



Universidad Autónoma de Querétaro.

Facultad de Química.

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la  
República (PROPAC)

**Aplicación de la superficie de respuesta en la optimización de la producción  
microbiológica de zeaxantina**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología en Alimentos.

Presenta:

Ing. Agroindustrial Martín García Flores

Centro Universitario.

Santiago de Querétaro, Qro., Enero de 2010



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República  
(PROPAC)

**Aplicación de la superficie de respuesta en la optimización de la producción  
microbiológica de zeaxantina**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología en Alimentos

**Presenta:**

Ing. Agroindustrial Martín García Flores.

**Dirigido por:**

Dr. Eleazar M. Escamilla Silva.

Dr. Eleazar M. Escamilla Silva.

Presidente.

\_\_\_\_\_.

Dr. Carlos Regalado González.

Secretario.

\_\_\_\_\_.

Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche.

Vocal.

\_\_\_\_\_.

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga.

Suplente.

\_\_\_\_\_.

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano.

Suplente.

\_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz  
Director de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Dr. Luis G. Hernández Sandoval.  
Director de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro, Qro.  
Enero de 2010  
México

## RESUMEN

El carotenoide zeaxantina es un pigmento vegetal de gran importancia comercial debido a la diversidad de aplicaciones en la industria de los alimentos, incluyendo a la avicultura, la farmacéutica, los lácteos, y la panificación. En el campo de la salud humana se obtienen grandes beneficios del pigmento, como elevar la calidad de vida debido sus cualidades antioxidantes, por lo cual es necesario el estudio de la producción microbiológica del colorante zeaxantina a efecto de mejorar dicho proceso. Para lograr la optimización de la producción microbiológica de la zeaxantina se utilizó la cepa ATCC No. 21588 de *Flavobacterium sp.*, la cual se llevó a cabo mediante la técnica de fermentación de cultivo sumergido con células en suspensión en una relación inóculo: medio de cultivo de 5 a 10 por ciento, en un reactor de tanque agitado de 14 l. Se utilizó un diseño central compuesto de Box-Beknhen (15 tratamientos) para investigar los efectos de los niveles de aireación, mezclado y el de inóculo/medio de fermentación. Los nutrientes en el medio de cultivo fueron: fuente de carbono (licor de remojo de maíz), nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), manteniendo constante una concentración de magnesio de 1.5 g/l y oligoelementos de 0.5 ml/l y las condiciones de operación: temperatura ( $27^\circ\text{C}$ ), pH (7), mezclado (200 – 400 rpm) y flujo de aire (0.6 – 0.9 vvm). El análisis de varianza y las gráficas de superficie de respuesta de los datos obtenidos muestran que los factores más significativos son: aireación y mezclado, con un nivel de confianza del 95%. El análisis estadístico permitió encontrar las condiciones óptimas para la producción de zeaxantina en un tiempo relativamente corto; los valores fueron: aireación = 0.680 vvm, mezclado = 264 rpm, obteniendo con esta información un valor óptimo de 56.865 ppm, con una productividad de 1.420 mg/ [(l)/ (h)] en un tiempo de 40 horas de haber iniciado la fermentación y con un porcentaje de inóculo/medio de cultivo = 7.590. Un análisis estadístico posterior, considerando solamente los factores de aireación y mezclado, predice que la concentración óptima de zeaxantina será de de 82.336 ppm. La concentración promedio de zeaxantina lograda en este trabajo fue de 1.018 mg/ml con el empleo de licor de remojo de maíz como fuente de carbono que mejora el nivel de producción del carotenoide.

**(Palabras clave:** *Flavobacterium*, carotenoide, zeaxantina, aireación, mezclado, superficie de respuesta.)

## SUMMARY

The carotenoid zeaxanthin is a plant pigment of great commercial importance due to the diversity of applications in the food industry, including poultry, pharmaceuticals, dairy, and bakery. In the field of human health is highly profitable, and improving the quality of life because of its antioxidant qualities, so it is necessary to study the microbial production of zeaxanthin to improve the production process. To achieve the optimization of microbial production of zeaxanthin was used strain ATCC No. 21588 of *Flavobacterium sp.*, which was carried out using the technique of submerged culture fermentation with cells suspended in a relationship inoculum: culture 5 to 10% in a stirred tank reactor of 14 lt. A central composite design of Box-Beknhen (15 treatments) was used to investigate the effects of levels of aeration, mixing and the percentage of inoculum / fermentation medium. The nutrients in the culture medium were: carbon source (corn steep liquor), nitrogen ( $\text{NH}_4\text{SO}$ ), phosphorus ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), holding a constant magnesium concentration of 1.5 g / l and trace elements 0.5 ml / l and the following process conditions : temperature ( $27^\circ \text{C}$ ), pH (7), mixing (200 - 400 rpm) and airflow (0.6 - 0.9 vvm). The analysis of variance and response surface plots of the data obtained show that the most significant factors are: aeration and mixing, with a confidence level of 95%. The statistical analysis allowed to find the optimal conditions for production of zeaxanthin in a relatively short time, the values were: aeration = 0.680 vvm, mixing = 264 rpm, obtaining with this information an optimal value of 56.865 ppm with a productivity of 1.420 mg / [(l)/ (h)] in a time of 40 hours of starting fermentation and with a percentage of inoculum / culture medium = 7.590. A subsequent statistical analysis, considering only the factors of aeration and mixing, predicts that the optimal concentration of zeaxanthin will be 82.336 ppm. The average concentration of zeaxanthin achieved in this study was 1.018 mg / ml with the use of corn steep liquor as a carbon source that enhances the level of carotenoid production.

**(Keywords:** *Flavobacterium*, carotenoid, zeaxanthin, aeration, mixing, surface response.)

## AGRADECIMIENTOS

A la UAQ (Universidad Autónoma de Querétaro) por haberme brindado generosamente la inigualable oportunidad de alcanzar el grado académico que hoy obtengo.

Al CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por la beca otorgada para llevar a cabo el trabajo de investigación.

Al ITC (Tecnológico de Celaya) por facilitarnos el Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería.

Al Dr. Eleazar M. Escamilla Silva por integrarme a su grupo de investigación y por su actitud positiva y reconocida calidad humana.

A todos los integrantes del PROPAC (Programa del Posgrado en Alimentos del Centro de la República) por facilitarme los conocimientos en el área estratégica que es la alimentación para nuestro México.

A todos los integrantes de la Generación PROPAC 2007-2009, por la fineza y consideración en el trato para con mi persona. Para todos, mi más grato recuerdo y aprecio.

### OLD IRISH BLESSING.

May the road rise to meet you,  
May the wind be always at your back,  
May the sunshine warm upon your face,  
And the rains fall soft upon yours fields...  
And until we meet again,  
May GOD hold you in the palm of His hand.

## **DEDICATORIAS**

### **A toda mi familia**

A mis Padres José García Fernández y Rosa Flores Estrada.

A mi esposa Celia Amézquita López.

A mis Hijos Mateo García Amézquita y Marcela García Amézquita.

A mis Nietos Mateo García Granados y Daniel García Granados.

A todos los trabajadores mexicanos en el país y en el extranjero, porque con su esfuerzo y generoso empeño en hacer todos los días su trabajo bien hecho, son el ejemplo a seguir para que todos contribuyamos al logro de las metas que nuestra sociedad merece: Vivir en paz, armonía y progreso social en nuestra Nación Mexicana.

### **A DIOS, UNA ORACIÓN:**

Thank you God for little things that often come our way,  
Things we take for granted, but don't mention when we pray,  
The unexpected courtesy, the thoughtful kindly deed,  
A hand reaches out to help us in the time of sudden need,  
Oh! Make us more aware dear GOD of little daily graces,  
That come to us with sweet surprise, from never dreamed of places.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>i</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIAS</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>xii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1 Antecedentes históricos	4
2.2 Carotenoides	5
2.2.1 Generalidades	5
2.2.2 Estructura	6
2.2.3 Característica físicas y químicas	7
2.2.4 Examen físico	11
2.2.5 Clasificación	12
2.2.5.1 Clasificación estructural	12
2.2.5.2 Clasificación según su actividad biológica	13
2.2.6 Fuentes potenciales de carotenoides en la naturaleza	13
2.2.6.1 Plantas superiores	14
2.2.6.2 Algas	14
2.2.6.3 Líquenes	15
2.2.6.4 Hongos y levaduras	15
2.2.6.5 Bacterias	15
2.2.6.6 Tejidos animales	16
2.2.7 Biosíntesis de carotenoides	16
2.2.7.1 Regulación de la biosíntesis de carotenoides	19
2.2.8 Síntesis química	23
2.2.9 Extracción y purificación de carotenoides	24
2.2.9.1 Extracción	24
2.2.9.2 Saponificación	24
2.2.9.3 Separación y purificación	25
2.2.10 Identificación y caracterización de carotenoides	25
2.2.11 Funciones y usos	26

2.3	Xantofilas	29
2.3.1	Formación de xantofilas	29
2.3.2	Zeaxantina (3R, 3R'-β-β-caroteno-3-3' diol)	31
2.3.2.1	Biosíntesis de zeaxantina	33
2.3.2.2	Alternativas de obtención de zeaxantina	36
2.4	Biorreactores	41
2.5	Características del género <i>Flavobacterium</i>	45
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>48</b>
3.1	Objetivo general	48
3.2	Objetivos específicos	48
<b>IV.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
4.1	Equipo de trabajo	49
4.2	Material biológico	50
4.3	Acondicionamiento y mantenimiento de la cepa bacteriana	54
4.3.1	Acondicionamiento de <i>Flavobacterium sp</i> ATCC 21588	54
4.3.2	Pruebas de salinidad	54
4.3.3	Propagación y mantenimiento de <i>Flavobacterium sp.</i>	55
4.4	Medio de cultivo	55
4.4.1	Condiciones de propagación para llevar a cabo los tratamientos	55
4.4.2	Características del inóculo	56
4.4.3	Muestreo	56
4.5	Selección del diseño experimental	56
4.5.1	Análisis estadístico	58
4.5.2	Gráficas de superficie de respuesta	58
4.6	Cinética de crecimiento para <i>Flavobacterium sp.</i> ATCC 21588	58
4.7	Caracterización y cuantificación de zeaxantina	59
4.7.1	Extracción y purificación del estándar de maíz amarillo	59
4.7.1.1	Extracción	59
4.7.1.2	Purificación del estándar de maíz amarillo	60
4.7.2	Extracción del pigmento que proviene de las fermentaciones con <i>Flavobacterium sp.</i> ATCC No. 21588	62
4.7.3	Análisis infrarrojo del estándar de maíz y del pigmento obtenido en las fermentaciones con <i>Flavobacterium sp.</i>	62

4.7.4	Análisis HPLC del estándar de maíz obtenido en las fermentaciones con <i>Flavobacterium sp.</i> ATCC 21588	62
4.7.5	Determinación de la longitud de onda máxima de absorción del estándar de maíz amarillo, así como del pigmento bacteriano	63
4.7.6	Determinación de la concentración de zeaxantina por Espectrofotometría visible	63
4.8	Modelo logístico de crecimiento de Pearl Reed (Minitab, 2009)	65
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
5.1	Reactivación de la cepa de <i>Flavobacterium sp.</i> ATCC 21588	66
5.1.1	Pruebas de salinidad	67
5.2	Medio de cultivo	67
5.3	Cinética de crecimiento para <i>Flavobacterium sp.</i> ATCC 21588	68
5.3.1	Patrón de crecimiento del microorganismo	69
5.3.2	Consumo de glucosa	71
5.3.3	Consumo de nitrógeno	72
5.3.4	Consumo de fosfato	73
5.3.5	Patrón de formación de producto	74
5.3.6	Evolución del pH durante la fermentación	75
5.3.7	Desaparición del oxígeno presente en el medio en función del tiempo de fermentación	76
5.4	Caracterización y cuantificación de zeaxantina	78
5.4.1	Extracción del estándar de maíz amarillo	78
5.4.2	Purificación del estándar de maíz amarillo	78
5.4.3	Extracción del pigmento de las fermentaciones con <i>Flavobacterium sp.</i>	81
5.4.4	Análisis infrarrojo del estándar de maíz amarillo	81
5.4.5	Determinación de la longitud de onda máxima de absorción del estándar de maíz amarillo	83
5.4.6	Determinación de la concentración de zeaxantina por espectrofotometría uv-vis	84
5.4.7	Determinación de la concentración de zeaxantina por HPLC y fluorescencia	85
5.5	Análisis estadístico	87
5.5.1	Análisis de varianza del modelo experimental	87
5.5.2	Gráficas de superficie de respuesta	96
5.5.2.1	Gráfica de superficie de respuesta $X_1, X_2$	96
5.5.2.2	Gráfica de superficie de respuesta $X_2, X_3$	98
5.5.2.3	Gráfica de superficie de respuesta $X_1, X_3$	100

5.6	Técnicas analíticas	102
5.6.1	Curva de calibración para determinación de azúcares reductores totales. DNS (Miller, 1953)	102
5.6.2	Curva de calibración para determinación de fosfatos	103
5.7	Gráficas de crecimiento bacteriano con el modelo de tendencia “S” Curve, Pearl-Reed (Minitab, 2009)	104
5.8	Gráficas de crecimiento bacteriano con modelo de tendencia polinomial (Excel, 2007)	105
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>106</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>108</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
2.1 Características físicas y químicas de la zeaxantina	31
2.2 Resistencia y sensibilidad a antibióticos de <i>Flavobacterium sp.</i>	47
2.3 Perfiles de producción de carotenoides de algunas cepas bacterianas	47
4.1 Medio de cultivo utilizado para fermentación de <i>Flavobacterium sp.</i> cepa ATCC 21588	55
4.2 Factores que se incluyen en el modelo experimental	56
4.3 Factores experimentales con sus niveles de operación	57
4.4 Estructura del diseño central compuesto Box-Bekhen	57
4.5 Construcción de la curva de calibración de zeaxantina	64
5.1 Densidad microbiana y concentración de pigmento obtenidos con diferentes concentraciones de NaCl	67
5.2 Datos para la construcción de curva de crecimiento para <i>Flavobacterium sp.</i> cepa ATCC 21588, empleando el medio de cultivo sugerido por Morones <i>et al</i> , 2001	69
5.3 Datos experimentales para la obtención de la curva de calibración de zeaxantina usando como estándar un extracto saponificado de maíz amarillo	84
5.4 Reporte de resultados de lectura por HPLC	86
5.5 Resultados de producción de zeaxantina utilizando el diseño central compuesto Box-Beknhen	88
5.6 Análisis del ajuste del modelo experimental	90
5.7 Análisis de la falta de ajuste del modelo experimental	90
5.8 Análisis de varianza	91
5.9 Valores de los efectos de los factores experimentales	91
5.10 Coeficientes estimados de la ecuación cuadrática del modelo experimental	93

5.11 Datos para a) curva de calibración y b) Curva de recalibración, para cuantificar azúcares reductores	102
5.12 Datos para curva de calibración de fosfatos	103

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Estructuras de los carotenoides naturales más importantes en la industria	8
2.2	Posible esquema de degradación para los carotenoides	10
2.3	Propiedades físicas y químicas importantes de los carotenoides	11
2.4	Absorción de los isómeros de zeaxantina	12
2.5	Vía de biosíntesis de los compuestos carotenoides	17
2.6	Ruta simplificada de biosíntesis de carotenoides que se acumulan en <i>Flavobacterium sp.</i> cepa ATCC 21588	18
2.7	La reacción de Wittiz en la producción sintética de zeaxantina	23
2.8	Síntesis de (3R, 3-R)-zeaxantina de acuerdo con Widmer et al, 1990	24
2.9	Funciones o acciones que promueven la salud atribuidas a los carotenoides	28
2.10	Vías alternativas en la biosíntesis de zeaxantina a partir de neuroesporeno en <i>Flavobacterium sp.</i>	30
2.11	Estructura de zeaxantina	31
2.12	Estructura química de la zeaxantina en la conformación <i>trans</i> , <i>9-cis</i> , <i>13-cis</i> , y <i>15-cis</i>	32
2.13	Compuestos precursores y principales carotenos y xantofilas en la ruta biosintética de carotenoides en las plantas	35
2.14	Biorreactor de tanque agitado típico	44
2.15	Factores importantes que afectan la producción de zeaxantina	46
4.1	Secuencia para la obtención y análisis de zeaxantina del maíz amarillo	51
4.2	Secuencia para la obtención de zeaxantina por el proceso de fermentación en matraz agitado	52
4.3	Secuencia para la obtención de zeaxantina por el proceso de fermentación en biorreactor de tanque agitado	53

4.4	Montaje de columna cromatográfica para purificación del estándar de maíz	61
4.5	Análisis de crecimiento del microorganismo de acuerdo con el modelo de Pearl-Reed	65
5.1	Siembra de <i>Flavobacterium sp.</i> en caja petri	66
5.2	Vista al microscopio de <i>Flavobacterium sp.</i>	66
5.3	Biorreactor de tanque agitado	68
5.4	Cultivo sumergido de <i>Flavobacterium sp.</i> cepa ATCC No. 21588	68
5.5	Crecimiento de <i>Flavobacterium sp.</i> cepa ATCC 21588 expresado en logaritmos, en cultivo en lote	70
5.6	Evolución de la concentración de glucosa durante la fermentación con <i>Flavobacterium sp.</i> cepa ATCC 21588	71
5.7	Evolución de la concentración de nitrógeno durante la fermentación con <i>Flavobacterium sp.</i> cepa ATCC 21588	73
5.8	Evolución de la concentración de fosfatos durante la fermentación con <i>Flavobacterium sp.</i> cepa ATCC 21588	73
5.9	Formación de zeaxantina con <i>Flavobacterium sp.</i> cepa ATCC 21588 en función del tiempo de fermentación en un medio con licor de remojo de maíz	74
5.10	Evolución del pH durante el transcurso de la fermentación con <i>Flavobacterium sp.</i> cepa ATCC 21588 en medio de cultivo con licor de remojo de maíz	75
5.11	Variación de la concentración de oxígeno presente en el medio durante la fermentación con <i>Flavobacterium sp.</i> cepa ATCC 21588	77
5.12	Extracción del pigmento de maíz amarillo	78
5.13	Cromatografía en capa fina de extracto de maíz saponificado	79
5.14	Purificación de estándar de maíz amarillo	80
5.15	Cromatografía ascendente en capa fina, para purificación del estándar de maíz amarillo	81
5.16	Espectro de infrarrojo de extracto de maíz amarillo saponificado	82

5.17	Espectro UV-VIS de extracto de maíz amarillo saponificado	83
5.18	Curva de calibración para cuantificación de zeaxantina determinada a 448 nm usando acetona como blanco	85
5.19	Concentración de zeaxantina por HPLC por la técnica de Absorbancia y fluorescencia	85
5.20	Diagrama causa-efecto del diseño experimental de Box-Beknhen	87
5.21	Gráfica de la respuesta en cada uno de los tratamientos en serie de tiempo	89
5.22	Respuesta promedio de zeaxantina de acuerdo al modelo experimental de Box-Beknhen, con intervalos de confianza de 95%	90
5.23	Coefficientes estimados del modelo	92
5.24	Gráfica de Pareto de los efectos principales	92
5.25	Perfil predictivo de los factores en sus tres niveles	94
5.26	Interacciones de los factores en sus tres niveles	95
5.27	Gráfica con los valores de la respuesta en las esquinas del cubo	95
5.28	Gráfica de superficie de respuesta de los factores $X_1$ y $X_2$ (Statistics, 2009)	96
5.29	Gráfica de superficie de respuesta de los factores $X_1$ y $X_2$ (Minitab, 2009)	97
5.30	Gráfica de superficie de respuesta de los factores $X_2$ y $X_3$ (Statistics, 2009)	98
5.31	Gráfica de superficie de respuesta de los factores $X_2$ y $X_3$ (Minitab, 2009)	99
5.32	Gráfica de superficie de respuesta de los factores $X_1$ y $X_3$ (Statistics, 2009)	100
5.33	Gráfica de superficie de respuesta de los factores $X_1$ y $X_3$ (Minitab, 2009)	101
5.34	a) Curva de calibración y b) Curva de Recalibración para cuantificar azúcares reductores	102
5.35	Curva de calibración para cuantificar fosfatos	103
5.36	Gráfica de análisis de tendencia de experimento 4 (Minitab, 2009)	104
5.37	Gráficas de residuos para experimento 4 (Minitab, 2009)	104
5.38	Gráfica de análisis de tendencia de experimento 4 (Excel, 2007)	105

## I. INTRODUCCIÓN

En el medio ambiente que nos rodea encontramos una importante cualidad de los seres vivos y de los objetos: el color. El color forma una parte esencial en el desarrollo del hombre, en sus diversas manifestaciones sociales, culturales y ambientales. El color se basa en una serie de procesos físicos, químicos, fisiológicos y psicológicos. En el área de los alimentos, la aplicación de los colorantes es relevante y se usan como aditivos, pues no son los constituyentes esenciales. De acuerdo con el *Codex Alimentarius* de 1988, un aditivo es aquella sustancia que se añade de manera intencional a los alimentos, por lo general en pequeña cantidad, para mejorar su apariencia, sabor, color, para ayudar a su preservación, etc.

Con respecto a los colorantes, un aditivo colorido de acuerdo con la FDA (Federal Drug Administration, 1986): es cualquier colorante, pigmento u otra sustancia obtenida por síntesis o artificio similar o extraída, aislada o derivada, con o sin intermediarios del cambio final de identidad a partir de un vegetal, animal o mineral u otra fuente y que cuando es añadida o aplicada a los alimentos, medicamentos o cosméticos, al cuerpo humano o a cualquier parte, por sí misma es capaz (sola o a través de una reacción con otra sustancia) de impartir color.

En la actualidad, la producción de colorantes naturales es uno de los segmentos de mayor interés en el campo de la ciencia y tecnología en alimentos, ya que dicha disciplina nos permite combinar herramientas procedentes de la biotecnología, con la ingeniería de control de procesos y la ingeniería genética para obtener metabolitos específicos y en proporciones mayores. Una de las fuentes más ricas proveedoras de recursos y que han ampliado las posibilidades de obtención de pigmentos naturales son las bacterias, grupo al cual pertenece el género *Flavobacterium sp.*, (*Paracoccus zeaxanthinifaciens*), es una fuente fotosintética, de origen marino para la producción microbiológica de la zeaxantina; su importancia es de tal relevancia en la investigación de procesos de síntesis microbiológica que actualmente se encuentra clasificada en el ATCC (American Type Culture Collection) con el nombre de *Paracoccus zeaxanthinifaciens*.

La zeaxantina como producto de la síntesis microbiológica es la más segura en términos de reducción de riesgos para la salud del consumidor. Sus niveles de toxicidad y efectos residuales cancerígenos, como resultado de su metabolismo, son menores a los generados por los productos de síntesis química (Morones *et al.*, 2001).

La anterior es una de las razones por las cuales la sustitución de colorantes artificiales, por los de origen natural y microbiológico, presenta una tendencia de incrementos constantes en el mercado de los colorantes, aunado además a que los países en desarrollo están emitiendo la legislación correspondiente para proteger la salud humana y se prevé la reducción y prohibición de el uso de colorantes artificiales en el mediano plazo en las economías consumidoras del producto.

Las xantófilas, subdivisión de los carotenoides, son mezclas que incluyen luteína, cantaxantina, criptoxantina, neoxantina, violaxantina y zeaxantina, y se obtienen por el proceso de fermentación sumergida con las bacterias en suspensión, inmersas en la fase acuosa del medio fermentativo optimizado y con control sobre los valores críticos de los parámetros que determinan el crecimiento y la producción de la bacteria. La zeaxantina es un producto intracelular que se extrae de la masa celular mediante una serie de operaciones unitarias y con el uso de solventes orgánicos apropiados (Morones *et al.*, 2001). Otro de los elementos que son indispensables para llevar a cabo el proceso de la fermentación y producir microbiológicamente la zeaxantina es el biorreactor; en nuestro estudio utilizamos un biorreactor de 14 l de capacidad.

La superficie de respuesta es una herramienta estadística que combina los conceptos de regresión lineal con técnicas de optimización con el propósito de establecer los valores críticos de los parámetros en los que se obtiene la mejor producción de dicho metabolito. Se estableció el diseño experimental de Box-Beknhen con tres factores y 15 tratamientos para aplicar el método MSR (metodología de superficie de respuesta).

En el presente trabajo, se propuso la optimización de la producción microbiológica de la zeaxantina, aplicando la metodología de la superficie de respuesta, obteniendo un pigmento natural que se produce en el metabolismo secundario de la bacteria *Flavobacterium sp.*, para que se pueda utilizar como aditivo alimentario en aquellos productos de naturaleza lipídica de consumo humano, en la avicultura, en la fabricación de medicamentos y cosméticos, que no presenten riesgos a la salud del consumidor y que sirva como base de datos para generar las condiciones adecuadas de operación y control del procesamiento microbiológico de la zeaxantina en un biorreactor de tanque agitado.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Antecedentes históricos

Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado sustancias colorantes para la mayoría de sus actividades, obteniéndolas de fuentes diversas, ya sea vegetales, minerales o animales. Hasta mediados del siglo XIX, los colorantes empleados eran exclusivamente naturales (Devore, 1976). Sin embargo, con el desarrollo de la tecnología y las ciencias químicas, éstos fueron sustituyéndose poco a poco por sustancias sintéticas, debido a que en algunos casos, el pigmento natural tenía menor definición, poseía olores o sabores indeseables, presentaba poca estabilidad frente a cambios bruscos de pH, temperatura, luz, radiaciones, iones metálicos, actividad enzimática, etc., y sobre todo, al hecho de que, con el desarrollo de las metodologías de síntesis química, la extracción de colorantes de fuentes naturales, se hizo extremadamente cara (Agraz, 1993).

No obstante, posteriormente se demostró que muchas de las sustancias obtenidas químicamente causaban daño a la salud, lo que llevó a la tendencia a regresar a la utilización de fuentes naturales, decisión que fue apoyada por la aceptación de los consumidores. Además, actualmente existe mucha información acerca de cómo podrían minimizarse o incluso eliminarse, las desventajas por las cuales dejaron de utilizarse los colorantes naturales, tales como el uso de condiciones favorables, utilización de agentes quelantes, pHs adecuados, baja actividad de agua, etc. (Agraz, 1993).

Por lo anterior, actualmente es importante el uso de colorantes naturales, particularmente en la industria alimentaria, porque se ha visto que en este caso, la exposición al daño es más directa, y debido a esto, ya desde hace algunos años, la legislación sanitaria a nivel mundial ha prohibido una cantidad importante de sustancias químicas sintéticas que eran empleadas en alimentos por considerarlas tóxicas para el humano. Los colorantes naturales no sólo cumplen con las nuevas especificaciones sino que algunos también, brindan beneficios adicionales, tal como en el caso de los carotenoides que presentaban además, en algunos sistemas biológicos, acción fotoprotectora, antioxidante, de antitumor y de provitamina A.

Todas las consideraciones anteriores, aunadas a que existe solo un número limitado de productos con esas características, hacen que exista una gran demanda de carotenoides en el mercado. Esta necesidad ha sido blanco de numerosos estudios, y en consecuencia, existe un aumento permanente en el interés de la Biotecnología y la producción comercial de carotenoides mediante el empleo de fuentes no convencionales como son: las bacterias, hongos, levaduras, algas, etc., mediante el empleo de técnicas como la fermentación, el cultivo de células y tejidos con la posible transferencia de DNA, etc. (Villegas-Garrido, 1992).

Se estima que se producen en la naturaleza aproximadamente 100 millones de toneladas de estos productos al año (Gross, 1987). Actualmente en Estados Unidos y en casi todo el mundo, el mercado de los colorantes sintéticos continúa creciendo sólo en un modesto 2-3% anual, en tanto que el mercado global para colorantes naturales indica un incremento anual del 4%, esto estimado en cifras es equivalente, para colorantes sintéticos, a unos 400 millones de dólares, mientras que para los naturales se tiene una estimación de aproximadamente 939 millones de dólares (Lauro, 1998).

## **2.2. Carotenoides**

### **2.2.1. Generalidades**

Los carotenoides son sustancias que pertenecen a la clase de los hidrocarburos y sus derivados oxigenados (xantofilas) (Davies, 1976). Están compuestos típicamente de 40 carbonos, y constituidos a su vez, por más de 5 subunidades de isopreno, que se forman en una serie de pasos a partir de acetil CoA y acetoacetil CoA en la vía de los terpenoides y obviamente, pueden existir un gran número de isómeros geométricos de configuración *cis* y *trans*, por ser sustancias insaturadas (Gross, 1987).

Estos pigmentos son solubles en lípidos y pueden ser aislados por extracción con solventes adecuados (Moss y Weedon, 1976), tienen una gran variedad de funciones bioquímicas y una de ellas es en la inhibición de los productos de desecho del metabolismo celular tales como el oxígeno y el radical peróxido.

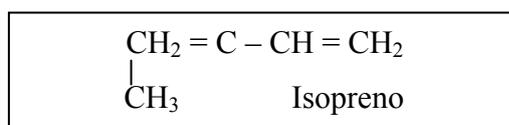
De los pigmentos naturales, los carotenoides amarillos, naranjas y rojos son de los más importantes y ampliamente distribuidos por todo el mundo (Gross, 1991) y, junto con las clorofilas, son sintetizados por todos los organismos capaces de realizar fotosíntesis, por lo que las plantas, son la fuente principal de todos los carotenoides animales.

Los carotenoides derivan su nombre del principal representante de su grupo, el beta-caroteno, el cual fue aislado de zanahoria (*Daucus carota*) por Wackenroder en 1831 (Gross, 1987).

En la naturaleza se encuentran más de 600 estructuras de carotenoides, pero su disponibilidad está supeditada por problemas prácticos relacionados con el proceso de extracción, el aislamiento de las bacterias o de los tejidos vegetales (Sandmann *et al.*, 1999); por dichas limitaciones, solamente se emplean en forma masiva en la industria alimentaria tres de ellos: la luteína, la zeaxantina y la astaxantina, que tienen en sus anillos laterales un radical OH y el producto precursor base es el β-caroteno (Marusich y Bauernfeind, 1981).

### 2.2.2. Estructura

Su estructura básica, que refleja su modo de biosíntesis, consta de ocho unidades de isopreno unidas de tal manera, que dos grupos metilo laterales están cercanos al centro de la molécula en la posición 1,6, en el cual, todos los demás grupos metilo están en posición 1,5 (Davies, 1976).



Zechmeister introdujo el concepto de polieno, con el cual Kuhn demostró la relación entre el color y la conjugación en la cadena de dobles enlaces (Gross, 1987), por lo que una serie de dobles enlaces conjugados constituyen las características cromóforas de éstos. Puede modificarse su estructura acíclica base de 40 carbonos por hidrogenación, dehidrogenación, ciclización u oxidación, aunque resultan algunas modificaciones de la adición de más unidades de isoprenoides hasta alcanzar C<sub>40</sub> y C<sub>50</sub>.

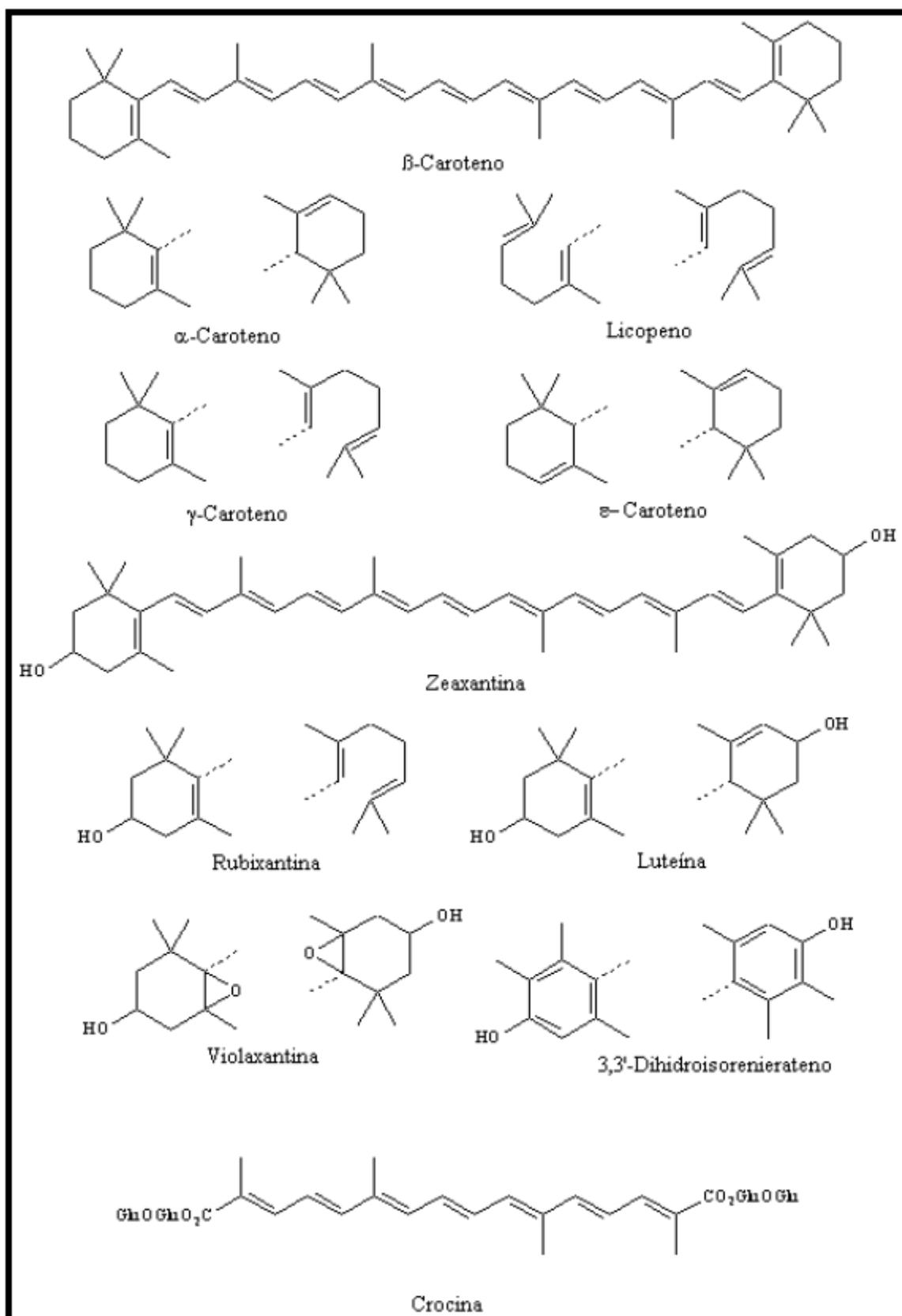
Aproximadamente 370 de los carotenoides que existen en la naturaleza son quirales ya que poseen de 1 a 5 átomos de carbono asimétricos; aunque en la mayoría de los casos, un carotenoide se presenta sólo en una configuración, sin embargo, excepciones de esto son los diferentes estereoisómeros de astaxantina y las diferentes configuraciones de los 5,8-epóxidos. Además el isomerismo *cis* o *trans* de los dobles enlaces carbono-carbono es otro rasgo interesante de la estereoquímica de los carotenoides; de acuerdo al número de dobles enlaces, existe un gran número de isómeros *cis-trans* para cada carotenoide (Pfander, 1992). Algunas de las estructuras de carotenoides más importantes en la industria alimentaria se muestran en la figura 2.1.

### **2.2.3. Características físicas y químicas**

Los carotenoides son lípidos solubles en otros lípidos y en solventes orgánicos en general, tales como acetona, alcohol, dietiléter y cloroformo, pero de éstos, los carotenos son solubles en solventes apolares tales como petróleo, hexano y éter, mientras que las xantofilas se disuelven mejor en solventes polares como los alcoholes y las cetonas (Gross, 1991).

Excepto para la mayoría de los carotenos insaturados (fitoeno, fitoflueno y  $\zeta$ -caroteno), los carotenoides son sólidos a temperatura ambiente y pueden cristalizar en varias formas utilizando pares de solventes adecuados (Gross, 1991). Los carotenoides se isomerizan en solución durante el almacenamiento o en presencia de calor; el isómero predominante en una mezcla en equilibrio es el compuesto *trans* (Klaui, 1981).

Debido al sistema de dobles enlaces conjugados en la molécula, los carotenoides son fácilmente destruidos por degradación oxidativa y la naturaleza de esa degradación depende de la localización en la cual ocurre el ataque; también pueden ser destruidos por degradación enzimática. Tanto cuando se encuentran en solución como en estado cristalizado, bajo autooxidación en la presencia de oxígeno o peróxidos, ocurre un proceso de formación de radicales libres (Gross, 1991), por lo que la oxidación durante la extracción y saponificación supone problemas que, sin embargo, pueden minimizarse con el uso de atmósferas de nitrógeno o prevenirse con antioxidantes tales como pirogallol o quinol (Davies, 1976). El esquema de degradación oxidativa se muestra en la figura 2.2.



