

## IMPACTO EN LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA POR *Xanthophyllomyces dendrorhous* DEBIDO AL PH Y LA ADICIÓN DE VITAMINAS

Alejandro Torres-Haro<sup>a</sup>, Juan Carlos Mateos-Díaz<sup>a</sup>, Gustavo Castillo-Herrera<sup>b</sup>, Hugo Espinosa-Andrews<sup>b</sup>, Melchor Arellano-Plaza<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Biotecnología Industrial, <sup>b</sup> Tecnología Alimentaria, Unidad Zapopan, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. Camino al Arenero 1227 Colonia El Bajío, Zapopan, Jalisco, C.P. 45019. México.

Correo electrónico del autor de contacto: [marellano@ciatej.mx](mailto:marellano@ciatej.mx)

### Resumen

La producción de astaxantina por medio de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, depende, en gran parte, de la capacidad de asimilación de la fuente de carbono así como de las variables fisicoquímicas del medio. En este trabajo se reporta la evaluación de la producción del pigmento astaxantina y el crecimiento de biomasa utilizando un medio de cultivo mineral químicamente definido, además se realizó la evaluación del impacto de micronutrientes a un pH de 4.0 y 6.0. El resultado obtenido demuestra que no hay una diferencia significativa en el crecimiento y la producción de astaxantina con la adición de vitaminas y a su vez el pH no tiene una mayor estimulación para la levadura (a pH 4.5: 1.74 de D. O con vitaminas y 1.63 de D. O. sin vitaminas; a pH 6.0: 1.61 D. O. con vitaminas y 1.65 de D. O. sin vitaminas). Con este trabajo se logró una máxima producción de astaxantina sin la necesidad de la adición de vitaminas y la estimulación por ajuste de pH.

**Palabras clave:** Astaxantina, producción, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, micronutrientes.

### Introducción

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ ,  $\beta'$ -caroteno-4,4'-diona) es un pigmento que pertenece a la familia de las xantofilas. Es uno de los principales pigmentos presentes en el medio marino, contribuyendo a la coloración típica del caparazón de muchos crustáceos (camarón, quisquilla, gamba, langosta, etc.), de la carne de salmónidos y de las plumas de algunas aves (flamenco) [1, 2]. Por otra parte, la astaxantina tiene una alta actividad antioxidante que sobresale en comparación con otros antioxidantes, la cual se ha demostrado ser superior a la del  $\beta$ -caroteno e incluso a la del  $\alpha$ -tocoferol [3]. Estas características promueven un alto interés en las industrias tanto alimentarias como farmacéuticas para prevenir y tratar enfermedades degenerativas que provocan oxidación celular como el cáncer. En términos económicos, la astaxantina es el tercer carotenoide más importante a nivel mundial después del  $\beta$ -caroteno y la luteína. En 2007 se generaron 227 millones de dólares (29 % de la venta total de carotenoides), además se tiene estimado que para el 2018 se generen 253 millones de dólares, con una tasa de crecimiento anual del 1.8 % [4].

El pigmento puede ser producido por diversas vías tecnológicas como la química sintética, pero algunos de los subproductos resultantes de las reacciones pueden tener efectos adversos a la salud [5]. Investigaciones demuestran que la síntesis del pigmento por medio de fuentes microbianas puede ser una mejor opción. Los principales microorganismos utilizados para la producción de este pigmento son la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* y la microalga *Haematococcus pluvialis* [6].

En la industria, comúnmente *X. dendrorhous* es más utilizada, la cual sintetiza principalmente el carotenoide astaxantina en condiciones de estrés medioambiental, como pueden ser la escasez de nitrógeno, la escasez de fosfato, una elevada concentración de sales en el medio o la alta intensidad luminosa. Los pigmentos que produce son principalmente xantofilas, donde la astaxantina representa 83-87 % del total de los carotenoides, seguida por fenicoxantina (5-7 %), 3-hidroxiéquinenona (3-4 %), equinenona (2-4 %) y  $\beta$ -caroteno (2-2.5 %) [7].

