Félix-Valenzuela L. and Goycoolea F. M., *Astaxanthin: A review of its chemistry and applications.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006. 46(2): p. 185-196.
3. Lorenz R. and Cysewki G. , *Commercial potential for Hematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin.* Trends in Biotechnology, 2000. 18 (4): p. 160-167.
4. Campocosio A.T., Wagner J.R., Rambala M.A.O. and Legarreta I., *Yeast and their products as ingredients in the food industry.* Universidad Nacional de Quilmes Editorial, 2008.
5. Guerin M., Huntley M.E. and Olaizola M., *Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition.* Trends in Biotechnology, 2003. 21: p. 210-216.
6. Nishino H., Tokuda H., Satomi Y., Masuda M., Bu P. and Onozuka M., *Cancer prevention by carotenoids.* Pure and Applied Chemistry, 1999. 71: p. 2273-2278.
7. BBC Research, *The global market for carotenoids (FOD025C).* http://www.bccresearch.com Accessed 26 June 2013, 2008.
8. Bernhard K., *Synthetic astaxanthin, the route of a carotenoid from research to commercialization.* Carotenoids: chemistry and biology, 1990: p. 337-363.
9. Frucht L.E. and Kanon S., *Israel grows red algae in the desert to figth desease.* 2005.
10. Lee J.E. and Peniston Q., *Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production.* Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products, 1982: p. 415.
11. Olsen R.L. and Jacobsen T., *Characterization of flash-dried shrimp processing waste.* Journal of Marine Biotechnology, 1995. 3: p. 208-209.
12. Lorenz R.T., *A review of astaxanthin as a carotenoid and vitamin source for sea bream.* 1998.
13. Olaizola M., *Commercial production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis using 25,000-liter outdoor photobioreactors.* Journal of Applied Phycology, 2000. 12: p. 499-506.
14. Boussiba S., Bing W. and Zarka A., *Changes in pigment profiles of Haematococcus pluvialis during exposure to environmental stresses.* Biotechnology Letters, 1999. 21: p. 601-604.
15. Storebakken T. and No H.K., *Pigmentation of rainbow trout.* Aquaculture, 1992. 100: p. 209-229.
16. Johnson E. A., *Phaffia rhodozyma: colorful odyssey.* International Microbiology, 2003. 6: p. 169-174.
17. Schmidt I., Schewe H., Gassel S., Jin C., Buckingham J., Humbelin M., Sandmann G. and Schrader J., *Biotecnological production of astaxanthin with Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2011. 89: p. 555-571.
18. Golubev W.I., *Perfect state of Rhodomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma).* Yeast, 1995. 11: p. 101-110.
19. Miller M.W. and Phaff H.J., *The yeasts: a taxonomic study.* 1998.
20. Johnson E. A. and An G.H., *Astaxanthin formation by microbial sources.* Critical Reviews in Biotechnology, 1991. 11(4): p. 297-326.
21. Rose A.H. and Harrison J.S., *The Yeasts.* Academic Press Limited, 1993. 5: p. 293-305.
22. Johnson E. A., Villa T.G. and Lewis M.J., *Phaffia rhodozyma as an astaxanthin source in salmonid diets.* Aquaculture, 1980. 20: p. 123-124.
23. Andrewes A, Phaff H and Starr M, *Carotenoids of Phaffia rhodozyma, a red-pigmented fermenting yeast.* Phytochemistry, 1976. 15(6): p. 1003-1007.
24. Kajiwara P., Fraser P.D., Kondo K. and Misawa N., *Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in Escherichia coli.* Biochemical Journal, 1997. 324: p. 421-426.

25. Niklitschek M., Alcaíno J., Barahona S., Sepúlveda D., Lozano C., Carmona M., Marcoleta A., Martínez C., Lodato P., Baeza M., and Cifuentes V., *Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of Xanthophyllomyces dendrorhous.* Journal of Biological Research, 2008. 41: p. 93-108.
26. Verdoes J.C., Krubasik K.P., Sandmann G. and van Ooyen A.J., *Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthesis gene from Xanthophyllomyces dendrorhous.* Molecular and General Genetics, 1999a. 262: p. 453-461.
27. Verdoes J.C., Misawa N. and van Ooyen A.J., *Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthesis gene encoding phytoene desaturase of Xanthophyllomyces dendrorhous.* Biotechnology and Bioengineering, 1999b. 63: p. 750-755.
28. Ojima K., Breitenbach J., Visser H., Setoguchi Y., Tabata K., Hoshino T., van der Berg J. and Sandmann G., *Cloning of the astaxanthin synthase gene from Xanthophyllomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma) and its assignment as a beta-carotene-3-hdroxylase/4-ketolase.* Molecular Genetics and Genomics, 2006. 275: p. 148-158.
29. Hannibal L., Lorquin J., D'Ortoli N.A., García N., Chaintreuil C., Masson-Boivin C., Dreyfus B. and Giraud E., *Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium Bradyrhizobium sp. Strain ORS278.* Journal of Bacteriology, 2000. 182: p. 3850-3853.
30. Marcoleta A., Niklitschek M., Wozniak A., Lozano C., Alcaíno J., Baeza M. and Cifuentes V., *Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin: biosynthesis pathway in Xanthophyllomyces dendrorhous.* BMC Microbiology, 2011. 11: p. 190.
31. Martin M.A., Acheampong E. and Patel R.T., *Production of astaxanthin by Phaffia rhodozyma using peat hydrolysates as substrate.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1993. 58: p. 223-230.
32. Moriel D.G., Chociai M.B., Pereira Machado I.M., Fontana J.D. and T.M. Bordim Bonfim, *Effect of feeding methods on the astaxathin production by Phaffia rhodozyma in fed-batch process.* Brazilian Archives of Biology and Technology, 2005. 48: p. 397-401.
33. Meyer P.S. and Preez J.C., *Astaxanthin production by Phaffia rhodozyma mutant on grape juice.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1994. 10: p. 178-183.
34. Dominguez-Bocanegra A.R. and Torres-Muñoz J.A., *Astaxanthin hyperproduction by Phaffia rhodozyma (now Xanthophyllomyces dendrorhous) with raw coconut milk as sole source of energy.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2004. 66: p. 249-252.
35. Haard N.F., *Astaxanthin formation by the yeast Phaffia rhodozyma on molasses.* Biotechnology Letters, 1988. 10: p. 609-614.
36. Ramírez J., Obledo N., Arellano M. and Herrera E., *Astaxanthin production by Phaffia rhodozyma in a fed-batch culture using a low cost medium feeding.* e-Gnosis, 2006. 4: p. 1-9.
37. Tinoi J., Rakariyatham N. and Deming R.L., *Utilization of mustard waste isolates for improved production of astaxathin by Xanthophyllomyces dendrorhous.* Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006. 33: p. 309-314.
38. Vázquez M., Santos V. and Parajó J.C., *Fed-batch cultures of Phaffia rhodozyma in xylose-containing media made from wood hydrolysates.* Food Biotechnology, 1998a. 12: p. 43-55.
39. An G.H., Jang B.G. and Cho M.H, *Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast Xanthophyllomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma) with molasses.* Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001. 92: p. 121-125.
40. Goodwin T.W., *Biosynthesis of carotenoids: an overview.* Methods in enzymology carotenoids. Part B. Metabolism, genetic and biosynthesis, 1993. 214: p. 330-340.
41. Raja R., Haemaiswarya S. and Rengasamy R., *Exploitation of Dunalliella for β-carotene production.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. 74: p. 517-523.