**Figura 2.1.** Estructuras de los carotenoides naturales más importantes en la industria.

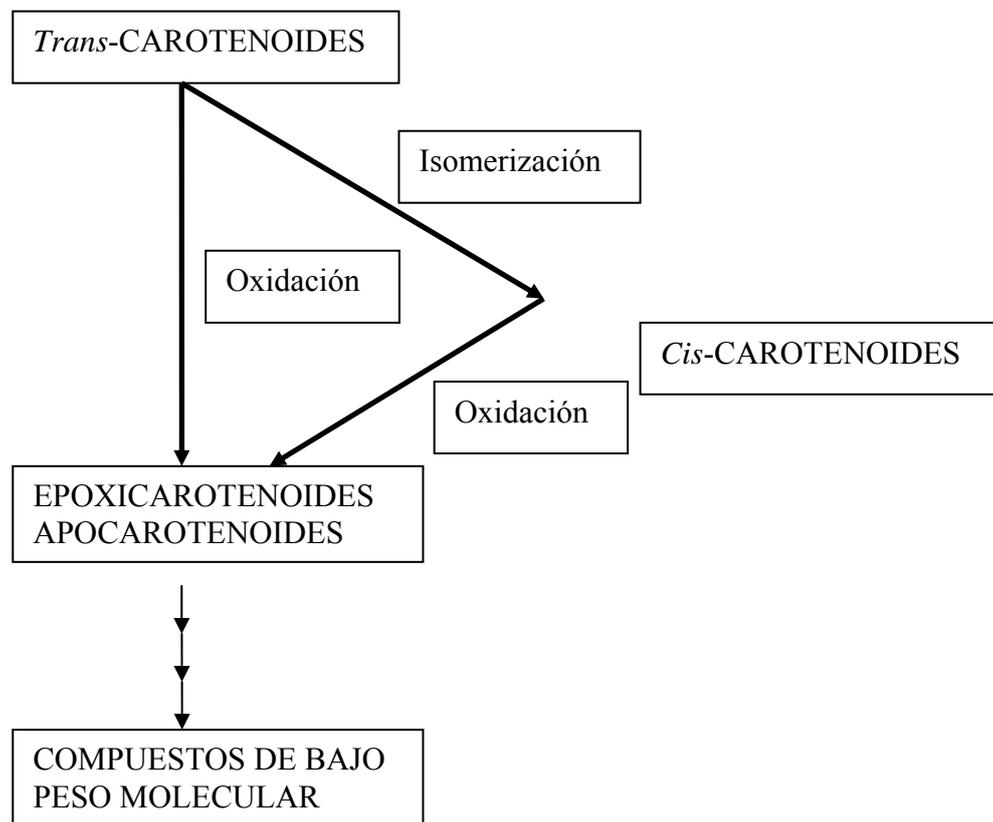
No obstante su especial sensibilidad a la luz, calor, oxígeno, ácidos y en algunos casos a álcalis (Davies, 1976), algunos son sorpresivamente estables al aire, y algunos otros, razonablemente estables, siempre y cuando estén puros y bien cristalizados (Moss y Weedon, 1976). Esto representa un problema fuerte en su utilización como pigmentos, sin embargo, el reconocimiento del daño que sufren ante cambios de esta naturaleza, sirve para minimizar el riesgo de resultados erróneos en trabajos de investigación en los que los carotenoides jueguen el papel central, de tal forma que puedan tomarse medidas precautorias para manejarlos de la mejor manera para obtener resultados satisfactorios (Davies, 1976), y que su inestabilidad y tendencia a la estereomutarotación, no representen un problema mayor o imposibilite su utilización (Moss y Weedon, 1976).

Tienen especial necesidad de protección a la luz, sobre todo a la luz directa o a la luz UV, ya que esto induce su fotoisomerización *cis-trans* y lleva a la fotodestrucción de los carotenoides. También presentan necesidad de protección al calor a causa de la termolabilidad de muchos de ellos, especialmente de las xantofilas; el calor deberá solo ser usado cuando sea absolutamente necesario para la manipulación de los pigmentos, y los solventes escogidos para su extracción deberán ser los adecuados, preferentemente deberán usarse aquellos que tengan mas bajos puntos de vaporización (Figura 2.3).

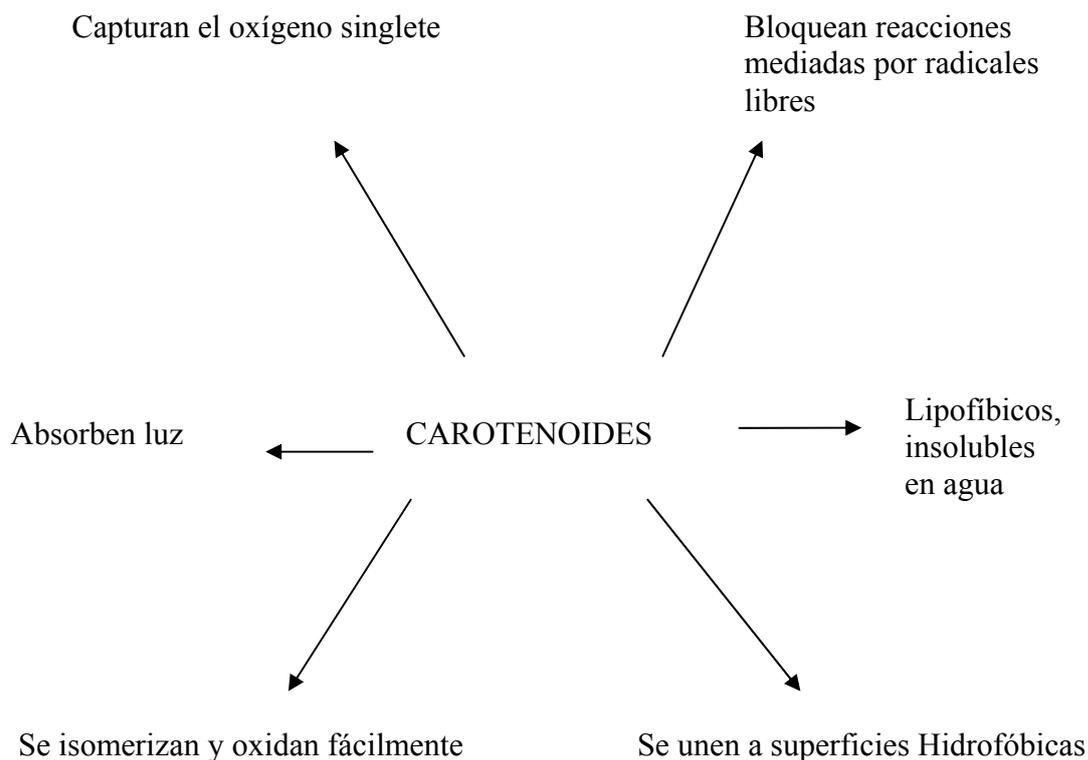
La protección a formación de ácidos es importante ya que pueden resultar descomposiciones oxidativas, isomerizaciones *cis-trans* e isomerizaciones de 5,6 -epóxidos a furanoides 5,8-epoxidos cuando los carotenoides son expuestos a ácidos, por lo que deben ser eliminados de todos los estados de manipulación de dichos carotenoides, particularmente de los solventes de extracción que pueden contener ácidos, como el cloroformo que contiene HCl generalmente.

La presencia de impurezas puede causar detrimento de los carotenoides, y tales impurezas comúnmente se encuentran en los solventes de extracción, por lo cual es importante la purificación de estos. Además, su almacenamiento debe realizarse en la obscuridad, a temperaturas de -20° C aproximadamente, con vacío o con nitrógeno. Los carotenoides puros estarán mejor almacenados como sólidos cristalinos pero los pigmentos pueden almacenarse en solución en un solvente hidrocarbonado como petróleo ligero, hexano o benceno (Davies, 1976).

Los métodos de aislamiento para carotenoides de fuentes naturales están determinados principalmente por la naturaleza del material biológico, la capacidad de extracción del solvente y las propiedades y cantidades de los carotenoides presentes (Pfander, 1992).



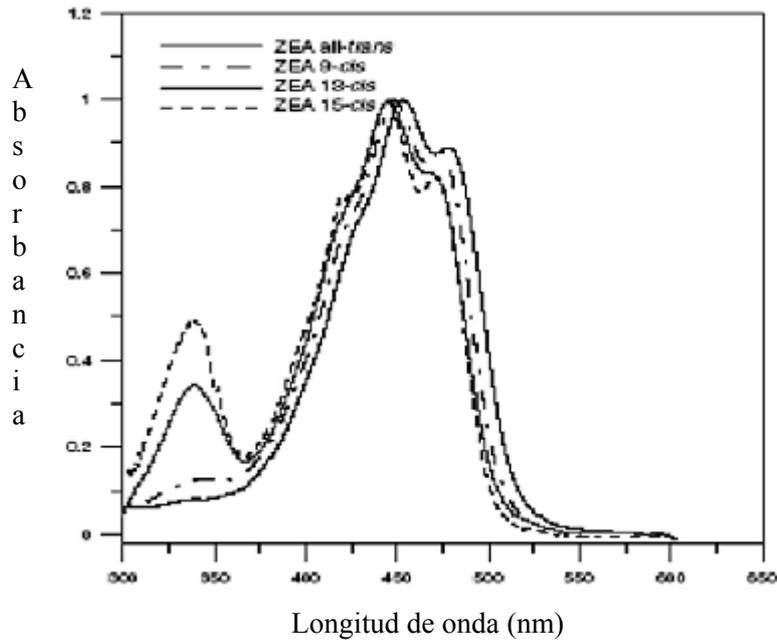
**Figura 2.2.** Posible esquema de degradación para los carotenoides. (Sajilata *et al.*, 2008).



**Figura 2.3.** Propiedades físicas y químicas importantes de los carotenoides (Olmedilla *et al.*, 2001).

#### 2.2.4. Examen físico

Se puede obtener mucha información de una combinación de métodos y técnicas no destructivas y de espectroscopia de masas. Las longitudes de onda de absorción máxima de luz incrementan con el número de dobles enlaces conjugados, pero la posición actual de la longitud de onda máxima es dependiente de varios rasgos estructurales y del solvente usado y, aunque varios carotenoides poseen formalmente el mismo cromóforo, las posiciones de su longitud de absorción máxima difieren significativamente (Moss y Weedon, 1976). En la Figura 2.4 se muestra un espectro de absorción de la zeaxantina.



**Figura 2.4.** Absorción de los isómeros de zeaxantina. El Espectro se realizó a partir del pigmento disuelto en una solución de MTBE-metanol (5:95, en volumen) (Sajilata *et al.*, 2008).

## 2.2.5. Clasificación

### 2.2.5.1 Clasificación estructural

Existen varios métodos de clasificación de los carotenoides basados en su estructura:

- Hidrocarburos o carotenos y sus derivados oxigenados (xantofilas) (Gross, 1987).
- La clasificación de los carotenoides de menos de 40 átomos de carbono en el esqueleto (los apocarotenoides) y los de más de 40 átomos de carbono (45 y 50) (Gross, 1991).
- Otra clasificación divide a los carotenoides en acíclicos y alicíclicos, y mono y bicíclicos (Gross, 1991).
- También se encuentra el sistema de clasificación donde se les divide en alnicos, los cuales tienen un grupo C=C=C al final o al centro de la cadena, y en acetilénicos, los cuales tienen un grupo -C=C- en posiciones 7, 8 y/o 7' y 8' (Gross, 1991).

### **2.2.5.2. Clasificación según su actividad biológica**

Por su uso como compuestos con actividad de provitamina A, como por su función nutricional y su acción de antioxidante, se definen cuatro clases de carotenoides:

1. Los activos nutricional y biológicamente,
2. Los biológicamente inactivos y nutricionalmente activos,
3. Los inactivos nutricionalmente y activos biológicamente,
4. Los que son ambas cosas inactivos (Olson, 1991).

Para que un caroteno tenga actividad de provitamina A debe tener al menos un anillo  $\beta$  no sustituido y una cadena de polieno a su lado; además, el otro extremo de la molécula puede variar en estructura cíclica o acíclica y ser mas grande, pero no mas corto de 11 carbonos, que son fragmentos de polienos (Branen *et al.*, 1990), y estos son activos solo después de ser convertidos en retinol durante la absorción a través de la pared del intestino (Mitsuda y Yamamoto, 1983).

Algunos de ellos son metabolizados dentro de la retina, mostrando entonces actividad de vitamina A (Branen *et al.*, 1990). Anteriormente la zeaxantina y algunas otras xantofilas, estaban consideradas como no precursoras de vitamina A, pero hoy en día esto parece ya no ser aplicable, ya que se ha demostrado que ciertos oxicarotenoides presentan actividad de vitamina A (Henken, 1992).

### **2.2.6. Fuentes potenciales de carotenoides en la naturaleza**

Los carotenoides están ampliamente distribuidos en toda la naturaleza, sin embargo, parece que la síntesis *de novo* se lleva a cabo solo en plantas superiores, algas y bacterias fotosintéticas. La capacidad de estos organismos para producir carotenoides parece haberse desarrollado en una temprana etapa en la evolución, y a través del tiempo, estos organismos la han conservado; sin embargo, la concentración de carotenoides varía enormemente de una fuente a otra (Ong *et al.*, 1992).

### **2.2.6.1. Plantas superiores**

#### **a) Tejidos fotosintéticos**

Todos los tejidos verdes contienen generalmente carotenoides, los cuales se localizan exclusivamente en los cloroplastos, dentro de los tilacoides, comúnmente en mezclas simples y existen como complejos en enlaces no covalentes con proteínas (Goodwin, 1992). De los más abundantes son:  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina y neoxantina; los que aparecen frecuentemente, aunque no siempre, en pequeñas cantidades:  $\alpha$ -carotenos,  $\beta$ -criptoxantinas, zeaxantinas y anteraxantinas; fitofluenos y precursores biosintéticos parcialmente saturados del fitoteno, que están presentes solo en cantidades trazas. Las xantofilas normalmente aparecen no esterificadas en los cloroplastos pero durante la senescencia cuando los cloroplastos se desintegran, estas se liberan y se esterifican dentro del citoplasma.

Las semillas que germinan en la obscuridad, producen tejidos ausentes de cloroplastos, por lo que podría esperarse la formación de muy poca cantidad de carotenoides, principalmente de xantofilas.

#### **b) Tejidos no fotosintéticos**

Los carotenoides se encuentran en tejidos reproductivos (anteras y polen) de algunas plantas superiores, también se ha encontrado una gran variedad en algunas flores, frutos, raíces, tubérculos, lo mismo que en semillas, aunque en estas últimas, en cantidades trazas generalmente. Además, se han encontrado en plantas parasíticas (Goodwin, 1976).

Las flores carotenogénicas pueden dividirse en tres grupos principales: aquellos que sintetizan carotenoides altamente oxigenados, carotenos principales y pigmentos altamente específicos de especie, pero en general, los frutos tienen más capacidad de síntesis que las flores (Goodwin, 1992).

### **2.2.6.2. Algas**

Aun no hay suficiente información, pero lo que se sabe, sugiere que los carotenoides presentes (además que se encuentran también en cloroplastos) son los mismos que los de las plantas verdes y son mezclas complejas que tienden a ser característicos de

cada clase, aunque también se ha reportado, en general, la presencia de rodoxantina (Goodwin, 1976; Goodwin, 1992). En algunas situaciones de estrés, la deficiencia de nitrógeno, etc., ciertas algas acumulan grandes cantidades de  $\beta$ -caroteno en la pared celular; por ejemplo, organismos como *Dunaliella bardawill* pueden sintetizar arriba del 9% de su peso seco de  $\beta$ -caroteno, bajo condiciones intensas de luz y altas concentraciones de sal (Goodwin, 1992), y *D. salina* puede producir arriba del 8% de  $\beta$ -caroteno de su peso seco (Hendry y Houghton, 1996). Otras algas verdes productoras de carotenoides son *Spongiococcum excentricum*, *Chlorella pyrenoidosa*, etc.

### **2.2.6.3. Líquenes**

Contienen carotenoides característicos de levaduras, así como de los presentes en algas y hongos simbioses. Los carotenoides se encuentran en los cloroplastos, pero bajo condiciones adversas aparecen en el citoplasma, también los acumulan en las áreas reproductivas y en las manchas oculares de algunas especies de *Euglena*.

### **2.2.6.4. Hongos y levaduras**

Como en bacterias fotosintéticas, la distribución de carotenoides en hongos es aparentemente caprichosa; se ha encontrado principalmente  $\beta$ -caroteno, no se han encontrado muchas evidencias de la presencia de xantofilas ni de los acetilencarotenoides (Goodwin, 1976). En levaduras rojas se ha aislado una xantofila rara como único pigmento llamada toruleno (Goodwin, 1992). Ejemplos de algunos de estos organismos productores de carotenoides son *Blakeslea trispora*, que sintetiza cantidades masivas de  $\beta$ -caroteno, *Rhodotorula mucilaginosa*, etc.

### **2.2.6.5. Bacterias**

#### **a) Bacterias fotosintéticas**

Los pigmentos se localizan en cromatóforos que son parte del sistema de membranas de las células bacterianas. Las bacterias fotosintéticas se caracterizan por su capacidad de sintetizar carotenoides acíclicos teniendo grupos hidroxil terciarios y metoxilos y los carotenoides cíclicos tienen comúnmente anillos aromáticos (Goodwin,

1992; Schmidt, 1978). Se conocen aproximadamente 80 carotenoides que son sintetizados en bacterias fotosintéticas (Delgado-Vargas, 1997). Un ejemplo de bacterias fotosintéticas productora de carotenoides es *Rhodobacter capsulatus*.

#### **b) Bacterias no fotosintéticas**

En éstas, la aparición esporádica de carotenoides está representada por la presencia de carotenoides singulares de 30 carbonos (presente en algunos estafilococos) y carotenoides de 45 y 50 carbonos (presentes en algunas flavobacterias), también como pigmentos glicosídicos de 40 carbonos (presentes en micobacterias), ya que es muy raro encontrar carotenoides convencionales, así como xantofilas y epóxidos característicos de plantas superiores (Goodwin, 1992).

#### **2.2.6.6. Tejidos animales**

Los carotenoides aislados de tejidos animales, provienen en su mayoría de fuentes vegetales o de bacterias, ingeridas en alguna etapa de la cadena alimenticia, los cuales existen, ya sea en forma inalterada (de tal manera que los animales pueden metabolizarlos de manera característica), o en forma alterada, después de la oxidación o reducción, por enzimas animales (Gross, 1987; Goodwin, 1992), sin embargo, los animales no son capaces de sintetizarlos.

Entre los tejidos animales en los que se han encontrado podemos citar: tejido graso, sangre, retina, corazón, hígado, páncreas, vesícula seminal, placenta, etc. (Gross, 1991).

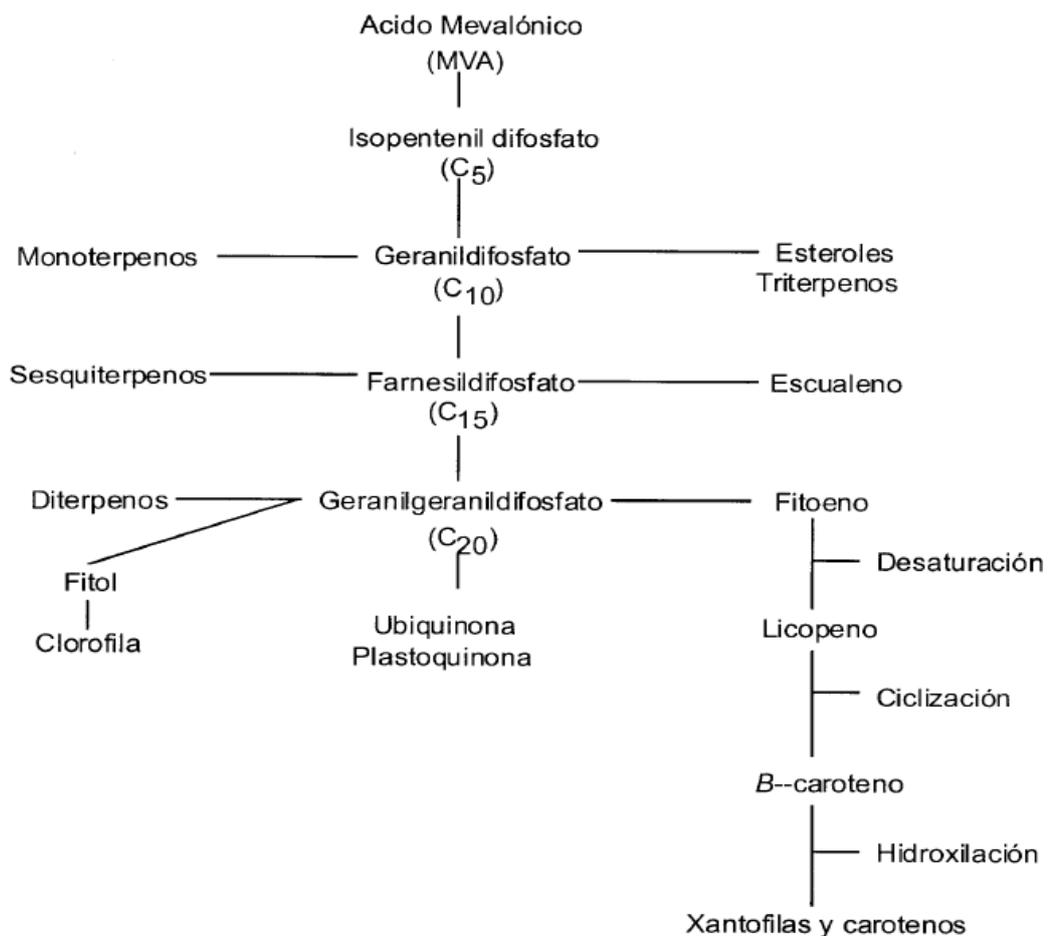
#### **2.2.7. Biosíntesis de carotenoides**

Los carotenoides, siendo terpenoides, son sintetizados del terpenoide precursor de 5 carbonos (isopentil pirofosfato), el cual es convertido luego a geranilgeranilpirofosfato de 20 carbonos; la dimerización de éste llega a fitoteno y enseguida ocurre una dehidrogenación vía fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno y nerurosporeno que llevan a la formación del licopeno. Dos ciclaciones convierten el licopeno a  $\beta$ -caroteno, y ocurren subsecuentes deshidrogenaciones, oxidaciones, etc., dependiendo de la naturaleza de cada carotenoide,

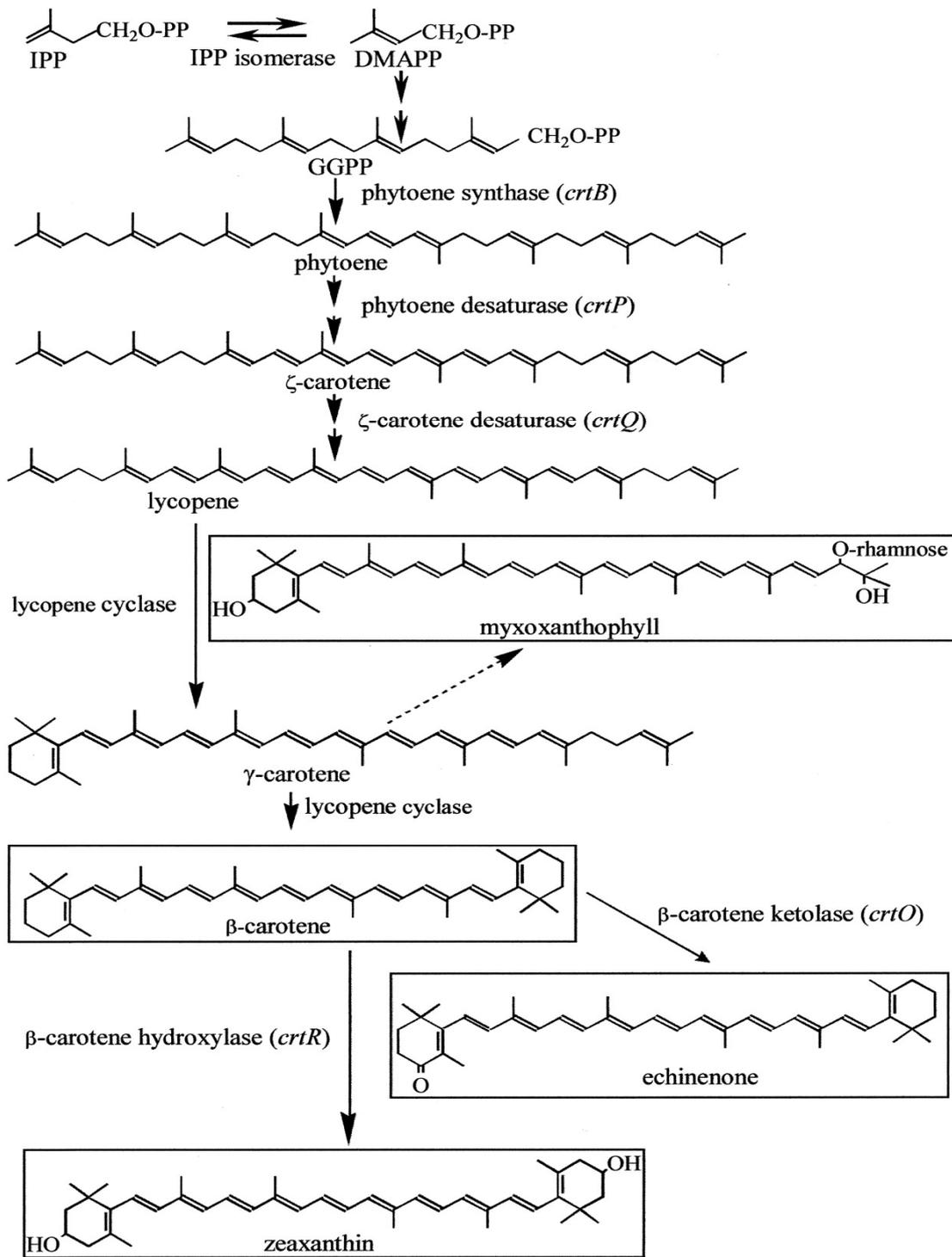
afectando también a estas reacciones los factores como el oxígeno, la temperatura, la luz, las hormonas presentes y su concentración, fertilizantes, etc. (Gross, 1987; Lotan y Hirschberg, 1995).

Se tiene indicios de que dentro de los plástidos, la vía biosintética se distribuye en dos sitios, la formación de fitoteno de isopentil difosfato que es mediada por proteínas estromales, mientras que la desaturación del fitoteno que conduce a la coloración roja del licopeno y ciclización de este a  $\alpha$  o  $\beta$ -caroteno son catalizadas por enzimas integrales de membrana (Beyer y Kleining, 1992).

La vía fotosintética general de formación de carotenoides se muestra en las figuras 2.5 y 2.6.



**Figura 2.5.** Vía de biosíntesis de los compuestos carotenoides (modificado de Young y Britton, 1993).



**Figura 2.6.** Ruta simplificada de biosíntesis de carotenoides que se acumulan en *Flavobacterium sp.* cepa ATCC 21588. Los nombres de los genes en la biosíntesis enzimática que han sido identificados en su genoma se encuentran entre paréntesis junto a las enzimas que ellos codifican. Las flechas indican rutas hipotéticas. DMAPP, dimetilalil difosfato; GGPP, geranilgeranil difosfato. (Ninet y Renault, 1979).

### 2.2.7.1. Regulación de la biosíntesis de carotenoides

La gran variedad de estructuras químicas de carotenoides que resultan de muchos tipos diferentes de reacciones biosintéticas muestran que las bacterias fotosintéticas desarrollaron enzimas altamente específicas durante la evolución; sin embargo, para un adecuado entendimiento de la profunda fisiología de síntesis se requiere de profundos experimentos genéticos y enzimáticos, pero se cree que los mecanismos de regulación son semejantes en todos los organismos que sintetizan carotenoides (Schmidt, 1978). Los principales mecanismos de regulación son los siguientes:

#### a) Control genético

Se han realizado estudios de mutación para observar la influencia del aspecto genético sobre la síntesis de carotenoides; éstos revelan que, por ejemplo en hongos, cada tipo de carotenoide se debe a mutaciones en un cistrón singular llamado *car R*, *car B* y *car A*, respectivamente; entonces, la ciclización de carotenos es debida al producto del gen *car R*, de tal forma que para la síntesis de  $\beta$ -caroteno, se requieren dos copias de este producto (dos enzimas ciclasas) en un complejo enzimático.

En plantas superiores, los estudios revelan que en los tejidos verdes, las reacciones de ciclización y desaturación de algunos carotenos están bajo control nuclear, y en algunas especies como *Helianthus annuus* que acumulan xantofilas después de acumular carotenos, sugieren que el núcleo controla un paso en la síntesis de carotenos, el cual no está involucrado en la síntesis de xantofilas, lo que pudiera indicar quizá una biosíntesis compartimentalizada, que refleja herencia Mendeliana y que es controlada por un sencillo factor de recesividad (Britton, 1976).

#### b) Control nutricional

La síntesis de carotenoides está también influenciada grandemente por diferentes clases de nutrientes, los cuales pueden cambiar la composición de carotenoides en las células de algunas bacterias fotosintéticas (Schmidt, 1978).

Es importante el estudio a fondo de las condiciones nutricionales favorables para la producción de carotenos, y además, los resultados que pudieran obtenerse dependerán de cada género y también de las características específicas de especie. Por ejemplo, en algunos hongos, la cantidad de carotenos producidos durante el periodo inicial de síntesis activa llega a la máxima concentración dependiendo de la disponibilidad del carbohidrato en exceso, después de que el crecimiento se ha completado, de tal forma que no todos los carbohidratos tienen la misma capacidad de ser aprovechados, siendo unos menos carotenogénicos que otros (Britton, 1976).

De la misma manera, cuando se reemplaza la fuente de nitrógeno por otra alternativa, puede ocasionarse una estimulación o disminución en la síntesis de carotenos, ya que algunos aminoácidos actúan especialmente como precursores de estos; las algas verdes, por ejemplo, bajo condiciones deficientes de nitrógeno, pueden llegar a ser amarillas o rojas, debido a la formación de carotenoides secundarios extraplastídicos (Britton, 1976).

### **c) Fotoinducción**

La cinética de acumulación de carotenoides fotoinducida es muy similar en todas las especies estudiadas, aunque la prolongación de los periodos de suministro de luz sea diferente. La base de la fotoregulación en hongos y bacterias no fotosintéticas, por ejemplo, está también bajo control genético, probablemente a nivel de la traducción de la síntesis de proteínas, donde la iluminación puede ocasionar la inactivación de un represor o, alternativamente, la producción de un inductor (Nelis y Leenheer, 1989). Un ejemplo de esto, son los estudios realizados con *Fusarium* que muestran que, después de un período “lag”, la cantidad de pigmento se incrementa rápidamente por un cierto tiempo y después, la síntesis de carotenoides cesa. Sin embargo, la iluminación continua conduce a una prolongada acumulación que parece ser lineal al tiempo. Como consecuencia de la fotoinducción, los organismos sintetizan un conjunto de carotenoides característicos por las especies particulares.

En las múltiples especies de plantas que tienen la capacidad de síntesis *de novo* de carotenoides, la carotenogénesis está bajo fotocontrol; especialmente en angiospermas, durante la germinación de las semillas, aunque esta regulación es solo una parte de las

transformaciones fotomorfológicas generales y puede no ser enteramente independiente de ellas (Rau, 1980). Sin embargo, la luz no es esencial para inducir la carotenogénesis, ya que los carotenoides son sintetizados en el etioplasto de plantas que crecen en la obscuridad; sin embargo, las vías de formación difieren de las de los carotenoides de los cloroplastos, así como ocurre con los carotenoides que son sintetizados dentro de frutos, tubérculos y raíces donde sólo puede penetrar una baja intensidad de luz (Gross, 1991).

En bacterias, la iluminación es obligatoria para la carotenogénesis masiva y parece estar seguida de la secuencia de reacciones que intervienen entre la absorción de la irradiación y la respuesta a ésta, y hasta ahora, esa estricta fotoinducción solo se ha detectado en especies de tres géneros: *Mycobacterium*, *Flavobacterium* y *Mixococcus* (Rau, 1980).

En el caso de algunos hongos, que forman cantidades razonables de carotenoides en la obscuridad, la formación se estimula ante la presencia de la luz; pero en otros, la síntesis ocurre en la obscuridad, aunque necesita ser iniciada por un período de fotoinducción y de exposición al oxígeno, habiendo una fase “lag” antes de que comience la carotenogénesis (Britton, 1976). La cinética de acumulación de carotenoides seguida de un periodo de iluminación muestra que la síntesis cesa probablemente después de un cierto tiempo. Estos resultados indican que la actividad de enzimas carotenogénicas se pierde mas tarde debido a la inactivación o por la degradación de las moléculas de enzimas (Rau, 1980).

En las algas, se ha visto que cuando éstas se desarrollan consecutivamente en la obscuridad, los niveles de carotenoides encontrados son muy bajos debido a que los cloroplastos dejan de producirse. Sin embargo, algunas algas que producen cloroplastos cuando crecen en la obscuridad, producen entonces los carotenoides plastídicos usuales, aunque en menor cantidad que los cultivos crecidos en condiciones de luz. Pero la síntesis de carotenoides extraplastídicos parece ser independiente de la intensidad de la luz recibida.

En muchos estudios se ha encontrado que, en general, las fotoreacciones son independientes de la temperatura y se ha concluido además, que la inducción de la luz es un proceso fotoquímico. Adicionalmente, se encontró que para una fotoinducción óptima,

es esencial la presencia de oxígeno, ya que, aunque el oxígeno no está involucrado directamente en la reacción fotoquímica del fotoreceptor, puede actuar o tener función posterior de aceptor de electrones que lleva al fotoreceptor a un estado de oxidación propio (Rau, 1980).

#### **d) Bioinducción química**

Algunos compuestos químicos tienen también influencia en la carotenogénesis, de tal forma que estimulan, suprimen o de alguna forma interviene en la síntesis.

En plantas, la producción de carotenoides está influenciada irreversiblemente por varios reguladores de crecimiento endógenos y exógenos como el ácido giberélico  $AG_3$ , ácido abscísico, bencil-adenina, etileno, etc. (Gross, 1991). En el caso de hongos, por ejemplo, se ha visto que el ácido trispórico, el cual es el mayor componente de una serie de ácidos presentes, estimula la carotenogénesis en algunas cepas; sin embargo, su efecto se inhibe por la presencia de actidiona, la cual reprime la síntesis de una enzima relacionada con la carotenogénesis (Britton, 1976). Otro ejemplo es el *p*-cloro ó *p*-hidroximercuribenzoato (conocidos como inhibidores de grupos *Sh*), que causan abundante acumulación de carotenoides en la obscuridad en *F. aquaeductuum*, al incubar con éstos el micelio, acumulándose el pigmento de 4 a 6 h después del período “lag”, e incrementándolo hasta 24 horas después de la adición del compuesto y luego continuando por algunos días en una proporción constante.

Algunas investigaciones muestran que el efecto de la quimioinducción es aditivo a la fotoinducción bajo condiciones de prueba (Rau, 1980).

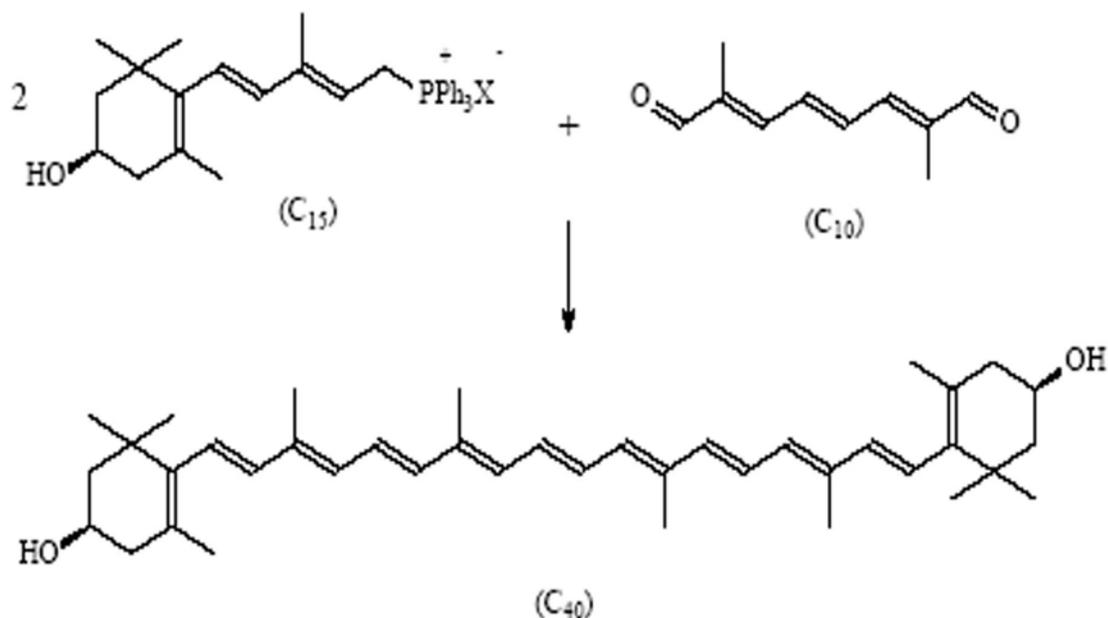
También existen algunas sustancias químicas que pueden actuar como inhibidores de la síntesis biológica de carotenoides, como la difenilamina que en concentraciones adecuadas inhibe la dehidrogenación del fitoteno, quedando inconclusa la síntesis de carotenoides. Otros inhibidores son el HCl, la nicotina (Figura 2.10), el imidazol, alfa-picolina, etc. (Cerdá-Olmedo, 1986).

