

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES POR *Rhodotorula mucilaginosa* MEDIADA POR LA RELACIÓN C/N Y DIODOS EMISORES DE LUZ”

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA
DIANA ANGÉLICA SOTO PÉREZ

DIRIGIDA POR
Dr. ALDO AMARO REYES

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2022.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Producción de carotenoides por *Rhodotorula*
mucilaginosa mediada por la relación C/N y diodos
emisores de luz

por

Diana Angélica Soto Pérez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQLIN-272420-0123-123



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES POR *Rhodotorula mucilaginosa* MEDIADA POR LA RELACIÓN C/N Y DIODOS EMISORES DE LUZ”

TESIS INDIVIDUAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA
DIANA ANGÉLICA SOTO PÉREZ
DIRIGIDA POR
Dr. ALDO AMARO REYES

SINODALES

Dr. ALDO AMARO REYES

DIRECTOR

Dr. JORGE NOEL GRACIDA RODRÍGUEZ


SINODAL


Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ


SINODAL


Dra. DIANA ISSELL SANDOVAL CÁRDENAS

SINODAL









ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Carotenoides	1
1.1.1 Importancia de los carotenoides en la industria alimentaria	2
1.1.2 Microorganismos como fuente de carotenoides	4
1.2 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	5
1.2.1 Metabolitos secundarios	6
1.2.2 Carotenogénesis	8
1.3 Condiciones de cultivo para la producción de carotenoides	11
1.3.1 Rendimiento producto/biomasa	13
1.4 Estrés oxidativo	14
1.4.1 Actividad fotoprotectora de los carotenoides	15
1.4.2 Efecto de la luz en cepas de <i>Rhodotorula</i>	16
1.4.3 Iluminación por diodos emisores de luz	16
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 General	18
3.2 Específicos	18
4. METODOLOGÍA	19
4.1 Materiales	19

4.1.1 Cepa	19
4.1.2 Pre-inóculo	19
4.1.3 Condiciones de cultivo	19
4.1.4 Luces LED	20
4.2 Métodos	20
4.2.1 Determinación de la mejor relación C/N para la productividad y rendimiento de carotenoides totales	20
4.2.2 Operación por lote a pequeña escala acompañada de luz LED	21
4.2.3 Efecto de la luz visible en la síntesis de carotenoides	21
4.2.4 Determinación del peso seco (g/L)	21
4.2.5 Extracción y cuantificación de carotenoides	22
4.3 Diseño experimental	22
4.3.1 Métodos analíticos	22
4.3.2 Análisis estadístico	22
5. RESULTADOS	24
5.1 Efecto de la relación C/N sobre el rendimiento y productividad del PSC y CT	24
5.2 Efecto del color e intensidad de luz sobre el rendimiento y productividad del PSC y CT	27
6. DISCUSIÓN	42
7. CONCLUSIONES	47
8. REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Rendimiento, productividad y relación del PSC y CT en diferentes relaciones C/N.	25
2 Rendimiento y productividad del PSC y CT de los ensayos sometidos a la luz blanca a diferentes intensidades luminosas.	28
3 Rendimiento y productividad del PSC y CT de los ensayos sometidos a la luz verde a diferentes intensidades luminosas.	31
4 Rendimiento y productividad del PSC y CT de los ensayos sometidos a la luz azul a diferentes intensidades luminosas.	34
5 Rendimiento y productividad del PSC y CT de los ensayos sometidos a la luz roja a diferentes intensidades luminosas.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ejemplos de carotenoides dentro de sus respectivas clasificaciones (adaptada de Campos-Vega y Oomah, 2013).	2
2	Actividad antioxidante con beneficios a la salud (Hu y Wang, 2018).	3
3	Estructura química del toruleno y torularodina (Kot y col., 2018).	7
4	Primer paso de la carotenogénesis (adaptada de Goodwin, 1993).	9
5	Segundo paso de la carotenogénesis (adaptada de Goodwin, 1993).	10
6	Tercer paso de la carotenogénesis (adaptada de Moliné y col., 2012).	11
7	Condiciones de cultivo relacionados con la síntesis de pigmentos microbianos (adaptada de Rana y col., 2021).	12
8	Ejemplos de algunos efectos negativos ocasionados por la acumulación de ERO dentro de la célula (adaptada de Angoa-Pérez y Rivas-Arancibia, 2007).	15
9	Imagen de la lámpara que proporciona color blanco, rojo, verde y azul (WRGB, por sus siglas en inglés).	20
10	Comportamiento de <i>R. mucilaginosa</i> con diferentes relaciones C/N cultivada durante 72 horas, a temperatura ambiente y 150 rpm. A) Producción y productividad de PSC. B) Producción y productividad de CT. C) Yp/x. Abreviaturas: PSC, peso seco celular; CT, carotenoides totales; Yp/x, rendimiento producto/biomasa.	25
11	Comportamiento de <i>R. mucilaginosa</i> en tratamientos expuestos a diferentes colores de luz e intensidades luminosas durante 120 horas, a temperatura ambiente y 150 rpm. A) Producción y productividad de PSC. B) Producción y productividad de CT. C) Yp/x. Abreviaturas: PSC, peso seco celular; CT, carotenoides totales; Yp/x, rendimiento producto/biomasa.	29

RESUMEN

Actualmente hay una creciente demanda en el uso de fuentes microbianas para la obtención de carotenoides, ya que los pigmentos microbianos representan grandes ventajas a nivel industrial además de ser una potencial alternativa al uso de colorantes sintéticos. Entre las distintas fuentes microbianas de carotenoides son de especial interés comercial las especies de *Rhodotorula*, debido a que este género de levadura es conocido por su alto rendimiento de carotenoides asociado a su naturaleza unicelular y alta tasa de crecimiento. Por lo tanto, se evaluó el efecto de cuatro relaciones carbono/nitrógeno (C/N), cuatro diferentes colores de luz y tres diferentes intensidades luminosas sobre el rendimiento y productividad de carotenoides totales (CT). Se concluyó que, entre las diferentes relaciones C/N empleadas, la de 58 es la más adecuada, reportando una productividad de CT hasta 103.4 % mayor que la relación C/N de 23. Por otro lado, a pesar de que la relación C/N de 105 mostró el rendimiento más alto ($24.76 \pm 5.52 \mu\text{g/g}$), la relación C/N de 58 sigue siendo una opción atractiva debido al ahorro de materia prima. Además, se concluyó que la luz verde generó la mayor estimulación de la ruta de carotenoides, ya que a una intensidad alta reportó un rendimiento 12.3 % mayor que el obtenido por los tratamientos sin luz, además de que fue el único color de luz que mostró una correlación directamente proporcional entre la intensidad luminosa y la productividad de CT. Por lo tanto, el empleo de luz verde a una intensidad alta como factor estimulante de la carotenogénesis en *R. mucilaginosa* resulta prometedor para la obtención de colorantes naturales a nivel industrial.

1. ANTECEDENTES

1.1 Carotenoides

Los carotenoides son tetraterpenoides los cuales consisten de ocho unidades de isopreno, por lo que son altamente insaturados y liposolubles. Sus dobles enlaces conjugados les confieren varias características como la reactividad química, absorción de luz, actividad antioxidante, y son determinantes de la pigmentación y coloración. Los carotenoides son la clase de pigmentos mayor distribuida en la naturaleza y, por lo tanto, los pigmentos naturales más estudiados (Aksu y Tuğba Eren, 2005; Sharma y Ghoshal, 2020). Se pueden encontrar estas moléculas en frutas, verduras, microalgas, líquenes, bacterias, hongos y levaduras (Hu y Wang, 2018; Rodrigues y col., 2019; Sharma y Ghoshal, 2020). Además, estos pigmentos son responsables del color amarillo, naranja y rojo de la mayoría de las frutas y vegetales (Bonadio y col., 2018).

Gracias a su aislamiento y caracterización se han podido identificar más de 600 tipos de carotenoides y se clasifican dependiendo de la presencia o no del oxígeno en su estructura molecular como xantófilas o carotenos, respectivamente (Figura 1) (Campos-Vega y Dave Oomah, 2013).

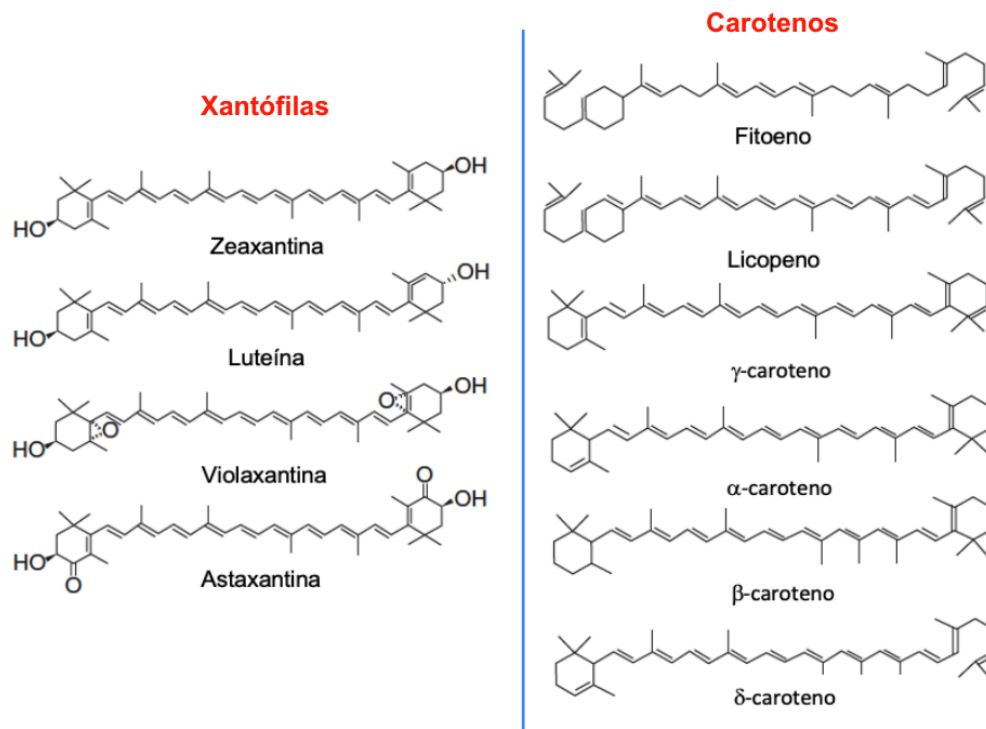


Figura 1. Ejemplos de carotenoides dentro de sus respectivas clasificaciones (adaptada de Campos-Vega y Dave Oomah, 2013).

1.1.1 Importancia de los carotenoides en la industria alimentaria

Los colorantes artificiales son normalmente añadidos a los alimentos para mejorar su apariencia, compensar la pérdida de color durante el procesamiento, y para asignar una entidad de color y sabor a los alimentos. Tienen varias ventajas como: un costo de producción bajo, alta eficacia a bajas concentraciones, y una estabilidad química alta al calor, pH, luz u oxígeno (Rana y col., 2021). Sin embargo, en los últimos años el uso de colorantes sintéticos en los alimentos ha empezado a generar preocupaciones respecto a efectos adversos en la salud relacionados con su consumo. Algunos ejemplos son: alergenicidad, síndrome de hiperactividad en los niños, neurotoxicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad. Lo anterior ha provocado una creciente demanda del consumidor por alternativas naturales (Corradini, 2018).

Los carotenoides, además de ser utilizados como colorantes naturales de alimentos, están siendo integrados en el mundo de los nutraceuticos, siendo de especial interés los carotenoides pro-vitamina A como el β -caroteno (Sharma y Ghoshal, 2020). Así mismo, estos pigmentos están relacionados con importantes actividades biológicas debido a sus propiedades antioxidantes (Figura 2) (Hu y Wang, 2018; Rodrigues y col., 2019). Por otro lado, los carotenoides también destacan por su actividad fotoprotectora, ya que tienen la capacidad de absorber la luz azul y ultravioleta, conocidas por ser dañinas para la vista (Campos-Vega y Dave Oomah, 2013).

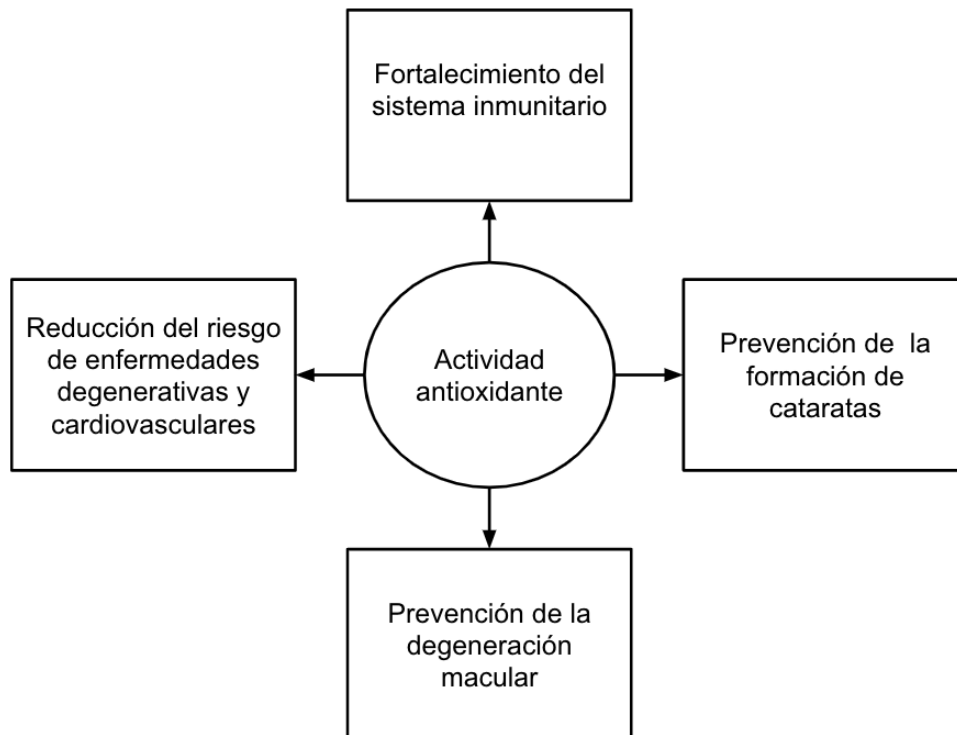


Figura 2. Actividad antioxidante con beneficios a la salud (Hu y Wang, 2018).

