



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

7

215

FACULTAD DE QUÍMICA

"SELECCION DE UNA BACTERIA PRODUCTORA DE  
ZEAXANTINA Y OPTIMIZACION DEL MEDIO  
DE PRODUCCION"



EXÁMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

**ARACELI BAUTISTA FELIX**



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO**

**Presidente**            **Dra. Amanda Galvez Mariscal.**

**Vocal**                **Dr. Sergio Sánchez Esquivel.**

**Secretario**         **Dra. Amelia Ma. de Guadalupe Farrés González Saravia.**

**1er. Suplente**      **Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio.**

**2do. Suplente**     **Prof. Norma Angélica Castellanos Chávez.**

**ESTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL,  
DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA, DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL.**



**Sustentante**  
**Araceli Bautista Felix.**



**Asesor**  
**Dr. Sergio Sánchez Esquivel.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Quisiera agradecer la colaboración de todas aquellas personas que en cierta medida contribuyeron en la realización del siguiente trabajo:**

**\*Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por su amistad y confianza que me permitieron culminar mis estudios.**

**\*A Fabian Díaz, Ana María Obregón Sergio Alcántara, Gilberto Casillas y Elia Velázquez por sus conocimientos y consejos que me permitieron avanzar en el proyecto de manera efectiva. Además agradezco infinitamente su amistad sincera.**

**\*A Eneida y Bety por su amistad y paciencia durante todos estos años de convivir juntas.**

**\*A todo el equipo del laboratorio que siempre recordare con verdadero cariño especialmente a Laurita Escalante y Lulú Sato.**

**\*Y a los sinodales Amanda y Amelia por realizar la revisión del trabajo tomando en cuenta sus múltiples acupaciones.**

**DEDICATORIAS**

**\* A MIS QUERIDOS PADRES JOSEFINA Y JOSE LEON POR SU APOYO Y AMOR INCONDICIONAL.**

**\* A MIS HERMANOS JUAN, VICTOR, ALFREDO, ISABEL, LAURA Y LEON, POR SU CARIÑO Y MOMENTOS GRATOS QUE HEMOS PASADO JUNTOS.**

**\* A OCTAVIO POR SU AMOR VERDADERO QUE ME ALIENTA A SEGUIR ADELANTE.**

**\* A MI QUERIDO CUÑADO DAVID POR SU APOYO DE HERMANO.**

**\* Y A TODOS MIS SOBRINOS QUE SON LA ALEGRIA DE MI FAMILIA. TANYS, DENIS, NANCY, JAIR, TOÑO, ADAN, FANY, KAREN, MARIANA, JUAN, JOVANY Y DANIEL.**

**Conozco "Tres Cosas Preciosas".  
Estimo y conservo las tres.  
La primera de ellas es el amor,  
la segunda es la Austeridad,  
la tercera es la Humanidad.**

**Con Amor se puede ser valeroso,  
con Amistad se puede ser generoso,  
con Humanidad se puede progresar.**

**Si los hombres no sienten Amor,  
no tienen móvil para la valentía.  
Si no tienen Austeridad,  
carecen de reservas para ser generosos.  
Si no son Humildes,  
no progresan por que no tendrán una meta que alcanzar.**

**Y cuando llega la muerte,  
les domina el miedo, el dolor y la ignorancia.**

**Lao-tse.**

## INDICE

RESUMEN.....	5
<b>I. INTRODUCCIÓN.</b>	
Generalidades.....	7
1.1. Los carotenoides.....	8
1.2. Biosíntesis de carotenoides.....	10
1.3. Condiciones de cultivo que controlan la biosíntesis de carotenoides:.....	12
1.3a. Efecto de la fuente de carbono.....	13
1.3b. Efecto de la fuente de nitrógeno.....	14
1.3c. Efecto de la luz.....	14
1.3d. Efecto del oxígeno.....	15
1.4. Zeaxantina.....	15
1.4a. Obtención y usos.....	16
1.4b. Biosíntesis.....	16
1.5. Optimización de medios de cultivo en fermentaciones.....	18
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>19</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>IV. ESTRATEGIA.....</b>	<b>23</b>

<b>V. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>5.1. Reactivos.....</b>	<b>24</b>
<b>5.2. Microorganismos.....</b>	<b>24</b>
<b>5.3. Medios de cultivo.....</b>	<b>25</b>
<b>5.3a. Condiciones de cultivo para mantenimiento de cepas.....</b>	<b>25</b>
<b>5.3b. Condiciones de cultivo para producción de pigmentos.....</b>	<b>25</b>
<b>5.4. Inóculo.....</b>	<b>26</b>
<b>5.5. Fermentación.....</b>	<b>27</b>
<b>Métodos analíticos.....</b>	<b>27</b>
<b>5.6. Cuantificación de crecimiento.....</b>	<b>27</b>
<b>5.6a. Método de Lowry.....</b>	<b>28</b>
<b>5.7. Métodos de extracción y cuantificación de pigmentos.....</b>	<b>29</b>
<b>5.8. Cromatografía en capa fina.....</b>	<b>30</b>
<b>5.9. Cuantificación de zeaxantina por densitometría.....</b>	<b>31</b>
<b>5.10. Cuantificación de glucosa residual.....</b>	<b>32</b>
<b>5.11. Determinación de amonio residual.....</b>	<b>33</b>
<b>5.12. Determinación del pH.....</b>	<b>34</b>
<b>5.13. Análisis estadístico.....</b>	<b>34</b>

## **VI. RESULTADOS.**

<b>6.1. Selección de la cepa productora.....</b>	<b>35</b>
<b>6.2. Selección del medio de cultivo.....</b>	<b>39</b>
<b>6.3. Selección de las condiciones del inóculo.....</b>	<b>40</b>
<b>6.4. Efecto del extracto de levadura y triptona sobre la producción de zeaxantina... 43</b>	<b>43</b>
<b>6.5. Efecto de la fracción de llenado sobre la producción de zeaxantina..... 47</b>	<b>47</b>
<b>6.6. Efecto del medio de cultivo, fracción de llenado y pH sobre la producción de zeaxantina..... 54</b>	<b>54</b>
<b>6.7. Variabilidad en la producción de zeaxantina en las condiciones a optimizar..... 58</b>	<b>58</b>
<b>6.8. Influencia del tipo de reactivo sobre la producción de zeaxantina..... 59</b>	<b>59</b>

<b>V. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>5.1. Reactivos.....</b>	<b>24</b>
<b>5.2. Microorganismos.....</b>	<b>24</b>
<b>5.3. Medios de cultivo.....</b>	<b>25</b>
<b>5.3a. Condiciones de cultivo para mantenimiento de cepas.....</b>	<b>25</b>
<b>5.3b. Condiciones de cultivo para producción de pigmentos.....</b>	<b>25</b>
<b>5.4. Inóculo.....</b>	<b>26</b>
<b>5.5. Fermentación.....</b>	<b>27</b>
<b>Métodos analíticos.....</b>	<b>27</b>
<b>5.6. Cuantificación de crecimiento.....</b>	<b>27</b>
<b>5.6a. Método de Lowry.....</b>	<b>28</b>
<b>5.7. Métodos de extracción y cuantificación de pigmentos.....</b>	<b>29</b>
<b>5.8. Cromatografía en capa fina.....</b>	<b>30</b>
<b>5.9. Cuantificación de zeaxantina por densitometría.....</b>	<b>31</b>
<b>5.10. Cuantificación de glucosa residual.....</b>	<b>32</b>
<b>5.11. Determinación de amonio residual.....</b>	<b>33</b>
<b>5.12. Determinación del pH.....</b>	<b>34</b>
<b>5.13. Análisis estadístico.....</b>	<b>34</b>

## **VI. RESULTADOS.**

<b>6.1. Selección de la cepa productora.....</b>	<b>35</b>
<b>6.2. Selección del medio de cultivo.....</b>	<b>39</b>
<b>6.3. Selección de las condiciones del inóculo.....</b>	<b>40</b>
<b>6.4. Efecto del extracto de levadura y triptona sobre la producción de zeaxantina... 43</b>	<b>43</b>
<b>6.5. Efecto de la fracción de llenado sobre la producción de zeaxantina..... 47</b>	<b>47</b>
<b>6.6. Efecto del medio de cultivo, fracción de llenado y pH sobre la producción de zeaxantina..... 54</b>	<b>54</b>
<b>6.7. Variabilidad en la producción de zeaxantina en las condiciones a optimizar..... 58</b>	<b>58</b>
<b>6.8. Influencia del tipo de reactivo sobre la producción de zeaxantina..... 59</b>	<b>59</b>

<b>6.9. Importancia de los nutrimentos a optimizar sobre la producción de zeaxantina..</b>	<b>68</b>
<b>6.10. Optimización final.....</b>	<b>81</b>
<b>VII. DISCUSION DE RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>88</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>90</b>
<b>X. APENDICES:</b>	
<b>1) Colorantes usados en la industria de alimentos.....</b>	<b>94</b>
<b>2) Análisis proximal del licor de maíz.....</b>	<b>96</b>
<b>3) Análisis estadístico.....</b>	<b>99</b>

## **RESUMEN**

El considerable interés mundial que se ha despertado en los últimos años por los colorantes naturales, principalmente rojos y amarillos ha incrementado su demanda en el mercado mundial, lo cual ha llevado a pensar en los microorganismos como una alternativa de producción.

Con la finalidad de incrementar la producción microbiana de un pigmento amarillo (zeaxantina), se realizaron estudios de optimización con un medio para el género *Flavobacterium*. El género *Flavobacterium* presenta la característica que del total de sus carotenoides el 90% corresponden a zeaxantina, la cual se utiliza en alimentación animal. Estudios previos en el laboratorio permitieron evaluar el efecto de los nutrientes del medio a optimizar sobre la producción del pigmento (Díaz, 1995). El medio de cultivo de partida se adquirió de una patente reportada por la compañía Nestlé, compuesto por reactivos grado analítico-industriales, siendo sustituidos los primeros por nutrientes industriales al iniciarse la optimización del medio. En este medio se lograron obtener producciones de zeaxantina por arriba del 100 % a las reportadas por la compañía Nestlé en el medio original.

Interesados en la producción de pigmentos amarillos, se evaluaron en el laboratorio cuatro especies de *Flavobacterias*: *Flavobacterium* sp 21588, *Flavobacterium* sp 21081, *Flavobacterium balustinum* y *Flavobacterium aquatile* adquiridas de la American Type Culture Collection. De entre ellas, se seleccionó a *Flavobacterium* sp 21081 como la mejor cepa productora de zeaxantina, pigmento amarillo de interés comercial.

A partir de herramientas estadísticas, se evaluó la importancia de los diferentes componentes del medio de cultivo ( fuentes de carbono y nitrógeno, sales), así como los factores fisicoquímicos ( pH, fracción de llenado y tiempo de fermentación) que puedan afectar la producción del pigmento.

Por medio de diseños factoriales completos, se pudo conocer que el licor de maíz es el nutriente que mayor influencia tiene sobre el crecimiento y producción, ya que su presencia estimula la síntesis de zeaxantina, pero en cambio triptona y extracto de levadura favorecen la síntesis de  $\beta$ -caroteno. Los resultados anteriores permitieron eliminar extracto de levadura y triptona del medio de cultivo, ya que la composición compleja del licor de maíz aportó los nutrientes necesarios para la síntesis del pigmento. Con respecto al efecto de la glucosa, concentraciones por arriba del 2% no son asimiladas por la bacteria y las producciones alcanzadas son muy parecidas a las obtenidas con 2% del nutriente, por lo que su presencia no influye de manera significativa sobre la síntesis del producto pero es necesaria para el crecimiento.

De los factores fisicoquímicos evaluados la fracción de llenado, que se relaciona directamente con la oxigenación del medio, resultó ser de suma importancia sobre la capacidad de síntesis de zeaxantina por *Flavobacterium* sp 21588, ya que a mayor oxigenación la formación de zeaxantina predomina por encima de otros pigmentos y en cambio poca oxigenación favorece la síntesis de  $\beta$ -caroteno.

En el medio optimizado las máximas producciones del pigmento de interés se lograron a las 48h de fermentación, con una fracción de llenado de 0.1 en matraces bafleados de 250 ml, logrando cuadruplicar tanto la producción de carotenoides totales como de zeaxantina (11.99  $\mu\text{g/ml}$  y 7.52  $\mu\text{g/ml}$ ) respectivamente, en base a la producción en el medio reportado por la compañía Nestlé (3.66  $\mu\text{g/ml}$  y 1.99  $\mu\text{g/ml}$ ). Los costos se abatieron, al sustituir los reactivos grado analítico por grado industrial y al eliminar dos nutrientes del medio de producción.

## **I. INTRODUCCION**

A mediados del siglo XIX los colorantes que se utilizaban en la industria alimentaria y en la farmacéutica eran de origen natural. En 1856, Perkin descubre el primer colorante orgánico sintético: mauve 114 iniciándose el apogeo de los compuestos sintéticos, llegando a disminuir considerablemente la presencia de los colorantes naturales en el mercado.

La prohibición por la FDA a principios de los años 80, del uso de la mayor parte de los pigmentos rojos y amarillos sintéticos en alimentos y cosméticos debido a sus efectos nocivos sobre la salud, así como la creciente demanda de colorantes, propiciaron el estudio masivo de pigmentos de origen natural (Klauri y Bavernfeind, 1981).

Los microorganismos son una fuente interesante para la obtención de colorantes naturales, al ser de fácil manipulación y crecer rápidamente en poco espacio y de forma independiente de los factores estacionales. Además, mediante estrategias de mejoramiento genético y estudios nutricionales, se pueden mejorar los rendimientos de producción.

Los carotenoides son uno de los grupos más importantes de pigmentos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son los responsables de la coloración del amarillo al rojo de frutas y flores, y se encuentran también en muchos organismos no fotosintéticos, incluyendo a los hongos. (Bramley y Mackenzie, 1992).

Bajo tales bases se ha visualizado a los sistemas microbianos como una alternativa para producir colorantes de origen biológico. En este sentido la producción de zeaxantina por el género *Flavobacterium* ha despertado interés, tanto de investigación como de aplicación industrial, debido a que algunas especies de éste género, producen zeaxantina en un 95% del total de sus carotenoides.

La zeaxantina de origen natural se utiliza principalmente en alimentación animal como suplemento alimenticio para aves ( pigmentación de yema de huevo y piel ) y en peces ( pigmentación de la piel ). La zeaxantina sintética es utilizada en la elaboración de grasas, bebidas calientes y frías, budines y salsas ( Badui, 1980 ).

En la actualidad se conoce muy poco sobre el efecto que ejercen los factores fisicoquímicos y nutricionales sobre la síntesis de este carotenoide. Por ello se planteó esta investigación cuyo principal objetivo es lograr optimizar las condiciones de producción de zeaxantina en una cepa del género *Flavobacterium*, esperando con ello, incrementar los rendimientos del pigmento.

### **1.1 LOS CAROTENOIDES:**

Los carotenoides son una familia de pigmentos naturales que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Las funciones que presentan en los organismos que los contienen son: absorción de la luz, fotoprotección y como precursores de la vitamina A. Estos pigmentos poseen un gran interés comercial por sus amplias posibilidades de aplicación en la industria de los alimentos, y en la farmacéutica, principalmente para cosmetología.

Los carotenoides son tetraterpenos liposolubles formados por la condensación de unidades de isoprenilo, cuya gama de color va del amarillo al rojo. Se dividen estructuralmente en dos grupos: los carotenos y las xantofilas. El grupo de los carotenos está formado por compuestos hidrocarbonados y su principal exponente es el  $\beta$ -caroteno. El grupo de las xantofilas está formado por derivados de los compuestos hidrocarbonados que se generan por la introducción de funciones oxígeno, especialmente de grupos hidroxí, oxo y epoxi, formando alcoholes, aldehídos y cetonas (Schwartz y Col, 1989). Las xantofilas son más solubles en agua que los carotenos. Tanto los carotenos como las xantofilas están formados por 40 átomos de carbono (Nelis y Leenheer, 1991).

Los carotenoides permitidos como aditivos de alimentos y forrajes se presentan en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Pigmentos permitidos como aditivos de alimentos y forrajes.

Compuesto	FUENTE		Uso
	No microbiana	Microbiana	
$\beta$ -caroteno	Zanahoria Síntesis	<i>B. trispora</i> <i>D. salina</i>	Alimentos para consumo humano
Lycopeno	Tomate	<i>B. trispora</i> <i>S. elaeostomycticus</i>	Alimentos para consumo humano
Luteína	Alfalfa, maíz flor de cempasúchil	<i>S. excentricum</i> <i>Ch. pyrenoidosa</i> <i>D. stollensteini</i>	Alimento para aves de corral
Zeaxantina	cf. luteína	<i>Flavobacterium</i> sp	Alimentos para aves y peces
Cantaxantina	Crustáceos Plumas de aves síntesis	<i>C. cinnabarinus</i> <i>Brevibacterium</i> <i>R. maris</i>	Alimento para peces y aves de corral
Astaxantina	Crustáceos Plumas de aves Síntesis y flores	<i>M. laticola</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Ph. rhodozyma</i>	Alimento para peces
$\beta$ -Apo-8 carotenal	Síntesis		Alimentos para aves y consumo humano
Capsantina	Paprika		Alimento para aves y consumo humano

En el campo de la medicina se ha reportado un efecto de fotoprotección (Will y Scovel, 1987), propiedades anticancerígenas (Bertram y col., 1987, Kaplan y col., 1990) incremento de la respuesta inmune (Krisnsky, 1987) y un aumento en la longevidad en mamíferos (Cutler, 1984).

Los carotenoides aprobados por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de America (FDA) para su inclusión en los alimentos son: el  $\beta$ -caroteno, el  $\beta$ -Apo-8-carotenal y la cantaxantina .

#### **1.1a. USOS:**

**Restaurar la apariencia normal del alimento cuando el color original ha sido destruido por su procesamiento . (frutas enlatadas).**

**Obtener un color uniforme en frutas recolectadas en diferentes cosechas.**

**Intensificar el color natural cuando éste es débil.**

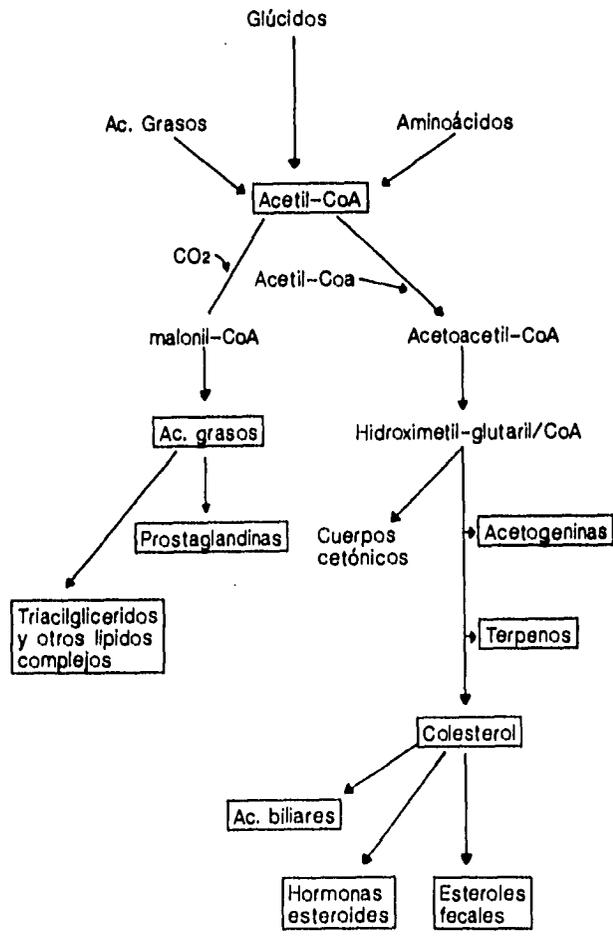
**Proteger agentes saborizantes y vitaminas fotosensibles durante su almacenamiento (Newsome, 1986).**

Por otra parte como colorantes presentan ventajas por su alta capacidad tintoreal, gran intervalo de color al utilizarse en diferentes combinaciones y actividad de vitamina A de algunos de ellos. Las desventajas son su baja solubilidad, su alta susceptibilidad a la oxidación durante su extracción y su alto costo comparado con el de los colorantes artificiales.

#### **1.2. BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES.**

Estudios de la biosíntesis del colesterol permitieron elucidar los mecanismos de biosíntesis de estos pigmentos (Lehninger, 1981). Por otro lado, la vía de carotenogénesis así como algunos aspectos de su regulación se han estudiado principalmente en sistemas microbianos y en plantas.(Schwartz y col., 1989).

El acetyl-CoA es el precursor no solo de los ácidos grasos, esteroides y prostaglandinas, sino también de los terpenos y las acetogeninas (Lehninger, 1981). En la figura 1.1, se presenta la importancia del acetyl-CoA. como precursor de estos compuestos.



