



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Producción de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* en un sistema de fermentación electrostática”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

**Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Presenta:**

IAG Sandra Denisse Zavala Aranda

**Dirigido por:**

Dr. Aldo Amaro Reyes

**Co-dirigido por:**

Dr. José Utrilla Carreri

Querétaro, Qro. a enero de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de  
Información



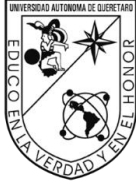
Producción de carotenoides por *Rhodotorula*  
mucilaginosa en un sistema de fermentación  
electrostática

**por**

Sandra Denisse Zavala Aranda

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** FQMAC-300248-0123-123



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Producción de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* en un sistema de fermentación electrostática”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
**Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Presenta:**

IAG Sandra Denisse Zavala Aranda

**Dirigido por:**

Dr. Aldo Amaro Reyes

**Co-dirigido por:**

Dr. José Utrilla Carreri

Dr. Aldo Amaro Reyes  
Director

Dr. José Utrilla Carreri  
Codirector

Dr. Carlos Regalado González  
Sinodal

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez  
Sinodal

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Sinodal

---

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad

---

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Enero 2023

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

---

Sandra Denisse Zavala Aranda

## RESUMEN

Los colorantes en la industria alimentaria se encuentran dentro de los aditivos de mayor interés por su aporte de atractivo visual en los productos. La mayoría de estos son sintéticos pero su ingesta afecta a consumidores con sensibilidad a los químicos, por lo tanto, obtener pigmentos naturales de los metabolitos de vegetales y microorganismos resulta una alternativa de solución a tal problemática. Sin embargo, los retos que se presentan para emplear únicamente colorantes naturales en los alimentos es la escasez de materias primas y la productividad al emplear microorganismos no cubre la demanda de la industria alimentaria. En la presente investigación evaluó el efecto de la relación C/N y aplicación de voltaje continuo e intermitente en un sistema de fermentación electrostática, sobre la generación de biomasa y la síntesis de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa*. La producción de biomasa se cuantificó mediante gravimetría, así como la síntesis de carotenoides por espectrofotometría para las diferentes relaciones C/N (20-90). Se demostró que la relación C/N 50 fue el tratamiento con mayor productividad de carotenoides respecto a la biomasa logrando  $20.97 \pm 1.7 \mu\text{g g}^{-1}$ . Se empleó un sistema de fermentación electrostática conformada por cátodo de acero inoxidable y ánodo de alambre de cobre aislado para aplicación de voltaje (0-30 V) de manera continua e intermitente durante el proceso fermentativo de *Rhodotorula mucilaginosa*. Se observó que la aplicación de voltaje a 10 V de forma continua favoreció la síntesis de carotenoides produciendo  $100.16 \pm 3.6 \mu\text{g L}^{-1}$ , seguida por el tratamiento con aplicación intermitente de 10 V que resultó con una concentración de  $85.45 \pm 5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ , ambos en comparación con el control con  $39.02 \pm 17.3 \mu\text{g L}^{-1}$ . Adicionalmente, se determinó la capacidad de regeneración de NADH y NADPH, mediante la reducción de resazurina. Donde, las unidades relativas de fluorescencia resultaron 1.35 veces mayor con la aplicación de 10 V de forma continua en comparación con el control. La relación C/N 50 y la aplicación continua de voltaje en el sistema de fermentación electrostática estimulan el crecimiento de *R. mucilaginosa* y la producción de carotenoides al modular la regeneración de NADH y NADPH.

**Palabras clave:** Colorantes alimentarios, relación C/N, fermentación electrostática, *Rhodotorula mucilaginosa*, carotenoides, NADH y NADPH.

## ABSTRACT

Colorants in the food industry are among the additives of greatest interest for their contribution to the visual attractiveness of products. Most of these are synthetic but their intake affects consumers with sensitivity to chemicals hence, obtaining natural pigments from plant metabolites and microorganisms is an alternative solution to this problem. However, the challenges to use natural colorants in food are the scarcity of raw materials and the productivity of using microorganisms does not meet the demand of the food industry. The present investigation evaluated the effect of C/N ratio and application of continuous and intermittent voltage in an electrostatic fermentation system on biomass generation and carotenoid synthesis by *Rhodotorula mucilaginosa*. Biomass production and carotenoid synthesis were analyzed by gravimetry and by spectrophotometry respectively for different C/N ratios (20-90). It was demonstrated that the C/N ratio 50 was the treatment with the highest carotenoid productivity with respect to biomass achieving  $20.97 \pm 1.7 \mu\text{g g}^{-1}$ . An electrostatic fermentation system consisting of a stainless steel cathode and an insulated copper wire anode was used to apply voltage (0-30 V) continuously and intermittently during the fermentation process of *Rhodotorula mucilaginosa*. It was observed that the continuous 10 V voltage application favored the synthesis of carotenoids producing  $100.16 \pm 3.6 \mu\text{g L}^{-1}$ , followed by the treatment with intermittent application of 10 V which resulted in a concentration of  $85.45 \pm 5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ , both compared to the control with  $39.02 \pm 17.3 \mu\text{g L}^{-1}$ . Additionally, the regeneration capacity of NADH and NADPH was determined by resazurin reduction. Where, the relative fluorescence units resulted 1.35 times higher with the application of 10 V continuously compared to the control. The C/N 50 ratio and continuous voltage application in the electrostatic fermentation system stimulate *R. mucilaginosa* growth and carotenoid production by modulating NADH and NADPH regeneration.

**Key words:** Food colorants, C/N ratio, electrostatic fermentation, *Rhodotorula mucilaginosa*, carotenoids, NADH and NADPH.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Sandra Aranda y Erick Zavala, por su amor y apoyo incondicional. Gracias por ser y estar, mis logros siempre serán suyos y mi objetivo será mantenerlos orgullosos de su obra.

A mis hermanos, Alexia y Erick, la luz de mi vida, mi motivación para continuar y darles buen ejemplo. Son mis mejores maestros, espero algún día ser como ustedes y seguiré esforzándome para que encuentren en mí un apoyo.

A mis abuelos, Carlos (tata) que con pocas palabras siempre me demuestras tu cariño, Gloria (tita), que estabas tan orgullosa de mi posgrado y sé que desde el otro plano me apapachas para concluirlo. A María (mamá Mary), conservo tus consejos presentes y también sé que estarás feliz desde donde estés.

A mis amigos, Pepe, Odette, Paola, Diana, Dany, Dana, Cindy y Alex, por hacer ameno el proceso y motivarme a continuar cuando creía que no podía más.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro, por impulsar el desarrollo del conocimiento, brindando apoyo con infraestructura y vinculación. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por brindarme el financiamiento durante el posgrado.

Especial agradecimiento a mi comité de sinodales, Dr. José Utrilla Carreri, Dr. Carlos Regalado González, Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez y Dra. Silvia Lorena Amaya Llano, quienes mostraron entusiasmo por compartir sus conocimientos en todo momento y me brindaron apoyo siempre que lo necesité. Principalmente a mi director de tesis, Dr. Aldo Amaro Reyes, quien confió en mi trabajo desde el inicio y fue paciente durante el proceso, aportando las herramientas que necesité para esta investigación. Y también de gran importancia, agradezco el apoyo de mi tutora la Dra. Montserrat Hernández Iturriaga, quien me motivó con sus consejos.



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Colorantes alimenticios	3
2.1.1 Uso de colorantes en alimentos	4
2.2 Carotenoides	6
2.2.1 Biosíntesis carotenoides	8
2.2.2 Levaduras carotenogénicas	11
2.2.4 Estabilidad de los carotenoides producidos por microorganismos	15
2.3 Fermentación por levaduras	16
2.3.2 Efecto de la relación C/N sobre el metabolismo de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	17
2.4 Sistemas bioelectroquímicos para fermentación	18
2.4.1 Fermentación electrostática	19
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos específicos	23
5. METODOLOGÍA	23
5.1 Material biológico	23
5.2 Pre-inóculo	23
5.3 Medio de fermentación	24
5.4 Sistema de fermentación electrostática	24
5.5 Métodos analíticos	25
5.5.1 Determinación de biomasa	25
5.5.2 Determinación de carotenoides	25
5.5.3 Cuantificación de consumo de azúcares reductores	26
5.5.4 Determinación de la regeneración de NADH y NADPH	26
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	27
6.1 Tratamientos	27
6.1.1 Primera etapa	27

6.1.2 Segunda etapa	27
6.2 Análisis estadístico	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1 Evaluación de biomasa y carotenoides a diferentes relaciones C/N	28
7.2 Fermentación electrostática continua	30
7.3 Fermentación electrostática intermitente	31
7.4 Comparación entre aplicación de voltaje continua e intermitente	32
7.5 Capacidad de regeneración de NADH y NADPH	37
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	39
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
10. ANEXOS	47
10.1 Anexo 1: Evaluación de curva de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio YPS a 24 h	47
10.2 Anexo 2: Evaluación de curva de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio de fermentación relación C/N 50 a 24 h	48

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b> Colorantes sintéticos empleados en alimentos y sus equivalentes en colorantes naturales (Aberoumand, 2011; Coultate y Blackburn, 2018) .....	4
<b>Cuadro 2</b> Relación C/N para producción de biomasa y carotenoides por <i>Rhodotorula glutinis</i> y <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	17
<b>Cuadro 3</b> Ejemplos de aplicación de fermentación electrostática en levaduras....	21
<b>Cuadro 4</b> Producción de biomasa y carotenoides por <i>R. mucilaginosa</i> a diferentes relaciones C/N .....	28
<b>Cuadro 5</b> Cuantificación de azúcares reductores en el medio de fermentación ...	29
<b>Cuadro 6</b> Producción de biomasa y carotenoides por <i>R. mucilaginosa</i> a diferentes voltajes en sistema de fermentación electrostática .....	30
<b>Cuadro 7</b> Producción de biomasa y carotenoides por <i>R. mucilaginosa</i> a 10 V con intervalos de intermitencia, encendiendo (c) y apagando (s), en sistema de fermentación electrostática .....	31
<b>Cuadro 8</b> Comparación de velocidad máxima de crecimiento ( $V_{max}$ ) y tiempo de duplicación ( $T_d$ ) entre tratamientos con aplicación de voltaje continuo (10 V C) e intermitente (10 V I) en comparación con el control (0 V) .....	33
<b>Cuadro 9</b> Comparación de producción de biomasa y consumo de glucosa del medio de fermentación por <i>R. mucilaginosa</i> sin aplicación de voltaje (0 V) y con aplicación de voltaje de forma continua (10 V C) en sistema de fermentación electrostática.	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Ejemplo de las estructuras químicas del caroteno ( $\beta$ -caroteno) y la xantofila (Zeaxantina) (Elaboración propia).....	7
<b>Figura 2</b> Rutas metabólicas para la biosíntesis de carotenoides (adaptado de Foong et al., 2021).....	9
<b>Figura 3</b> Formación de análogos de tetraterpenos (adaptado de Dewick, 2009) ..	11
<b>Figura 4</b> Principales carotenoides sintetizados por las levaduras carotenogénicas (Elaboración propia).....	12
<b>Figura 5</b> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> de la colección de cepas de la planta piloto de Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (Elaboración propia).....	13
<b>Figura 6</b> Sistema de fermentación electrostática en incubadora. 1) Fuente de poder, 2) Biorreactores, 3) Placa de agitación (Elaboración propia).....	25
<b>Figura 7</b> Producción de biomasa de <i>R. mucilaginosa</i> , comparación de aplicación de voltaje continuo (C) e intermitente (I) en el sistema de fermentación electrostática.....	33
<b>Figura 8</b> Producción de carotenoides por <i>R. mucilaginosa</i> , comparación de aplicación de voltaje continuo (C) e intermitente (I) en el sistema de fermentación electrostática.....	34
<b>Figura 9</b> Producción de biomasa vs. consumo de glucosa en el medio de fermentación por <i>R. mucilaginosa</i> durante 240 h sin aplicación de voltaje (0 V) y con aplicación de voltaje (10 V).....	36
<b>Figura 10</b> Cinética de unidades relativas de fluorescencia (URF) en la reducción de resazurina por NADH y NADPH de <i>R. mucilaginosa</i> en un sistema de fermentación electrostática a 0 h, 12 h y 72 h.....	38
<b>Figura 11</b> Regresión logarítmica de unidades relativas de fluorescencia (URF) en la reducción de resazurina por NADH y NADPH de <i>R. mucilaginosa</i> en un sistema de fermentación electrostática a 12 h y 72 h.....	38
<b>Figura 12</b> Curva de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio YPS a 24 h.....	48
<b>Figura 13</b> Curva de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio de fermentación relación C/N 50 durante 24 h.....	50
<b>Figura 14</b> Producción de biomasa por <i>R. mucilaginosa</i> en medio de fermentación relación C/N 50 durante 24 h.....	50
<b>Figura 15</b> Relación de absorbancia (Abs) y producción de biomasa (PSC) por <i>R. mucilaginosa</i> en medio de fermentación relación C/N 50 a 24 h.....	51

## **1. INTRODUCCIÓN**

El color es uno de los principales atributos de los alimentos que se asocia con frescura, calidad y tiempo de vida útil. Durante generaciones hemos recibido instrucciones y adquirido experiencia respecto al color correspondiente para cada producto alimenticio. Por lo tanto, buscamos que se conserven los colores característicos a pesar de ser sometidos a procesos que degradan tales pigmentos. Una de las alternativas frecuentemente empleadas para estandarizar el color en los alimentos procesados es la adición de colorantes similares a los originales de ese mismo alimento. Del mismo modo, existe una tendencia por cambiar el color de los alimentos con el objetivo de llamar la atención de los consumidores y para ello se emplean colores brillantes e incluso algunos poco convencionales en alimentos como neón, plateado y dorado.

De manera general, los colorantes se pueden clasificar en naturales y sintéticos. Los primeros se refieren a extracciones de fuentes vegetales y microorganismos. El segundo caso aplica para los tintes obtenidos mediante síntesis química, principalmente por diazotación de aminas aromáticas, de los cuales se ha demostrado poder carcinogénico, reacciones alérgicas y otras consecuencias adversas a la salud de los consumidores. De acuerdo con lo anterior, el área de oportunidad para la industria es ofrecer una alternativa de sustitución de tales pigmentos y en su lugar se empleen únicamente los de origen natural (Coulter y Blackburn, 2018). Mientras tanto se continuará con el uso de colorantes sintéticos en cantidades permitidas, según lo indicado en los acuerdos correspondientes de cada país para uso de aditivos en alimentos.

El uso de colorantes naturales presenta un reto, ya que la principal fuente de obtención es directamente extraerlos de vegetales, por lo tanto, la cantidad que la industria alimentaria demanda es mayor a la cantidad de materia prima que se dispone para tal fin. La mayoría de los vegetales ricos en pigmentos son consumidos en fresco o como ingrediente en otros productos, la concentración de tintes en sus

células es baja, aunado a las diversas etapas del proceso para su extracción, encarece los colorantes y resulta poco viable a gran escala.