Hasta hace más de cinco décadas, las plantas han sido utilizadas como fuente de carotenoides. Sin embargo, su producción industrial tanto por la extracción de tejidos de plantas como por la síntesis química no es económicamente atractiva debido al bajo rendimiento y costos de producción, así como limitaciones en la disponibilidad

de las fuentes naturales. Por lo anterior, y tomando en cuenta la creciente demanda por el uso de colorantes naturales, se han examinado nuevas fuentes alternativas como lo son los microorganismos productores de pigmentos (Tkáčová y col., 2017; Garcia-Cortes y col., 2021).

Comparado con las plantas, los pigmentos microbianos son más estables, económicamente viables, no dependientes de las variaciones estacionales, dóciles al mejoramiento del rendimiento y fácilmente extraíbles. Además, el uso excesivo de cultivo microbiano para la producción de carotenoides no es dañino para la biodiversidad y medio ambiente (Rana y col., 2021). Finalmente, usar fuentes microbianas para la obtención de carotenoides permite acceder a una gran variedad de colores disponibles, la cual sobrepasa los límites de la extracción convencional (Sharma y Ghoshal, 2020).

1.1.2 Microorganismos como fuente de carotenoides

Es bien conocido que la producción de pigmentos en los microorganismos se puede dar de forma intracelular y extracelular. Además, para elegir el microorganismo adecuado se debe tomar en cuenta que debe ser fácil de cultivar, esto significa tener una tasa de crecimiento y productividad alta en un espacio y tiempo reducidos, así como ser capaces de crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono y nitrógeno (Rana y col., 2021). También, hay que recordar que no todos los microorganismos productores de carotenoides son de interés comercial. Las levaduras han demostrado poseer varias ventajas sobre otros microorganismos carotenogénicos. Por un lado, pueden aprovechar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para la síntesis de estos colorantes naturales, haciendo sencillo el cultivo de levaduras en comparación con otros microorganismos (Dias-Rodrigues y col., 2019). Además, las especies de levadura pigmentadas son capaces de sintetizar una gran variedad de carotenoides, incluyendo una alta cantidad relativa de pigmentos naturales como el toruleno y la torularodina en el caso del género *Rhodotorula*, los cuales hasta 1990 eran considerados carotenoides poco comunes en la naturaleza,

ya que, hasta ahora, no se han encontrado cantidades relativamente predominantes de ambos carotenoides en otros microorganismos carotenogénicos, como las especies nativas de *Sporobolomyces* y *Sporidiobolus* (Zoz y col., 2015; Kot y col., 2018). Además, no se ha reportado la síntesis de toruleno y torularodina en bacterias carotenogénicas (Vila y col., 2018; Padmanabhan y col., 2021). Estas características han puesto a las levaduras carotenogénicas como una fuente potencial de pigmentos y, de esta manera, como un objetivo interesante para estudios biotecnológicos (Libkind y col., 2004).

Las levaduras productoras de carotenoides son células eucariotas distribuidas en el suelo, cuerpos de agua, plantas y animales. Entre la variedad de dichas levaduras es de especial interés comercial las especies de *Rhodotorula*, ya que, además de lo mencionado anteriormente, este género de levadura es conocido por su alto rendimiento de carotenoides debido a su naturaleza unicelular y alta tasa de crecimiento (Aksu y Tuğba Eren, 2005; Sharma y Ghoshal, 2020).

1.2 *Rhodotorula mucilaginosa*

La levadura del género *Rhodotorula* es ampliamente distribuida en el medio ambiente. Puede ser encontrada en el aire, suelo, lagos, océanos, leche y jugo de fruta. Además, tiene la capacidad de colonizar plantas y mamíferos, así como de crecer en ecosistemas oligotróficos de agua salada o dulce, hipersalinos y de altas temperaturas. Así mismo, las colonias de *Rhodotorula* destacan por ser oleaginosas y carotenogénicas, por lo que poseen una pigmentación rosa a roja, y por sus blastoconidios, los cuales son unicelulares y carecen de pseudohifas e hifas (Libkind y col., 2004; Wirth y Goldani, 2012; Lau y col., 2018).

La especie más estudiada es *R. glutinis*, sin embargo, la síntesis de β -caroteno es relativamente baja en cepas silvestres (García-Cortés y col., 2021). Por otro lado, se ha encontrado que particularmente las cepas de *R. mucilaginosa* son capaces de producir cantidades importantes de β -caroteno, toruleno y torularodina, los cuales

son de gran interés en la industria y en el desarrollo biotecnológico (Cheng y Yang, 2016; Sharma y Ghoshal, 2020). La máxima absorción de la solución con β -caroteno, toruleno y torularodina varía entre 400 a 550 nm, dependiendo de la concentración de cada pigmento (Sharma y Ghoshal, 2020; Zoz y col., 2015). Además, *R. mucilaginosa* es especialmente caracterizada por su color rosa anaranjado y gran tasa de crecimiento (Cheng y Yang, 2016; Lau y col., 2018).

1.2.1 Metabolitos secundarios

El proceso principal de la formación de metabolitos secundarios consiste en el metabolismo de la fuente de carbono a acetil-CoA seguido por su subsecuente utilización. El acetil-CoA es precursor tanto de la producción de lípidos como de carotenoides, por lo que ambas rutas de síntesis tienen correlación. Los carotenoides son metabolitos secundarios en *Rhodotorula*, entonces, primero se acumulan los ácidos grasos en las células durante la fase estacionaria temprana y luego, los carotenoides son sintetizados en la fase estacionaria tardía (Somashekar y Joseph, 2000; Braunwald y col., 2013; Tkáčová y col., 2017).

En microorganismos oleaginosos, cuando son cultivados bajo concentraciones de carbono excesivas se desencadena la síntesis de lípidos, ya que el carbono es usado para la acumulación lipídica en vez de procesos de proliferación celular. Así mismo, la acumulación de carotenoides es potenciada cuando la glucosa ha sido enteramente consumida del medio de cultivo, sobretodo para la síntesis de ácidos grasos intracelulares (Braunwald y col., 2013; Tkáčová y col., 2017).

El β -caroteno es el carotenoide más común y es uno de los pigmentos naturales más importantes en la industria. Lo anterior se explica por su amplia variedad de aplicaciones, como: colorante, precursor de vitamina A, aditivo en cosméticos y preparaciones multivitamínicas, así como antioxidante para el mejoramiento de la salud (del Campo y col., 2007; Kot y col., 2018). Por otro lado, la producción y

comercialización del toruleno y torularodina sigue en etapa de desarrollo (Cheng y Yang, 2016).

Generalmente, el número de dobles enlaces conjugados de los carotenoides están proporcionalmente relacionados con su capacidad antioxidante. El toruleno y la torularodina tienen una cadena polieno más larga que la de β -caroteno, esto debido a que sus dobles enlaces conjugados son dos más que los del β -caroteno (Zoz y col., 2015). Por lo que, tomando en cuenta su estructura química y sus propiedades, estos compuestos representan un gran potencial para la industria alimenticia, cosmética y de salud (Kot y col., 2018).

El toruleno es considerado el carotenoide principal de *R. mucilaginosa*. Al igual que la torularodina, tiene 13 dobles enlaces y se identifica por un color rojo, en contraste con el β -caroteno que presenta un color amarillo a naranja dependiendo de la concentración (Zoz y col., 2015; Cheng y Yang, 2016). Además, tanto el toruleno como la torularodina poseen un anillo aromático conectado a una cadena polieno (Figura 3) (Kot y col., 2018).

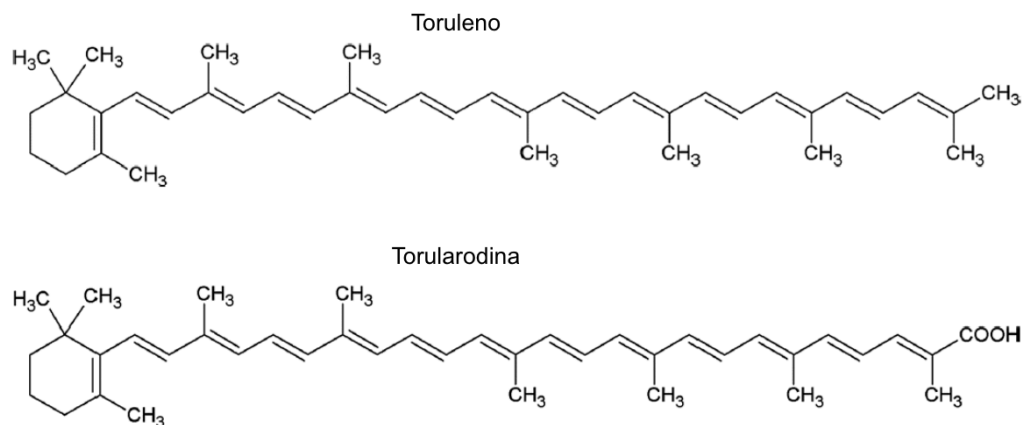


Figura 3. Estructura química del toruleno y torularodina (Kot y col., 2018).

La torularodina tiene una gran actividad antioxidante, la cual ayuda a la estabilización de las membranas bajo condiciones de estrés. Además de eso, es uno de los pocos carotenoides con un grupo carboxílico, lo que le confiere propiedades polares (Zoz y col., 2015; Tkáčová y col., 2017).

1.2.2 Carotenogénesis

En *Rhodotorula* la ruta del mevalonato es importante para la síntesis de pigmentos naturales (Moliné y col., 2012). Junto con la ruta del mevalonato se han analizado otras rutas generales para la síntesis de carotenoides por levaduras y se ha concluido que la carotenogénesis está involucrada en tres pasos generales (Mata-Gómez y col., 2014).

1) La síntesis comienza con la conversión de acetil-CoA a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), catalizada por la HMG-CoA sintasa. Luego, HMG-CoA es convertido en ácido mevalónico (MVA) mediante la HMG-CoA reductasa, siendo este el primer precursor de la producción de carotenoides. El MVA es fosforilado por la mevalonato quinasa para, seguidamente, ser descarboxilado por la difosfomevalonato descarboxilasa para convertirse en isopentenil pirofosfato (IPP) (Figura 4) (Mata-Gómez y col., 2014; Kot y col., 2018).

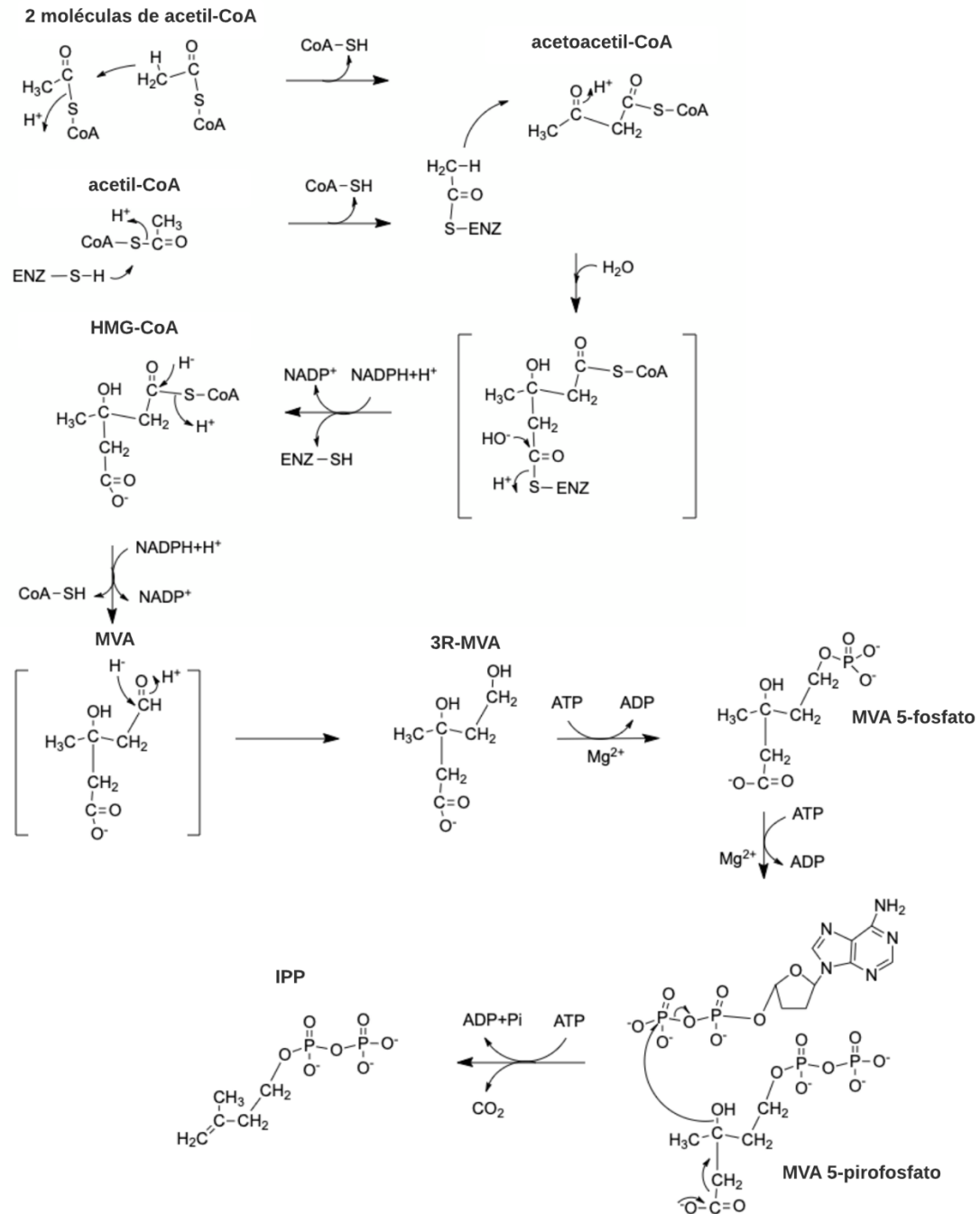


Figura 4. Primer paso de la carotenogénesis (adaptada de Goodwin, 1993).

2) Como se muestra en la Figura 5, el IPP es isomerizado a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) por la isopentenil pirofosfato isomerasa y luego, con la adición de tres moléculas IPP a DMAPP catalizada por la preniltransferasa, es convertido en geranil

geranil pirofosfato (GGPP). La condensación de dos moléculas de GGPP, catalizada por la fitoeno sintasa, forma fitoeno (el primer caroteno C₄₀ de la ruta). El fitoeno es subsecuentemente insaturado para formar licopeno, reacción catalizada por la fitoeno desaturasa (Mata-Gómez y col., 2014; Kot y col., 2018).