### e) Condiciones de crecimiento

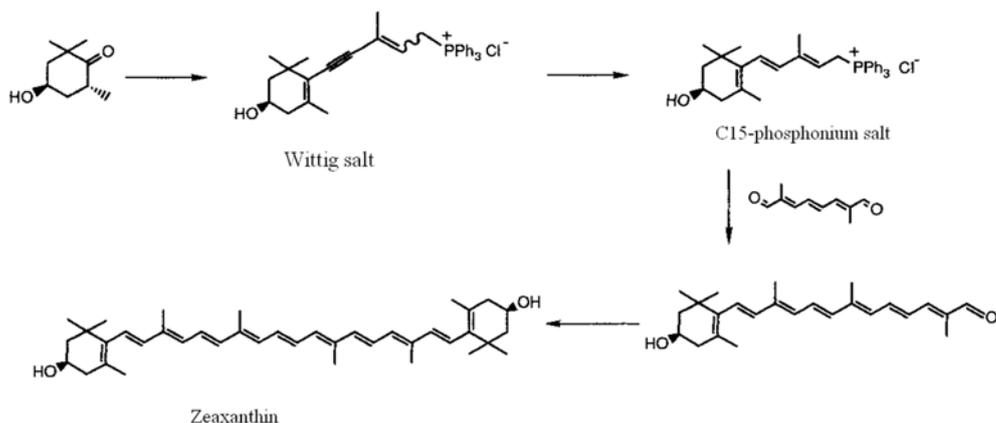
La temperatura y el grado de acidez presente en el medio son factores determinantes para la síntesis de carotenoides, siendo variables los valores óptimos de estos factores para cada especie (Britton, 1976); sin embargo, las temperaturas requeridas en general, son bajas (Gross, 1991).

### 2.2.8. Síntesis química.

Las ventas totales de carotenoides sintéticos en nuestros días son muy grandes. Los avances tecnológicos han hecho posible la síntesis de carotenoides a precios razonables con la ventaja de que, teniendo el proceso bien controlado, se pueden obtener colores reproducibles y sin la desventaja que presentan los extractos naturales en cuanto a variaciones en la calidad y por lo tanto fluctuaciones en el precio (Klaui, 1981). La variedad de métodos de síntesis de carotenoides ha permitido que algunos carotenoides naturales puedan sintetizarse a escala industrial (Figura 2.7 y Figura 2.8) (Moss y Weedon, 1976).



**Figura 2.7.** La reacción de Wittiz usada en la producción sintética de zeaxantina (Sajilata *et al.*, 2008).



**Figura 2.8.** Síntesis de (3R, 3'-R) –zeaxantina de acuerdo con Sajilata *et al.*, 2008.

## 2.2.9. Extracción y purificación de carotenoides

El aislamiento de carotenoides involucra la extracción de la fuente de origen, la saponificación (aunque no siempre) y separación.

### 2.2.9.1. Extracción

Se emplean solventes puros (libres de ácidos y halógenos) para evitar la oxidación, en este proceso ayuda la adición de antioxidantes y neutralizantes como el BHT al 1% y el amortiguador TRIS. Los métodos de extracción involucran principalmente la separación de fase con solventes de partición, empleando para la separación características como la polaridad (Gross, 1987).

### 2.2.9.2. Saponificación

La saponificación es un procedimiento útil como paso previo a la purificación e identificación de xantofilas, puesto que estas se encuentran casi siempre en forma esterificada, lo que trae consigo complicaciones adicionales en el análisis; por ejemplo, un extracto de un pigmento con dos grupos hidroxilo, puede aparecer sin esterificar, esterificado en una o dos posiciones, o incluso en una mezcla de ambos, lo cual a su vez implica el tener que separarlos e identificarlos. De esta forma, con la saponificación se

disminuye la complejidad de la mezcla dejando sólo la forma libre del pigmento, además de que destruye la clorofila presente.

Ya que la mayoría de los carotenoides son estables hacia tratamientos alcalinos, los métodos de saponificación más usados son aquellos en los que se usan soluciones alcohólicas o metabólicas de hidróxido de potasio, ya sea a temperatura ambiente, o con calentamiento, dependiendo del carotenoide del cual se trate. Si alguno de éstos es sensible a ese tratamiento, se usan condiciones más suaves o se sustituye por el uso de lipasas (Delgado-Vargas, 1997).

### **2.2.9.3. Separación y purificación**

Los métodos más comúnmente empleados en la separación de mezclas de carotenoides incluyen los métodos de separación de fases utilizando solventes de partición; métodos cromatográficos, que en nuestros días es la técnica de separación y purificación más importante (cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, cromatografía líquida de alta resolución) y métodos en los que se emplean fluidos supercríticos (Gross, 1991).

### **2.2.10. Identificación y caracterización de carotenoides**

La identificación de una muestra de carotenoide purificado puede realizarse a través de cromatografía en capa fina o HPLC utilizando un espécimen auténtico. Además, la espectroscopia de absorción UV y visible y la espectrometría de masas son de significancia básica para tal identificación. Adicionalmente, la determinación de la estructura puede basarse en datos proporcionados por espectros de infrarrojo, resonancia magnética nuclear, espectros de dicroísmo circular, así como estudios de descomposición derivativa, los cuales son muy útiles para carotenoides con estructuras altamente complicadas (Matsuno, 1992).

### 2.2.11. Funciones y usos

La presencia universal de carotenoides en organismos fotosintéticos como complejos clorofilas-carotenoides, localizadas en membranas fotosintéticas tiene justificación. Algunas de las principales funciones de los carotenoides en plantas superiores es que actúan como pigmentos accesorios en la fotosíntesis, ya que transfieren a las clorofilas la energía que absorben de la luz a diferentes longitudes de onda (Gross, 1987); esto significa que, presentan una función “*antena*”, ya que los carotenoides absorben la luz en regiones del espectro donde las clorofilas tiene pocos coeficientes de extinción y les transfieren a éstas los resultados de la excitación vía un proceso de transferencia de energía “*singulete-singulete*” (Gust *et al.*, 1992).

Actúan además como agentes protectores del aparato fotosintético contra el daño potencial de la luz visible y lo protegen contra la acción del oxígeno (el cual tiene alta reactividad), de tal forma que en los sistemas biológicos pueden acarrear reacciones de oxidación incontroladas o indeseables que llevan a la destrucción oxidativa de componentes celulares vitales, por lo que los carotenoides actúan, por tanto, amortiguando estos efectos, transformando al singulete de oxígeno en una molécula no tóxica, en una respuesta rápida tipo SOS (Gross, 1987; Mann, 1992). La actividad antioxidante de los carotenoides es isómero-específica (Delgado-Vargas, 1997).

Algunas enfermedades como el cáncer (de piel principalmente), las apoplejías, los neoplasmas, etc., involucran procesos oxidativos mediados por radicales libres. Los carotenoides, con su actividad antioxidante, pueden tener efectos benéficos debido a que permanecen inmersos en la membrana, por lo que, algunos como el  $\beta$ -caroteno, por ejemplo, son capaces de reaccionar eficientemente con los radicales generados en la parte interna de la membrana (tales como peróxidos de lípidos), mientras que las xantofilas, pueden reaccionar con los radicales libres del medio acuoso, por tener expuestos sus grupos polares en esas zonas. En general, la eficiencia de los carotenoides para eliminar radicales libres depende del sistema en particular (tipo de radical, carotenoide, microambiente, etc.), por lo que se sugiere tomar en la dieta una mezcla de ellos, ya que *in vivo* tenemos una gran variedad de microambientes (Figura 2.9). Además, se piensa que los

carotenoides tienen un efecto en la respuesta inmune y en la comunicación de célula a célula (Delgado-Vargas, 1997).

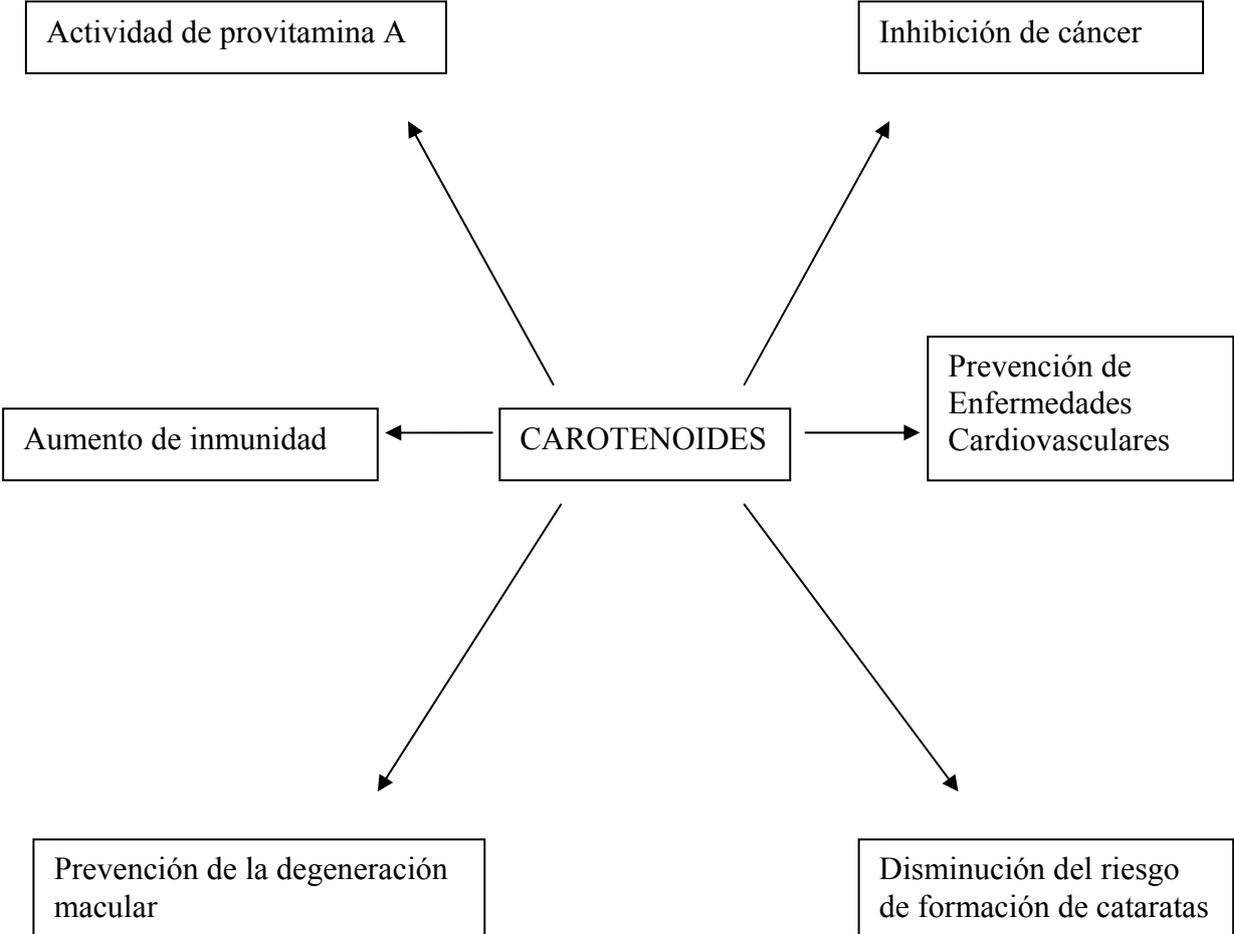
Una de las principales funciones de los carotenoides es que algunos de ellos actúan como precursores de la vitamina A en organismos animales, de los cuales, la mayoría tiene la capacidad de convertir enzimáticamente los carotenoides provenientes de plantas de una cierta estructura, en vitamina A (Olson, 1991). Esta vitamina es requerida para el proceso de visión, mantenimiento del epitelio, secreción de la mucosa y reproducción (Delgado-Vargas, 1997). Esto resulta de gran interés ya que, en muchos países del tercer mundo, la deficiencia en esta vitamina representa un gran problema (Pfander, 1992), y por lo tanto, una de sus principales aplicaciones es su uso como agentes de prevención o corrección de deficiencias de vitamina A en el hombre (Olson, 1991).

La actividad de vitamina A dependerá de la naturaleza y cantidad de los carotenoides activos biológicamente, de su estado de isomerización, su estabilidad en el tracto gastrointestinal y su digestibilidad (Olson, 1991). Ciertos factores nutricionales como por ejemplo, un incremento en el contenido de nitrato, presente en el frijol de soya y otros alimentos, pueden ocasionalmente impedir o disminuir la utilización de carotenos en el intestino (Klaui, 1981).

Además, poseen una conocida función como colorantes, la cual es de mayor interés en este trabajo, proporcionando un amplio rango de colores que van desde el amarillo brillante hasta el rojo oscuro, y cuando forman complejos con proteínas, producen coloraciones verdes y azules (Ong *et al.*, 1992). Algunos carotenoides son adicionados directamente a los alimentos para consumo humano, mientras que otros, llamados “pigmentadores”, son adicionados a alimentos animales que darán color a los tejidos de su cuerpo o a sus productos (Gross, 1987). Los carotenoides “*trans*” son más efectivos en la pigmentación debido a que producen coloraciones más rojizas y tienen mayor estabilidad; también las diferencias metabólicas en organismos con las mismas características están involucradas en los diferentes grados de pigmentación (Delgado-Vargas, 1997). Las formas comerciales de carotenoides que se utilizan principalmente para dar color a aceites y grasas, así como a alimentos de naturaleza lipídica, no pueden ser aplicadas a medios acuosos. Sin embargo, la mayoría de los carotenoides existen en la naturaleza en

dispersiones muy finas y en esta forma, son capaces de colorear medios acuosos tales como jugos y otras bebidas, por lo que, usando carotenoides puros cristalizados, es posible preparar formas comerciales dispersables en agua, por la formación de suspensiones coloidales, por la emulsificación de soluciones “lipídicas” y por dispersión en coloides adecuados, particularmente con la adición de agentes surfactantes. En diluciones acuosas, los carotenos pueden ser estabilizados por la adición de ácido ascórbico (Klaui, 1981).

Entre los alimentos y productos en los cuales se utilizan los carotenoides para darles color están: margarina, aceites, grasas, pasteles, chocolates, mayonesas, salsas, jugos de frutas y bebidas, algunos alimentos enlatados, sopas secas, yogurt, helados de crema, algunos postres, dulces, gomas de frutas, aderezos y ensaladas, algunos productos de carne y productos de pasta, harina, etc., (Klaui, 1981; Rodríguez y Delia, 2000).



**Figura 2.9.** Funciones o acciones que promueven la salud atribuidas a los carotenoides (Olmedilla *et al.*, 2001).

### **2.3. Xantofilas**

Los pigmentos amarillos forman una familia de compuestos llamados xantofilas por Berzelius (Gross, 1987), los cuales son carotenoides oxigenados.

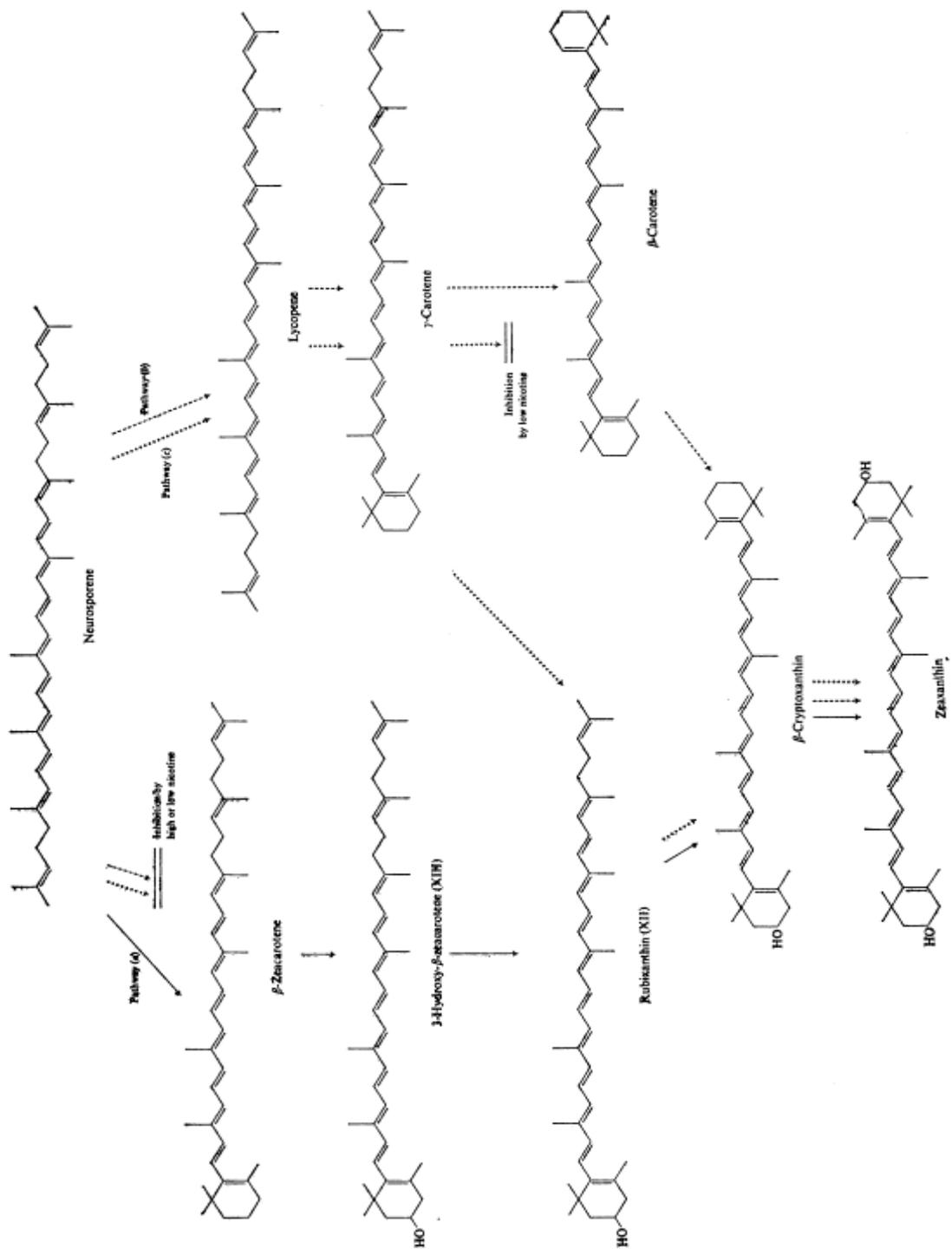
El oxígeno tiene una importante función en la formación de xantofilas, ya que, con la sustitución del oxígeno en el sitio adecuado, los carotenoides pueden llegar a ser ácidos carboxílicos (como la torularodina), aldehídos, cetonas (como la cantaxantina, astaxantina y spheroidenona), alcoholes (como la luteína y zeaxantina), epóxidos (como la violaxantina) o éteres de carotenoides (como el spheroideno) (Davies, 1976; Goodwin, 1976).

Estos pigmentos son encontrados en el etioplasto, el cual contiene pequeños gránulos amarillos, o en el exterior de los plástidos. También se encuentran en tejidos no fotosintéticos de plantas superiores, por ejemplo, en los pétalos de las flores donde están generalmente parcial o completamente (Goodwin, 1976). Su posición y movilidad en la membrana está afectada por los grupos polares que presenten (Delgado-Vargas, 1997).

#### **2.3.1. Formación de xantofilas**

La inserción del oxígeno, grupos hidroxilo y grupos epoxi ocurren después de la ciclización, como una etapa tardía en la biosíntesis, cuando los carotenos correspondientes están oxidados. Esto trató de demostrarse con estudios de inhibición, principalmente con una cepa de *Flavobacterium* sintetizadora de grandes cantidades de zeaxantina, la cual, en presencia de nicotina, acumulaba licopeno, y con la remoción de la nicotina, el licopeno era transformado en  $\beta$ -caroteno bajo condiciones anaeróbicas y en zeaxantina en la presencia de oxígeno, siendo éste derivado del oxígeno molecular y no del agua, y la oxidación es catalizada probablemente por la asociación de la función oxidasa con retención de la configuración absoluta (Gross, 1987) (Figura 2.10).

La epoxidación de carotenoides es formada por la oxidación del caroteno o xantofila correspondiente, aunque no se conoce todavía el mecanismo, además de que la fuente de oxígeno parece ser diferente al agua y al oxígeno molecular, dependiendo del sitio donde ocurra la biosíntesis en el cloroplasto (Gross, 1987).



**Figura 2.10.** Vías alternativas en la biosíntesis de zeaxantina a partir de neurosporeno en *Flavobacterium sp.* a) Vía  $\beta$ -zeacaroteno, si el inhibidor nicotina no está presente, b) Vía cambio a síntesis de licopeno en presencia de nicotina, y conversión de licopeno en zeaxantina vía  $\beta$ -caroteno al remover el inhibidor, c) Vía licopeno y rubixantina con una concentración pequeña del inhibidor nicotina (McDermott, Brown, Britton y Goodwin, 1974).

### 2.3.2. Zeaxantina (3R, 3R' – β- β-caroteno- 3-3' diol)

Perteneciente al grupo de las xantofilas, por ser un carotenoide hidroxilado, debido a sus centros quirales, la zeaxantina se ubica dentro del grupo de los carotenoides ópticamente activos (Figura 2.12). Está ampliamente distribuido y es el carotenoide principal del maíz amarillo. Se encuentra en una posición que atraviesa la membrana, de tal forma que, al estar expuestos sus grupos polares al medio acuoso, es capaz de reaccionar con los radicales generados en esa zona (Delgado-Vargas, 1997).

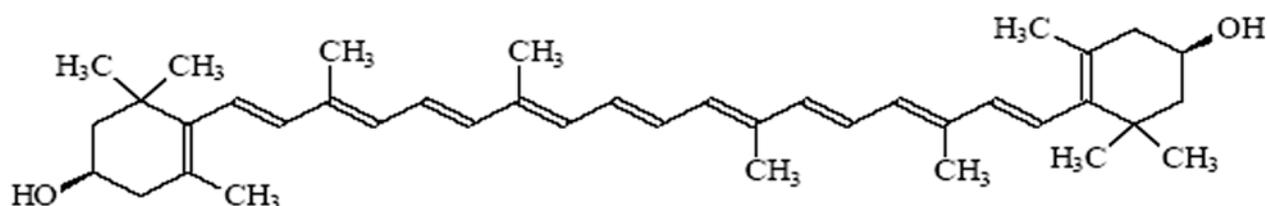
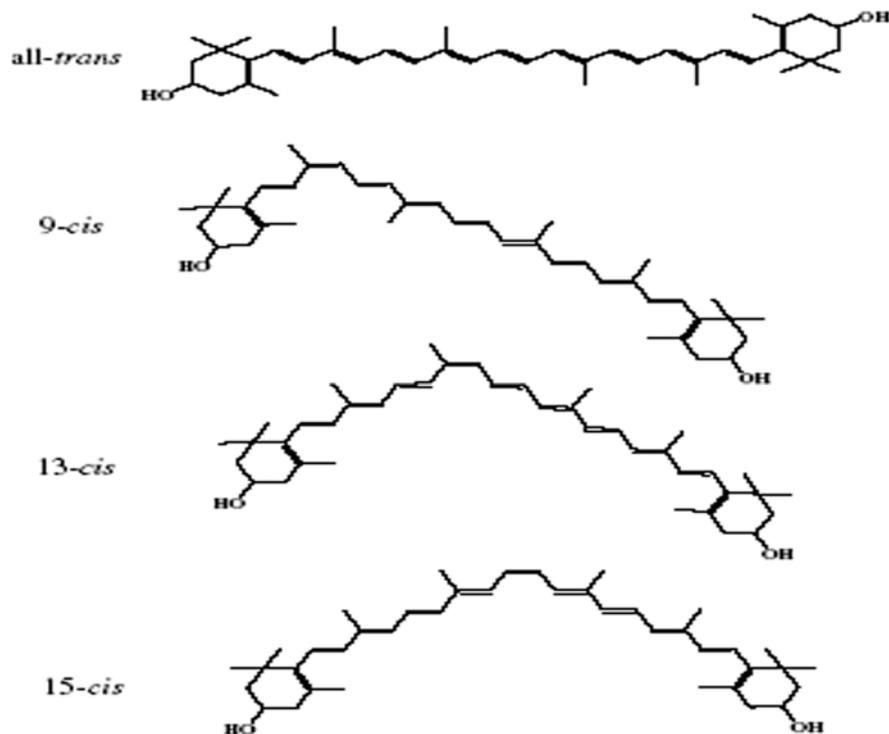


Figura 2.11. Estructura de la zeaxantina (Sajilata *et al.*, 2008).

Cuadro 2.1. Características físicas y químicas de la Zeaxantina.

Nombre IUPAC	4-4-(18-(4-hidroxi-2,6,6-trimetil-3,7,12,16-tetrametiloctadeca)-3,5,5-trimetil-ciclohexano-3-en-1-ol)
Nombre común	Zeaxantina; β,β-caroteno-3, 3'-diol
Formula molecular	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>
Apariencia	Rojo-naranja
Punto de fusión	215.5° C(488.7° K)
Masa molar	568.88 g 7 7mol
Solubilidad	Insoluble en agua

Sus longitudes de onda de absorción máxima son: 463 y 492 nm en cloroformo. Es de los carotenoides el pigmento más estable en el secado, pero de los más sensibles a la luz (Delgado-Vargas, 1987). Su configuración absoluta fue establecida por correlación con la fucoxantina, cuya configuración se determinó por análisis cristalográfico de rayos X, en el cual se demuestra que ambos tienen la misma quiralidad (Muller *et al.*, 1980).



**Figura 2.12** Estructura química de la zeaxantina en la conformación *trans*, *9-cis*, *13-cis*, y *15-cis* (Sajilata, *et al.*, 2008).

Existe un renaciente interés en el pigmento zeaxantina, principalmente para el uso en pigmentación de aves de corral como potenciador de color junto con otras xantofilas, como son la violaxantina (Hendry y Houston, 1996). Este método indirecto de coloración de alimentos es empleado en la pigmentación de la piel y de la yema de huevo de los pollos; la intensidad a la vista del color es la relacionada con la presencia concentrada de los oxicarotenoides en el alimento que a diario consumimos (Marusich y Bauernfeind, 1981).

A los carotenoides que se encuentran en el huevo, frutas y verduras (la zeaxantina y luteína, principalmente), se les ha señalado como compuestos que atrasan el desarrollo de cataratas (90%), ya que tanto la luteína como la zeaxantina se acumulan en la región macular del ojo y lo protegen de los rayos ultravioleta. Esto se encontró en personas que consumieron un mínimo de una y media porciones de frutas y verduras diarias y tres huevos por semana (Houston Medical School, 1995), pero los suplementos de  $\beta$ -caroteno no redujeron el riesgo de las cataratas (Schafer y Nelson, 2002). Se ha indicado que el cuerpo humano tiene una mayor habilidad de utilizar zeaxantina y la luteína de la yema de huevo que la proveniente de los vegetales (Don, 2001).

En investigaciones farmacológicas recientes, se le ha asociado a la zeaxantina con la disminución en los niveles de tabaquismo, junto con la luteína en una vacuna contra la gripa, en la protección de vasos cerebrales, en la prevención de efectos adversos hematológicos del cinc, en la reducción de la presión sanguínea (Schafer y Nelson, 2002).

Los alimentos con spirulina y pigmentados con zeaxantina incrementan el nivel de astaxantina y aumentan la absorción y metabolismo de ésta en el cuerpo humano (Marusich y Bauernfeid, 1981).

### 2.3.2.1. Biosíntesis de zeaxantina

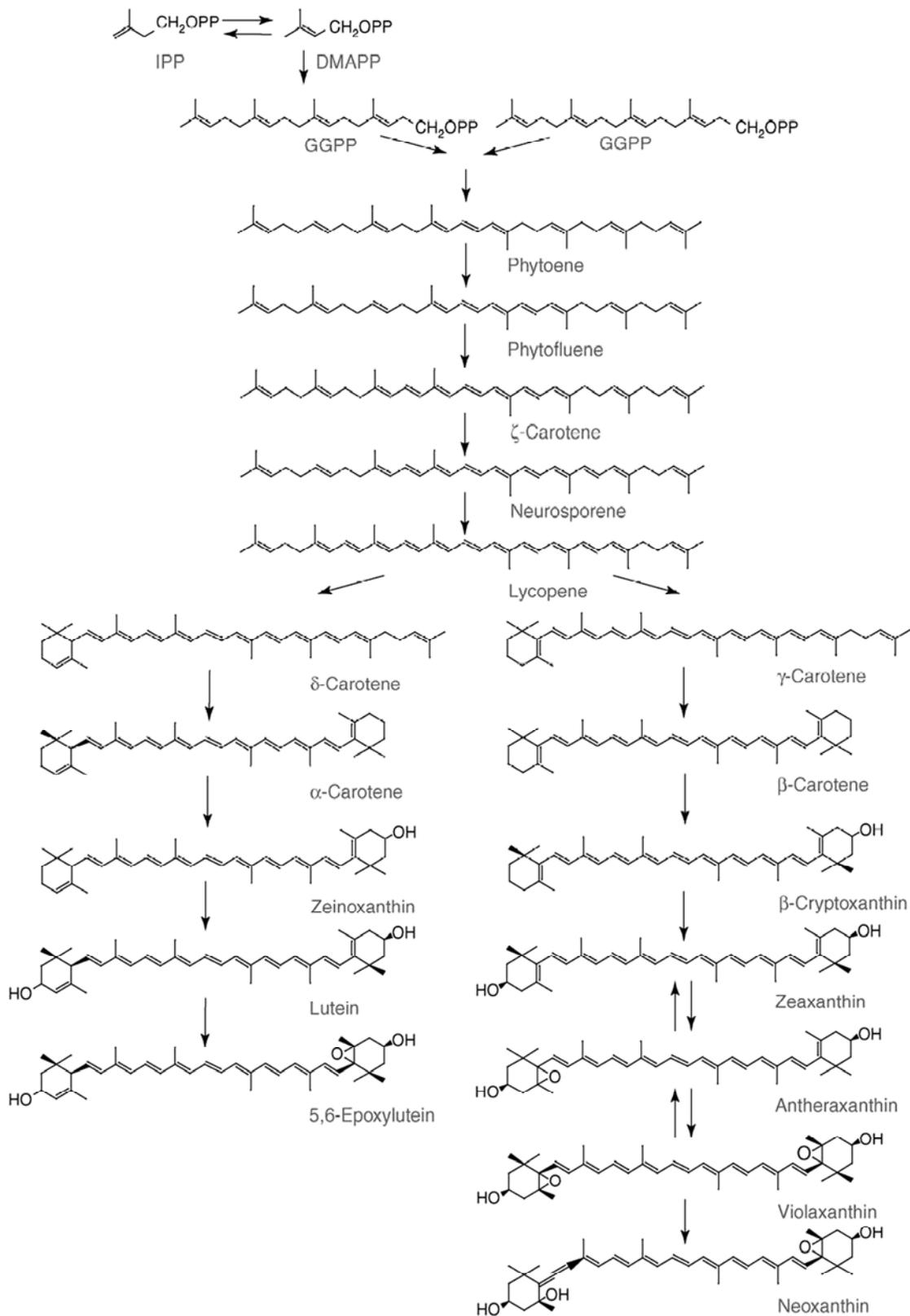
Sapozhnikov detectó en 1957 cambios reversibles en el contenido de violaxantina bajo condiciones de luz y oscuridad. La conversión de xantofilas es debida al “ciclo de las xantofilas”, dependiente de la luz, el cual involucra la depoxidación de violaxantina en la luz y la re-epoxidación de la zeaxantina formada en la oscuridad, vía anteraxantina:



En estas reacciones están involucradas principalmente dos enzimas: la violaxantina de-epoxidasa, situada en el interior de la membrana tilacoide, y la epoxidasa situada fuera de la membrana, siendo por lo tanto, transmembranal el arreglo del ciclo, lo cual también implica el transporte de sustratos a través de la membrana. La enzima de-epoxidasa es activada por la baja de pH dentro de los tilacoides, debido al transporte de electrones en la fotosíntesis en la presencia de oxígeno y NADPH, su actividad es independiente de la luz (Gross, 1987).

En hojas expuestas al sol, se ha observado una tendencia hacia el incremento de todos los carotenoides del ciclo de las xantofilas (violaxantina, zeaxantina y anteraxantina), lo cual es importante porque las hojas expuestas al sol y que están en etapa de crecimiento rápido, no utilizan más del 50% de la luz absorbida durante el máximo de irradiancia, y muchas especies pueden estar aprovechando sólo el 10%, por lo que, del 50 al 90% de la luz absorbida, está en exceso, por lo que la eliminación de esa energía es necesaria para

evitar daño celular. De esta forma, al parecer este ciclo es uno de los mecanismos de las plantas para la protección contra el daño por luz, pues a medida que las hojas de las plantas se exponen a altas intensidades luminosas, los grupos epóxidos de la violaxantina son removidos para producir inicialmente anteraxantina y finalmente zeaxantina (Figura 2.13). Siendo el ciclo de las xantofilas el que facilita el proceso de disipación de energía y el que protege el aparato fotosintético, se ha establecido que el proceso de transferencia de energía de la clorofila a la zeaxantina es teóricamente posible, lo que apoya la evidencia de la formación de zeaxantina bajo condiciones de alta iluminación. Este ciclo de xantofilas que involucra violaxantina, anteraxantina y zeaxantina, es ubicuo de plantas superiores, así como algas verdes y cafés, mientras que, otro ciclo de xantofilas ha sido identificado recientemente en otros grupos de algas e involucra a las xantofilas diadinoxantina y diatoxantina, pero aún no hay mucha información al respecto (Delgado-Vargas).



**Figura 2.13.** Compuestos precusores y principales carotenos y xantofilas en la ruta biosintética de carotenoides en las plantas. DMAPP = dimetilalil pirofosfato; GGPP = geranylgeranil pirofosfato; IPP = isopentenil pirofosfato (Sajilata, *et al.*, 2008).

### 2.3.2.2. Alternativas de obtención de zeaxantina

#### a) Extracción de plantas, flores y frutos

Como ya se ha visto, los extractos naturales, particularmente de frutos, flores y hojas han sido usados por muchos años como fuentes de carotenoides para su empleo como colorantes. Particularmente, las fuentes no microbianas de obtención de zeaxantina más comunes hasta el momento, son: la alfalfa, el maíz, las plantas verdes, las flores y la caléndula, entre otras (Hendry y Houghton, 1996).

#### b) Síntesis química

La primera síntesis total de zeaxantina fue reportada en 1975. La reacción se lleva a cabo en varios pasos, obteniéndose primero un importante intermediario en la síntesis de zeaxantina y su acetato correspondiente: el 3(R)-3-hidroxi-beta-ionona, sintetizado por una eficiente ruta. Esto ocurre al tratar una hidroxiacetona (A) con un sulfúrido (B), dando un epóxido (C), que luego es transformado en (3R)-3-hidroxi-beta ciclocitral (E), vía el aldehído intermediario (D). La catálisis basada en la condensación del (3R)-3-hidroxi-beta ciclocitral (E) con acetona da (3R)-3-hidroxi-beta ionona (F) y el acetato correspondiente (G). Posteriormente, la síntesis del esqueleto de 40 carbonos se lleva a cabo después de lograr el acomodo del esquema de construcción  $C_{15} + C_{10} + C_{15} = C_{40}$  empleado al principio, para la síntesis de zeaxantina, como una mezcla óptimamente inactiva de la forma racemato y la *meso* forma 1:1. La sal de 15 carbonos (H), preparada del (3R)-3-hidroxi-beta ionona (F) por métodos convencionales (vinilación seguida por un tratamiento del intermediario vinil carbonil con  $PH_3P/HCl$ ), se hizo reaccionar con el dialdehído de 10 carbonos completamente conjugado (I), para dar Trans-(3R,R')-zeaxantina (L), después de la isomerización con excelentes rendimientos. Cuando se usó el dialdehído de 10 carbonos con un triple enlace central (J), se obtuvo la trans-(3R, 3R')-15,15'-didehidro-zeaxantina (K), el cual, después de la hidrogenación parcial e isomerización, se convirtió en la zeaxantina deseada (Muller, 1980).