En la mayoría de las investigaciones se enfocan en factores como el tipo de fuente de carbono. Sin embargo, se ha demostrado que la relación carbono/nitrógeno (C/N) tiene efecto sobre las mismas variables respuesta en otras variedades de *Rhodotorula*. Por lo tanto, este trabajo evaluó el efecto de la relación C/N, así como la aplicación de un sistema de fermentación electrostática sobre la productividad de carotenoides respecto a la producción de biomasa. Buscando brindar una nueva alternativa de producción de colorantes de origen natural, que aporten beneficios a la salud de los consumidores.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Colorantes alimenticios**

Constantemente nos encontramos en contacto con colores en la naturaleza que atraen la atención del ojo humano. Principalmente se perciben los colores verde, naranja, morado y rojo, correspondientes a la clorofila, carotenoides, antocianinas y antraquinonas, respectivamente. Con el afán de asimilar las tonalidades que aporten atractivo visual a los alimentos, la industria se ha dedicado a adicionar pigmentos a la mayoría de los productos (Coultate y Blackburn, 2018). No obstante, la escasez de materias primas para la extracción de colorantes naturales y alta demanda de los pigmentos en la industria los ha orillado a emplear colorantes sintéticos.

Desde la antigüedad se emplean aditivos en los alimentos, por ejemplo, especias y sazónadores que mejoran el sabor en los mismos. En ese entonces se realizaba una inspección organoléptica para determinar si el alimento sufría modificaciones, tomando como referencia únicamente la experiencia del degustador debido a la ausencia de tecnología que permitiera identificar y cuantificar contaminantes específicos (Accum, 1820). Sin embargo, la falta de pruebas analíticas no garantizaba alimentos seguros, lo que desencadenó daños a salud de los consumidores.

En algunos de los aditivos alimentarios se ha comprobado poder carcinogénico, así como reacciones alérgicas, incluso se asociaron con mayores incidencias de hiperactividad (Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad, TDAH) en niños. Tal es el caso de los tintes azoicos empleados en conservas, bebidas alcohólicas, refrescos, productos cárnicos, sopas, algunos medicamentos, entre otros (McCann et al., 2007). La solución que se propone es emplear colorantes de origen natural que aporten las mismas pigmentaciones evitando los riesgos antes mencionados, sin embargo, se enfrentan retos para su producción a gran escala y de este modo cubrir la demanda de las industrias alimenticias (Aberoumand, 2011; Coultate y Blackburn, 2018).

Como se puede observar en el Cuadro 1, se han identificado opciones de biocolorantes para la sustitución de los colorantes sintéticos que generalmente derivan del petróleo, agrupándolos en cinco colores: azul, verde, amarillo, naranja y rojo. Cabe mencionar que en el caso de los colores amarillo, naranja y rojo se encuentran presentes los carotenoides como alternativa de colorantes naturales, lo que pondera su importancia en el área de investigación de aditivos alimentarios.

**Cuadro 1** Colorantes sintéticos empleados en alimentos y sus equivalentes en colorantes naturales (Aberoumand, 2011; Coultate y Blackburn, 2018)

	<b>Colorantes sintéticos</b>	<b>Colorantes naturales</b>
<b>Azul</b>	E131 Azul patente V	E163 Antocianinas
	E132 Indigotina	E165 Azul de gardenia
	E133 Azul brillante FCF	
<b>Verde</b>	E142 Verde S	E140 Clorofilas y clorofilinas
	E143 Verde sólido FCF	
<b>Amarillo</b>	E102 Tartrazina	E100 Curcuminas
	E104 Amarillo de quinoleína	E101 Riboflavinas
	E110 Amarillo ocazo FCF	E160 Carotenoides
<b>Naranja</b>	E111 Naranja GGN	E120 Ácido carmínico
		E160 Carotenoides
<b>Rojo</b>	E122 Azorrubina	E121 Rojo cítrico 2
	E124 Ponceau 4R	E160 Carotenoides
	E127 Eritrosina	E160b Annatto, Bija, Bixina,
	E129 Rojo allura AC	Norbixina
		E161 Xantofilas
	E162 Betanina	

### 2.1.1 Uso de colorantes en alimentos

Los principales motivos por los que se emplean colorantes en los alimentos son; compensar la pérdida de color debido a la exposición a la luz, el aire, la temperatura y otras condiciones de almacenamiento. Además de realzar los colores naturales



para hacer la comida más atractiva, aportar color a productos alimenticios incoloros, permitir a los consumidores identificar los productos visualmente y volverlos más apetecibles (Amchova et al., 2015).

A nivel mundial existe un comité de expertos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO), quienes se encargan de determinar la cantidad de aditivo alimentario, expresado en miligramos por kilogramo de peso corporal, que se puede consumir al día sin que presenten efectos tóxicos. Tales cantidades y detalles han sido plasmados en la norma general para los aditivos alimentarios, CODEX STAN 192-1995 perteneciente al *Codex Alimentarius* o "Código de alimentos" que es una colección de normas, directrices y códigos de prácticas para proteger la salud del consumidor y promover prácticas leales en el comercio de alimentos (FAO-WHO, 2021).

Asimismo, cada país cuenta con su propio organismo regulador el cual se encarga de delimitar los aditivos, en este caso colorantes alimenticios permitidos y la ingesta diaria admisible para cada uno de tal forma que no represente un riesgo para la salud de su población. Los organismos reguladores que se destacan son la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para la Unión Europea y la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) para Estados Unidos de América.

En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) se encarga de regular el uso de los aditivos alimentarios y la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO) verifica que se cumplan las normas, de igual forma, advierte a los consumidores de los productos o marcas que no las cumplen. Este último organismo publicó un comunicado en su página oficial el 11 de octubre de 2020, titulado "Entre más industrializado un producto más químicos contiene" (PROFECO, 2020). El objetivo del comunicado fue informar a la sociedad respecto a los riesgos que representan a la salud el consumo de productos que contienen colorantes artificiales. Lo cual funciona como medio de divulgación de la investigación respecto a este tema para la sociedad en general y crea

tendencia por evitar el consumo de colorantes sintéticos, buscando en su lugar productos que contengan colorantes naturales.

## **2.2 Carotenoides**

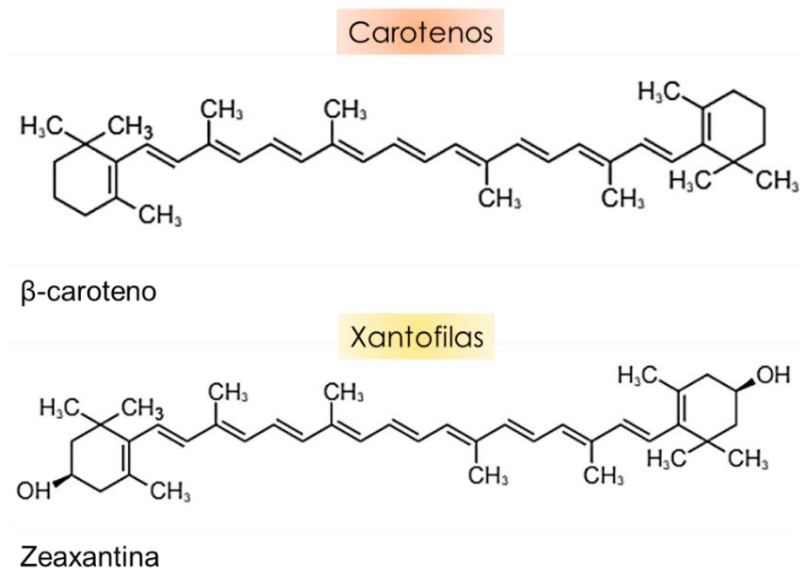
Los carotenoides, también llamados “terpenoides”, son una clase de hidrocarburos formados a partir de la unión de moléculas de isopreno. Su estructura cíclica básica puede modificarse mediante hidrogenación, deshidrogenación, ciclación, migración de dobles enlaces, acortamiento o extensión de la cadena, reordenamiento isomerización y oxidación o combinaciones de estas reacciones que logran cadenas de hasta 50 átomos de carbono (Saini y Keum, 2019).

Son pigmentos orgánicos lipofílicos, precursores de vitamina A, a los cuales se asocian propiedades antioxidantes como que pueden prevenir los daños oxidativos que conducen al desarrollo de las enfermedades cardiovasculares y relacionadas con el envejecimiento. Se ha demostrado que pueden prevenir los daños fotooxidativos en los ojos y la piel al eliminar las especies reactivas del oxígeno para facilitar el mantenimiento del nivel de glutatión (Campos-Vega y Dave Oomah, 2013).

Algunos carotenoides se administran como compuestos bioactivos en formulaciones nutracéuticas en forma de polvo, oleoresina o geles blandos. Se conocen más de 600 carotenoides y por su estructura se clasifican en xantofilas, contienen iones hidroxilo y presentan tonalidades de amarillo a naranja, o carotenos, no contienen iones hidroxilo en su estructura y presentan tonalidades de naranja a rojo, como se muestra en la Figura 1 (Foong et al., 2021).

Los carotenos y xantofilas se encuentran en la naturaleza casi tan abundantes como la clorofila, que aporta el color verde a las plantas, pero a los carotenoides se atribuye la producción de colores amarillo, naranja y algunas tonalidades de rojo. Se encuentran como pigmentos naturales en los vegetales tales como pimientos, zanahorias, flores, así como en hongos, levaduras y microalgas. Además, son precursores de vitamina A y cuentan con propiedades antioxidantes, actividad

potencial de inhibición de tumores, así como protección contra infecciones bacterianas y fúngicas (Garcia-Cortes et al., 2020; Mannazzu et al., 2015).



**Figura 1** Ejemplo de las estructuras químicas del caroteno ( $\beta$ -caroteno) y la xantofila (Zeaxantina) (Elaboración propia)

Actualmente, los carotenoides se encuentran empleados de manera frecuente en productos farmacéuticos y cosméticos (Yolmeh y Khomeiri, 2017), también como aditivo alimentario en la Unión Europea, Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, México, entre otros países y regiones. De acuerdo con las estadísticas reportadas por McWilliams (2018), en 2017 el mercado de carotenoides alcanzó \$1.5 mil millones de dólares a nivel mundial y considerando una tasa de crecimiento anual del 5.7 % se estimó que para el año 2022 se estarían alcanzando los \$2 mil millones de dólares.

El 90 % de los carotenoides que se emplean en las industrias son producidos por síntesis química (Tang et al., 2019), trayendo consigo las desventajas por consumo y producción de estos que se mencionaron anteriormente. Por lo tanto, el reto con que nos encontramos en esta época es el de producir carotenoides naturales de tal forma que se disminuya y paulatinamente se pueda prescindir el uso de los

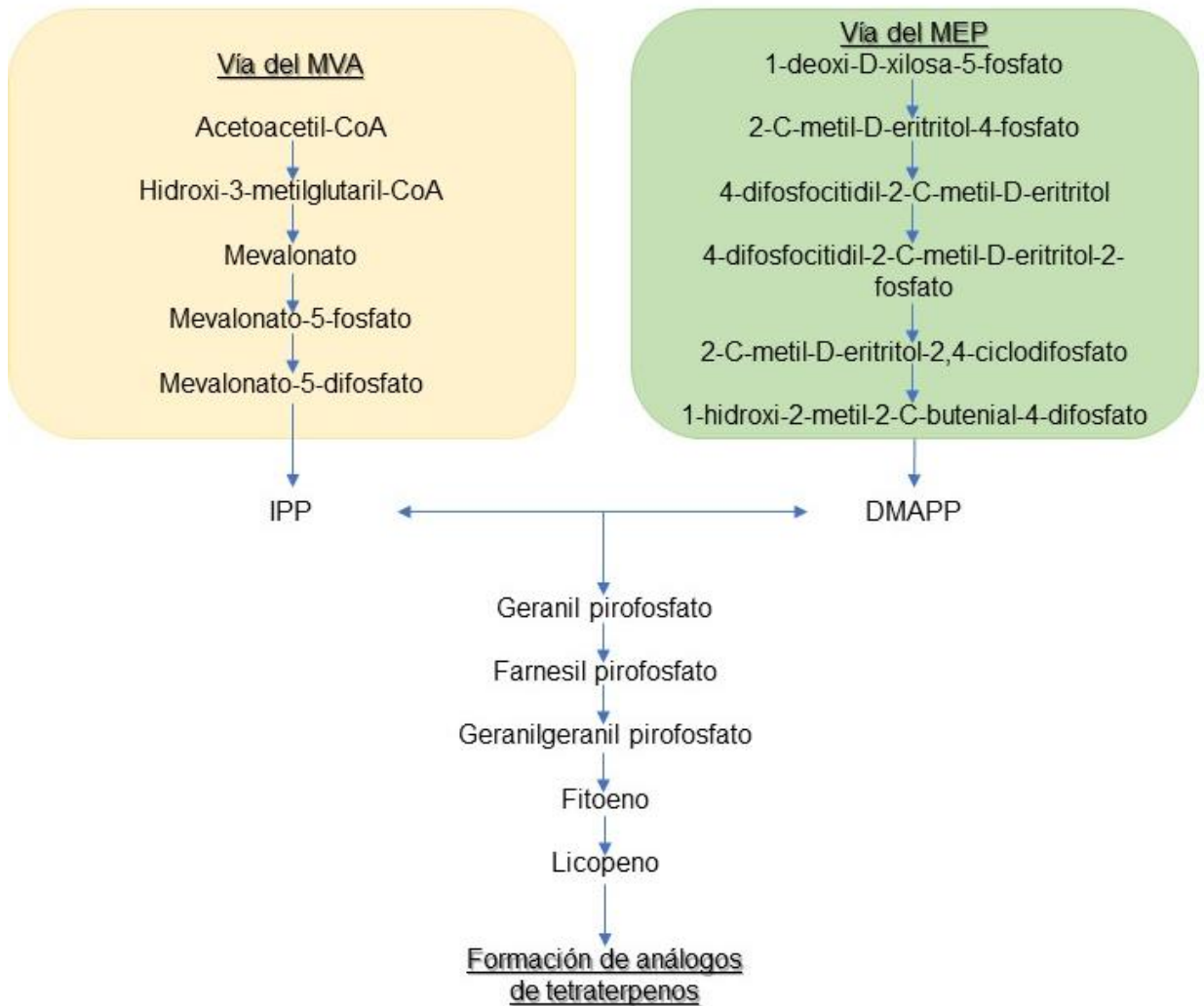
sintetizados químicamente. Los carotenoides naturales se pueden extraer directamente de plantas, vegetales o se pueden producir por microorganismos denominados “carotenogénicos”, de estos últimos podemos encontrar bacterias, hongos y levaduras (Fontana, 2001).

Una investigación realizada por Román-Paez et al., (2017) reporta que se obtienen entre 8.5 a 19.5 mg de carotenoides por cada 100 g de materia prima, cuando estos son extraídos de fuentes vegetales, como plantas, flores, frutos, etc. Por otra parte, Park et al., (2005) mencionan que es posible obtener entre 22 a 46 mg de carotenoides por cada 100 g de materia orgánica, cuando estos son sintetizados por microorganismos carotenogénicos.