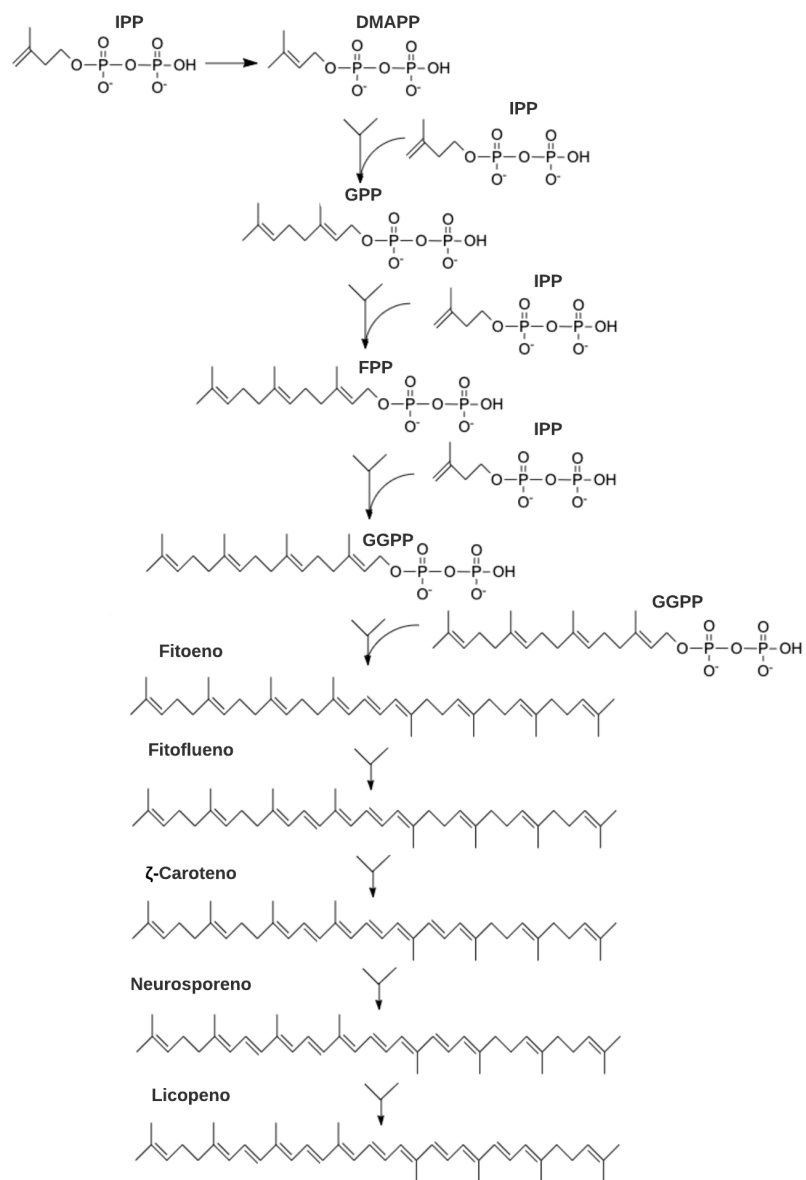


Figura 5. Segundo paso de la carotenogénesis (adaptada de Goodwin, 1993).

3) En *Rhodotorula* los carotenoides cíclicos que derivan del licopeno son el β -caroteno, γ -caroteno, toruleno y torularodina (Figura 6) (Moliné y col., 2012). El porcentaje de cada carotenoide en la célula va a variar dependiendo de cambios en las condiciones de cultivo, de incubación y en la cepa (Zoz y col., 2015; Sharma y Ghoshal, 2020).

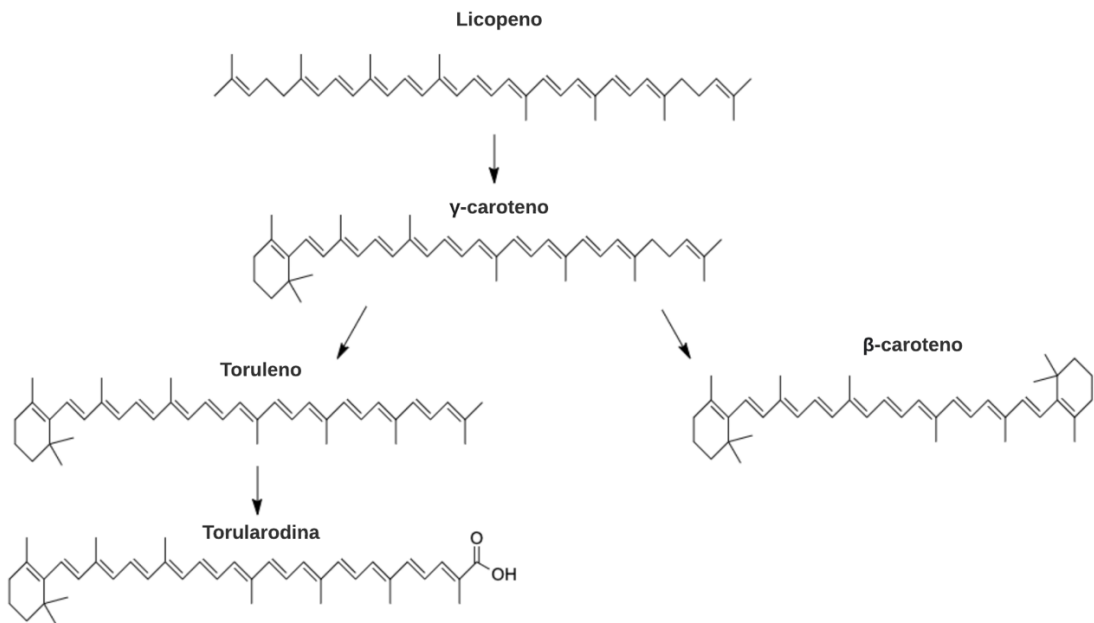


Figura 6. Tercer paso de la carotenogénesis (adaptada de Moliné y col., 2012).

1.3 Condiciones de cultivo para la producción de carotenoides

Hay varios factores que afectan el crecimiento y rendimiento de pigmentos microbianos (Figura 7) (Rana y col., 2021). Sin embargo, uno de los parámetros más importantes, tanto para el crecimiento celular como para la producción de lípidos y carotenoides microbianos, es la relación carbono/nitrógeno (C/N). La mejor relación C/N para la producción de dichos metabolitos dependerá de la naturaleza del microorganismo, la composición del medio de cultivo, así como de las fuentes de carbono y nitrógeno (Jiru y col., 2017; Tkáčová y col., 2017). No obstante, existe

ambigüedad respecto a la influencia de relaciones C/N en la producción de carotenoides (Braunwald y col., 2013).

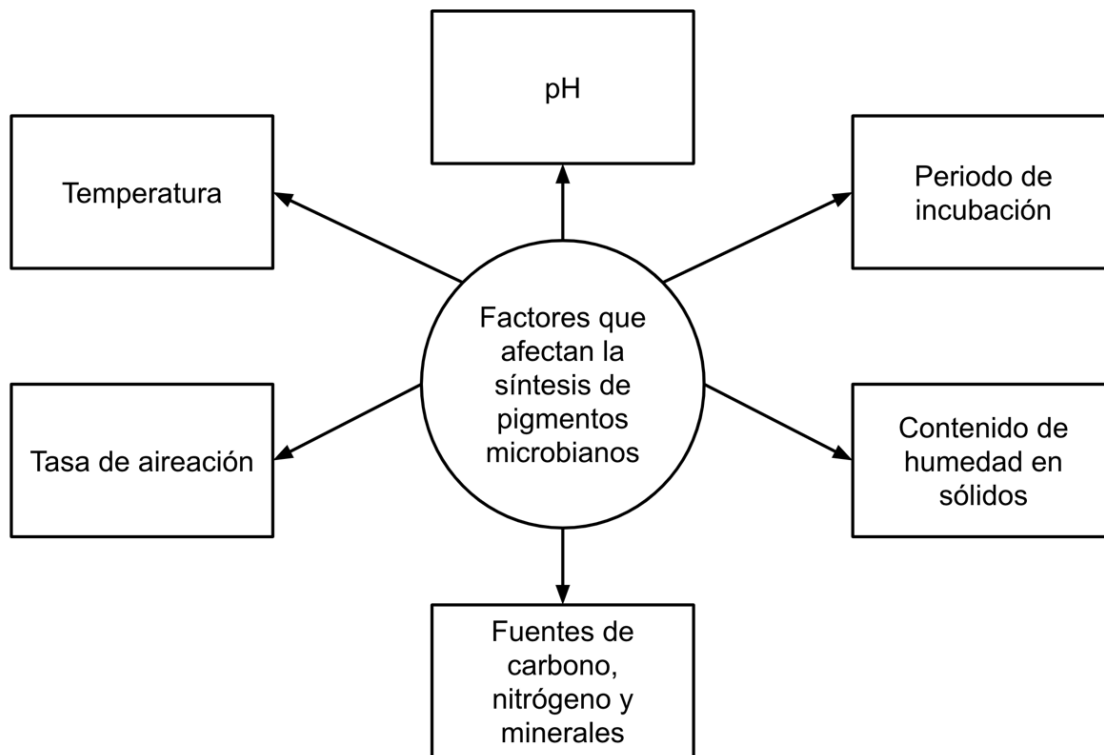


Figura 7. Condiciones de cultivo relacionados con la síntesis de pigmentos microbianos (adaptada de Rana y col., 2021).

Braunwald y col. (2013) demostraron que un aumento de relación C/N de 70 a 120 afectó positivamente la síntesis de carotenoides en una cepa de *R. glutinis*. Saenge y col. (2011) también indicaron una correlación positiva entre la relación C/N y la producción de carotenoides en dicha levadura. Pero, por otro lado, Somashekar y Joseph (2000) reportaron una relación inversa a relaciones C/N altas con *R. gracilis*.

Para *R. mucilaginosa*, Dias-Rodrigues y col. (2019) demostraron que una relación C/N mayor a 5 puede influir positivamente en la producción de carotenoides. Sin embargo, Libkind y col. (2004) reportaron que las relaciones C/N de 5, 20 y 100, no

mostraron una influencia significativa en la producción de carotenoides, pero una baja relación C/N incrementó el rendimiento de biomasa. Finalmente, da Silva y col. (2020) reportaron que cuando el sulfato de amonio se redujo la relación C/N fue más alta, favoreciendo la síntesis de carotenoides en las células, dado que la limitación de un nutriente en el medio puede llevar al estrés del microorganismo, lo que permite la acumulación de estos metabolitos secundarios.

Es por esta gran ambigüedad que hay respecto al efecto de la relación C/N en la acumulación de carotenoides, que es indispensable evaluar la mejor relación C/N para cada estudio en particular.

Después de la relación C/N, la síntesis de carotenoides por levaduras está principalmente influenciada por la temperatura y pH. La temperatura controla la concentración de enzimas involucradas en la carotenogénesis y, por ende, la concentración de cada carotenoide, mientras que el pH es un determinante de la tonalidad de los pigmentos (da Silva y col., 2020; Rana y col., 2021).

Las levaduras carotenogénicas son capaces de crecer en un medio de cultivo en un amplio rango de pH (2.5 - 9.5) y temperatura (5 – 28 °C) (Tkáčová y col., 2017). Sin embargo, se ha demostrado que una temperatura menor a 20 °C ocasiona inhibición de crecimiento, mientras que una temperatura mayor a 30 °C disminuye la síntesis de carotenoides. Para *R. mucilaginosa* se ha reportado que el mejor valor de pH para la síntesis de carotenoides es de 5 – 7 y la mejor temperatura es de 22 – 25.8 °C, dependiendo de la cepa (Cheng y Yang, 2016; Dias-Rodrigues y col., 2019; da Silva y col., 2020; Sharma y Ghoshal, 2020).

1.3.1 Rendimiento producto/biomasa

El rendimiento de carotenoides respecto a la biomasa de levadura (Y_p/x) normalmente se determina como la cantidad de carotenoides producida por unidad

de biomasa seca al final de la fermentación (Ecuación 1) (Aksu y Tuğba Eren, 2005; Bonadio y col., 2018).

$$Y^{p/x} (\mu g/g) = \frac{\mu g \text{ carotenoides producidos}}{g \text{ biomasa seca}} \quad (1)$$

Para mejorar el rendimiento de carotenoides, las levaduras carotenogénicas se pueden someter a diferentes factores generadores de estrés como lo pueden ser el estrés osmótico u oxidativo, este último ocasionado por la exposición a luz UV o visible (Mannazzu y col., 2015; Sandmann, 2019).

1.4 Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son normalmente generadas por el metabolismo celular para la obtención de energía. Por otro lado, los antioxidantes se encargan de eliminar las ERO con el fin de mantener un equilibrio de óxido-reducción en el organismo. Por lo tanto, el estrés oxidativo es un estado ocasionado por el exceso de ERO, el cual no puede ser contrarrestado por los antioxidantes (Angoa-Pérez y Rivas-Arancibia, 2007).

Algunos ejemplos de ERO son: el oxígeno singlete (1O_2), radicales de hidroxilo ($HO\cdot$), radicales de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las especies anteriores son formas parcialmente reducidas o excitadas del oxígeno atmosférico generados por fotosensibilidad o en reacciones celulares y, las cuales pueden reaccionar con diferentes componentes celulares como aminoácidos en enzimas, los ácidos grasos en las membranas lipídicas y ácidos nucleicos en cadenas de ADN o ARN (Inupakutika y col., 2016; Sandmann, 2019).

Las ERO a nivel basal son empleadas como moléculas señalizadoras capaces de mediar procesos celulares como la regulación de rutas metabólicas, la respuesta frente a patógenos, coordinación de respuestas sistémicas frente a estímulos ambientales, entre otros (Mittler, 2017). Sin embargo, el incremento en los niveles de

ERO puede ocasionar efectos negativos en las células (Figura 8) (Angoa-Pérez y Rivas-Arancibia, 2007).