42. Johnson E.A. and Lewis M.J., *Astaxanthin formation by Phaffia rhodozyma.* Journal of Genetic and Microbiology, 1979. 115: p. 173-183.
43. Longo E., Siero C., Velazquez J.B., Calo P., Cansado J. and Villa T.G., *Astaxanthin production from Phaffia rhodozyma.* Biotechnology Forum European, 1992. 9: p. 565-567.
44. Hayman E.P, Yokoyama H., Chichester C.O. and Simpson K.L., *Carotenoid biosynthesis in Rhodotorula glutinis.* Journal of Bacteriology, 1974. 120: p. 1339-1343.
45. Buzzini P., Martini A., Gaetani M., Turchetti B., Pagnoni U.M. and Davoli P., *Optimization of carotenoid production by Rhodotorula graminis DBVPG 7021 as a fundtion of trace elements concentration by means of response surface analysis.* Enzyme and Microbial Technology, 2005. 36: p. 687-692.
46. Flores L.B. and Sánchez S., *Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by Phaffia rhodozyma in a chemically defined medium.* Biotechnology Letters, 2001a. 23: p. 793-797.
47. Culotta V.C., Lin S.J., Schmidt P., Klomp L.W., Casareno R.L. and Gitlin J., *Intracellular pathways of copper trafficking in yeast and humans.* Advances in Experimental Medicine and Biology, 1999. 448: p. 247-254.
48. Galiazzo F., Schiesser A. and Rotilio G., *Oxygen-independent induction of enzyme activities related to oxygen metabolism in yeast by copper.* Biochimica et Biophysica Acta, 1988. 965: p. 46-51.
49. Tamai K.T., Gralla E.B., Ellerby L.M, Valentine J.S. and Thiele D.J., *Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase.* Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1993. 90: p. 8013-8017.
50. Misawa N., Satomi Y., Kondo K., Yokoyama A., Kajiwara S., Saito T. and Ohtani A., *Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level.* Journal of Bacteriology, 1995. 177: p. 6575-6584.
51. Evans C.T., Scragg A.H. and Ratledge C., *Regulation of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-olaginous yeast by adenine nucleotides.* European Journal of Biochemistry, 1983. 132: p. 609-615.
52. Flores L.B., Martin R. and Sánchez S., *Citrate, a possible precursor of astaxanthin in Phaffia rhodozyma: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2001b. 55: p. 341-347.
53. Pilar C., Trinidad M., Velázquez J. and Villa T., *Mevalonic acid increases tran-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in Phaffia rhodozyma.* Biotechnology Letters, 1995. 17(6).
54. Kim S.J., Kim G.J, Park D.H. and Ryu Y.W., *High-level production of astaxanthin by fed-batch culture of mutant strain Phaffia rhodozyma AJ-6-1.* Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003. 13: p. 175-181.
55. Gu W.L., An G.H. and Johnson E. A., *Ethanol increases carotenoid production in Phaffia rhodozyma.* Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1997. 19: p. 114-117.
56. Crueger W. and Crueger A., *Biotecnología.* Manual de Microbiología Industrial, 1993. 5: p. 73-80.
57. McNeil B. and Harvey L.M., *Fermentation, a practical approach.* IRL Press, Tokyo, 1990.
58. Agrawal P., Kosh G. and Ramseier M, *An Algorithm for Operting a Fed-Batch Fermentor at Optimum Specific Growth Rate.* Biotechnology and Bioengineering, 1989. 33: p. 115-125.
59. Pirt S.J., *The dynamics of microbial processes: a personal view in microbial growth dynamics.* IRL Press, Tokyo, 1990. 28: p. 1-16.
60. Ni H., Chen Q.H., Ruan H., Yang Y.F., Li L.J., Wu G.B., Hu Y. and He G.Q., *Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by Phaffia rhodozyma.* Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 2007. 8(5): p. 365-370.