La levadura *X. dendrorhous* crece en un rango de temperatura que va de 0 a 27°C, realizando síntesis de pigmentos carotenoides entre 18 y 22°C y pH cercano a 6.0. Otra de sus características es la capacidad de asimilar compuestos carbonados incluyendo D-glucosa, maltosa, sacarosa, celubiosa, trealosa, rafinosa, almidón soluble, etanol, metilglucosido, D-manitol, salicilina, 2-cetogluconato, succinato y glicerol, además de utilizar urea como fuente de nitrógeno en lugar de nitratos [8].

Anteriormente el medio de extracto de levadura era mayormente utilizado para la producción de astaxantina por *X. dendrorhous*. Este medio tiene un costo muy elevado (1,694 pesos / kg) debido a su gran variedad compuestos, entre ellos micronutrientes y oligoelementos presentes y especiales para crecimiento de levaduras [9]. Un medio de cultivo alternativo químicamente definido para la producción de astaxantina por *X. dendrorhous* puede ser variado y exitoso, lo cual promueve un capital variado optimizando los procesos ya existentes [10]. De manera general, se han utilizado tres enfoques para la mejora en la producción de astaxantina empleando la levadura *X. dendrorhous*: (i) obtención de astaxantina con cepas mutantes sobreproductoras, (ii) desarrollo de medios de cultivo industriales alternos y (iii) implementación de diversos sistemas de producción [11, 12].

El objetivo de presente trabajo fue estudiar un medio de cultivo alternativo químicamente definido evaluando el impacto de micronutrientes y el pH en la producción de astaxantina por la cepa 25-2.

## Metodología

### *Microorganismo:*

En el presente trabajo de investigación se utilizó una 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 CIATEJ. La levadura fue cultivada en cajas Petri con medio Agar YM (Sigma-Aldrich®) a 20°C por 72 horas y posteriormente fue almacenada en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

### *Medios de cultivo:*

Se utilizaron dos medios de cultivo minerales químicamente definidos, uno con vitaminas y otro sin vitaminas, usando una fuente de carbono alternativa A (medio de cultivo confidencial por ser propiedad del CIATEJ y encontrarse en posibilidad de patente). Esto con el fin de evaluar la fuente de carbono alternativa para la producción del pigmento astaxantina y conocer la influencia que tiene la adición de vitaminas y el pH en la producción de carotenoides totales y astaxantina en la levadura *X. dendrorhous*. En la siguiente tabla se muestra la composición del medio de cultivo mineral alternativo:

**Tabla 1.** Composición del medio de cultivo mineral alternativo para la levadura *X. dendrorhous*.

<b>Compuestos</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
<b>Sustrato</b>	
Fuente de Carbono A	20
<b>Sales</b>	
Glutamato	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.49
<b>Oligoelementos</b>	
Cofactores	Confidencial por CIA TEJ
<b>Vitaminas</b>	
Micronutrientes	Confidencial por CIA TEJ

#### *Cultivos realizados a nivel matraz:*

La levadura se activó en un matraz con 100 mL de medio mineral químicamente definido usando glucosa como fuente de carbono con un criovial que contenía  $1 \times 10^7$  células de la cepa productora de astaxantina. Los cultivos fueron incubados en un orbital rotatorio New Brunswick<sup>®</sup> Innova 44 a una velocidad de agitación de 250 rpm por 72 horas a una temperatura de 20°C.

Se procedió a las fermentaciones en los diferentes dos medios de cultivo químicamente definidos empleados a dos condiciones de pH, 4.5 y 6. La inoculación para cada uno de los cuatro tratamientos se realizó con  $5 \times 10^6$  células de la levadura *X. dendrorhous* cultivadas en paso anterior. Los cultivos fueron incubados en un orbital rotatorio New Brunswick<sup>®</sup> Innova 44 a una velocidad de agitación de 250 rpm por 72 horas a una temperatura de 20°C hasta alcanzar la fase estacionaria a y poder evaluar la producción de astaxantina en cada tratamiento.

#### *Técnicas analíticas:*

Se monitoreo el crecimiento de biomasa por medio de un espectrofotómetro Eon-Biotek<sup>®</sup> a una longitud de onda de 600 nm para 200 µL de muestra. Los resultados fueron expresados en unidades de Densidad Óptica (D.O.).