La zeaxantina sintética es un polvo cristalino de color rojo-naranja con poco o ningún olor. Es prácticamente insoluble en agua y etanol, y ligeramente soluble en cloroformo dando una solución clara intensa de color anaranjada. Se compone de *trans*-zeaxantina y cantidades menores de *cis*-zeaxantina, 12\_-apo-zeaxantinal, diatoxantina, y

parasiloxantina. Procesos no fermentativos presentan varias desventajas, típicamente requieren numerosos pasos de reacción, y en cada paso se producirá menos del 100%, de modo que el rendimiento final de zeaxantina en la etapa final del proceso multietapas tiende a ser relativamente pobre. Además, la síntesis química tiende a producir no deseados S-S y S-R estereoisómeros de zeaxantina, así como de productos de conversión diferentes, tales como la zeaxantina oxidada, y moléculas de zeaxantina, que han perdido a uno o más de los dobles enlaces en la cadena principal o en los anillos extremos.

La síntesis de la zeaxantina sigue una secuencia de reacciones en las que el paso final es una doble condensación de Wittig de un C10-dialdehído simétrico como elemento central con 2 equivalentes C15 de la adecuada sal de fosfonio. El primer paso en el proceso es la producción de un enantiopuro-C9 hidroxicetona ya sea por una hidrogenación catalítica enantioselectiva o por un proceso biocatalítico combinados con una reducción química. El C9 enantiopuro-hidroxicetona se convierte entonces en la C15-sal de fosfonio empleado en la condensación de Wittig (Figura 2.7).

El compuesto C10-dialdehído está disponible comercialmente. Un enfoque similar se utiliza para la síntesis de otros carotenoides simétricos, tales como el licopeno,  $\beta$ -caroteno y astaxantina, también disponibles comercialmente (Soukup y otros, 1996; Ernst 2002). En el método descrito por Loeber y otros (1971), una mezcla de sal de Wittig (146 mg, 0,26 mmol), 2, 7-dimetilocta-2, 4,6 -- trienedial (16 mg, 0,1 mmol), y 1,2-epoxibutano (0,5 g) se calienta durante 1 hora a 100° C en atmósfera de nitrógeno en un tubo sellado, y enfriado. El producto crudo se cromatografía en alúmina (gradiente de elución con éter de petróleo, benceno y acetato de etilo); la principal banda roja dio un sólido naranja (35 mg, 62%).

La cristalización a partir de metanol dio zeaxantina, MP, 211° C;  $\lambda_{\text{max}}$  (C6H6) 589, 462, y 439; V max, 3610, 1035, y 965 cm<sup>-1</sup>. El producto no se separó de la zeaxantina natural en el TLC mixto [Kieselgel HF 254, 30% de acetona en éter de petróleo (punto de ebullición de 60 a 80° C)].

Zeaxantina y su dipalmitato fisalien han sido sintetizados por Isler y otros (1956a, 1956b). A partir de la hidroxiacetona ópticamente puros 1, una síntesis eficaz de (3R, 3\_R) -- zeaxantina es descrita por Widmer y otros (1990). Creemers y otros (2002) sintetizaron zeaxantina E-pura como sigue: TiCl<sub>3</sub> (0,22 g, 1,4 mmol) en THF seco bajo argón; LiAlH<sub>4</sub> (0,04 g, 1,1 mmol) se añadió a la suspensión y la mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. 3-Hidroxi-retinal (0,21 g, 0,7 mmol) en THF se añade lentamente y la mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente.

Se añadió HCl (1 M) y la mezcla se extrajo dos veces con éter dietílico. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl, se seca con MgSO<sub>4</sub>, y concentrada en vacío. Después la purificación en una columna de gel de sílice (50% dietil éter / éter de petróleo), y posterior recristalización (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, -20 ° C), se obtuvo pura-E zeaxantina (0,02 g, 0,04 mmol, 10%).

En vitro, la conversión de la luteína a la *meso*-zeaxantina es fácilmente logrado en una reacción básica catalizada (Bone y otros 1993), y esta es la base de un proceso industrial para su síntesis y uso en alimentos para aves. La hipótesis de la conversión es apoyada por la distribución de los carotenoides individuales en la retina (Bone *et al.*, 2007).

### **c) Fermentación por microorganismos productores**

La zeaxantina tiene una permanencia muy corta en plantas superiores, además de que la extracción de fuentes naturales no es viable económicamente debido a las bajas concentraciones presentes; en vista de esto, la producción microbiológica de este valioso carotenoide tiene mucho interés.

Realmente se conocen pocas especies bacterianas que produzcan zeaxantina libre (no glicosilada), entre ellas, ciertos metilótrofos y flavobacterias marinas (Nelis y Leenheer, 1989; Hendry y Houghthon, 1996). De éstas, las flavobacterias sintetizan normalmente grandes cantidades de zeaxantina en presencia de oxígeno (Gross, 1987) y se sabe que los nutrientes que repercuten de alguna manera en la producción de este pigmento son entre otros, la fuente de nitrógeno y el hierro presente en el medio de cultivo. La

fermentación de *Flavobacterium sp.* en un medio que contenga glucosa y licor de remojo de maíz, se reportó que generaba de 10 a 40 mg de zeaxantina por litro, pero en otros estudios realizados posteriormente, la proporción se incrementó a 335 mg/l por la suplementación del medio con ésteres palmíticos, metionina, piridoxina, sales de hierro y por adición continua de nutrientes y reducción de la temperatura. Este procedimiento fue patentado en 1973 por Sheperd, Dasek y Carels (Nelis y Leenheer, 1989).

La fermentación es uno de los procesos asociados con la producción de algunos metabolitos de interés, a partir de microorganismos, es de gran importancia comercial y generalmente está encaminada a establecer procesos a escala industrial.

Los requisitos indispensables para llevar a cabo el proceso de fermentación son:

- a) Microorganismo adecuado, y éste puede ser utilizado como células microbianas libres o inmovilizadas.

En la fermentación con células libres, éstas se pueden inocular de manera directa en el medio de cultivo, pero tienen ciertas desventajas, como que el microorganismo sufre mayor estrés mecánico, inhibición o muerte por la producción de sus propios metabolitos.

En la fermentación con células inmovilizadas, éstas se pueden conservar por tiempos más prolongados que las células libres y una vez utilizadas pueden volver a reutilizarse sin que las células del microorganismo sufran algún daño (Montes y Magaña, 1991). Existen diferentes métodos para inmovilizar células, como son:

- Entrecruzamiento físico y covalente.
- Adsorción y unión covalente sobre matrices insolubles.
- Atropamiento físico dentro de materiales porosos.
- Encapsulamiento.

Las ventajas de utilizar células inmovilizadas son: alargamiento de la fase de producción del metabolito de interés, permite la re-utilización de las células, facilita la recuperación del producto, se reduce el comportamiento de fluido no-newtoniano, se facilita la transferencia de masa, el microorganismo no sufre estrés mecánico o es casi nulo (Gierhart y High, 1994).

b) Medio de cultivo con nutrientes esenciales para el microorganismo.

c) Condiciones fisicoquímicas apropiadas de proceso.

La fermentación se puede llevar a cabo en estado sólido y cultivo sumergido.

#### **Fermentación en cultivo sumergido.**

La fermentación en cultivo sumergido es el proceso más utilizado ya que proporciona una mayor concentración del metabolito de interés y es de fácil operación, económico, no requiere gran espacio, su operación es confiable y práctica y se tienen mayor control de las posibles contaminaciones del ambiente (Negrete, 1999).

La fermentación en cultivo sumergido se puede llevar a cabo tanto en matraz agitado como en algunos fermentadores agitados y equipados adecuadamente para el control de parámetros de proceso (Negrete, 1999). Los factores fisicoquímicos involucrados en el proceso de fermentación en cultivo sumergido, influyen de manera directa en el desarrollo del microorganismo haciéndolo lento o acelerado, inhibiendo o favoreciendo el crecimiento ó incrementando la producción del metabolito de interés.

Los principales factores en los que se debe de tener mayor control en el proceso de fermentación son:

**Temperatura:** Es uno de los factores más importantes, los estudios cinéticos realizados han mostrado que la variación de ésta variable afecta de manera directa el proceso de fermentación tanto cualitativa como cuantitativamente en el crecimiento y formación de metabolitos de interés. En ciertos microorganismos la variación de 1° C es determinante para lograr el objetivo del proceso establecido en particular. Se ha encontrado

que la temperatura adecuada para el crecimiento del microorganismo se encuentra entre 31 y 32° C, y otros afirman que se debe situar en 27° C, pero esto depende del microorganismo en particular (Konemann *et al.*, 1998).

**Potencial de Hidrógeno (pH):** La fuente de nitrógeno que se utiliza determina el pH del medio al inicio de un proceso de fermentación y determina las reacciones que se llevan a cabo al variar los valores de pH. Al igual que la temperatura es de suma importancia, estudios realizados han demostrado que la variación de éste factor afecta de manera directa el proceso de fermentación, tanto cualitativa como cuantitativamente en el crecimiento y formación de productos de interés. El pH óptimo varía según el microorganismo de trabajo y el objetivo perseguido (Negrete, 1999).

**Aireación y agitación:** La mezcla del medio de cultivo con las células bacterianas y la aireación son más fáciles de controlar en un matraz pequeño que en un fermentador industrial. Una parte importante del fermentador es el sistema de aireación, el oxígeno es poco soluble en agua y un fermentador con una gran población microbiana tiene una mayor demanda de oxígeno para el cultivo. A medida que se incrementa el tamaño del fermentador, también incrementa la relación superficie de espacio/volumen de masa, y en un fermentador de mayor tamaño es más fácil la transferencia de oxígeno, por lo que este factor es de gran importancia para fermentaciones a escala industrial (Negrete, 1999).

## 2.4. Biorreactores

El uso de biorreactores para la elaboración de productos de fermentación es de reciente aplicación. Particularmente la operación de estos biorreactores en condiciones antisépticas para la producción de antibióticos surgió en la década de los 40's. Desde esta década los reactores de tanque agitado y los reactores de columna son comúnmente utilizados en la industria biotecnológica. La decisión del tipo de reactor se basa principalmente en la transferencia de masa y energía. Es decir, que el transporte de los nutrientes a las células sea eficiente. Igualmente es necesario que se realice adecuadamente la transferencia de oxígeno de la fase gas, al medio líquido y a las células (Parra-Saldívar, 2000).

En su definición más simple, los biorreactores son recipientes en los cuales se llevan a cabo reacciones bioquímicas y/o bioprocesos, ya sea con enzimas, microorganismos o con células vegetales y animales viables y no viables (especies que se conocen como biocatalizadores). Las reacciones bioquímicas se aprovechan para la transformación y producción de sustancias biológicas y químicas. Los bioprocesos se emplean para la transformación de materia orgánica con la ayuda de un biocatalizador, en síntesis química y para la conversión de material de desecho a productos útiles (reciclaje) o a efluentes que no son peligrosos para el ambiente (tratamiento de desechos). La característica más importante de los bioprocesos es su elevado potencial sintético para llevar a cabo complicadas reacciones químicas en un solo paso.

El término fermentador, cuando se usa en el contexto de la microbiología industrial, incluye cualquier proceso microbiano a gran escala que se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Los microbiólogos emplean el término fermentación de dos formas distintas. En el contexto metabólico, la fermentación se refiere al crecimiento en ausencia de un receptor de electrones externo; mientras que en el contexto de los bioprocesos industriales, se habla de fermentación cuando se refiere al crecimiento de grandes cantidades de células.

El diseño de biorreactores depende de la concentración de biomasa, los requerimientos de esterilidad, el mezclado, la suspensión, la aireación, la transferencia de calor, y la generación de condiciones óptimas de esfuerzo cortante.

Como resultado de un amplio intervalo de demandas hechas por los sistemas biológicos sobre su ambiente, en relación con el suministro de nutrientes disueltos más oxígeno y sobre la disposición de los productos metabólicos, no existe un biorreactor universal.

Las necesidades generales de mayor importancia para un biorreactor son las siguientes:

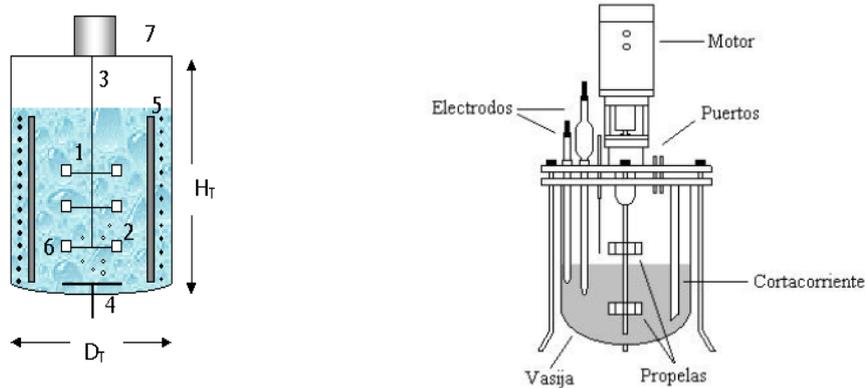
- Condiciones monosépticas (presencia exclusiva del microorganismo de interés)
- Volumen residente
- Mezcla óptima, con un esfuerzo cortante bajo y uniforme
- Adecuado transporte de masa (de oxígeno)
- Condiciones de flujo claramente definidas
- Alimentación del sustrato evitando el defecto o el exceso de nutrientes
- Transferencia de calor moderada
- Conveniente suspensión de sólidos
- Satisfacción de las exigencias de diseño: a) Susceptible de ser esterilizado, b) Construcción simple, c) Técnicas adecuadas de medición, control y regulación, d) Cambio de escala, e) Versatilidad de uso, f) Operación de estado estacionario estable según la necesidad, g) Compatibilidad con las características de las corrientes de entrada y de salida y h) Mecanismos antiespumantes.

### **Biorreactores de tanque agitado.**

La geometría y el funcionamiento de los biorreactores de tanque agitado son muy similares a la de los reactores químicos de este tipo, con la diferencia de que los esfuerzos cortantes generados por la agitación deben ser considerablemente disminuidos para evitar el daño de los biocatalizadores.

Típicamente, los biorreactores de tanque agitado son tanques cilíndricos con fondo plano o levemente curvo donde la mezcla y la dispersión del gas, esta última en el caso de los procesos aeróbicos, se lleva a cabo por la acción de un agitador, generalmente ubicado en el centro del tanque. La relación entre la altura y el diámetro del tanque ( $H_T/D_T$ ) puede variar pero generalmente está dentro del intervalo [1 - 3]. El agitador crea una corriente de flujo dentro del sistema que hace que el líquido circule por todo el tanque y vuelva de vez en cuando al agitador. Consta de un eje sobre el cual van montados uno o más rodetes. En los biorreactores de tanque agitado de gran altura se acostumbra usar varios rodetes, ubicados a diferentes alturas sobre el eje, con el fin de garantizar la mezcla.

El agitador, además de promover la homogenización del medio (contiene los biocatalizadores, sustratos y demás nutrientes) y la dispersión del gas en éste, incrementa la velocidad de transferencia de calor. En los tanques más pequeños, el control de temperatura se logra a través de chaquetas de calentamiento/enfriamiento, mientras que en los tanques de mayor tamaño, la temperatura se mantiene constante a través de serpentines. En los procesos aeróbicos, el gas es introducido al biorreactor, generalmente, a través de difusores ubicados en el fondo del tanque. Los difusores pueden hacer parte de un anillo o plato o simplemente ser un tubo abierto en uno de sus extremos con uno o más orificios. La mayoría de los biorreactores de tanque agitado están provistos de baffles para prevenir la formación de vórtices y promover la mezcla del fluido. En la Figura 2.14 se observa la apariencia común de este tipo de biorreactores.



**Figura 2.14.** Biorreactor de Tanque Agitado típico. 1) Agitador; 2) Rodete; 3) Eje del agitador; 4) Difusor de aire; 5) Serpentin de calentamiento / enfriamiento; 6) Baffles; 7) Motor.

En los biorreactores de tanque agitado no aireados, la labor principal de la agitación es la homogenización. Esta resulta relativamente fácil, considerando que la densidad de los microorganismos y la del medio acuoso es, por lo general, casi la misma. Una excepción a esto último la constituyen aquellos medios en los cuales se presenta la formación y posterior floculación de pellets microbiales. En los biorreactores aeróbicos de tanque agitado, la dispersión del gas y la remoción de calor, las cuales dependen de la agitación, son de vital importancia para el proceso bioquímico; la primera porque de ella depende la actividad biológica de los biocatalizadores y la segunda porque durante los procesos biológicos aeróbicos se genera una gran cantidad de calor que debe ser removida.

Entre más grande sea el biorreactor, es más difícil obtener una aireación uniforme y una adecuada homogenización y remoción de calor. En los biorreactores aeróbicos de tanque agitado pequeños ( $<1\text{m}^3$ ), la principal función del agitador es la dispersión del gas en el líquido. En los biorreactores aeróbicos de tanque agitado grandes ( $>10\text{m}^3$ ), tanto la homogenización como la aireación y la remoción de calor adquieren igual importancia, puesto que las tres presentan dificultades importantes. El tipo de agitador depende del sistema biológico y de las propiedades del medio (viscosidad, número de fases, etc.).

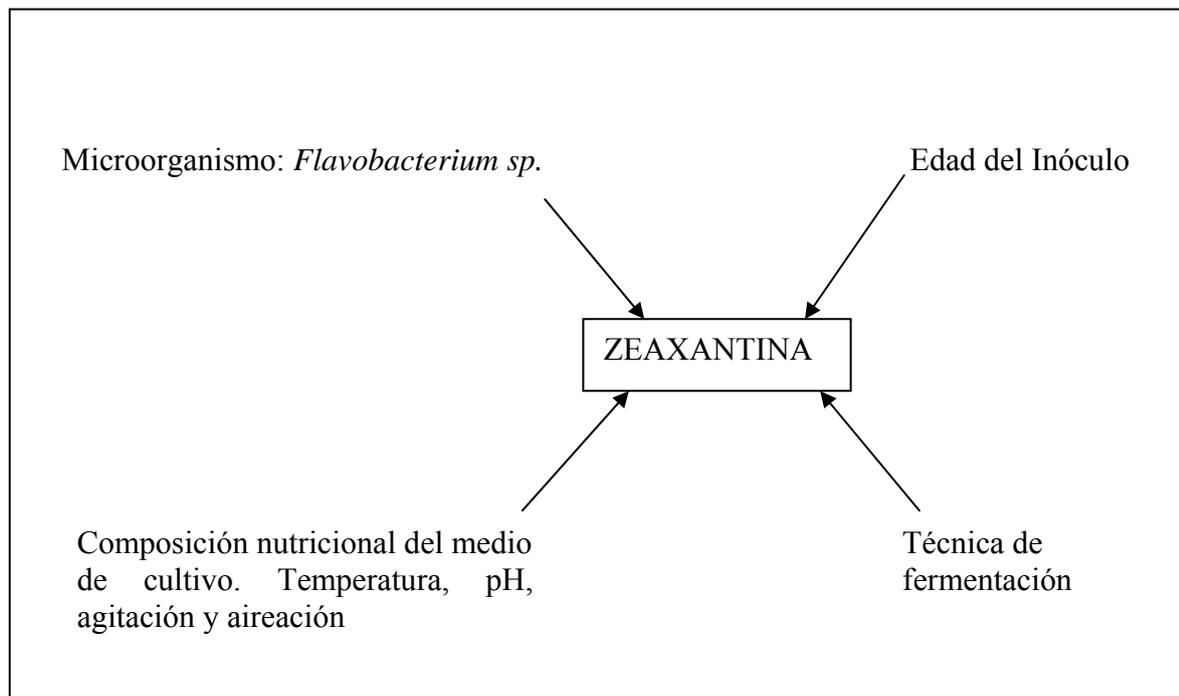
Los biorreactores de tanque agitado son los más utilizados en la industria bioquímica entre otras cosas porque se adaptan a diferentes procesos fermentativos y porque su reparación se reduce, la mayoría de las veces, al cambio de los agitadores o alguna otra pieza mecánica. Parámetros de diseño como el tiempo de mezcla, las áreas interfaciales específicas gas - líquido y los coeficientes de transferencia de masa y calor, dependen estrechamente de la hidrodinámica del líquido, razón por la cual es necesario caracterizar los patrones de flujo y turbulencia del sistema (Caicedo Argoti, Andrés, 2007).

## **2.5. Características del género *Flavobacterium***

En general tienen como características el ser bacilos con extremos redondeados, miden típicamente  $0.5 \times 1.0$  a  $3.0 \mu\text{m}$ , no forman endoesporas, son células *Gram* negativas, no móviles y de crecimiento aerobio; las colonias poseen pigmentaciones amarillas a naranjas, pero también existen cepas no pigmentadas. Las colonias son translúcidas, ocasionalmente opacas, circulares y con un diámetro de 1 a 2 mm, convexas o poco convexas, más lisas y brillantes con el tiempo. La resistencia y sensibilidad a antibióticos de *Flavobacterium* se muestran en el Cuadro 2.2. Dan positivo a las pruebas de la catalasa, oxidasa y fosfatasa; pueden o no producir indol (la producción de indol en caldo de triptofán es una prueba que señala en particular a especies de *Flavobacterium*), los azúcares son desdoblados lentamente por oxidación sin producción de gas, el intervalo de temperatura de crecimiento óptimo es de  $25\text{-}30^\circ \text{C}$  a un pH de 6.5 a 7.5 (Konemann *et al.*, 1998). Se encuentran generalmente en el suelo, en el agua, en carnes crudas, leche y otros alimentos, y algunas cepas han sido aisladas de materiales patológicos humanos (Holt *et al.*, 1994). Sin embargo, existe aún, un poco de heterogeneidad en los organismos incluidos en este género (Hendiré *et al.*, 1968) (Cuadro 2.3).

Se conocen muy pocas especies bacterianas que produzcan zeaxantina libre (no glicosilada), entre ellas, ciertos metilótrofos y flavobacterias marinas (Nelis y De Leenheer, 1989; Hendry y Houston, 1996). Las flavobacterias sintetizan de manera natural grandes cantidades de zeaxantina en presencia de oxígeno (Gross, 1987), y se sabe que la fuente de nitrógeno, hierro y magnesio presentes en el medio de cultivo afectan la producción de zeaxantina. En la Figura 2.15 se muestran los factores de mayor influencia en la producción de zeaxantina.

La fermentación de *Flavobacterium sp.* en matraz agitado con un medio de cultivo que contenga mínimo la presencia de glucosa y licor de remojo de maíz, se reportó que generaba de 10 a 40 mg de zeaxantina por litro de medio de cultivo, pero en estudios realizados posteriormente, con cepas mutantes de *Flavobacterium*, la proporción se incrementó a 335 mg por litro de medio de cultivo por el suplemento al medio de cultivo con ésteres palmíticos, metionina, piridoxina, sales de hierro y por adición continua de nutrientes y reducción de la temperatura (Ninet y Renaut, 1979). Este procedimiento fue patentado en 1973 por Sheperd, Dasek Y Carels, pero hasta este momento la fermentación en escala industrial aún no se han logrado obtener resultados satisfactorios (Nelis y De Leenheer, 1989).



**Figura 2.15.** Factores importantes que afectan la producción de zeaxantina (Olmedilla *et al.*, 2001).

**Cuadro 2.2.** Resistencia y sensibilidad a antibióticos de *Flavobacterium sp.* (Yabuuchi et al., 2002).

ANTIBIÓTICOS	% DE SENSIBILIDAD	% DE RESISTENCIA
Amoxicilina	0	100
Ceftazima	100	0
Ciprofloxacina	100	0
Gentomicina	100	0
Novobiocina	100	0
Penicilina	0	100
Tetraciclina	0	100

**Cuadro 2.3.** Perfiles de producción de carotenoides de algunas cepas bacterianas. (Berry, Janssens, Hunmbelin, Jore, Cleenwerck, Vancanneyt, Bretzel, Mayer, López-Ulibarri, Shanmugam, Swings y Pasamontes, 2003).

Cepa.	Carotenoides (Porcentaje del total).*			
	ZXN	CXN	ADN	AXN
<i>P. zeaxanthinifaciens</i> ATCC 21588	100			
<M> R114	100			
<M> R1534	100			
<M> R-1506	100			
<M> MBIC 3966	100			
<i>Paracoccus sp.</i> MBIC 3024		36		64
<M>MBIC 4017		25	4	71
<M> MBIC 4020				100
<i>P. Marcusii</i> DSM 11574		46		54
<i>P. carotinifaciens</i> E-396		56		44

\*ZXN, Zeaxantina (incluyendo los isómeros *cis*); CXN, Cantaxantina; ADN, adenoxantina; AXN, astaxantina.

### **III. OBJETIVOS.**

#### **3.1 Objetivo general**

Aplicación de la superficie de respuesta en la optimización de la producción microbiológica de zeaxantina.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Efectuar un estudio dinámico del desarrollo y la producción de zeaxantina con la bacteria *Flavobacterium sp.* ATCC 21588 en matraz agitado.
2. Establecer la dinámica de crecimiento de *Flavobacterium sp.* ATCC 21588 y la producción de zeaxantina, en un biorreactor de tanque agitado.
3. Determinar por medio de un diseño experimental de superficie de respuesta los niveles de los factores que influyen en la producción óptima de zeaxantina en el proceso de fermentación en el biorreactor de tanque agitado.
4. Caracterizar el pigmento obtenido del maíz amarillo y el pigmento obtenido del proceso de fermentación, utilizando técnicas instrumentales de análisis apropiadas.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación fue realizada en el Instituto Tecnológico de Celaya, en el laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería a cargo del Dr. Eleazar M. Escamilla Silva, profesor-investigador del departamento de Ingeniería Química del mismo Instituto y profesor titular de la materia de Fisicoquímica en el Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

### 4.1. Equipo de Trabajo

A continuación se describe el equipo utilizado para la realización de este trabajo de investigación:

- Autoclave marca ALL AMERICAN Mod. 1925 X.
- Balanza Analítica marca SCIENTECH Mod. 210 D.
- Biorreactor marca CRODE, de 14 l de capacidad que incluye, vaso fermentador de acero inoxidable con chaqueta integrada y motor agitador.
- Bomba de recirculación de control de temperatura marca MRC.
- Campana de flujo laminar marca ALDER Mod. CFH-13.
- Centrífuga DYNAC II marca BECTON DICKINSON Mod. 420103.
- Desecador marca PYREX.
- Equipo para cromatografía líquida de alta resolución marca AGILENT. Serie 1200.
- Espectrofotómetro de absorción infrarroja marca PERKIN ELMER Mod. 783.
- Espectrofotómetro de absorción infrarroja marca THERMO SCIENTIFIC. iS10.
- Espectrofotómetro de absorción UV-VISIBLE marca PERKIN ELMER Mod. 2280.
- Estufa marca FELISA Mod. FE141 AD.
- Horno marca FELISA Mod. 242 AD.
- Incubadora de agitación orbital con control de velocidad de agitación y control de temperatura, marca CRODE.
- Incubadora marca FELISA Mod. FE-293.
- Incubadora con agitación orbital marca LAB-LINE.
- Microscopio LEICA ATC 2000.
- Molino Industrial automático para molienda de maíz.
- Placas de agitación/calentamiento marca CORNING.

- Potenciómetro marca HANA instruments.
- Potenciómetro marca DENVER INSTRUMENT.
- Rotavapor marca HEIDOLPH Mod. LABOROTA 4000.
- Sistema de microfiltración marca MILLIPORE.
- 

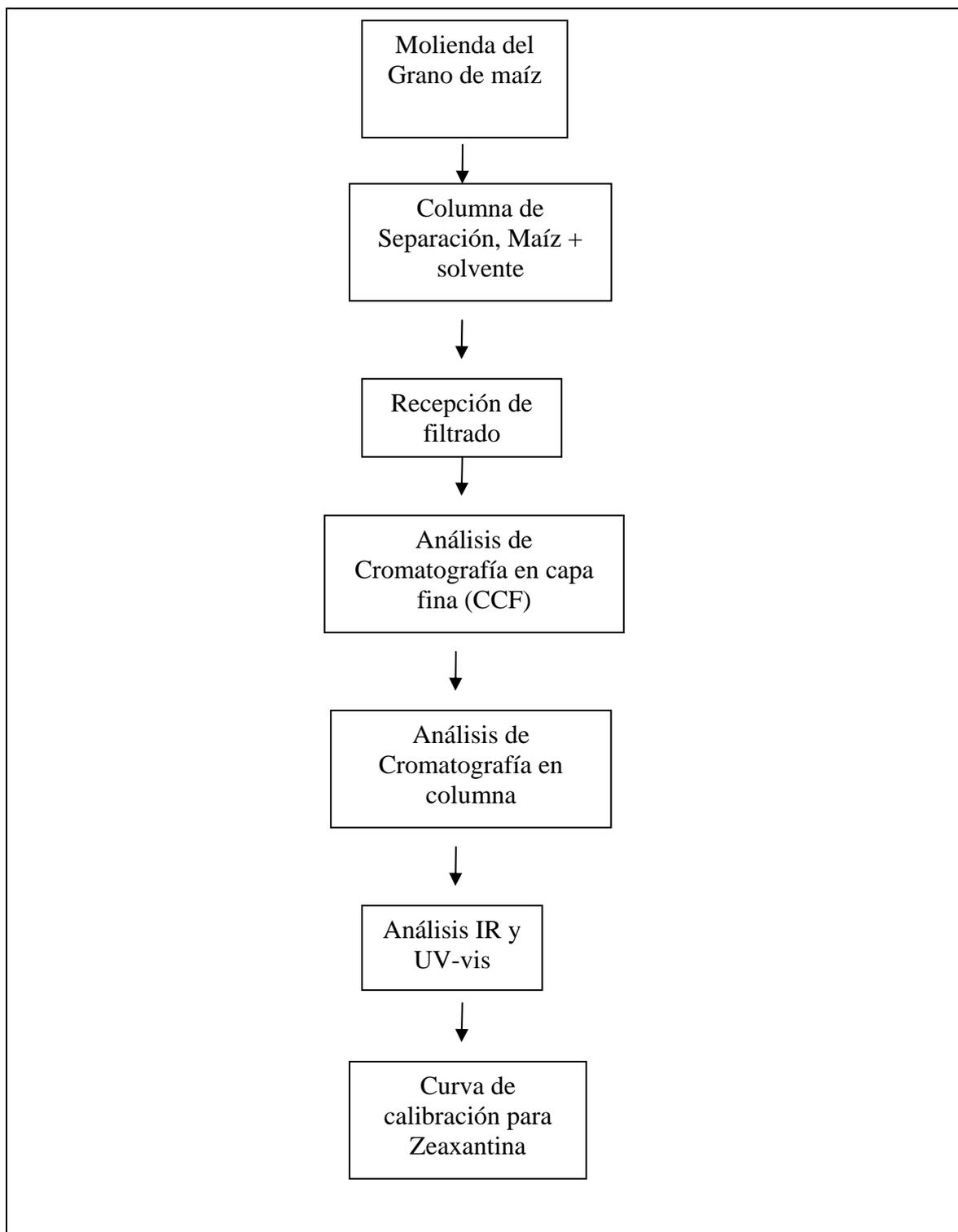
#### **4.2. Material biológico**

Se trabajó con la bacteria catalogada como *Flavobacterium sp.* No. de cepa 21588 en el ATCC. Para lograr su identificación se utilizó la técnica de *Gram* o Método de *Gram*. Esta bacteria se mantuvo en refrigeración a una temperatura de 4 °C para su siembra y propagación.

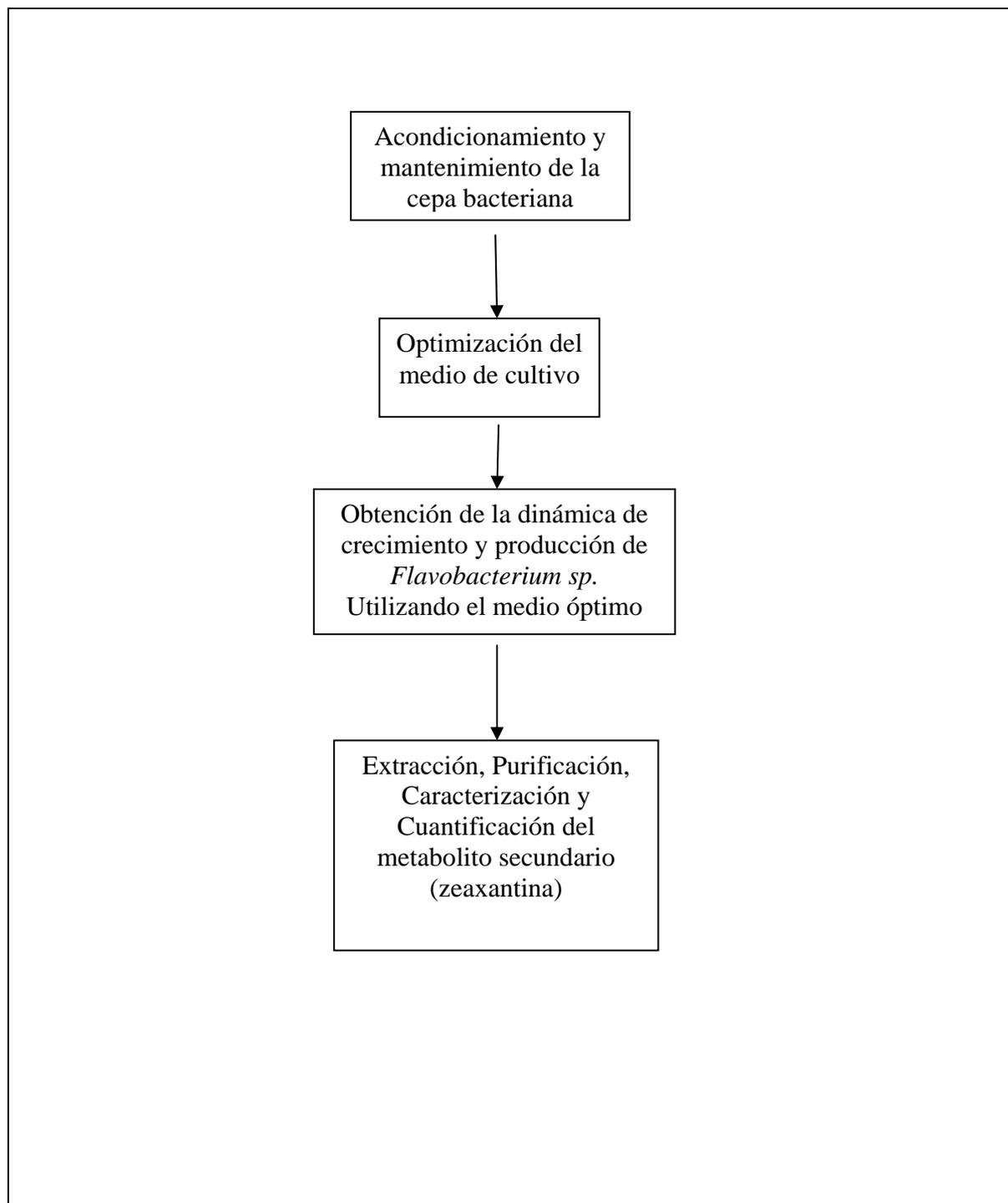
Medio de cultivo líquido de propagación celular: Caldo de Soya-Trypticaseína (48-72 H, a 27°C y 250 r.p.m.), y la adición de 15.0 g/l de NaCl. Se esteriliza a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos.

Medio de cultivo sólido de propagación celular: Agar de Soya-Trypticaseína. (Cajas petri, a 27°C y durante 48 h), adición de 15 g/l de NaCl. Se esteriliza a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos.