**Figura 1.1. EL Acetil-CoA COMO PRECURSOR CLAVE DE LA BIOSÍNTESIS DE NUMEROSOS LÍPIDOS.**  
**FUENTE: Lehninger, L.A. (1981).**

En la biosíntesis de los carotenoides se pueden distinguir tres etapas (fig. 1.2) :

- a) La formación de ácido mevalónico por condensación de 3 moléculas de Acetil-CoA.
- b) La conversión del ácido mevalónico en geranil-geranil pirofosfato a través de reacciones de fosforilación, isomerización y condensación.
- c) La formación del primer tetraterpeno denominado fitoeno, que en función del organismo, plantas, algas, levaduras, hongos o bacterias, sufrirá cambios para generar diversos tetraterpenos.

Al respecto se reporta que los  $\beta$ -carotenos se sintetizan por hongos y algas, mientras que las xantofilas por algas, levaduras y bacterias (Goodwin, 1971).

En la ruta de biosíntesis de los carotenoides (fig. 1.2), cabe destacar lo siguiente (Goodwin, 1971; Ninet y Renaut, 1979; Schwartz y col., 1989):

I) El ácido mevalónico se forma por condensación de tres moléculas de acetil-CoA. El producto intermediario clave de estas reacciones es el 3-metil, 3-metil glutaril-CoA (HGM-CoA), el cual se reduce por acción de una reductasa para formar el mevalonato.

II) El ácido mevalónico, considerado el primer precursor específico de todos los terpenoides, se fosforila por el ATP, inicialmente para formar un ester 5-monofosfato. Una segunda fosforilación, también por el ATP, forma el 5-pirofosfato que por una descarboxilación formará el isopentenil pirofosfato (IPP). Para la formación de los terpenoides a partir de IPP, el primer paso es la isomerización de este compuesto a dimetil alil pirofosfato (DAPP) que permite la elongación de la cadena. La enzima prenil-transferasa transfiere una molécula de IPP a DAPP para formar geranil pirofosfato (GPP). La posterior transferencia de una molécula de IPP a GPP conduce a la formación de farnesil pirofosfato (FPP), que finalmente formará, por una nueva transferencia de IPP, geranil geranil pirofosfato (GGPP). Por último dos moléculas de GGPP se condensarán generando el fitoeno, primer molécula de síntesis de 40 átomos de carbono.

III) La desaturación secuencial de fitoeno a licopeno en plantas superiores y algas, implica una serie de deshidrogenaciones que producen en orden de aparición: fitoflueno  $\xi$ -caroteno, neurosporeno y licopeno. En ciertas bacterias fotosintéticas el  $\xi$ -caroteno se sustituye por su isómero asimétrico el 7,8,11,12,-tetrahidroxilicopeno, mientras que en otras bacterias y hongos ambos isómeros están presentes. Por otra parte se ha visto que el licopeno puede ciclarse para formar el  $\delta$ -caroteno y después el  $\beta$ -caroteno.

### **1.3 CONDICIONES DE CULTIVO QUE CONTROLAN LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES: CARBONO, NITRÓGENO, OXÍGENO Y LUZ,**

La mayoría de los estudios sobre la regulación de la biosíntesis de carotenoides se ha realizado en los hongos, los cuales presentan diferentes mecanismos de regulación que son (Rosas, 1993; y col, 1989):

- a) Retrorregulación por producto final.
- b) Fotorregulación.
- c) Efecto del oxígeno.
- d) Temperatura.
- e) pH.
- f) Activación o inhibición química.
- g) Factores de crecimiento.
- h) Hormonas o interacción sexual.
- i) Nutrientes en el medio de cultivo.
- k) Efecto del AMP cíclico.

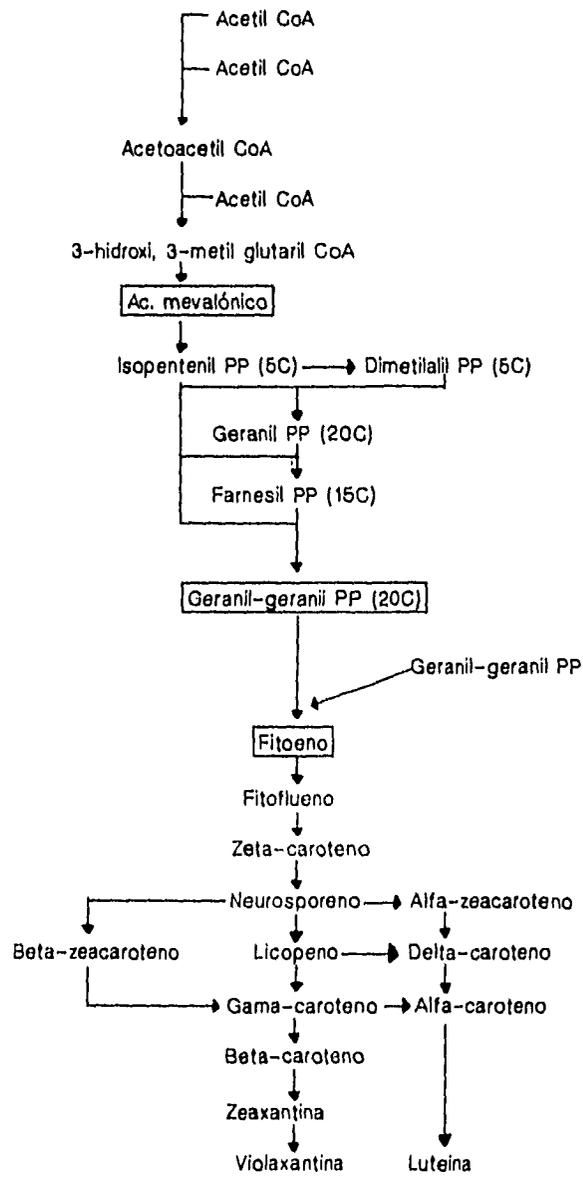


Figura 1.2. RUTA DE LA BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES.  
 FUENTE: Schwartz, R; Rosas, R; Farrés, A; Paredes, L y Sánchez, S (1989).

### 1.3a. EFECTO DEL CARBONO.

Rosas (1993) estudió el efecto de diversas fuentes de carbono sobre la síntesis de carotenoides en el hongo *Dacrymyces deliquescens*. Observó que en concentraciones del 1% las mejores fuentes de carbono para la síntesis de pigmentos fueron: D-glucosa, celobiosa y D-xilosa.

Al probar concentraciones del 5%, encontró que la celobiosa, la D-xilosa y el almidón estimularon la producción de carotenoides. A esta misma concentración reportó un efecto negativo por la D-glucosa y el ácido cítrico, que son fuentes de carbono fácilmente asimilables.

Por su parte Goodwin (1959) encontró que la naturaleza de la fuente de carbono influye en la carotegénesis, es decir, maltosa y glucosa fueron igualmente carotenogénicas en *Phycomyces blakesleeanus*, xilosa y fructosa al igual que maltosa y glucosa soportaron buen crecimiento pero resultaron ser sustratos menos eficientes para la carotenogénesis.

Alcantara (1995) encontró que *Flavobacterium* sp presenta la característica de utilizar la glucosa como fuente de carbono a concentraciones menores de 80 mg/ml, ya que a concentraciones mayores ejerció un efecto negativo sobre la síntesis del pigmento. La concentración óptima de este carbohidrato para la producción de zeaxantina fue de 8 mg/ml. Además dicha bacteria presentó la característica de utilizar los aminoácidos asparagina o glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, siempre y cuando estén presentes los iones azufre y magnesio. Las respuestas en el crecimiento celular y la producción de zeaxantina se ven mejoradas cuando se adiciona glucosa al medio de cultivo. El piruvato o los ácidos tricarbóxicos en una concentración de 10mM, en presencia de glucosa, sustituyeron a la asparagina del medio de cultivo. La glucosa logró eliminarla del medio de cultivo al manejar concentraciones de citrato, piruvato y succinato de 55 mM ya que permitieron alcanzar respuestas similares en crecimiento celular y producción de pigmento al utilizar una combinación de glucosa -citrato 55mM-10mM.

### 1.3b. EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO.

En sistemas microbianos fijos la naturaleza del anión ligado al amonio fue importante para la carotenogénesis. Así el fosfato, el sulfato y el cloruro de amonio inhibieron la síntesis, pero el nitrato, el bicarbonato, el acetato y el succinato de amonio no fueron inhibidores.

Orange y Monclair (1961) reportaron que para la familia *Dacrymycetaceae* la mejor fuente de nitrógeno para la síntesis de carotenos fueron los aminoácidos.

Chichester y col. (1959) reportaron que en *Phycomyces blakesleeanus* la leucina y la valina resultaron inductores de la síntesis de carotenoides. Por su parte Ruddat y Garber (1983) observaron que el extracto de levadura, como fuente de nitrógeno, estimuló la carotenogénesis en este mismo hongo.

### 1.3c. EFECTO DE LA LUZ.

Una alta intensidad de luz favoreció la síntesis de carotenoides coloridos en el micelio de hongos ( Bramley y Mackenzie, 1992 ). La fotorregulación de la biosíntesis de carotenoides ha sido reportada en por lo menos 15 especies de hongos ( Rau, W. 1983). En algunos casos la luz incrementa el contenido de carotenoides coloridos en el micelio.

La cinética de fotorregulación en hongos sigue 2 etapas: la primera dependiente de la luz, pero independiente de la temperatura la cual es de duración corta (fase de luz). La segunda es una etapa independiente de la luz durante la cual la biosíntesis de carotenoides se lleva a cabo (reacción oscura).

Las enzimas que catalizan la conversión de PPPP a  $\beta$ -caroteno están ausentes cuando las células se crecen en la oscuridad y son fotoinducibles. La HMG.CoA reductasa es fotorregulada en *Rhodotorula minuta*, pero las enzimas que convierten fitueno a carotenoides coloridos no son fotoinducibles en levaduras (Tada, M.H and col. 1982).

Existen efectos de fotorregulación a nivel transcripcional, un ejemplo es *Fusarium aquaeductuum* (Rau, W. 1983). La desrepresión de la transcripción del gen carotenoides en *Neurospora crassa* es controlada por la concentración intracelular de cAMP. La luz causa un decremento en los niveles de cAMP lo cual elimina la represión del gen carotenoides. (Kritsky, M.S. and Col 1982).

#### 1.3d. EFECTO DEL O<sub>2</sub>.

La síntesis es controlada por el estado de oxidación del acarreador de electrones en el sistema celular. Cuando el acarreador se encuentra en su estado reducido la síntesis de pigmentos procede activamente, el acarreador se oxida por la introducción de OH proveniente del agua y por incrementos en la intensidad de la luz, llegando a un estado de oxidación crítica que detiene la síntesis. ( Britton y Goodwin, 1971). La intensidad de la oxigenación influye de manera significativa en la apariencia y la proporción de los carotenoides sintetizados.

#### 1.4. ZEAXANTINA.

La zeaxantina (3,3-dihidroxi- $\beta$ -caroteno) es una xantofila de color amarillo, con peso molecular de 568; es soluble en acetona, cloroformo, éter de petróleo y etanol. Su estructura se presenta en la figura. 1.4.

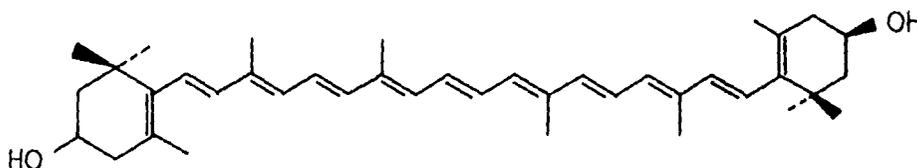


FIG.1. 4.-Estructura de la zeaxantina.

#### 1.4a. OBTENCION Y USOS.

La zeaxantina es un pigmento amarillo ampliamente distribuido en la naturaleza. Se ha obtenido de el maíz, de la alfalfa, de la flor de cempasúchil y yema de huevo ( Nelis y De leenher, 1991 ). Por otro lado se ha encontrado en la grasa y en el hígado humanos. También se ha encontrado en microorganismos como las cianobacterias y algunas bacterias no fotosintéticas (Peppler y Perlmann 1979 ).

En cuanto a su poder pigmentante es dos veces mayor que el de la luteína. Hoy en día la única fuente comercial de este pigmento es la flor de caléndula (flor de cempasúchil) que sin embargo la produce en muy baja concentración (5% base seca) No obstante, esta flor es empleada debido a que posee una buena proporción de luteína (75% base seca). Otras fuentes naturales de pigmentos estan representadas por los sistemas microbianos, el género *Flavobacterium* que representa a las bacterias de color amarillo (Bergey's, 1980) es de especial interés por su elevado porcentaje de zaexantina intracelular que produce. Por ejemplo en el *Flavobacterium* RI560, el 95% de sus carotenoides corresponde a esta xantofila ( Britton y Goodwin,1971)

La zeaxantina es empleada a nivel industrial en la formulación de alimentos para aves, cerdos y peces; en los primeros para mejorar el color de la yema del huevo y de la piel y en los peces y cerdos para pigmentar la piel (Nelis y De Leenheer, 1991)

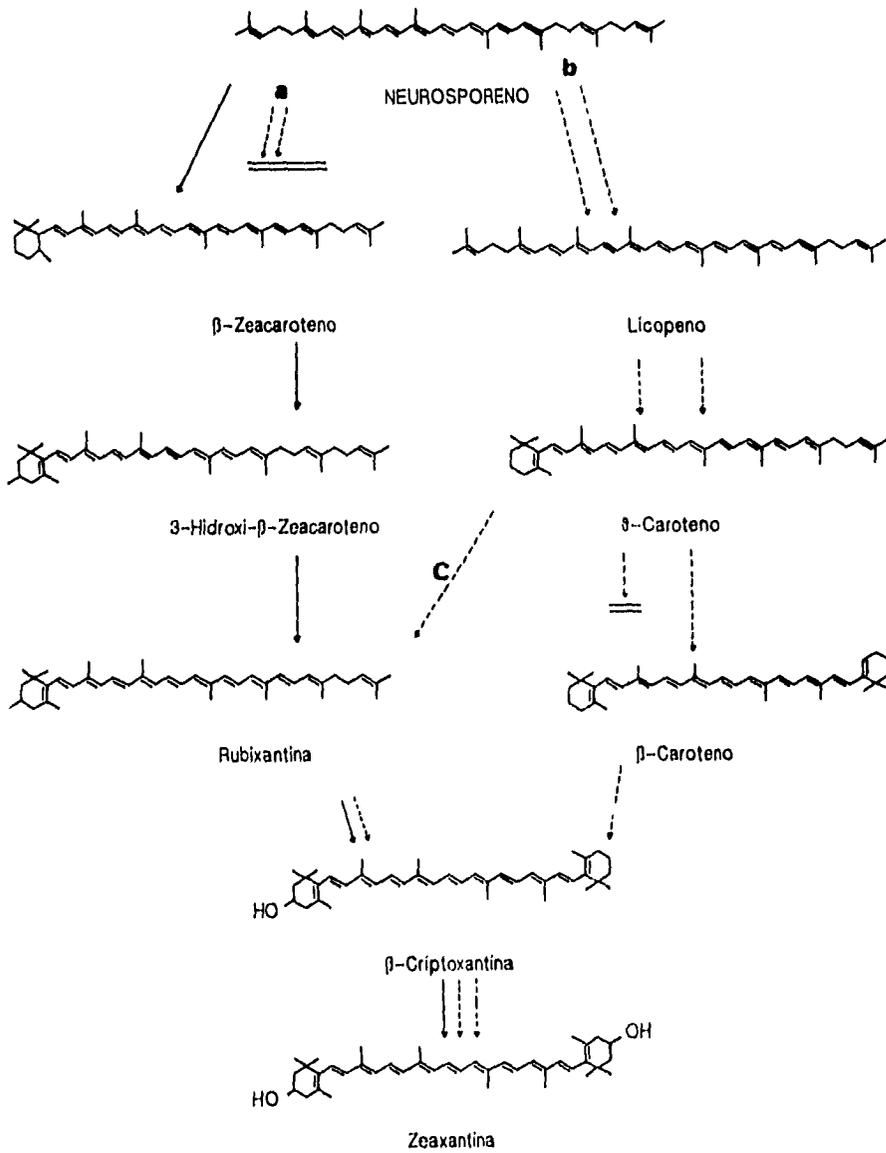
#### 1.4b. BIOSINTESIS.

Britton y Goodwin (1971) utilizaron la cepa de *Flavobacterium* R 1560, bacteria gram negativa que incorpora eficientemente ácido mevolónico para sintetizar carotenoides, para elucidar la ruta de biosíntesis de xantofilas. De esta manera se estableció que : 1) los grupos hidroxilos se introducen hasta después de la ciclización 2) se necesita la presencia de oxígeno, y 3) el licopeno es el precursor inmediato de los carotenoides ciclicos.

MaeDermott y col. (1973, 1974) han propuesto tres rutas alternativas para la biosíntesis de zeaxantina: a) vía  $\beta$ -zeacaroteno; b) vía  $\beta$ -caroteno; y c) vía licopeno rubixantina (Figura. 1.5).

La ruta (a) representa la principal vía de síntesis de zeaxantina, en la cual el neurosporeno se cicliza dando lugar a la formación de  $\beta$ -zeacaroteno, el cual se hidroxila a 3-hidroxi- $\beta$ -zeacaroteno, que después se desatura y se convierte en rubixantina. Por último la rubixantina se cicliza y se hidroxila para producir  $\beta$ -criptoxantina y zeaxantina.

La conversión de neurosporeno a  $\beta$ -zeacaroteno se inhibe en altas concentraciones de nicotina en el medio. Se presenta por ello una ruta alterna de síntesis (ruta b). En ella primeramente el licopeno se cicliza para formar  $\delta$ -caroteno el cual produce  $\beta$ -caroteno que finalmente se hidroxila generando zeaxantina. La ruta (c) se presenta cuando se inhibe la conversión de  $\delta$ -caroteno a  $\beta$ -caroteno por la acción de bajas concentraciones de nicotina. Este inhibidor impide la ciclización del  $\delta$ -caroteno formando entonces rubixantina y finalmente zeaxantina.



**Figura 1.5. BIOSINTESIS DE ZEAXANTINA.**  
 Ruta (a) via β-zeacaroteno, ruta (b) via β-caroteno y (c) ruta via licopeno y rubixantina.  
**FUENTE:** McDermott, C; Britton, G and Goodwin, W (1973).

## **1.5 OPTIMIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO EN FERMENTACIONES.**

Un problema que se presenta con frecuencia en el campo de la fermentación es el del incremento en la productividad. En general podemos considerar que el medio de cultivo disponible proviene de dos fuentes, como parte de la adquisición de una patente extranjera o de su desarrollo parcial o total por la compañía.

Muchas veces se ignora el porqué de los porcentajes de los diversos componentes del medio, pudiéndose dar el caso en que uno o varios constituyentes del medio sean superfluos, porque las condiciones de operación no siempre son las óptimas ó porque el desarrollo se ha efectuado por procedimientos empíricos de ensayo y error.

En ambos casos es altamente probable que el medio de cultivo original pueda optimizarse, esta es, modificando los porcentajes de algunos componentes, obteniendo un medio de cultivo que proporcione mayores rendimientos en la producción.

Haciendo uso de combinaciones entre los cambios en los porcentajes de los ingredientes del medio de cultivo, es factible optimizar un medio, haciéndolo más productivo. Además si durante la optimización se eliminan nutrimentos por no ser importantes para la producción, los costos se pueden reducir.

Para alcanzar tales objetivos, es necesario hacer uso de métodos estadísticos, como son los diseños factoriales a dos niveles que nos permiten determinar los efectos de las variables sobre la respuesta de interés. El algoritmo de Yates permite calcular los mismos efectos pero de una manera más rápida, y el método de Box-Wilson nos permite saber qué tanto aumentar o disminuir las variables para obtener una mejor respuesta.

## **II. ANTECEDENTES.**

En 1929 Karrer, Salomon y Wehrli aislaron una nueva fitoxantina del maíz, a la que llamaron zeaxantina. De 1931 a 1932 Karrer y sus colaboradores determinaron la constitución química de la zeaxantina.

Algunas plantas contienen zeaxantina como principal pigmento como son el maíz y las hojas de *ficus*.

Karrer y Solmsen llevaron a cabo la formación de la zeaxantina a partir de otro carotenoide con 40 átomos de carbono llamado rodoxantina por reducción con isopropóxido de aluminio, representando la primera síntesis parcial de un carotenoide de 40 carbonos.

Los Microorganismos del género *Flavobacterium* se caracterizan por la producción de pigmentos amarillos. En algunas especies estos pigmentos presumen ser de naturaleza carotenoide. Algunas cepas capaces de producir carotenoides son: *F. sp* 21588, *F. sp* 21081, *F. balustinum* y *F. aquatile*, variando la capacidad de producción de pigmentos entre ellos y afectándose directamente el perfil de carotenoides por los componentes del medio de cultivo (Bergey's 1980).

Se han realizado fermentaciones con cepas del género *Flavobacterium* obteniendo pigmentos amarillos que se usan para la pigmentación de alimentos de consumo humano y animal, así como en procesos industriales, un ejemplo de ello es la compañía de alimentos Nestlé que reporta la producción de zeaxantina por algunas flavobacterias en algunos medios patentados por ella misma (Dasek y.col.,1973).