Para la cuantificación del consumo de sustrato se realizó por medio del método colorimétrico ácido 3-5, dinitrosalicílico (DNS) a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro Eon-Biotek<sup>®</sup> [13].

La cuantificación de carotenoides totales y astaxantina se realizó mediante el método de Sedmark [14] para muestras de 0.5 mL de la levadura utilizando 0.5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a una temperatura de 55°C y posteriormente se aplicó un pulso con un ultrasonicador de vástago Ultrasonic Processor<sup>®</sup> GEX130 para reafirmar el rompimiento de la pared celular y extraer los carotenoides. Inmediatamente se adicionó 0.1 mL de buffer de fosfato de sodio (10 mM, pH 7) y 0.8 mL de una mezcla 1:1 (v / v) de acetato de etilo-hexano. La muestra se homogenizó y centrifugo. La fase orgánica

se separó de la acuosa y se colocó en un concentrador de vacío Thermo Scientific® DNA 120 por 20 minutos para remover el solvente donde los carotenoides se encuentran disueltos. Estos fueron resuspendidos 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 Eon-Biotek®.

La cuantificación de carotenoides y astaxantina se realizó mediante las siguientes formulas:

$$\text{Carotenoides } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}\right) = \frac{(A_{480 \text{ nm}})(\text{Volumen orgánico})}{(\text{Extinción molar})(\text{Trayecto óptico})(\text{Volumen muestra inicial})}$$

$$\text{Astaxantina } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}\right) = (\text{Concentración de Carotenoides totales})(0.85)$$

## Resultados

### Fermentaciones a nivel matraz a pH 4.5

Se inició con una concentración de sustrato de 20 g / L y se evaluó la producción de biomasa y astaxantina. Así mismo, se determinó el consumo de sustrato a través del tiempo. La fermentación se monitoreo hasta alcanzar la fase estacionaria donde se produce la máxima concentración de carotenoides totales y astaxantina [5]. En la Figura 1 se observó una diferencia significativa para los medios con vitaminas y sin vitaminas en la producción de astaxantina. Se logró un máximo de 1.03 y 0.995 mg / L respectivamente.

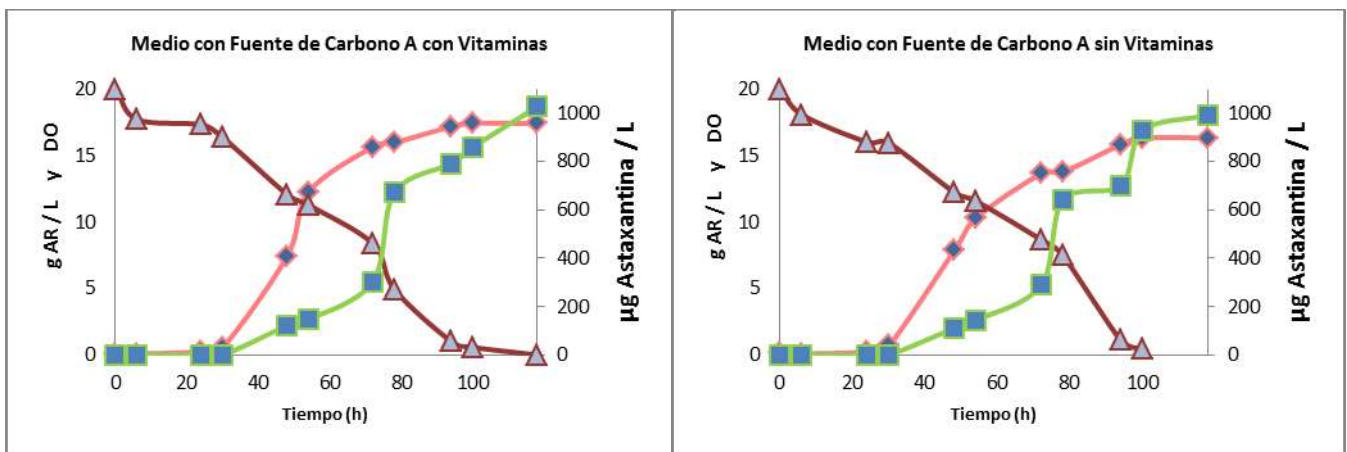


Fig 1. Determinación de las variables bioquímicas en *X. dendrorhous* en el medio de cultivo alternativo químicamente definido a pH 4,5. La línea rosa con figura de rombo representa el crecimiento de biomasa ( $DO \cdot 10$ ), en verde con figura de cuadro la producción de astaxantina ( $\mu\text{g} / \text{L}$ ) y en café con figura de triangulo el consumo de azúcares reductores ( $\text{g AR} / \text{L}$ ). Tiempo de fermentación: 118 horas.