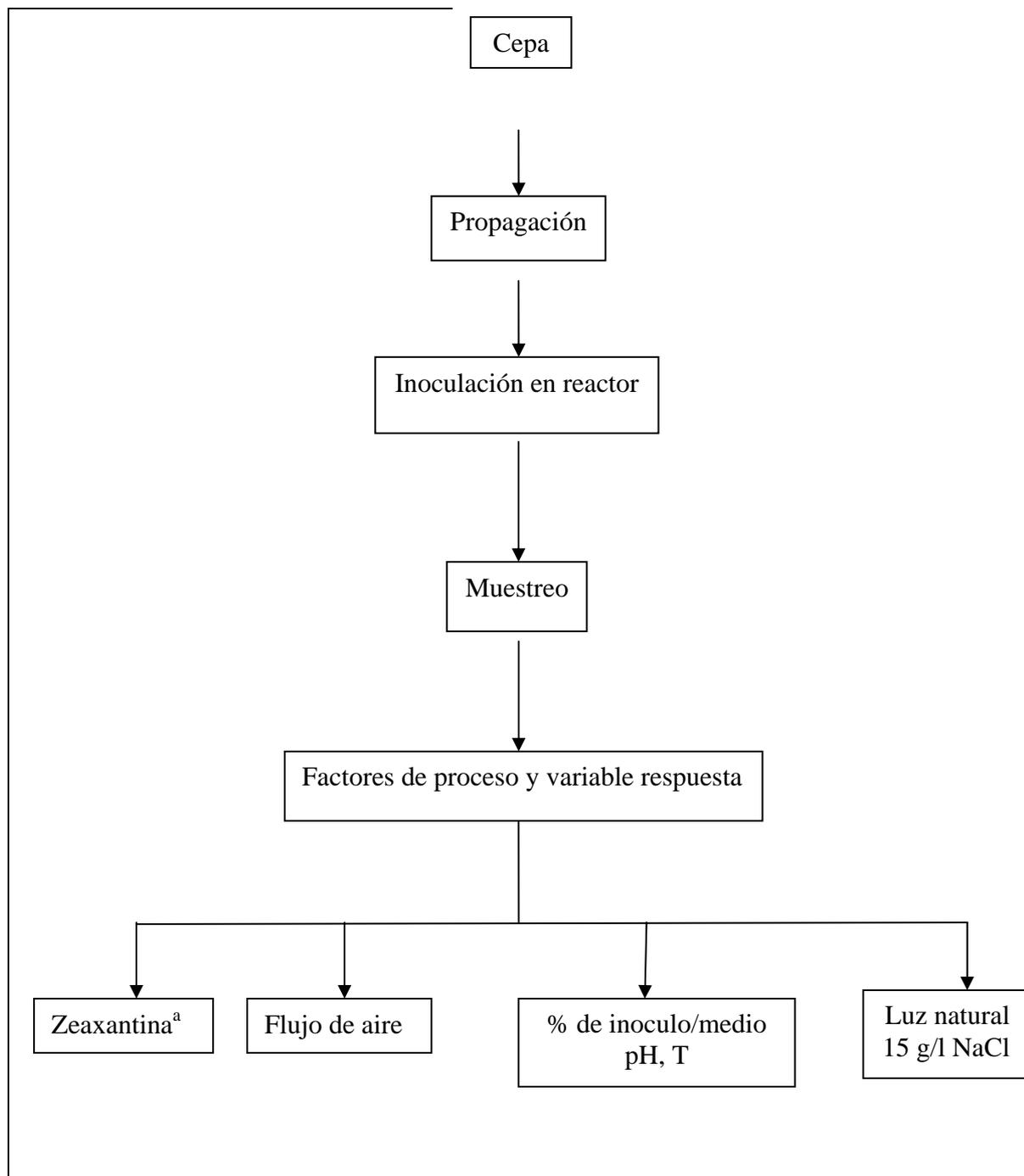
Las figuras siguientes describen la estrategia general que se siguió para obtener zeaxantina del maíz amarillo (Figura 4.1), para obtener zeaxantina en los procesos de fermentación en matraz agitado (Figura 4.2) y para obtener zeaxantina del proceso de fermentación en biorreactor de lecho fluidizado (Figura 4.3).



**Figura 4.1.** Secuencia para la obtención y análisis de zeaxantina del maíz amarillo.



**Figura 4.2.** Secuencia para la obtención de zeaxantina por el proceso de fermentación en matraz agitado.



<sup>a</sup>Variable respuesta del diseño experimental de fermentación en biorreactor.

**Figura 4.3.** Secuencia para la obtención de zeaxantina por el proceso de fermentación en biorreactor de tanque agitado.

### **4.3. Acondicionamiento y mantenimiento de la cepa bacteriana**

#### **4.3.1. Acondicionamiento de *Flavobacterium sp* ATCC 21588**

Para acondicionar la cepa bacteriana se utilizó una caja petri sembrada con el microorganismo y se trabajó en condiciones asépticas (trabajando en campana de flujo laminar); con una asa de aluminio estéril, se obtuvo una pequeña cantidad del material sembrado y se resembró en forma de estrías en las cajas petri previamente preparadas para tal fin. Las placas se incubaron a 27 °C durante 48 h . Al término del período de incubación, las cajas se sellaron con polifilm y se guardaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso en la etapa de propagación y posterior resiembra.

#### **4.3.2. Pruebas de salinidad**

Debido a que la bacteria utilizada en este experimento fue aislada de aguas superficiales marinas, requiere de grandes cantidades de sal (aunque no mayores de 30 g/l) para llevar a cabo su metabolismo eficientemente, por lo que se hicieron algunas pruebas preliminares de niveles de salinidad con el fin de determinar la cantidad adecuada, con la cual se lograra mantener al microorganismo en las mejores condiciones de desarrollo y productividad de pigmento.

Para tal fin, se inocularon varias cajas con agar de soya-tripticaseína y con una concentración de: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 g/L de NaCl. Para la inoculación, realizada en forma de estría, se escogió en cada caso, colonias muy pequeñas y de tamaño similar y se incubó a 27° C durante 48 horas.

La evaluación de la densidad microbiana, así como la intensidad del pigmento se hizo en forma visual, utilizando una escala que emplea símbolos (+), donde “+”, corresponde a un nivel bajo en la respuesta (densidad microbiana o concentración de pigmento); “++”, corresponde a un nivel medio y, “+++”, corresponden a un nivel abundante en la respuesta.

#### 4.3.3. Propagación y mantenimiento de *Flavobacterium sp.*

La cepa se resembró aproximadamente cada 21 días en agar de soya tripticaseína, marca BIOXON, adicionado con 15 g/l de NaCl (concentración que resultó óptima en las pruebas preliminares de salinidad), esterilizándolo y enfriándolo previamente a la inoculación en forma de estría. Posteriormente se incubó a 27° C por 48 horas y se conservó en refrigeración (4 °C) hasta su utilización. Cada vez que se requirió del empleo de una caja con el cultivo de *Flavobacterium sp.*, se revisaron al microscopio las características generales del cultivo, tales como la forma y apariencia de las colonias, color, tinción Gram, etc., con el fin de asegurar las buenas condiciones de la cepa.

#### 4.4. Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó en el experimento se presenta en el Cuadro 4.1.

**Cuadro 4.1.** Medio de cultivo utilizado para fermentación de *Flavobacterium sp.* ATCC 21588 (Escamilla y Morones, 2001).

Tipo de Nutriente	Concentración
Dextrosa $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{CHO}$	10 g/L
Licor de remojo de maíz	5 g/L
Cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	5 g/L
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KHPO}_4$ )	5 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1.5 g/L
Sulfato de manganeso monohidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.01 M
Cloruro de cobalto hexahidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.01 M
Sulfato de cinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.05 M
Sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.05 M

#### 4.4.1. Condiciones de propagación para llevar a cabo los tratamientos

Cada una de las propagaciones en esta etapa se llevó a cabo en matraz erlenmeyer de 500 ml con 300 ml del medio de cultivo correspondiente, adicionado con 15 g/l de NaCl, a pH de 7.3 e incubando durante 48 horas a 27° C y 250 rpm de agitación orbital. Se utilizó un volumen de inóculo del 5 al 10% con respecto del volumen del medio fermentativo que es de 14 l.

#### 4.4.2. Características del inóculo

Se utilizó un inóculo de 48 horas, el cual se sembró en caldo de soya trpticaseína adicionado con 15 g/l de NaCl, a un pH de 7.3 e incubándose a 27° C con 250 rpm de agitación orbital. La inoculación a cada medio se hizo de manera aséptica empleando campana de flujo laminar.

#### 4.4.3. Muestreo

Durante el transcurso de las fermentaciones (0 – 56 h), se tomaron 8 muestras a intervalos iguales de tiempo, a las cuales se les determinó la cantidad de glucosa, biomasa, nitrógeno amoniacal residual, fosfatos y producción del pigmento zeaxantina.

#### 4.5. Selección del diseño experimental

Como un primer paso, se identificaron las variables que se consideró podrían ser manipuladas y pudieran ser elementos importantes en el desarrollo y productividad del microorganismo.

Dentro del proceso para la obtención de la zeaxantina se identificaron tres variables y, los niveles a los cuales serían estudiadas dichas variables fueron seleccionados a base de pruebas preliminares, así como a las condiciones de operación del biorreactor. La variable de respuesta a evaluar fue la concentración de zeaxantina, que se cuantificó al final de la fermentación (a las 40 horas de iniciado el cultivo) (Cuadro 4.2 y Cuadro 4.3).

**Cuadro 4.2.** Factores que se incluyen en el modelo experimental.

<b>Variable</b>	<b>Nivel</b>
<b>(X<sub>1</sub>)</b> Aireación (vvm)	0.6 – 0.9
<b>(X<sub>2</sub>)</b> Mezclado (rpm)	200 - 400
<b>(X<sub>3</sub>)</b> Relación inóculo/medio de cultivo (%)	5.0 – 10 .0

Con base a los factores que se deseaba estudiar y teniendo en cuenta, como lo expresan Castaño y Domínguez en 2003, que el objetivo de un diseño experimental es desarrollar un proceso que resulte mínimamente afectado por fuentes de variaciones externas, con el fin de obtener un producto confiable en menor tiempo y a menor costo, se

debió cuidar que el diseño seleccionado, nos permitiera obtener datos apropiados, que pudieran ser analizados mediante métodos estadísticos a nuestro alcance y producir conclusiones válidas y objetivas.

**Cuadro 4.3.** Factores experimentales con sus niveles de operación.

Variable	Nivel		
	1	2	3
Aireación (vvm)	0.6	0.75	0.9
Mezclado (rpm)	200	300	400
Relación inóculo/medio de cultivo (%)	5.0	7.5	10.0

El diseño experimental Box-Beknhen seleccionado quedó planteado como se muestra en el Cuadro 4.4.

**Cuadro 4.4.** Estructura del diseño central compuesto Box-Beknhen (Castaño y Domínguez, 2003).

No.	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	-1	+1	0
3	+1	-1	0
4	+1	+1	0
5	0	-1	-1
6	0	-1	+1
7	0	+1	-1
8	0	+1	+1
9	-1	0	-1
10	+1	0	-1
11	-1	0	+1
12	+1	0	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

#### **4.5.1. Análisis estadístico**

El análisis de los resultados para un diseño central compuesto Box-Beknhen incluye:

- La determinación de la respuesta promedio de los niveles de los factores estudiados.
- Graficar los efectos de los factores, para tener una mejor comprensión de su comportamiento.
- La selección de los niveles óptimos de cada factor, comparando los promedios de las respuestas.
- La estimación del promedio del proceso para los niveles óptimos (Castaño y Domínguez, 2003).

Una vez que se llevaron a cabo los 15 experimentos (uno para cada combinación de niveles de los tres factores), se realizó el análisis estadístico utilizando el software JMP 5.0.1, para determinar la influencia de cada uno de los factores en el experimento y donde la variable de respuesta evaluada fue la concentración de zeaxantina.

#### **4.5.2. Gráficas de superficie de respuesta**

Estas gráficas son útiles para determinar la relación existente entre la respuesta experimental y las variables involucradas, empleando un polinomio de segundo orden, donde; “x” y “y” representan el conjunto de variables de las que depende el nivel de la respuesta “z” (Castaño y Domínguez, 2003).

#### **4.6. Cinética de crecimiento para *Flavobacterium sp.* ATCC 21588**

Para la obtención de la cinética de crecimiento se utilizó el medio de cultivo previamente especificado en el Cuadro 4.1, llevando a cabo la fermentación en matraces erlenmeyer de 500 ml de capacidad, con 300 ml del medio de cultivo correspondiente y adicionado con 15 g/l de NaCl, a pH de 7.3 e incubando durante 48 horas a 27° C y 250 rpm de agitación orbital. Se utilizó un volumen de inóculo del 10% con respecto del volumen del medio.

Durante el transcurso de la fermentación se tomaron 8 muestras, desde el tiempo cero, hasta las 56 h, en intervalos de 8 h . Se determinaron los valores de pH, biomasa, temperatura, glucosa, nitrógeno amoniacal residual, fosfatos y concentración de zeaxantina. Tanto el pH como la temperatura se monitorearon con los potenciómetros correspondientes, mientras que los azúcares reductores totales se cuantificaron con el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), la biomasa se evaluó con el método del peso seco (Scragg, 1996), el nitrógeno residual amoniacal por el método Kjeldahl modificado (AOAC, 1990), los fosfatos (Committee Report, 1958) y la zeaxantina, utilizando técnicas espectrofotométricas de absorción UV-VIS, de infrarrojo y HPLC (Sajilata *et al*, 2008).

#### **4.7. Caracterización y cuantificación de zeaxantina**

Para llevar a cabo la caracterización y cuantificación del pigmento obtenido de las fermentaciones con *Flavobacterium sp.*, fue necesario contar con un estándar de referencia. Dicho estándar se obtuvo a partir de maíz amarillo.

##### **4.7.1. Extracción y purificación del estándar de maíz amarillo**

###### **4.7.1.1. Extracción**

Para la extracción del pigmento, se hicieron algunas variaciones a las técnicas descritas por la AOAC en 1990 y Delgado-Vargas en 1996 para extracción de carotenoides en base a pruebas preliminares con varios solventes de extracción.

Se empacó una columna de vidrio con maíz amarillo finamente molido, colocando una pequeña capa de algodón en la boca de dicha columna con el fin de impedir la salida del maíz. Para extraer el pigmento contenido en el maíz se agregó poco a poco, por la parte superior de la columna, una solución 50:50 de alcohol-acetona, obteniendo, por el extremo inferior de la columna, el extracto del pigmento. Se siguió adicionando el solvente hasta la obtención de un líquido claro, tiempo en el cual, se desempacó la columna y se rellenó con nuevo maíz molido, repitiendo entonces, el procedimiento de adición de solvente de manera consecutiva hasta obtener una cantidad de pigmento suficiente para los experimentos programados.

Al pigmento extraído mediante el procedimiento exterior, se le sometió a destilación con vacío para la eliminación del solvente, en un rotavapor, a una temperatura no mayor de 50° C. Así, se obtuvo el colorante del maíz amarillo. A este se le saponificó para la eliminación de los ésteres de ácidos grasos (AOAC, 1990), se separó la epifase de la hipofase ayudados de un embudo de separación, añadiendo hexano y posteriormente una solución de sulfato de sodio anhidro al 10%. La epifase se destiló con vacío nuevamente, para la eliminación del solvente, y con esto, la recuperación del pigmento.

#### **4.7.1.2. Purificación del estándar de maíz amarillo**

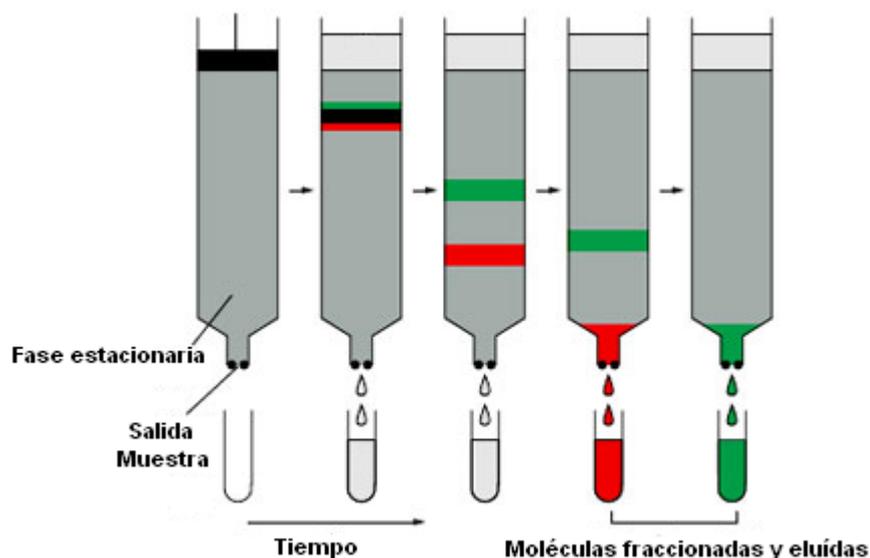
##### **a) Cromatografía en capa fina analítica**

Se emplearon placas de aluminio recubiertas con sílica gel ( $\text{SiO}_2$ ) de 2 x 8 cm (placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> para cromatografía analítica); se trazó una línea de referencia en el extremo inferior de la placa a una distancia aproximada de 0.5 cm y en ese punto se colocó cuidadosamente una muy pequeña gota de extracto de pigmento saponificado (con la punta de un capilar). Se eluyó el pigmento mediante cromatografía ascendente, con diferentes combinaciones de solventes en diversas proporciones para cada placa: hexano: acetato de etilo, en diferentes proporciones (80:20, 70:30) y utilizando una cámara cerrada para evitar la evaporación del solvente. Un poco antes de que el solvente llegase al otro extremo de las placas, éstas se sacaron de la cámara, se dejaron secar protegiéndolas de la luz; posteriormente se observaron con lámpara de luz UV para ver las manchas oscuras correspondientes a la separación de bandas. Esta prueba fue realizada a temperatura ambiente y con luz tenue, para evitar en lo posible, la isomerización del producto.

##### **b) Cromatografía en columna**

Una columna de vidrio se empacó de la siguiente manera: en la punta de la columna se colocó una capa de fibra conocida como cabello de ángel, pequeña y delgada para detener el material de empaque. Posteriormente se adicionó un volumen de sílica gel ( $\text{SiO}_2$ ) en polvo al 9% de humedad, con el fin de desactivar un poco la sílica gel; encima de esta capa se colocó un pequeño volumen del extracto del pigmento embebido en un poco de sílica, de manera que estuviese perfectamente adsorbido. Luego, encima de esa segunda capa, se adicionó otro pequeño volumen de  $\text{SiO}_2$  al 9% de humedad y un segundo trozo de algodón. Al terminar de incorporar la última capa, se acomodó el material de empaque dando pequeños golpecitos a la columna para cubrir posibles huecos, evitando dejar

demasiado apretado dicho material, para permitir la mejor separación de bandas. Como eluyente, se trabajó con el mejor sistema de solvente resultante, el cual fue el hexano: acetato de etilo, en proporción 70:30. Se recolectaron las fracciones (ya que se separó la fracción que contenía zeaxantina y la fracción que contenía otros carotenoides, siendo la mancha oscura de mayor tamaño zeaxantina, ya se tiene la información que el 85% de pigmento del maíz es zeaxantina) y se procedió a la purificación de la fracción de interés (zeaxantina).



**Figura 4.4.** Montaje de columna cromatográfica para purificación del estándar de maíz (Universidad Arturo Prat, República de Chile, 2008).

### c) Cromatografía en capa fina preparativa

Una vez que se recuperó la fracción de interés mediante la cromatografía en columna, se destiló a sequedad con vacío empleando un rotavapor, para la eliminación del solvente.

Para la purificación de la fracción se hizo una cromatografía en capa fina preparatoria empleando placas de vidrio de 20x20 cm, recubiertas con una delgada placa de sílica gel. El pigmento se colocó en uno de los extremos de la placa en forma de una línea muy delgada (mediante la punta de un capilar). Nuevamente se empleó hexano: acetato de etilo (70:30) como eluyente y se corrió la cromatografía ascendente en una cámara sellada para evitar la evaporación del solvente de elusión. Un poco antes de que el solvente llegase al otro extremo de la placa, se abrió la cámara y se reveló la placa con

lámpara de luz UV. Se raspó la banda de interés y se resuspendió en acetona, luego se filtro. El filtrado se destilo a sequedad, empleando vacío para eliminar el solvente.

#### **4.7.2. Extracción del pigmento que proviene de las fermentaciones con *Flavobacterium* ATCC 21588**

Se tomaron alícuotas de 30 ml. de cada fermentación con *Flavobacterium sp.*, se transfirieron a tubos cónicos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. Posteriormente se separó el paquete celular y se lavó dos veces con 10 ml de solución salina 0.9%. Una vez que el paquete celular estuvo libre de medio de cultivo, se adicionaron 15 ml de acetona, se homogeneizó perfectamente y se esperó unas horas en la oscuridad a que se llevara a cabo la extracción. Luego, se centrifugó nuevamente a 3000 rpm durante 10 min. y el sobrenadante se separó y guardó en congelación y en la oscuridad para su posterior análisis.

#### **4.7.3. Análisis infrarrojo del estándar de maíz y del pigmento obtenido en las fermentaciones con *Flavobacterium sp.* ATCC 21588**

Para este análisis se usó un espectrofotómetro de absorción infrarroja.

Las muestras analizadas fueron: extractos provenientes de las fermentaciones con *Flavobacterium sp.* ATCC 21588, usando acetona como solución extractora; y extractos de maíz amarillo saponificado, purificado y resuspendido en acetona. Las muestras se evaporaron a sequedad con vacío previamente al análisis. Se corrió el espectro de infrarrojo haciendo las mediciones por toda la región del infrarrojo, desde 4000 hasta 200 nm, utilizando una celda de NaCl.

#### **4.7.4. Análisis HPLC del estándar de maíz obtenido en las fermentaciones con *Flavobacterium sp.* ATCC 21588.**

Para este análisis se usó un equipo para HPLC marca Agilent equipado con un detector de fotodiodos y con una columna Spherisorb-OD524.0 -250 mm C<sub>18</sub>, con las siguientes condiciones de operación: tiempo de lectura de la prueba de 15 minutos con una tasa de flujo de 1.5 ml/min y un gradiente de agua y acetonitrilo (ACN) en proporción de 10% y 90% en vol-vol.

#### **4.7.5. Determinación de la longitud de onda máxima de absorción del estándar de maíz amarillo, así como del pigmento bacteriano**

Se hizo un barrido por toda la región UV-VIS para los extractos de bacteria y de maíz amarillo resuspendidos en acetona, con el fin de encontrar las longitudes de onda máximas de absorción para ambos extractos y buscar con esto, semejanzas de identidad de compuestos. En el análisis se empleó un blanco de acetona.

#### **4.7.6. Determinación de la concentración de zeaxantina por espectrofotometría visible**

Una vez establecida la longitud de onda máxima para el extracto saponificado de maíz en el paso anterior, se procedió a la preparación de un estándar de maíz amarillo, para, a partir de éste, preparar una curva de calibración para la cuantificación de zeaxantina y, con ésta, correlacionar las concentraciones de pigmento obtenido en cada fermentación.

La solución estándar se preparó de la forma siguiente: Se pesaron 50 mg del extracto de maíz llevado a sequedad empleando vacío y se adicionó en un matraz volumétrico de 50 ml, el cual se aforó a la marca con acetona pura. Se homogeneizó perfectamente y se protegió de la luz. La concentración de la solución estándar fue de 1 mg del extracto, equivalente a 1 mg de zeaxantina por mililitro de solvente (1 mg/ml), y a partir de ésta se prepararon estándares de concentraciones diferentes, a los cuales se les midió la absorbancia a 448 nm (la longitud de onda máxima para el estándar y el extracto de la bacteria, determinada en el punto anterior) empleando acetona como blanco o testigo, y con los datos generados se construyó posteriormente, una gráfica de concentración contra absorbancia, con la cual se pudiese interpolar la concentración del pigmento obtenido en las fermentaciones con *Flavobacterium sp.* ATCC 21588.

La forma de preparación de los estándares y sus concentraciones, para la curva de calibración de zeaxantina se describe en el Cuadro 4.5.

**Cuadro 4.5.** Construcción de la curva de calibración de zeaxantina.

<b>Estándar No.</b>	<b>Concentración (mg/ml)</b>	<b>ml de estándar de zeaxantina 1 mg/ml</b>	<b>ml de acetona</b>
1	0	0	5.0
2	0.05	0.25	4.75
3	0.1	0.5	4.5
4	0.2	1.0	4.0
5	0.3	1.5	3.5
6	0.4	2.0	3.0
7	0.5	2.5	2.5
8	0.6	3.0	2.0
9	0.7	3.5	1.5
10	0.8	4.0	1.0
11	0.9	4.5	0.5
12	1.0	5.0	0

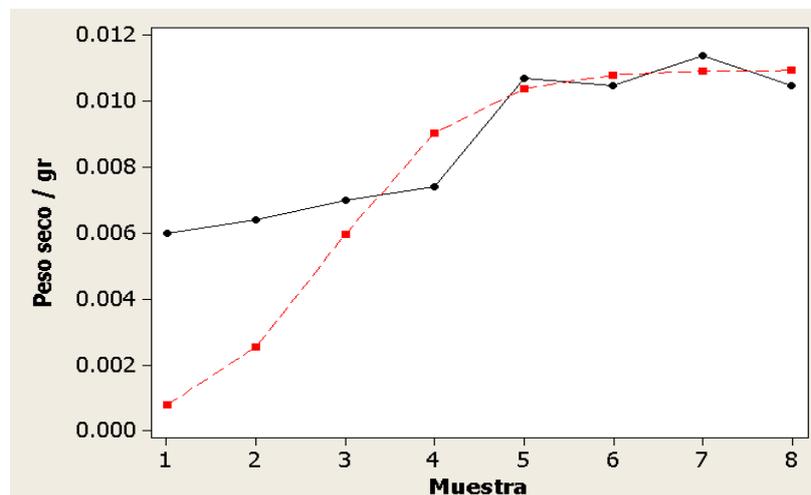
#### 4.8. Modelo logístico de crecimiento de Pearl Reed(Minitab, 2009)

El modelo de la curva en “S” ajusta al modelo de tendencia logística de Pearl-Reed. Este modelo se ajusta al caso en donde las series siguen una curva en forma de “S”.

El modelo es el siguiente:  $Y_t = (10^a) / (\beta_0 + \beta_1 \beta_2^t)$

Así definida, la función logística cumple las propiedades de ser una función monótona creciente, acotada en el intervalo [0,1]. Su representación gráfica (Figura 4.5) es una curva de forma sinusoidal en la que se observa que para valores pequeños de la variable “Y” la función experimenta un crecimiento lento, que aumenta rápidamente a medida que aumenta la variable (en este tramo se asemeja al crecimiento exponencial), y, finalmente, se ralentiza para valores altos de “Y”, alcanzando su cota máxima situada en el valor 1.

El significado de esta ecuación depende de la definición de las variables. Por ejemplo, en Biología es frecuente que “Y” sea la función de probabilidad del suceso dicotómico supervivencia o muerte del organismo observado cuando es sometido a un estímulo continuo, expresado éste como un modelo lineal (Y).



$$Y_t = (10^{*-1}) / (9.12816 + 467.293*(0.253506^{**t}))$$

—●— Valores reales.

-■- Valores ajustados.

**Figura 4.5.** Análisis de crecimiento del microorganismo de acuerdo con el modelo logístico de Pearl-Reed.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

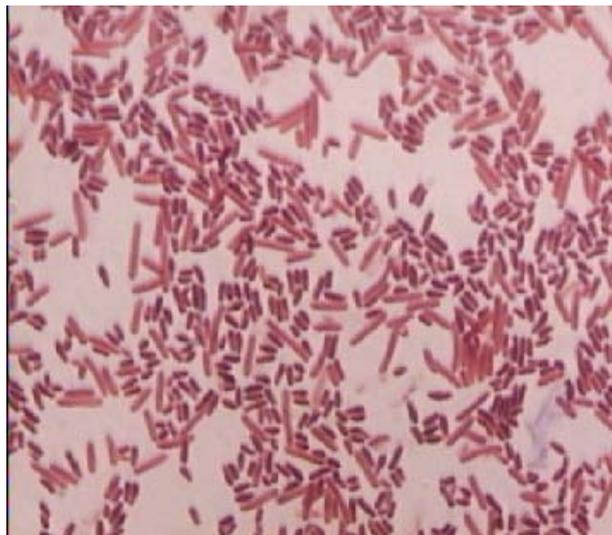
### 5.1. Reactivación de la cepa de *Flavobacterium sp.* ATCC 21588

Se logró la reactivación de la cepa *Flavobacterium* ATCC 21588, cuyas colonias presentaban consistencia cremosa, color amarillo, el cual resultó más intenso para las colonias jóvenes, mientras que para cultivos un poco más viejos, el color presentó pérdida de intensidad.

Al observarse al microscopio se encontraron bacilos *gram* negativos, pequeños en estadios jóvenes, y más largos en etapa madura, libres o agrupados en filas en ambos casos; dando positivo a la prueba de catalasa.



**Figura 5.1.** Siembra de *Flavobacterium sp.* en caja petri.



**Figura 5.2.** Vista al microscopio de *Flavobacterium sp.*

### 5.1.1. Pruebas de salinidad

Los resultados obtenidos de las pruebas de salinidad se muestran en el cuadro 5.1.

**Cuadro 5.1.** Densidad microbiana y concentración de pigmento obtenidos con diferentes concentraciones de NaCl.

Concentración NaCl (g/L)	Densidad microbiana	Concentración de pigmento
5	+	+
10	++	+
15	+++	+++
20	+++	++
25	++	++
30	++	+

+++ Abundante densidad microbiana ó concentración de pigmento.

++ Densidad microbiana media ó concentración de pigmento media.

+ Escasa densidad microbiana ó concentración de pigmento.

La concentración de sal que presentó mayor densidad microbiana, así como mayor concentración de pigmento fue la de 15 g/l, por lo que, para todos los tratamientos posteriores, se adicionó siempre esta concentración de NaCl al medio de cultivo.

### 5.2. Medio de cultivo

Se seleccionó al licor de maíz como fuente de nitrógeno (Morones, *et al.*, 2001).

Díaz *et al.* (1996) reportaron un máximo de 10.3 ppm de zeaxantina al utilizar un medio de cultivo compuesto de una combinación de licor de remojo de maíz con tristoná, y de 9 ppm de zeaxantina en un medio con una mezcla de licor de remojo de maíz con extracto de levadura, utilizando también la cepa ATCC 21588, teniendo la desventaja de la elevación de costos en la elaboración del medio de cultivo por la mezcla de varias fuentes de nitrógeno orgánico y presentándose un exceso aparente en los requerimientos de nitrógeno, que se ve reflejado en la disminución de la productividad.

Existen reportes de incrementos importantes en la productividad de zeaxantina al adicionar el medio de cultivo con aminoácidos libres, como metionina, oligoelementos y vitaminas como la piridoxina (Shepherd *et al.*, 1976), promotores de formación de pigmentos y factores de crecimiento, enzimas, etc. (Gierhart, 1994), ésteres palmíticos y otros suplementos por adición continua al medio y reducción de la temperatura (Ninet y Renault, 1979), que si bien, mejoran la producción de pigmento, podría resultar poco costeable en el proceso a gran escala, por lo que valdría la pena hacer estudios a fondo en cuanto a estimación de costos vs. productividad.

### 5.3. Cinética de crecimiento para *Flavobacterium sp.* ATCC 21588

Para el estudio de la cinética de crecimiento se empleó el medio de cultivo con la siguiente composición: 0.05M de cinc, 10 g/l de dextrosa, 5 g/l de licor de remojo de maíz como fuente de nitrógeno orgánico, 5 g/l de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno inorgánico, 5 g/l de fosfato de potasio como fuente de fósforo, 1.5 g/l de sulfato de magnesio, 0.01 M de las fuentes de cobalto y de manganeso, así como 0.05 M de hierro.

Las fermentaciones para la determinación de la cinética de crecimiento se llevaron a cabo en un reactor mecánicamente agitado de 14 l, bajo condiciones descritas en la metodología (4.4) (Figura 5.3 y Figura 5.4).



**Figura 5.3.** Biorreactor de tanque agitado. **Figura 5.4** Cultivo sumergido de *Flavobacterium sp.* ATCC 21588.

Los datos generados de estas fermentaciones y a partir de los cuales se construyó la curva de crecimiento se muestran en el Cuadro 5.2. En ésta la concentración de zeaxantina, biomasa, glucosa, pH, nitrógeno residual y fosfatos se evaluaron cada 8 horas a partir de la hora cero en la cual inició la fermentación y hasta las 56 horas que marcan el término de la fermentación.

**Cuadro 5.2.** Datos para la construcción de curva de crecimiento para *Flavobacterium sp.* ATCC 21588, empleando el medio de cultivo sugerido por Morones *et al*, 2001.

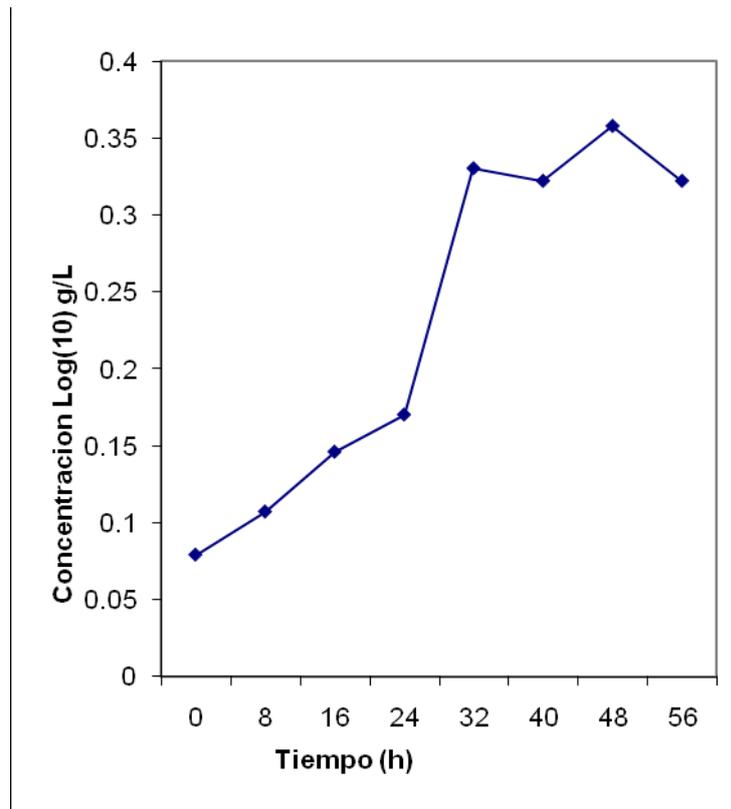
Tiempo (horas)	Glucosa (g/L)	Biomasa (g/L)	pH	Temp. °C	Nitrógeno (g/L)	Fosfatos (g/L)	Zeaxantina (ppm)
0	5.000	1.20	7.55	28.5	1.876	5.000	0.0
8	4.053	1.28	6.75	25.1	1.794	4.919	0.0
16	3.963	1.40	5.81	24.7	1.302	4.036	0.063
24	3.905	1.48	5.02	25.9	1.204	3.462	0.063
32	3.312	2.14	4.95	27.5	1.190	5.000	0.010
40	1.560	2.10	4.95	25.8	1.176	4.268	0.080
48	0.451	2.28	4.99	27.4	1.176	4.513	0.257
56	0.359	2.10	4.95	28.4	1.176	4.037	0.257

A continuación se explican individualmente cada uno de los parámetros medidos en la fermentación.

### 5.3.1. Patrón de crecimiento del microorganismo

Las figuras siguientes representan el crecimiento de *Flavobacterium sp.* ATCC 21588 en un sistema cerrado, puesto que no se añade medio nuevo al cultivo (cultivo por lotes).

En la evolución del peso seco en función del tiempo de fermentación (Figura 5.5) se observan las siguientes etapas: fase *lag*, con duración de aproximadamente 24 horas; la fase exponencial o *log*, que se presenta a partir de las 24 h o menos y hasta las 32 h y la fase estacionaria, a partir de las 32 h, extendiéndose por más de 24 h.



**Figura 5.5.** Crecimiento de *Flavobacterium sp* No. ATCC 21588 expresado en logaritmos, en cultivo en lote.

En ambas gráficas se presenta como patrón de crecimiento una “sigmoide”, esto sugiere que el crecimiento microbiano unicelular es autocatalítico, de modo que la velocidad de crecimiento es proporcional a la concentración de células ya presente. Durante el crecimiento exponencial, el número de células aumenta de la forma siguiente:

$$X_0 \longrightarrow 2X_0 \longrightarrow 4X_0 \longrightarrow 8X_0 \longrightarrow 16X_0 \longrightarrow nX_0$$

Donde X es el peso seco (g/l) y el intervalo es constante y se denomina tiempo de duplicación ( $t_d$ ). En consecuencia se tiene que, el aumento de duplicaciones,  $n$ , después del tiempo  $t$ , está dado por:

$$n = t/t_d \quad \text{---- (1)}$$

A la ecuación siguiente se le llama “ecuación de crecimiento”, donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento, definida como la rapidez de aumento de la

concentración celular por unidad de tiempo ( $h^{-1}$ ); esta ecuación se puede emplear para describir el crecimiento en cualquier etapa durante el ciclo de éste.