61. Zheng Y.G., Hu Z.C., Wang Z. and Shen Y.C., *Large-scale production of astaxanthin by Xanthophyllomyces dendrorhous.* Food and Bioproducts Processing, 2006. 84(2): p. 164-166.
62. Liu Z.Q., Zhang J.F., Zheng Y.G. and Shen Y.C., *Improvement of astaxanthin production by a newly isolated Phaffia rhodozyma mutant with low-energy ion beam implantation.* Journal of Applied Microbiology, 2008. 104(3): p. 861-872.
63. Hu Z.C., Zheng Y.G., Wang Z. and Shen Y.C., *Effect of sugar-feeding strategies on astaxanthin production by Xanthphyllomyces dendrorhous.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005. 21(5): p. 771-775.
64. Acheampong E.A. and Martin M.A., *Kinetic studies on the yeast Phaffia rhodozyma.* Journal of Basic Microbiology, 1995. 35(3): p. 147-155.
65. An G.H., Kim C.H., Choi E.S. and Rhee S.K., *Medium optimization for cultivation of carotenoid hyperproducing Phaffia rhodozyma mutant HT-5FO1C.* Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996. 82(5): p. 515-518.
66. Vázquez M. and Martin M.A., *Optimization of Phaffia rhodozyma continuous culture through response surface methodology.* Biotechnology and Bioengineering, 1998b. 57(3): p. 314-320.
67. Pons M.N., Le Bonté S. and Potier O., *Spectral analysis and finger-printing for biomedia characterisation.* Journal of Biotechnology, 2004. 113: p. 211-230.
68. Alford J.S., *Bioprocess control: advances and challenges.* Computers & Chemical Engineering, 2006. 30: p. 1464-1475.
69. Schugerl K., *Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years.* Journal of Biotechnology, 2001. 85: p. 149-173.
70. Lourenço N.D., Lopes J.A., Almeida C.F., Sarraguça M.C. and Pinheiro H.M., *Bioreactor monitoring with spectroscopy and chemometrics: a review.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. 404: p. 1211-1237.
71. Konstantinov K. and Yoshida T., Biotechnol Bioeng, 1989. 33: p. 1154.
72. Axcell B. and O'Connor E., *The concept of yeast vitality - an alternative approach.* Procedings 24th Convention of th Institute of Brewing, 1996. Asia Pacific Section(Institute of Brewing, Singapore): p. 64-71.
73. Gabriela C.G. and Daniela V., *The influence of different forms of backery yeast Saccharomyces cerevisiae type strain on the concetration of individual sugars and their utilization during fermentation.* Romanian Biotecnhnology Letters, 2010. 15: p. 5417-5422.
74. Powell C.D., Quain D.E. and Smart K.A., *The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation.* FEMS Yeast Research, 2003. 3: p. 149-157.
75. Rezaei M.N., Dornez E., Jacobs P., Parsi A., Verstrepen K.J. and Courtin C.M., *Harvesting yeast (Saccharomyces cerevisiae) at different physiological phases significantly affects its functionality in bread dough fermentation.* Food Microbiology, 2014. 39: p. 108-115.
76. Schwan H.P., *Electric properties of tissues and cell suspensions.* Advances in Biological and Medical Physics, 1957. 5: p. 147-208.
77. Carvell J.P., Austin G., Matthee A., Van de Spiegle K., Cunningham S. and Harding C., *Developments in using offline radio-frecuency impedance methods for measuring the viable cell concentration in the brewery.* Journal of the American Society of Brewing Cemists, 2000. 58: p. 57-62.
78. Carvell J.P. and Williams J., *Latest developments in the monitoring of the viable cell concentration during fermentation using radio-frequency impedance methods.* Symposium Life Science and Technology, Rotterdam, Netherlands, 2002.
79. Olguín-Sánchez R.A., Rojas-Rendón J.A., Díaz-Campillo M.J. and Salazar Y., *Monitorización del crecimiento de microorganismo en sistemas cerrados utilizando espectroscopía de impedancia eléctrica.* Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica, 2009. 30(2): p. 98-108.

80. Tibayrenc P., Preziosi-Belloy L. and Ghommidh C., *On-line monitoring of dielectrical propierties of yeast cells during a stress-model alcoholic fermentation.* Process Biochemistry, 2011. 46: p. 193-201.
81. Millard P.J., Roth B.L., Thi H.P., Yue S.T. and Haugland R.P., *Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeast.* Applied and Environmental Microbiology, 1997. 63(7): p. 2897-2905.
82. de Carvalho M.A.G., Lotufo R. de A. and Couprie M., *Morphological segmentation of yeast by image analysis.* Image and Vision Computing, 2007. 25: p. 34-39.
83. Papaioannou E.H., Liakopoulou-Kyriakides M., Christofilos D., Arvanitidis I. and Kourouklis G., *Raman spectroscopy for intracellular monitoring of carotenoid in Blakeslea trispora.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009. 159: p. 478-487.
84. Cannizaro C., Rhiel M., Marison I. and von Stockar U., *On-line monitoring of Phaffia rhodozyma fed-batch process with in situ dispersive raman spectroscopy.* Biotechnology and Bioengineering, 2003. 83(6).
85. Fredrik C.M., *Recent developments in the monitoring, modeling and control of biological production systems.* Bioprocess and Biosystems Engineering, 2004. 26: p. 347-351.
86. Miller G.L, *Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar.* Analytical Chemical, 1959. 3: p. 426-428.
87. Sedmark M., Weerasinghe D.K. and Jolly S.O., *Extraction and cuantification of astaxanthin from Phaffia rhodozyma.* Biotechnology and Technology, 1990. 4: p. 107-112.
88. Luna C.H., Ramírez J.J., Pelayo C., Femat R. and Herrera E.J., *Batch and fed-batch modeling of carotenoids production by Xanthophyllomyces dendrorhous using Yucca fillifera date juice as substrate.* Biochemical Engineering Journal, 2010. 53: p. 131-136.
89. Luedeking R. and Piret E.L, *A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH.* Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering, 1959. 1: p. 393-412.
90. Yuan L. and Jian W., *Modeling of Xanthophyllomyces dendrorhous growth on glucose and overflow metabolism in batch and fed-batch cultures for astaxanthin production.* Biotechnology and Bioengineering, 2008. 101: p. 996-1004.
91. Moon K., Woo M. and Heung J., *Production of carotenoids by β-Ionone resistant mutant of Xanthophyllomyces dendrorhous using various carbon sources.* Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2008. 13: p. 197-203.
92. Luna-Flores C.H., Ramírez-Córdova J.J., Pelayo-Ortiz C., Femat R. and Herrera-López E.J., *Batch and fed-batch modeling of carotenoids production by Xanthophyllomyces dendrorhous using Yucca fillifera date juice as substrate.* Biochemical Engineering Journal, 2010. 53: p. 131-1136.
93. Calderon-Soto L.F., Lara-Cisneros G., Herrera-López E.J. and Femat R., *Hopf bifurcation in a CSTB with inhibition by substrate and product.* IFAC CHAOS, 2012. Junio 20-22(Cancún México): p. ISBN: 978-3-902823-02-1.
94. Yamane Y., Higashida K., T. Kakizono and N. Nishio, *Astaxanthin production by Phaffia rhodozyma enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding.* Biotechnology Letters, 1997. 19: p. 1109-1111.
95. Liu Y.S. and Wu J.Y., *Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in Xanthophyllomyces dendorhous.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. 73: p. 663-668.
96. Carvell J.P. and Dowd J.E., *On-line measurements and control of viable cell density in cell culture manufacturing processes using radio-frequency impedance.* Cytotechnology, 2006. 50: p. 35-48.
97. Schroeder W.A. and Johnson E. A., *Antioxidant role of carotenoids in Phaffia rhodozyma.* Journal of General Microbiology, 1993. 139(5): p. 907-912.