La evaluación de diferentes cepas de *Flavobacterium* ha demostrado la importancia de la composición del medio de cultivo y las condiciones de incubación para obtener cantidades apreciables del pigmento. Díaz (1995), tomando como medio base el patente de Nestlé, evaluó la influencia de la glucosa como fuente de carbono, extracto

de levadura, triptona y licor de maíz como fuente de nitrógeno así como la influencia del ión magnesio sobre la capacidad de producción de carotenoides totales por *Flavobacterium* sp 21588. Encontró que concentraciones mayores y menores al 2% de glucosa, reducen tanto el crecimiento como la producción, logrando producciones de pigmento que van de 2.5 a 3.2 µg/ml.

Posteriormente al evaluar diferentes fuentes de nitrógeno orgánicas, observó que las mejores producciones (5.3 µg/ml y 4.5 ml/µg) se obtuvieron cuando el extracto de levadura y la triptona se eliminaron del medio de cultivo respectivamente. El licor de maíz al 1% (v/v) permitió obtener las mejores producciones (3.2 µg/ml), su presencia en el medio se consideró necesaria ya que las producciones bajaron mucho en su ausencia con respecto a las obtenidas cuando se encontraba.

El efecto del ión magnesio se evaluó porque al parecer su ausencia en el medio de cultivo inhibió el crecimiento del microorganismo y por lo tanto no hubo producción de pigmentos. Se utilizaron sulfato de magnesio y cloruro de magnesio al 1.5% cada uno, encontrando que efectivamente el ión magnesio favoreció la síntesis de carotenoides, pero la producción fue mayor cuando se usó cloruro de magnesio, en lugar del sulfato de magnesio reportado en la patente de la compañía Nestlé.

Así mismo la influencia de factores físicos ha sido establecida en la producción del pigmento. Estudios en *Flavobacterium dehydrogenans* (una bacteria que produce un pigmento amarillo denominado R439), demostraron que para la síntesis de este carotenoide es indispensable la presencia de luz y oxígeno, ya que la producción específica de este compuesto se incrementa cuando ambas se utilizan (Weeks y Garner, 1967; Weeks y Andrewes, 1969).

En base a lo anterior, pareció interesante evaluar la capacidad de producción del pigmento zeaxantina en diversas cepas del género *Flavobacterium*. Una vez seleccionada la mejor cepa, realizar estudios de optimización del medio reportado por Díaz (1995).

## MICROORGANISMOS DE ESTUDIO

El género *Flavobacterium* ( bacteria amarilla ), es una bacteria Gram negativa que produce un pigmento característico supuestamente de naturaleza carotenoide, que puede ser amarillo, anaranjado, rojo, o café amarillento, lo cual depende del medio nutritivo en que se crezca el microorganismo y de la temperatura de incubación. Comúnmente estos microorganismos son proteolíticos, con baja capacidad para fermentar los carbohidratos y sus requerimientos nutricionales no son complejos. Las colonias típicas son amarillas translúcidas, planas y enteras, ocasionalmente opacas. su temperatura de incubación preferentemente es abajo de 30 °C. Se localizan en el suelo, aguas frescas y marinas, siendo aerobios o anaerobios facultativos.

Los microorganismos de estudio y medios de propagación de los mismos, reportados por la American Type Culture Collection se muestran a continuación:

MICROORGANISMO	MEDIO ATCC
* <i>Flavobacterium balustinum</i> ———	agar nutritivo.
* <i>Flavobacterium aquatile</i> ———	caseinato de sodio.
* <i>Flavobacterium sp 21588</i> ———	YTN.
* <i>Flavobacterium sp 21081</i> ———	GTYE

*Flavobacterium sp*: Es anaerobio facultativo, que presenta su crecimiento máximo a las 36 hrs de incubación a 29° C. No utiliza la glucosa como principal fuente de carbono, sino que requiere de aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno para crecer y producir pigmento en concentraciones aceptables. El ión Mg<sup>++</sup> es determinante para el crecimiento y la síntesis de pigmentos en este microorganismo.

### **III . OBJETIVOS:**

#### **◊ OBJETIVO GENERAL.**

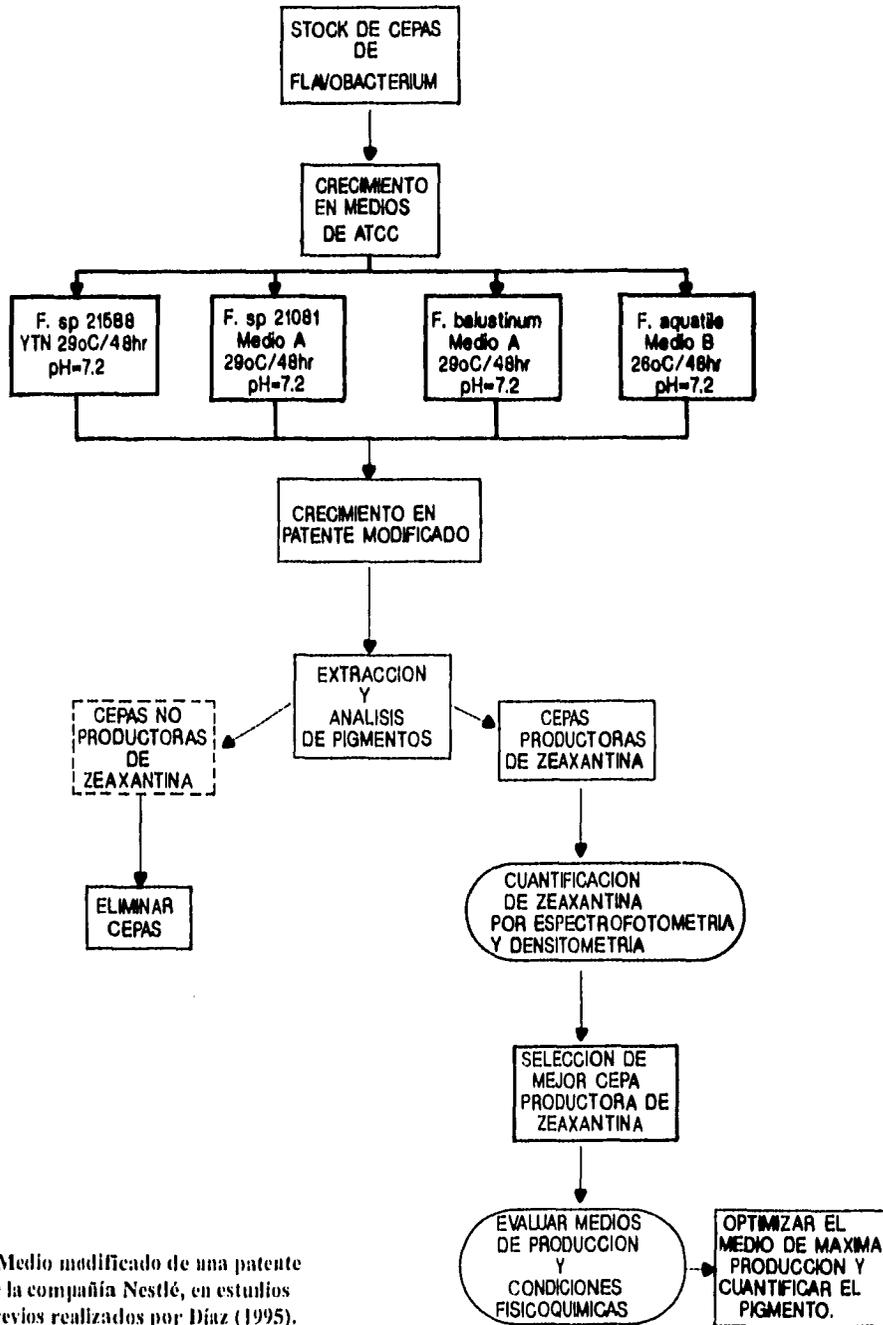
**Selección de una cepa productora de zeaxantina y optimización del medio de producción.**

#### **◊ OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

- 1. Evaluar diferentes cepas del género *Flavobacterium* para la producción de zeaxantina.**
- 2. Seleccionar la mejor cepa productora de zeaxantina.**
- 3. Optimizar las condiciones fisicoquímicas determinantes de la producción de zeaxantina.**
- 4. Optimizar el medio de producción de zeaxantina utilizando métodos estadísticos.**

## ESTRATEGIA

### IV. EVALUACION DE LAS DIFERENTES CEPAS DE *Flavobacterium* PARA SELECCIONAR LA MEJOR PRODUCTORA DE ZEAXANTINA



\* Medio modificado de una patente de la compañía Nestlé, en estudios previos realizados por Díaz (1995).

## **V. MATERIAL Y METODOS:**

### **5.1.-REACTIVOS.**

**5.1a. ANALITICOS.** Acido bórico, carbonato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso , cloruro de cobre, cloruro de zinc, fosfato monobásico y dibásico de potasio, glucosa, molibdato de sodio, sulfato de fierro, sulfato de cobre, y tartrato doble de sodio y potasio se obtuvieron de J.T. Baker de México, S.A.

Extracto de levadura, hidróxido de sodio se obtuvieron de Merck de México S.A.

Peptona, triptona y agar de DIFCO Laboratorios de Estados Unidos.

Caseinato de sodio de Quimica Barsa de México S.A.

**5.1b. INDUSTRIALES:** Aceite de maíz Wesson elaborado por Wesson Foods U.S.A.

Licor de maíz (Nutriferm) y dextrosa monohidratada fueron obsequiados por Arancia Comercial S.A de C.V.

Cloruro de magnesio se adquirió de la Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.

### **5.2. MICROORGANISMOS.**

Las cepas utilizadas fueron:

\* *Flavobacterium* sp ATCC 21081.

\* *Flavobacterium* sp ATCC 21588.

\* *Flavobacterium aquatile* ATCC 11947.

\* *Flavobacterium balustinum* ATCC 33487.

Obtenidos de la American Type Culture Collection.

### 5.3. MEDIOS DE CULTIVO :

A) Para mantenimiento y propagación se utilizaron los medios reportados en el Catalogue of Bacteria and Bacteriophages ATCC (1982) para cada microorganismo.

*Flavobacterium* sp 21588.

YTN: triptona 1%, extracto levadura 1%, glucosa 0.1%, NaCl 0.1% elementos traza y en el caso de cultivos sólidos agar 1.5%.

*Flavobacterium* sp 21081 y *Flavobacterium balustinum*.

MEDIO A: Ext.lev. 1%, peptona 2%, glucosa 1%.

*Flavobacterium aquatile*.

MEDIO B: Caseinato de sodio 0.2%, ext. de levadura 0.05%, peptona 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%.

#### 5.3a. CONDICIONES DE CULTIVO :

Se emplearon matraces Erlenmeyer de 250ml con 50 ml de medio a pH de 7.2, y 26 °C de temperatura para *F. aquatile* y *F. sp 21081*. Para *F.sp 21588* y *F. balustinum* se utilizaron de temperatura 29°C y un tiempo de fermentación de 72 h a 180 rpm de agitación.

B) Para producción de pigmentos:

Para la optimización del medio de producción se partió de un medio patentado por la compañía Nestlé ( Patente 790,289, 1973, J. Dasek ), con modificaciones realizadas por estudios previos a la optimización ( Díaz, 1995, en proceso de elaboración ).

La composición del medio Patente Nestlé (PN) : triptona 0.8%, extracto de levadura 1.8%, glucosa 7%, licor de maíz 1.6%, aceite de maíz 0.08%,  $MgSO_4$  0.5% y agar 1.5%. (para medio sólido), el cual se modificó como sigue:

Medio Patente Modificado (PM): triptona 0.8%, ext. lev. 1.8%, \* glucosa 2%, licor maíz 1.6%, aceite de maíz 0.08% y \*  $MgCl_2$  1.5% .<sup>1</sup>

\* Reactivos modificados.

La optimización se realizó en un medio sin triptona y extracto de levadura el cual se identificó como:

Medio sin triptona/ext. lev.(STYE): \* glucosa 2%, licor maíz 1.6%, aceite de maíz 0.08% y \*  $MgCl_2$  1.5%.

#### 5.3b. CONDICIONES DE CULTIVO:

Matraces Erlenmeyer bafleados de 250 ml, con 100, 50, y 25 ml de medio para ver influencia de la oxigenación sobre la producción, pH=7.2 y 6.5, T= 29°C con 120h de fermentación a 180 rpm.

El pH inicial de los medios se ajustó con hidróxido de sodio 0.1N, antes de esterilizarlos durante 20 min a 120°C . La glucosa se esterilizó por separado para evitar su caramelización.

#### 5.4. INOCULO:

A partir de un "stock", el microorganismo se creció por 48 h en cajas de petri con YTN. Posteriormente se rasparon las cajas y las células se resuspendieron en solución salina hasta obtener una densidad óptica de 0.3 . Se sembraron las diferentes condiciones a evaluar con el 5% de volumen del inóculo correspondiente al volumen total de la muestra.

---

<sup>1</sup> \* Reactivos grado analítico que se sustituyeron por grado industrial, quedando un medio grado industrial completamente.

### **5.5.FERMENTACION:**

Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer bafleados de 250 ml, con 50ml de medio al principio y con 25ml al final al encontrarse que con menor volumen de llenado se favorece la producción de zeaxantina. El medio de partida fue el PM al que se le fueron eliminando nutrientes para posteriormente optimizar los más importantes, para la producción del pigmento. En todos los experimentos los matraces se inocularon con el 5% v/v, a excepción de los experimentos del efecto de la concentración del inóculo en la producción, que se inocularon con 3%, 5% y 7%.

### **METODOS ANALITICOS:**

#### **5.6. CUANTIFICACION DE CRECIMIENTO:**

##### **FUNDAMENTO:**

El crecimiento se estimó cuantificando proteína por el método de Lowry (1951) que tiene como base la formación de un complejo colorido entre el grupo fenólico ( ó el grupo aromático en el caso de triptofano, histidina y fenilalanina ) de la tirosina de las proteínas y el ácido fosfotúngstico-molibdico (color oro) que oxida al grupo hidroxilo de la tirosina en condiciones alcalinas dando un color azul intenso que se mide a una longitud de onda de 595 nm, utilizando un espectrofotómetro Bausch and Lomb E-21.

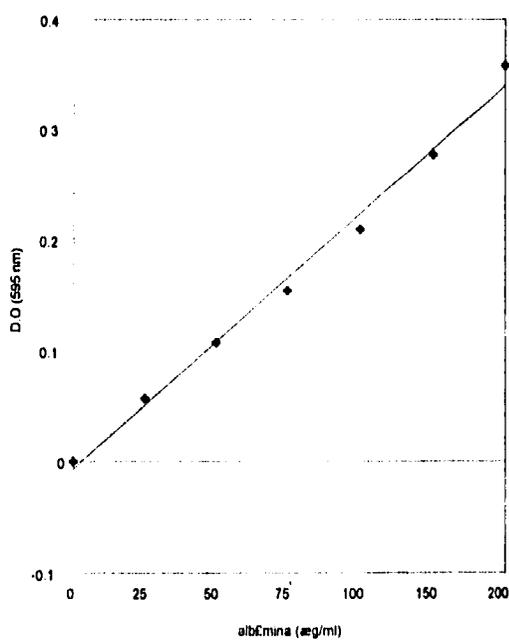
##### **Tratamiento de la muestra:**

- 1)Centrifugar la muestra a 6500 rpm 15min guardar sobrenadante para pH.
- 2)Resuspender con 2 ml de TCA al 5%, agitar 5 min.
- 3)Centrifugar a 7500 rpm, 10 min.
- 4)Tirar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de NaOH 0.4 N.

**5.6a. METODO DE LOWRY:**

- 1) 1 ml de muestra (variando la fracción alícuota aforando a 1 ml)
- 2) Resuspender con 2 ml de TCA al 5%, agitar 20 seg.
- 3) Centrifugar a 7500 rpm, 10 min.
- 4) Agregar 0.5 ml de sol. de Folín, diluida 1:3.
- 5) Agitar y reposar 30 min.
- 6) Leer a 595 nm.

La concentración de proteína se determina por comparación con una curva estándar de albúmina sérica bovina (figura 5.1).



**Figura 5.1. CURVA PATRÓN DE CONCENTRACION DE ALBUMINA VS D.O PARA LA DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR.**

## **5.7. METODOS DE EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE PIGMENTOS:**

La extracción del pigmento se efectuó por la técnica reportada por Britton (1985).

- 1) 2 ml de muestra del cultivo en matraz, centrifugar a 7 500 rpm por 15 min.
- 2) Separar sobrenadante.
- 3) Resuspender el pellet en 4 g de perlas de vidrio.
- 4) Agregar 2 ml de acetona pura y agitar 1 min. con vortex.
- 5) Agregar 2 ml de dietil éter -éter de petróleo 1:1 y agitar 10 seg.
- 6) Agregar agua destilada y agitar 10 seg.
- 7) Centrifugar a 5,000 rpm. por 7 min y extraer fase etérea o epifase con pipeta Pasteur
- 8) Dejar secar fase oleosa 24 hrs. (proteger de la luz)
- 9) Resuspender el pigmento con 2.5 ml de etanol absoluto.
- 10) Leer a 450 nm. (en alta) en un espectrofotómetro utilizando el coeficiente de extinción de 2549 (1%, 1cm).

### **NOTA:**

Como las muestras presentaban cierta degradación al dejarlas secar se decidió leerlas inmediatamente después de su extracción resuspendiendo en eter de petróleo utilizando un coeficiente de extinción de 2348 (1%,1cm).

El cálculo de la concentración del pigmento se realizó aplicando la siguiente fórmula propuesta por Britton y Goodwin (1985):

$$\mu\text{g de carotenoides} = \frac{(A)(y)(10^6)}{(A_{1\text{cm}})(100)}$$

Donde:

**A** = absorbancia de la muestra

**y** = volumen del extracto en ml

**10<sup>6</sup>** = constante para expresar los carotenoides en  $\mu\text{g}$

**A<sub>1cm</sub>** = coeficiente de extinción específico para zeaxantina

**100** = constante para eliminar el factor de porcentaje.

### 5.8. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC):

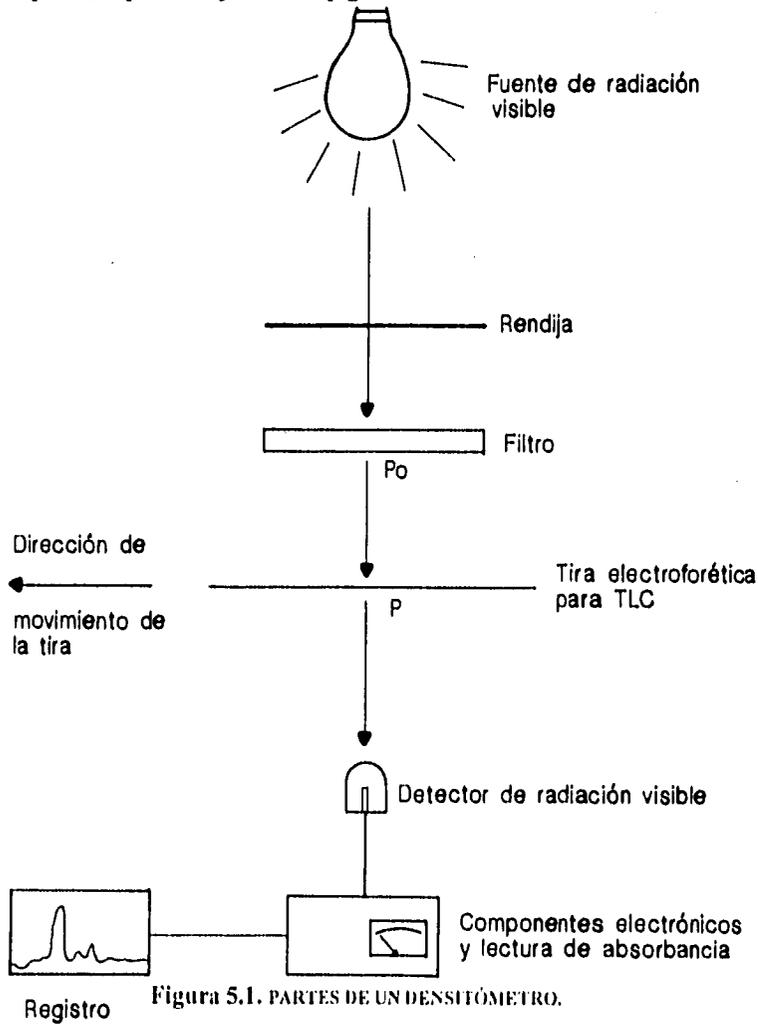
La técnica de cromatografía en capa fina (TLC) se utilizó para la separación de la zeaxantina de los otros pigmentos producidos por las flavobacterias y así poder cuantificarla por medio de un densitómetro marca CAMAG que dependiendo de la intensidad de las manchas determina la concentración de las muestras, utilizando un estándar puro de zeaxantina proporcionado por Hoffman Le Roche como patrón de referencia. Otros estándares utilizados fueron el de  $\beta$ -caroteno proporcionado por la misma compañía y la oleoresina de flor de caléndula (flor de empasúchitl) que nos permitieran conocer qué otros pigmentos son sintetizados por las flavobacterias.

Las cromatografías se realizaron sobre placas de sílica gel 60 (Kieselgel DC-alufolien sin indicador fluorescente) de 10 x 20 cm x 0.2 mm.