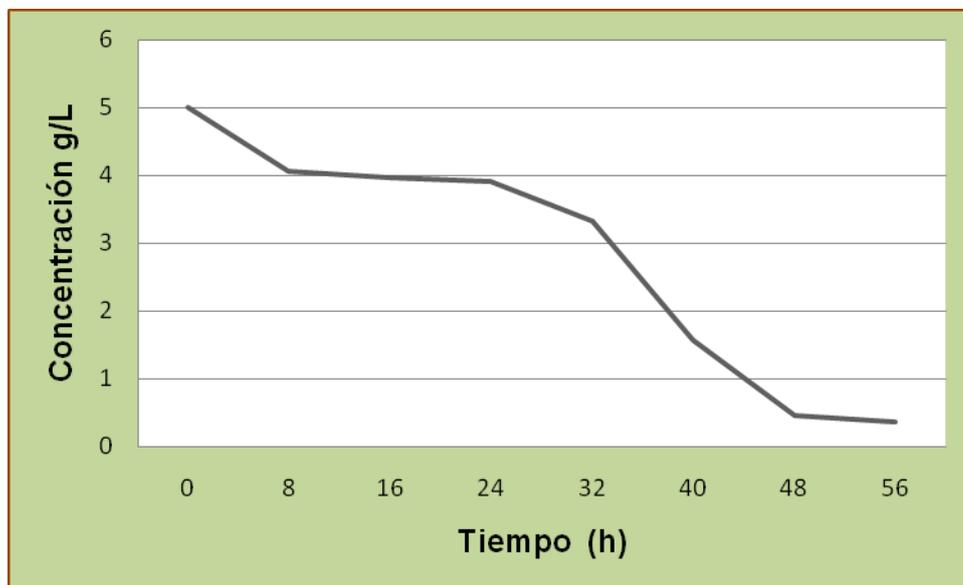
$$(1/X)*(dX/dt) = 0.693/t_d = \mu \quad \text{---- (2)}$$

El tiempo de duplicación por lo general es equivalente al tiempo medio de generación ( $t_{mg}$ ), es decir, el período promedio de un ciclo completo de división celular, aunque ocurren excepciones donde una fracción de la población de células no es viable.

Enseguida se presentan las gráficas que muestran el consumo de glucosa, el de nitrógeno, el de fosfatos y el comportamiento del pH durante la fermentación. Todos estos parámetros afectan directa y significativamente la rapidez de crecimiento del microorganismo y por consecuencia la producción del metabolito de interés.

### 5.3.2. Consumo de glucosa

El patrón de consumo de glucosa llevado a cabo por el microorganismo se presenta a continuación (Figura. 5.6).



**Figura 5.6.** Evolución de la concentración de glucosa durante la fermentación con *Flavobacterium sp.* ATCC 21588.

Se observa en la figura, un consumo lento pero constante de glucosa, hasta alrededor de las 30 h de iniciada la fermentación. Posteriormente, una vez que se inician las etapas estacionarias y de declinación, el microorganismo deja de consumirla, o lo hace mucho más lentamente; este comportamiento se observa algunas veces en bacterias marinas que al parecer presentan una cierta incapacidad para metabolizar carbohidratos, o los requieren sólo en bajas concentraciones, mientras que para la elaboración de sus productos emplean otro tipo de nutrientes.

Es importante destacar que la concentración del sustrato tiene un efecto importante sobre la rapidez de crecimiento. Monod descubrió que el ciclo de crecimiento procedía cuando se inoculaba medio nuevo con glucosa como única fuente de carbono y energía y con todos los otros nutrientes en exceso; y que  $\mu$  es constante durante la fase exponencial, luego tiende a cero en la fase de desaceleración, donde la concentración del sustrato se vuelve no saturante.

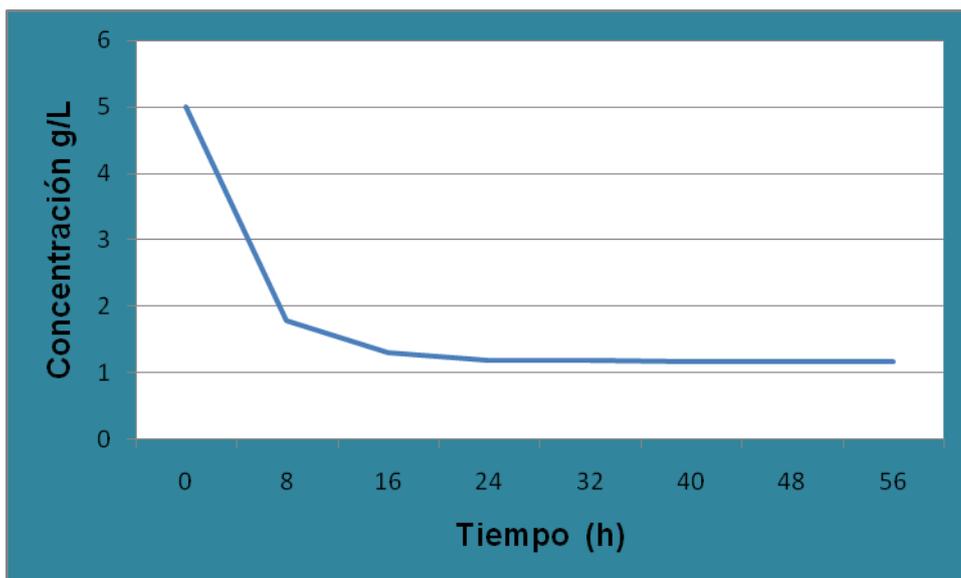
Para un cultivo en lotes, la relación entre la concentración del sustrato sobre la tasa específica de crecimiento está dada por una hipérbola, definida por la siguiente ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_m * (S / K_s + S) \quad \text{---- (3)}$$

donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento (1/h),  $S$  es la concentración de sustrato (g/L),  $\mu_m$  es la rapidez específica de crecimiento máxima y  $K_s$  es la constante de Monod (g/d), que representa la concentración del sustrato que produce la mitad de  $\mu_m$ . Durante la fase de crecimiento exponencial en el cultivo intermitente, la población crece a la máxima rapidez posible.

### 5.3.3. Consumo de nitrógeno

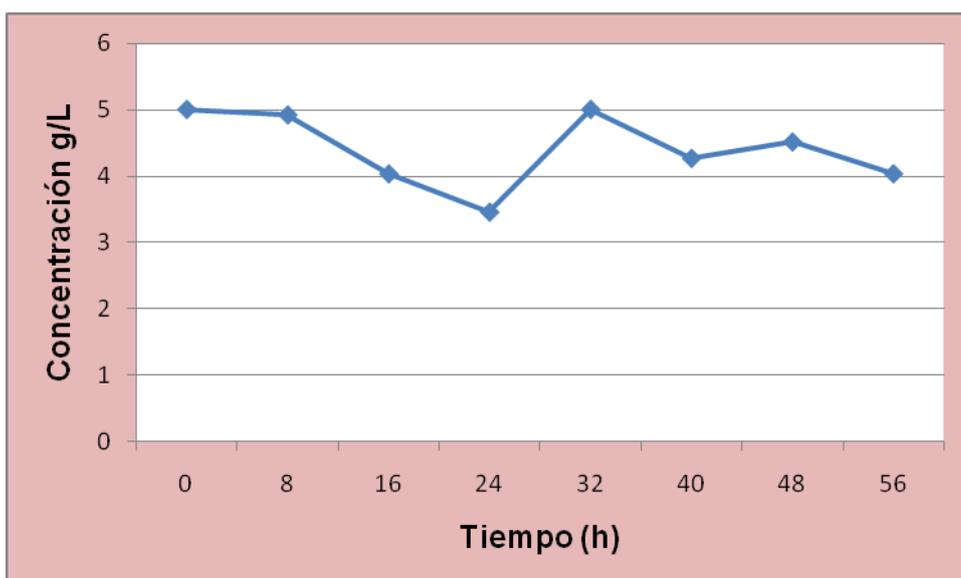
La gráfica de consumo de nitrógeno nos muestra que es un ingrediente importante para garantizar el crecimiento del microorganismo ya que prácticamente es consumido en un 80% de su concentración inicial (Figura 5.7).



**Figura 5.7.** Evolución de la concentración de nitrógeno durante la fermentación con *Flavobacterium sp.* ATCC 21588.

#### 5.3.4. Consumo de fosfato

El fosfato es necesario para que el microorganismo cubra sus requerimientos energéticos de ATP, por ello podemos observar en el comportamiento gráfico (Figura 5.8) que su demanda es importante a partir de las 16 h ya que es cuando la fase *lag* está en desarrollo y el microorganismo se encuentra próximo a su etapa de crecimiento logarítmico. Una vez que se satisface la necesidad de fosfato, el microorganismo deja de consumirlo y su concentración se mantiene constante después de las 40 h.



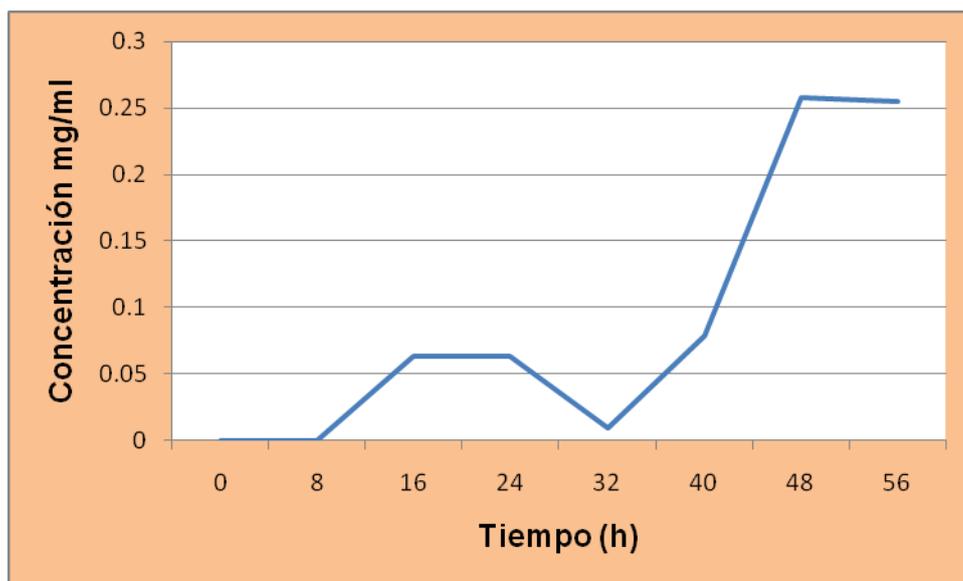
**Figura 5.8.** Evolución de la concentración de fosfatos durante la fermentación con *Flavobacterium sp.* ATCC 21588.

### 5.3.5. Patrón de formación de producto

La formación de producto está estrechamente relacionada con el consumo de nutrientes y asimismo, la formación del producto, podrá estar total o parcialmente relacionada con el crecimiento del microorganismo o incluso no estarlo. Es posible determinar esta relación haciendo balances del material para cada nutriente ayudados por la siguiente ecuación que muestra la relación entre la rapidez específica de consumo de sustrato,  $q_s$ , el crecimiento celular, el mantenimiento celular y la formación de producto:

$$-q_s = (-1/X) * (ds/dt) = \mu / Y_{x/s} - m - q_p / Y_{p/s} \quad \text{---- (4)}$$

El patrón de formación de zeaxantina por *Flavobacterium sp.* ATCC 21588, en medio con licor de remojo de maíz se muestra en la Figura 5.9.



**Figura 5.9.** Formación de zeaxantina con *Flavobacterium sp.* No. ATCC 21588 en función del tiempo de fermentación en un medio con licor de remojo de maíz.

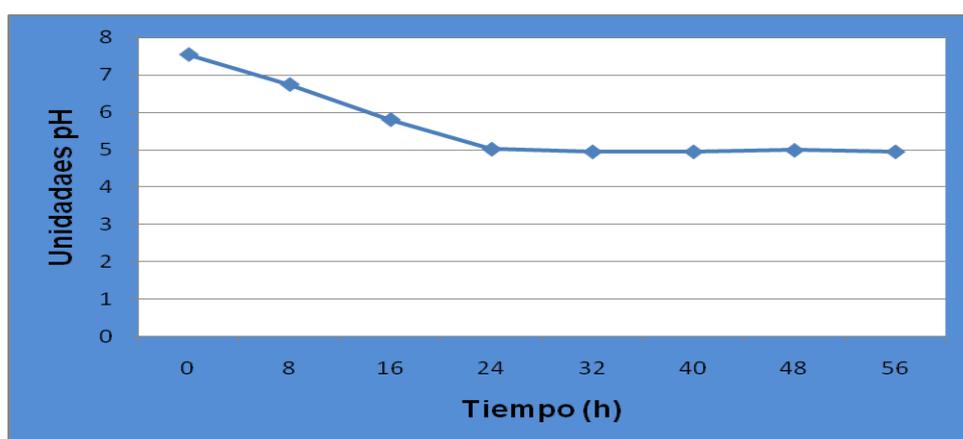
La producción del metabolito deseado (zeaxantina) se presenta a partir de las 8 h de la fermentación y decae abruptamente después de las 48 horas. Esto significa que, aparentemente, la síntesis de dicho metabolito está asociada al crecimiento (lo que podría resultar lógico por tratarse de una sustancia presente en la membrana celular), aunque sin ser esencial para el crecimiento; pudiendo estar ocurriendo dos cosas: que la rapidez de síntesis del producto esté relacionada directamente con la rapidez de crecimiento, o bien, que la zeaxantina se forme independientemente de la rapidez de crecimiento, ya que,

ocasionalmente, la síntesis de productos puede comenzar después de un período de crecimiento previo, debido a la acumulación de algunos metabolitos primarios y, subsecuentemente, relacionarse con el crecimiento.

En ocasiones ocurre que el medio de cultivo está diseñado de manera que el nutriente clave está presente pero en una forma que no puede ser asimilado rápidamente, por lo que, el crecimiento del microorganismo resulta en proporciones subóptimas desde el principio, con el resultado de que los metabolitos secundarios son producidos al mismo tiempo que la proliferación celular. Sin embargo, será necesario realizar estudios más profundos para determinar la relación existente entre la síntesis de zeaxantina y el crecimiento de *Flavobacterium sp.*

### 5.3.6. Evolución del pH durante la fermentación

La evolución del pH durante la fermentación con la cepa ATCC 21588 se presenta en la Figura 5.10. En ella se observa que comienza a ocurrir un cambio en el pH del medio a partir de las 8-16 horas, lo que indica que está llevándose a cabo una gran actividad metabólica y están agregándose al medio sustancias capaces de disminuir el pH inicial. Esto coincide con la etapa donde comienza la fase *log* del microorganismo. Una vez que la fermentación está llegando a su fin, y por lo tanto, el microorganismo llega a su etapa de declinación, el pH deja de disminuir, al cesar la actividad metabólica (Figura 5.12).



**Figura 5.10.** Evolución del pH durante el transcurso de la fermentación con *Flavobacterium sp.* ATCC 21588 en medio con licor de remojo de maíz.

La incorporación de productos ácidos en el medio ocurre con frecuencia cuando se emplean como fuente de nitrógeno sustancias como el hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), por ejemplo. El crecimiento da como resultado, el consumo de  $\text{NH}_3$  dejando un protón en el medio, el cual causa que el pH disminuya (Parra-Saldívar, 2000).

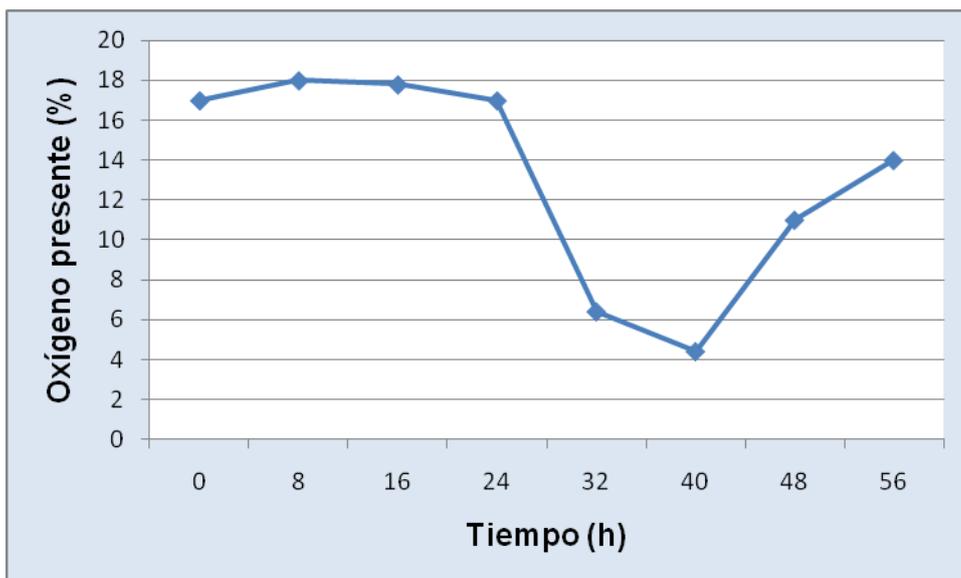
Los microorganismos tienden a crecer en un intervalo de pH limitado, y aún dentro de este intervalo, pueden llegar a cambiar su metabolismo como resultado de pequeñas modificaciones e incluso de 1 a 1.5 unidades de pH, lo que con frecuencia lleva a la disminución de la productividad u obtención de productos indeseables; la importancia del seguimiento de este parámetro, por lo tanto, radica, en que podrá ser controlado ventajosamente para “cuidar” la obtención del metabolito deseado.

### **5.3.7. Desaparición del oxígeno presente en el medio en función del tiempo de fermentación.**

La disponibilidad de oxígeno en el medio es de gran importancia para los microorganismos aerobios en el cultivo sumergido, por esto, el oxígeno debe ser aportado continuamente, ya que es muy poco soluble en una solución acuosa.

Por otro lado, la síntesis de nuevos productos requiere casi siempre del crecimiento de microorganismos en recipientes aireados con agitación, por lo que es conveniente conocer todo lo relacionado con la concentración, distribución, transferencia y aprovechamiento del oxígeno, para planear mejor el proceso y obtener mejores resultados. Normalmente, cuando se administra aire al medio de cultivo, se tiene en el medio una concentración aproximada de  $8.69 \times 10^{-3} \text{ Kg/m}^3$  de oxígeno.

La variación del oxígeno presentada en la fermentación con *Flavobacterium sp.* Se muestra en la Figura. 5.11.



**Figura 5.11.** Variación de la concentración de oxígeno presente en el medio durante la fermentación con *Flavobacterium sp.* No. ATCC 21588 (Morones *et al*, 2001).

En la Figura anterior se observa que la disminución del oxígeno en el medio es drástica a partir de las 24 h de fermentación, etapa en la cual, la población de células se duplica a una rapidez constante, lo que requiere de una gran cantidad de oxígeno. A partir de las 56 h, la concentración de oxígeno se mantiene constante. Aquí es importante recalcar que este oxígeno no solo se utilizará para el proceso normal de crecimiento y desarrollo de una bacteria aerobia, sino que como ya se había mencionado previamente, es importante en el proceso de síntesis de carotenoides.

## 5.4. Caracterización y cuantificación de zeaxantina

### 5.4.1. Extracción del estándar de maíz amarillo

Se logró la extracción del pigmento que da color al maíz amarillo (Figura 5.12), el extracto obtenido era de color amarillo intenso que teóricamente contiene en su mayoría al pigmento zeaxantina y pequeñas proporciones de luteína y cryptoxantina. La cuantificación de la zeaxantina se obtiene de las lecturas que se efectúan con la curva de calibración que se muestra en la Figura No. 5.19.



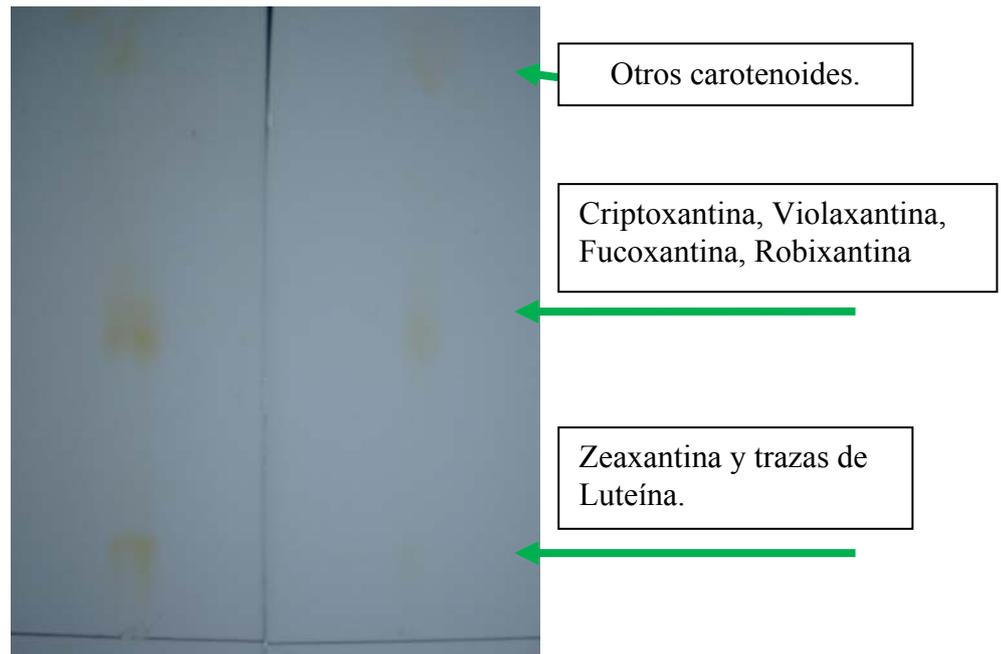
**Figura. 5.12.** Extracción del pigmento de maíz amarillo.

### 5.4.2. Purificación del estándar de maíz amarillo

#### a) Cromatografía en capa fina exploratoria

El mejor sistema de solventes resultó ser el de hexano: acetato de etilo en proporción 70:30, lográndose con éste una mejor definición en la separación de bandas.

Después de observar con lámpara UV, se apreciaron dos manchas oscuras, de las cuales, la primera en eluir era muy pequeña con respecto a la segunda. El valor del  $R_f$  de la zeaxantina fue de 0.15 y el de la criptoxantina es de 0.475 (Figura 5.13).

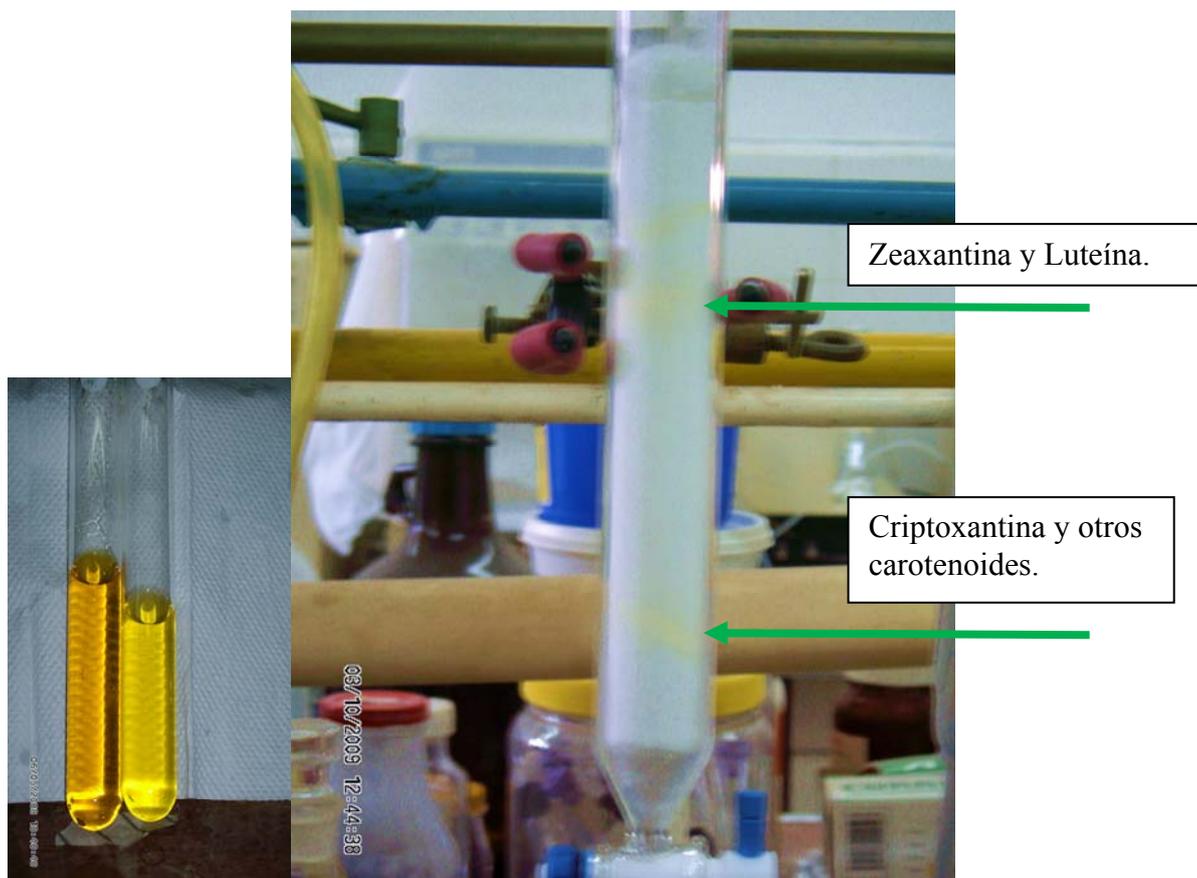


**Figura. 5.13.** Cromatografía en capa fina de extracto de maíz saponificado (Morones *et al.*, 2001).

#### **b) Cromatografía en columna**

Utilizando los datos que aportó la cromatografía exploratoria, se procedió a la purificación del estándar de maíz amarillo, por lo que el sistema de solventes con el que se trabajó, estaba compuesto también por hexano: acetato de etilo (70:30).

De la misma forma como ocurrió en la CCF exploratoria, se recolectaron dos fracciones, de las cuales, la que eluyó en primer lugar fue muy pequeña en volumen, con respecto a la que eluyó en segundo lugar. Sin embargo, ambas fracciones eluían con muy poca distancia de por medio, por lo que fue complicado la separación eficiente de las fracciones (Figura 5.14)

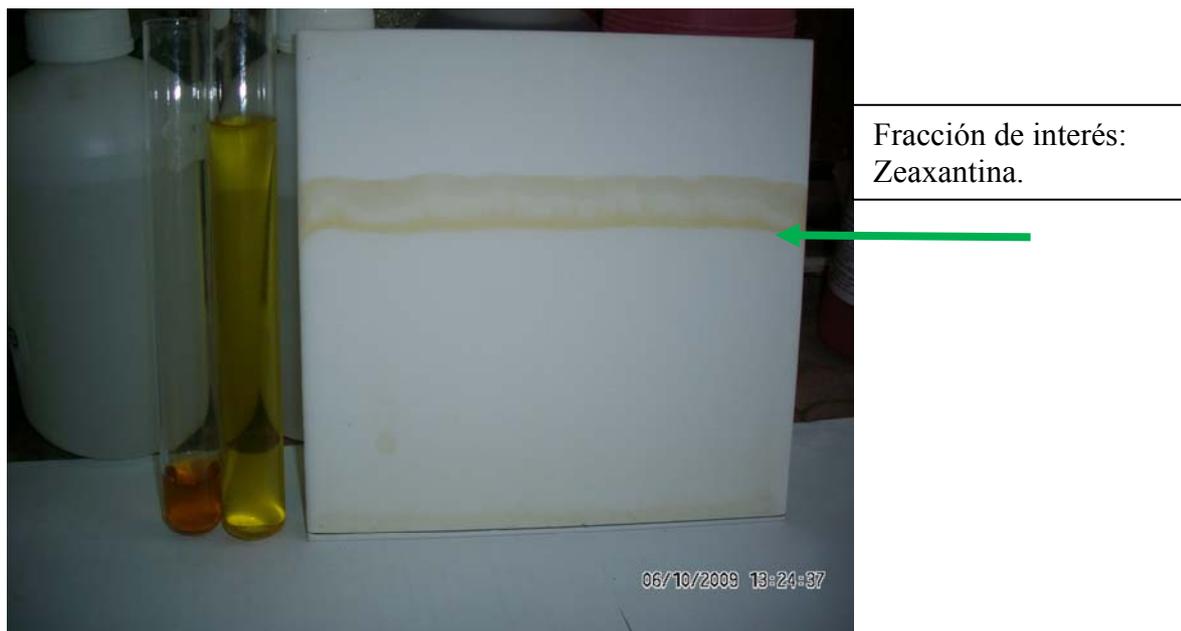


**Figura 5.14.** Purificación de estándar de maíz amarillo.

### c) Cromatografía ascendente en capa fina preparativa

Al llevarse a cabo la CCF preparativa, se obtuvieron nuevamente dos bandas, aunque ahora, la banda más pequeña resultaba casi insignificante (Figura 5.15). La fracción de interés (la más abundante), se recuperó mediante raspado de la zona en la que se encontraba, resuspendiendo luego el pigmento en acetona.

Enseguida se filtró cuidadosamente, y protegiendo de la luz el filtrado, para eliminar la sílica gel presente y nuevamente se le sometió a destilación con vacío. De esta forma, el estándar de maíz amarillo se obtuvo finalmente puro y enseguida se le sometió a un análisis infrarrojo para saber más acerca de su identidad (Figura 5.16)



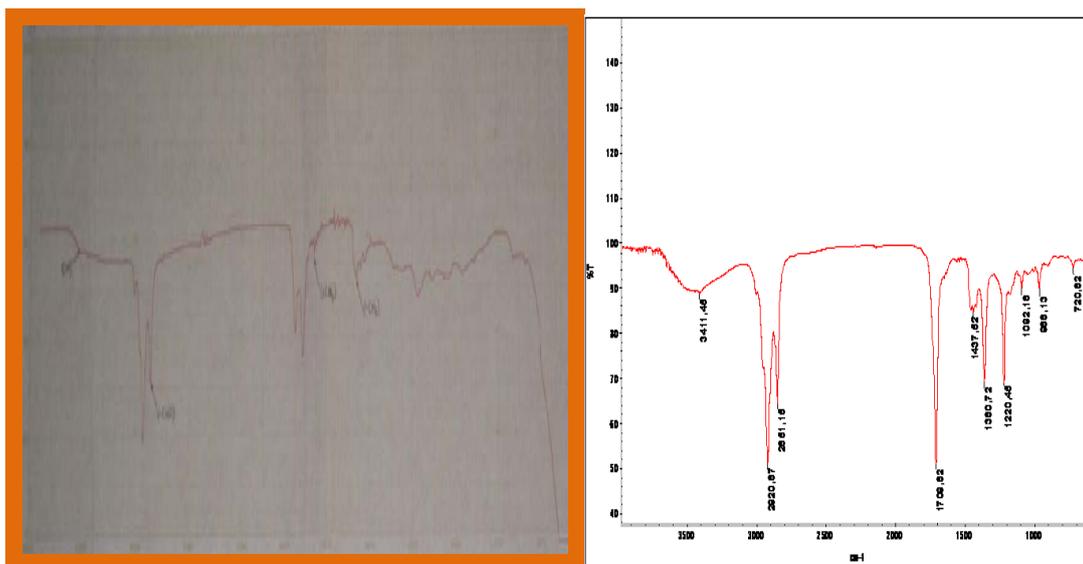
**Figura 5.15.** Cromatografía ascendente en capa fina, para purificación del estándar de maíz amarillo.

**5.4.3. Extracción del pigmento de las fermentaciones con *flavobacterium sp.***

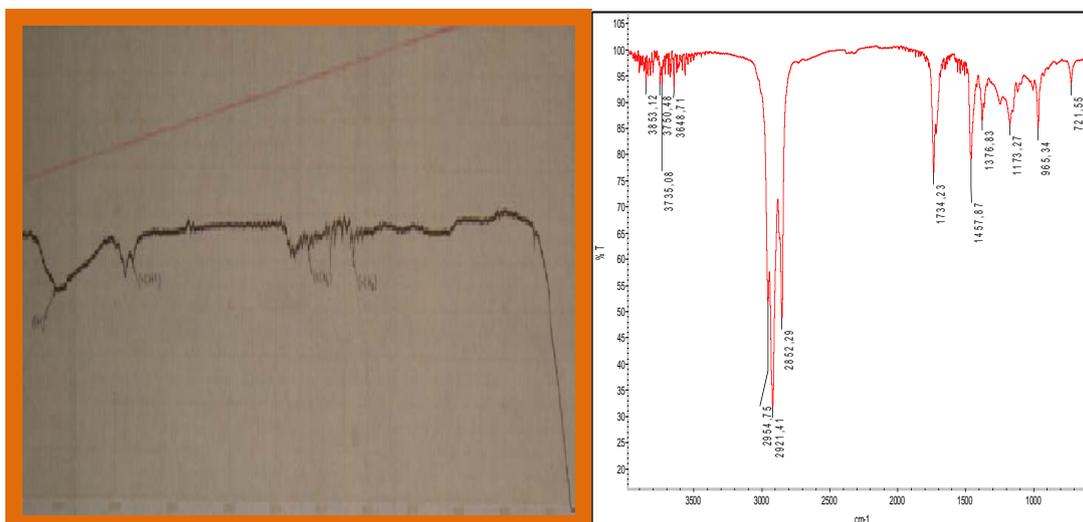
Se obtuvo un extracto de color amarillo, el cual presentó mayor o menor intensidad en color dependiendo del tratamiento resultante de la fermentación y del cual se hizo la extracción. Una vez llevado a sequedad en el rota vapor, se le practicó un barrido en el espectrofotómetro por toda la región UV-VIS, para localizar su longitud de onda máxima de absorción y así lograr su plena identificación.

**5.4.4. Análisis infrarrojo del estándar de maíz amarillo.**

La Figura 5.16 que se muestra a continuación representa el análisis infrarrojo practicado al estándar de maíz amarillo.



a).



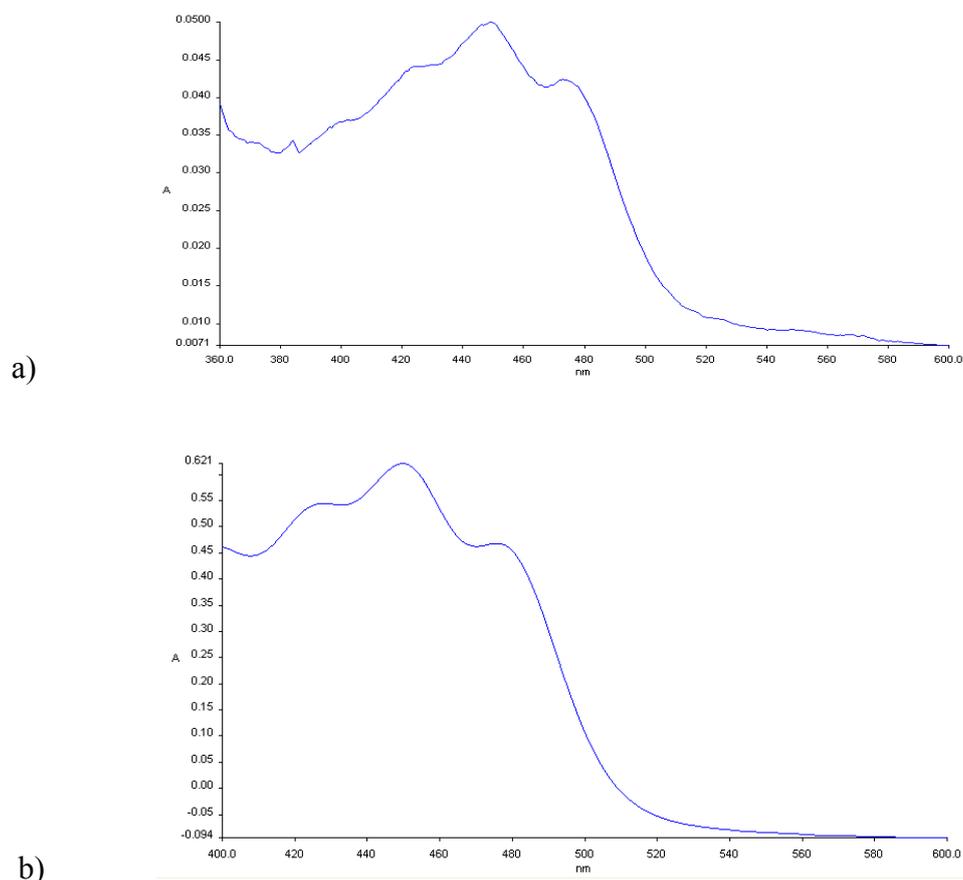
b).

**Figura 5.16.** a) y b) Espectros de infrarrojo de extracto de maíz amarillo saponificado y del extracto de fermentación de *Flavobacterium sp.*

El espectro de infrarrojo muestra el pico correspondiente a grupos OH, presente en el anillo de la molécula de zeaxantina (aproximadamente a los 3600 – 3500 nm) de igual forma, se aprecia el pico correspondiente a los grupos –CH= (por los 3000 nm), así como de grupos metilo CH<sub>3</sub>, alrededor de los 1450 nm, etc., lo cual es evidencia de que existe similitud en la molécula del estándar con la del pigmento obtenido de *Flavobacterium sp.*

#### 5.4.5. Determinación de la longitud de onda máxima de absorción del estándar de maíz amarillo

La Figura 5.17 b) muestra el barrido por la región UV-VIS para el estándar de maíz amarillo.