### 2.2.1 Biosíntesis carotenoides

De manera general, los organismos carotenogénicos biosintetizan los carotenoides utilizando el precursor isoprenoide isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero alílico pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). El IPP y el DMAPP se derivan del 2-C-metil-eritritol 4-fosfato (MEP), también conocido como 1-deoxiilulosa- 5-fosfato (DXP), como primer intermediario obtenido mediante la vía del metileritritol fosfato o por la vía del mevalonato (MVA). La mayoría de los organismos fotosintéticos, incluidas las microalgas y las plantas, utilizan predominantemente la vía del MVA, mientras que las bacterias y los hongos obtienen el IPP y el DMAPP principalmente a través de la vía del MEP, como se aprecia en la Figura 2 (Saini & Keum, 2019).

Los organismos fotosintéticos, incluidas las microalgas utilizan la vía del MVA, mientras que la vía del MEP es predominante en la mayoría de las bacterias y los hongos. Tres moléculas de IPP y una de moléculas de DMAPP se condensan para producir un precursor inmediato de la biosíntesis de carotenoides, un geranylgeranyl difosfato (GGPP) seguida de la producción de licopeno, que es un intermediario común para la biosíntesis de casi todos los carotenoides C40 posteriores (Saini y Keum, 2019).



**Figura 2** Rutas metabólicas para la biosíntesis de carotenoides (adaptado de Foong et al., 2021)

De acuerdo con lo descrito por Ciegler (1965), el proceso de carotenogénesis además se puede dividir en dos etapas:

a) Formación de compuestos iniciales de tetraterpenos

La ruta del MVA comienza por la condensación de acetoacetil-CoA con acetil-CoA provenientes del ciclo del ácido cítrico para formar  $\beta$ -OH- $\beta$ -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) mediados por las enzimas  $\beta$ -oxitilasa y HMG-CoA enzima de condensación. HMG-CoA es reducida en mevalonato por la HMG-CoA reductasa, utilizando 2

moles de nicotidamida adenida dinucleótido fosfato reducida NADPH por cada mol de HMG-CoA reducida.

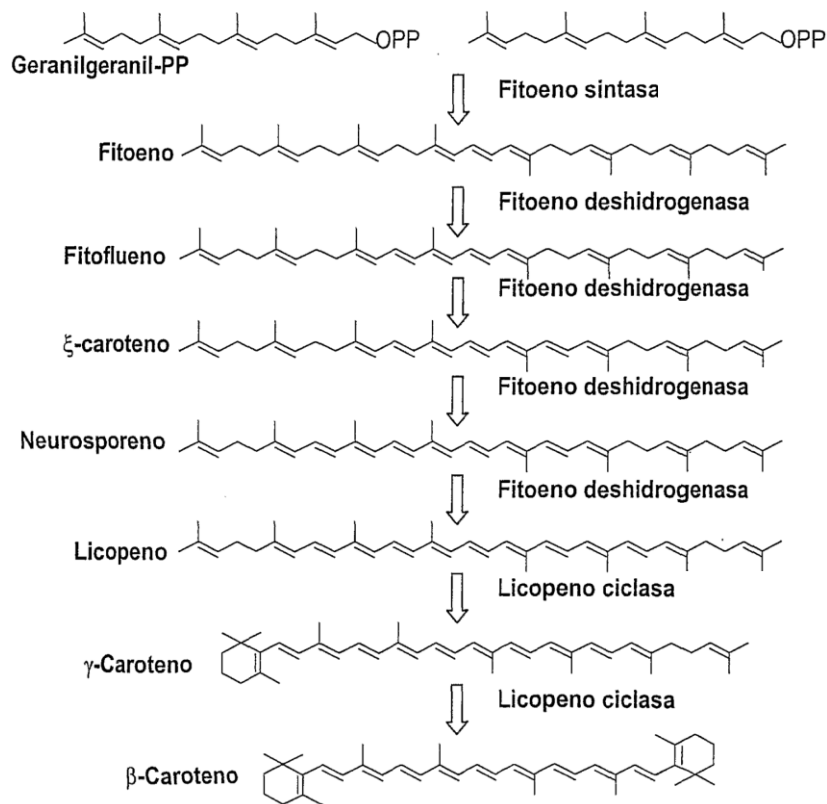
El ácido mevalónico continúa por la MVA, se fosforila en ácido mevalónico 5-fosfato por la mevalonato quinasa y posteriormente a 5,5-difosfomevalonato por la fosfomevalonato quinasa. Después de esta secuencia de reacciones, el mevalonato pirofosfato es descarboxilado por la mevalonato pirofosfato descarboxilasa para formar pirofosfato de isopentenilo (IPP). Este último compuesto en presencia de una isomerasa forma dimetilalil pirofosfato (DMAPP).

Continúa en la vía del farnesil difosfato donde el dimetilalil pirofosfato se condensa con pirofosfato de isopentenilo bajo la mediación de farnesil pirofosfato sintetasa para formar geranil pirofosfato. Una segunda molécula de isopentenil pirofosfato se condensa con geranil pirofosfato bajo la influencia de la misma enzima para formar farnesil pirofosfato.

El farnesil pirofosfato puede sufrir una dimerización reductora para formar escualeno (McGarvey y Croteau, 1995) que después se puede utilizar para la síntesis de esteroides. También puede condensarse con otra molécula de farnesil pirofosfato por la enzima geranil geranil pirofosfato sintetasa para formar geranil-geranil pirofosfato, un compuesto de C<sub>20</sub>. Por último, dos moléculas de geranil geranil pirofosfato se condensan para formar un tetraterpeno inicial (compuesto de C<sub>40</sub>).

#### b) Formación de análogos de tetraterpenos

Se sabe que el primer tetraterpeno que se sintetiza es el tetrahidrofitoeno, que posteriormente se deshidrogena sucesivamente a fitoeno, fitoflueno, β-caroteno, neurosporeno y licopeno. Este último resulta clave para dar lugar a γ-caroteno y β-caroteno por la formación de anillos debido al cierre de sus extremos como puede observarse en la Figura 3.



**Figura 3** Formación de análogos de tetraterpenos (adaptado de Dewick, 2009)

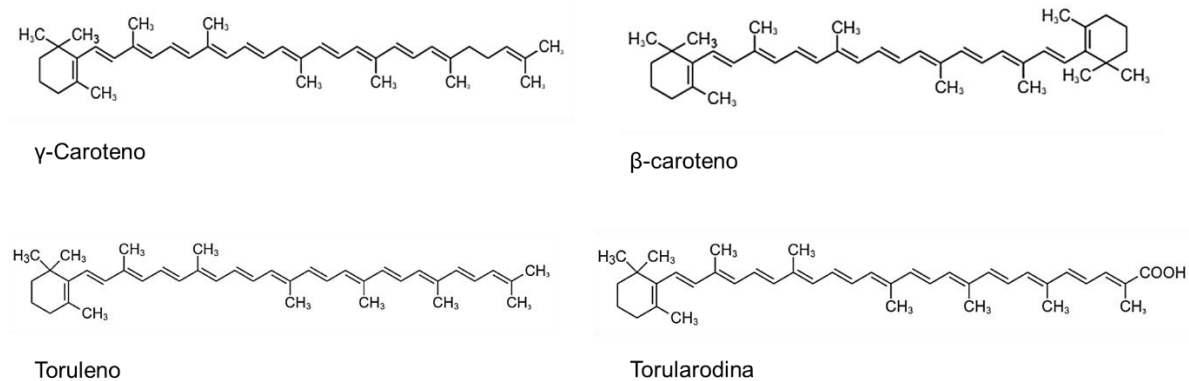
Otro factor de importancia durante la carotenogénesis es la presencia de iones metálicos ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ ) en el sustrato, por la activación o inhibición de enzimas, particularmente en las desaturasas (Tang et al., 2019).

Los carotenoides pertenecen al grupo de metabolitos secundarios debido a que la biosíntesis de estos se lleva a cabo durante la fase estacionaria del desarrollo de los organismos carotenogénicos tales como vegetales y microorganismos. Así como en los vertebrados para la síntesis de colesterol, para la síntesis de carotenoides, se sigue la ruta del MVA en el citosol y ambos tienen la función en común de formar parte de la membrana celular.

### 2.2.2 Levaduras carotenogénicas

Las levaduras carotenogénicas son aquellas responsables de metabolizar fuentes de carbono y producir carotenoides de valor comercial tales como  $\gamma$ -caroteno,  $\beta$ -

caroteno, toruleno y torularodina, que podemos observar en la Figura 4, mediante el proceso denominado carotenogénesis (Martinez-Moya et al., 2015). Las fuentes de carbono empleadas por las levaduras carotenogénicas incluyen la glucosa, xilosa, sacarosa, lactosa, sorbitol, entre otros carbohidratos que incluso pueden ser obtenidos de los residuos de procesos agroindustriales. Ejemplos de los residuos son el suero de leche, residual de la elaboración derivados lácteos o la melaza, de la industria azucarera (Aksu y Tuğba Eren, 2005; Mata-Gómez et al., 2014).



**Figura 4** Principales carotenoides sintetizados por las levaduras carotenogénicas (Elaboración propia)

Entre las levaduras carotenogénicas que han sido objeto de estudio con mayor frecuencia se destacan: *Sporidiobolus ruineniae*, *Rhodospiridium babjevae*, *Rhodotorula* sp., *Rhodotorula slooffiae*, *Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula mucilaginosa*. Generalmente, se han investigado en función de la fuente de carbono, componentes en el sustrato para el desarrollo del microorganismo, condiciones de fermentación como pH, temperatura, aireación y relación carbono/nitrógeno (Ligia et al., 2017; Mata-Gómez et al., 2014).

Cada especie de levaduras carotenogénicas asimila de manera positiva un sustrato diferente, requieren condiciones específicas de crecimiento y morfológicamente pueden variar, sin embargo, comparten el atributo de contener colorantes que van del amarillo al rojo en su membrana celular (Guamán-Burneo & Carvajal-Barriga, 2009). Los carotenoides presentes en las levaduras otorgan color y protección



contra la radiación UV (mecanismo de fotoprotección), estos han generado interés por la variedad de opciones para aplicaciones industriales, especialmente en alimentos y cosméticos (Das et al., 2007).

Además de la biosíntesis de carotenoides, las levaduras carotenogénicas han participado en investigaciones recientes para analizar su capacidad antioxidante, someterlas a diferentes factores de estrés físico o químico y explorar distintos métodos de extracción de sus metabolitos secundarios, tal es el caso de *Rhodotorula mucilaginosa* (Mannazzu et al., 2015).

#### 2.2.2.1 *Rhodotorula mucilaginosa*

Es una levadura carotenogénica, oleaginoso, aerobia facultativa de característico color naranja como se aprecia en la Figura 5. Se ha descubierto que sintetiza principalmente,  $\beta$ -caroteno, toruleno y torularodina, que son de interés industrial (García et al., 2020). Actualmente es protagonista de diversas investigaciones en el área de biotecnología debido a los metabolitos que sintetiza, la practicidad para elaborar sus medios de cultivo, así como por ser fuente natural y de bajo impacto ambiental (Mannazzu et al., 2015).



**Figura 5** *Rhodotorula mucilaginosa* de la colección de cepas de la planta piloto de Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (Elaboración propia)

De acuerdo con la investigación de Zhang et al. (2013), se demostró que *R. mucilaginosa* puede funcionar como biocontrol de deterioradores debido a que coloniza rápidamente los tejidos de la fruta y competirá con el patógeno por los nutrientes. Esta característica se comprobó con la inhibición de crecimiento de moho gris causado por *Botrytis cinerea*, lo cual es una de las enfermedades postcosecha más destructivas de las fresas.

La biomasa de *R. mucilaginosa* funciona como fuente de proteína unicelular de alta calidad para ser empleada como aditivo en piensos para animales (Tang et al., 2019). También se demostró la capacidad de *R. mucilaginosa* para degradar algunos compuestos fenólicos y crecer en aguas residuales de almazara (molino o industria donde se obtiene el aceite a partir de la oliva) con un doble interés: primero limpiar el agua residual de tal industria y segundo, para producir antioxidantes (Jarboui et al., 2012).

### 2.2.3 Desafíos en la producción de carotenoides por *R. mucilaginosa*

Los métodos químicos cuentan con ventajas competitivas en el mercado de los carotenoides sobre la síntesis de estos por microorganismos, esto se debe a que a gran escala para los procesos microbianos se deben cuidar diversos factores para lograr una producción eficiente. La producción de metabolitos microbianos a nivel industrial requiere adionar etapas en el proceso como la esterilización, preparación de inóculos de rutina, monitoreo de posible contaminación, lo que significa costos de energía, tiempo y mano de obra (Rafiqul y Sakinah, 2013). Además, algunos microorganismos requieren condiciones específicas de fuentes de carbono o nitrógeno, oxígeno disponible, control de las condiciones de cultivo, así como la conservación de la naturaleza genética de la cepa (Baptista et al., 2018).

Aberoumand (2011) menciona la importancia de que los colorantes producidos por microorganismos sean aprobados por las autoridades, lo que resultaría costoso debido a los estudios toxicológicos a los que se deben someter para garantizar la seguridad de este como aditivo alimentario. Sin embargo, los estudios de toxicidad

realizados en ratas demuestran que el consumo de carotenoides producidos por *R. glutinis* (Latha y Jeevaratanm, 2012) y por *Paracoccus carotinifaciens* (Katsumata et al., 2014) no representaron riesgo para la salud de los individuos.

#### 2.2.4 Estabilidad de los carotenoides producidos por microorganismos

Se ha demostrado que las propiedades funcionales de los carotenoides están asociadas a su estructura química, al número de dobles enlaces conjugados y a la presencia de diferentes tipos de grupos funcionales. Sin embargo, estas propiedades estructurales también son responsables de la inestabilidad de los carotenoides ante la exposición a la luz, las altas temperaturas, el oxígeno y los iones metálicos, lo que se traduce en una alta susceptibilidad a la oxidación y una baja biodisponibilidad (Sridhar et al., 2021).

A pesar de replicar por síntesis química la estructura de los carotenoides naturales, los avances de la biotecnología han concedido ventajas a los carotenoides producidos por microorganismos. Esto se debe a que permiten un mejor control de la manipulación ambiental y genética, así como la producción de isómeros con configuraciones biológicamente activas, en comparación con la síntesis química que produce mezclas de estereoisómeros (Braga et al., 2021).

Entre las alternativas para conservar la estabilidad de los carotenoides se encuentra emplearlos como aditivo en los alimentos procesados Boon et al., (2010) mencionan en su investigación algunas pruebas de que carotenoides añadidos a los alimentos pueden ser más biodisponibles que sus fuentes naturales. Por ejemplo, algunos carotenoides, como el licopeno pueden formar agregados cristalinos en los cromoplastos de las células vegetales, lo que puede reducir su solubilidad y la biodisponibilidad. El tratamiento térmico, así como la presencia de lípidos en la matriz alimentaria mejoran la biodisponibilidad y la isomerización cis-trans de los alimentos ricos tanto en betacaroteno como de licopeno, ya que los carotenoides son lipofílicos y el calor puede inducir la isomerización.

Otra opción es la microencapsulación de estos compuestos, tal como lo mencionan Manowattana et al., (2020), quienes reportan una mejora en la estabilidad del  $\beta$ -caroteno producido por *Sporidiobolus pararoseus*. Así como la microencapsulación por liofilización de carotenoides producidos por *S. pararoseus* y *R. mucilaginoso* que reportan Braga et al., (2021).