El desarrollo de las cromatografías se realizó con una mezcla de diclorometano:acetato de etilo (80:20), en una cámara sobresaturada.

### 5.9. CUANTIFICACION DE ZEAXANTINA POR DENSITOMETRIA:

La cuantificación de zeaxantina se llevó a cabo con un densitómetro marca CAMAG TLC SCANNER II que tiene un mecanismo para montar y mover una placa cromatográfica a través de un haz de luz. Se miden las absorbancias de las distintas regiones de la placa. Si se acopla un registrador, se obtiene una gráfica de absorbancia frente a la posición de la placa (FIG. 5.1). El área bajo los distintos picos es proporcional a la cantidad de pigmento presente, la cual se determina utilizando estandares puros, específicos para cada pigmento.



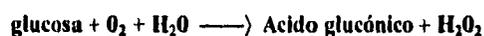
### 5.10. CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA RESIDUAL:

La glucosa residual se cuantificó utilizando el paquete para diagnóstico enzimático de glucosa en suero GOD-PAD.

#### FUNDAMENTO:

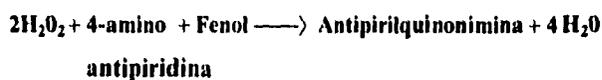
La glucosa oxidasa (GOD)( $\beta$ -D-glucosa:oxígeno-1-oxidoreductasa) cataliza la oxidación de la glucosa.

#### GOD



El peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-amino antipiridina y fenol en presencia de peroxidasa (PAD) a través de una reacción oxidativa de acoplamiento formando una antipirilquinonimina roja cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra analizada.

#### PAD



- 1) Disolver el contenido de reactivo No. 1 en 200 ml. de agua destilada
- 2) Añadir el contenido de un frasco No. 2. Mezclar suavemente y conservar a 4° C.
- 3) Marcar 3 tubos con M ( muestra), P (patrón) y B ( blanco) y proceder como sigue:

	BIANCO	PATRON	MUESTRA
AGUA DESTILADA	0.025	***	***
PATRON	***	0.025	***
MUESTRA	***	***	0.025
MEZCLA DE REACCION	2.5	2.5	2.5

- 4) Mezclar e incubar 25 minutos a 20°C. Evitar la luz directa del sol.
- 5) Determinar las absorbancias a 510 nm durante los 15 minutos posteriores a la incubación.

## **CALCULOS:**

$$\text{GLUCOSA (mg/ml)} = \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del patrón}}$$

### **5.11. DETERMINACION DE AMONIO:**

Se determinó por el método de Berthelot ( Neatherburn, 1967 )

Para preparar un litro de cada solución.

**Solución A:)** Pesar 20 g de fenol y disolver en agua, agregar inmediatamente 50 mg de nitroprusiato de sodio. Guardar en frasco ámbar a 4°C.

**Solución B:** Pesar 5 g de NaOH y disolver en agua, agregar 8.4 ml de hipoclorito de sodio al 5.6%.

#### **METODOLOGIA:**

- 1) Diluir las muestras hasta una concentración menor a 10 mM.
- 2) Poner alicuotas de 50 µl en tubos de 5 ml.
- 3) Agregar 5 ml de sol. A y agitar.
- 4) Agregar 2.5 ml de sol. B y agitar.
- 5) Dejar reaccionar 30min a temperatura ambiente ( sin luz )
- 6) Leer a 625 nm.

#### **5.11a. CURVA ESTANDAR DE AMONIO.**

La cuantificación de amonio residual se determina por comparación con una curva estándar de cloruro de amonio 0.1 M, realizando diluciones de 0.5, 1, 1.5, 2.5 y 5 mM. (figura 4.2). Las absorbancias de las muestras se extrapolan en la curva y considerando el factor de dilución se calcula la concentración.

## **CALCULOS:**

$$\text{GLUCOSA (mg/ml)} = \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del patrón}}$$

### **5.11. DETERMINACION DE AMONIO:**

Se determinó por el método de Berthelot ( Neatherburn, 1967 )

Para preparar un litro de cada solución.

**Solución A):** Pesar 20 g de fenol y disolver en agua, agregar inmediatamente 50 mg de nitroprusiato de sodio. Guardar en frasco ámbar a 4°C.

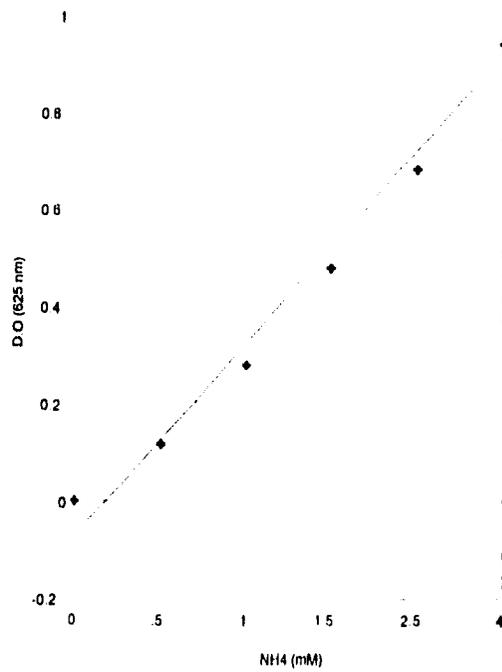
**Solución B:** Pesar 5 g de NaOH y disolver en agua, agregar 8.4 ml de hipoclorito de sodio al 5.6%.

#### **METODOLOGIA:**

- 1) Diluir las muestras hasta una concentración menor a 10 mM.
- 2) Poner alícuotas de 50 µl en tubos de 5 ml.
- 3) Agregar 5 ml de sol. A y agitar.
- 4) Agregar 2.5 ml de sol. B y agitar.
- 5) Dejar reaccionar 30min a temperatura ambiente ( sin luz )
- 6) Leer a 625 nm.

#### **5.11a. CURVA ESTANDAR DE AMONIO.**

La cuantificación de amonio residual se determina por comparación con una curva estándar de cloruro de amonio 0.1 M, realizando diluciones de 0.5, 1, 1.5, 2.5 y 5 mM. (figura 4.2). Las absorbancias de las muestras se extrapolan en la curva y considerando el factor de dilución se calcula la concentración.



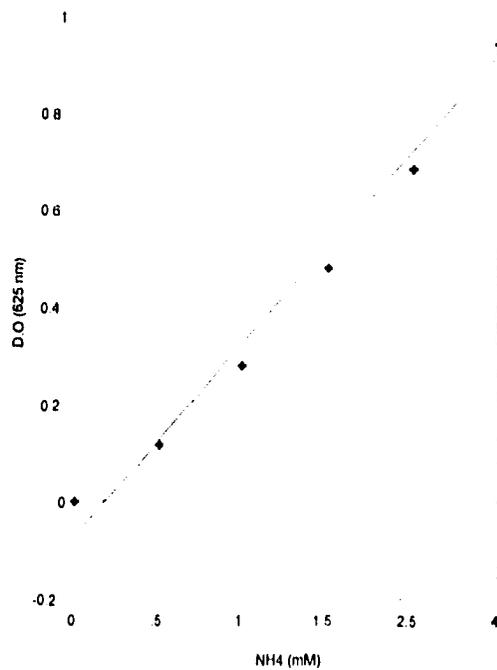
**Figura 5.2. CURVA PATRÓN DE CONCENTRACIÓN DE  $\text{NH}_4^+$  VS D.O PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL.**

#### **5.12. DETERMINACION DEL pH:**

El pH del medio de cultivo fue medido con un potenciómetro digital marca Beckman modelo 3500.

#### **5.13. ANALISIS ESTADISTICO:**

El análisis estadístico se realizó mediante la aplicación de diseños factoriales completos a dos niveles. Cada condición evaluada se realizó por triplicado para reducir errores de variabilidad. Se estableció un coeficiente de variación del 25% como límite máximo por tratarse de sistemas biológicos.



**Figura 5.2.** CURVA PATRÓN DE CONCENTRACIÓN DE NH<sub>4</sub><sup>+</sup> VS D.O PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL.

#### 5.12. DETERMINACION DEL pH:

El pH del medio de cultivo fue medido con un potenciómetro digital marca Beckman modelo 3500.

#### 5.13. ANALISIS ESTADISTICO:

El análisis estadístico se realizó mediante la aplicación de diseños factoriales completos a dos niveles. Cada condición evaluada se realizó por triplicado para reducir errores de variabilidad. Se estableció un coeficiente de variación del 25% como límite máximo por tratarse de sistemas biológicos.

## **VI.-RESULTADOS**

### **6.1. SELECCION DE LA CEPA PRODUCTORA .**

En este trabajo se evaluaron cuatro cepas del género *Flavobacterium*, identificadas como: *Flavobacterium sp 21588*, *Flavobacterium sp 21081*, *Flavobacterium balustinum* y *Flavobacterium aquatile* para seleccionar la mejor productora del pigmento zeaxantina.

Las cuatro cepas se recuperaron de liofilizados, haciéndolas crecer en medios de propagación reportados en el catálogo de la American Type Culture Collection de 1992, para cada especie de flavobacteria. Después de la propagación, se realizaron análisis de los pigmentos generados por cada cepa, utilizando la técnica de cromatografía en capa fina, de manera visual y por comparación de los Rf de las manchas generadas por las distintas bacterias con el Rf del estándar puro de zeaxantina (0.25), se determinó que únicamente *Flavobacterium sp 21588* fue capaz de producir zeaxantina en cantidades apreciables en su respectivo medio de propagación fig.6.1, ya que las otras flavobacterias sintetizaron  $\beta$ -caroteno como principal pigmento.

## **VI.-RESULTADOS**

### **6.1. SELECCION DE LA CEPA PRODUCTORA .**

En este trabajo se evaluaron cuatro cepas del género *Flavobacterium*, identificadas como: *Flavobacterium sp 21588*, *Flavobacterium sp 21081*, *Flavobacterium balustinum* y *Flavobacterium aquatile* para seleccionar la mejor productora del pigmento zeaxantina.

Las cuatro cepas se recuperaron de liofilizados, haciéndolas crecer en medios de propagación reportados en el catálogo de la American Type Culture Collection de 1992, para cada especie de flavobacteria. Después de la propagación, se realizaron análisis de los pigmentos generados por cada cepa, utilizando la técnica de cromatografía en capa fina, de manera visual y por comparación de los Rf de las manchas generadas por las distintas bacterias con el Rf del estándar puro de zeaxantina (0.25), se determinó que únicamente *Flavobacterium sp 21588* fue capaz de producir zeaxantina en cantidades apreciables en su respectivo medio de propagación fig.6.1, ya que las otras flavobacterias sintetizaron  $\beta$ -caroteno como principal pigmento.

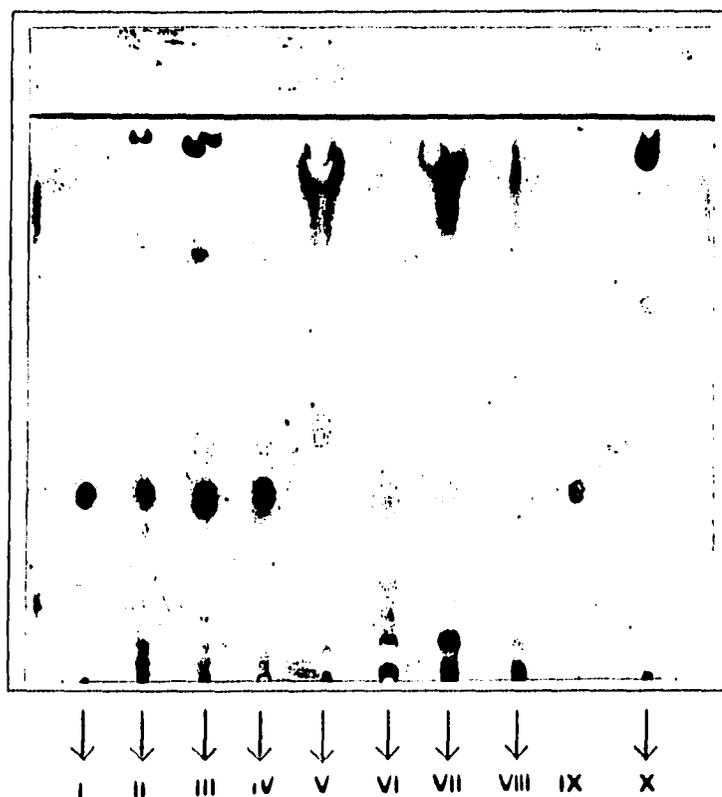


Figura 6.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LOS PIGMENTOS PRODUCIDOS POR 4 ESPECIES DE FLAVOBACTERIAS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

I= *St. zexantina*; II= *Flavobacterium* sp 21588 en medio YTN; III= *Flavobacterium* sp 21588 en medio Patente; IV= *Flavobacterium* sp 21588 en medio STYE; V= *Flavobacterium* sp 21081 en medio PM; VI *Flavobacterium* aquatile en medio PM; VII *Flavobacterium* balustinum en medio A; VIII *Flavobacterium* halnstnum en medio PM.; IX *St. zexantina* y X *St. de β-caroteno*.

Considerando lo anterior se realizó un nuevo análisis de los pigmentos de cada flavobacteria, creciéndolas en el medio a optimizar (medio STYE) y se realizó una cromatografía para corroborar los resultados anteriores. En la fig. 6.2, se observa que efectivamente *Flavobacterium* sp 21588 fue el único capaz de producir zeaxantina al comparar la mancha generada por el estándar con la formada por la cepa anteriormente mencionada. Utilizando un densitómetro marca CAMAG se pudo determinar la concentración real de zeaxantina de las muestras (fig. 6.3). De esta manera se corroboró que efectivamente *Flavobacterium* sp 21588, fue el único capaz de producir zeaxantina en cantidades cuantificables (1.60 µg/ml), con poca acumulación de otros carotenoides.

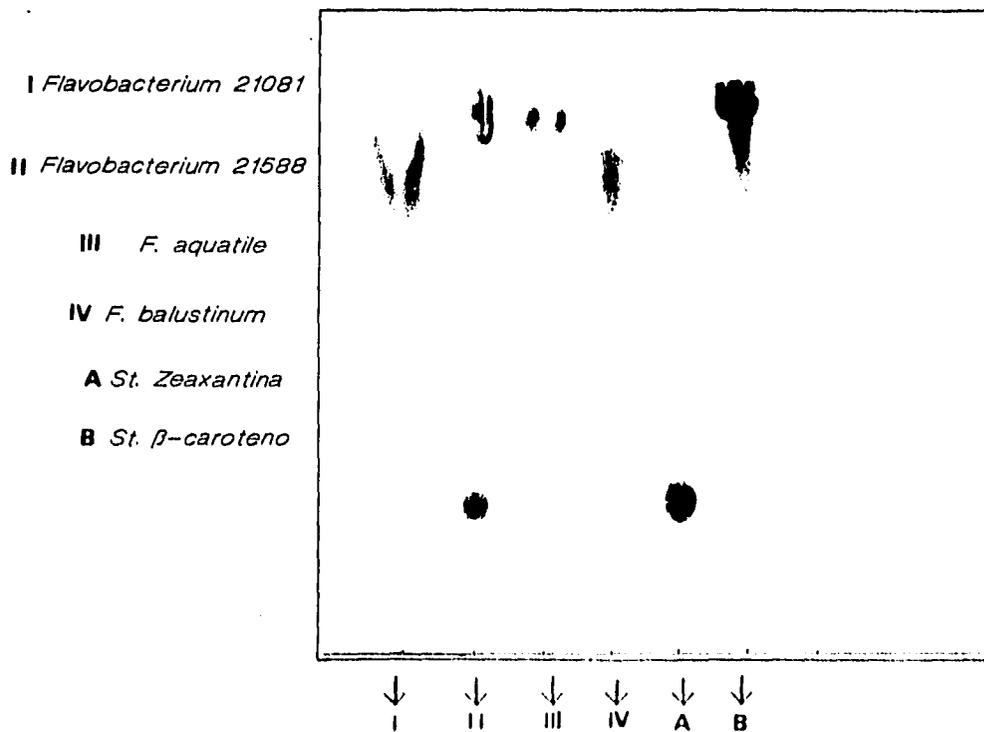


Figura 6.2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LOS CAROTENOIDES PRODUCIDOS POR 4 ESPECIES DE FLAVOBACTERIAS EN MEDIO STYE. Tiempo de fermentación 48 h.

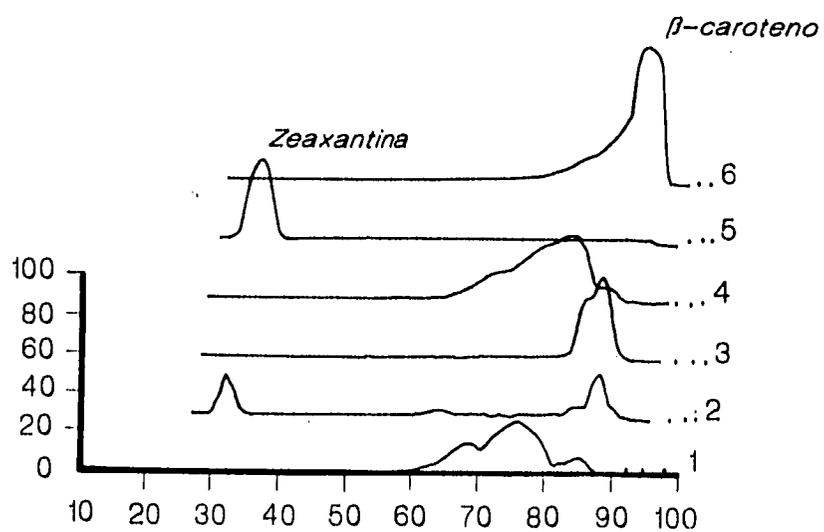


Figura 6.3. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LOS PIGMENTOS PRODUCIDOS POR LAS 4 FLAVOBACTERIAS EN MEDIO STYE CON 48 H DE FERMENTACIÓN.

1 = *F. sp* 21081; 2 = *F. sp* 21588; 3 = *F. aquatile*; 4 = *F. balustinum*; 5 = *St. zeaxantina* (1.36 µg/20µl); 6 = *St. β-caroteno* (19.95 µg/10µl).

Los resultados anteriores permitieron seleccionar a *Flavobacterium sp* 21588 como la mejor opción para incrementar la producción de zeaxantina, por medio de la optimización de un medio modificado del patente Nestlé.

## 6.2. SELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO.

Dado que se contaban con antecedentes en el laboratorio de que el medio modificado de la patente Nestlé (PM) permitía a *Flavobacterium* sp 21588 producir considerables concentraciones de zeaxantina (Díaz, 1995), se eligió dicho medio para iniciar los estudios de optimización, ofreciendo ventajas como su bajo número de nutrientes y además la posibilidad de sustituir los pocos reactivos grado analítico por otros grado industrial, abatiendo con ello costos de producción.

**Tabla 6.1. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE PARTIDA  
(Patente Modificado)**

Ingrediente	%
Aceite de maíz	0.08
*Extracto de levadura	1.8
*Glucosa	2
Licor de maíz	1.6
*MgCl <sub>2</sub>	1.5
*Tryptona	0.8
Agua de la llave c.b.p.	100 ml.

**\* Ingredientes grado analítico ( posteriormente se sustituyeron por grado industrial)**

### **6.3. SELECCION DE LAS CONDICIONES DEL INOCULO.**

Antes de evaluar el efecto de diversos factores y nutrimentos sobre la producción de zeaxantina en el medio a optimizar, se consideró conveniente seleccionar el medio y las condiciones para el crecimiento del inóculo que mayor producción generen del pigmento.

Se probaron como posibles medios de propagación el medio YTN, reportado por F.Hoffmann como adecuado para la producción de zeaxantina y el medio patente sin extracto de levadura y triptona denominado STYE, sobre el cual se llevó a cabo la optimización. Se pretendió usar como medio de inoculación el mismo de producción, con el propósito de crecer al microorganismo desde un principio bajo las mismas condiciones.

Además de la selección del medio, se determinó el tiempo de crecimiento del inóculo y el porcentaje de inóculo necesario para iniciar la fermentación en el medio de producción.

Para seleccionar las mejores condiciones del inóculo se recurrió a un diseño factorial de dos niveles  $2^3$ . El análisis de los datos se realizó por medio del algoritmo de Yates tabla 6.3, el cual nos permitió conocer que variables del inóculo influyen de manera significativa sobre la producción de zeaxantina, los datos generales se muestran en una matriz de diseño (tabla 6.2).

El tiempo de fermentación para el análisis se fijó a las 24 h, ya que la máxima productividad se obtuvo a este tiempo (tabla 6.3).

Por medio del algoritmo de Yates, se pudo calcular la desviación típica de este experimento, obteniendo un valor de la misma de 0.194, la cual permitió determinar qué variables del inóculo afectaban significativamente la producción de zeaxantina. El medio de cultivo y el tiempo de crecimiento del inóculo resultaron ser importantes

para la producción del pigmento. Los signos positivos de las estimaciones de estas variables nos indicaron que el tiempo y el medio a utilizar para el crecimiento del inóculo serían los valores máximos de los mismos, es decir medio YTN con 24 h de crecimiento. Con respecto al porcentaje de inóculo éste no fue de importancia significativa, por lo que se decidió utilizar el 5%, manejado normalmente en el laboratorio en otros estudios sobre *Flavobacterium*.