98. Schroeder W.A. and Johnson E. A., *Carotenoids protect Phaffia rhodozyma against singlet oxygen damage.* Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1995a. 14(6): p. 502-507.
99. Schroeder W.A. and Johnson E. A., *Singlet oxygen and peroxyl radicals regulate carotenoid biosynthesis in Phaffia rhodozyma.* Journal of Biological Chemistry, 1995b. 270(31): p. 18374-18379.
100. Justice C., Brix A., Freimark D., Kraume M., Pfromm P., Eichenmueller B. and Czermak P., *Process control in cell culture technology using dielectric spectroscopy.* Biotechnology Advances, 2011. 29: p. 391-401.

9. Anexos

Análisis de Sensibilidad Paramétrica de *Xanthophyllomyces dendrorhous* en cultivo por Lote y Lote Alimentado

Allan F. Sánchez[1], Javier A. Hernández[1], Anne Gschaedler[1], Ricardo Femat[2], Jesús Cervantes[1], Lorena Amaya[1], Javier Arrizón[1], Melchor Arellano-Plaza[1], Enrique J. Herrera-López[1,*]

1- Unidad de Biotecnología. CIATEJ. Av. Normalistas 800, Colinas de la Normal, C.P. 44270. Guadalajara Jalisco, México. email: *eherrera@ciatej.net.mx

2- División de Matemáticas Aplicadas, IPICYT. Camino a la presa San José 2055. Lomas 4ta Secc. C.P. 78216. San Luis Potosí. México.

Teléfono: (52)-33-33455200 Ext. 1304

***Resumen*—La producción de carotenoides, y en general, la producción de metabolitos de interés industrial mediante fuentes microbianas puede ser afectada por la naturaleza impredecible del microorganismo con el que se esté trabajando. Los microorganismos pueden presentar comportamiento no lineal, diferentes tiempos de crecimiento, incertidumbre en las mediciones y en ocasiones desconocimiento de los parámetros cinéticos del bioproceso respecto al crecimiento, generación de productos y consumo de sustratos. A través del modelado matemático del bioproceso se puede obtener un panorama general de los sucesos dentro del biorreactor. Sin embargo, un conocimiento más detallado de la influencia sobre el sistema de las variables y parámetros en un modelo, permitirán crear estrategias para optimizar y controlar el bioproceso. En este trabajo se desarrolló un análisis de sensibilidad paramétrica a dos modelos cinéticos que describen la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous*, con el fin de obtener mayor información sobre los parámetros que tienen mayor influencia en el sistema.**

Palabras clave: Modelo cinético, análisis de sensibilidad paramétrica, astaxantina, *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

I. INTRODUCCIÓN

La astaxantina (3,3 '-dihidroxi - β, β - caroteno - 4,4' - diona) es un carotenoide ampliamente distribuido en la naturaleza y es el principal pigmento en los crustáceos y los salmónidos, así como diversas aves como el flamingo, el ibis escarlata y muchos otros microorganismos (Johnson y col., 1991).

Existe un creciente interés en el uso de astaxantina como pigmento para la acuicultura e industria de aves de corral, debido a que estos animales no pueden sintetizar la astaxantina. Por lo tanto, ésta debe ser incluida en sus alimentos para obtener un color atractivo para el consumidor (Meyers, 1994). Por otra parte, la astaxantina tiene una alta actividad antioxidante, lo cual ha creado un creciente interés en la industria farmacéutica para la prevención de algunos tipos de cáncer (Nishino y col., 1999).

En términos económicos, la astaxantina sobresale debido a que su valor en el mercado genera ganancias mayores a los 100 millones de dólares por año (Johnson, 2003).

Aunque el pigmento astaxantina puede ser producido por tecnología química sintética, algunos de los subproductos resultantes de los procesos químicos pueden tener efectos secundarios para el consumidor. Es por esta razón que la producción de carotenoides mediante fuentes microbianas ha sido objeto de extensas investigaciones (Frengova y col., 2009).

Una de las fuentes microbianas más reconocidas de producción de astaxantina es la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (antes *Phaffia rhodozyma*) que sintetiza la astaxantina como su principal carotenoide (Phaff y col., 1976).

Principalmente, se han utilizado tres enfoques para la mejora en la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous:* (i) obtención de astaxantina con cepas mutantes de sobreproducción (An y col., 1989; An y col., 1996; Fang y col., 1993; Dominguez y col., 2004), (ii) desarrollo de medios de cultivos industriales (Parajó y col., 1998; Florencio y col., 1998; Ramírez y col., 2000; Domínguez y col., 2004), (iii) implementación de diversos sistemas de producción (Reynders y col., 1997; Nishio y col., 1977; Yamane y col., 1997; Ramírez y col., 2006).