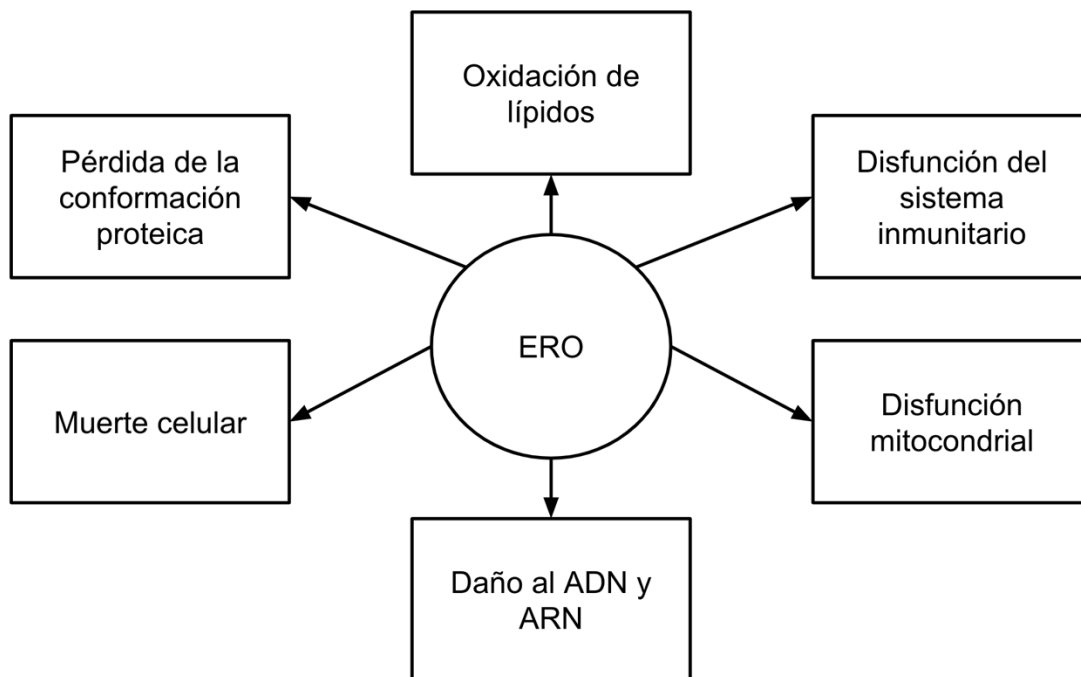


Figura 8. Ejemplos de algunos efectos negativos ocasionados por la acumulación de ERO dentro de la célula (adaptada de Angoa-Pérez y Rivas-Arancibia, 2007).

1.4.1 Actividad fotoprotectora de los carotenoides

Durante el curso de la evolución, los organismos han desarrollado varias estrategias para protegerse de las ERO. Un ejemplo es la formación de antioxidantes en las regiones hidrofílicas o hidrofóbicas de la célula que protegen de especies reactivas de oxígeno y de la radiación. Los carotenoides en levaduras carotenogénicas son importantes antioxidantes protectores de la membrana que pueden eficientemente inactivar el oxígeno singlete y radicales peroxilo e hidroxilo. Así mismo, es probable que los carotenoides estén relacionados con modificaciones en la permeabilidad de la membrana y, por ende, con el aumento de la resistencia celular a la oxidación y radiación (Mannazzu y col., 2015; Zoz y col., 2015; Kot y col., 2018; Sandmann, 2019).

1.4.2 Efecto de la luz en cepas de *Rhodotorula*

Se ha demostrado que la radiación es capaz de ocasionar estrés oxidativo en cepas del género *Rhodotorula* (Zhang y col., 2014). La levadura como respuesta a dicho estrés promueve el crecimiento celular y, además, la producción de lípidos y carotenoides con el fin de remover los radicales libres generados por la oxidación. Por lo tanto, la radiación básicamente funciona como un estímulo en la regulación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la ruta de los triglicéridos y la ruta de los carotenoides (Gong y col., 2019).

1.4.3 Iluminación por diodos emisores de luz

En la investigación realizada por Yen y Yang (2012) se reportaron resultados prometedores respecto al aumento del crecimiento celular, lípidos totales y contenido de β -caroteno en *R. glutinis* mediante la administración de energía lumínica por diodos emisores de luz (LED, por sus siglas en inglés). Para la metodología, utilizaron luz LED blanca, azul, verde y roja, siendo esta última la que tuvo un mayor efecto positivo respecto al contenido de biomasa y β -caroteno. En los resultados de la misma investigación se demostró que la exposición a la luz LED durante la fase exponencial afectó positivamente en el contenido de biomasa producida.

Mediante el uso de *R. glutinis*, Yen y Zhang (2011) demostraron que el incremento de la intensidad luminosa permitió la obtención de un mayor contenido de biomasa pero, a su vez, esto inhibió la acumulación de lípidos. Sin embargo, Zhang y col. (2014) reportaron una relación directa entre la intensidad luminosa y el contenido total de carotenoides con *R. glutinis*.

Conforme a lo anterior, se puede asumir que aún no hay suficiente investigación respecto a los efectos ocasionados por diferentes colores de luz LED e intensidades luminosas en el contenido total de carotenoides en cepas de *Rhodotorula*.

2. HIPÓTESIS

Mejora la producción del contenido total de carotenoides por *R. mucilaginosa* mediante energía lumínica administrada desde el inicio de la fase exponencial hasta el inicio de la fase estacionaria. Además, el color de la luz LED, la intensidad luminosa, así como la relación C/N de un cultivo de *R. mucilaginosa* modula positivamente la producción del contenido total de carotenoides.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar el efecto de la relación C/N y de la iluminación por luz LED administrada desde el inicio de la fase exponencial hasta el inicio de la fase estacionaria, a diferentes colores e intensidades luminosas, en la producción del contenido total de carotenoides por *R. mucilaginosa*.

3.2 Específicos

- Determinar la relación C/N adecuada para la mayor producción de carotenoides totales en un cultivo de *R. mucilaginosa*.
- Estimar la mejor relación de color de luz LED e intensidad luminosa (luz blanca a 78 – 774 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, luz verde a 4 – 24 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, luz azul a 2 – 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y luz roja a 2 – 6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) para la producción de carotenoides totales en un cultivo de *R. mucilaginosa*.
- Caracterizar el rendimiento de carotenoides totales respecto a la biomasa del tratamiento que conduzca a su mayor producción en un cultivo de *R. mucilaginosa*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Cepa

La levadura que se empleó en este trabajo, *Rhodotorula mucilaginosa*, pertenece a la colección de cepas de la planta piloto de Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se conservó a -80 °C en suspensión con glicerol al 20 % v/v.

4.1.2 Pre-inóculo

Conforme a Lau y col. (2018), la cepa que se encontraba en el tubo de almacenamiento se activó durante 24 h a 30 °C y 150 rpm en 15 mL de medio líquido de extracto de levadura, peptona y sacarosa (YPS, por sus siglas en inglés). La formulación consistió en (g/L): extracto de levadura (10), peptona de caseína (20) y sacarosa (20), pH 5. Posteriormente, la levadura activada se inoculó en placas de Petri para su desarrollo durante 36 h a la temperatura ya mencionada en medio sólido de extracto de levadura, peptona y dextrosa (YPD, por sus siglas en inglés). La formulación consistió en (g/L): extracto de levadura (10), peptona de caseína (20), dextrosa (20) y agar base (15), pH 5. En base a Cheng y Yang (2016), se inoculó con una concentración celular reportada de 0.1 ± 0.02 unidades OD₆₀₀ en 15 mL de medio YPS, posteriormente, se incubó durante 15 h a 30 °C y 150 rpm. Se centrifugó a $4,500 \times g$, a 4 °C durante 15 min para sedimentar las células, las cuales se resuspendieron en una solución con glicerol al 20% v/v para su conservación a -80 °C.

4.1.3 Condiciones de cultivo

Teniendo en cuenta a Jiru y col. (2017) respecto al mejor tamaño del inóculo para un biorreactor, se tomó un inóculo desarrollado durante 12 horas en YPS para inocular al 10% de un volumen total de 30 mL en medio líquido con glucosa como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno a una relación C/N de 23, 58, 82 y 105. Los medios de cultivo se prepararon en base a lo reportado por Wang y

col., 2017) y Libkind y col. (2004), pero con algunas modificaciones. La formulación consistió en (g/L): glucosa (21.2, 53, 74.2 o 95.4), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2), KH_2PO_4 (1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a (0.5), CaCl_2 a (0.1), y NaCl a (0.3). El pH fue ajustado a 7.0.

4.1.4 Luces LED

Como fuente de energía lumínica se utilizó la lámpara WRGB “Full Spectrum” (Chihiros aquatic studio, modelo LD04 – 34, China) (Figura 9). La lámpara está compuesta por 72 LED de luz blanca, 18 LED de luz azul, 8 LED de luz verde, 8 LED de luz roja y 27 LED rojo/verde/azul (RGB, por sus siglas en inglés).



Figura 9. Imagen de la lámpara que proporciona color blanco, rojo, verde y azul (WRGB por sus siglas en inglés).

4.2 Métodos

4.2.1 Determinación de la mejor relación C/N para la productividad y rendimiento de carotenoides totales

Para las cuatro relaciones C/N ya mencionadas, se determinó el rendimiento de carotenoides/biomasa ($Y_{p/x}$) mediante la Ecuación 1, en la cual normalmente se determina como los carotenoides totales producidos (CT) por unidad de peso seco celular (PSC) al final de la fermentación (Aksu y Tuğba Eren, 2005; Bonadio y col.,

2018). Por otro lado, se cuantificó la productividad de CT y PSC, la cual fue expresada como CT/L*h y PSC/L*h, respectivamente. Posteriormente, se compararon los rendimientos y productividades obtenidos con el fin de elegir la relación C/N con mayor resultado positivo.

4.2.2 Operación por lote a pequeña escala acompañada de luz LED

En base a la metodología descrita por Yen y Yang (2012) y Zhang y col. (2014), se tomó un inóculo desarrollado durante 12 horas en YPS para inocular al 10% de un volumen total de 30 mL a temperatura ambiente y 150 rpm. Los matraces de 125 mL inoculados junto con un control (protegidos de la luz) fueron puestos dentro de una caja de unicel adherida al agitador orbital y fueron expuestos a la luz visible de LED administrada por la lámpara WRGB localizada a 5 cm de la superficie de la caja. La intensidad de la luz dentro de la caja de unicel fue medida con un medidor de luz. Además, se emplearon cuatro condiciones de radiación diferentes: luz blanca, luz verde, luz azul y luz roja.

4.2.3 Efecto de la luz visible en la síntesis de carotenoides

Para evaluar el efecto de la luz visible a diferentes colores e intensidades luminosas, los cultivos por lote se desarrollaron durante cinco días y fueron expuestos a luz LED blanca, verde, azul, o roja, y a una intensidad luminosa de 78 – 774 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, 4 – 24 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, 2 – 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ o 2 – 6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, respectivamente, desde el inicio de la fase exponencial hasta el inicio de la fase estacionaria. Posteriormente, se calculó el $Y_{p/x}$ para comparar los resultados con el fin de determinar la relación del color e intensidad luminosa con mayor síntesis de carotenoides.

4.2.4 Determinación del peso seco (g/L)

Conforme a la metodología propuesta por Lau y col. (2018), se centrifugaron 5 mL de suspensión de levadura a $4,500 \times g$ durante 15 min y, posteriormente, se lavó dos veces con agua destilada. Finalmente, se secó a 105 °C hasta llegar a un peso constante (1 – 2 horas).

4.2.5 Extracción y cuantificación de carotenoides

Siguiendo la metodología de Kanzy y col. (2015), se tomaron 5 mL de suspensión de levadura y las células fueron recolectadas usando la centrifugación a $4,500 \times g$ durante 15 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular fue lavado tres veces con agua destilada para, seguidamente, ser resuspendió en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) precalentado a $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego, se centrifugó y extrajo la solución pigmentada. Se repitió la extracción con DMSO tres veces. Para determinar los carotenoides totales a partir de la solución pigmentada total, se midió la densidad óptica mediante espectrofotómetro a 501 nm. El contenido total de carotenoides (mg/L) se calculó mediante la Ecuación 2, donde A es la absorbancia a 501 nm, V es el volumen total y $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ es el coeficiente de extinción, el cual es igual a 2,040 (cuando la celda es de 1 cm de ancho y la concentración es del 1 %).

$$\text{Carotenoides} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{A \cdot V \cdot 10^6}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100} \quad (2)$$

4.3 Diseño experimental

4.3.1 Métodos analíticos

Para la primera etapa, se realizó un diseño experimental unifactorial. El factor fue la relación C/N (23, 58, 82 y 105). Las variables respuesta fueron la producción de biomasa y carotenoides totales.

Para la segunda etapa, se aplicó un diseño factorial de múltiples niveles y dos factores. Los factores fueron el color de la luz LED (blanca, verde, azul y roja) y la intensidad luminosa: $78 - 774 \text{ } \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (luz blanca), $4 - 24 \text{ } \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (luz verde), $2 - 10 \text{ } \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (luz azul) y $2 - 6 \text{ } \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (luz roja).

4.3.2 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y fueron reportadas como la media de los ensayos \pm desviación estándar. Se aplicó análisis de varianza, seguido

de una comparación de medias por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) utilizando el paquete estadístico Minitab 16.

5. RESULTADOS

5.1 Efecto de la relación C/N sobre el rendimiento y productividad del PSC y CT

En los tratamientos con la relación C/N como variable, se observó un mayor efecto del cambio de la relación C/N sobre la producción y productividad de CT en comparación con la producción y productividad de PSC (Cuadro 1, Figura 10). Respecto a lo anterior, la relación C/N de 58 reportó la producción y productividad de PSC más altas (1.413 ± 0.27 g/L y 0.020 ± 0.00 g/L*h, respectivamente). En cambio, la relación C/N de 23 mostró la concentración y productividad de PSC más bajas (0.787 ± 0.06 g/L y 0.011 ± 0.00 g/L*h, respectivamente). Por consiguiente, la relación C/N de 58 reportó una producción y productividad de PSC significativamente similares a las reportadas por la relación C/N de 82 y 105, mientras que la relación C/N de 23 mostró una diferencia significativa respecto a los valores obtenidos por la relación C/N de 58 y 105. Aunado a lo anterior, la relación C/N no reportó una correlación con la producción y productividad de PSC, ya que al cambiar la relación C/N de 23 a 58 se obtuvo un aumento del 79.5 %, mientras que, al aumentar la relación C/N a 82, se reportó una caída del 16.5% de producción y productividad, sin embargo, se mostró un aumento del 8.5% de los valores al subir la relación C/N a 105, aunque estos se mantuvieron por debajo de los resultados obtenidos a una relación C/N de 58.

Cuadro 1. Rendimiento, productividad y relación del PSC y CT en diferentes relaciones C/N.

Relación C/N	PSC (g/L)	CT ($\mu\text{g/L}$)	Productividad de PSC (g/L*h)	Productividad de CT ($\mu\text{g/L*h}$)	Yp/x ($\mu\text{g/g}$)
23	0.787 ± 0.06^b	14.46 ± 2.83^b	0.011 ± 0.00^b	0.201 ± 0.04^b	18.47 ± 3.83^a
58	1.413 ± 0.27^a	29.41 ± 4.27^a	0.020 ± 0.00^a	0.409 ± 0.06^a	20.97 ± 1.61^a
82	1.180 ± 0.10^{ab}	26.23 ± 0.49^a	0.016 ± 0.00^{ab}	0.364 ± 0.01^a	22.35 ± 2.18^a
105	1.280 ± 0.24^a	30.80 ± 0.37^a	0.018 ± 0.00^a	0.428 ± 0.01^a	24.76 ± 5.52^a

Abreviaturas: PSC, peso seco celular; CT carotenoides totales; Yp/x, rendimiento producto/biomasa. Los valores se expresan como promedio \pm desviación estándar (N = 3); letras diferentes en la misma columna indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) conforme la prueba de Tukey.