El efecto de las variables fue de manera individual ya que las interacciones entre las mismas no ejercieron una influencia significativa sobre la respuesta.

Los coeficientes de variación de las distintas condiciones evaluadas fueron menores al 25% permitido para sistemas biológicos, por lo que los resultados obtenidos se consideraron confiables.

**Tabla 6.2. DATOS DE UN DISEÑO FACTORIAL 2<sup>3</sup> PARA LA EVALUACIÓN DEL INOCULO.**

Condición	Tiempo (h)	Concentración (%)	Medio (A o B)	Producción (µg/ml)
	T	C	M	y
<b>a) Unidades originales de variables</b>				
1	12	3	A	1.91
2	12	3	B	2.086
3	12	7	A	1.69
4	12	7	B	2.38
5	24	3	A	2.06
6	24	3	B	2.50
7	24	7	A	2.15
8	24	7	B	2.32
<b>b) Unidades codificadas de variables</b>				
1	-	-	-	1.91
2	-	-	+	2.086
3	-	+	-	1.69
4	-	+	+	2.38
5	+	-	-	2.06
6	+	-	+	2.50
7	+	+	-	2.15
8	+	+	+	2.32
<b>Tiempo (h)</b>		<b>Concentración</b>		<b>Medio</b>
-	+	-	+	-
12	24	3	7	A B

A= Medio STYE

H= Medio YTN.

**Tabla. 6.3. ALGORITMO DE YATES PARA LA EVALUACIÓN DEL INÓCULO.**

N.º Condición	Variables de matriz T C M	Media exp. elemental y (µg/ml)	Estima- ciones	S. típica	Identi- ficación	S. Estandar	C.V.
1	- - -	1.91	2.13	± 0.097	Media	0.341	18
2	- - +	2.08	0.37	± 0.194	M	0.348	16
3	- + -	1.69	0.001	± 0.194	C	0.11	6
4	- + +	2.18	0.060	± 0.194	CM	0.29	12
5	+ - -	2.06	0.242	± 0.194	T	0.29	14
6	+ - +	2.20	-0.067	± 0.194	TM	0.42	24
7	+ + -	2.15	-0.038	± 0.194	TC	0.41	0.46
8	+ + +	2.32	-0.195	± 0.194	TCM	0.39	17
C		2.02				0.66	3

Cálculo de las estimaciones para determinar las mejores condiciones del inóculo por medio del algoritmo de Yates. Donde T es el tiempo de incubación, C es la concentración del medio de propagación, M el medio de cultivo, S la desviación estandar y C.V el coeficiente de variación.

#### 6.4. EFECTO DEL EXTRACTO DE LEVADURA Y TRIPTONA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA.

Como estudios previos a la optimización se evaluó el efecto del extracto de levadura y triptona sobre la producción de zeaxantina por *Flavobacterium* sp 21588, ya que al parecer estos nutrimentos incrementaban la producción de carotenoides totales, pero la concentración real de zeaxantina fue muy baja, al acumularse mayormente β-caroteno (Díaz, 1985).

El efecto de los nutrimentos antes mencionados se corroboró al crecer a *Flavobacterium* sp 21588 en medio PM y en medio STYE. Los resultados obtenidos de este experimento se muestran en las figuras 6.4 y 6.5, observándose un mayor crecimiento y producción volumétrica de carotenoides totales en el medio STYE, pero la producción específica fue mayor en el medio PM, lo cual nos indicó que aunque el crecimiento no fue muy grande en los primeros tiempos (24-48 h.), las producciones

con ese crecimiento resultaron mejores que las alcanzadas en el medio STYE, en el cual la bacteria optó por crecer preferentemente.

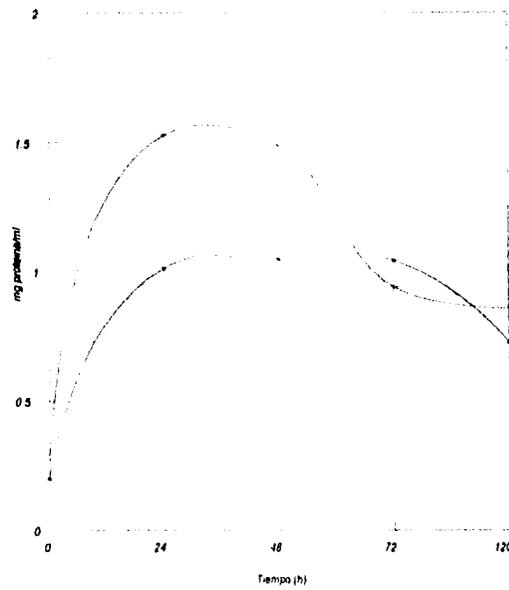
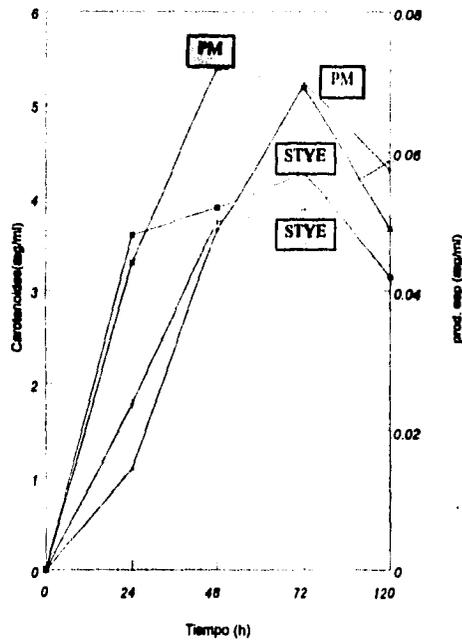


Figura 6.4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Flavobacterium* Sp 21588 EN DOS MEDIOS DE CULTIVO: (●) Patente Modificado y (×) STYE.



**Figura 6.5. PRODUCCIÓN VOLUMÉTRICA Y ESPECÍFICA DE CAROTENOIDES TOTALES.  
POR *Flavobacterium* sp 21588**

- (●) Medio PM producción volumétrica; (×) Medio STYE producción volumétrica.
- (\* ) Medio PM producción específica y (■) Medio STYE producción específica.

El medio PM, resultó ser un mejor medio de producción de carotenoides totales, pero al realizar un análisis cromatográfico de los pigmentos producidos en ambos medios por la flavobacteria fig.6.6, se observó que el incremento de carotenoides totales en el medio PM se debió a la acumulación de  $\beta$ -caroteno, pero la concentración de zeaxantina fue muy baja, en cambio en el medio STYE de la producción de carotenoides totales en casi un 100% correspondió a zeaxantina.

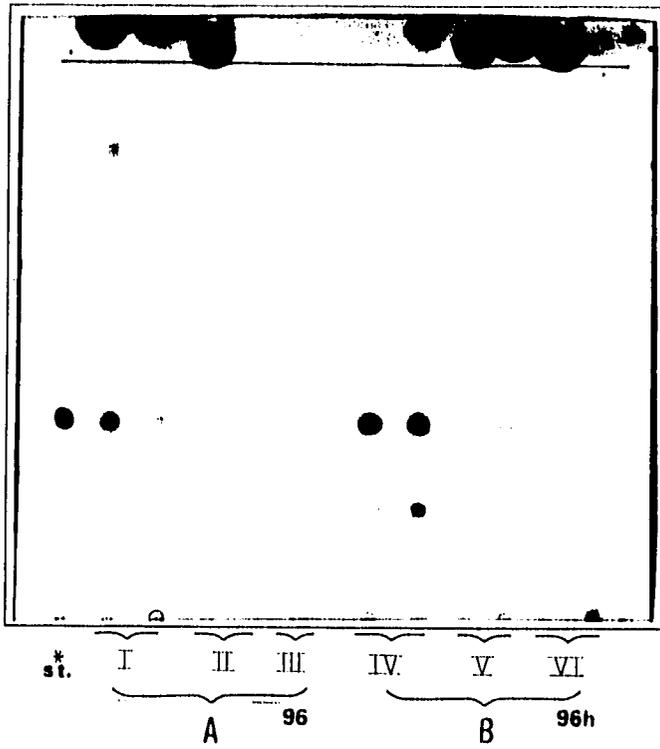


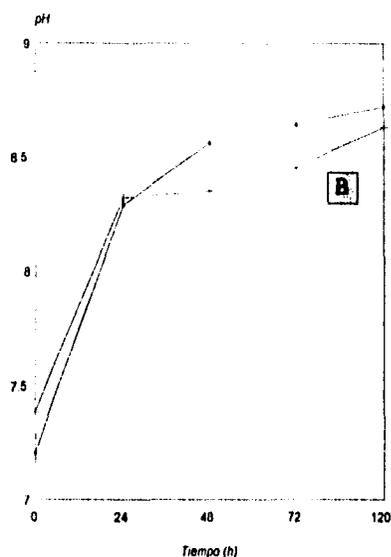
Figura 6.6. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LOS PIGMENTOS PRODUCIDOS POR *Flavobacterium* sp 21588 EN DOS MEDIOS DE CULTIVO.

(A) Patente Modificado y (B) STYE. Tiempo de fermentación 48 y 72 h.

\* St. zeaxantina.

Considerando el objetivo planteado de incrementar la producción de zeaxantina, se decidió realizar la optimización del medio STYE por su baja acumulación de otros pigmentos diferentes a zeaxantina, teniendo así una pureza cercana al 100%.

La evolución de los valores del pH en ambos medios fue muy semejante, siendo ligeramente mayor en el medio PM, manteniéndose en un intervalo de 7-9, lo cual nos indicó que la bacteria requiere un pH muy básico para crecer y producir pigmentos figura 6.7.



**Figura 6.7. VARIACIÓN DEL PH EN DOS MEDIOS DE PRODUCCIÓN POR *Flavobacterium* sp 21588. (●) Patente Modificado y (×) STYE.**

#### **6.5. EFECTO DE LA FRACCIÓN DE LLENADO SOBRE LA PRODUCCION DE ZEAXANTINA.**

Se decidió probar el efecto de la fracción de llenado sobre la producción de zeaxantina, al considerar que dicha fracción se encuentra directamente relacionada con la oxigenación, ya que a menor fracción de llenado la oxigenación existente dentro del sistema es mayor, lo cual podría beneficiar la producción de pigmentos al obligar a la célula a producirlos como defensa antioxidante.

Dicho efecto se evaluó en los dos medios anteriormente mencionados PM y STYE, analizándose tres fracciones de llenado 0.4, 0.2 y 0.1 en matraces bafleados de 250 ml. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.4 y en las figuras de la 6.8 a la 6.10. Se observa que en ambos medios la fracción de llenado afectó tanto el crecimiento

como la producción, es decir, una fracción de llenado de 0.4 no permitió una buena oxigenación por lo que la flavobacteria creció lentamente, produciendo una mínima cantidad de pigmentos, con 0.2 de fracción de llenado se obtuvo un buen crecimiento y producción, presentando sus máximos a las 72 h en ambos medios. Las máximas producciones se observaron con una fracción de llenado de 0.1 reduciéndose el tiempo de máxima producción a 48 h, siendo mayores en el medio PM (6.28 $\mu$ g/ml), que en el medio STYE (3.5 $\mu$ g/ml)

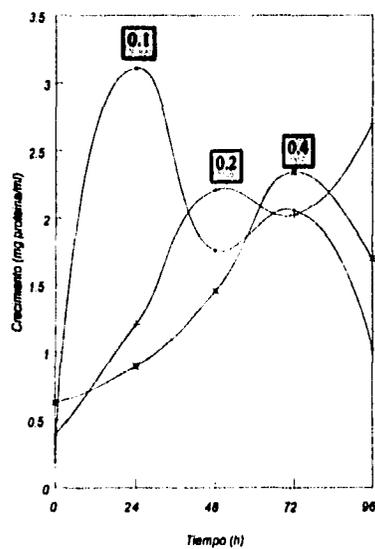


Figura 6.8a. IMPORTANCIA DE LA FRACCION DE LLENADO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Flavobacterium* sp 21588 en medio PM.

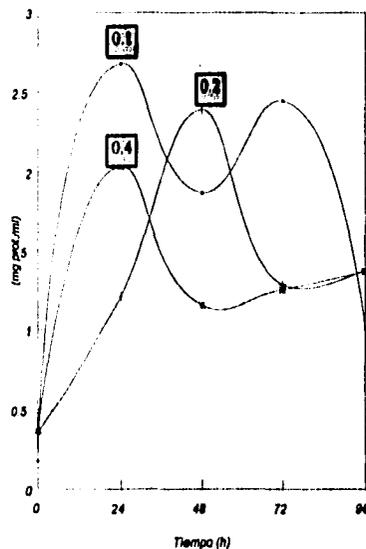
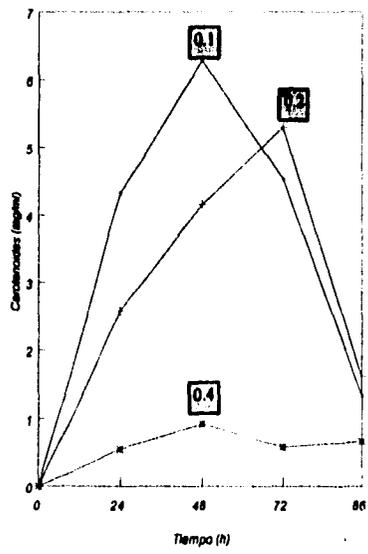
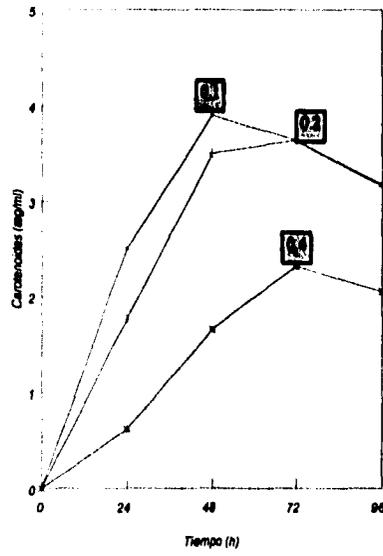


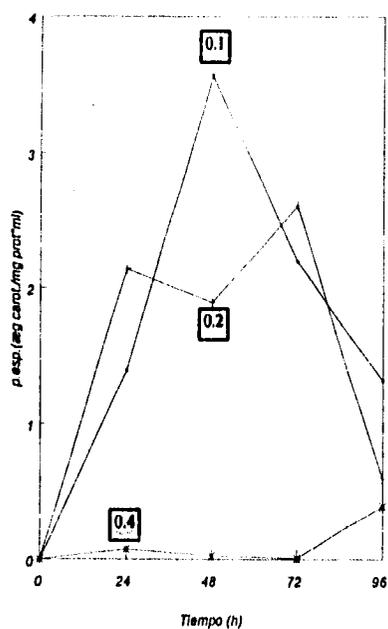
Figura 6.8b. IMPORTANCIA DE LA FRACCION DE LLENADO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Flavobacterium* sp 21588 en medio STYE.



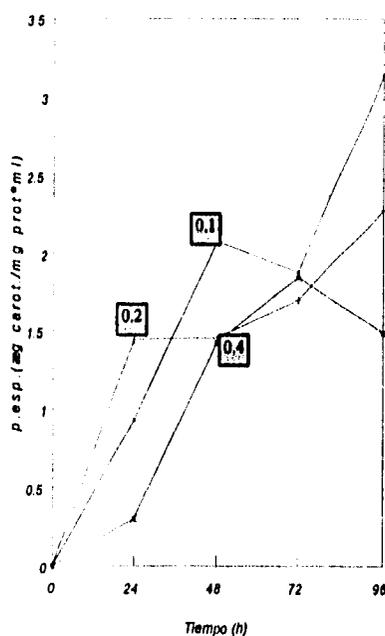
**Figura 6.9a. Importancia de la fracción de llenado en la producción volumétrica de carotenoides totales en medio PM.**



**Figura 6.9b. Importancia de la fracción de llenado en la producción volumétrica de carotenoides totales en medio STYE.**



**Figura 6.10a. Importancia de la fracción de llenado en la producción específica de carotenoides totales en medio PM.**



**Figura 6.10b. Importancia de la fracción de llenado en la producción específica de carotenoides totales en medio STYE.**

Lo anterior nos mostró que una fracción de llenado de 0.1 influyó de manera positiva sobre el crecimiento y producción de pigmentos por *Flavobacterium sp 21588*, obteniéndose los máximos tanto de crecimiento como de producción en un menor tiempo, ya que con una fracción de llenado de 0.2 y 0.4 el crecimiento y las producciones son menores, alcanzándose los máximos en un mayor tiempo de fermentación.

El pH tendió a desestabilizarse y disminuir drásticamente en el medio PM cuando se usó una fracción de llenado de 0.4, lo cual pudo deberse al poco crecimiento de la bacteria; con fracciones de 0.2 y 0.1 el pH se mantuvo más estable en un rango de 7-9. En medio STYE el pH tendió a aumentar en función del tiempo, siendo ligeramente menor con la fracción de llenado de 0.4, debido igualmente como en el medio PM al crecimiento deficiente del microorganismo comparado con el alcanzado con fracciones de 0.2 y 0.1 (Fig. 6.11 a y b).

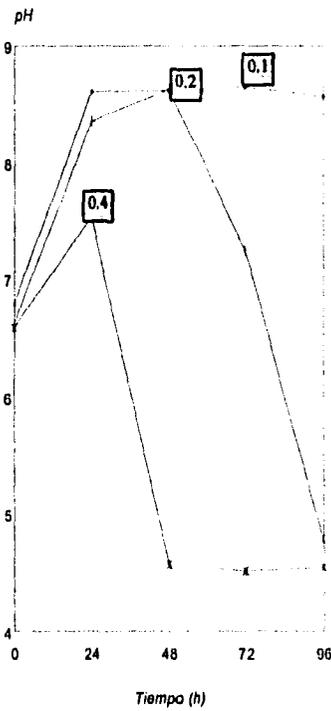


Figura 6.11a. Influencia de la fracción de llenado sobre el pH del medio de producción (PM).

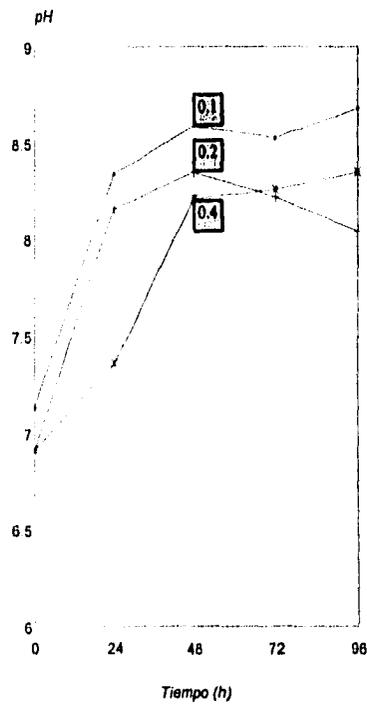


Figura 6.11b. Influencia de la fracción de llenado sobre el pH del medio de producción (STYE).

**Cromatográficamente se evaluaron las tres fracciones de llenado antes mencionadas para conocer su efecto sobre la producción de zeaxantina. En la fig. 6.12. se observan las variaciones en la intensidad de las manchas de los pigmentos producidos por la flavobacteria. En medio STYE con una fracción de llenado de 0.1, las manchas correspondientes a zeaxantina fueron más intensas que las generadas con 0.2 y 0.4 las cuales tendieron a disminuir de manera marcada. La fracción de llenado de 0.1 en medio STYE además de favorecer una mayor producción de zeaxantina, evitó la acumulación de otros pigmentos entre ellos el  $\beta$ -caroteno, que se acumuló de manera marcada con fracciones de llenado de 0.2 y 0.4 y aún más en medio PM con las mismas fracciones de llenado. Este experimento permitió seleccionar una menor fracción de llenado de 0.1, ya que anteriormente se manejaba una fracción de 0.2 que acumulaba otros carotenoides diferentes a zeaxantina.**

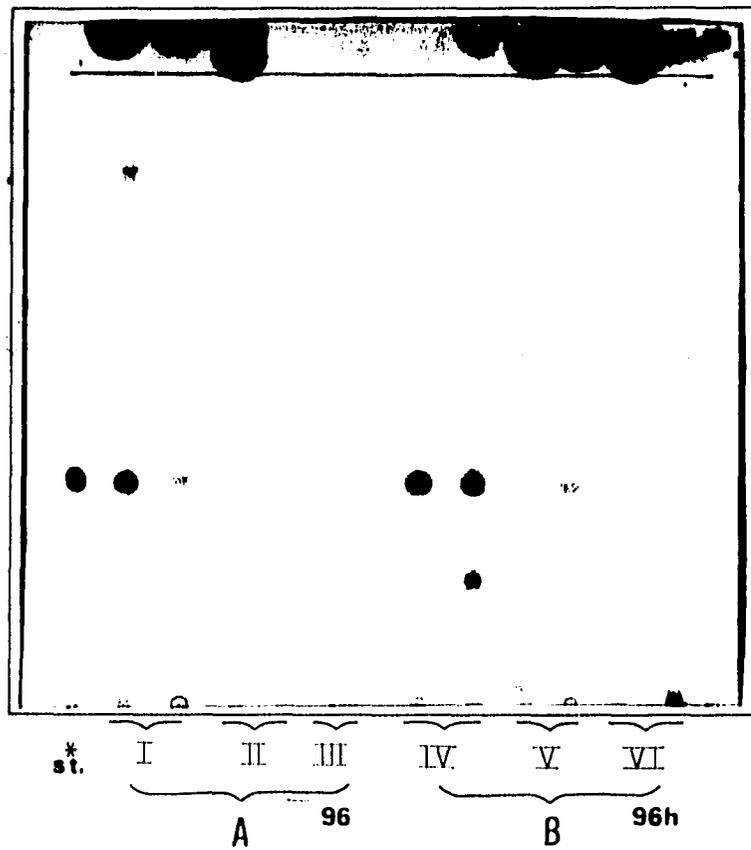


Figura 6.12. Importancia de la oxigenación en la producción de pigmentos por *Flavobacterium* sp 21588 a las 48 h y 72 h de fermentación, con tres fracciones de llenado. (A) Medio PM 0.1, 0.2 y 0.4 respectivamente de fracción de llenado. (B) Medio STYE 0.1, 0.2 y 0.4 de fracción de llenado. \* St. zeaxantina.