De los sistemas más utilizados para producir astaxantina está el cultivo por lote, que es afectado por altas concentraciones de sustrato (Reynders y col., 1997), y el sistema por lote alimentado, el cual ha mostrado mejoras en la producción de astaxantina y biomasa (Yamane y

col., 1997; Ramírez y col., 2006). En la actualidad, el monitoreo y control de bioprocesos se han vuelto indispensables para el desarrollo científico e industrial. Un conocimiento más detallado del biosistema permitirá una mejor comprensión del fenómeno y eventualmente, la optimización del proceso (Fredrik, 2004). Una herramienta para desarrollar lo anterior es el uso de modelos cinéticos que describan el crecimiento microbiano, el consumo de sustrato y la formación de producto (Zhang y col., 1999). Estos modelos pueden ser usados para identificar los parámetros y condiciones óptimas de operación y posteriormente como base para implementar un sistema de control.

Sin embargo, de la teoría de ecuaciones diferenciales ordinarias es sabido que sus coeficientes tienen repercusión en su solución, y que los modelos cinéticos no pueden ser considerados exactos, por esta razón, la certidumbre del modelo requiere de un estudio de sensibilidad paramétrica, el cual investiga, de manera sistemática, como influyen los parámetros de las ecuaciones diferenciales sobre las variables de estado que describen el proceso. Este trabajo se enfoca a determinar los parámetros que impactan de manera importante sobre cada una de las ecuaciones diferenciales de los modelos cinéticos; así como en qué proporción lo hacen y, lo más importante, que salidas se ven afectadas con los cambios en los valores numéricos de los parámetros.

II. MODELOS CINÉTICOS

Los modelos cinéticos analizados en este trabajo fueron reportados por Luna y col. (2010). En la tabla 1 se describen las variables y parámetros utilizados.

Tabla 1. Nomenclatura usada en el desarrollo de este trabajo

Nomenclatura	
x_1	Concentración de biomasa (gL^{-1})
x_2	Concentración de sustrato (gL^{-1})
x_3	Concentración de producto (μgL^{-1})
x_4	Volumen (L)
~	Coeficiente de formación de producto asociado al crecimiento (μgg^{-1})
	Coeficiente de formación de producto no asociado al crecimiento ($\mu gg^{-1}h^{-1}$)
¥	Término exponencial para el modelo de inhibición por producto
D	Tasa de dilución (h^{-1})
F	Velocidad de flujo (Lh^{-1})
K_i	Constante de inhibición por sustrato (gL^{-1})
K_p	Constante de inhibición por producto (μgL^{-1})
K_s	Constante de saturación de sustrato (gL^{-1})
m_s	Coeficiente de mantenimiento celular ($gg^{-1}h^{-1}$)
S_f	Concentración de sustrato de entrada (gL^{-1})
«	Velocidad de crecimiento específico (h^{-1})
$«_{max}$	Velocidad máxima de crecimiento específico (h^{-1})
$Y_{X/S}$	Rendimiento de biomasa sobre sustrato (gg^{-1})

Para estos modelos se tomaron en cuenta los siguientes supuestos:

1. Aunque el jugo de dátil se compone principalmente de fructosa y glucosa, la concentración de azúcar en el medio se trató como un sustrato único.
2. No existe limitación de oxígeno en el cultivo.

3. No existe limitación de nitrógeno.

4. La producción de etanol y glicerol son despreciables.

III. MODELO CINÉTICO POR LOTE

Un balance diferencial para describir la biomasa está dado por:

$$\frac{dx_1}{dt} = «x_1 \qquad (1)$$

donde « es la velocidad de crecimiento específico. El balance de masa de sustrato rige la producción de biomasa, así como el mantenimiento celular y está dado por:

$$\frac{dx_2}{dt} = -\left(m_s + \frac{«}{Y_{X/S}} \right) x_1 \qquad (2)$$

La levadura *X. dendrorhous* produce carotenoides en la fase de crecimiento exponencial y en la fase estacionaria, por lo tanto, la producción de carotenoides puede ser descrita por la ecuación de Luedeking-Piret (1959).

$$\frac{dx_3}{dt} = (\sim « + \quad) x_1 \qquad (3)$$

Las ecuaciones diferenciales (1) - (3) describen la cinética de crecimiento de biomasa, consumo de sustrato, y la producción de carotenoides en un cultivo por lote.

IV MODELO CINÉTICO POR LOTE ALIMENTADO

Las ecuaciones diferenciales (1)-(3) pueden ser modificadas para describir una fermentación por lote alimentado, el modelo incluye los efectos del sustrato de

alimentación, el factor de dilución y el cambio de volumen:

$$\frac{dx_1}{dt} = (« - D)x_1 \tag{4}$$

$$\frac{dx_2}{dt} = -\left(m_s + \frac{«}{Y_{X/S}}\right)x_1 + D(S_f - x_2) \tag{5}$$

$$\frac{dx_3}{dt} = (\sim« + \quad)x_1 - Dx_3 \tag{6}$$

$$\frac{dx_4}{dt} = F \tag{7}$$

donde $D = F / x_4$ representa la tasa de dilución.

La velocidad de crecimiento de *X. dendrorhous* se inhibe por altas concentraciones de sustrato (Reynders y col., 1997; Yu y col., 1997; Yuan y col., 2008). También ha sido reportado que el aumento en la acumulación intracelular de carotenoides ejerce un grado de inhibición (Moon y col., 2008). Una opción directa para representar la velocidad de crecimiento específico es la combinación de la inhibición por sustrato y producto:

$$« = \frac{«_{\max} x_2}{K_s + x_2 + (x_2^2 / K_i)}\left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥} \tag{8}$$

V. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD PARAMÉTRICA

Se realizó el análisis de sensibilidad paramétrica con el propósito de establecer los parámetros 'sensibles', es decir, aquellos que tienen un mayor impacto en cada una de las ecuaciones diferenciales que forman los modelos cinéticos. Las variables y parámetros analizados en los modelos cinéticos se muestran en la Tabla 2. Los valores utilizados para los parámetros (Tabla 3) fueron idénticos a los utilizados por Luna y col (2010).