### **2.3 Fermentación por levaduras**

Es un proceso catabólico de carbohidratos que mediante una oxidación incompleta resulta en la producción de compuestos orgánicos como metabolitos primarios, producidos durante la trofofase y metabolitos secundarios producidos durante la idiofase respectivamente, del crecimiento microbiano (Singh et al., 2017).

La fermentación ha desempeñado un papel fundamental en producción, transformación y conservación de alimentos, comenzando por espontaneidad, pero en medida que el ser humano identificó las estrategias para la manipulación del proceso se encargó de tomar ventaja de este. Emplear la fermentación de alimentos ha facilitado su almacenamiento, aportando mayor estabilidad y cambios en las propiedades sensoriales y de textura.

A pesar de que, en los últimos años también se ha utilizado la fermentación a escala industrial para producir otros metabolitos, su proceso cuenta con limitaciones termodinámicas que impactan negativamente en la productividad y el rendimiento (Schievano et al., 2016). Tales limitaciones requieren ser disminuidas mediante propuestas biotecnológicas que permitan la regulación de las vías metabólicas hacia productos de interés (Dahiya et al., 2018).

La composición del medio de cultivo estándar para el desarrollo de las levaduras debe incluir como base fuente de carbono, nitrógeno, metales y sales minerales (Bonadio et al., 2018). Sin embargo, de acuerdo con cada especie se pueden adaptar los nutrientes del medio, así como limitar algunos para someterlos a estrés.

2.3.2 Efecto de la relación C/N sobre el metabolismo de *Rhodotorula mucilaginosa*  
 La relación C/N del medio de fermentación juega un papel crucial en las vías metabólicas involucradas en el crecimiento de los microorganismos reportado como producción de biomasa y en la síntesis de metabolitos secundarios como los carotenoides. En el Cuadro 2 se citan las relaciones C/N ideales para la producción de biomasa y carotenoides, reportadas por diversos autores que trabajaron con *Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula mucilaginosa*. En el caso de *R. glutinis* se puede considerar que, a partir de una relación C/N de 70 se obtiene mayor cantidad de biomasa y con el incremento de la relación C/N se estimula la producción de carotenoides, por lo tanto, indican una correlación positiva.

Para *R. mucilaginosa*, Libkind et al. (2004) reportaron que la relación C/N de 5 propicia el incremento de producción de biomasa, pero no se encontró relación con la producción de carotenoides. Por otra parte, da Silva et al. (2020) reportan que la síntesis de carotenoides se ve favorecida por la limitación de un nutriente (normalmente nitrógeno), emplear una relación C/N alta representa mayor cantidad de glucosa y menor cantidad de sulfato de amonio, favoreciendo consecuentemente la síntesis de pigmentos.

**Cuadro 2** Relación C/N para producción de biomasa y carotenoides por *Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula mucilaginosa*

Levadura	Relaciones C/N evaluadas	Relación C/N para producción de biomasa	Relación C/N para producción de carotenoides	Referencia
<i>R. glutinis</i>	140-180	140	170	Saenge et al., 2011
	20-120	70	70-120	Braunwald et al., 2013
	30-150	No se reporta	80-100	Zhang et al., 2014

	20-100	70	50	Tkáčová et al., 2017
<b>R.</b> <b><i>mucilaginoso</i></b>	5-100	5	No se reporta	Libkind et al., 2004

## 2.4 Sistemas bioelectroquímicos para fermentación

Es una técnica relativamente nueva en biotecnología, aplicada principalmente en vinos para la obtención de compuestos fenólicos que se encuentran en el citosol de las células y son liberados mediante la microporación que esta técnica induce. También acelera el proceso fermentativo debido a la modificación del potencial de óxido reducción en el medio en que se lleva a cabo. Recientemente, gran parte de la investigación se ha centrado en electrosíntesis microbiana donde el metabolismo de los microorganismos se ve afectado por los electrones suministrados mediante energía eléctrica y se utilizan para redirigir las vías metabólicas hacia la producción de compuestos de carbono múltiple de alto valor (Schievano et al., 2016).

De manera general, los microorganismos llevan a cabo sus actividades metabólicas utilizando el sustrato disponible en el medio de cultivo y generan un gradiente electroquímico de protones y electrones que se transportan a través de las coenzimas flavín adenín dinucleótido oxidado (FAD) o en su forma reducida (FADH<sub>2</sub>) y nicotidamida adenina dinucleótido fosfato oxidada (NADP) o en su forma reducida (NADPH) (Venkata Mohan et al., 2014).

De acuerdo con este contexto, se considera que este tipo de sistemas pueden emplearse para modificar el potencial óxido reductor extracelular y mejorar la producción de metabolitos mediante el suministro o la recolección de energía en forma de una corriente eléctrica mediante el uso de electrodos. Originalmente se conoció como electrofermentación (Moscoviz et al., 2016) y fue tomando diversas nomenclaturas con base en el diseño del sistema de fermentación implementado.

#### 2.4.1 Fermentación electrostática

Existe una amplia gama de biorreactores industriales dentro de la que se encuentran los reactores electroquímicos, por otro lado, los que deben fusionarse simultáneamente para optimizar electroquímicos, biológicos o hidráulicos. De acuerdo con el tipo de reacción por inducir, componentes del medio de cultivo, organismo y producto de interés, será el biorreactor por emplear (Schievano et al., 2016).

En recientes investigaciones se ha aplicado fermentación electrostática para mejorar la producción de metabolitos secundarios en levaduras. Tal es el ejemplo del etanol producido por *Saccharomyces cerevisiae*, así como producción de lípidos y ácidos orgánicos por *Rhodospirium toruloides*.

Con la introducción electrodos, el metabolismo de los microorganismos puede manipularse para la producción de metabolitos de interés, así como para incrementar el crecimiento y densidad celular (Schievano et al., 2016). La fermentación electrostática, se emplea generalmente durante la anaerobiosis regulando el adenosin trifosfato (ATP) en ausencia de forforilación oxidativa (Venkata Mohan et al., 2014). El transporte transmembranal de electrones suministrados por los electrodos al citoplasma se lleva a cabo por transferencia directa mediante enzimas adheridas a la membrana (Moscoviz et al., 2016).

Los metabolitos producidos durante la fermentación tradicional resultan significativamente impactados cuando se emplean procesos bioelectroquímicos, como es el caso de la electrofermentación, debido a la modificación de la capacidad de regeneración de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  (Schievano et al., 2016). La reducción de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  en el metabolismo microbiano sucede a partir de 2 moléculas de  $\text{NADH}$  generados de una molécula de glucosa durante la glucolisis (Ali et al., 2016).

Según Zhen et al (2018), reportaron que la aplicación de voltaje durante la fermentación logra modificar el metabolismo microbiano, lo cual impacta a los genes responsables de la reducción de  $\text{NAD}^+$ . Por su parte, (Arbter et al., 2019), también

mencionan que la fermentación electrostática logra cambios en la capacidad de regeneración de cofactores del metabolismo. Sin embargo, Kim et al. (2018) concluyeron que la aplicación de voltaje a un cultivo impacta en la expresión de enzimas y estas, a su vez, son las que permiten la regulación del metabolismo.

De esta manera, diversos autores han reportado que el uso de fermentación electrostática logra modificar positivamente el metabolismo de algunas levaduras y se obtienen mejores rendimientos en metabolitos de interés, como se describe en el Cuadro 3.

Entre las técnicas empleadas para identificar o cuantificar la concentración de los cofactores NADH y NADPH se encuentra la propuesta por Kuepper et al., (2016) quienes emplearon la resorufina fluorescente rosa en células vivas. La reducción de resazurina a resorufina fluorescente se logra mediante las deshidrogenasas dependientes de NADH y NADPH resultando como indicador de la regeneración de estos. Lo cual permite estimar la concentración midiendo la fluorescencia de la resorufina en unidades relativas de fluorescencia (URF) en un lector de microplacas.

En investigaciones recientes como la realizada por Pinheiro et al., (2020) quienes llevaron a cabo análisis de las vías metabólicas de *Rhodotorula toruloides* mediante actividad fosfoacetolasa y reducción de la b-oxidación, correlacionándose con el aumento del rendimiento lipídico cuantificado por UPLC.



**Cuadro 3** Ejemplos de aplicación de fermentación electrostática en levaduras

<b>Levadura</b>	<b>Parámetros de fermentación electrostática</b>	<b>de</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	0.75, 1.5, 3.0 y 5.0 V. Electrodo de carbono.	de	Incremento de hasta 60 % de etanol a 5 V, en comparación con el control.	Shin et al., 2002
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	3, 10 y 15 V. Fermentador con agitación y electrodo de carbono.	con	Incremento de hasta 12.30 % de etanol a 15 V, en comparación con el control.	Mathew et al., 2015
<b><i>Rhodospirium toruloides</i></b>	0.4 y 1.0 A. Equipo "All-in-one".	Equipo	Incremento en producción de lípidos y ácidos grasos saturados hasta 50 % a 0.4 A	Arbter et al., 2019

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La tendencia por llevar un estilo de vida saludable se ha extendido a nivel global, comenzando por los alimentos, se busca que sean lo más naturales que se pueda. Sin embargo, en esta época es difícil prescindir de alimentos industrializados, por lo que la alternativa es buscar opciones con la menor cantidad de aditivos sintéticos en sus ingredientes. Algunos de los aditivos que se emplean con mayor frecuencia en los alimentos son los colorantes debido a su aporte como atractivo visual, conservando el color en los productos que han sido sometidos a procesos en los que este se pierde o para modificar el color original.

A pesar de los beneficios organolépticos que aporta el uso de colorantes alimenticios y que las dosis permitidas en los acuerdos de aditivos no demuestran efectos tóxicos, se han atribuido daños a la salud de los consumidores a largo plazo. Lo anterior, se mantuvo lejos del dominio público durante años, pero actualmente los organismos encargados de regular el uso de los aditivos alimentarios han expuesto las inconformidades al respecto.

Considerando que los daños que provoca el consumo constante de colorantes artificiales se han vuelto tema de interés, se proyecta que incrementará la demanda de emplear colorantes naturales, como clorofila, carotenoides, xantofilas, etc., en los alimentos consumidos en el país.

Lo anterior presenta un reto, ya que los colorantes naturales solo se pueden obtener por extracción de fuentes vegetales o por producción con microorganismos. Las fuentes vegetales se destinan mayormente al comercio en fresco o en productos procesados y los microorganismos no cuentan con la capacidad de producción a nivel industrial. Por lo tanto, el presente trabajo busca ofrecer una alternativa de producción de carotenoides empleando una levadura carotenogénica en un sistema de fermentación electrostática con el objetivo de inducir la regeneración de NADH/NADPH y propiciar el incremento de metabolitos secundarios.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de las condiciones de fermentación, relación C/N y sistema de fermentación electrostática, sobre la generación de biomasa y la síntesis de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa*.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Evaluar la producción de biomasa, carotenoides y consumo de azúcares reductores ante diferentes relaciones C/N en el medio de cultivo.
- Estimar el efecto de la aplicación de voltaje continuo y en intervalos de intermitencia, sobre la producción de biomasa y carotenoides por *R. mucilaginosa* en el sistema de fermentación electrostática.
- Analizar el consumo de azúcares reductores y generación de biomasa en el tratamiento que conduzca a la mayor producción de carotenoides por *R. mucilaginosa* en el sistema de fermentación electrostática.
- Evaluar la capacidad de regeneración de NADH/NADPH al emplear el sistema de fermentación electrostática que conduzca a la mayor productividad de carotenoides.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Material biológico**

La levadura *Rhodotorula mucilaginosa* que se empleó en la presente investigación pertenece a la colección de cepas de la planta piloto de Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro y cuenta con identificación molecular por el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. Se encontraba conservada a -70 °C en suspensión con glicerol al 20 % v/v.

### **5.2 Pre-inóculo**

Se realizó una curva de crecimiento previamente para definir el tiempo de incubación en el que se alcance la mitad de la fase de crecimiento (ver Anexo 1). El

medio líquido que se empleó fue YPS ( $\text{g L}^{-1}$ ): 10 extracto de levadura, 20 peptona de caseína y 20 sacarosa, pH 5 para la activación de *R. mucilaginosa*. La levadura se inoculó en 15 mL de medio YPS y se incubó durante 24 h a 30 °C y 150 rpm. Se empleó medio agar YPD ( $\text{g L}^{-1}$ ): 10 extracto de levadura, 20 peptona de caseína, 20 sacarosa y 15 agar base, pH 5. Se inoculó en cajas Petri y se incubó durante 48 h a 30 °C. Se tomó una Unidad Formadora de Colonias (UFC) definida y se inoculó en 15 mL de medio YPS, 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 suspendieron en una solución de glicerol 20 % y medio YPS 80 %

### **5.3 Medio de fermentación**

El medio de fermentación se elaboró de acuerdo con lo reportado por Wang et al. (2017) modificando las cantidades de glucosa y manteniendo constante la cantidad de sulfato de amonio para establecer las relaciones C/N 20, 50, 70 y 90, de acuerdo con los tratamientos para esta investigación: glucosa 21.2, 53.0, 74.2 y 95.4  $\text{g L}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1  $\text{g L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$  0.1  $\text{g L}^{-1}$  y  $\text{NaCl}$  0.3  $\text{g L}^{-1}$ , el pH se ajustó a 7.0 con soluciones de  $\text{NaOH}$  y  $\text{HCl}$ .

### **5.4 Sistema de fermentación electrostática**

El sistema de fermentación electrostática fue un recipiente de polipropileno de 5.2 x 7.5 x 5 cm de volumen, con 100 mL de medio de fermentación inoculado con levadura *R. mucilaginosa*, un electrodo de acero inoxidable como cátodo y el biorreactor embobinado con alambre de cobre aislado, calibre 24 como ánodo. En el cual se evaluarán los voltajes de 0, 10, 20 y 30 V, aplicando la corriente eléctrica de forma continua (C) e intermitente (I). El electrodo de acero inoxidable, así como el cable de cobre estarán conectados a través de una fuente con voltaje en corriente continua modelo GPS-3030DD y un amperímetro (Mut-33, Truper, China). El electrodo se sujetó de la tapa del recipiente y se conectó a una fuente de voltaje tal como se muestra en la Figura 6.



**Figura 6** Sistema de fermentación electrostática en incubadora. 1) Fuente de poder, 2) Biorreactores, 3) Placa de agitación (Elaboración propia)

## 5.5 Métodos analíticos

### 5.5.1 Determinación de biomasa

La biomasa se determinó como peso seco celular (PSC), empleando la relación previamente evaluada en la curva de crecimiento (ver Anexo 2). Se tomó 1 mL de muestra y se midió la absorbancia a densidad óptica (DO) de 600nm en espectrofotómetro (Thermoscientific, Genesys 10s UV-Vis).