**Figura 5.17.** a) Espectro UV-VIS de referencia y b) Espectro UV-VIS de extracto de maíz amarillo saponificado.

En la Figura 5.17 a) y b), existe similitud con el espectro de zeaxantina en cuanto a longitud de onda máxima de absorción (448 nm), pues al parecer ambas presentan el mismo cromóforo, confirmándose el hecho de que son sustancias con identidad muy parecida.

#### 5.4.6. Determinación de la concentración de zeaxantina por espectrofotometría uv-vis

La longitud de onda máxima de absorción, tanto para el estándar de zeaxantina como para el pigmento obtenido de las fermentaciones fue de 448 nm, por lo tanto, para la determinación de la curva de calibración, se determinó la absorbancia de una serie de estándares a esta longitud de onda y con ésta, se correlacionaron las concentraciones del pigmento obtenido en cada fermentación.

**Cuadro 5.3.** Datos experimentales para la obtención de la curva de calibración de zeaxantina, usando como estándar un extracto saponificado de maíz amarillo.

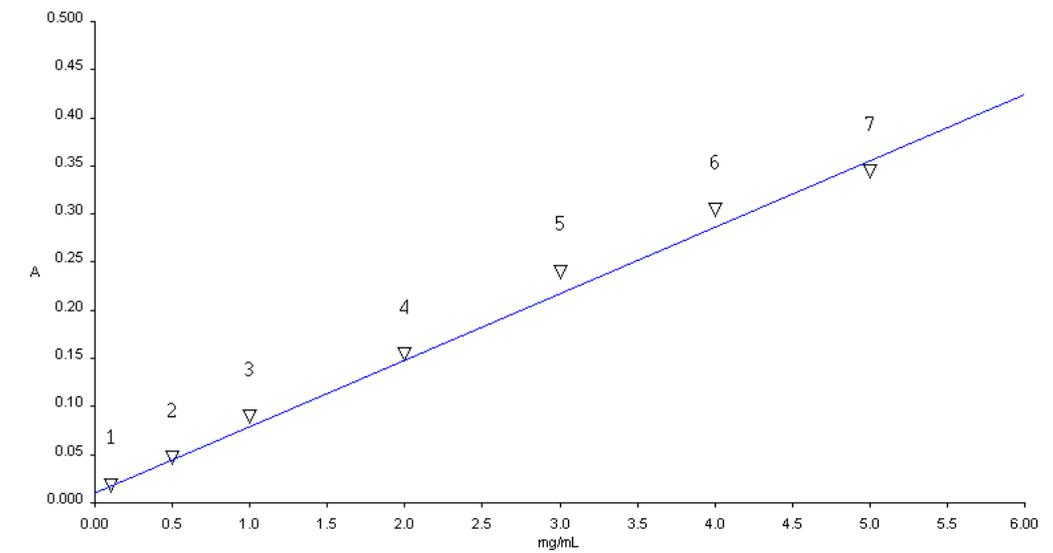
Longitud de onda	Muestra	Concentración (mg/ml)	Absorbancia
448	1	0.100	0.011
448	2	0.500	0.040
448	3	1.000	0.082
448	4	2.000	0.147
448	5	3.000	0.233
448	6	4.000	0.297
448	7	5.000	0.338

Ecuación de la recta:  $y = 1.014 e^{-02} + 6.903 e^{-02} (x)$ .

Error residual: 0.012.

Coefficiente de correlación: 0.996.

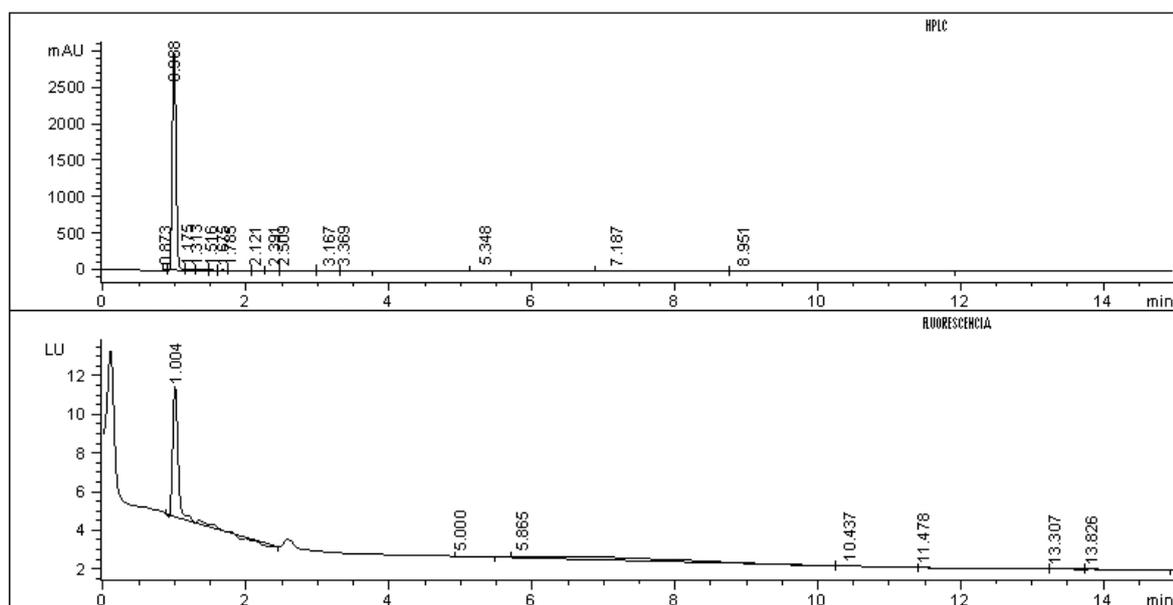
Con los datos del Cuadro 5.3 se construyó la curva de calibración para la cuantificación de la zeaxantina obtenida en las fermentaciones (Figura. 5.18).



**Figura 5.18.** Curva de calibración para cuantificación de zeaxantina determinada a 448 nm usando acetona como blanco.

#### 5.4.7. Determinación de la concentración de zeaxantina por hplc y fluorescencia.

Los resultados del análisis del extracto saponificado y purificado por cromatografía en columna del maíz amarillo, por medio de la técnica de cromatografía de líquidos de alta presión se muestran en la Figura 5.19.



**Figura 5.19.** Concentración de zexantina por HPLC por la técnica de Absorbancia y Fluorescencia.

**Cuadro 5.4.** a) y b) Reporte de resultados de lectura por HPLC

Cresta No.	Tiempo de retención (Minutos)	Base (Minutos)	Área (mAU*s)	Altura (mAU)	Área (Porcentaje)
1	0.873	0.036	2.190	1.057	0.019
2	0.988	0.059	1.121*e4	3018.456	96.059
3	1.175	0.096	112.481	16.784	0.964
4	1.313	0.119	82.350	9.292	0.071
5	1.516	0.075	23.854	4.420	0.020
6	1.675	0.081	27.127	4.904	0.232
7	1.785	0.141	23.392	2.336	0.200
8	2.121	0.079	3.912	7.051*e-1	0.033
9	2.391	0.112	2.293	2.982*e-1	0.020
10	2.505	0.000	4.207*e-1	3.252*e-1	3.506*e-3
11	3.167	0.130	15.271	1.757	0.135
12	3.369	0.067	3.844	8.809*e-1	0.029
13	5.848	0.161	51.547	5.803	0.445
14	7.187	0.532	66.232	1.617	0.568
15	8.951	0.000	44.718	6.313*e-1	0.304
Totales			1.197*34	3068.452	

a) Sistema de detección arreglo de diodos.

Cresta No.	Tiempo de retención (Minutos)	Base (Minutos)	Área (mAU*s)	Altura (mAU)	Área (Porcentaje)
1	1.004	0.087	35.151	6.701	60.570
2	5.000	0.623	8.432*e-1	1.625*e-1	1.453
3	5.865	3.218	20.978	7.669*e-2	36.147
4	10.437	0.203	7.458*e-1	6.085*e-2	1.286
5	11.478	0.102	6.097*e-2	8.319*e-3	0.105
6	13.307	0.128	7.491*e-2	7.870*e-3	9.129
7	13.826	0.394	1.811*e-1	6.958*e-3	0.312
Totales			58.034	6.882	

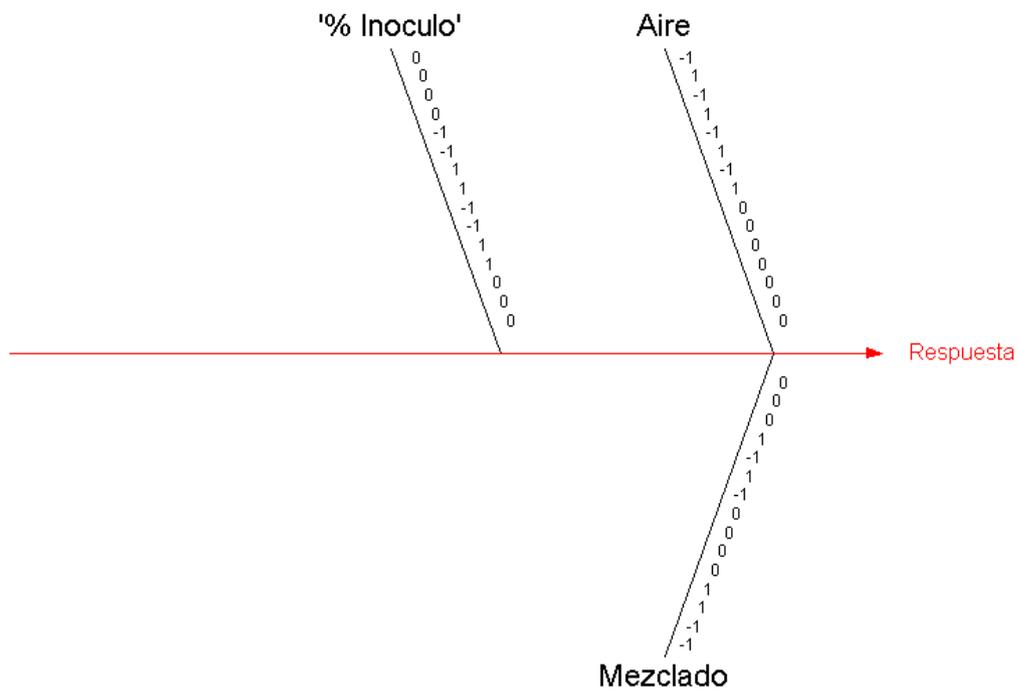
b) Sistema de detección de Fluorescencia.

Del Cuadro 5.4 a) y b) se desprende que en la muestra se encuentran una concentración de zeaxantina de alrededor del 96.0585% y su tiempo de retención es de 0.988 minutos y 3000 mAU en la técnica de absorbancia. Con respecto a la técnica de Fluorescencia se tiene un valor de 11 LU y un tiempo de retención de 1.004 minutos, con un porcentaje de zeaxantina del 60.5693%. Ambas gráficas muestran la presencia de otros carotenoides a diferentes longitudes de absorbancia y de fluorescencia así como tiempo de retención (Figura 5.19).

## 5.5. Análisis estadístico

### 5.5.1. Análisis de varianza del modelo experimental

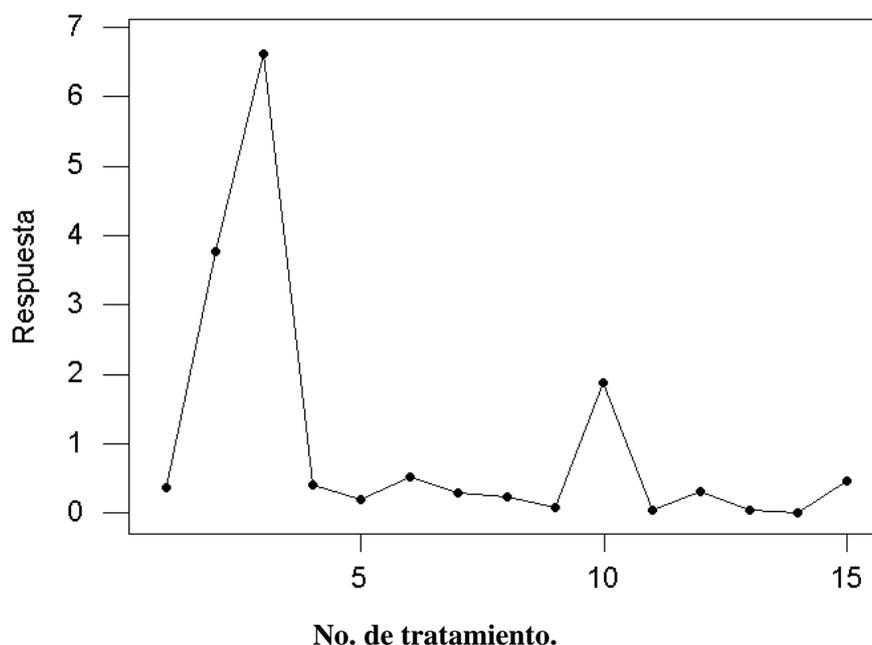
Los resultados de la producción de zeaxantina durante las fermentaciones realizadas de acuerdo a la combinación de los niveles en los tratamientos propuestos en el modelo central compuesto de Box-Beknhen (Figura 5.20), que se analizaron con el paquete estadístico JMP 5.0.1, se muestran en el Cuadro 5.5 y en forma gráfica en la Figura 5.21.



**Figura 5.20.** Diagrama causa efecto del diseño experimental de Box-Beknhen

**Cuadro 5.5.** Resultados de producción de zeaxantina utilizando el diseño central compuesto Box-Beknhen (Castaño y Domínguez, 2003).

<b>No. de tratamiento</b>	<b>X1 Aireación (vvm)</b>	<b>X2 Mezclado (ppm)</b>	<b>X3 Inóculo (%)</b>	<b>Respuesta Zeaxantina (mg/ml)</b>
1	-1	-1	0	0.375
2	-1	+1	0	6.617
3	+1	-1	0	3.703
4	+1	+1	0	0.410
5	0	-1	-1	0.079
6	0	-1	+1	0.051
7	0	+1	-1	1.874
8	0	+1	+1	0.316
9	-1	0	-1	0.191
10	+1	0	-1	0.524
11	-1	0	+1	0.294
12	+1	0	+1	0.239
13	0	0	0	0.043
14	0	0	0	0.017
15	0	0	0	0.471



**Figura 5.21.** Gráfica de la respuesta en cada uno de los tratamientos en serie de tiempo.

Los tratamientos que presentaron los niveles más elevados de producción de zeaxantina como respuesta fueron el 2 y 3, con 6.617 y 3.703 mg/ml respectivamente, seguido por el tratamiento No. 7 con un nivel de producción de 1.874 mg/ml. Las condiciones de operación para dichos tratamientos son los siguientes:

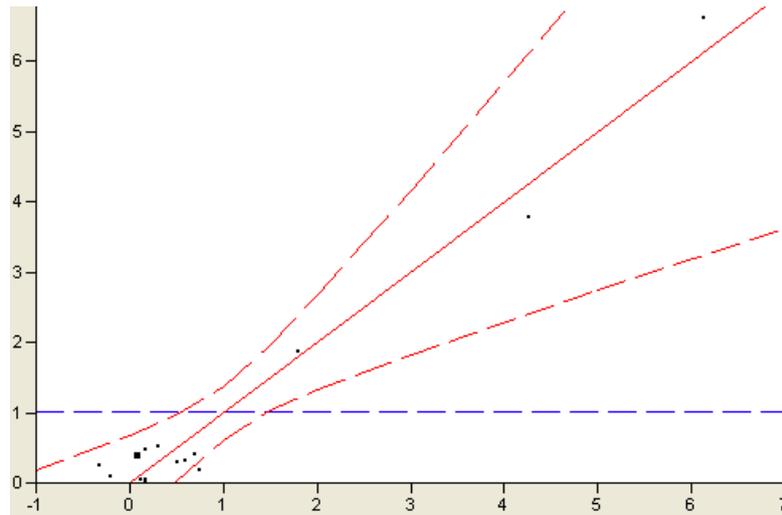
Tratamiento No. 2: Aireación (-1), 0.6 vvm; Mezclado (+1), 400 rpm; % de inóculo (0), 7.5 %.

Tratamiento No. 3: Aireación (+1), 0.9 vvm; Mezclado (-1), 200 rpm; % de inóculo (0), 7.5 %.

Tratamiento No. 7: Aireación (0), 0.75 vvm; Mezclado (+1), 400 rpm; % de inóculo (-1), 5.0 %.

De lo anterior podemos precisar que es en los niveles bajo y alto de aireación, niveles alto y bajo de mezclado y nivel medio del factor % de inóculo microbiano.

La respuesta promedio de producción de zeaxantina de acuerdo con los resultados en el análisis de ajuste del modelo al experimento, es de 1.018 mg/ml (Figura 5.22).



**Figura 5.22.** Respuesta promedio de Zeaxantina de acuerdo al Modelo experimental de Box-Beknhen, con intervalos de confianza de 95%.

**Cuadro 5.6.** Análisis del ajuste del modelo experimental.

Raíz cuadrada.	0.965
Raíz cuadrada ajustada.	0.901
Raíz cuadrada media del error.	0.575
Respuesta media.	1.018
Número de observaciones.	15

Con respecto al ajuste del modelo experimental, se tiene que el diseño de Box-Beknhen explica el 99.72% de la varianza en los resultados. Cuadro 5.6 y Cuadro 5.7.

**Cuadro 5.7.** Análisis de la falta de ajuste del modelo experimental.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F
Falta de ajuste	3	1.525	0.508	7.808
Error puro	2	0.130	0.065	Prob > F : 0.116
Error total	5	1.655		Raíz cuadrada Máxima : 0.997

**Cuadro 5.8.** Análisis de varianza.

<b>Fuente</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>F</b>
Modelo	9	45.406	5.045	15.245
Error	5	1.655	0.330	
Total	14	47.061		

En el Cuadro 5.8 se observa que debido a que F calculada es mayor a  $F_{\infty}$ , al menos uno de los factores, su interacción o sus cuadrados, tienen efecto sobre la respuesta.

A continuación se presenta en el Cuadro 5.9 el análisis de la importancia de los efectos de cada uno de los factores y los coeficientes estimados de la ecuación cuadrática del modelo experimental.

**Cuadro 5.9.** Valores de los efectos de los factores experimentales.

<b>Fuente</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Prob &gt; F</b>
<b>X<sub>1</sub></b>	1	0.802	2.425	0.180
<b>X<sub>2</sub></b>	1	3.053	9.223	0.029
X <sub>3</sub>	1	0.391	1.183	0.326
<b>X<sub>1</sub>* X<sub>2</sub></b>	1	23.049	69.647	0.001
X <sub>1</sub> * X <sub>3</sub>	1	0.038	0.114	0.750
X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub>	1	0.585	1.768	0.241
<b>X<sub>1</sub>* X<sub>1</sub></b>	1	5.091	15.382	0.011
<b>X<sub>2</sub>* X<sub>2</sub></b>	1	7.678	23.202	0.005
<b>X<sub>3</sub>* X<sub>3</sub></b>	1	3.986	12.045	0.018

Podemos observar que los factores más importantes son X<sub>1</sub> (Aireación) y X<sub>2</sub> (Mezclado), la interacción entre dichos factores X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> así como los cuadrados de cada uno de los factores X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> (% de inóculo).

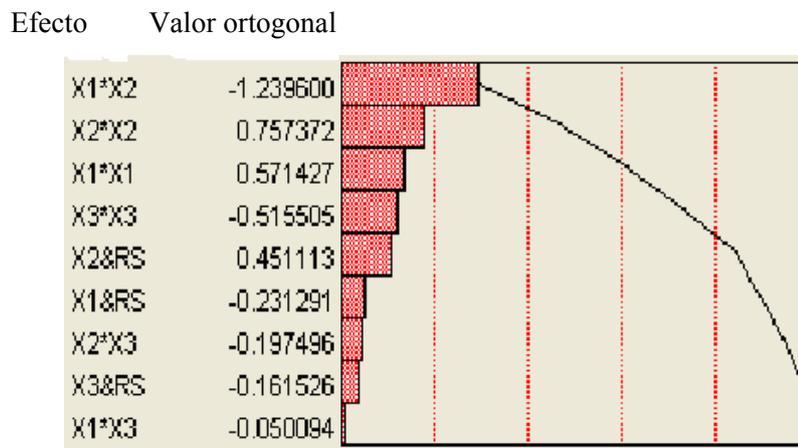
Lo anterior se confirma con la gráfica de los coeficientes estimados que a continuación se muestra (Figura 5.23):

Efecto	Coefficiente	Error Std.	Valor "t"	Prob> t
Intercept	0.1769	0.332135	0.53	0.6171
X1&RS	-0.316709	0.20339	-1.56	0.1802
X2&RS	0.6177125	0.20339	3.04	0.0288
X3&RS	-0.221179	0.20339	-1.09	0.3265
X1*X2	-2.400475	0.287637	-8.35	0.0004
X1*X3	-0.097007	0.287637	-0.34	0.7496
X2*X3	-0.38245	0.287637	-1.33	0.2411
X1*X1	1.1741913	0.299382	3.92	0.0112
X2*X2	1.4420838	0.299382	4.82	0.0048
X3*X3	-1.039034	0.299382	-3.47	0.0178

\*Intercept es el intercepto.

**Figura 5.23.** Coeficientes estimados del modelo.

El orden de importancia de cada uno de los factores, sus interacciones y sus efectos cuadráticos se determina con una gráfica de Pareto que a continuación se muestra (Figura 5.24):



**Figura 5.24.** Gráfica de Pareto de los efectos principales.

**Cuadro 5.10.** Coeficientes estimados de la ecuación cuadrática del modelo experimental.

<b>Fuente</b>	<b>Valor Estimado</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor de “t”</b>	<b>Prob &gt;  t </b>
Intercepto	0.177	0.332	0.53	0.617
<b>X<sub>1</sub></b>	-0.317	0.203	-1.56	0.180
<b>X<sub>2</sub></b>	0.618	0.203	3.04	0.029
X <sub>3</sub>	-0.222	0.203	-1.09	0.326
<b>X<sub>1</sub>* X<sub>2</sub></b>	-2.400	0.288	-0.35	0.001
X <sub>1</sub> * X <sub>3</sub>	-0.097	0.288	-0.34	0.750
X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub>	-0.283	0.288	-1.33	0.241
<b>X<sub>1</sub>* X<sub>1</sub></b>	1.174	0.299	3.92	0.011
<b>X<sub>2</sub>* X<sub>2</sub></b>	1.442	0.299	4.82	0.005
<b>X<sub>3</sub>* X<sub>3</sub></b>	-1.039	0.299	-3.47	0.018

La ecuación óptima del modelo experimental para la producción de zeaxantina es el que se muestra en el Cuadro 5.10 y se expresa de la manera siguiente:

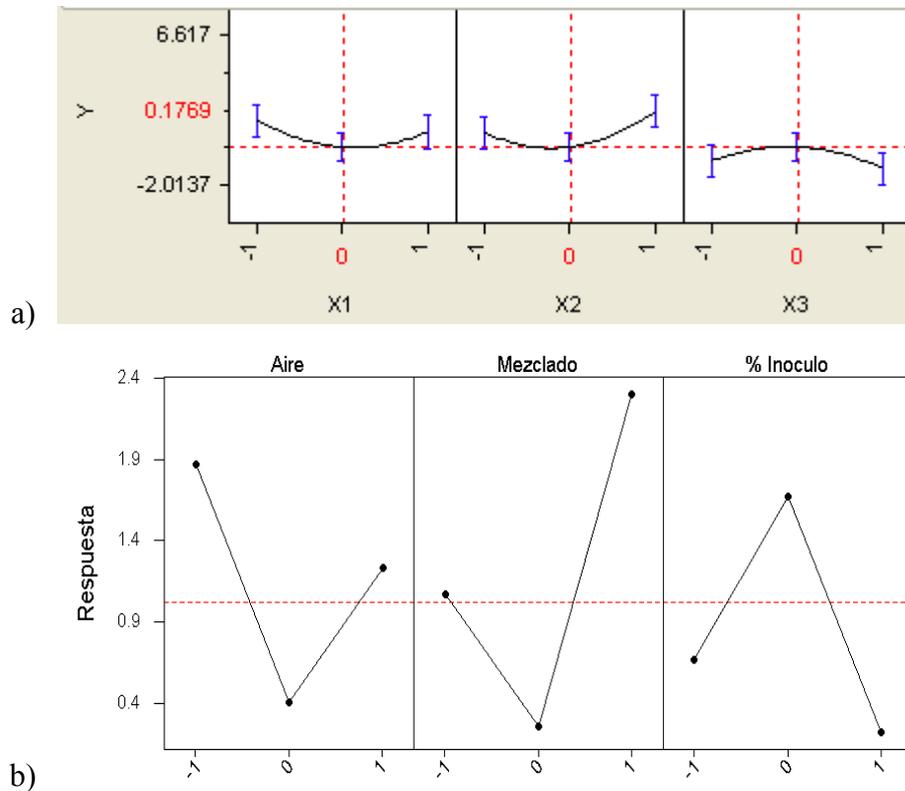
$$Z = 0.177 - 0.317 X_1 + 0.618X_2 - 0.222 X_3 - 2.400 X_1 * X_2 - 0.097 X_1 * X_3 - 0.283 X_2 * X_3 + 1.174 X_1^2 + 1.442 X_2^2 - 1.039 X_3^2$$

Los valores críticos para cada uno de los factores que optimizan la respuesta de zeaxantina, de acuerdo al modelo experimental son los siguientes:

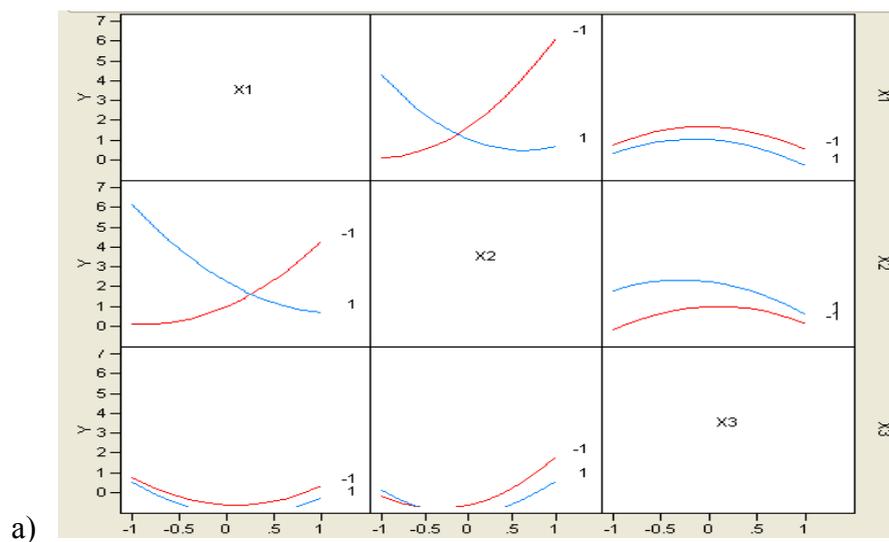
$$X_1 = -0.520; X_2 = -0.643; X_3 = +0.036$$

El valor solución es de **56.865** ppm y la forma de la gráfica de respuesta es de silla (Figuras. 5.28, 5.30 y 5.32). Para un mejor análisis del comportamiento de las variables, las Figuras 5.29, 5.31 y 5.33 presentan las superficies de respuesta en una vista desfasada en 90°.

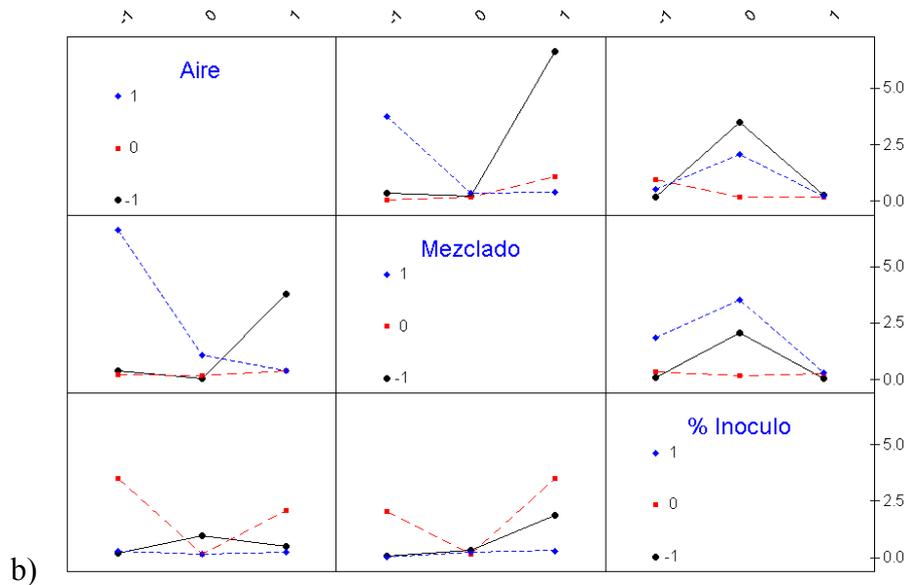
A continuación se muestran en las figuras 5.25, 5.26 y 5.27 el perfil predictivo, las interacciones de los factores y los valores de respuesta en una gráfica de cubo.



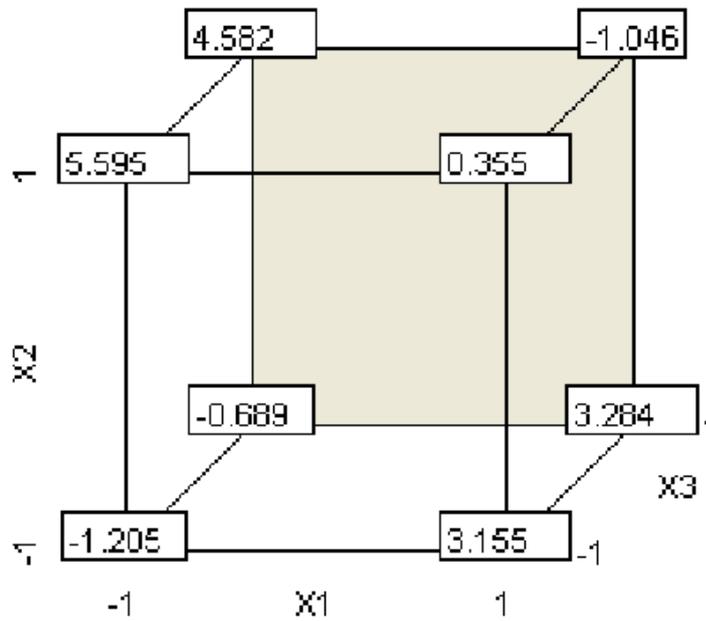
**Figura 5.25.** a) y b) Perfil predictivo de los factores en sus tres niveles.



a)



**Figura 5.26.** a) y b) Efectos de interacción entre los factores en sus tres niveles.

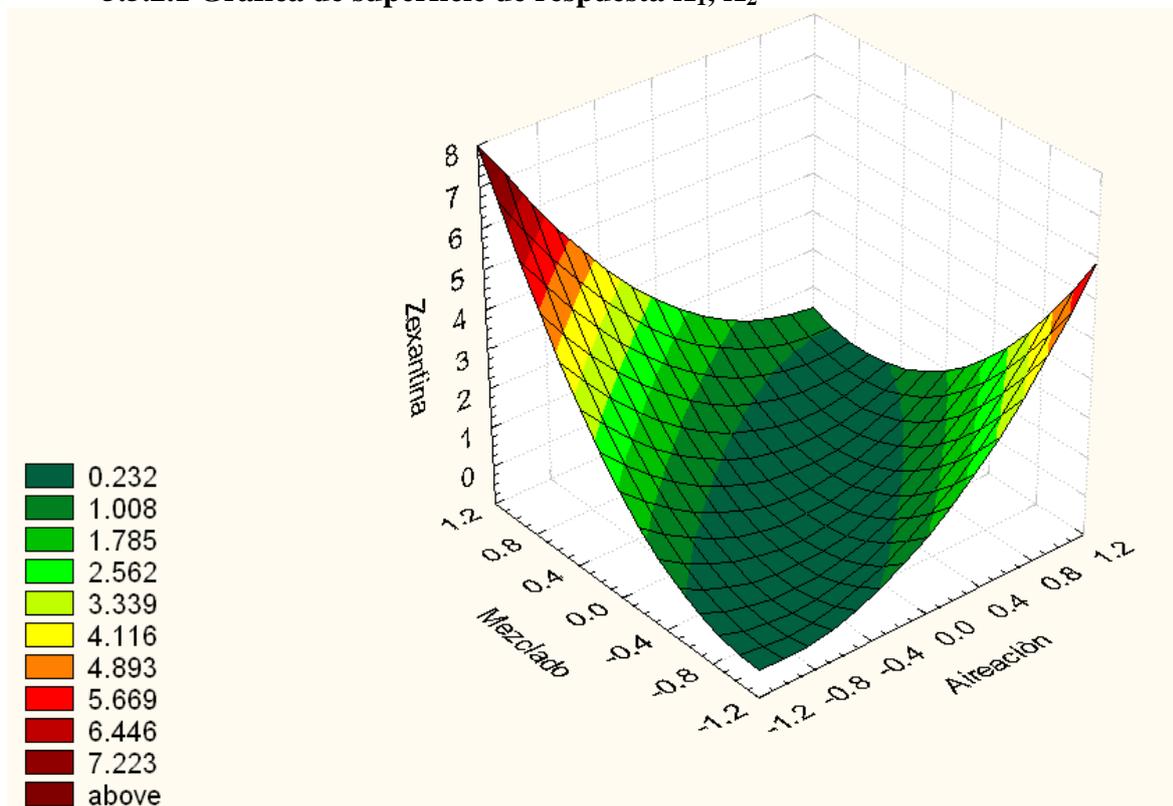


**Figura 5.27.** Gráfica de cubo con los valores de la respuesta en los puntos de intersección.

Del análisis de las anteriores gráficas podemos confirmar que la interacción de mayor importancia es de  $X_1$  con  $X_2$  en sus niveles -1 y +1 respectivamente.

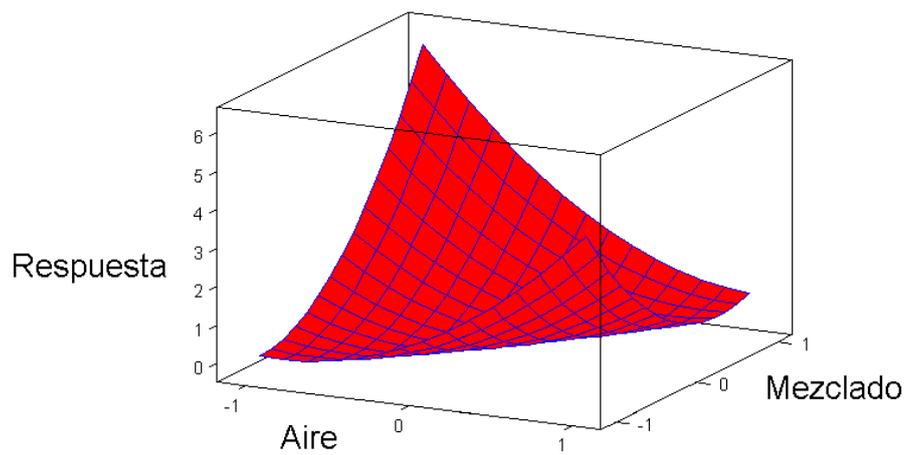
## 5.5.2. Gráficas de superficie de respuesta

### 5.5.2.1 Gráfica de superficie de respuesta $X_1, X_2$



**Figura 5.28.** Gráfica de Superficie de respuesta de los factores  $X_1$  y  $X_2$  (Statistics, 2009).

Los dos factores que resultaron ser más influyentes en el proceso son: aireación y mezclado, por lo que la relación existente entre la producción de zeaxantina y estas variables se presenta en la Figura 5.28, con un nivel de significancia de 95%. Se observan diferentes áreas de operabilidad de esos dos factores para los cuales, los valores de respuesta son positivos hasta 7.223 mg/ml de zeaxantina.



\*Respuesta es la concentración de zeaxantina en mg/ml.