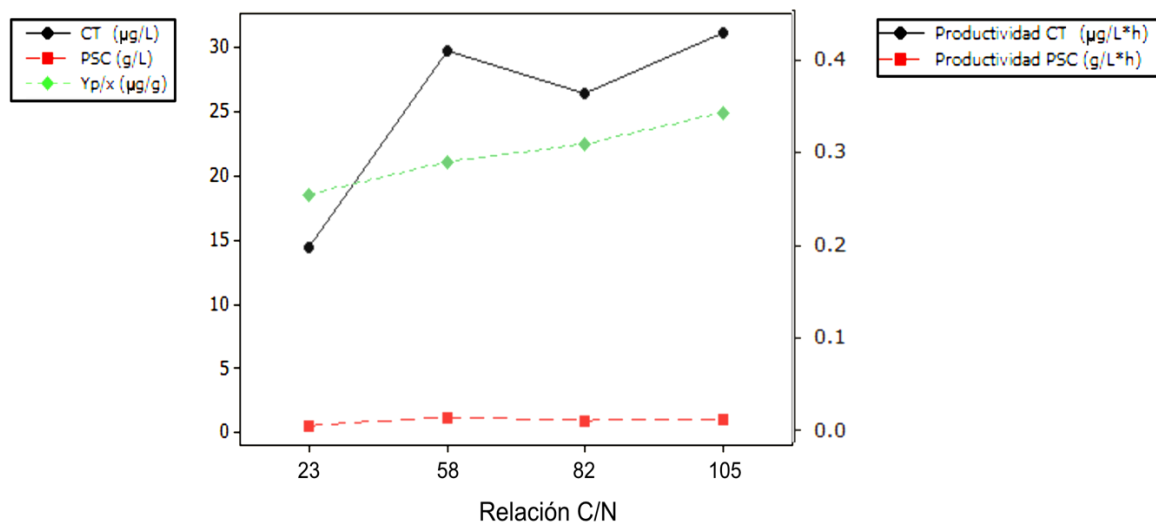


Figura 10. Comportamiento de *R. mucilaginosa* con diferentes relaciones C/N cultivada durante 72 horas, a temperatura ambiente y 150 rpm. A) Producción y productividad de PSC. B) Producción y productividad de CT. C) Yp/x. Abreviaturas: PSC, peso seco celular; CT, carotenoides totales; Yp/x, rendimiento producto/biomasa.

También, se mostró la producción y productividad de CT a diferentes relaciones C/N (Cuadro 1, Figura 10). Por un lado, la relación C/N de 105 reportó los valores más altos ($30.80 \pm 0.37 \mu\text{g/L}$ y $0.428 \pm 0.01 \mu\text{g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente). En cambio, la relación C/N de 23 mostró la producción y productividad de CT más bajas ($14.46 \pm 2.83 \mu\text{g/L}$ y $0.201 \pm 0.04 \mu\text{g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente). Por lo tanto, la producción y productividad de CT reportaron un aumento del 113 % al cambiar el empleo de una relación C/N de 23 a una de 105. Conforme lo anterior, la relación C/N de 58, 82 y 105 mostraron una similitud significativa de producción y productividad de CT, por lo que la relación C/N de 23 obtuvo valores significativamente diferentes a las demás relaciones C/N. Además, la relación C/N no reportó una correlación con la producción y productividad de CT, ya que al cambiar la relación C/N de 23 a 58 se obtuvo un aumento del 103.4 %, mientras que, al pasar a una relación C/N de 82, se reportó una caída del 10.8 % de producción y productividad, sin embargo, se mostró un aumento del 17.4 % de producción y productividad al subir la relación C/N a 105. En base a lo anterior, se observó que al subir la relación C/N de 23 a 58, casi se alcanzó el mayor aumento de producción y productividad de CT.

En contraste con la producción y productividad de PSC y CT se obtuvo una correlación directamente proporcional entre el Y_p/x y la relación C/N, por lo que se reportó un aumento del 34.1 % de rendimiento al cambiar el empleo de una relación C/N de 23 en el medio de cultivo por una relación C/N de 105 (Cuadro 1, Figura 10). Conforme lo anterior, la relación C/N de 23 obtuvo un rendimiento de $18.47 \pm 3.83 \mu\text{g/g}$, mientras que al subir la relación C/N a 105 se mostró un rendimiento de $24.76 \pm 5.52 \mu\text{g/g}$.

Respecto al comportamiento mostrado entre la relación C/N y el Y_p/x , la relación C/N de 105 reportó un rendimiento 1.3 veces mayor que el rendimiento más bajo obtenido a una relación C/N de 23 ($24.76 \pm 5.52 \mu\text{g/g}$ y $18.47 \pm 3.83 \mu\text{g/g}$, respectivamente) (Cuadro 1, Figura 10).

5.2 Efecto del color e intensidad de luz sobre el rendimiento y productividad del PSC y CT

Conforme lo mostrado en el Cuadro 2, los tratamientos expuestos a la luz blanca a una intensidad luminosa baja ($78 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) reportaron la mayor concentración y productividad de PSC ($9.283 \pm 0.42 \text{ g/L}$ y $0.159 \pm 0.01 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente) y, por lo tanto, el $Y_{p/x}$ más bajo ($25.53 \pm 2.38 \mu\text{g/g}$). Además, la intensidad baja obtuvo una mayor producción y productividad de CT ($242.8 \pm 24.0 \mu\text{g/L}$ y $4.047 \pm 0.40 \mu\text{g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente) en comparación con la intensidad media ($358 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), la cual mostró la concentración y productividad de CT más bajas ($238.7 \pm 24.6 \mu\text{g/L}$ y $3.979 \pm 0.41 \mu\text{g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente). Sin embargo, la intensidad luminosa media mostró un mayor $Y_{p/x}$ ($28.58 \pm 2.69 \mu\text{g/g}$). Además, dicha intensidad obtuvo una producción y productividad de PSC de $8.351 \pm 0.30 \text{ g/L}$ y $0.139 \pm 0.01 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente, las cuales se reportaron por debajo de las obtenidas con una intensidad baja. En contraste, la intensidad luminosa alta ($774 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) mostró el $Y_{p/x}$ más alto ($42.55 \pm 4.33 \mu\text{g/g}$), ya que, a su vez, reportó la menor concentración y productividad de PSC ($6.309 \pm 0.35 \text{ g/L}$ y $0.105 \pm 0.01 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente). Además, conforme a los tratamientos sometidos a la luz, dicha intensidad reportó la mayor concentración y productividad de CT ($267.6 \pm 19.3 \mu\text{g/L}$ y $4.461 \pm 0.32 \mu\text{g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente). Por lo tanto, los tratamientos expuestos a la luz blanca con una intensidad luminosa alta mostraron un $Y_{p/x}$ 1.7 veces más alto comparado con el resultado de dicha luz a una intensidad luminosa baja.

Cuadro 2. Rendimiento y productividad del PSC y CT de los ensayos sometidos a la luz blanca a diferentes intensidades luminosas.

Intensidad luminosa ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	PSC (g/L)	CT ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Productividad de PSC (g/L*h)	Productividad de CT ($\mu\text{g}/\text{L}\cdot\text{h}$)	Yp/x ($\mu\text{g}/\text{g}$)
Control	7.942 \pm 0.93 ^a	326.9 \pm 41.5 ^a	0.132 \pm 0.02 ^a	5.448 \pm 0.69 ^a	41.30 \pm 4.99 ^a
78	9.283 \pm 0.42 ^a	242.8 \pm 24.1 ^b	0.155 \pm 0.01 ^a	4.047 \pm 0.40 ^b	26.16 \pm 2.44 ^b
358	8.351 \pm 0.30 ^a	238.7 \pm 24.6 ^b	0.139 \pm 0.01 ^a	3.979 \pm 0.41 ^b	28.58 \pm 2.69 ^b
774	6.308 \pm 0.35 ^b	267.7 \pm 19.3 ^{ab}	0.105 \pm 0.01 ^b	4.461 \pm 0.32 ^{ab}	42.55 \pm 4.33 ^a

Abreviaturas: PSC, peso seco celular; CT, carotenoides totales; Yp/x, rendimiento producto/biomasa. Los valores se expresan como promedio \pm desviación estándar (N = 3); letras diferentes en la misma columna indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) conforme la prueba de Tukey.

Los tratamientos sometidos a la luz blanca a diferentes intensidad luminosas mostraron una correlación directamente o inversamente proporcional dependiendo del parámetro a evaluar (Cuadro 2). Conforme lo anterior, se mostró una correlación directamente proporcional entre el Yp/x y la intensidad luminosa, ya que se obtuvo un aumento del 62.7 % al subir la intensidad baja a una alta (Figura 11C). Sin embargo, se reportó una correlación inversamente proporcional de la intensidad luminosa respecto a la producción y productividad de PSC, la cual obtuvo una caída del 32 % al cambiar de una intensidad baja a una alta (Figura 11A). Por otro lado, la producción y productividad de CT no mostraron una correlación con la intensidad luminosa, ya que, al subir la exposición de una intensidad baja a una media, se mostró una caída del 4.1 %, mientras que, al subir a una intensidad alta, hubo un aumento del 12.1 % de producción y productividad (Figura 11B).

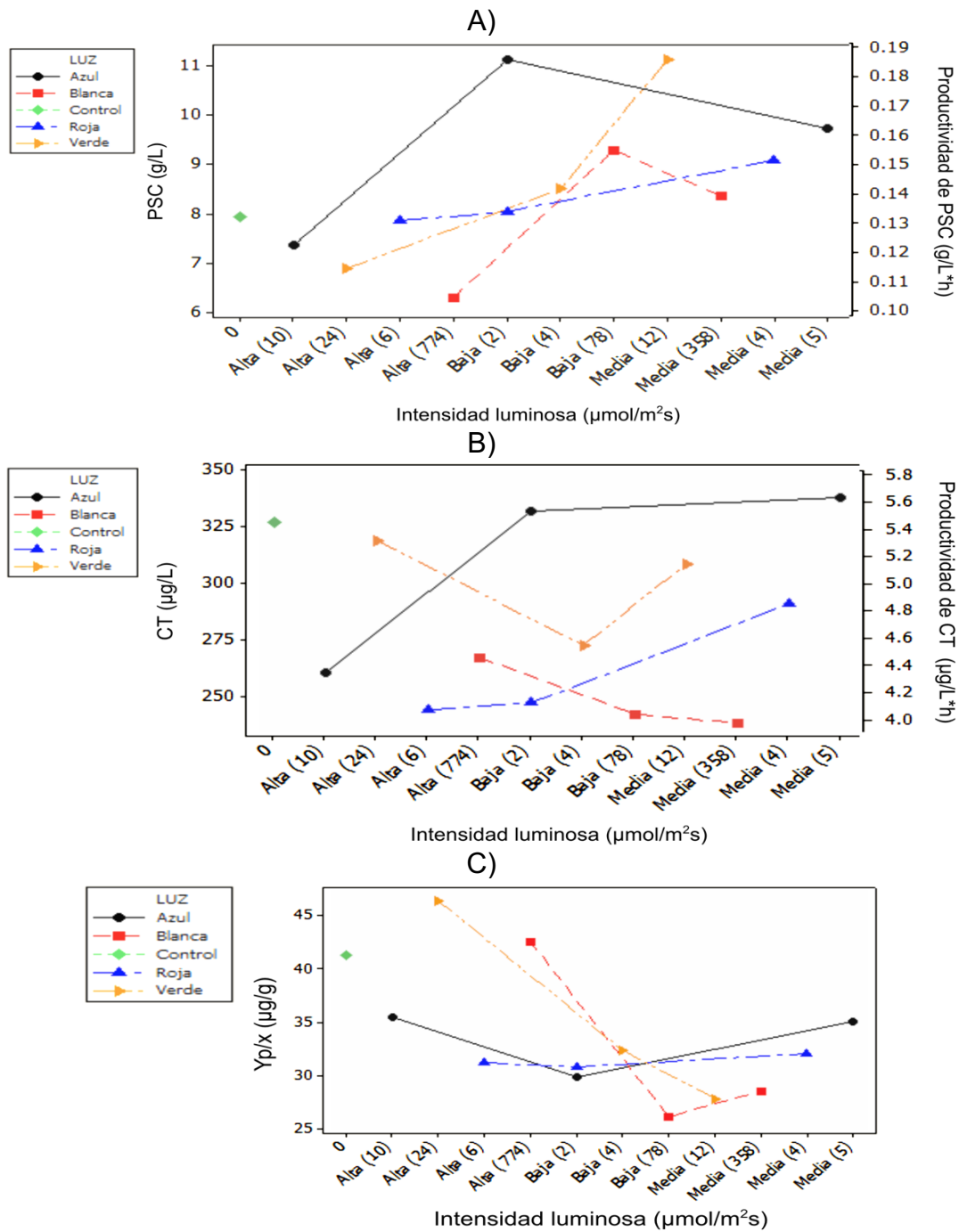


Figura 11. Comportamiento de *R. mucilaginosa* en base a la interacción de los tratamientos expuestos a diferentes colores de luz e intensidades luminosas durante 120 horas, a temperatura ambiente y 150 rpm. A) Producción y productividad de PSC. B) Producción y productividad de CT. C) Yp/x. Abreviaturas: PSC, peso seco celular; CT, carotenoides totales; Yp/x, rendimiento producto/biomasa.

La intensidad luminosa baja y media reportaron una producción y productividad de PSC 1.2 y 1.1 veces más altas, respectivamente, que los valores reportados por el control (Cuadro 2, Figura 11). Mientras que la intensidad luminosa alta fue la única que reportó valores más bajos que los del control, estos últimos siendo 1.3 veces más altos. En contraste, el control reportó una concentración y productividad de CT más altas que las obtenidas por los tratamientos sometidos a la luz, por lo que dichos valores mostraron ser 1.2 veces más altos que los valores más altos reportados bajo una exposición a la luz. Sin embargo, sólo los tratamientos expuestos a una intensidad luminosa baja y media reportaron un $Y_{p/x}$ más bajo que el mostrado por el control, siendo este último 1.6 y 1.4 veces más alto que el rendimiento obtenido a una intensidad luminosa baja y media, respectivamente. Aunado a lo anterior, la concentración y productividad del PSC del control fueron estadísticamente similares a las reportadas por la intensidad luminosa baja y media, por lo que los tratamientos en los cuales se empleó la intensidad luminosa alta fueron los únicos que mostraron valores estadísticamente diferentes a los demás. En contraste, la producción y productividad de CT reportadas por el control fueron estadísticamente similares a las obtenidas a una intensidad luminosa alta, la cual, a su vez, reportó valores estadísticamente similares a los mostrados a una intensidad luminosa baja y media. Aunado a lo anterior, los $Y_{p/x}$ reportados por la intensidad luminosa alta y el control fueron estadísticamente similares, mientras que los rendimientos de la intensidad luminosa baja y media fueron estadísticamente similares.