### 5.5.2 Determinación de carotenoides

Se tomaron 10 mL de muestra del biorreactor y se centrifugaron a  $1,600 \times g$  por 15 min, la pastilla celular se lavó tres veces con agua destilada. La pastilla celular

restante se suspendió en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) precalentado a 55 °C, se agitó en un vórtex durante 10 s y se centrifugó a 4,500 x g durante 15 min. El proceso de lavado con DMSO, agitación y centrifugación se repitió tres veces. El sobrenadante obtenido se empleó como muestra para medir la absorbancia en el espectrofotómetro (Thermoscientific, Genesys 10s UV-Vis) a una densidad óptica (DO) de 501 nm. Posteriormente, se emplearon las fórmulas para cálculo de carotenoides por volumen (Cv) como se muestra en la Ecuación 1 y carotenoides en masa (Cm) como se muestra en la Ecuación 2 (Hornero-Méndez y Minguez-Mosquera, 2001; Kanzy et al., 2015; Lau et al., 2018)

$$C_v \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{A * V * 10^6}{E_{1cm}^{1\%} * 100} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde Cv es la cantidad de carotenoides en el medio líquido, se expresa en mg/L, A es la lectura de absorbancia, V es el volumen de la muestra inicial, expresado en L,  $E_{1cm}^{1\%}$  corresponde al coeficiente de extinción, que para carotenoides se considera el valor de 2040 de acuerdo con lo reportado por Kanzy et al. (2015).

$$C_m \left( \frac{mg}{g} \right) = \frac{C_v}{PSC} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde Cm es la cantidad de carotenoides con relación a la cantidad de biomasa, expresada en mg/g, PSC es el peso seco celular y se expresa en g.

### 5.5.3 Cuantificación de consumo de azúcares reductores

Se tomó el sobrenadante de las muestras empleadas para cuantificación de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), empleando una curva estándar de glucosa y el resultado se expresó en gramos de glucosa reducida por litro.

### 5.5.4 Determinación de la regeneración de NADH y NADPH

La concentración de NADH/NADPH en la mezcla de reacción se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Kuepper et al. (2016), con algunas modificaciones, mediante la reducción de resazurina a resorufina fluorescente. Se

tomó una muestra de 60 mL de fermento a las 0 h, 12 h y 72 h. Las muestras se centrifugaron a 1,600 x g por 15 min, la pastilla celular se lavó con agua destilada tres veces y al final se suspendió en agua destilada hasta alcanzar una concentración de  $DO_{600} = 2.08 \pm 0.03$ . En una microplaca de 96 pocillos se suministraron 50  $\mu$ L de la suspensión de células, 20  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos 180 mM, 10  $\mu$ L de glucosa 200 mM, 10  $\mu$ L de formato de sodio 600 mM y 10  $\mu$ L de resazurina 0.1 mM. Para el control abiótico se sustituyó el volumen de células por amortiguador de fosfatos. Se midió la fluorescencia, expresada en URF, de la reacción en un espectrofotómetro de microplacas multimodo (Thermoscientific, Varioskan Flash) bajo las siguientes condiciones: 30 °C,  $\lambda$  de extinción 544nm, cinética de 3 mm de amplitud con agitación.

## **6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se llevó a cabo en dos etapas: la primera para la selección del medio de cultivo con la relación de carbono/nitrógeno más conveniente, la segunda para la aplicación de energía eléctrica mediante un sistema de fermentación electrostática.

### **6.1 Tratamientos**

#### **6.1.1 Primera etapa**

Se realizó un diseño experimental unifactorial. Los factores fueron las relaciones C/N 20, 50, 70, y 90. Las variables respuesta fueron la producción de biomasa y concentración de carotenoides.

#### **6.1.2 Segunda etapa**

Se aplicó un diseño experimental factorial completo. Considerando como factores el voltaje (0 V, 10 V, 20 V y 30 V) y la aplicación de la energía eléctrica; intermitente (I) o continua (C). Las variables respuesta fueron la producción de biomasa, concentración de carotenoides y la capacidad de regeneración de NADH/NADPH. Como control, se realizó una fermentación tradicional sin voltaje, utilizando el mismo reactor.

## 6.2 Análisis estadístico

Todas las determinaciones, así como cada control, se realizaron por triplicado y se reportaron como la media de los ensayos  $\pm$  desviación estándar. Se aplicó el análisis de varianza, seguido de una comparación múltiple por la prueba de Tuckey o Dunnett, cuando se comparó con un control, considerando un  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Evaluación de biomasa y carotenoides a diferentes relaciones C/N

En el Cuadro 4 se muestra la producción de biomasa y carotenoides por *R. mucilaginosa* ante las diferentes relaciones C/N (20-90). La comparación de medias se realizó empleando la prueba de Tuckey ( $p < 0.05$ ) y resultó que la relación C/N 20 produjo menor cantidad de biomasa con  $0.79 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ , mientras que la relación C/N 50 tuvo la mayor producción de biomasa con  $1.41 \pm 0.3 \text{ g L}^{-1}$ . Sin embargo, las relaciones C/N 70 y 90 no presentan diferencias estadísticamente significativas ya que obtuvieron valores de  $1.18 \pm 0.1$  y  $1.28 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente.

Respecto a la producción de carotenoides ante las cuatro relaciones C/N, se puede apreciar que la síntesis de estos pigmentos presentó un comportamiento similar a la producción de biomasa por *R. mucilaginosa*. De nueva cuenta, la relación C/N 20 resultó con el valor más bajo con  $29.16 \pm 5.6 \mu\text{g L}^{-1}$ . Sin embargo, las relaciones C/N 50, 70 y 90 resultan similares con valores de  $59.6 \pm 8.4$ ,  $53.01 \pm 0.7$  y  $62.09 \pm 0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. También se estimó la productividad de carotenoides respecto a la biomasa, la cual no arrojó diferencias significativas entre los tratamientos.

**Cuadro 4** Producción de biomasa y carotenoides por *R. mucilaginosa* a diferentes relaciones C/N

Relación C/N	Biomasa (g/L)	Carotenoides ( $\mu\text{g/L}$ )	Productividad ( $\mu\text{g/g}$ )
20	$0.79 \pm 0.1^b$	$29.16 \pm 5.6^b$	$18.46 \pm 3.8^a$
50	$1.41 \pm 0.3^a$	$59.64 \pm 8.4^a$	$20.97 \pm 1.7^a$



70	1.18 ± 0.1 <sup>ab</sup>	53.01 ± 0.7 <sup>a</sup>	22.34 ± 2.0 <sup>a</sup>
90	1.22 ± 0.2 <sup>ab</sup>	62.09 ± 0.3 <sup>a</sup>	24.73 ± 5.3 <sup>a</sup>

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En el Cuadro 5 se presenta la cuantificación de azúcares reductores presentes en el medio de cultivo al inicio y final de la fermentación para cada relación C/N. En los tratamientos de las relaciones C/N 20 y 50 se observó un consumo de 23.81 y 13.57 % respectivamente. Sin embargo, en las relaciones C/N 70 y 90 se presentó un incremento en la concentración de azúcares reductores en el medio al final de la fermentación, con 4.49 y 4.64 % de diferencia, respectivamente.

**Cuadro 5** Cuantificación de azúcares reductores en el medio de fermentación

Relación C/N	0 h (gglucosa/ L medio)	72 h (gglucosa/ L medio)	Diferencia (%)
20	18.26 ± 0.0	13.91 ± 5.7	23.81
50	50.24 ± 0.0	43.42 ± 5.7	13.57
70	86.31 ± 0.0	90.19 ± 13.5	4.49
90	100.23 ± 0.2	104.88 ± 22.4	4.64

Se proyectaba que el incremento en la relación C/N beneficiaría la producción de biomasa y por consecuencia de carotenoides, no obstante, esta condición se encuentra limitada por el tiempo de fermentación, ya que según lo reportado por Tkáčová et al., (2017) al emplear una relación C/N mayor o igual a 70 se extiende el tiempo de la fase de adaptación. Además, Okoro et al., (2021), reportaron que el uso de un medio de fermentación con alta concentración de glucosa favorece la producción de exopolisacáridos, empleando la glucosa como precursora de estos en lugar de la síntesis de carotenoides, lo que se vio reflejado en los resultados de la concentración de azúcares reductores para las relaciones C/N 70 y 90. Por otra

parte, Braunwald et al., (2013) mencionan en su investigación que la baja concentración inicial de glucosa en el medio limita la síntesis de carotenoides debido a que las células dan prioridad al metabolismo primario, como fue el caso de la relación C/N 20.

## 7.2 Fermentación electrostática continua

En el Cuadro 6 se muestran los resultados de la producción de biomasa y carotenoides por *R. mucilaginosa* al aplicar corriente eléctrica de forma continua a diferentes niveles de voltaje (0-30 V) en el sistema de fermentación electrostática. La comparación de medias se realizó empleando la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ) y demostró que no se encuentran diferencias significativas en la producción de biomasa por *R. mucilaginosa* al aplicar 10 V, 20 V y 30 V en comparación con el control 0 V. Sin embargo, la síntesis de carotenoides resultó beneficiada significativamente en el tratamiento al que se aplicaron 10 V obteniendo la concentración más alta con  $110.60 \pm 4.9 \mu\text{g L}^{-1}$ . Seguido por los tratamientos con aplicación de voltaje a 20 y 30 V con  $100.80 \pm 2.8$  y  $96.10 \pm 4.8 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Por su parte, en el cálculo de productividad resultó de 1.37 veces mayor al aplicar voltaje, en comparación con el control que obtuvo el menor valor con  $45.54 \pm 3.6 \mu\text{g g}^{-1}$ . Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con aplicación de voltaje a 10, 20 y 30 V con valores de  $62.70 \pm 1.9$ ,  $63.40 \pm 4.4$  y  $62.23 \pm 3.4 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

**Cuadro 6** Producción de biomasa y carotenoides por *R. mucilaginosa* a diferentes voltajes en sistema de fermentación electrostática

c	Biomasa (g/L)	Carotenoides ( $\mu\text{g/L}$ )	Productividad ( $\mu\text{g/g}$ )
0	$1.72 \pm 0.1^a$	$77.80 \pm 0.3^a$	$45.54 \pm 3.6^a$
10	$1.76 \pm 0.1^a$	$110.60 \pm 4.9^b$	$62.70 \pm 1.9^b$
20	$1.60 \pm 0.1^a$	$100.80 \pm 2.8^{ab}$	$63.40 \pm 4.4^b$
30	$1.54 \pm 0.1^a$	$96.10 \pm 4.8^{ab}$	$62.23 \pm 3.4^b$

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

La aplicación de voltaje de forma continua demostró que, a pesar de no obtener diferencia significativa en el crecimiento de *R. mucilaginosa*, reportado como producción de biomasa, la síntesis de carotenoides se encontró beneficiada significativamente. Lo cual coincide por lo reportado por Schievano et al., (2016) quienes mencionan que el metabolismo de las levaduras resulta afectado por el suministro de electrones y se emplean para redirigir las vías metabólicas hacia la producción de compuestos de carbono múltiple.

### 7.3 Fermentación electrostática intermitente

Se realizaron experimentos aplicando corriente eléctrica de forma intermitente, encendiendo (c) y apagando (s) la fuente de poder durante diferentes intervalos de tiempo, como se muestra en el Cuadro 7. Se observó que el tratamiento con intervalos de 12 h con voltaje y 12 h sin voltaje hasta concluir el periodo de fermentación benefició el crecimiento de *R. mucilaginosa* expresado como biomasa y a su vez la síntesis de carotenoides. Lo cual coincide por lo reportado por Kot et al., (2019) quienes mencionan que aplicar un tratamiento intermitente mediante factores exógenos a *Rhodotorula* sp. induce estrés e impacta positivamente en la producción de carotenoides. El resto de los tratamientos no presentaron diferencias significativas. Por otra parte, la productividad tampoco mostró diferencias significativas.

**Cuadro 7** Producción de biomasa y carotenoides por *R. mucilaginosa* a 10 V con intervalos de intermitencia, en sistema de fermentación electrostática

Intervalos	Biomasa (g/L)	Carotenoides (µg/L)	Productividad (µg/g)
60s	1.38 ± 0.1 <sup>a</sup>	81.34 ± 5.4 <sup>a</sup>	61.65 ± 3.5 <sup>a</sup>
12s/48c	1.35 ± 0.0 <sup>a</sup>	87.74 ± 1.7 <sup>a</sup>	65.13 ± 1.2 <sup>a</sup>
24s/36c	1.30 ± 0.0 <sup>a</sup>	90.35 ± 3.9 <sup>a</sup>	69.61 ± 3.7 <sup>a</sup>
24s/24c /12s	1.35 ± 0.0 <sup>a</sup>	80.71 ± 19.0 <sup>a</sup>	59.51 ± 13.1 <sup>a</sup>

12s/12c /12s /12c/12s	1.93 ± 0.0 <sup>b</sup>	135.45 ± 14.7 <sup>b</sup>	73.70 ± 4.5 <sup>a</sup>
-----------------------------	-------------------------	----------------------------	--------------------------

Encendido (c) y apagando (s)

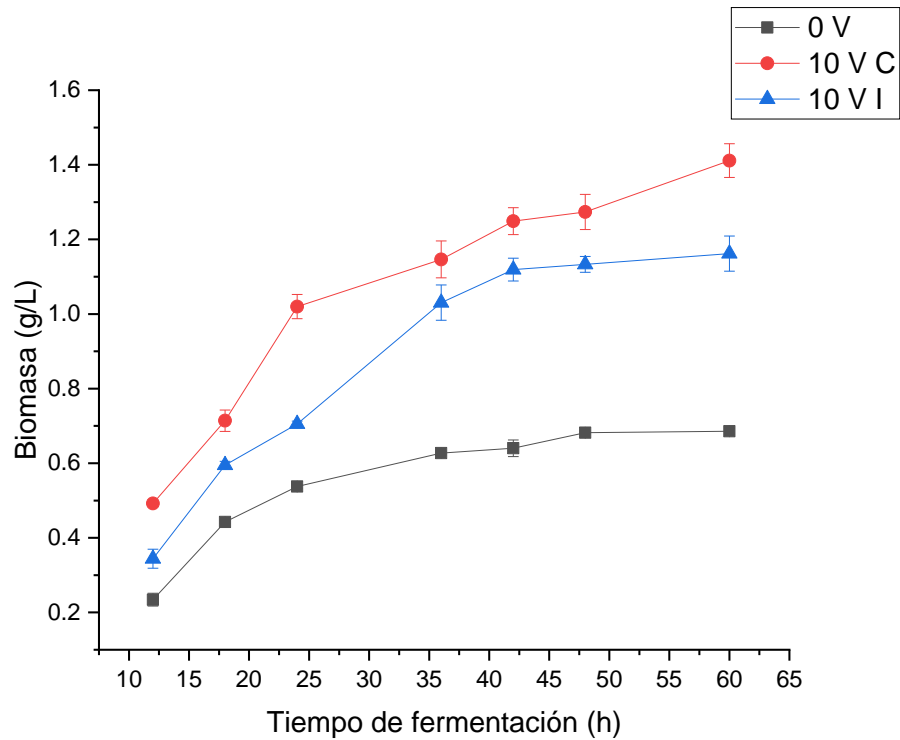
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

#### 7.4 Comparación entre aplicación de voltaje continua e intermitente

Se seleccionó el tratamiento con mayor producción de carotenoides para ambas formas de aplicación de voltaje, continua (C) e intermitente (I) y se llevó a cabo la evaluación comparativa con el control, tomando muestras cada 12 h para monitorear el comportamiento de la levadura durante 60 h de fermentación. Cabe mencionar que se partió de un inóculo uniforme para ambos tratamientos, 10 V C, 10 V I y el control 0 V con una concentración de  $3 \pm 0.0 \text{ mg L}^{-1}$ .