Tabla 2. Variables y parámetros estudiados en el análisis de sensibilidad paramétrica

Modelo	Variables	Parámetros
Lote	x_1, x_2, x_3	$Y_{X/S}$, m_s, ~, , $«_{\max}$, K_s, K_i, K_p, ¥
Lote Alimentado	x_1, x_2, x_3, x_4	$Y_{X/S}$, m_s, ~, , $«_{\max}$, K_s, K_i, K_p, ¥, S_f, D, F

Tabla 3. Valores numéricos para los parámetros estudiados en el análisis de sensibilidad paramétrica

Parámetro	Lote	Lote Alimentado
$Y_{X/S}$	0.3941 ($gg^{-1}h^{-1}$)	0.3713 ($gg^{-1}h^{-1}$)
m_s	0.005 ($gg^{-1}h^{-1}$)	0.005 ($gg^{-1}h^{-1}$)
~	371.45 (μgg^{-1})	536.92 (μgg^{-1})
	1.5502 ($\mu gg^{-1}h^{-1}$)	1.0184 ($\mu gg^{-1}h^{-1}$)
$«_{\max}$	0.1450 (h^{-1})	0.1258 (h^{-1})
K_s	1.6607 (gL^{-1})	1.3463 (gL^{-1})
K_i	50.3151 (gL^{-1})	57.5259 (gL^{-1})
K_p	8798.15 (μgL^{-1})	8466.25 (μgL^{-1})
¥	3.6558	1.2109
S_f	-	65 (gL^{-1})
F	-	0.00021 (Lh^{-1})
D	-	F/x_4

Partimos de un modelo matemático descrito por:

$$\frac{dx}{dt} = f(x, t, °) \tag{9}$$

donde x, son las variables de estado, t es el tiempo y ρ representa los parámetros del sistema.

La matriz de sensibilidad paramétrica S está dada por:

$$\frac{dS}{dt} = \left(\frac{\partial f}{\partial x}\right)S + \frac{\partial f}{\partial °} \tag{10}$$

donde,

$$S = \begin{bmatrix} S_{11} & \cdots & S_{1j} \\ \vdots & \cdots & \vdots \\ S_{i1} & \cdots & S_{ij} \end{bmatrix} \tag{11}$$

$$S_{ij} = \frac{\partial x_i}{\partial p_j} \tag{12}$$

Entonces $\partial f/\partial x$ está dada por la derivada parcial de cada una de las ecuaciones diferenciales con respecto a cada una de las variables. El primer subíndice corresponde al número de ecuación a evaluar y el segundo a la variable evaluada.

$$\frac{\partial f}{\partial x} = \begin{bmatrix} s_{11} & s_{12} & s_{13} \\ s_{21} & s_{22} & s_{23} \\ s_{31} & s_{32} & s_{33} \end{bmatrix} \qquad (13)$$

Por ejemplo, “s_{12}” corresponde a la ecuación diferencial que representa el cambio en la concentración de biomasa con respecto al sustrato, tal como se muestra a continuación:

$$\frac{\partial x_1}{\partial x_2} = \left(\frac{x_1 «_{\max} \left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s} \right) - \frac{x_2 x_1 «_{\max} \left(\frac{\left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s} \right)}{\left(\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s \right)^2} \qquad (14)$$

De esta forma se genera una matriz de derivadas parciales con respecto a cada uno de los parámetros. Cada fila en la matriz representa una variable analizada y la derivada se determinó para cada uno de los 9 parámetros del sistema por lote y 12 parámetros para el sistema por lote alimentado.

De esta forma se generan un total 30 ecuaciones diferenciales para el modelo cinético por lote y 52 para el modelo por lote alimentado; dichas ecuaciones fueron evaluadas con el programa MATLAB 7®. Como ejemplo se muestra la ecuación diferencial ubicada en la fila 1 y columna 2 del modelo por lote:

$$\dot{S}_{22} = S_{22} \left(\frac{x_1 «_{\max} \left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s} \right) - \left(\frac{x_2 x_1 «_{\max} \left(\frac{\left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{2x_2}{K_i + 1}} \right)}{\left(\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s \right)^2} \right) +$$

$$\left(\frac{S_{12} x_2 «_{\max} \left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s} \right) - \left(\frac{S_{32} x_2 x_1 ¥ «_{\max} \left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥-1}}{K_p \left(\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s \right)} \right) \qquad (15)$$

$$\dot{S}_{22} = ¤_1 - ¤_2 + ¤_3 - ¤_4$$

$$¤_1 = S_{22} \left(\frac{x_1 «_{\max} \left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s} \right)$$

$$¤_2 = \left(\frac{x_2 x_1 «_{\max} \left(\frac{\left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{2x_2}{K_i + 1}} \right)}{\left(\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s \right)^2} \right)$$

$$¤_3 = \left(\frac{S_{12} x_2 «_{\max} \left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥}}{\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s} \right)$$

$$¤_4 = \left(\frac{S_{32} x_2 x_1 ¥ «_{\max} \left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{¥-1}}{K_p \left(\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_s \right)} \right)$$

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

La figura 1 muestra los resultados del análisis de sensibilidad para cultivo por lote. En el inciso ‘a’ se puede observar que el único parámetro que impacta de manera positiva en la generación de biomasa es la velocidad máxima de crecimiento específico ($«_{\max}$); esto concuerda con el estudio en cultivo continuo de este mismo microorganismo reportado por Calderón y col, 2012. En el inciso ‘b’ se detectan 3 parámetros con influencia significativa sobre el consumo de sustrato. $«_{\max}$ y m_s tienen un peso negativo sobre el sustrato, mientras que $Y_{x/s}$ afecta de manera positiva el sustrato. En el inciso ‘c’ se puede apreciar que el parámetro “sensible” durante la generación de astaxantina es de nueva cuenta $«_{\max}$, esto positivamente. Cabe señalar que el resto de los parámetros no tuvieron una influencia significativa sobre el sistema.