En el Cuadro 3 se mostraron los tratamientos en los cuales se empleó la luz verde a una intensidad luminosa media ($12 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), los cuales reportaron la mayor concentración y productividad de PSC ($11.12 \pm 0.85 \text{ g/L}$ y $0.185 \pm 0.01 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente), así como una concentración y productividad de CT de $308.8 \pm 17.7 \mu\text{g/L}$ y $5.147 \pm 0.30 \mu\text{g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente, mientras que la intensidad baja ($4 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) reportó la menor concentración y productividad de CT ($272.9 \pm 4.45 \mu\text{g/L}$ y $4.548 \pm 0.07 \mu\text{g/L}\cdot\text{h}$). Conforme lo anterior, la intensidad media mostró el menor $Y_{p/x}$ ($27.86 \pm 2.08 \mu\text{g/g}$), mientras que la intensidad baja, con una producción y

productividad de PSC de 8.502 ± 0.98 g/L y 0.142 ± 0.02 g/L*h, respectivamente, reportó un rendimiento 1.2 veces más alto que el de la intensidad media (32.38 ± 3.70 µg/g). Por otro lado, la intensidad luminosa alta ($24 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) mostró el mayor $Y_{p/x}$ ya que, a su vez, reportó la menor producción y productividad de PSC (46.38 ± 4.88 µg/g, 6.889 ± 0.22 g/L y 0.115 ± 0.00 g/L*h, respectivamente). Además, en base a los tratamientos sometidos a la luz, la intensidad alta reportó la mayor producción y productividad de CT (319.1 ± 29.2 µg/L y 5.319 ± 0.49 µg/L*h, respectivamente). Conforme lo anterior, los tratamientos en los que se empleó la luz verde a una intensidad luminosa alta mostraron un $Y_{p/x}$ 1.7 veces mayor en comparación con el empleo de una intensidad media.

Cuadro 3. Rendimiento y productividad del PSC y CT de los ensayos sometidos a la luz verde a diferentes intensidades luminosas.

Intensidad luminosa ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	PSC (g/L)	CT ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Productividad de PSC (g/L*h)	Productividad de CT ($\mu\text{g}/\text{L}^*\text{h}$)	$Y_{p/x}$ ($\mu\text{g}/\text{g}$)
Control	7.942 ± 0.93^b	326.9 ± 41.5^a	0.132 ± 0.02^b	5.448 ± 0.69^a	41.30 ± 4.99^{ab}
4	8.501 ± 0.98^b	272.9 ± 4.45^a	0.142 ± 0.02^b	4.548 ± 0.07^a	32.38 ± 3.70^{bc}
12	11.12 ± 0.85^a	308.8 ± 17.7^a	$(0.185 \pm 0.01^a$	5.147 ± 0.30^a	27.86 ± 2.07^c
24	6.890 ± 0.22^b	319.1 ± 29.2^a	0.115 ± 0.00^b	5.319 ± 0.49^a	46.37 ± 4.89^a

Abreviaturas: PSC, peso seco celular; CT carotenoides totales; $Y_{p/x}$, rendimiento producto/biomasa. Los valores se expresan como promedio \pm desviación estándar (N = 3); letras diferentes en la misma columna indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) conforme la prueba de Tukey.

En base al comportamiento de los tratamientos sometidos a la luz verde, el cual se observó en el Cuadro 3, se demostró que existe una correlación directamente proporcional de la producción y productividad de CT respecto a la intensidad

luminosa (Figura 11B). Por lo tanto, se reportó un aumento del 16.9 % de concentración y productividad de CT al pasar de una intensidad baja a una alta. En contraste, se demostró que no hay una correlación de la producción y productividad del PSC respecto a la intensidad luminosa, ya que se reportó un aumento de la producción y productividad del 30.8 % al cambiar el empleo de la intensidad luminosa baja por la intensidad media, mientras que hubo una caída del 38 % de los valores cuando se subió a una intensidad alta, lo cuales se reportaron por debajo de la producción y productividad obtenidas con una intensidad baja (Figura 11A). Por otro lado, se mostró una caída del 14 % de Yp/x al cambiar la exposición de una intensidad luminosa baja por una media, sin embargo, al subir a una intensidad alta se obtuvo un incremento del 66.4 % de rendimiento respecto al reportado por la intensidad media (Figura 11C).

Conforme a lo reportado en el Cuadro 2, la intensidad luminosa baja y media mostraron una producción y productividad de PSC más altas que los tratamientos sin luz, siendo 1.1 y 1.4 veces más altas, respectivamente, que el valor reportado por el control (Cuadro 3, Figura 11). En contraste, la intensidad luminosa alta reportó valores más bajos que los del control, estos últimos siendo 1.2 veces más altos. Aunado a lo anterior, el control mostró la mayor producción y productividad de CT comparado con la exposición a la luz verde, el cual fue 2.4 % más alto que los valores más altos reportados bajo el empleo de la luz verde. En contraste, el control reportó un Yp/x 1.3 y 1.5 veces más alto que los reportados por los tratamientos sometidos a una intensidad luminosa baja y media, respectivamente, mientras que la intensidad luminosa alta mostró un rendimiento 1.1 veces más alto que el reportado por el control. Dicho lo anterior, la producción y productividad de PSC reportadas por el control fueron estadísticamente similares a las de la intensidad luminosa baja y alta, por lo que la intensidad luminosa media mostró valores estadísticamente diferentes a los reportados por los demás tratamientos. En contraste, la producción y productividad de los CT no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos expuestos a la luz y sin dicha exposición. Conforme lo anterior, el Yp/x reportado por el control y la intensidad luminosa alta fueron estadísticamente similares, mientras

que el control, a su vez, mostró un rendimiento estadísticamente similar al de la intensidad luminosa baja y esta, de igual forma, reportó un valor estadísticamente similar al de la intensidad luminosa media.

En comparación con los tratamientos que fueron expuestos a la luz blanca, la exposición a la luz verde mostró un mayor efecto sobre el $Y_{p/x}$ obtenido, mientras que, a diferencia de los tratamientos expuestos a luz blanca, la luz verde mostró tener un mayor efecto sobre la producción y productividad de PSC en comparación con las de CT (Cuadro 2 - 3, Figura 11).

Los resultados obtenidos con el empleo de la luz azul se presentaron en el Cuadro 4. La intensidad luminosa baja ($2 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) reportó la mayor concentración y productividad de PSC ($11.11 \pm 0.20 \text{ g/L}$ y $0.185 \pm 0.00 \text{ g/L}^*\text{h}$, respectivamente), así como una producción y productividad de CT de $332.0 \pm 11.8 \mu\text{g/L}$ y $5.534 \pm 0.20 \mu\text{g/L}^*\text{h}$, respectivamente. Por lo tanto, la intensidad baja reportó el menor $Y_{p/x}$ ($29.89 \pm 1.62 \mu\text{g/g}$), mientras que la intensidad media ($5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) mostró una producción y productividad de PSC de $9.732 \pm 1.17 \text{ g/L}$ y $0.162 \pm 0.02 \text{ g/L}$, no obstante, reportó la mayor concentración y productividad de CT ($337.7 \pm 6.12 \mu\text{g/L}$ y $5.629 \pm 0.10 \mu\text{g/L}^*\text{h}$, respectivamente). Conforme lo anterior, la intensidad media mostró un $Y_{p/x}$ 1.2 veces más alto que el reportado por la intensidad baja ($35.01 \pm 3.93 \mu\text{g/g}$). En contraste, conforme a los tratamientos expuestos a la luz, la intensidad luminosa alta ($10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) reportó el mayor $Y_{p/x}$ ($35.48 \pm 5.49 \mu\text{g/g}$), con la producción y productividad de PSC y CT más bajas ($7.376 \pm 0.44 \text{ g/L}$, $0.123 \pm 0.01 \text{ g/L}^*\text{h}$, $261.1 \pm 39.2 \mu\text{g/L}$ y $4.352 \pm 0.65 \mu\text{g/L}^*\text{h}$, respectivamente). Conforme lo anterior, la luz azul a una intensidad luminosa alta obtuvo un $Y_{p/x}$ 1.2 veces mayor que a una intensidad baja.

Cuadro 4. Rendimiento y productividad del PSC y CT de los ensayos sometidos a la luz azul a diferentes intensidades luminosas.

Intensidad luminosa ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	PSC (g/L)	CT ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Productividad de PSC (g/L*h)	Productividad de CT ($\mu\text{g}/\text{L}\cdot\text{h}$)	Yp/x ($\mu\text{g}/\text{g}$)
Control	7.942 \pm 0.93 ^{bc}	326.9 \pm 41.5 ^a	0.132 \pm 0.02 ^{bc}	5.448 \pm 0.69 ^a	41.30 \pm 4.99 ^a
2	11.11 \pm 0.20 ^a	332.0 \pm 11.8 ^a	0.185 \pm 0.00 ^a	5.534 \pm 0.20 ^a	29.89 \pm 1.62 ^b
5	9.733 \pm 1.17 ^{ab}	337.8 \pm 6.12 ^a	0.162 \pm 0.02 ^{ab}	5.629 \pm 0.10 ^a	35.01 \pm 3.93 ^{ab}
10	7.376 \pm 0.44 ^c	261.1 \pm 39.2 ^a	0.123 \pm 0.01 ^c	4.352 \pm 0.65 ^a	35.48 \pm 5.49 ^{ab}

Abreviaturas: PSC, peso seco celular; CT carotenoides totales; Yp/x, rendimiento producto/biomasa. Los valores se expresan como promedio \pm desviación estándar (N = 3); letras diferentes en la misma columna indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) conforme la prueba de Tukey.

Respecto a la correlación entre la exposición a la luz y los parámetros a evaluar, los tratamientos a los cuales se les empleó la luz azul mostraron un comportamiento similar a los tratamientos sometidos a la luz blanca, ya que, como se observó en la Cuadro 4, la exposición a la luz azul reportó una correlación inversamente proporcional entre la intensidad luminosa y la producción y productividad de PSC, mientras que la producción y productividad de CT no reportaron una correlación con la intensidad luminosa (Figura 11A - B). Conforme lo anterior, se reportó una caída del 33.6 % de la concentración y productividad de PSC al subir la intensidad baja a una alta, mientras que se mostró un aumento del 1.7 % de la producción y productividad de CT al pasar de una intensidad luminosa baja a una intensidad media, mientras que hubo una caída del 22.7 % cuando se subió la intensidad a una alta. Sin embargo, lo anterior no tuvo efecto sobre la correlación del Yp/x y la intensidad luminosa, la cual fue directamente proporcional, ya que al pasar de una

intensidad baja a una alta, hubo un incremento del 18.7 % de rendimiento (Figura 11C).

La intensidad luminosa baja y media mostraron una concentración y productividad de PSC más altas que el control, siendo 1.4 y 1.2 veces más altas, respectivamente, que el valor reportado por el control (Cuadro 4, Figura 11). Mientras que el control mostró valores 1.1 veces más altos que el reportado por la intensidad luminosa alta. En contraste con la luz blanca y verde, los tratamientos sometidos a la luz azul reportaron una mayor concentración y productividad de CT a una intensidad luminosa baja y media en comparación con el control. Dichas intensidades mostraron valores 1.6 % y 3.3 % más altos, respectivamente, que los reportados por los tratamientos sin una exposición a la luz. Por otro lado, el control reportó una producción y productividad 1.3 veces más altas que las reportadas por la intensidad luminosa alta. En comparación con los tratamientos sometidos a la luz blanca y verde, el control reportó un Yp/x 1.2 veces más alto que el mayor valor reportado por los tratamientos expuestos a la luz azul. Conforme lo anterior, el control mostró una producción y productividad de PSC estadísticamente diferentes a las de la intensidad luminosa baja, mientras que esta última reportó valores estadísticamente diferentes a los de la intensidad luminosa alta, sin embargo, la intensidad luminosa baja mostró una producción y productividad estadísticamente similares a los reportados por la intensidad luminosa media y esta, a su vez, reportó valores estadísticamente similares a los del control, mientras que el control también mostró una producción y productividad estadísticamente similares a las de la intensidad luminosa alta.

Tal como los tratamientos expuestos a la luz verde, los tratamientos sometidos a luz azul no reportaron diferencias significativas entre la producción y productividad de CT (Cuadro 3 - 4, Figura 11). Sin embargo, el control mostró un Yp/x estadísticamente similar al de la intensidad luminosa media y alta, las cuales, de igual forma, reportaron valores de Yp/x estadísticamente similares al obtenido a una intensidad luminosa baja. En contraste con los tratamientos expuestos a la luz blanca y de igual forma que los tratamientos en los que se empleó la luz verde, una

exposición a la luz azul mostró un mayor efecto sobre la producción y productividad de PSC que sobre las de CT (Cuadro 2). Sin embargo, la luz verde mostró tener un mayor efecto sobre el $Y_{p/x}$ que la luz azul.

Los resultados obtenidos con el empleo de la luz roja se presentaron en el Cuadro 5. La intensidad luminosa media ($4 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) reportó la mayor producción y productividad de PSC ($9.074 \pm 0.63 \text{ g/L}$, $0.151 \pm 0.01 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente), así como la concentración y productividad de CT más altas entre los tratamientos expuestos a la luz ($291.3 \pm 28.5 \mu\text{g/L}$ y $4.856 \pm 0.48 \mu\text{g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente). Sin embargo, a pesar de haber obtenido la mayor producción y productividad de PSC, la intensidad media mostró el mayor $Y_{p/x}$ entre los tratamientos expuestos a la luz ($32.07 \pm 1.24 \mu\text{g/g}$). Dicho rendimiento fue 1.1 veces mayor que el rendimiento más bajo reportado, el cual se obtuvo a una intensidad luminosa baja ($2 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) ($30.06 \pm 1.08 \mu\text{g/g}$). Además, dicha intensidad reportó una producción y productividad de PSC de $8.045 \pm 0.35 \text{ g/L}$ y $0.137 \pm 0.01 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente, así como una concentración y productividad de CT de $247.7 \pm 2.21 \mu\text{g/L}$ y $4.129 \pm 0.04 \mu\text{g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente. La producción y productividad de PSC y CT mencionados anteriormente se mostraron por encima de los obtenidos a una intensidad luminosa alta ($6 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) ($7.859 \pm 0.14 \text{ g/L}$, $0.131 \pm 0.00 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, $244.6 \pm 33.6 \mu\text{g/L}$ y $4.077 \pm 0.56 \mu\text{g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente). Conforme lo anterior, la intensidad alta reportó un rendimiento de $31.17 \pm 4.80 \mu\text{g/g}$.