En la Figura 7 se muestra el crecimiento de *R. mucilaginosa*, expresado como producción de biomasa, se logra apreciar que el crecimiento resultó favorecedor en los tratamientos con aplicación de voltaje, 10 V C y 10 V I, desde la primera toma de muestra a las 12 h con  $0.49 \pm 0.1$  y  $0.34 \pm 0.0$  respectivamente, en comparación con el control 0 V con  $0.23 \pm 0.0 \text{ g L}^{-1}$ . Además, es importante resaltar que, a partir de las 48 h, el tratamiento control 0 V alcanzó la fase estacionaria, sin embargo, los tratamientos con aplicación de voltaje continuaron creciendo hasta las 60 h del tratamiento.

La comparación de medias se realizó empleando la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ) al final de la fermentación a 60 h. Demostró que se encuentra diferencias estadísticamente significativas en la producción de biomasa por *R. mucilaginosa* al aplicar 10 V C y 10 V I que alcanzaron las concentraciones de  $1.41 \pm 0.0$  y  $1.16 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, en comparación con el control 0 V con  $0.68 \pm 0.0 \text{ g L}^{-1}$ .



**Figura 7** Producción de biomasa de *R. mucilaginosa*, comparación de aplicación de voltaje continuo (C) e intermitente (I) en el sistema de fermentación electrostática

Por otra parte, se determinaron la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) y el tiempo de duplicación (Td), mediante el modelo de Gompertz y resultó que la aplicación de voltaje aumenta la  $\mu_{\max}$ , ya que para el tratamiento 10 V C fue 1.5 veces mayor que el control, mientras que el tratamiento 10 V I fue 1.2 veces mayor que el control. Por consiguiente, la aplicación de voltaje redujo el tiempo de duplicación, para el tratamiento 10 V C se logró la reducción del 30 % en comparación con el control y en el caso del tratamiento 10 V I solo se obtuvo una reducción del tiempo de duplicación del 15 %, aproximadamente, como se muestra en el Cuadro 8.

**Cuadro 8** Comparación de velocidad máxima de crecimiento y tiempo de duplicación entre tratamientos, con aplicación de voltaje continuo (10 V C) e intermitente (10 V I)

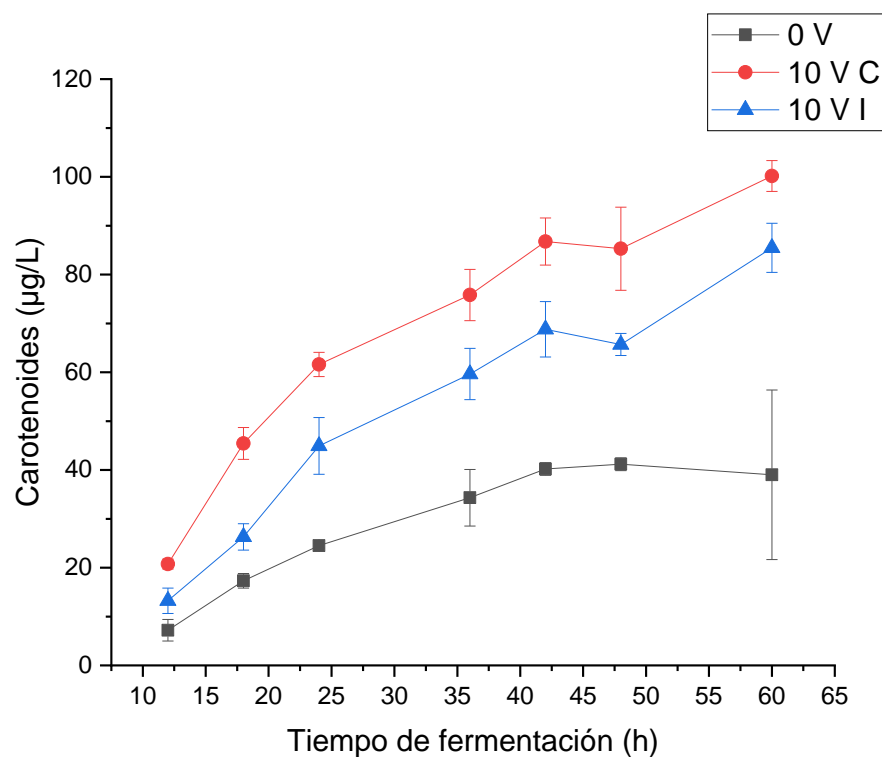
Nivel	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Tiempo de duplicación (h)	Diferencia $\mu_{\max}$	Reducción del Td %
-------	---------------------------------	---------------------------	-------------------------	--------------------

0 V (control)	0.08 <sup>a</sup>	7.87 <sup>a</sup>		
10 V C	0.12	5.45	1.44	30.81
10 V I	0.10	6.68	1.17	15.07

$\mu_{\max}$ : velocidad máxima de crecimiento

Td: tiempo de duplicación

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



**Figura 8** Producción de carotenoides por *R. mucilaginosa*, comparación de aplicación de voltaje continuo (C) e intermitente (I) en el sistema de fermentación electrostática

Respecto al monitoreo de la síntesis de carotenoides, se logra apreciar en la Figura 8 que la síntesis de carotenoides resultó favorecida por la aplicación de voltaje en los tratamientos, 10 V C y 10 V I, desde la primera toma de muestra a las 12 h con  $20.75 \pm 1.0$  y  $13.23 \pm 2.6 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente, en comparación con el control 0 V con  $7.19 \pm 2.2 \mu\text{g L}^{-1}$ . Además, es importante resaltar que, a partir de las 42 h, el

tratamiento control 0 V alcanzó la fase estacionaria, sin embargo, los tratamientos con aplicación de voltaje mostraron una disminución y posterior repunte a las 48 h. La comparación de medias se realizó empleando la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ) al final de la fermentación a 60 h. Demostró que se encuentra diferencias estadísticamente significativas en la producción de carotenoides por *R. mucilaginosa* al aplicar 10 V C y 10 V I que alcanzaron las concentraciones de  $100.16 \pm 3.6$  y  $85.45 \pm 5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, en comparación con el control 0 V con  $39.02 \pm 17.3 \mu\text{g L}^{-1}$ . Sin embargo, el crecimiento de *R. mucilaginosa* y la síntesis de carotenoides resultan beneficiadas si el voltaje es aplicado desde el inicio de la fase exponencial de la levadura para lograr una fermentación acelerada que se confirma midiendo el consumo simultáneo de glucosa como reportan Mathew et al., (2015).

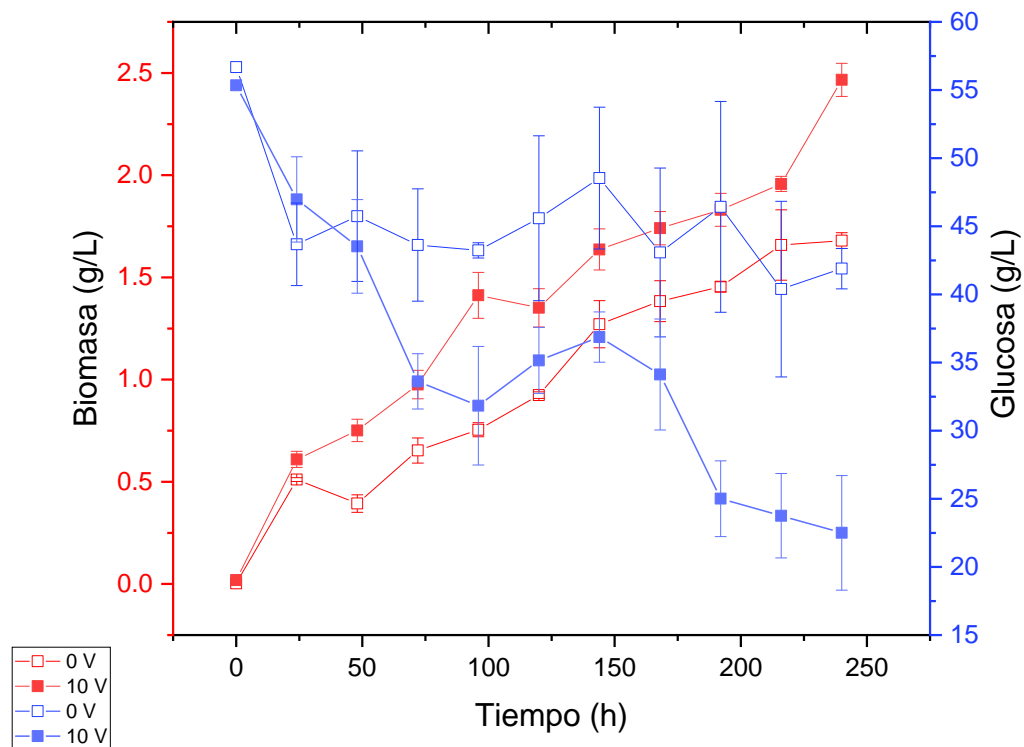
**Cuadro 9** Comparación de producción de biomasa y consumo de glucosa del medio de fermentación por *R. mucilaginosa* sin aplicación de voltaje (0 V) y con aplicación de voltaje de forma continua (10 V C) en sistema de fermentación electrostática

<b>Biomasa (g/L)</b>				
	<b>Inicial</b>	<b>Final</b>	<b>Incremento</b>	<b>Dif %</b>
<b>0 V</b>	$0.01 \pm 0.0^a$	$1.68 \pm 0.0^a$	1.67	46.7
<b>10 V C</b>	$0.01 \pm 0.0^a$	$2.46 \pm 0.1$	2.45	
<b>Glucosa (g/L)</b>				
	<b>Inicial</b>	<b>Final</b>	<b>Consumo</b>	<b>Dif %</b>
<b>0 V</b>	$56.68 \pm 0.01^a$	$41.89 \pm 1.5^a$	14.79	26.10
<b>10 V C</b>	$55.34 \pm 0.01^a$	$22.50 \pm 4.2$	32.84	59.34

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Se analizó el consumo de azúcares reductores y generación de biomasa en el tratamiento de aplicación continua de 10 V, que condujo a la mayor producción de carotenoides por *R. mucilaginosa* en el sistema de fermentación electrostática, como se aprecia en la Tabla 5. Este fue evaluado durante 240 h de fermentación. Se demostró que al aplicar 10 V de forma continua durante la fermentación de *R.*

*mucilaginosa* se logra incrementar 46.7% su crecimiento, expresado en producción de biomasa, en comparación con el tratamiento sin aplicación de voltaje. Por consecuencia, la concentración de glucosa en el medio de fermentación es consumida en mayor cantidad durante el mismo tiempo. El tratamiento sin aplicación de voltaje consumió el 26.10 % de glucosa, mientras que el tratamiento con aplicación continua de 10 V consumió el 59.34 %. No obstante, en la Figura 9 se logra apreciar que la pendiente de la producción de biomasa no ha llegado a la fase estacionaria, lo cual coincide con lo reportado por Wang et al., (2017) quienes mencionan que el crecimiento de *R. mucilaginosa* es lento y continua aún después de 240 h de fermentación.



**Figura 9** Producción de biomasa vs. consumo de glucosa en el medio de fermentación por *R. mucilaginosa* durante 240 h sin aplicación de voltaje (0 V) y con aplicación de voltaje (10 V)

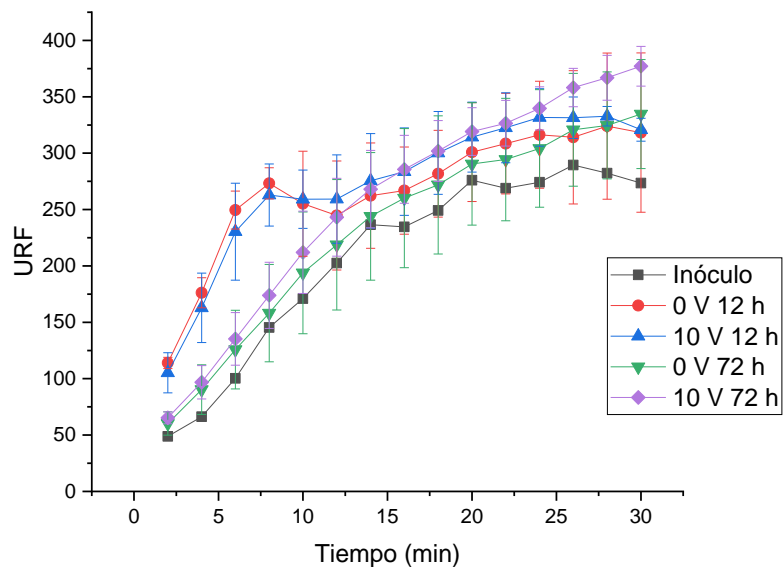


## 7.5 Capacidad de regeneración de NADH y NADPH

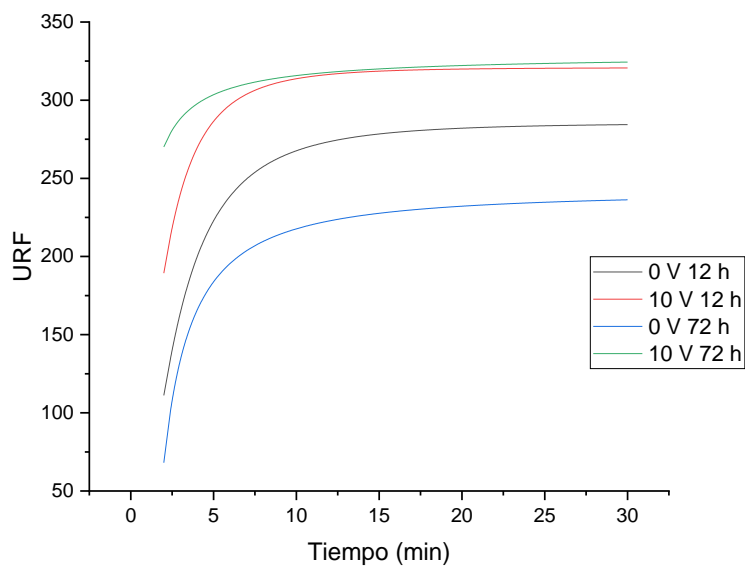
Se evaluó la capacidad de regeneración de NADH y NADPH mediante la prueba de resazurina fluorescente, se tomaron muestras a las 0 h (inóculo), 12 h y 72 h de fermentación. Se midieron las URF en cinética durante 30 min como se muestra en la Figura 10. Se logra apreciar un comportamiento similar en las muestras tomadas a las 12 h para ambos tratamientos 0 V y 10 V C, que proyectaron al inicio de la cinética  $103.26 \pm 5.0$  y  $94.56 \pm 17.8$  URF, respectivamente. Estos fueron valores superiores a los que proyectaron las muestras tomadas a las 72 h para ambos tratamientos 0 V y 10 V C, que iniciaron con  $50.85 \pm 10.3$ ,  $55.94 \pm 5.3$  URF, respectivamente. Por otra parte, el inóculo obtuvo el menor valor con  $38.13 \pm 0.0$  URF. Lo que muestra mayor capacidad de regeneración de NADH/NADPH para ambos tratamientos a las 12 h de fermentación al inicio de la cinética.