Los resultados arrojados por el análisis de sensibilidad paramétrica para el sistema por lote alimentado se observan en la figura 2. En el inciso ‘a’ se aprecia la existencia de 2 parámetros “sensibles” sobre la generación de biomasa, el de mayor impacto y de manera negativa es la tasa de dilución (D) y el segundo, de forma positiva, es la $«_{max}$. En el inciso ‘b’ se observa que sólo D tiene influencia negativa sobre el consumo de sustrato. En el inciso ‘c’ se detecta la presencia de dos parámetros con repercusión sobre la generación de astaxantina, el de mayor relevancia y de forma negativa fue la tasa de dilución D y posteriormente de carácter positivo la $«_{max}$. Por último en inciso ‘d’ se observa que sólo el flujo (F) tiene influencia sobre el cambio de volumen (x_4) en el biorreactor, esto de modo positivo. Para todos los casos anteriores, los parámetros restantes no tuvieron un impacto mayor sobre el desarrollo del proceso.

El valor de $«_{max}$ es inherente y específico para cada microorganismo. Además depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, y de la presencia de inhibidores. En el análisis de sensibilidad paramétrica realizado sobre el modelo por lote se observa que el parámetro con más influencia es la $«_{max}$, además es visto que la presencia de inhibidores, representada por las constantes de inhibición por sustrato y producto (K_i, K_p), no tiene una mayor influencia en el sistema. Lo anterior nos lleva a pensar en el uso de bajas concentraciones de sustrato para un mejor desarrollo del proceso de producción de astaxantina vía *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ramírez y col., 2000).

Del análisis de sensibilidad paramétrica realizado sobre el modelo por lote alimentado se puede dilucidar la influencia de la tasa de dilución no sólo para la formación de biomasa, sino también para el consumo del sustrato y la formación de astaxantina. (Reynders y col., 1997; Ramírez y col., 2006).

VII. CONCLUSIONES

El análisis de sensibilidad paramétrica permitió visualizar los parámetros de mayor influencia en el proceso de producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous* en sistemas en lote y lote alimentado. Del análisis de sensibilidad paramétrica, se pueden escoger ahora aquellas variables físicas que tuvieron más peso para realizar la optimización matemática del cultivo buscando una función objetivo que permita maximizar la producción de un metabolito de interés, a través de una curva óptima de alimentación prediseñada y consecuentemente después el control del bioproceso. La obtención de estos parámetros “sensibles” genera una nueva perspectiva para la creación de estrategias de control que permitan la obtención de mejores resultados.

VIII. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la becas de posgrado 283294 y 290747. Así como por los apoyos a los proyectos 128894 y 162712.