**Tabla 6.4. EFECTO DEL MEDIO Y FRACCIÓN DE LLENADO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES.**

Medio	Vol. del matraz (ml)	Vol. del medio	Fración de llenado	Carotenoides ( $\mu\text{g ml}$ )
PM	250	25	0.1	6.28 $\pm$ 1.04
PM	250	50	0.2	4.16 $\pm$ 2.35
PM	250	100	0.4	0.925 $\pm$ 0.15
STYE	250	25	0.10	3.90 $\pm$ 0.042
STYE	250	50	0.2	3.50 $\pm$ 0.07
STYE	250	100	0.4	1.65 $\pm$ 0.148

El experimento se llevó a cabo por duplicado a 29°C y 180 r.p.m. durante 48h.

En este experimento observamos que la producción de carotenoides totales en medio STYE correspondió casi en un 100% a zeaxantina, según los resultados cromatográficos anteriores, que mostraron una mínima acumulación de otros pigmentos.

#### 6.6. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO, FRACCIÓN DE LLENADO Y pH SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA.

Muchas veces no se tienen las condiciones adecuadas para obtener los mejores resultados de un determinado proceso, es por ello que mediante un análisis estadístico se puede determinar la importancia de las diferentes variables que pueden influir sobre la respuesta de interés. En este estudio se desea conocer si el medio de cultivo, la fracción de llenado y el pH ejercen una influencia significativa sobre la producción de zeaxantina tanto de manera individual como de manera interactiva para lo cual se utilizó un análisis de varianza. Las combinaciones de las tres variables a evaluar se presentan en una matriz de diseño (tabla 6.5), la cual nos permite visualizar los niveles máximos y mínimos manejados.

**Tabla 6.5. EFECTO DEL PH, VOLUMEN DE LLENADO Y MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN.**

Condición	pH	Volumen (ml)	Medio (A o B)	Producción Carotenoides (µg/ml)	Producción Zeaxantina (µg/ml)
	P	V	M	48 h.	48h.
<b>a) Unidades originales de variables</b>					
1	6.5	25	A	2.91	1.91
2	7.2	25	A	3.04	1.21
3	6.5	25	B	1.95	1.64
4	7.2	25	B	2.20	1.91
5	6.5	50	A	2.5	1.55
*6	7.2	50	A	2.01	0.793
7	6.5	50	B	2.15	1.14
8	7.2	50	B	2.32	0.700
<b>b) Unidades codificadas de variables</b>					
1	-	-	-	1.91	1.91
2	+	-	-	2.086	1.21
3	-	-	+	1.69	1.64
4	+	-	+	2.38	1.91
5	-	+	-	2.06	1.55
*6	+	+	-	2.50	0.793
7	-	+	+	2.15	1.14
8	+	+	+	2.32	0.700

A= Medio PM.

B=Medio STYE.

\*La condición 6 corresponde al control.

El análisis de varianza presentado en el anexo 3, permitió conocer que la composición del medio de cultivo y la fracción de llenado afecta de manera importante la producción de zeaxantina, siendo el medio STYE y la fracción de 0.1 los más adecuados. El pH no ejerció ninguna influencia por lo que la producción no se ve afectada si se maneja un pH de 6.2 o uno de 7.2

La mejor combinación de las tres variables evaluadas (medio, fracción de llenado y pH) se seleccionó considerando la mayor producción de zeaxantina obtenida en las condiciones presentadas en la tabla 6.5.

De las condiciones evaluadas la número dos (medio PM, fracción de llenado de 0.1 y pH de 7.2) fue la que permitió obtener la mayor producción de carotenoides totales (3.04  $\mu\text{g/ml}$ ).

Con respecto a la producción de zeaxantina, un análisis cromatográfico permitió visualizar en las condiciones 3 (medio STYE, fracción de llenado 0.1 y pH de 6.5) y 4 (medio STYE, fracción de 0.1 y pH de 7.2) poca acumulación de otros carotenoides (Fig. 6.13). Sin embargo en la condición cuatro el pH de 7.2 favoreció la síntesis de zeaxantina obteniendo una pureza cercana al 100%

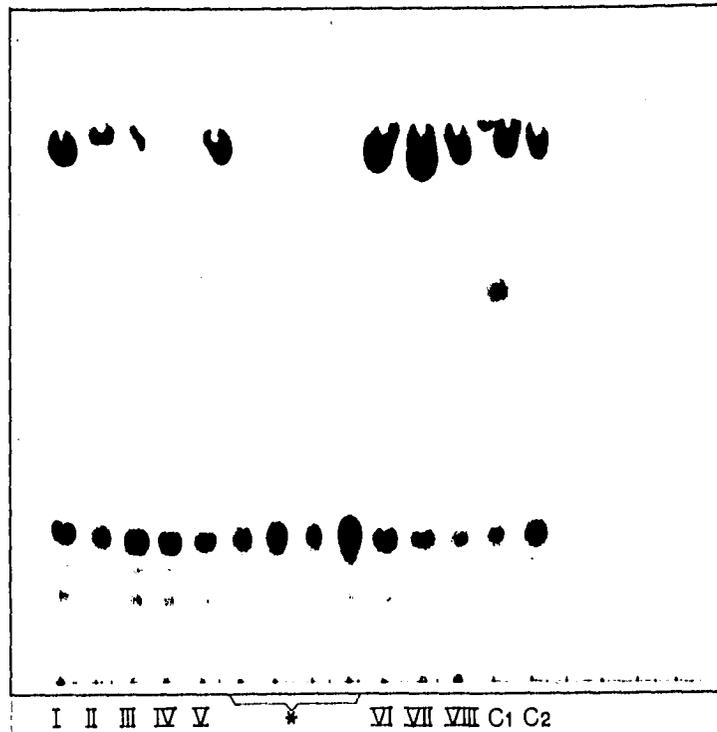


Figura 6.13. INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO, FRACCIÓN DE LLENADO Y pH SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA POR *Flavobacterium* sp 21588. I= Medio PM, 0.1, 6.5. II= Medio PM, 0.1, 7.2. III=Medio STYE, 0.1, 6.5. IV= Medio STYE, 0.1,7.2. V= Medio PM, 0.2, 6.5. VI= Medio PM, 0.2, 7.2. VII= Medio STYE, 0.2, 6.5. VIII= Medio STYE, 0.2, 7.2. C1 = Medio PM, 0.2,7.2. C2= STYE, 0.2, 7.2. \* St. zeaxantina.

Con base en estos resultados y en función de nuestro objetivo de optimizar la producción de zeaxantina, las condiciones de partida fueron medio STYE, con un volumen de llenado de 25 ml en matraces bafados de 250 ml , con un pH inicial de 7.2.

## **6.7. VARIABILIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA EN LAS CONDICIONES A OPTIMIZAR.**

**La finalidad de este experimento fue establecer la variabilidad máxima que se puede generar en las condiciones experimentales establecidas hasta ahora, con el fin de asegurar que los resultados obtenidos durante el desarrollo del trabajo fueran confiables. Se revisó la variabilidad en un mismo experimento y la variabilidad de un experimento a otro.**

**En el primer caso, se utilizaron 10 corridas en matraces bafleados de 250 ml con 25 ml de medio STYE con reactivos grado analítico-industrial, (los reactivos analíticos más adelante se sustituyeron por reactivos industriales al obtener mejores producciones con estos), las 10 repeticiones se sometieron a las mismas condiciones y fueron evaluadas en el mismo tiempo, para evitar la influencia de factores ambientales o de manipulación que pudieran afectar el comportamiento de la cepa.**

**Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1 del anexo 3 donde se muestra la variabilidad en la producción de carotenoides totales y zeaxantina a las 48 h de fermentación sobre un mismo experimento. La diferencia entre el valor más alto y más bajo fue de 1.47  $\mu\text{g/ml}$ , esta variación estadísticamente representa el 10.90 % del promedio, cifra que en la práctica se considera razonable para sistemas biológicos.**

**Para analizar la variabilidad de un experimento a otro se llevaron a cabo corridas por triplicado en fechas diferentes, preparando el medio de cultivo cada vez. El lote de reactivos, los tratamientos y las condiciones utilizadas para cada corrida, fueron los mismos.**

**Los resultados obtenidos presentados en la tabla 2 del anexo 3 muestran la magnitud del intervalo de variación. A partir de los 15 datos de producción obtenidos de 5 experimentos realizados por triplicado, se observó un considerable intervalo de**

variación de un experimento a otro. Con estos resultados se realizó un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95%. Los resultados mostrados en la tabla 3 del anexo 3 indican que la variabilidad de la producción en diferentes experimentos es mayor a la obtenida en un mismo experimento, siendo altamente significativa.

El análisis de homogeneidad que se presenta en la tabla 4 del anexo 3, nos muestra al comparar los promedios de producción de los diferentes experimentos, que existe una diferencia altamente significativa del experimento 4 con respecto a los otros, los experimentos 1 y 5 no presentan diferencias significativas entre ellos, al igual que los experimentos 2 y 3, pero de manera comparativa estos dos grupos presentan una diferencia significativa. Lo anterior nos muestra que la variación entre experimentos es mayor a la generada en un mismo experimento.

#### **6.8. INFLUENCIA DEL TIPO DE REACTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE ZEAXANTINA**

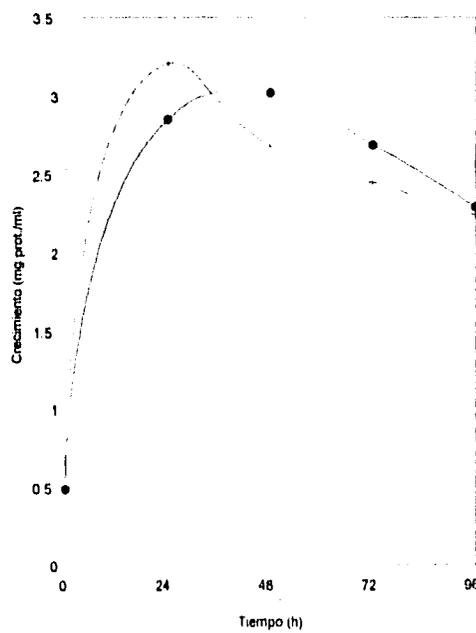
Los reactivos usados al inicio del trabajo fueron una mezcla de reactivos grado industrial-analítico, lo cual generaba interferencias al no tener un grado de pureza uniforme, además como en cualquier optimización, lo que se desea es una mayor producción al menor costo posible, se decidió sustituir los reactivos grado analítico por reactivos grado industrial, para observar el efecto de la pureza de los mismos sobre la producción de zeaxantina.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.6 y en las figuras 6.14-6.16. Se observa que los reactivos grado industrial favorecen tanto la producción de carotenoides totales como de zeaxantina, así como el crecimiento, obteniendo respuestas mayores a las generadas en el medio con la mezcla de reactivos grado analítico-industrial.

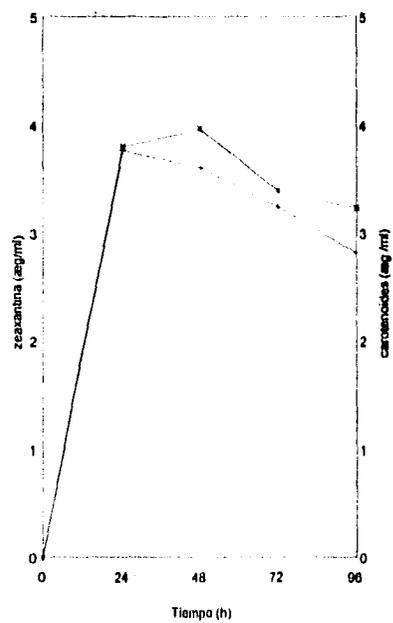
**Tabla 6.6. EFECTO DEL TIPO DE REACTIVO (R) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA.**

Tiempo (h)	Carotenoides Totales ( $\mu\text{g ml}$ )		Zeaxantina ( $\mu\text{g ml}$ )	
	R. Ind. * Analit.	R. Industriales	R. Ind. * Analit.	R. industriales
	24	3.79	4.32	3.76
48	3.96	5.62	3.60	5.41
72	3.39	4.31	3.23	4.04
96	3.23	3.51	2.81	3.0

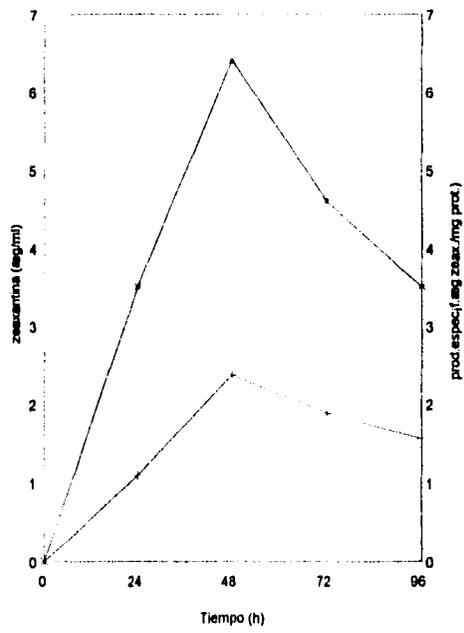
El experimento se llevó a cabo en matraces bafleados de 250 ml con 25 ml de medio STYE durante 96 h. \*Glucosa y  $\text{MgCl}_2$  se manejaron como reactivos grado analítico.



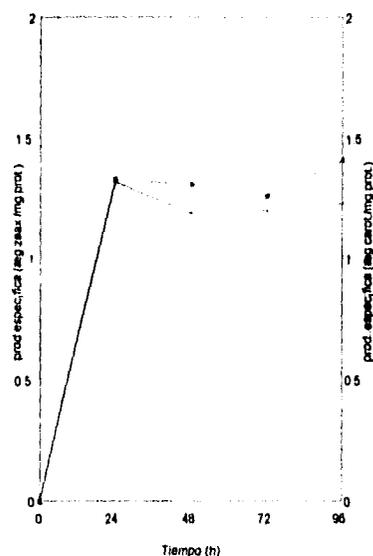
**Figura 6.14. IMPORTANCIA DEL TIPO DE REACTIVO.**  
 Cinética de crecimiento de *Flavobacterium* sp 21588 en medio STYE,  
 con un pH inicial de 7.2 y una fracción de llenado de 0.1.  
 (●) Reactivos grado analítico y (x) Reactivos grado industrial



**Figura 6.15 a. PRODUCCIÓN VOLUMÉTRICA DE CAROTENOIDES TOTALES Y ZEAXANTINA EN MEDIO STYE USANDO REACTIVOS GRADO ANALÍTICO. (\* carotenoides totales y (x) zeaxantina.**

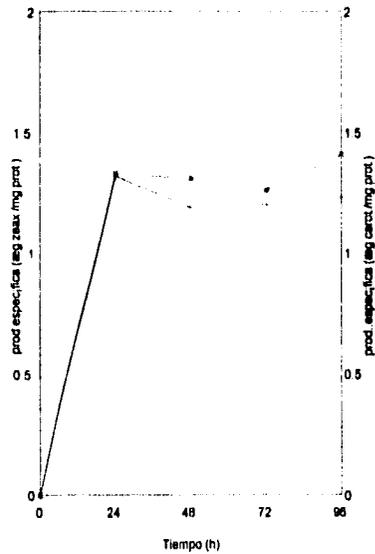


**Figura 6.15b. PRODUCCIÓN VOLUMÉTRICA Y ESPECÍFICA DE ZEAXANTINA EN MEDIO STYE CON REACTIVOS GRADO INDUSTRIAL.**  
 (\*) Producción volumétrica y (x) Producción específica.



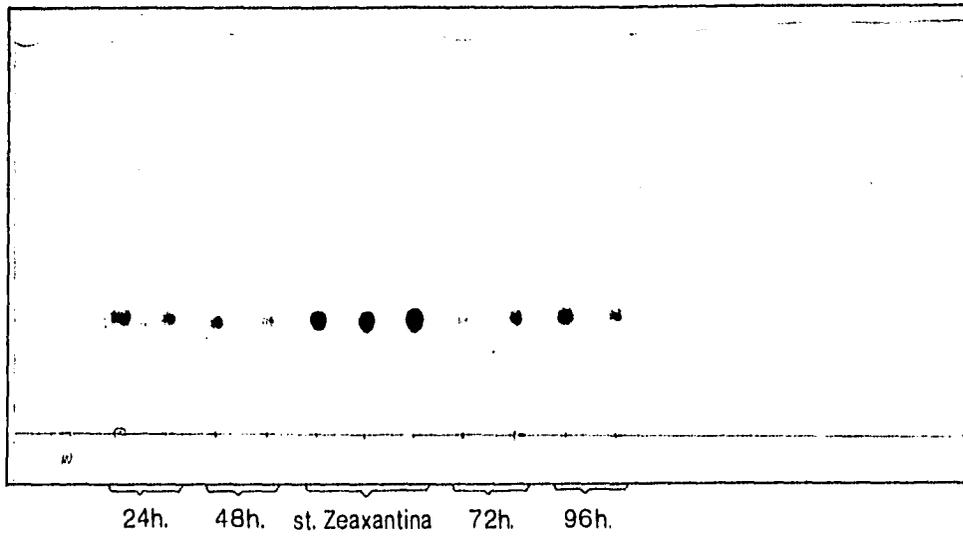
**Figura 6.16. PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE CAROTENOIDES TOTALES Y ZEAXANTINA EN MEDIO STYE USANDO REACTIVOS GRADO ANALÍTICO. (\*) zeaxantina y (x) carotenoides totales.**

En la figuras 6.17, 6.18, 6.19 y 6.20 se muestran las placas cromatográficas y los análisis densitométricos respectivamente de las cinéticas de producción de zeaxantina por *Flavobacterium* sp 21588 en el medio STYE con reactivos analíticos-industriales y con reactivos 100% industriales, en el primer caso se observó que a las 24 h. de fermentación se alcanza el máximo de producción de zeaxantina (3.76  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), con poca acumulación de otros carotenoides, y en el segundo caso se alcanzó el máximo a las 48h (6.35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), igualmente con poca acumulación de otros carotenoides, pero con un incremento considerable en la producción. Algo importante que se observó fue que a medida que el tiempo transcurre se incrementa la cantidad de carotenoides totales, pero disminuye notablemente el porcentaje de zeaxantina.

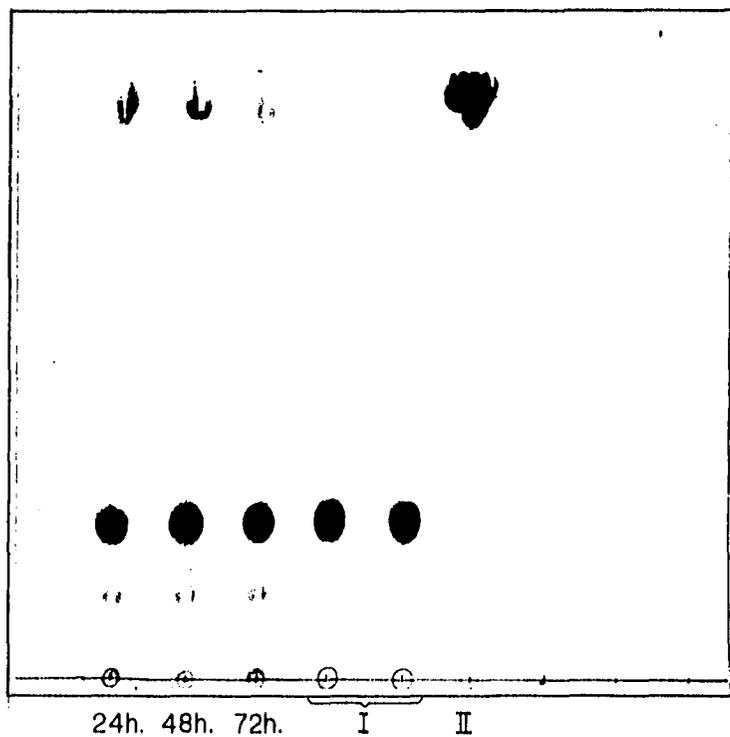


**Figura 6.16. PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE CAROTENOIDES TOTALES Y ZEAXANTINA EN MEDIO STYE USANDO REACTIVOS GRADO ANALÍTICO. (\*) zeaxantina y (x) carotenoides totales.**

En la figuras 6.17, 6.18, 6.19 y 6.20 se muestran las placas cromatográficas y los análisis densitométricos respectivamente de las cinéticas de producción de zeaxantina por *Flavobacterium* sp 21588 en el medio STYE con reactivos analíticos-industriales y con reactivos 100% industriales, en el primer caso se observó que a las 24 h. de fermentación se alcanza el máximo de producción de zeaxantina (3.76  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), con poca acumulación de otros carotenoides, y en el segundo caso se alcanzó el máximo a las 48h (6.35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), igualmente con poca acumulación de otros carotenoides, pero con un incremento considerable en la producción. Algo importante que se observó fue que a medida que el tiempo transcurre se incrementa la cantidad de carotenoides totales, pero disminuye notablemente el porcentaje de zeaxantina.