Las URF mantuvieron un incremento constante en todos los tratamientos, hasta los 8 min de reacción, donde la pendiente comenzó a inclinarse negativamente hasta alcanzar valores similares a los de las muestras tomadas a las 72 h. Al final de la reacción, la muestra tomada a las 72 h de fermentación del tratamiento 10 V C, alcanzó el valor más alto con  $368.36 \pm 17.6$  URF, seguido por las muestras 0 V 72 h y 10 V 12 h con  $334.68 \pm 48.4$  y  $320.82 \pm 10.1$  URF respectivamente. Mientras que la muestra tomada a las 12 h del tratamiento 0 V obtuvo el menor valor con  $307.69 \pm 70.6$  URF.

Se aplicó la regresión logarítmica a las curvas obtenidas con la finalidad de visualizar la diferencia entre tratamientos, tal como se muestra en la Figura 11. Donde se observa que se proyecta mayor capacidad de regeneración de NADH y NADPH al final de la fermentación con aplicación de voltaje, ya que el tratamiento 10 V 72 h resultó 1.35 veces mayor en comparación con el control 0 V 72 h. Del mismo modo resultó beneficiada con el tratamiento 10 V 12 h, siendo 1.12 veces mayor que su control 0 V 12 h.



**Figura 10** Cinética de unidades relativas de fluorescencia (URF) en la reducción de resazurina por NADH y NADPH de *R. mucilaginosa* en un sistema de fermentación electrostática a 0 h, 12 h y 72 h



**Figura 11** Regresión logarítmica de unidades relativas de fluorescencia (URF) en la reducción de resazurina por NADH y NADPH de *R. mucilaginosa* en un sistema de fermentación electrostática a 12 h y 72 h

La técnica para la evaluación de la capacidad de regeneración de NADH y NADPH reportada por Kuepper et al., (2016) permitió identificar que el tratamiento 10 V a las 72 h de fermentación cuenta con la mayor actividad de regeneración de NADH y NADPH. Lo cual coincide con lo reportado por Arbter et al., (2019), quienes mencionan que la aplicación de voltaje durante la fermentación permite la modulación del metabolismo y con este, la expresión de genes de la reducción de cofactores.

No obstante, el análisis estadístico indica que no se aprecian diferencias significativas entre tratamientos al final de la reacción, esto se debe a que la técnica cuenta con limitantes, mencionadas en la investigación de Kuepper et al., (2016). Ya que la resazurina puede ser reducida no solo por los cofactores NADH y NADPH sino también por enzimas mitocondriales o microsomales, enzimas de la cadena respiratoria o agentes de transferencia de electrones. Por lo tanto, como lo reportan Yoon et al., (2009), la principal modificación puede deberse a la expresión de enzimas, lo que permite la regulación de las vías metabólicas para dar lugar al mejoramiento en la producción de carotenoides.

## **8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

Se demostró que el incremento en la concentración de glucosa como fuente de carbono, de la relación C/N 20 a 50, propicia el aumento en la producción de biomasa y carotenoides por *R. mucilaginosa*. No obstante, a partir de la relación C/N 70 se limita el crecimiento de *R. mucilaginosa*.

La aplicación continua de voltaje en el sistema de fermentación electrostática estimula el crecimiento de *R. mucilaginosa* y la producción de carotenoides. Es relevante que la aplicación de voltaje se realice de inicio a fin de la fermentación para que el efecto resulte significativo. Asimismo, el análisis de rendimiento durante tiempo de fermentación mayor a 240 h en conjunto con pruebas de viabilidad celular, permitirán definir las etapas de crecimiento de *R. mucilaginosa* en el sistema de fermentación electrostática.

Finalmente, la evaluación de capacidad de regeneración de NADH y NADPH por reducción de resazurina fluorescente, permite comprobar que la aplicación de voltaje por fermentación electrostática a *R. mucilaginosa* impacta en la reducción de cofactores. Además, aporta continuidad a la presente investigación para encausar las futuras investigaciones con ingeniería metabólica para precisar el efecto de la fermentación electrostática en el metabolismo de *R. mucilaginosa*.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberoumand, A. (2011). A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. *Journal of Dairy & Food Sciences*, 6(1), 71–78. <https://doi.org/10.12691/ajfst-2-1-6>
- Accum, F. (1820). A treatise on adulterations of food, and culinary poisons. In 1820. <http://www.gutenberg.org/files/19031/19031-h/19031-h.htm>
- Aksu, Z., & Tuğba Eren, A. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 40(9), 2985–2991. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.011>
- Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 914–922. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>
- Arbter, P., Sinha, A., Troesch, J., Utesch, T., & Zeng, A. P. (2019). Redox governed electro-fermentation improves lipid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 294(September), 122122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122122>
- Baptista, S. L., Cunha, J. T., Romani, A., & Domingues, L. (2018). Xylitol production from lignocellulosic whole slurry corn cob by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *Bioresource Technology*, 267, 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.068>
- Bonadio, M. de P., Freitas, L. A. de, & Mutton, M. J. R. (2018). Carotenoid production in sugarcane juice and synthetic media supplemented with nutrients by *Rhodotorula rubra* I02. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 872–878. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.02.010>
- Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J., & Decker, E. A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(6), 515–532. <https://doi.org/10.1080/10408390802565889>
- Braga, L. T., Borba, C. M., Rodrigues, T. V. D., Moraes, C. C., & Burkert, J. F. de M. (2021). Microencapsulation by lyophilization of natural carotenoids using different wall materials/ Microencapsulação por liofilização de carotenoides naturais utilizando diferentes materiais de parede. *Brazilian Journal of Development*, 7(7), 70051–70066. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n7-263>
- Braunwald, T., Schwemmlin, L., Graeff-Hönninger, S., French, W. T., Hernandez, R., Holmes, W. E., & Claupein, W. (2013). Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6581–6588. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5005-8>

- Campos-Vega, R., & Dave Oomah, B. (2013). Chemistry and Classification of Phytochemicals. *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*, 5–48. <https://doi.org/10.1002/9781118464717.ch2>
- Ciegler, A. (1965). Microbial Carotenogenesis. *Agricultural Research Service*, 1(1), 34.
- Coultate, T., & Blackburn, R. S. (2018). Food colorants: their past, present and future. *Coloration Technology*, 134(3), 165–186. <https://doi.org/10.1111/cote.12334>
- da Silva, J., Honorato da Silva, F. L., Santos Ribeiro, J. E., Nóbrega de Melo, D. J., Santos, F. A., & Lucena de Medeiros, L. (2020). Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101847. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101847>
- Dahiya, S., Kumar, A. N., Shanthi Sravan, J., Chatterjee, S., Sarkar, O., & Mohan, S. V. (2018). Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. In *Bioresource Technology* (Vol. 248, pp. 2–12). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.176>
- Das, A., Yoon, S. H., Lee, S. H., Kim, J. Y., Oh, D. K., & Kim, S. W. (2007). An update on microbial carotenoid production: Application of recent metabolic engineering tools. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 77, Issue 3, pp. 505–512). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1206-3>
- FAO-WHO. (2021). Home | CODEXALIMENTARIUS FAO-WHO. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>
- Fontana, J. D. (2001). Carotenogenic Microorganisms. In *Food Microbiology Protocols* (Vol. 14, pp. 259–271). <https://doi.org/https://doi.org/10.1385/1-59259-029-2:259>
- Foong, L. C., Loh, C. W. L., Ng, H. S., & Lan, J. C. W. (2021). Recent development in the production strategies of microbial carotenoids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02967-3>
- Garcia-Cortes, A., Garcia-Vásquez, J. A., Aranguren-Díaz, Y. C. A., & Ramirez-Castrillón, M. (2020). Effects of cellular stress on pigment production in *Rhodotorula mucilaginosa/alborubescens* AJB01 strain from the Caribbean region of Colombia. In *bioRxiv* (p. 2020.05.20.107201). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.107201>
- Garcia, A., Garcia, J., & Aranguren, Y. (2020). *Effects of cellular stress on pigment production in*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.05.20.107201>
- Guamán-Burneo, C., & Carvajal-Barriga, J. (2009). Caracterización e identificación

- de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. *Universitas Scientiarum*, 14(2–3), 187. <https://doi.org/10.11144/javeriana.sc14-2-3.ceid>
- Jarboui, R., Baati, H., Fetoui, F., Gargouri, A., Gharsallah, N., & Ammar, E. (2012). Yeast performance in wastewater treatment: Case study of *Rhodotorula mucilaginosa*. *Environmental Technology*, 33(8), 951–960. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.603753>
- Kanzy, H. M., Nasr, N. F., El-Shazly, H. A. M., & Barakat, O. S. (2015). Optimization of carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(1), 456–469.
- Katsumata, T., Ishibashi, T., & Kyle, D. (2014). A sub-chronic toxicity evaluation of a natural astaxanthin-rich carotenoid extract of *Paracoccus carotinifaciens* in rats. *Toxicology Reports*, 1, 582–588. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.08.008>
- Kot, A. M., Błażej, S., Kieliszek, M., Gientka, I., Bryś, J., Reczek, L., & Pobiega, K. (2019). Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by *Rhodotorula* yeast strains in media containing agro-industrial waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2732-8>
- Kuepper, J., Zobel, S., Wierckx, N., & Blank, L. M. (2016). A rapid method to estimate NADH regeneration rates in living cells. *Journal of Microbiological Methods*, 130, 92–94. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.001>
- Latha, B. V., & Jeevaratanm, K. (2012). Thirteen-week oral toxicity study of carotenoid pigment from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 50(9), 645–651.
- Libkind, D., Brizzio, S., & Van Broock, M. (2004). *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude Lake. *Folia Microbiologica*, 49(1), 19–25. <https://doi.org/10.1007/BF02931640>
- Ligia, A. da C. C., Karen, Y. F. K., & Susan, G. K. (2017). Microbial production of carotenoids A review. *African Journal of Biotechnology*, 16(4), 139–146. <https://doi.org/10.5897/ajb2016.15763>
- Mannazzu, I., Landolfo, S., da Silva, T. L., & Buzzini, P. (2015). Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(11), 1665–1673. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1927-x>
- Manowattana, A., Techapun, C., Laokuldilok, T., Phimolsiripol, Y., & Chaiyaso, T. (2020). Enhancement of  $\beta$ -carotene-rich carotenoid production by a mutant *Sporidiobolus pararoseus* and stabilization of its antioxidant activity by

- microencapsulation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(8), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14596>
- Martinez-Moya, P., Niehaus, K., Alcaíno, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2015). Proteomic and metabolomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* using different carbon sources. *BMC Genomics*, 16(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1484-6>
- Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavala, A., & Aguilar, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: An overview. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 13, Issue 1, p. 12). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>
- Mathew, A. S., Wang, J., Luo, J., & Yau, S. T. (2015). Enhanced ethanol production via electrostatically accelerated fermentation of glucose using *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 5(October), 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep15713>
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., Warner, J. O., & Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370(9598), 1560–1567. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61306-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61306-3)
- McGarvey, D. J., & Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7(7), 1015–1026. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1015>
- McWilliams, A. (2018). *FOD025F The Global Market for Carotenoids BCC Research Report Overview The Global Market for Carotenoids*. <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E., & Bernet, N. (2016). Electro-Fermentation: How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 34, Issue 11, pp. 856–865). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.009>
- Okoro, O. V., Gholipour, A. R., Sedighi, F., Shavandi, A., & Hamidi, M. (2021). Optimization of exopolysaccharide (Eps) production by *Rhodotorula mucilaginosa* sp. gums16. *ChemEngineering*, 5(3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/chemengineering5030039>
- Park, P. K., Cho, D. H., Kim, E. Y., & Chu, K. H. (2005). Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. *World*



- Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(4), 429–434.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-004-1891-3>
- Pinheiro, M. J., Bonturi, N., Belouah, I., Miranda, E. A., & Lahtvee, P. J. (2020). Xylose metabolism and the effect of oxidative stress on lipid and carotenoid production in *Rhodotorula toruloides*: insights for future biorefinery. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(August), 1–15.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.01008>
- PROFECO. (2020). *Informa Profeco sobre colorantes artificiales en los alimentos | Procuraduría Federal del Consumidor | Gobierno | gob.mx*.  
<https://www.gob.mx/profeco/prensa/informa-profeco-sobre-colorantes-artificiales-en-los-alimentos?idiom=es>
- Rafiqul, I. S. M., & Sakinah, A. M. M. (2013). Processes for the Production of Xylitol—A Review. In *Food Reviews International* (Vol. 29, Issue 2, pp. 127–156). Taylor & Francis Group . <https://doi.org/10.1080/87559129.2012.714434>
- Román-Paez, Melissa, Cadavid-Muñoz, Natalia, Betancur-Nieto, María Isabel, Martínez-Valera, B. (2017). Implementación de la extracción y análisis de  $\beta$ -caroteno en zanahoria (*Daucus carota* L.) por fluidos supercríticos (FSC) y UHPLC-DAD. <https://186.113.6.49/index.php/Encuentro/article/view/2180>
- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., & Bourtoom, T. (2011). 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. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(1), 23–33.  
<https://doi.org/10.1007/s12257-010-0083-2>
- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2019). Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: an updated review of critical issues. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(5), 657–674.  
<https://doi.org/10.1007/s10295-018-2104-7>
- Schievano, A., Pepé Sciarria, T., Vanbroekhoven, K., De Wever, H., Puig, S., Andersen, S. J., Rabaey, K., & Pant, D. (2016). Electro-Fermentation – Merging electrochemistry with fermentation in industrial applications. *Trends in Biotechnology*, 34(11), 866–878. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.007>
- Shin, H., Zeikus, J., & Jain, M. (2002). Electrically enhanced ethanol fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), 476–481. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0923-2>
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. M. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>
- Sridhar, K., Inbaraj, B. S., & Chen, B. H. (2021). Recent advances on nanoparticle