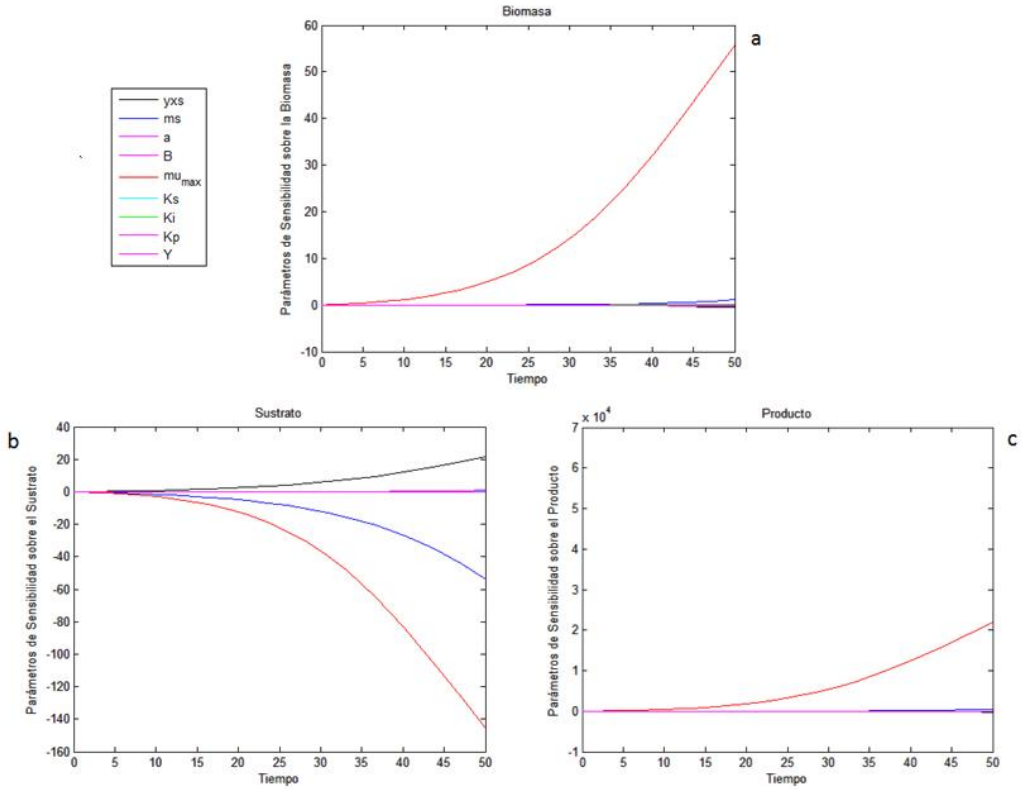

Figura 1. Análisis de sensibilidad paramétrica del modelo por lote

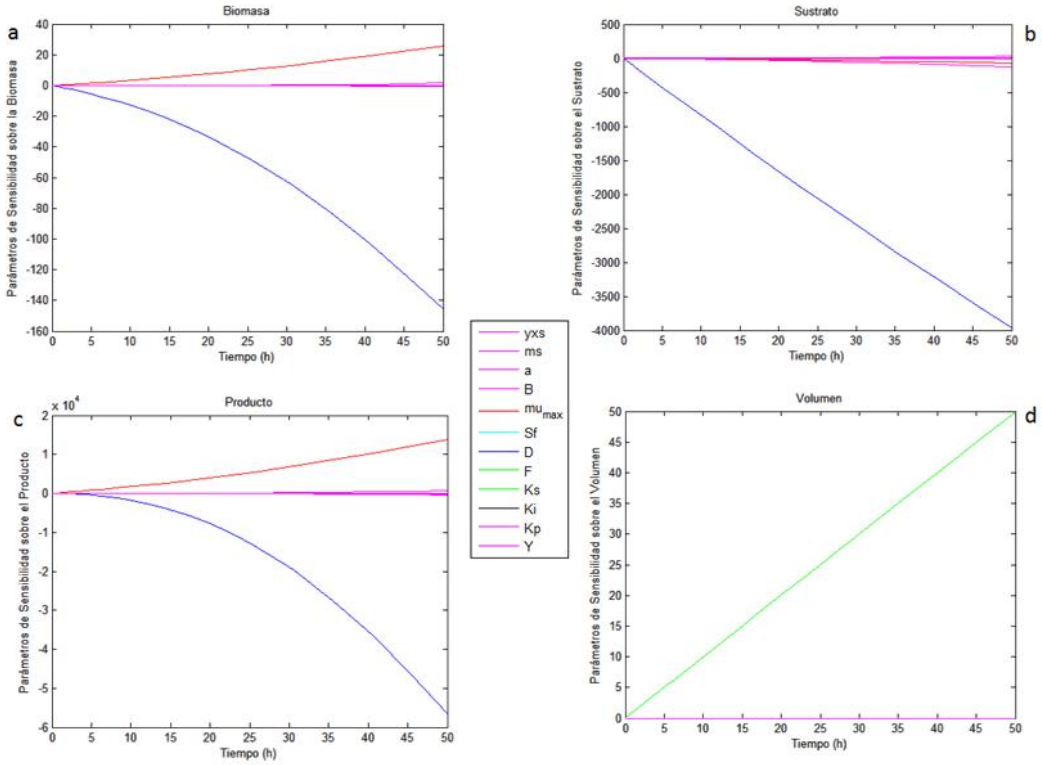

Figura 2. Análisis de sensibilidad paramétrica del modelo por lote alimentado

VI. REFERENCIAS

An, GH (1996) Characterization of yellow mutants isolated from the red yeasts *P. rhodozyma*. J. Microbol. Biotechnol. 6: 110-115.

An, GH, Schuman DB, Johnson EA (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. Aplied and Enviromental Microbiology 55: 116-124.

Calderón-Soto LF, Lara-Cisneros G., Herrera-López EJ, Femat R Hopf bifurcation in a CSTB with inhibition by substrate and product. IFAC CHAOS 2012, Junio 20-22, Cancún México. ISBN: 978-3-902823-02-1

Dominguez–Bocanegra, AR. And Torres-Muñoz, JA. (2004) Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. Appl. Microbol. Biotechnol. 66(3): 249-252.

Fang TJ, Cheng Y (1993) Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering 75 (6): 466-469.

Florencio JA, Soccol CR, Furlanetto TMB, Bonfim N, Fontana JD (1998) A factorial approach for a sugarcane juice-based low cost culture medium increasing the astaxanthin production by the red yeast *Phaffia rhodozyma*. Bioprocess Engineering 19: 161-164

Fredrik Carl M., (2004), Recent developments in the monitoring, modeling and control of biological production systems, Bioprocess Biosyst. Eng. 26, 347-351.

Frengova G. I., Beshkova D. M., (2009), Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeast of biotechnological importance J Ind Microbiol Biotechnol. 36, 163-180.

Johnson E. A., (2003), *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey, Int Microbiol. 6, 169-174.

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

Luedeking R., Piret E.L., (1959), A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH, J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng., 1, 393-412.

Luna-Flores C.H., Ramírez-Cordova J.J, Pelayo-Ortiz C., Femat R., Herrera-López E.J., (2010), Batch and fed-batch modeling of carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* using *Yucca fillifera* date juice as substrate, Biochemical Engineering Journal, 53, 131-136.

Meyers S. P., (1994) Developments in world aquaculture, formulations and the role of carotenoids, Pure Appl. Chem. 66, 1069-1076.

Moon Park K., Woo Song M., Heung Lee J., (2008), Production of carotenoids by β-Ionone resistant mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* using various carbon sources, Biotechnol. Bioprocess Eng., 13, 197-203.

Nishino H., Tokuda H., Satomi Y., Masuda M., Bu P., Onozuka M., (1999), Cancer prevention by carotenoids. Pure Appl Chem. 71, 2273-2278.

Nishio N, Tsuchiya Y, Hayashi M, Nagai S (1977) A fed-batch culture of methanol-utilizing with pH-stat. Journal Fermentation Technology 55 (2): 151-155.

Parajó JC, Santos V, Vazquez M (1998) Production of carotenoid by *Phaffia rhodomyza* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of Eucalyptus globules wood. Biotechnology and Bioengineering 59: 501-506.

Phaff H. J., Andrewes A. G., Starr M. P. (1976), Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast, Photochemistry. 15,1003-1007.

Ramírez J, Nuñez ML, Valdivia R (2000) Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 24: 187-190

Ramírez J., Obledo N., Arellano M., Herrera E., (2006), Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a fed-batch culture using a low cost medium feeding. e-GNOSIS 4, 1-9.

Reynders MB, Rawlings DE, Harrison STL (1997) Demostration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultization. Biotechnology Letters 19: 549-552.

Yamane Y., Higashida K., Nakashimada Y., Kakizono T., Nishio N., (1997), Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. Biotechnol. Lett. 11, 1109-1111.

Yu-Ichi Y., Katsuya H., Yujtaka N., Toshihide K., Naomichi N., (1997), Influence of oxygen and glucose on primary metabolism an astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analyses, Appl. Environ. Microbio., 4471-4478.

Yuan-Shuai L., Jian-Yong W., (2008), Modeling of *Xanthophyllomyces dendrorhous* growth on glucose and overflow metabolism in batch and fed-batch cultures for astaxanthin production, Biotechnol. Bioeng. 101, 996-1004.

Zhang X. W., Gong X. D., Chen F., (1999), Dynamics and stability analysis of the groth and astaxanthin production system of *Haematococcus pluvialis*, Ind. Microbiol. Biotechnol. 23, 133-137.

Fotografías de Fermentación a Nivel Biorreactor

Fermentación a nivel biorreactor (0 h)

Fermentación a nivel biorreactor (24 h)

Fermentación a nivel biorreactor (48 h)

Fermentación a nivel biorreactor (96 h)

Fermentación a nivel biorreactor (168 h)