**Figura 6.17. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA POR *Flavobacterium* sp 21588 EN MEDIO SYE USANDO REACTIVOS GRADO ANALÍTICO.**



**Figura 6.18. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA POR *Flavobacterium* sp 21588 EN MEDIO STYE USANDO REACTIVOS GRADO INDUSTRIAL. I = St. zeaxantina y II = St.  $\beta$ -caroteno.**

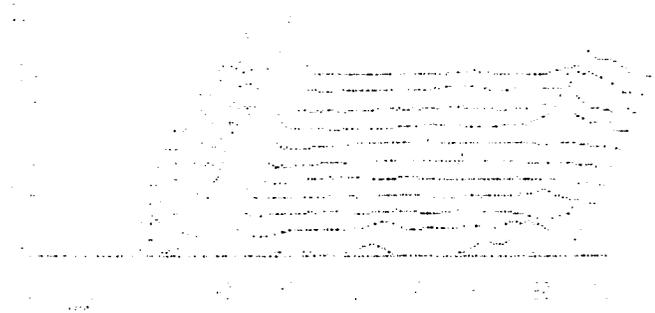


Figura 6.19. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO. Pigmentos producidos por *Flavobacterium* sp 21588 en medio STYE, usando reactivos grado analítico y 72 h de fermentación.

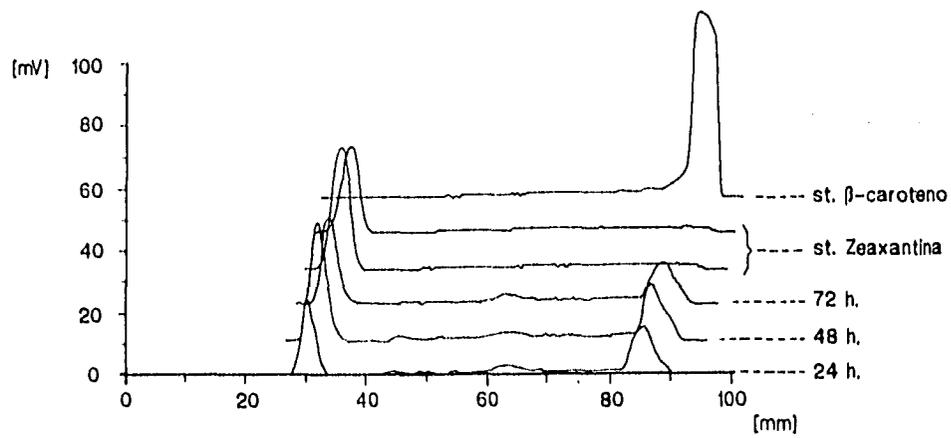
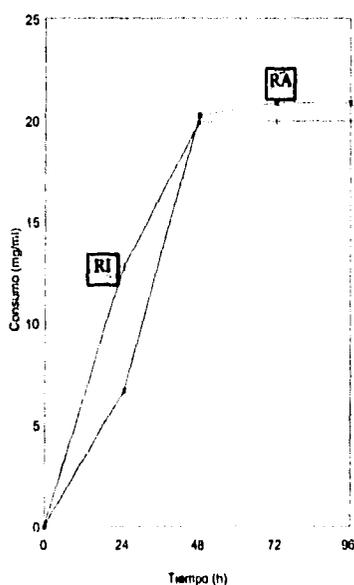
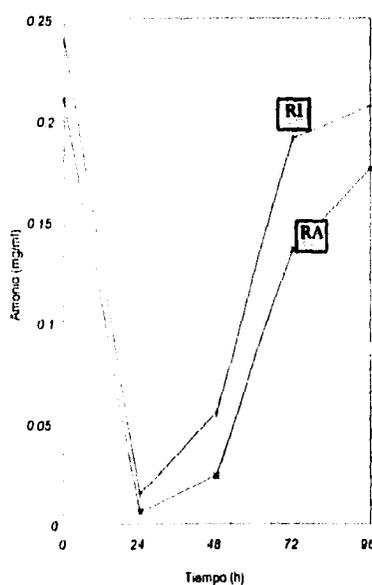


Figura 6.20. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO. Cinética de pigmentos producidos por *Flavobacterium* sp 21588 en medio STYE, usando reactivos grado industrial.

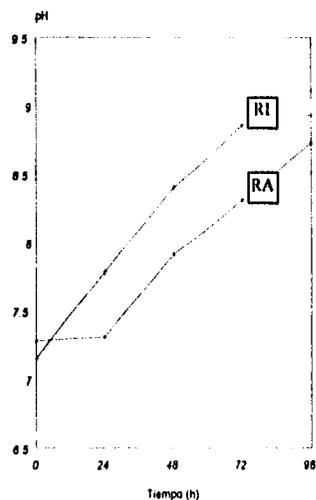
Con lo que respecta al consumo de glucosa, amonio y variación del pH inicial, los resultados en ambos medios se muestran en las gráficas 6.21-6.23. Se observa que la bacteria consume casi el 100% de glucosa a las 48 h, sin importar que los reactivos sean grado analítico o industrial. El amonio igualmente se consume en ambos medios casi al 100% a las 24h, pero posteriormente el microorganismo comienza a excretarlo, esto posiblemente ocurra como mecanismo de defensa para evitar que el amonio intracelular a altas concentraciones afecte el crecimiento celular. El pH en ambas condiciones de un valor inicial de 7.2 tiende a incrementarse, mayormente en el medio con reactivos grado industrial, alcanzando valores hasta de 8.93.



**Figura 6.21. CONSUMO DE GLUCOSA en medio STYE. Concentración inicial 2%. (RA) Reactivos grado analítico y (RI) Reactivos grado industrial.**



**Figura 6.22. AMONIO RESIDUAL presente durante el crecimiento de *Flavobacterium* sp 21588 en medio STYE. (RA) Reactivos grado analítico y (RI) Reactivos grado industrial.**



**Figura 6.23. EFECTO DE LA PUREZA DE LOS REACTIVOS SOBRE LA VARIACIÓN DEL pH EN EL MEDIO STYE. (RA) Reactivos grado analítico y (RI) Reactivos grado industrial.**

#### **6.9. IMPORTANCIA DE LOS NUTRIMENTOS DEL MEDIO A OPTIMIZAR SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA**

Como una fase previa a la optimización del medio STYE, se realizó un diseño factorial  $2^4$ , para determinar que nutrientes ejercían un efecto significativo sobre la producción de zeaxantina, considerando tanto los efectos positivos como los negativos y buscando así poder generar un modelo matemático que pudiera pronosticar adecuadamente el efecto de los nutrientes sobre la producción y con ello prever próximos experimentos.

Se realizó un experimento por duplicado aplicando el diseño factorial  $2^4$ , en el que se evaluaron los cuatro ingredientes del medio a optimizar (licor de maíz,  $MgCl_2$ , aceite de maíz y glucosa), todos ellos grado industrial. La matriz de diseño con los valores máximos y mínimos de cada nutrimento se muestra en la tabla 6.7.

Los valores máximos y mínimos de los nutrimentos se establecieron en base a estudios previos realizados en el laboratorio. Los decrementos e incrementos fueron del 50% para licor, glucosa y  $MgCl_2$  y de un 100% para el aceite de maíz, en relación a la concentración de los mismos en el medio base a optimizar.

Por medio del algoritmo de Yates se determinó el efecto de los nutrimentos sobre la producción de zeaxantina. Los coeficientes de regresión obtenidos para cada nutrimento nos permitieron determinar cuales ejercían realmente una influencia significativa sobre la producción y si esa influencia era positiva o negativa. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.8, en la cual se observa considerando, dos veces el valor de la desviación típica (0.32) (con el fin de tener un 95% de confiabilidad de las respuestas), que al comparar esta desviación con los coeficientes de los diferentes nutrimentos, únicamente el licor de maíz influyó de manera significativa y positiva sobre la producción de zeaxantina. No existió influencia importante por parte de los demás nutrimentos y tampoco la hubo por efecto de las dobles y triples interacciones de los mismos.

**Tabla 6.7. DATOS DE UN DISEÑO FACTORIAL 2<sup>4</sup> PARA DETERMINAR LA IMPORTANCIA DE LOS NUTRIENTES A OPTIMIZAR SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA.**

Condición	Licor de maíz (ml)	MgCl <sub>2</sub> (g)	Glucosa (g)	Aceite de maíz (ml)	Zeaxantina (µg/ml)
1	0.8	0.75	1	0	2.27
2	0.8	0.75	1	0.16	1.81
3	0.8	0.75	3	0	1.84
4	0.8	0.75	3	0.16	1.42
5	0.8	2.25	1	0	1.34
6	0.8	2.25	1	0.16	1.30
7	0.8	2.25	3	0	1.38
8	0.8	2.25	3	0.16	2.29
9	2.04	0.75	1	0	5.03
10	2.04	0.75	1	0.16	4.47
11	2.04	0.75	3	0	3.89
12	2.04	0.75	3	0.16	4.10
13	2.04	2.25	1	0	3.96
14	2.04	2.25	1	0.16	2.94
15	2.04	2.25	3	0	4.42
16	2.04	2.25	3	0.16	3.82
C	1.6	1.5	2	0.08	3.03

**Tabla 6.8. ALGORITMO DE YATES**  
**IMPORTANCIA DE LOS NUTRIMENTOS A OPTIMIZAR SOBRE**  
**LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA.**

Nº. Condición	Variables				Media (µg/ml)	Esti- mación	S. típica	Identi- ficación	S. estándar	C.V
	A	B	C	D						
1	-	-	-	-	2.27	2.89	±0.095	Media	0.14	6
2	-	-	-	+	1.81	-0.124	±0.1910	d	0.037	2
3	-	-	+	-	1.84	0.003	±0.1910	e	0.21	11
4	-	-	+	+	1.43	0.135	±0.1910	cd	0.05	3
5	-	+	-	-	1.84	-0.211	±0.1910	b	0.21	11
6	-	+	-	+	1.30	0.028	±0.1910	bd	0.08	4.5
7	-	+	+	-	1.89	0.293	±0.1910	bc	0.06	5
8	-	+	+	+	2.29	0.034	±0.1910	bcd	0.084	4.5
9	+	-	-	-	5.03	1.18	±0.1910	a	0.31	21
10	+	-	-	+	4.47	-0.122	±0.1910	ad	0.42	8
11	+	-	+	-	3.89	-0.021	±0.1910	ac	0.26	6
12	+	-	+	+	4.60	0.013	±0.1910	acd	0.38	10
13	+	+	-	-	3.96	-0.083	±0.1910	ab	0.17	4
14	+	+	-	+	2.44	0.189	±0.1910	abd	0.17	7
15	+	+	+	-	4.42	0.062	±0.1910	abc	0.54	12
16	+	+	+	+	3.81	-0.077	±0.1910	abcd	0.77	20
C					3.03				0.29	10

Considerando lo anterior, el modelo matemático que pronosticó el efecto de los nutrientes sobre la producción de zeaxantina fue el siguiente:

$$y = 2.893 + 1.184A$$

Donde:

$y$  = Concentración de zeaxantina esperada.

2.893 = Error aleatorizado e independiente.

1.184A = Coeficiente de regresión del licor de maíz.

El modelo matemático nos dice que la concentración de zeaxantina es linealmente dependiente de la concentración del licor de maíz, el signo positivo del coeficiente nos dice que el licor debe incrementarse aproximadamente en 1.184 unidades para obtener una mayor producción del pigmento de interés. El análisis pronosticado nos permitió usar posteriormente el método de Box-Wilson para encontrar la concentración mínima necesaria de los nutrientes no significativos que permitiera la mejor producción del pigmento, para posteriormente mantener dichas concentraciones constantes y buscar por último la concentración óptima de licor de maíz que resultara en la mayor producción de zeaxantina.

También se aplicó el algoritmo de Yates al revés, para comprobar que efectivamente el modelo obtenido, pronosticaba adecuadamente el efecto de los nutrientes sobre la respuesta, lo cual se corroboró al obtener residuos cercanos a cero.

En virtud de que el  $MgCl_2$ , el aceite de maíz y la glucosa no ejercieron un efecto significativo sobre la producción de zeaxantina, con un nivel de confianza del 95%, sus concentraciones mínimas necesarias se determinaron por medio del método de Box-Wilson.

El método de Box-Wilson nos permitió determinar la mejor concentración de los nutrientes que no ejercieron un efecto importante sobre la producción (  $MgCl_2$ , glucosa y aceite de maíz) para posteriormente mantenerlos constantes y variar únicamente el licor de maíz hasta encontrar la concentración óptima del mismo que generó la máxima producción de zeaxantina, además nos indicó en cuantas unidades aumentar o disminuir los nutrientes poco significativos, los valores se muestran en la tabla 6.9.

**Tabla 6.9. VARIACIÓN DE LOS NUTRIMENTOS POCO SIGNIFICATIVOS.**

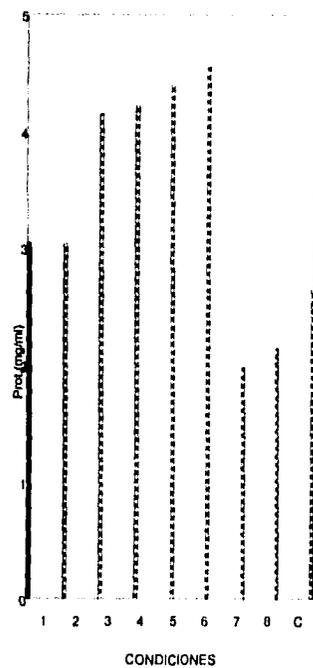
Medio Base	A	B	C	D
	Licor de maíz	$MgCl_2$	Glucosa	Acete de maíz
%	1.6	1.5	2	0.08
Unidades de Variación	+1	-0.167	+0.0032	-0.010

Considerando las unidades de variación de cada nutriente, el licor de maíz deberá incrementarse a razón de +1 unidad a partir del medio base original, el  $MgCl_2$  deberá disminuirse en 0.167 unidades, glucosa incrementarse en 0.0032 y aceite de maíz bajarse en 0.010 unidades. Tomando como medio de partida el medio STYE, se realizaron corridas por triplicado para evaluar los 8 nuevos medios, los cuales se muestran en la tabla 6.10.

**Tabla 6.10. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS NUTRIMENTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA.**

Condición	Nutrimiento			
	A	B	C	D
1	2.6	1.33	2.003	0.07
2	3.6	1.166	2.006	0.06
3	4.6	0.999	2.009	0.05
4	5.6	0.832	2.012	0.04
5	6.6	0.665	2.015	0.03
6	7.6	0.498	2.018	0.02
7	8.6	0.331	2.021	0.01
8	9.6	0.164	2.024	0
C	1.6	1.5	2	0.08

Se realizó la cuantificación tanto de zeaxantina como de carotenoides totales, los resultados obtenidos se muestran en las figuras de la 6.24-a la 6.26. Se observa que la condición 3 es la que permite obtener la mayor producción y crecimiento de la flavobacteria, con valores de 9.657 µg/ml de carotenoides totales y 6.45 µg/ml de zeaxantina.



**Figura 6.24. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS NUTRIMENTOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Flavobacterium* sp 21588.**

(La concentración de los nutrientes se modifico en el siguiente orden:

% licor de maíz, % MgCl<sub>2</sub>, % glucosa y % aceite de maíz).

**Condiciones.**

1= 2.6, 1.33, 2.003, 0.07.

2= 3.6, 1.166, 2.006, 0.06.

3= 4.6, 0.099, 2.009, 0.05.

4= 5.6, 0.832, 2.012, 0.04.

5= 6.6, 0.665, 2.015, 0.03.

6= 7.6, 0.498, 2.018, 0.02.

7= 8.6, 0.331, 2.021, 0.01.

8= 9.6, 0.164, 2.024, 0.0.

Control= 1.6, 1.5, 2.0, 0.8.

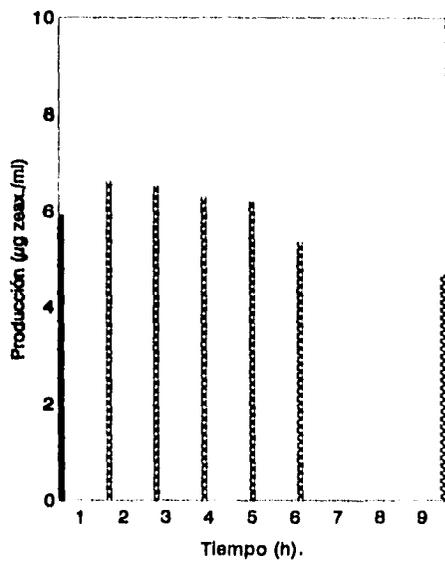


Figura 6.25a. Efecto de la concentración de los nutrientes en la producción volumétrica de zeaxantina

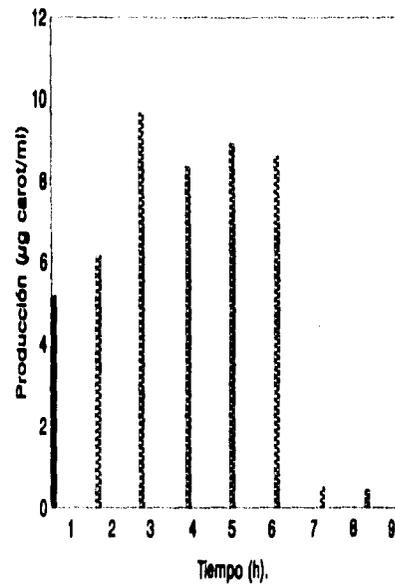


Figura 6.25b. Efecto de la concentración de los nutrientes en la producción volumétrica de carotenoides totales.

**Condiciones:**

(variación de licor, MgCl<sub>2</sub>, glucosa y aceite respectivamente)

1= 2.6, 1.33, 2.003, 0.07.

2= 3.8, 1.66, 2.066, 0.06.

3= 4.6, 0.999, 2.009, 0.05.

4= 5.6, 0.832, 2.012, 0.04.

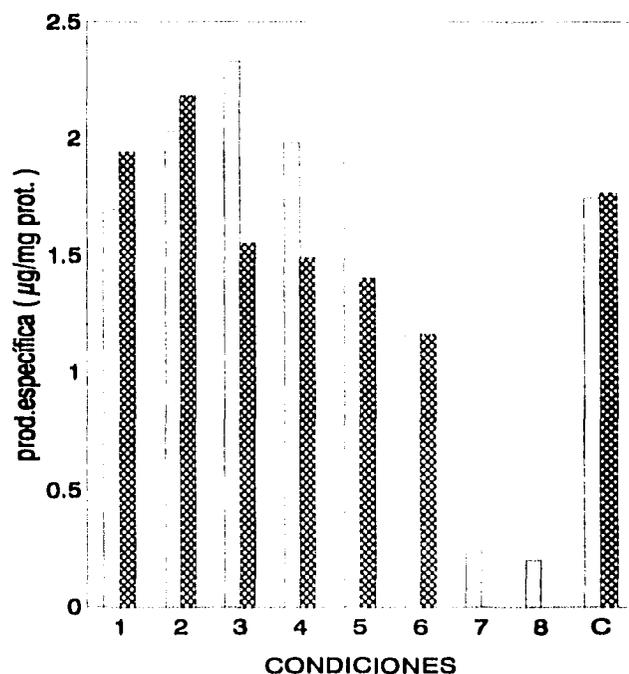
5= 6.6, 0.665, 2.015, 0.03.

6= 7.6, 0.498, 2.018, 0.02.

7= 8.6, 0.331, 2.021, 0.01.

8=9.6, 0.164, 2.024, 0.0.