### Fermentación a nivel matraz a pH 6.0

Se trabajó con los mismos dos medios de cultivo iniciales aforados con una solución de citrato a 0.1 M y ajustados a pH 6. El citrato 0.1 M funciona como una solución amortiguadora evitando los cambios de

pH en el medio de cultivo ocasionados por el metabolismo de la levadura. Además, el ácido cítrico es un inhibidor del metabolismo en la ruta del ciclo de los ácidos tricarboxílicos lo cual estimula la ruta glucolítica de la levadura para producir acetil-CoA activando la ruta de formación de carotenoides totales y astaxantina [15, 16].

En la figura 2 se observó un ligero incremento de la producción de astaxantina de 45.55  $\mu\text{g} / \text{L}$  en el medio de cultivo vitaminado y de 70.85  $\mu\text{g} / \text{L}$  en el medio no vitaminado con respecto a los medios evaluados a pH 4.5. De igual manera la diferencia de la producción de astaxantina entre los medios con vitaminas y sin vitaminas para este experimento fue despreciable de 10.12  $\mu\text{g} / \text{L}$ .

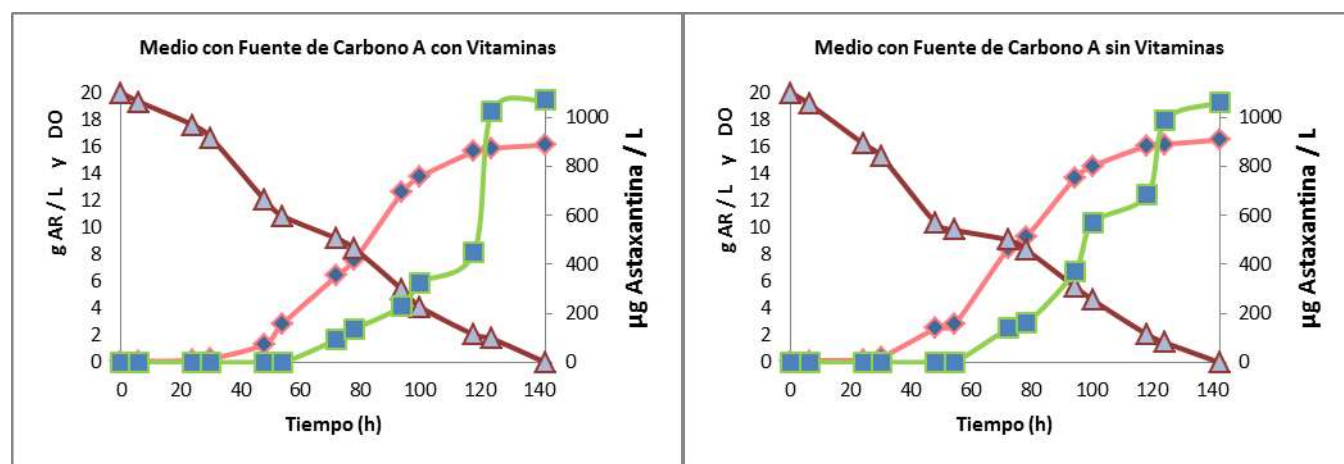


Fig 2. Determinación de las variables bioquímicas en *X. dendrorhous* en el medio de cultivo alternativo químicamente definido a pH 6.0 ajustado con citrato. La línea rosa con figura de rombo representa el crecimiento de biomasa ( $\text{DO} \cdot 10$ ), en verde con figura de cuadro la producción de astaxantina ( $\mu\text{g} / \text{L}$ ) y en café con figura de triangulo el consumo de azúcares reductores ( $\text{g AR} / \text{L}$ ). Tiempo de fermentación: 144 horas.