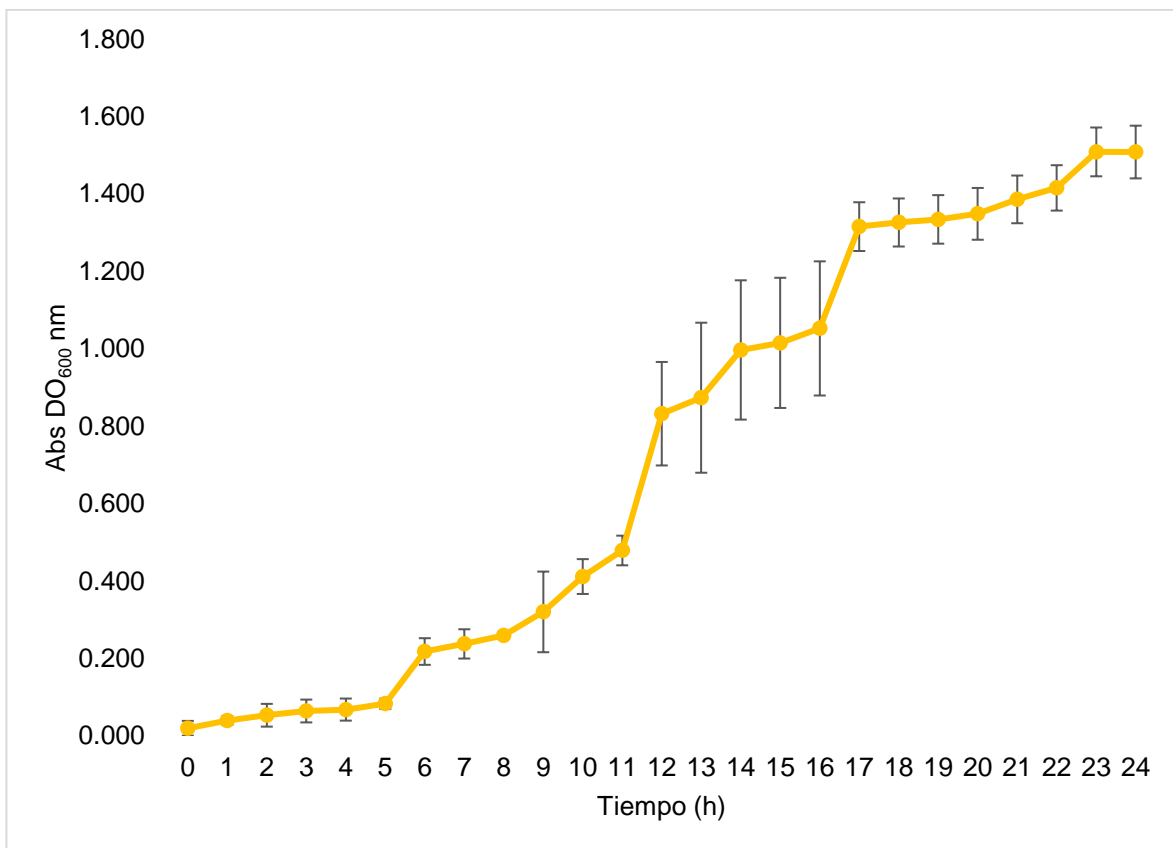
- based strategies for improving carotenoid stability and biological activity. *Antioxidants*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/antiox10050713>
- Tang, W., Wang, Y., Zhang, J., Cai, Y., & He, Z. (2019). Biosynthetic pathway of carotenoids in *Rhodotorula* and strategies for enhanced their production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507–517. <https://doi.org/10.4014/jmb.1901.01022>
- Tkáčová, J., Čaplová, J., Klemková, T., & Čertík, M. (2017). Correlation between lipid and carotenoid synthesis in torularhodin-producing *Rhodotorula glutinis*. *Annals of Microbiology*, 67(8), 541–551. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1284-0>
- Venkata Mohan, S., Velvizhi, G., Vamshi Krishna, K., & Lenin Babu, M. (2014). Microbial catalyzed electrochemical systems: A bio-factory with multi-facet applications. In *Bioresource Technology* (Vol. 165, Issue C, pp. 355–364). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.048>
- Wang, Q., Liu, D., Yang, Q., & Wang, P. (2017). Enhancing carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa* KC8 by combining mutation and metabolic engineering. *Annals of Microbiology*, 67(6), 425–431. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1274-2>
- Yolmeh, M., & Khomeiri, M. (2017). Effect of mutagenesis treatment on antimicrobial and antioxidant activities of pigments extracted from *Rhodotorula glutinis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.04.007>
- Yoon, S. H., Lee, S. H., Das, A., Ryu, H. K., Jang, H. J., Kim, J. Y., Oh, D. K., Keasling, J. D., & Kim, S. W. (2009). Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of  $\beta$ -carotene in *E. coli*. *Journal of Biotechnology*, 140(3–4), 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.01.008>
- Zhang, H., Yang, Q., Lin, H., Ren, X., Zhao, L., & Hou, J. (2013). Phytic acid enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula mucilaginosa* against postharvest gray mold spoilage and natural spoilage of strawberries. *LWT - Food Science and Technology*, 52(2), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.027>
- Zhang, Z., Zhang, X., & Tan, T. (2014). Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. *Bioresource Technology*, 157, 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.039>

## 10. ANEXOS

### 10.1 Anexo 1: Evaluación de curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio YPS a 24 h

Se evaluó el crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio YPS a 30 °C y 160 rpm durante 24 h para conocer el tiempo de cada una de las fases. En agar YPD g/L: 10 extracto de levadura, 20 peptona de caseína, 20 dextrosa y 15 agar, pH 5 se sembró una muestra directamente de la conserva y se incubó durante 36 h hasta que fueron visibles las unidades formadoras de colonias (UFC). Se tomó una UFC y se inoculó en 30 mL de medio YPS en un matraz de 150 mL con tapón de algodón y pellón quirúrgico. Se incubaron los matraces por triplicado más un blanco en incubadora orbital (Prendo, INO 650V-9). Se tomó 1 mL de muestra cada hora y se midió la absorbancia a densidad óptica (DO) de 600 nm en espectrofotómetro (Thermoscientific, Genesys 10s UV-Vis).

En la Figura 12 se pueden apreciar los resultados de la curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio YPS a 30 °C, 160 rpm, durante 24 h expresados en absorbancia. Se observó que la fase de adaptación comprende de las 0 h a las 5 h, la fase exponencial comienza a las 5 h, a las 17 h que es cuando llega a una tentativa fase estacionaria. Sin embargo, continúa el crecimiento, por lo tanto, esta curva se empleó únicamente para estandarizar el tiempo de incubación para la preparación de conservas. Así como para definir el tiempo de adaptación de *R. mucilaginosa* en medio YPS para la preparación de inóculos en los tratamientos de la presente investigación.



**Figura 12** Curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio YPS a 24 h

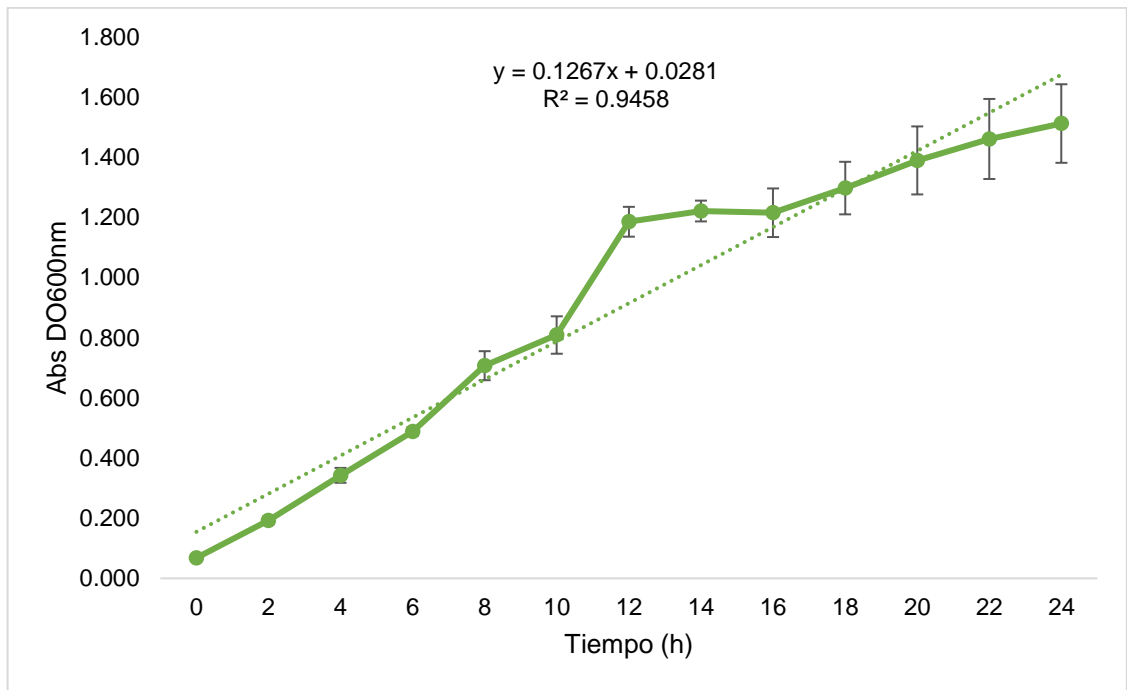
### 10.2 Anexo 2: Evaluación de curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio de fermentación relación C/N 50 a 24 h

Se evaluó el crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio de fermentación restringido, relación C/N 50: glucosa 53.0 g L<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g L<sup>-1</sup> y NaCl 0.3 g L<sup>-1</sup>, el pH se ajustó a 7.0 con soluciones de NaOH y HCl, a 30 °C y 160 rpm durante 24 h. Se sembró una muestra directamente de la conserva en agar YPD y se incubó durante 36 h hasta que fueron visibles las UFC. Se tomó una UFC y se inoculó en 30 mL de medio de fermentación relación C/N 50 en un matraz de 150 mL con tapón de algodón y pellón quirúrgico. Se incubaron los matraces por triplicado más un blanco en incubadora orbital (Prendo, INO 650V-9). Se tomó 1 mL de muestra cada hora y se midió la absorbancia a densidad óptica (DO) de 600 nm en espectrofotómetro (Thermoscientific, Genesys 10s UV-Vis).

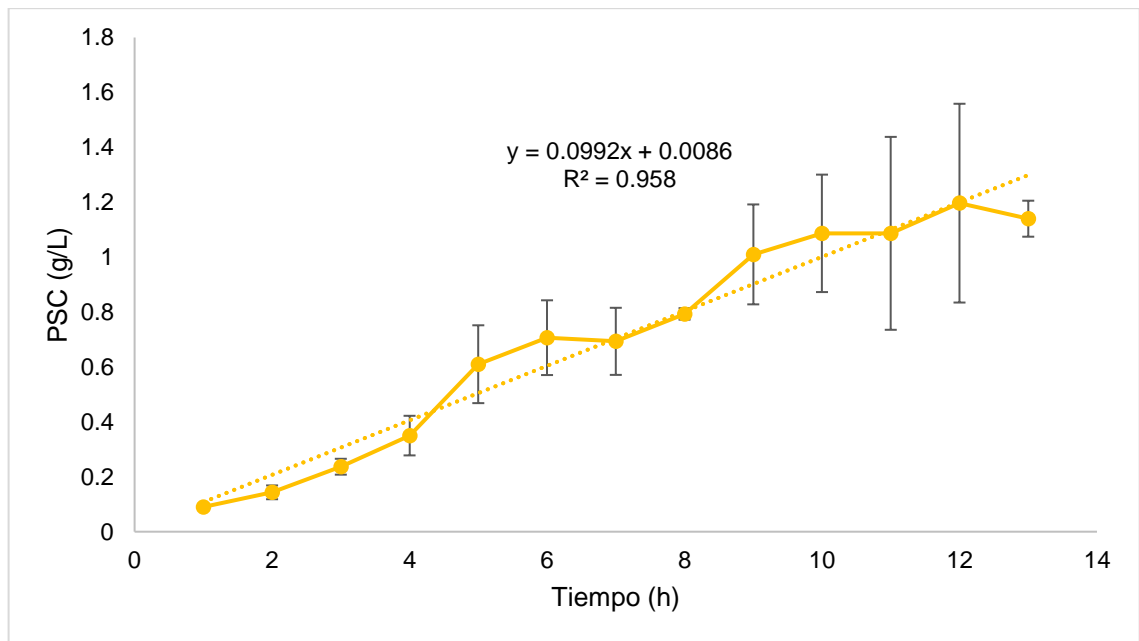
La biomasa se determinó como peso seco celular (PSC), se tomaron 10 mL de muestra de cada biorreactor a las 0 h y 72 h, inicio y fin de la fermentación. Se centrifugaron a 1,600 x g por 15 min, la pastilla celular se lavó dos veces con agua destilada, se suspendió en 2 mL de agua destilada, se vertió en una charola de aluminio y se secó en el horno a 105 °C durante 2 h monitoreando la masa hasta llegar a peso constante (Kanzys et al., 2015) en una balanza analítica (Pioneer, modelo PX224/E AM- Ohaus).

En la Figura 13 se pueden apreciar los resultados de la curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio de fermentación relación C/N 50 a 30 °C, 160 rpm, durante 24 h, expresados en absorbancia. Se observó que la fase de adaptación se logró eliminar al preparar el inóculo en el mismo medio de fermentación y se mantuvo en fase exponencial durante las 24 h de la prueba.

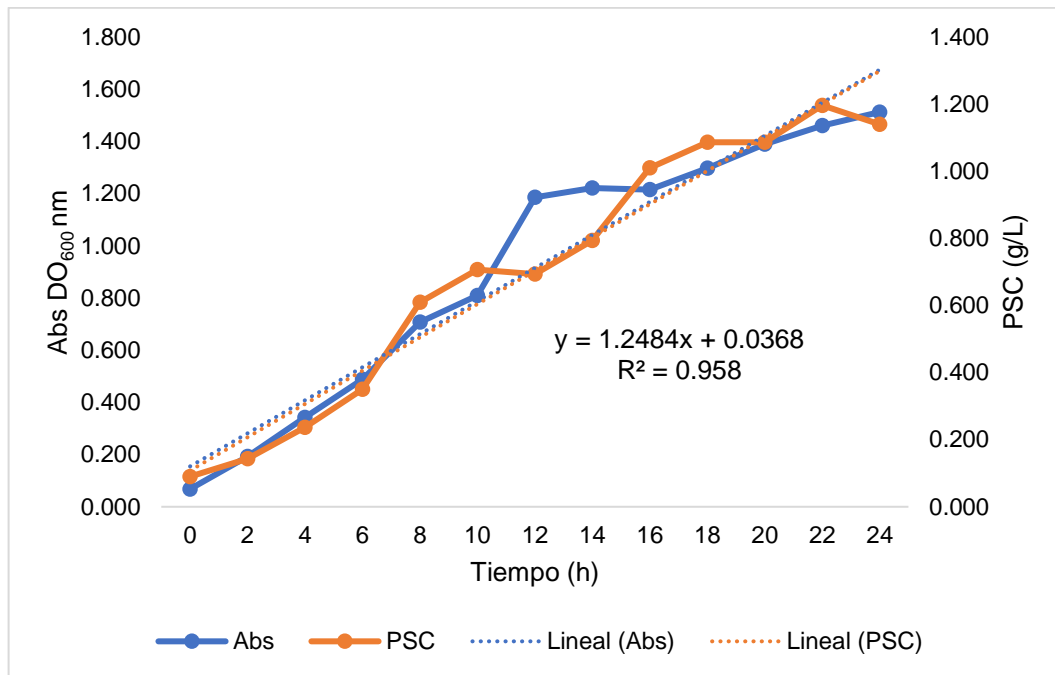
En la Figura 14 se muestran los resultados de producción de biomasa (PSC) por *R. mucilaginosa* en medio de fermentación relación C/N 50 a 30 °C, 160 rpm, durante 24 h. Se observó variación en la linealidad de la recta, lo cual se puede atribuir a la agitación del medio durante las tomas.



**Figura 13** Curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio de fermentación relación C/N 50 durante 24 h



**Figura 14** Producción de biomasa por *R. mucilaginosa* en medio de fermentación relación C/N 50 durante 24 h



**Figura 15** Relación de absorbancia (Abs) y producción de biomasa (PSC) por *R. mucilaginosa* en medio de fermentación relación C/N 50 a 24 h

En la Figura 15 se presenta la relación de la absorbancia a DO<sub>600</sub> en conjunto con la determinación de peso seco celular, donde se determinó la ecuación de la recta y con estos valores poder calcular la concentración (x) cuando se tiene un valor de absorbancia (y).