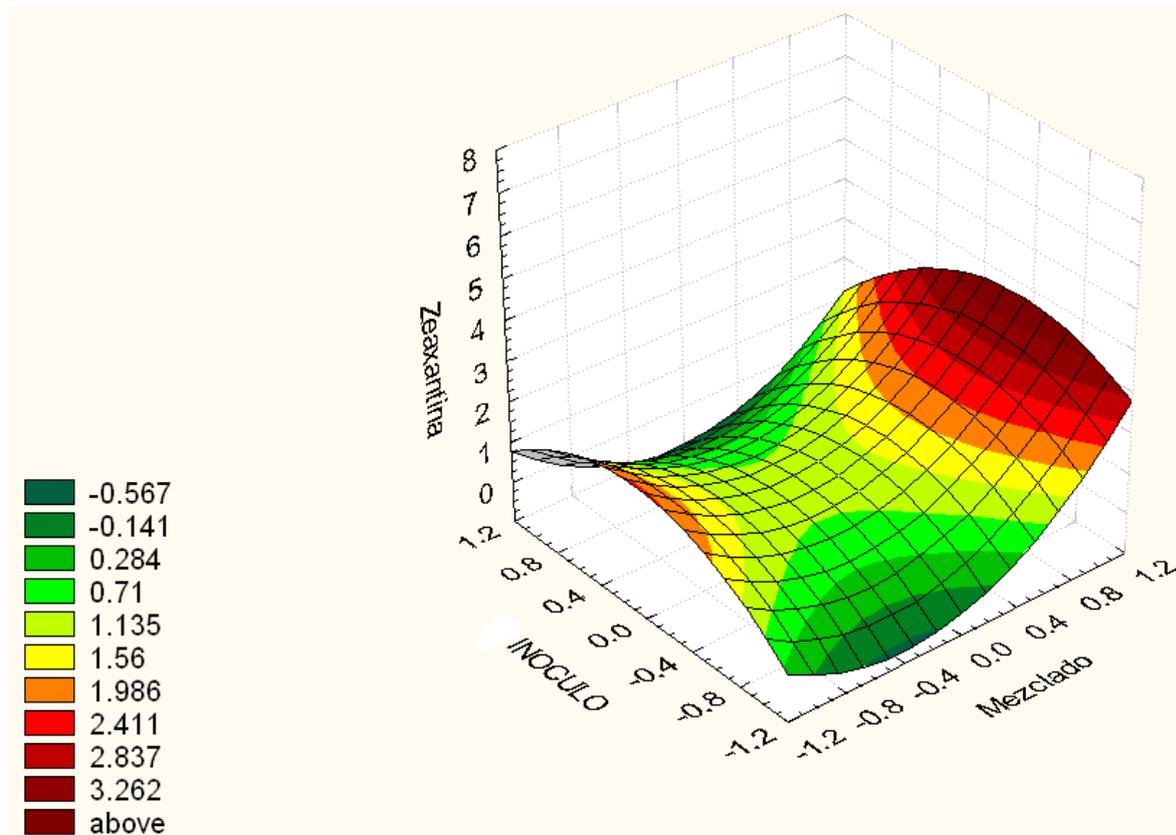
**Figura 5.29.** Gráfica de Superficie de respuesta de los factores  $X_1$  y  $X_2$  (Minitab, 2009).

El modelo que se aplica al comportamiento de estas variables es:

$$Z = -0.462 - 0.317X_1 + 0.618X_2 - 2.400X_1X_2 + 1.254X_1^2 + 1.522X_2^2$$

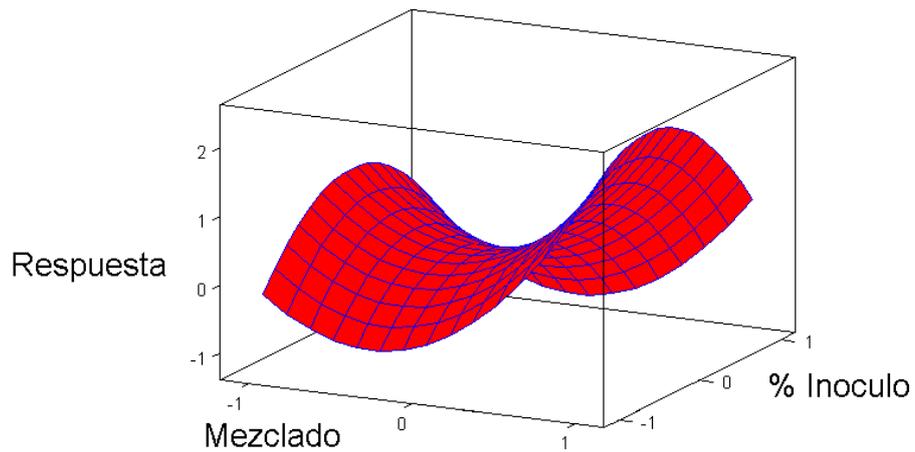
Donde  $Z$  = concentración de zeaxantina,  $X_1$  = nivel de aireación,  $X_2$  = nivel de mezclado.

### 5.5.2.2 Gráfica de superficie de respuesta $X_2$ , $X_3$ .



**Figura 5.30.** Gráfica de Superficie de respuesta de los factores  $X_2$  y  $X_3$  (Statistics, 2009)

En este caso se presenta la relación entre los factores de mezclado y % de inóculo y la producción de zeaxantina con un nivel de significancia de 95%. Se observan diferentes áreas de operabilidad de esos dos factores para los cuales, los valores de respuesta van desde valores negativos (respuesta nula) hasta los que son positivos, alcanzando una concentración de 3.262 mg/ml de zeaxantina.



\*Respuesta es la concentración de zeaxantina en mg/ml.

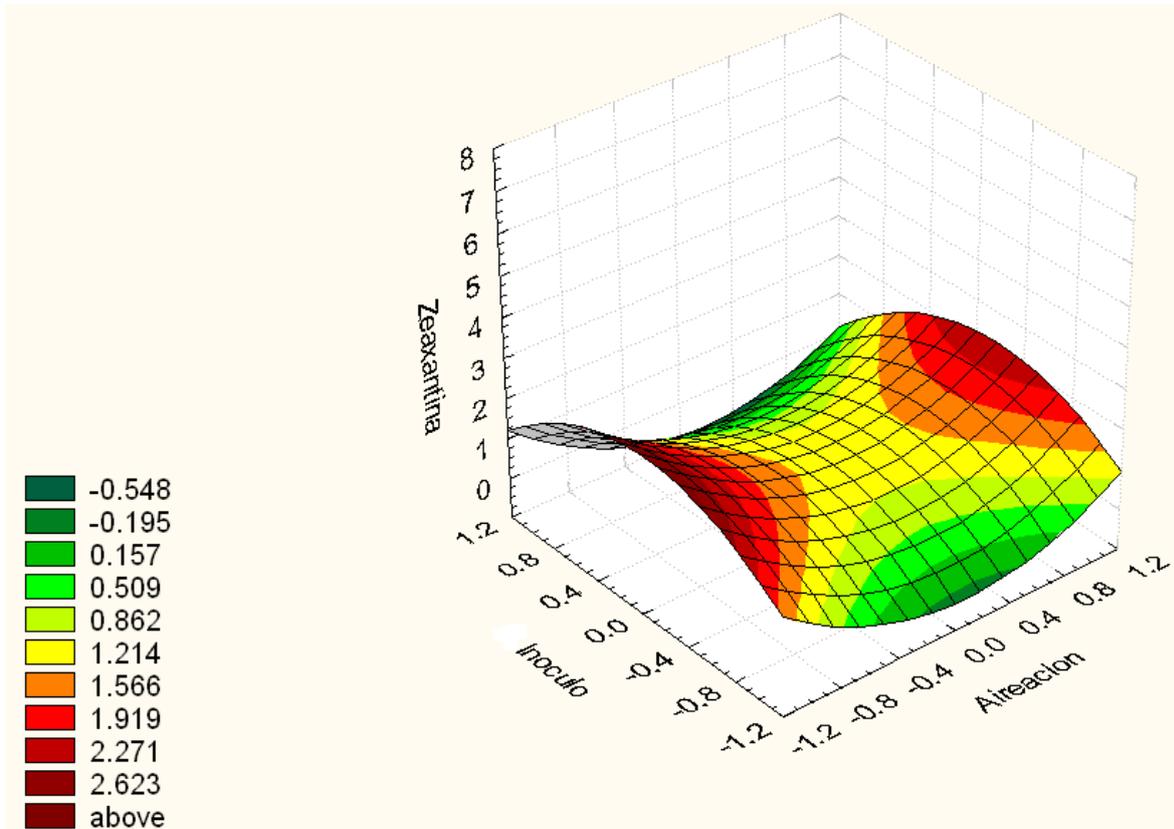
**Figura 5.31.** Gráfica de Superficie de respuesta de los factores  $X_2$  y  $X_3$  (Minitab, 2009).

El modelo que se aplica al comportamiento de estas variables es:

$$Z = 0.899 + 0.6188X_2 - 0.221X_3 - 0.382X_2X_3 + 1.352X_2^2 - 1.129X_3^2$$

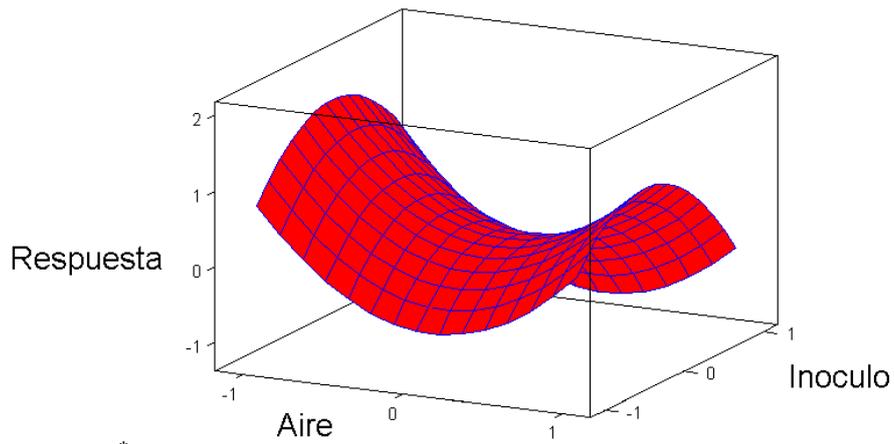
Donde  $Z$  = concentración de zeaxantina,  $X_2$  = nivel de mezclado,  $X_3$  = % de inóculo.

### 5.5.2.3 Gráficas de superficie de respuesta $X_1$ , $X_3$ .



**Figura 5.32.** Gráfica de Superficie de respuesta de los factores  $X_1$  y  $X_3$  (Statistics, 2009)

La relación que existe entre la producción de zeaxantina y los factores aireación y % de inóculo se muestran en la figura 5.32, a partir de la cual puede ser calculada la concentración esperada de zeaxantina en función de estas dos variables con un nivel de significancia del 95%. Se observan diferentes áreas de operabilidad de esos dos factores para los cuales, los valores de la respuesta van desde valores negativos (respuesta nula) hasta valores positivos de 2.623 mg/ml de zeaxantina.



\*Respuesta es la concentración de zeaxantina en mg/ml.

**Figura 5.33.** Gráfica de Superficie de respuesta de los factores  $X_1$  y  $X_3$  (Minitab, 2009).

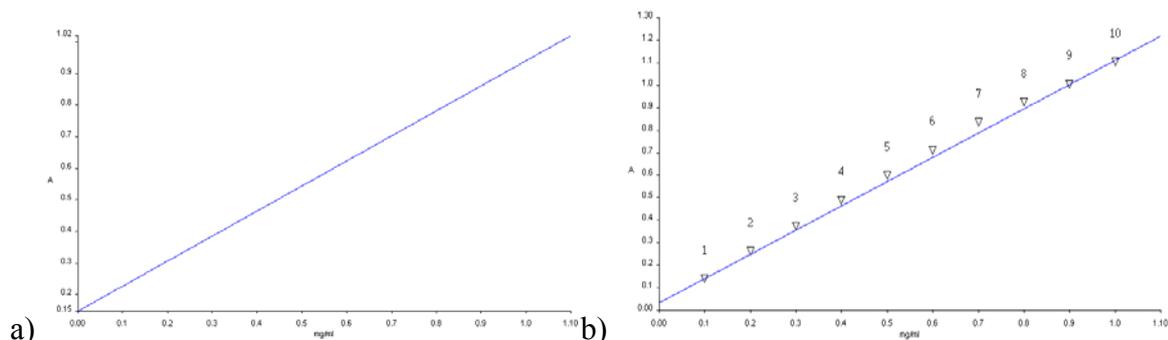
El modelo que se aplica al comportamiento de estas variables es:

$$Z = 1.064 - 0.317X_1 - 0.221X_3 - 0.097X_1X_3 + 1.0633X_1^2 - 1.150X_3^2$$

Donde  $Z$  = concentración de zeaxantina,  $X_1$  = nivel de aireación,  $X_3$  = % de inóculo.

## 5.6. Técnicas Analíticas

### 5.6.1. Curva de calibración para determinación de azúcares reductores totales. Método del Ácido Dinitrosalicílico DNS (Miller, 1953)



**Figura 5.34.** a) Curva de calibración y b) Curva de Recalibración, para cuantificar azúcares reductores.

Como resultado de los datos de la absorbancia obtenidos de las muestras del Cuadro 5.11, se obtuvo la curva de calibración presentada en la Figura 5.34.

**Cuadro 5.11.** Datos para a) curva de calibración y b) curva de recalibración de azúcares reductores.

a)

Longitud de onda.	Muestra.	Concentración (mg/ml).	Absorbancia.
575	1	0.200	0.323
575	2	0.400	0.466
575	3	0.600	0.602
575	4	0.800	0.754
575	5	1.000	0.970

Ecuación de la recta:  $y = 1.476 e^{-01} + 7.924 e^{-01} (x)$ .

Error residual: 0.028.

Coefficiente de correlación: 0.995.

c)

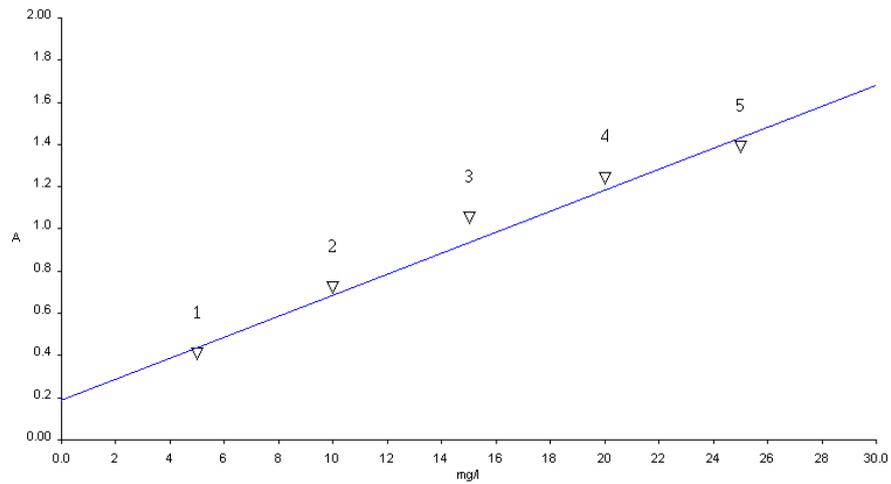
Longitud de onda.	Muestra.	Concentración (mg/ml).	Absorbancia.
575	1	1.100	0.121
575	2	0.200	0.244
575	3	0.300	0.354
575	4	0.400	0.470
575	5	0.500	0.579
575	6	0.600	0.692
575	7	0.700	0.815
575	8	0.800	0.901
575	9	0.900	0.986
575	10	1.000	1.084

Ecuación de la recta:  $y = 3.253 e^{-02} + 1.077 e^{-00} (x)$ .

Error residual: 0.018.

Coefficiente de correlación: 0.999.

### 5.6.2. Curva de calibración para determinación de fosfatos



**Figura 5.35.** Curva de calibración para cuantificar fosfatos.

Como resultado de los datos de la absorbancia obtenidos de las muestras del Cuadro 5.12, se obtuvo la curva de calibración presentada en la Figura 5.35.

**Cuadro 5.12.** Datos para curva de calibración de fosfatos.

Longitud de onda.	Muestra.	Concentración (mg/ml).	Absorbancia.
690	1	5.000	0.379
690	2	10.000	0.694
690	3	15.000	1.025
690	4	20.000	1.214
690	5	25.000	1.362

Ecuación de la recta:  $y = 1.887 e^{-01} + 4.974 e^{-02} (x)$ .

Error residual: 0.076.

Coefficiente de correlación: 0.986.

5.7. Gráficas de crecimiento bacteriano con el modelo de tendencia “S”- Curve, Pearl-Reed (Minitab, 2009)

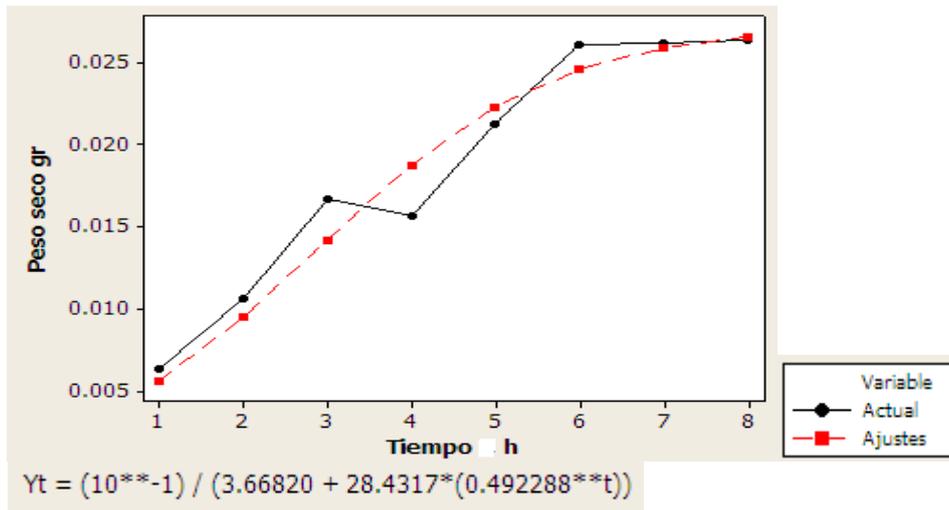


Figura 5.36. Gráfica de análisis de tendencia de experimento 4.

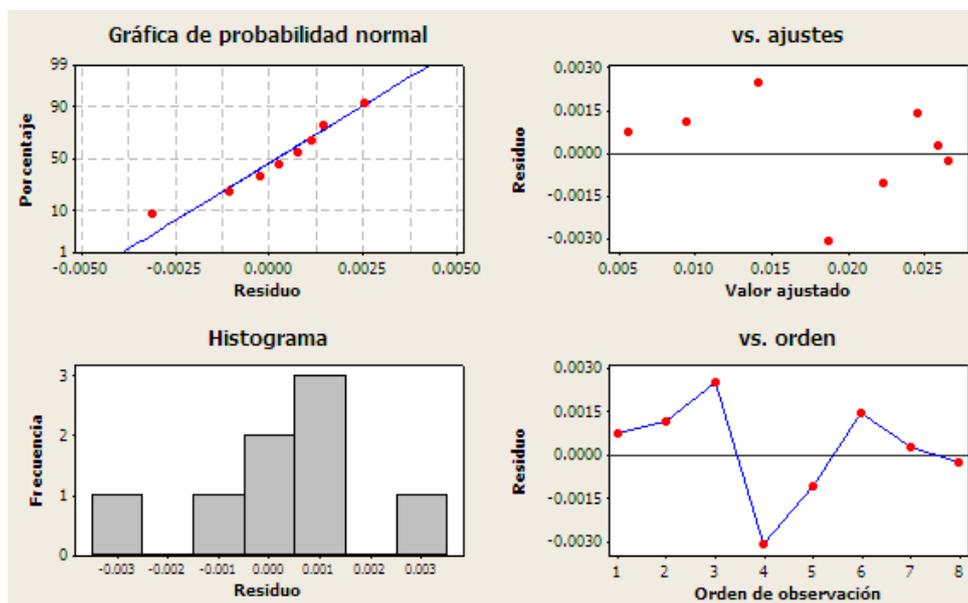


Figura 5.37. Gráficas de residuos para experimento 4.

Del análisis de las gráficas de las Figuras 5.36 y 5.37 se confirma que el crecimiento bacteriano de *Flavobacterium sp.* sigue un modelo de crecimiento explicado por el modelo logístico de Pearl Reed.

5.8. Gráficas de crecimiento bacteriano con modelo de tendencia polinomial (Excel, 2007)

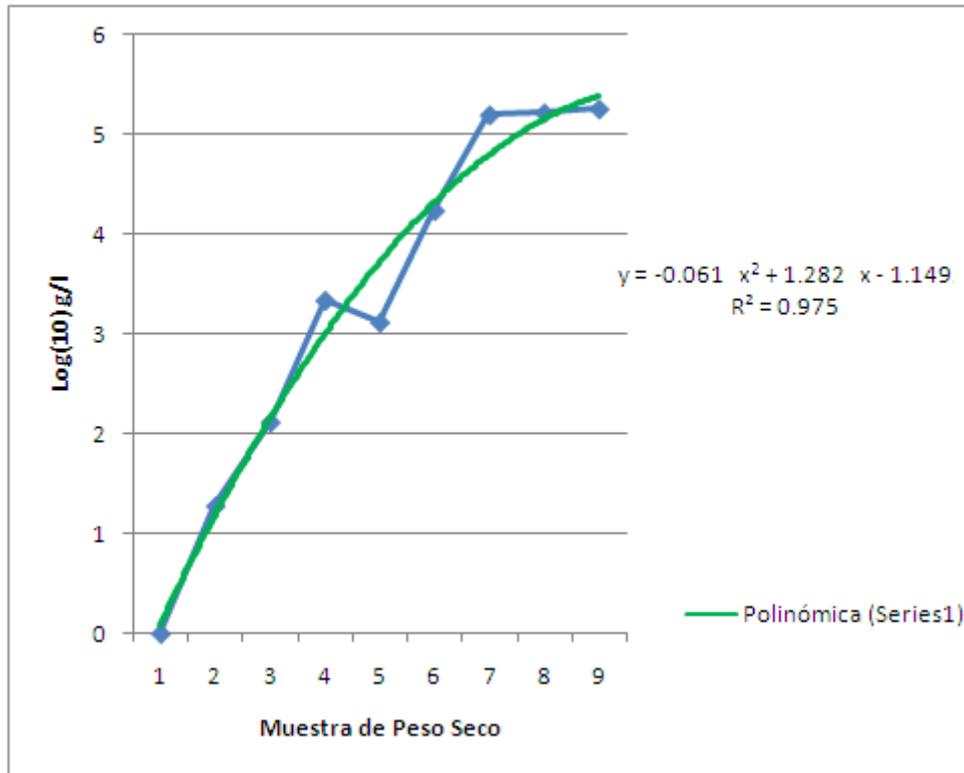


Figura 5.38. Gráfica de análisis de tendencia de experimento 4.

En nuestro análisis del crecimiento bacteriano, aplicando un modelo cuadrático (Figura 5.38), podemos observar que el modelo presenta una tendencia de crecimiento rápido en todo el rango de las muestras, a diferencia del modelo logístico de Pearl Reed en el que la variable de respuesta presenta un crecimiento lento al inicio y al final del rango. En la parte de crecimiento exponencial es donde se adapta el modelo al crecimiento bacteriano de *Flavobacterium sp.*

## VI. CONCLUSIONES

Se encontró que la cepa de *Flavobacterium sp.* ATCCC 21588 desarrolla un mayor crecimiento utilizando una concentración salina de NaCl de 15 g/l, adicionados al medio de cultivo sólido y líquido, a una temperatura de 27 °C y un pH inicial ajustado de 7.

Se obtuvieron condiciones de crecimiento del microorganismo satisfactorias empleando el medio de cultivo líquido con dextrosa como fuente de carbono y como suplemento el licor de remojo de maíz el cual es una fuente rica de aminoácidos, vitaminas, oligoelementos y ácido láctico que potencian el crecimiento celular.

La cinética de crecimiento del microorganismo, en matraz y en tanque agitado, presentó el inicio de la fase log, de crecimiento exponencial, a las 24 horas y de la fase estacionaria a las 40 horas de la fermentación, tiempo en el que se efectuaron las mediciones espectrofotométricas de zeaxantina ya que se encontró que la producción celular está asociada con la máxima producción de metabolitos obtenidos mediante fermentación microbiológica.

Se encontró que el modelo logístico de Pearl-Reed define el comportamiento sigmoide de la cinética de crecimiento celular de *Flavobacterium sp.* aplicando el modelo a los datos de biomasa. En alguno de los tratamientos se aplicó el método de suavización doble exponencial a los datos originales y de esta manera se obtuvo el comportamiento final de curva en “S” del modelo logístico. El modelo exponencial satisface básicamente la etapa de crecimiento local logarítmica.

El análisis estadístico permitió encontrar las condiciones óptimas para la producción de zeaxantina en el biorreactor de tanque agitado en un tiempo relativamente corto; los valores críticos de los factores fueron: aireación = 0.680 vvm, mezclado = 264 rpm, obteniendo de la ecuación de superficie de respuesta del diseño experimental de Box-Bekhen un valor óptimo de 56.865 ppm, con una productividad de 1.42 mg/ [(l)/ (h)] en un tiempo de 40 horas de haber iniciado la fermentación y con un porcentaje de inóculo/medio de cultivo = 7.590.

La caracterización del pigmento del maíz amarillo se logró mediante las operaciones de molienda en seco, extracción líquida, separación líquido-líquido, purificación sólido-líquido y rota-evaporación. La identificación y cuantificación del pigmento del maíz amarillo se efectuó mediante las técnicas de espectrofotometría UV-VIS, espectrometría de análisis infrarrojo y de cromatografía de líquidos de alto rendimiento HPLC; al pigmento que se obtuvo por fermentación con *Flavobacterium sp.*, sólo se le identificó y cuantificó con la técnica instrumental de espectrofotometría de UV-VIS, utilizando como patrón al pigmento natural del maíz.

## VII. REFERENCIAS

- Agraz, J.A. 1993. Los colores de la naturaleza son compuestos químicos complejos. *Química Hoy*. 2:1-3.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis (15<sup>th</sup> Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Va., USA.
- Berry, A., Janssens, D., Humbelin, M., Jore, J., Hoste, B., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Bretzel, W., Mayer, A., López-Ulibarri, R., Shanmugam, B., Swings, J. and Pasamontes, L., 2003. *Paracoccus zeaxanthinifaciens* sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:231-238.
- Beyer, P. and Kleining, H. 1992. Analysis of the formation of carotene Chromophore and icone rings in *Narcissus pseudonarcissus* L. Chromoplast membranes. In: *Methods in Enzimology*. Vol. 213. Packer, Lester. Academic Press. New York, USA.  
([http://www.amazon.com/reader/0121821145?\\_encoding=UTF8&ref=sib%5Fd p%5Fpt#reader\\_0121821145](http://www.amazon.com/reader/0121821145?_encoding=UTF8&ref=sib%5Fd p%5Fpt#reader_0121821145). 02/10/09).
- Bhosale, P., Larson, A.J. and Berbstein, P.S. 2004. Factorial analysis of tricarboxylic acid cycle intermediates for optimization of zeaxanthin production from *Flavobacterium multivorum*. *Journal of Applied Microbiology*. 96:623-629.
- Branen. A.L. 1990. Carotenes. In: *Food Additives*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Britton, G. 1976. Biosynthesis of carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. 2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press. New York, USA.
- Caicedo, Andrés. 2007. Biorreactores. Tutorial electrónico para estudiantes de Ingeniería. Universidad Nacional. Colombia. Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería. Instituto Tecnológico de Celaya. Fecha de consulta: 01/09/09.
- Castaño, Tostado Eduardo y Domínguez, Domínguez Jorge. 2003. Experimentos: Estrategia y análisis en Ciencia y Tecnología, S y G editores, S.A. de C.V., México, D.F. 295:330.
- Cerdá-Olmedo, E. 1989. Production of carotenoids with fungi. In: *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*. Elsevier Applied Science, New York. USA. 27:43.
- Committee Report. 1958. The determination of orthophosphate, hydrolysable phosphate and total phosphate in surface waters. *Journal Awwa*. 50:1563.

- Davies, B.H. 1976. Carotenoids. In: Chemistry and Biochemistry of plant pigments. Vol. 2, 2<sup>nd</sup>. ed. Goodwin, T.W. Academic Press. New York. USA.
- Delgado Vargas, F. 1997. “Pigmentos de Flor de Cempasúchil (*Tagetes erecta*). Caracterización fisicoquímica, procesamiento y eficiencia pigmentante”. Tesis Doctoral. Especialidad en Biotecnología. Departamento de Biotecnología. CINVESTAV. Irapuato, Gto. México.
- Delgado, V.F. and Paredes, O.L. 1997. Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flowers (*Tagetes erecta*). *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 45: 1097-1102.
- Delgado, V.F., Jiménez, A.R. and Paredes, O.L. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Review Food Science and Nutrition*. 40(30): 173-289.
- Devore, G. 1976. Química Orgánica. Ed. Publicaciones Culturales. México. 643:644.
- Don, Mc.N. 2001. The additional benefits nourishing of egg. *Center of nutrition of egg. Science*. 29:1-3.
- Gierhart, D. and Ridge, H. 1994. Production of zeaxanthin and zeaxanthin-containing compositions. United States Patent Number 5,308,759. USA.
- Goodwin, T.W. 1976. Distribution of carotenoids. In: Chemistry and Biochemistry of plant pigments. Vol. 1. Academic Press, New York, USA.
- Goodwin, T.W. 1992. Distribution of carotenoids. In: Chemistry and Biochemistry of plant pigments. Vol. 1. 59-63. Academic Press, New York, USA.
- Gross, J. 1987. Pigments in fruits. Academic Press. London. Great Britain.
- Gross, J. 1991. Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids. Van Nostrand Reinhold, New York. USA.
- Hendry, G.A. and Houghton, J.D. 1996. Natural food colorants. 2<sup>nd</sup>. Ed. Blackie Academic and Professional. London. Great Britain.
- Hendry, M.S., Mitchell, T.G. and Sewn, J.M. 1968. The identification of yellow-pigmented rods. In: Identification Methods for Microbiologists. Part B. Edited by Gibbs, B.M. and Shelton, D.A. Academic Press. London. Great Britain.

- Henken, H. 1992. Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poultry Science*. 71:711-717.
- Hofman, H., Pasamontes, L., Tessie, M. and Van Loon, Adolphus. 2004. Fermentative carotenoid production. European Patent EPO 747483. Munich. Germany.
- Holt, J.C., Krieg, N.R., Senath, P.H., Staley, J.T. and Williams, S.J. 1994. *Berge's Manual of determinative bacteriology*. 9a. ed. Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland. USA.
- Houston Medical School. 1995. Department Medic. University of Texas. (<http://medic.med.uth.tmc.edu/path/00001512.htm>. 02/10/09.)
- Klauri, H. 1981. Carotenoids and their Applications. In: *Natural colours for food and other uses*. Applied Science Publishers. Great Britain.
- Koneman, E.W., Allen, D.A., Dowell, V.R., Janda, W.M., Sommers, H.M. and Winn, W.C. 1998. *Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas a Color*. (3ra. Ed.). Editorial Médica Panamericana. México, D.F. 268-316.
- Lagarde, D., Beuf, L. and Vermaas, W. 2000. Increased Production of Zeaxanthin and other pigments by Application of Genetic Engineering Techniques to *Synechocystis sp.* Strain PC 6803. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 1:64-72.
- Lauro, H.J. 1998. *Food colorants*. Applied Science Publishers. Great Britain. 1-21.
- Lotan, H. and Hirschberg, F. 1995. *Biosynthesis of carotenoids and their application*. Applied Science Publishers. Great Britain. 39.
- Mann, S. 1992. Carotenoids and using in foods. *Physiology Plantarum*. 12:29.
- Marusich, W.L. and Bauerfeind, J.C. 1981. Carotenoids as colorants and Vitamin A precursors. Academic Press, Inc. New York. USA. 323:329.
- Matsuno, T. 1992. Structure and characterization of carotenoids from various habitats and natural sources. In: *Methods in Enzimology*. Vol.213. Packer, Lester. Academic Press. New York. USA.
- Mc Dermott, J., Brown, D., Britton, G. and Goodwin, W. 1974. Alternative Pathways of Zeaxanthin Biosynthesis in a *Flavobacterium* Species. *Biochemistry Journal*. 144: 231:243.

- Miller, G.L. 1953. Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Mitsuda, H. and Yamamoto, A. 1983. Enriched and fortified foods. In: *Handbook of nutritional supplements human use*. Vol. 1. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida. USA.
- Montes, L. and Magaña, P. 1991.  $\Lambda$ -Dehydrogenation of steroids by *Arthrobacter simplex* immobilized in calcium polygalacturonate beads. *Journal Industrial Microbiology*. 8:259-264.
- Montgomery, D.C. 1996. *Probabilidad y Estadística aplicadas a la ingeniería*. 1st. Ed. Mc Graw-Hill. México, D.F.
- Montgomery, D.C. 2005. *Diseño y análisis de experimentos*. 2nd. Ed. Limusa Willey. Mexico, D.F. 427-472.
- Morones, L. y Escamilla, M.E. 2001. “Estudio Cinético y Optimización del proceso de producción de zeaxantina por *Flavobacterium sp.* mediante fermentación sumergida”. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Qro. México.
- Moss, G.P. and Weedon, C.L. 1976. Chemistry of the Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. 2<sup>nd</sup>. Ed. Academic Press. New York. USA. 91-94.
- Muller, R.K., Bernhard, K., Kienzle, F., Mayer, H. and Ruttimann, A. 1980. Some recent advances in the synthesis of natural carotenoids. *Applied Science Publishers*. Great Britain. 40-49.
- Negrete, R.M.L.X. 1999. Efecto de los diversos constituyentes en el cultivo de *Gibberella fijiikuroi* en matraz agitado. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato. México.
- Nelis, H.J. and De Leenheer, A.P. 1989. Microbial production of carotenoids other than beta-carotene. In: *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*. Elsevier Applied Science. New York. USA.
- Ninet, L. and Renault, J. 1979. Carotenoids. In: *Microbial Technology*. 2<sup>nd</sup>. Ed. Vol.1. Pepler, H.J. and Perlman, D. Academic Press. New York. USA.

- Nishida, Y., Adachi, K., Shizuri, Y., Shindo, K., Sawabe, A., Komemushi, S., Miki, W. and Misawa, N. 2005. Elucidation of a Carotenoid Biosynthesis Gene Cluster Encoding a Novel Enzyme. 2, 2'- $\beta$ -Hydroxylase, from *Brevundimonas sp.* strain SD212 and Combinatorial Biosynthesis of new or rare Xanthophylls. American Society for Microbiology. (<http://aem.asm.org/cgi/reprint/71/8/4286.pdf> 02/10/09.)
- Olmedilla, B., Granada, F., Southon, S., Wright, A.J.A., Blanco, Y., Gil, E.M., Van den Berg, H., Corridan, B., Roussel, A.M., Chopra, M. and Thurnham, D.L. 2001. Serum Carotenoids Concentration, vitamins A, E and C in control subjects from 5 European countries. British Journal Nutrition. 85:1-12.
- Ong, Augustine, S.H. and Tee, E.S. 1992. Natural sources of carotenoids from plants and oils. In: Methods in Enzymology. Vol. 213. Academic Press. New York. USA.
- Parra Saldívar, Roberto. 2000. Optimización de parámetros ingenieriles de un reactor de lecho fluidizado para la producción de Giberelinas por medio de *G. Fujikuroi* inmovilizado en ácido poligalacturónico. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología en Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro. México.
- Pfander, H. 1992. Carotenoids: an overview. In: Methods in Enzymology. Vol. 213. Packer, Lester. Academic Press. New York. USA.
- Rau, W. 1980. Blue Light-Induced Carotenoid Biosynthesis in Microorganisms. In: The Blue Light Syndrome. Senger, H. Ed. Springer. Berlin. Germany.
- Rodriguez, A. y Delia, B. 2000. Carotenoides y preparación de alimentos. Escuela de Medicina. 1512-1513. Universidad de Texas. Houston. Texas. USA. <http://jn.nutrition.org/cgi/content/full/136/10/2519>. 30/09/09
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., y Kamat, M.Y. 2008. The Carotenoid Pigment Zeaxanthin. A Review. Institute of Food Technologists. USA.
- Sandmann, G.M., Albretch, G., Schnurr, O. Knorz, and Boger, P. 1999. The biotechnological potencial and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. Biotechnology Letters. 17:233-239.
- Schafer, E. and Nelson D. 2002. El valor saludable de las frutas y verduras. Universidad Estatal de Iowa. ([www.extension.iastate.edu/pubs.04/03/08](http://www.extension.iastate.edu/pubs.04/03/08).)

- Schmidt, K. 1978. Biosynthesis of carotenoids. In: The photosynthetic bacteria. Clayton, R.K. and Sistrom, W.R. pp. 729-750. Plenum Press. New York. USA.
- Scragg, A. 1996. Biotecnología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. pp. 4- 16. Ed. Limusa. México.
- Villegas, G. 1992. What are the biotransformations?. Environmental Research and Waste Reduction 1:42-47.
- Yabuuchi, E., Yano, I., Kaneko, T., and Ohyama, A. 2002. Classification of Group II K-2 and related bacteria. Applied Microbiology. 1:9-11.