En la tabla 2 se presenta una comparación de la velocidad de crecimiento específico para la levadura *X. dendrorhous*. La velocidad es menor en el medio a pH de 6.0 en comparación con el que estaba a 4.5. En cuanto a rendimientos, no hay una influencia significativa debido a la adición de micronutrientes en los dos medios de cultivo empleados para este trabajo.

Tabla 2. Determinación de la velocidad de crecimiento específico y rendimiento de producto por sustrato.

pH	Medio con micronutrientes		Medio sin micronutrientes	
	4.5	6	4.5	6
Velocidad de crecimiento de biomasa específico:	0.1095	0.0631	0.191	0.063
$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$				
Rendimiento de astaxantina por sustrato A	51.36	53.64	49.6	53.13
( $\mu\text{g} / \text{g}$ )				

## Conclusiones

El medio de cultivo alternativo químicamente definido resultó ser eficiente para la producción de biomasa y astaxantina a lo largo de las fermentaciones. Con respecto al impacto de los micronutrientes, a pH 4.5 y 6, no fue posible apreciar un efecto significativo en cuanto a la producción de carotenoides totales y astaxantina.

Además, el pH resulta ser un factor fisicoquímico de interés para la fermentación ya que en el medio a pH 6 se prolonga el tiempo de crecimiento celular con respecto al medio a pH 4.5.

Por lo tanto, se demuestra la existencia de un medio de cultivo alternativo químicamente definido mayormente económico y rentable para llevar a cabo la producción de astaxantina por medio de la levadura *X. dendrorhous* sin la necesidad de adicionar micronutrientes.

## Referencias

1. Ytrestoyl T., Bjerkeng B., “Dose response in uptake and deposition of intraperitoneally administered astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)”, *Aquaculture*, 263: p. 179-191, 2007.
2. Miao F., Lu D., Li Y., & Zeng M., “Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry”, *Analytical Biochemistry*, 352 (2): p. 176-181, 2006.
3. Miki W., “Biological functions and activities of animal carotenoids”, *Pure Applied Chemistry*, 63: p. 141-146, 1991.
4. BBC Research, “The global market for carotenoids (FOD025C)”, <http://www.bccresearch.com>, Accessed 30 March 2015.
5. Sánchez A., “Monitoreo del estado fisiológico de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* durante la producción de astaxantina por medio de técnicas espectroscópicas y análisis de imágenes”, *Tesis biotecnología productiva*, Guadalajara, Jalisco, p. 4-96, 2015.
6. Johnson E., “*Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey”, *International Microbiology*, 6: p. 169-174, 2003.
7. Andrewes A., Phaff H. and Starr M., “Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast”, *Phytochemistry*, 15(6): p. 1003-1007, 1976.
8. Johnson E. A. and An G. H., “Astaxanthin formation by microbial sources”, *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(4): p. 297-326, 1991.
9. Maquina M., “Caracterización fenotípica y genotípica de Rizobios autóctonos provenientes de diversas regiones de Venezuela”, *Biología de Microorganismos*, Merida, Venezuela: p. 64-72, 2006.
10. Yawei N., Qiang L., Feng C., Na Y., Zhengyu J. and Xueming X., “Low-cost production of 6 G-fructofuranosidase with high value-added astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*”, *Bioresource Technology*, 104: p. 660-667, 2012.
11. Schmidt I., Schewe H., Gassel S., Jin C., Buckingham J., Humbelin M., Sandmann G. and Schrader J., “Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: p. 555-571, 2011.
12. Amado I., Vazquez J., “Mussel processing wastewater: a low-cost substrate for the production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*”, *Microbiology Cell Factors*, 14: p. 177, 2015.
13. Miller G. L., “Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar”, *Analytical Chemistry*, 31: p. 426-428, 1959.
14. Sedmak J., Weerasinghe D., Jolly S., “Extraction and quantification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*”, *Biotechnology Technology*, 4: p. 107-112, 1990.
15. Reynders M., Rawlings D and Harrison S., “Demonstration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation”, *Biotechnology Letters*, 19: p. 549-552, 1997.
16. Marcoleta A., Niklitschek M., Wozniak A., Lozano C., Alcaíno J., Baeza M., Cifuentes V., “Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*”, *BCM Microbiology*, 11: p. 190, 2011.