Cuadro 5. Rendimiento y productividad del PSC y CT de los ensayos sometidos a la luz roja a diferentes intensidades luminosas.

Intensidad luminosa ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	PSC (g/L)	CT ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Productividad de PSC (g/L*h)	Productividad de CT ($\mu\text{g}/\text{L}\cdot\text{h}$)	Yp/x ($\mu\text{g}/\text{g}$)
Control	7.942 \pm 0.93 ^a	326.9 \pm 41.5 ^a	0.132 \pm 0.02 ^a	5.448 \pm 0.69 ^a	41.30 \pm 4.99 ^a
2	8.045 \pm 0.35 ^a	247.7 \pm 2.21 ^{ab}	0.134 \pm 0.01 ^a	4.129 \pm 0.04 ^{ab}	30.82 \pm 1.14 ^b
4	9.074 \pm 0.63 ^a	291.3 \pm 28.5 ^{ab}	0.151 \pm 0.01 ^a	4.856 \pm 0.48 ^{ab}	32.07 \pm 1.24 ^{ab}
6	7.859 \pm 0.14 ^a	244.6 \pm 33.7 ^b	0.131 \pm 0.00 ^a	4.077 \pm 0.56 ^b	31.18 \pm 4.80 ^b

Abreviaturas: PSC, peso seco celular; CT carotenoides totales; Yp/x, rendimiento producto/biomasa. Los valores se expresan como promedio \pm desviación estándar (N = 3); letras diferentes en la misma columna indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) conforme la prueba de Tukey.

Como se observó en el Cuadro 5, a diferencia de los tratamientos expuestos a la luz blanca, verde y azul, los tratamientos a los cuales se les aplicó luz roja no reportaron una correlación directa o inversamente proporcional respecto a la producción o productividad del PSC y CT, así mismo, tampoco se demostró una correlación entre la intensidad luminosa y el Yp/x (Cuadro 2 - 4, Figura 11). Por un lado, el comportamiento mostrado en la producción y productividad del PSC bajo una exposición a la luz roja fue similar al obtenido con la exposición a la luz verde, ya que se reportó un aumento del 12.8 % de los valores al pasar de la aplicación de una intensidad luminosa baja a una media, mientras que, al subir a una intensidad alta, hubo una caída del 13.4 % de los valores, siendo estos últimos la concentración y productividad de PSC más bajos reportados por la exposición a la luz roja. En contraste, el comportamiento de la producción y productividad de CT de los tratamientos expuestos a la luz roja fue similar al reportado con la aplicación de la luz azul, ya que, al pasar de una intensidad baja a una media, se mostró un aumento

del 17.6 % de la producción y productividad, mientras que hubo una caída del 16 % de los valores cuando la exposición se subió a una intensidad alta, siendo estos últimos la producción y productividad de CT más bajas reportadas por la exposición a la luz azul. En contraste, el Yp/x reportó un aumento del 4.1 % al pasar de una intensidad luminosa baja a una media y, por otro lado, al subir a una intensidad alta el rendimiento mostró una caída del 2.8, aunque este se mantuvo por encima del valor reportado por la exposición a la intensidad baja.

Los tratamientos expuestos a la luz roja a una intensidad luminosa baja y media, de forma similar que los tratamientos sometidos a la luz blanca, verde y azul, reportaron una concentración y productividad de PSC 1.3 % y 14.3 % mayores, que los valores mostrado por el control, a excepción de los tratamientos en los que se empleó una intensidad alta, los cuales mostraron una producción y productividad por debajo de las del control, el cual fue 1.1 % más alto (Cuadro 2 - 5, Figura 11). Conforme lo anterior, la exposición a una intensidad luminosa media reportó un mayor efecto sobre la producción y productividad de PSC.

De igual forma que los tratamientos en los que se empleó la luz blanca y verde, los tratamientos sometidos a la luz roja, así como a una intensidad luminosa baja, media y alta, reportaron una concentración y productividad de CT más bajas que las del control, siendo estas últimas 1.1 veces mayores que los valores más altos mostrados bajo la exposición a la luz roja (Cuadro 2, 3 y 5, Figura 11). Aunado a lo anterior, el control reportó un Yp/x más alto en comparación con los tratamientos expuestos a la luz, siendo dicho valor 1.3 veces mayor que el valor más alto mostrado por los tratamientos en los que se empleó luz. Dicho comportamiento también se mostró con el empleo de la luz azul.

En contraste con la concentración y productividad del PSC reportadas por los tratamientos expuestos a la luz blanca, verde y azul, la exposición a la luz roja no mostró diferencias significativas entre los tratamientos sometidos a la luz y el control (Cuadro 2 - 5, Figura 11). Aunado a lo anterior, y en comparación con lo reportado

por el empleo de la luz verde y azul, los tratamientos sometidos a la luz roja a una intensidad luminosa alta mostraron diferencias significativas con el control respecto a la producción y productividad de los CT, mientras que, de igual forma que los tratamientos sometidos a la luz blanca, todos los tratamientos expuestos a la luz roja reportaron valores estadísticamente similares. Por consiguiente, el control reportó un Yp/x estadísticamente similar al de la intensidad luminosa media y, por otro lado, con un comportamiento similar a los tratamientos en los que se aplicó la luz azul, no se reportaron diferencias significativas entre los rendimientos de los tratamientos expuestos a la luz roja. Al contrario que lo reportado por el empleo de la luz azul y verde, y con un comportamiento similar a los tratamientos expuestos a la luz blanca, el empleo de la luz roja mostró un mayor efecto sobre la producción y productividad de CT que sobre las de PSC. Sin embargo, entre todos los tipos de colores de luces, la luz verde mostró tener el mayor efecto sobre el Yp/x .

Se observó una interacción entre la producción y productividad de PSC reportadas por los tratamientos expuestos a la luz blanca, roja y verde, mientras que esta última, a su vez, mostró interacción con los tratamientos que fueron expuestos a la luz azul (Figura 11). De igual manera, la producción y productividad de CT reportaron una interacción entre los tratamientos que fueron expuestos a la luz verde y luz azul y, por otro lado, los que fueron expuestos a la luz blanca y roja mostraron una interacción de valores. En contraste, todos los tratamientos expuestos a la luz reportaron una interacción de Yp/x . Por otro lado, una exposición a la luz blanca, verde y azul, mostró que los tratamientos que reportaron la mayor producción y productividad de PSC, a su vez obtuvieron el Yp/x más bajo, mientras que el rendimiento más alto se obtuvo en los tratamientos que reportaron la menor concentración y productividad. Conforme lo anterior, se dedujo que la producción y productividad de PSC influyó más sobre el Yp/x que la producción y productividad de CT. Sin embargo, la exposición a la luz roja no mostró dicho comportamiento, ya que los tratamientos que obtuvieron la concentración y productividad de CT más altas, a su vez reportaron el mayor rendimiento, a pesar de haber mostrado la producción y productividad de PSC más altas. Por otro lado, la exposición a la luz verde a una

intensidad luminosa alta no reportó la producción y productividad de PSC más bajas entre los tratamientos expuestos a diferentes colores de luz, sin embargo, reportó el Y_p/x más alto.

En esta investigación, la cepa de *R. mucilaginosa* no mostró una correlación directamente proporcional entre la intensidad luminosa y la producción de CT en todos los tratamientos expuestos a los diferentes colores de luz (Cuadro 2 - 5, Figura 11A - B). Por un lado, la exposición a la luz blanca mostró una inhibición del crecimiento al subir la intensidad baja a media, la cual se relacionó con una baja protección al estrés oxidativo mediada por los CT, sin embargo, al subir a una intensidad alta, a pesar de mostrar una mayor inhibición del crecimiento celular, la exposición a la luz mostró una producción de CT sobre regulada. Los tratamientos expuestos a la luz azul también mostraron una inhibición del crecimiento celular al pasar de una intensidad baja a una media, sin embargo, la exposición a la luz mostró una sobrerregulación de CT, mientras que al subir a una intensidad alta se observó un aumento de inhibición del crecimiento celular, la cuál se vinculó con una menor protección celular al daño oxidativo mediada por los CT. La luz roja, en contraste, no mostró una inhibición del crecimiento celular al pasar de una intensidad baja a una media, relacionándose con una mayor protección brindada por los CT, sin embargo, al subir a una intensidad alta se mostró una inhibición del crecimiento celular, la cuál se vinculó con una menor protección contra el daño oxidativo. La luz verde tampoco mostró una inhibición del crecimiento celular al pasar de una intensidad baja a una media, lo cual se relacionó con el aumento de la producción de CT, mientras que al subir a una intensidad alta se reportó una inhibición del crecimiento celular, sin embargo, se mostró una sobrerregulación de CT. Conforme lo anterior, se determinó que la luz roja fue el único color de luz capaz de mostrar una correlación directamente proporcional entre el crecimiento celular y la formación de CT, lo cual se relacionó con una gran protección contra el daño oxidativo generado por el color de luz rojo. En contraste, se estableció que la luz blanca a una intensidad alta es la luz que más inhibió el crecimiento celular, lo cual se relacionó con una protección baja contra el estrés oxidativo. Mientras que la luz verde mostró generar la mayor estimulación de

la ruta de carotenoides, ya que fue el único color de luz que reportó una correlación directamente proporcional entre la intensidad luminosa y la producción y productividad de CT.

6. DISCUSIÓN

En esta investigación se reportó el comportamiento de *R. mucilaginosa* con la relación C/N como variable (Cuadro 1, Figura 10). Conforme lo anterior, se observó una producción y productividad de PSC 1.8 veces más altas a una relación C/N de 58 que a una relación C/N de 23, mientras que disminuyó cuando la relación C/N era mayor a 58. En contraste, Tkáčová y col. (2017) reportaron que la mejor relación C/N para la producción de PSC de *R. glutinis* es la de 70, con glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, además, reportaron que el PSC tiende a duplicarse cuando se cambia de la relación C/N de 20 a la de 50 en el medio de cultivo. Sin embargo, también demostraron que a una relación C/N de 100 hay un decaimiento del rendimiento celular.

En base al Cuadro 1 y a la Figura 10 se destacó que la relación C/N tendió a tener un mayor efecto sobre la producción de CT en comparación con la del PSC. Además, se observó un aumento de producción y productividad de CT a relaciones C/N mayores a 23, sobretodo, cuando la relación C/N era de 58 o 105, las cuales reportaron una producción y productividad 2.0 y 2.1 veces más altas, respectivamente, que la de la relación C/N de 23. Como plantea Libkind y col. (2004), una baja relación C/N puede potenciar el crecimiento celular, sin embargo, concluyeron que el género *Rhodotorula* no muestra un patrón común entre el crecimiento celular y la producción de carotenoides en respuesta a diferentes relaciones C/N. Además, resultados obtenidos por Braunwald y col. (2013) contradicen la correlación positiva entre la producción de biomasa y carotenoides, aunque, por otro lado, demostraron que el aumento de la relación C/N basada en glucosa y sulfato de amonio afecta positivamente la síntesis de carotenoides en *R. glutinis*. Cuando la relación C/N es alta, se favorece la acumulación de carotenoides dentro de las levaduras, esto debido al estrés ocasionado por la limitación de un nutriente, en este caso de nitrógeno (da Silva y col., 2020). En la investigación de Dias-Rodrigues y col. (2019) se reportó que un aumento en la relación C/N tiene una influencia positiva en la producción de biomasa y carotenoides. Sin embargo, Tkáčová y col. (2017) demostraron que las relaciones C/N mayores a 50 favorecen

la acumulación de lípidos en las células, provocando un decaimiento gradual en la síntesis de carotenoides debido a la competencia por el acetil-CoA, el cual es precursor tanto de la ruta de lípidos como de carotenoides. Lo anterior se explica con el sustento de que los medios con relaciones C/N altas tienen suficiente fuente de carbono para ser utilizado para la acumulación de lípidos durante el crecimiento celular (Jiru y col., 2017). Además, Tkáčová y col. (2017) también demostraron que a bajas relaciones C/N es más rápido que la glucosa se consuma por completo, lo cual a su vez favorece la acumulación de carotenoides. Lo anterior explica el decaimiento de síntesis de carotenoides al pasar de una relación C/N de 58 a una de 82, así mismo, a una relación C/N de 105 se relacionó el aumento de producción de dichos metabolitos con un favorecimiento en el crecimiento celular debido a la alta fuente de carbono, lo cual a su vez permitió un aumento de síntesis.

Los resultados reportados mostraron una correlación directamente proporcional entre la relación C/N y el $Y_{p/x}$ (Cuadro 1, Figura 10). En contraste, en otro estudio se demostró que el aumento de una relación C/N de 5 a una de 20 llevó a un incremento en el rendimiento de los carotenoides totales respecto a la biomasa en *R. mucilaginosa*, mientras que el medio con una relación C/N de 100 mostró una disminución en el rendimiento comparado con la relación C/N de 20 (Libkind y col., 2004). Sin embargo, en este estudio no se reportó dicho decaimiento, por lo que se determinó que el comportamiento del $Y_{p/x}$ de *R. mucilaginosa* depende de la cepa empleada en la investigación.

En esta investigación también se reportó el comportamiento de *R. mucilaginosa* bajo diferentes colores de luz e intensidades luminosas (Cuadro 2 – 5, Figura 11). Conforme lo anterior, los resultados obtenidos fueron consistentes con la investigación realizada por Kong y col. (2019), los cuales concluyeron que, a pesar de que la exposición a la luz blanca es capaz de aumentar el crecimiento de *R. mucilaginosa*, una intensidad luminosa fuerte puede inhibir el crecimiento. Dicho comportamiento también se ha reportado en cepas de *R. glutinis* utilizando luz blanca fluorescente (Sakaki y col., 2001). En contraste, en cepas de *R. glutinis* se ha

demostrado un aumento del crecimiento celular cuando hay una exposición a la luz LED, incluso aumentando la intensidad luminosa; lo cual se relacionó con un consumo más rápido de nutrientes debido a la exposición a la luz (Yen y Zhang, 2011; Zhang y col., 2014).

Por otro lado, todos los tratamientos sometidos a una intensidad alta reportaron la producción y productividad de PSC más bajas, independientemente del color de luz (Cuadro 2 - 5, Figura 11A). Conforme lo anterior, la intensidad luminosa tuvo un mayor efecto sobre la producción de biomasa que el color de luz, reportándose un incremento de hasta el 40 % al aplicar luz. Lo anterior también fue reportado por Yen y Yang (2012), los cuales concluyeron que el empleo de diferentes colores de luz (blanca, verde, azul y roja) no tuvo un efecto significativo en el crecimiento de *R. glutinis*, sin embargo, los tratamientos expuestos a los diferentes colores de luz reportaron una concentración de biomasa hasta un 50 % mayor que el control (sin luz) a las 120 horas. Además, se ha concluido que el empleo de luz durante el cultivo de *R. glutinis* no sólo aumenta los rendimientos de biomasa y carotenoides, sino que también ocasiona una reducción del tiempo de cultivo (Zhang y col., 2014). Aunado a lo anterior, *R. glutinis* ha permitido establecer el aumento de carotenoides como un mecanismo de defensa celular contra el estrés oxidativo inducido por la exposición a la luz, lo cual permitió considerar el empleo de luz como una estrategia efectiva para promover la producción de carotenoides (Gong y col., 2019).

Se ha demostrado que el cultivo bajo condiciones de estrés permite a los microorganismos carotenogénicos acumular grandes concentraciones de carotenoides, sobretodo, se ha determinado que una intensidad de luz alta es el mejor factor de estrés para sobreproducir carotenoides en muchas especies microbianas (Foong y col., 2021). Aunado a lo anterior, diferentes autores han concluido que la exposición a la luz no sólo es capaz de aumentar la producción de lípidos y carotenoides en cepas de *R. mucilaginosa* y *R. glutinis*, sino también el crecimiento celular y la asimilación de glucosa, lo cual se ha relacionado con una activación de las rutas del ciclo de Krebs, la síntesis de lípidos y carotenoides,

traduciéndose en una significativa sobrerregulación de dichas rutas biosintéticas (Gong y col., 2019; Kong y col., 2019). Conforme lo anterior, se ha reportado una correlación directamente proporcional de la intensidad luminosa con la producción y rendimiento de carotenoides en cepas de *R. mucilaginosa* y *R. glutinis*, respecto a estas últimas, el incremento de la concentración fue de hasta 116.7 % en comparación con el control a las 60 horas, mientras que en cepas de *R. mucilaginosa* el incremento del rendimiento fue de hasta 32.9 % en comparación con los ensayos sin luz a las 120 horas (Zhang y col., 2014; Kong y col., 2019). Sin embargo, en la investigación enfocada en *R. mucilaginosa*, mencionada anteriormente, los autores concluyeron que una intensidad de luz fuerte puede reducir la producción de biomasa, así como la asimilación de glucosa. Lo anterior fue consistente con la investigación realizada por Yen y Zhang (2011), en la que se observó que una exposición a la luz blanca mediante 2 lámparas LED tuvo un aumento de β -caroteno del 67 % comparado con los tratamientos sin dicha exposición a las 150 horas, sin embargo, también se demostró que una intensidad luminosa más alta, la cual se logró con el empleo de 3 lámparas LED, reportó un menor rendimiento de β -caroteno. Conforme lo anterior, se concluyó que el empleo de una intensidad luminosa muy alta es capaz de provocar una caída en la producción de carotenoides y biomasa, lo cual se relacionó con el daño ocasionado por el estrés oxidativo. En contraste, se ha demostrado una relación entre la formación de carotenoides, como el β -caroteno, y el aumento del crecimiento celular, la cual se ha vinculado con el incremento de la protección contra el estrés oxidativo mediada por los carotenoides Yen y Yang (2012).

Por lo tanto, se dedujo que el aumento de carotenoides puede suceder en dos situaciones: un incremento en la formación de carotenoides, el cual funciona como un mecanismo de protección celular y, por lo tanto, permite el aumento del crecimiento celular cuando la intensidad luminosa no es tan alta, o una inhibición del crecimiento celular debido a que el metabolismo celular está más enfocado en la formación de carotenoides con el fin de brindar protección contra el daño oxidativo cuando la exposición a la luz es muy alta.

Con el fin de establecer el color de luz capaz de ocasionar la mayor activación de la ruta biosintética de CT mediada por la intensidad luminosa, se determinó el mayor $Y_{p/x}$ obtenido en esta investigación (Cuadro 2 - 5, Figura 11C). Por un lado, la luz blanca y azul fueron las únicas que mostraron una correlación directamente proporcional entre la intensidad y el rendimiento. Lo anterior fue consistente con la investigación realizada por Kong y col. (2019), los cuales también reportaron una correlación directamente proporcional entre la intensidad luminosa emitida por luz blanca y el rendimiento de carotenoides, a pesar de no mostrar una correlación entre la biomasa y los carotenoides. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, la luz verde a una intensidad alta reportó el mayor rendimiento entre todos los tratamientos expuestos a la luz, así como en comparación con el control, obteniéndose por dicha exposición un rendimiento 12.3 % más alto que el mostrado por el control. Se determinó que dicha sobrerregulación se debió a que los nutrientes del metabolismo celular se enfocaron más en la producción de CT que en el crecimiento celular, siendo dicho comportamiento un mecanismo de defensa celular contra el estrés oxidativo. Conforme lo anterior, se ha demostrado que la exposición a la luz tiene una gran influencia en el metabolismo celular, específicamente en la actividad y en los niveles de enzimas biosintéticas cuando se aplica en diferentes intensidades (Liu y col., 2021). En relación con lo anterior, Gong y col. (2019) demostraron que las células de *R. glutinis* respondieron a la exposición a la luz mediante un aceleramiento del plegamiento de proteínas y del transporte de proteínas plegadas correctamente, así como un aumento del degradamiento de proteínas mal plegadas, mientras que la exposición a la luz demostró una inactivación de rutas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno. Por lo tanto, con el fin de expandir el entendimiento del comportamiento de *R. mucilaginoso* bajo una exposición a la luz verde a una intensidad alta, es de especial interés para futuras investigaciones analizar la cepa empleada en esta investigación a nivel metabólico.

7. CONCLUSIONES

La relación C/N de 58 es la más adecuada para la obtención de carotenoides en términos de rendimiento y productividad, reportando valores hasta 13.5 % y 103.4 %, respectivamente, mayores que la relación C/N de 23, además de que la relación C/N de 58 permite el ahorro de materia prima. Por otro lado, el empleo de luz verde a una intensidad alta como factor estimulante resulta prometedor en el aumento de la productividad y rendimiento de carotenoides totales en *R. mucilaginosa*, mostrando un rendimiento 12.3 % mayor a una intensidad alta que el obtenido por los tratamientos sin luz, además de que fue el único color de luz que reportó una correlación directamente proporcional entre la intensidad luminosa y la productividad de CT. No obstante, aún se requiere ampliar el campo de investigación hacia un mayor rango de intensidades luminosas, así como ensayos multi-ómicos que permitan brindar un mayor entendimiento de la activación e inhibición de las principales rutas metabólicas afectadas por el estrés oxidativo generado por la luz verde. Así mismo, se requiere promover la investigación del efecto de la luz verde en los diferentes tipos de carotenoides con el fin de establecer un perfil de los principales colorantes naturales producidos por *R. mucilaginosa* bajo dicho color de luz.

8. REFERENCIAS

- Aksu Z**, Tuğba-Eren A. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochem* **2005**;40:2985-2991.
- Angoa-Pérez M**, Rivas-Arancibia S. Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? *Arch de Neurocienc* **2007**;12:45-54.
- Bonadio M de P**, de Freitas LA, Mutton MJR. Carotenoid production in sugarcane juice and synthetic media supplemented with nutrients by *Rhodotorula rubra* 102. *Braz J Microbiol* **2018**;49:872-878.
- Braunwald T**, Schwemmlin L, Graeff-Hönninger S, French WT, Hernandez R, Holmes WE, Claupein W. Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2013**;97:6581-6588.
- Campos-Vega R**, Oomah B. Chemistry and classification of phytochemicals. En: Tiwari BK, Brunton NP, Brennan C, Ed. *Handbook of plant food phytochemicals: sources, stability and extraction*: John Wiley & Sons, **2013**:7-34.
- Cheng YT**, Yang CF. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *J Taiwan Instit Chem E* **2016**;61:270-275.
- Corradini MG**. Synthetic food colors. En: Melton L, Shahidi F, Varelis P, Ed. *Encyclopedia of food chemistry*: Elsevier, **2018**;vol.1:291-296.
- da Silva J**, Honorato da Silva FL, Santos-Ribeiro JE, Nóbrega de Melo DJ, Santos FA, Lucena de Medeiros L. Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. *Biocatal Agric Biotechnol* **2020**;30:1-25.
- del Campo JA**, García-González M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**;74:1163-1174.
- Dias-Rodrigues TV**, Amore TD, Teixeira EC, Janaina F de MB. Carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* in batch and fed-batch fermentation using agroindustrial byproducts. *Food Technol Biotechnol* **2019**;57:388-398.

- Foong** LC, Loh CWL, Ng HS, Lan, JCW. Recent development in the production strategies of microbial carotenoids. *World J Microbiol Biotechnol* **2021**;37:1-11.
- Garcia-Cortes** A, Garcia-Vásquez JA, Aranguren Y, Ramirez-Castrillon, M. Pigment production improvement in *Rhodotorula mucilaginosa* AJB01 using design of experiments. *Microorganisms* **2021**;9:387.
- Gong** G, Liu L, Zhang X, Tan T. Comparative evaluation of different carbon sources supply on simultaneous production of lipid and carotene of *Rhodotorula glutinis* with irradiation and the assessment of key gene transcription. *Bioresour Technol* **2019**;288:1-10.
- Gong** G., Liu L, Zhang X, Tan T. Multi-omics metabolism analysis on irradiation-induced oxidative stress to *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2019**;103:361–374.
- Hu** Q, Wang Y. Optimization ultrasound assisted extraction of carotenoids from *Rhodopseudomonas faecalis* PSB-B. *OALib J* **2018**;5:1-10.
- Inupakutika** MA, Sengupta S, Devireddy AR, Azad RK, Mittler R. The evolution of reactive oxygen species metabolism. *J Exp Bot* **2016**;67:5933-5943.
- Jiru** TM, Groenewald M, Pohl C, Steyn L, Kiggundu N, Abate D. Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodosporidium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. *3 Biotech* **2017**;7:1-11.
- Kanzy** HM, Nasr NF, El-Shazly HAM, Barakat OS. Optimization of carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* **2015**;4:456-469.
- Kong** W, Yang S, Agboyibor C, Chen D, Zhang A, Niu S. Light irradiation can regulate the growth characteristics and metabolites compositions of *Rhodotorula mucilaginosa*. *J Food Sci Technol* **2019**;56:5509–5517.
- Kot** AM, Błazejak S, Gientka I, Kieliszek M, Bryś J. Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? *Microb Cell Fact* **2018**;17:1-14.
- Lau** WX, Carvajal-Zarrabal O, Nolasco-Hipólito C, Kohei M, Gregory ZAA, Abdullah MO, Toh SC, Lihan S. Production of pigments by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Malays J Microbiol* **2018**;14:344-350.

- Libkind D**, Pérez P, Sommaruga R, Diéguez MDC, Ferraro M, Brizzio S, Zagarese H, Van-Broock M. Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. *Photochem Photobiol Sci* **2004**;3:281-286.
- Liu C**, Hu B, Cheng Y, Guo Y, Yao W, Qian H. Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments. *Bioresour Technol* **2021**;337: 1-13.
- Mannazzu I**, Landolfo S, da Silva TL, Buzzini P. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World J Microbiol Biotechnol* **2015**;31:1665-1673.
- Mata-Gómez LC**, Montañez JC, Méndez-Zavala A, Aguilar, CN. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microb Cell Fact* **2014**;13:1-11.
- Mittler R**. ROS are good. *Trends Plant Sci* **2017**;22:11-19.
- Moliné M**, Libkind D, Van-Broock M. Production of torularhodin, torulene, and β -carotene by *Rhodotorula* yeasts. *Methods Mol Biol* **2012**;898:275-283.
- Padmanabhan S**, Monera-Girona AJ, Pérez-Castaño R, Bastida-Martínez E, Pajares-Martínez E, Bernal-Bernal D, Galbis-Martínez ML, Polanco MC, Iniesta, A.A, Fontes M, Elías-Arnanz, M. Light-Triggered Carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: New Paradigms in Photosensory Signaling, Transduction and Gene Regulation. *Microorganisms* **2021**;9.
- Rana B**, Bhattacharyya M, Patni B, Arya M, Joshi GK. The realm of microbial pigments in the food color market. *Front Sustain Food Syst* **2021**;5:1-14.
- Saenge C**, Cheirsilp B, Suksaroge TT, Bourtoom T. Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production. *Biotechnol Bioprocess Eng* **2011**;16:23-33.
- Sakaki H**, Nakanishi T, Tada T, Miki W, Komemushi S. Activation of Torularhodin Production by *Rhodotorula glutinis* Using Weak White Light Irradiation. In *J Biosci Bioeng* **2001**;92:294-297.

- Sandmann** G. Antioxidant protection from UV-and light-stress related to carotenoid structures. *Antioxidants* **2019**;8:1-13.
- Sharma** R, Ghoshal G. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: a statistical approach. *Biotechnol Rep* **2020**;25:1-11.
- Somashekar** D, Joseph R. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium. *World J Microbiol Biotechnol* **2000**;16:491-493.
- Speers** A, Forbes J. Yeast: an overview. En: Hill AE, Ed. *Brewing microbiology: managing microbes, ensuring quality and valorising waste*: Elsevier, **2015**:3-9.
- Tkáčová** J, Čaplová J, Klemková T, Čertík M. Correlation between lipid and carotenoid synthesis in torularhodin-producing *Rhodotorula glutinis*. *Ann Microbiol* **2017**;67:541-551.
- Vila** E, Hornero-Méndez D, Azziz G, Lareo C, Saravia V. Carotenoids from heterotrophic bacteria isolated from Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Biotechnol Rep* **2019**;21.
- Wang** Q, Liu D, Yang Q, Wang P. Enhancing carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa* KC8 by combining mutation and metabolic engineering. *Ann Microbiol* **2017**;67:425-431.
- Wirth** F, Goldani LZ. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2012**;2012:1-7.
- Yen** HW, Yang YC. The effects of irradiation and microfiltration on the cells growing and total lipids production in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour Technol* **2012**;107:539-541.
- Yen** HW, Zhang Z. Enhancement of cell growth rate by light irradiation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour Technol* **2011**;102:9279-9281.
- Zhang** Z, Zhang X, Tan T. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. *Bioresour Technol* **2014**;157:149-153.
- Zoz** L, Carvalho JC, Soccol VT, Casagrande TC, Cardoso L. Torularhodin and torulene: Bioproduction, properties and prospective applications in food and

cosmetics - a review. Braz Arch Biol Technol **2015**;58:278-288.