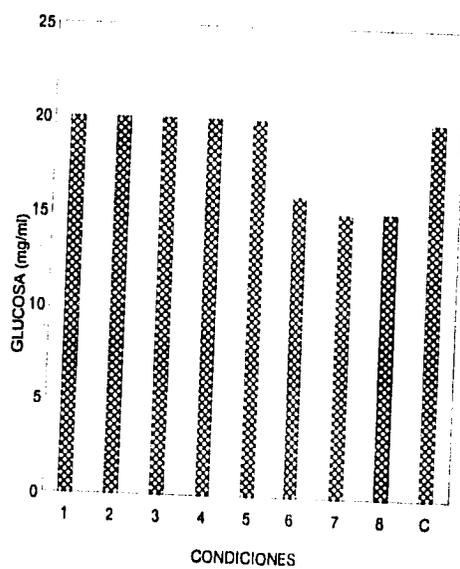
9(Control)=1.6, 1.5, 2, 0.08.



**Figura 6.26. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS NUTRIMENTOS EN LA PRODUCCIÓN ESPECIFICA DE PIGMENTOS. ( ) Carotenoides totales y (X) Zeaxantina.**

Con respecto al consumo de glucosa y amonio gráficas 6.27 y 6.28, el azúcar se consume casi en un 100% hasta la condición 5, pero apartir de la condición 6 con una concentración del 2.018%, el consumo disminuyó considerablemente, esto posiblemente por el decremento del  $MgCl_2$  (0.498%) o por el incremento del licor (7.6%), que afectaron el crecimiento y con ello la producción del pigmento.

El licor de maíz se consumió de manera importante hasta concentraciones de 0.046 g/ml, posteriormente su consumo por la flavobacteria disminuyó acumulándose como amonio residual.



**Figura 6.27. CONSUMO DE GLUCOSA VARIANDO LA CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTOS POR *Flavobacterium* sp 21588. Tiempo de fermentación 48 h.**

**Condiciones:**

**(variación de licor, MgCl<sub>2</sub>, glucosa y aceite respectivamente)**

**1= 2.6, 1.33, 2.003, 0.07.**

**2= 3.8, 1.66, 2.066, 0.06.**

**3= 4.6, 0.999, 2.009, 0.05.**

**4= 5.6, 0.832, 2.012, 0.04.**

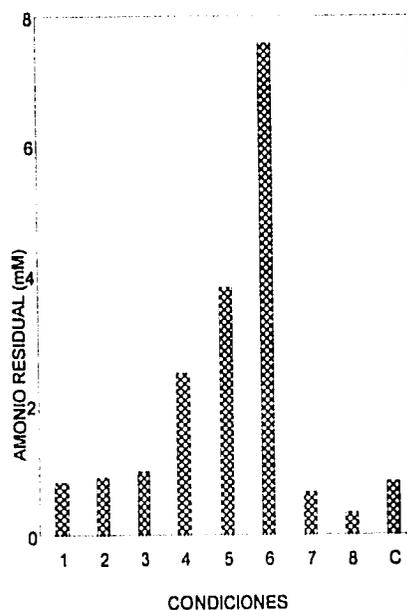
**5= 6.6, 0.665, 2.015, 0.03.**

**6= 7.6, 0.498, 2.018, 0.02.**

**7= 8.6, 0.331, 2.021, 0.01.**

**8=9.6, 0.164, 2.024, 0.0.**

**Control=1.6, 1.5, 2, 0.08.**



**Figura 6.28. AMONIO RESIDUAL PRESENTE AL VARIAR LA CONCENTRACIÓN DE LOS NUTRIMENTOS**

**POR *Flavobacterium* sp 21588. Tiempo de fermentación 48 h.**

**Condiciones:**

**(variación de licor, MgCl<sub>2</sub>, glucosa y aceite respectivamente)**

1= 2.6, 1.33, 2.003, 0.07.

2= 3.8, 1.66, 2.066, 0.06.

3= 4.6, 0.999, 2.009, 0.05.

4= 5.6, 0.832, 2.012, 0.04.

5= 6.6, 0.665, 2.015, 0.03.

6= 7.6, 0.498, 2.018, 0.02.

7= 8.6, 0.331, 2.021, 0.01.

8= 9.6, 0.164, 2.024, 0.0.

Control= 1.6, 1.5, 2, 0.08.

En la figura 6.29 se muestra el efecto de la concentración de los nutrimentos sobre la acumulación de los pigmentos sintetizados por *Flavobacterium* sp 21588. Se observa que a mayor concentración de licor de maíz se acumuló mayor cantidad de  $\beta$ -caroteno, disminuyendo el porcentaje de zeaxantina. El decremento de la concentración del  $MgCl_2$  afectó el crecimiento y con ello la producción (manchas VII y VIII). La glucosa y el aceite no parecen haber afectado la síntesis de zeaxantina, posiblemente por que sus concentraciones no se modificaron marcadamente. El control no presentó acumulación de  $\beta$ -caroteno, pero la concentración de zeaxantina fue menor a la de las condiciones I-VI.

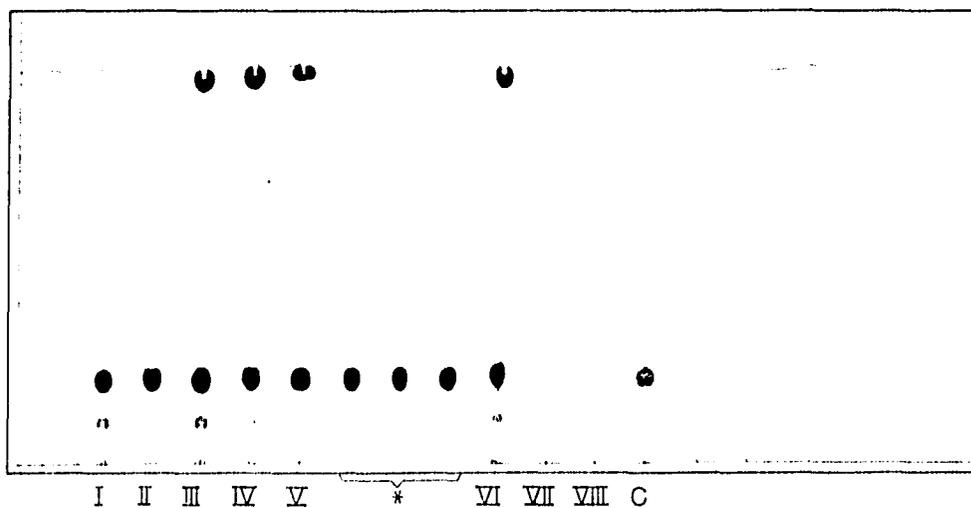


Figura 6.29. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS NUTRIMENTOS EN LA SÍNTESIS DE ZEAXANTINA POR *Flavobacterium* sp 21588. Condiciones : I = 2.6, 1.33, 2.003, 0.07. II = 3.6, 1.16, 2.006, 0.06. III = 4.6, 0.999, 2.009, 0.05. IV = 5.6, 0.832, 2.012, 0.04. V = 6.6, 0.665, 2.012, 0.04. VI = 7.6, 0.498, 2.018, 0.02. VII = 8.6, 0.331, 2.021, 0.01. VIII = 9.6, 0.164, 2.024, 0. Control = 1.6, 1.5, 2, 0.08. \* Si. zeaxantina. ( Variación del licor de maíz,  $MgCl_2$ , glucosa y aceite respectivamente).

## 6.10. OPTIMIZACION FINAL

Por el método de Box-Wilson, las concentraciones mínimas necesarias del  $MgCl_2$ , glucosa y aceite fueron: 1.166, 2.006 y 0.06 respectivamente, las cuales se mantuvieron constantes durante la búsqueda de la concentración óptima de licor de maíz.

Se realizó un experimento por triplicado en el que se evaluó el efecto de 10 diferentes concentraciones de licor de maíz sobre la producción de carotenoides totales y zeaxantina (tabla 6.11) Los incrementos se establecieron por criterio propio, considerando no tener intervalos de variación muy amplios que pudieran enmascarar los resultados, por lo que se estableció un incremento acumulado de 0.4 unidades.

Tabla 6.11. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL LICOR DE MAÍZ SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES Y ZEAXANTINA

N° Condición	Licor de maíz	% Nutrimiento			Carot. T. ( $\mu g/ml$ )	Zeaxantina ( $\mu g/ml$ )
		$MgCl_2$	Glucosa	Aceite de maíz		
1	2.8	1.166	2.006	0.06	8.22	6.10
2	3.2	1.166	2.006	0.06	8.46	7.52
3	3.6	1.166	2.006	0.06	9.10	6.12
4	4.0	1.166	2.006	0.06	10.07	6.61
5	4.4	1.166	2.006	0.06	9.30	6.62
6	4.8	1.166	2.006	0.06	9.73	5.40
7	5.2	1.166	2.006	0.06	10.34	5.80
8	5.6	1.166	2.006	0.006	11.99	5.88
9	6.0	1.166	2.006	0.06	7.76	5.78
10	6.4	1.166	2.006	0.06	7.47	5.73
C	1.6	1.5	2	0.08	5.16	5.03

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 6.30 y 6.31, de las condiciones evaluadas la condición 2 con 3.2 % de licor fue la que permitió obtener la mayor producción de zeaxantina (7.52 µg/ml), pero no así de carotenoides totales ya que estos se incrementaron proporcionalmente con respecto a la concentración del licor, llegando a valores de 11.99 µg/ml, con una concentración de licor de 5.6%. Una mayor concentración del nutrimento causó un efecto negativo en el crecimiento y por lo tanto una disminución de la producción del pigmento. Se comprobó que efectivamente el licor en altas concentraciones permitió que la bacteria sintetizara preferentemente β-caroteno por encima de zeaxantina.

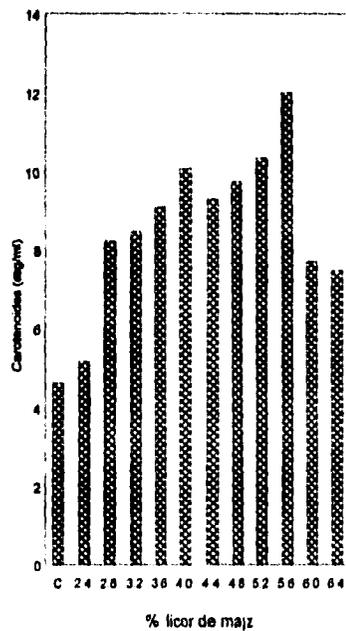


Figura 6.30. Efecto de la concentración del licor de maíz sobre la producción vol. de carotenoides totales. ( Control 1.6 % ).

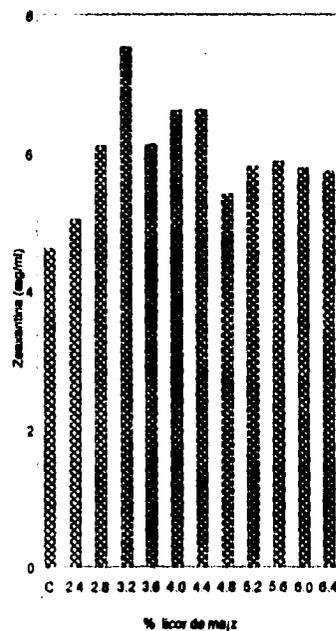


Figura 6.31. Efecto de la concentración del licor de maíz sobre la producción vol. de zexantina.

La figura 6.32, muestra el análisis cromatográfico del efecto de la concentración del licor de maíz sobre la producción de zeaxantina. Se observa que el incremento de este nutrimento favoreció la síntesis de zeaxantina, pero también la de otros carotenoides, los cuales se incrementaron de manera proporcional a la concentración del licor de maíz. La mancha de zeaxantina de la condición 2, efectivamente fue la que se observó más intensa de las condiciones evaluadas. El control con 1.6% de licor además de presentar acumulación de otros carotenoides, resultó con una mancha de zeaxantina menos intensa a la generada en las otras condiciones.

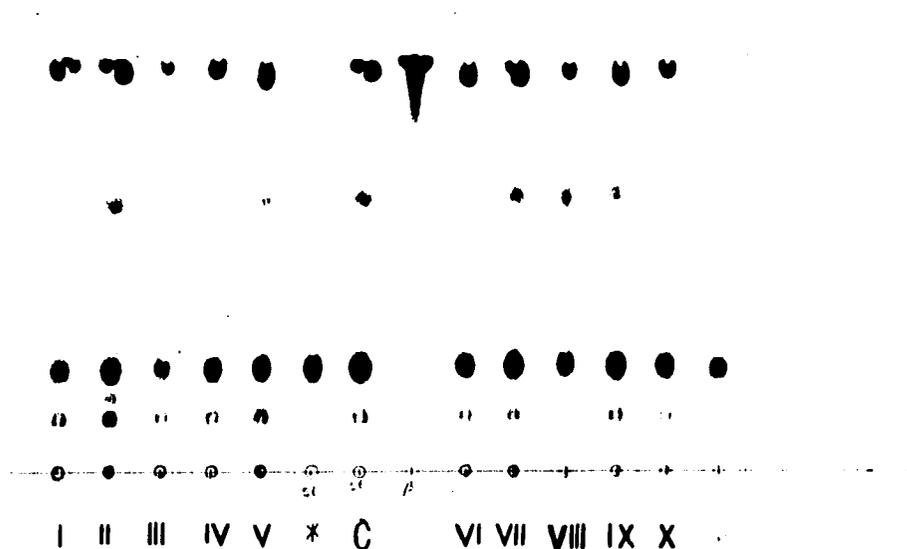


Figura 6.32. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL LICOR DE MAÍZ SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA. Concentraciones (%): I = 2.8; II = 3.2; III = 3.6; IV = 4.0; V = 4.4; VI = 4.8; VII = 5.2; VIII = 5.6; IX = 6.0 y X = 6.4. C = Control + st. interno de zeaxantina, \* St zeaxantina; † = St.  $\beta$ -caroteno.

La optimización final permitió obtener una concentración de zeaxantina de 7.52  $\mu\text{g/ml}$ , con una concentración de licor de maíz de 3.2% y con respecto a carotenoides totales, la máxima concentración alcanzada fue de 11.99  $\mu\text{g/ml}$ , con una concentración de licor de 5.6%. El medio optimizado quedo con la composición y concentración de nutrientes mostrado en la tabla 6.12. La concentración de maíz se optimizó tanto para carotenoides totales como para zeaxantina, siendo de 5.6  $\mu\text{g/ml}$  y de 3.2  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

**Tabla 6.12. MEDIO OPTIMIZADO PARA LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA.**

Nutriente	%	Zeaxantina		Carot. Totales	
		$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
Licor de maíz		3.2		5.6	
MgCl <sub>2</sub>	1.166	7.52	8.46	5.88	11.99
Glucosa	2.006				
Aceite de maíz	0.006				

La fermentación se llevó a cabo en matraces bafleados de 250 ml con 25 ml de medio de cultivo durante 48 h a 29 °C y 180 rpm.

## VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El medio modificado por Díaz que nos permitió iniciar los estudios de optimización sufrió modificaciones tanto en composición como en la concentración de los nutrientes, las cuales se muestran en las siguientes tablas.

### A) MEDIO ORIGINAL.

MEDIO PM	
("o)	
Licor de maíz	1.6
MgCl <sub>2</sub>	1.5
Glucosa	2.0
Ext. Levadura	1.8
Triptona	0.8
Aceite de maíz	0.08

La optimización se inició con el medio modificado por Díaz de la Patente de Nestlé en el que se evaluaron tres fracciones de llenado 0.4, 0.2 y 0.1 y dos pH's 6.5 y 7.2, obteniendo producciones de 0.925, 3.66 y 6.28 µg/ml de carotenoides totales respectivamente en cada fracción de llenado. El valor del pH no afectó la producción por lo que se decidió usar el pH de 7.2, el cual se manejó en experimentos previos. La pureza de los reactivos de este medio fue una mezcla de grado analítico-industrial.

#### B) MEDIO SIN TRIPTONA/EXT. DE LEVADURA.

MEDIO SI YE	
(%)	
Licor de malz	1.6
MgCl <sub>2</sub>	1.5
Glucosa	2.0
Aceite de malz	0.08

Posteriormente se eliminó el extracto de levadura y la triptona, ya que favorecían la acumulación de  $\beta$ -caroteno por encima de zeaxantina, obteniéndose producciones de 1.65, 3.50 y 3.90  $\mu\text{g/ml}$  de carotenoides totales, en fracciones de llenado de 0.4, 0.2 y 0.1 respectivamente. El 90% de los carotenoides correspondieron a zeaxantina. La pureza de los reactivos fue una mezcla de reactivos analíticos-industriales. Posteriormente se evaluó la producción con reactivos 100% industrial obteniendo producciones de 5.025  $\mu\text{g/ml}$  con fracciones de llenado de 0.1. Considerando lo anterior las mejores producciones se logran obtener cuando se usan reactivos 100 % grado industrial, un pH de 7.2 y una fracción de llenado de 0.1.

#### C) CONCENTRACIÓN DE LOS NUTRIMENTOS POCO SIGNIFICATIVOS.

MEDIO OPTIMO I	
(%)	
Licor de malz	3.6
*MgCl <sub>2</sub>	1.166
*Glucosa	2.006
*Aceite de malz	0.06

Lo siguiente fue determinar la concentración mínima necesaria de los nutrientes no significativos para la producción de zeaxantina (\*), utilizando el método de Box-Wilson, obteniendo producciones de 9.657  $\mu\text{g/ml}$  de carotenoides totales y 6.449  $\mu\text{g/ml}$  de zeaxantina.

#### D) OPTIMIZACIÓN FINAL.

MEDIO OPTIMO FINAL	
( % )	
Licor de malz	3.2
MgCl <sub>2</sub>	1.166
Glucosa	2.006
Aceite de malz	0.06

Por último se evaluarón diferentes concentraciones de licor de maíz, encontrando que 3.2% fue la concentración óptima para obtener la máxima producción de zeaxantina (7.52 µg/ml) y una producción de carotenoides totales de 8.46 µg/ml. Con respecto a carotenoides totales la concentración óptima de licor fue de 5.6% obteniendo producciones de 11.99 µg/ml. Las condiciones de fermentación fuerón 48 h, 29°C a 180rpm, en matraces Erlenmeyer bañados de 250 ml con una fracción de llenado de 0.1 y un pH de 7.2.

Comparando las producciones reportadas en estudios previos de carotenoides totales (3.2 µ/ml) y de zeaxantina (1.8 µ/ml) con las obtenidas después de la optimización 7.52 µ/ml de zeaxantina y 11.99 µ/ml de carotenoides totales, se observa que gracias a la optimización las producciones de ambos pigmentos lograron cuadruplicarse, por lo que este estudio resultó ser de gran valor al incrementarse más del doble la producción inicial.

En cuanto a costos de producción en el medio optimizado se eliminaron dos nutrimentos presentes en el medio original (extracto de levadura y triptona) reduciendo de esta manera costos de producción, además su ausencia permitió obtener zeaxantina en mayor proporción que la de otros carotenoides.

## **VIII. CONCLUSIONES.**

- \* No todas las flavobacterias probadas son capaces de producir zeaxantina.**
- \* De las cuatro flavobacterias evaluadas, *Flavobacterium* sp 21588, resultó ser la mejor cepa productora de zeaxantina.**
- \* La composición del medio de cultivo afectó de manera significativa la concentración de zeaxantina con respecto a la de otros carotenoides.**
- \* El extracto de levadura y la triptona favorecen la síntesis de  $\beta$ -caroteno por encima de zeaxantina.**
- \* El medio patente sin triptona y extracto de levadura denominado medio STYE, favorece la síntesis de zeaxantina, con poca acumulación de  $\beta$ -caroteno.**
- \* La fracción de llenado afecta de manera importante la oxigenación del sistema y con ello la capacidad de síntesis de zeaxantina por la flavobacteria, siendo 0.1 la mejor opción en el medio STYE, permitiendo un incremento importante en la producción de dicho pigmento, con poca acumulación de otros carotenoides.**
- \* El licor de maíz resultó ser el único nutrimento que afectó de manera significativa la producción, ( $p < .05$ )**
- \* Las mejores condiciones para el inóculo resultaron ser el medio YTN, con 24 h de crecimiento y una concentración del 5%, con respecto al volumen final del medio.**
- \* La variabilidad dentro de un mismo experimento resultó ser menor a la de diferentes experimentos, siendo los resultados confiables al tener un coeficiente de variación menor al 25% permitido para sistemas biológicos.**

\* El pH no influye de manera importante sobre la síntesis de zeaxantina, manteniéndose entre 7-9 durante la fermentación.

\* La concentración mínima necesaria de los nutrimentos poco significativos en la producción se determinó por el método de Box-Wilson, tomando los siguientes valores: glucosa 2.006, MgCl<sub>2</sub> 1.166 y aceite de maíz 0.06.

\* El licor de maíz a altas concentraciones favorece la síntesis de  $\beta$ -caroteno, pero no así la de zeaxantina. por lo que una concentración de 3.2 % resultó ser la óptima para obtener producciones de 7.52  $\mu\text{g/ml}$  de zeaxantina y 8.46  $\mu\text{g/ml}$  de carotenoides totales. Una Concentración de 5.6% de licor resultó ser la óptima para la producción de carotenoides totales (11.99  $\mu\text{g/ml}$ ).

\* El medio optimizado mostró la siguiente formulación: Licor de maíz 3.2%, glucosa 2.006%, MgCl<sub>2</sub> 1.166% y aceite de maíz 0.06%. Las condiciones de fermentación fuerón 48 h, a 29°C y 180 rpm, en matraces Erlenmeyer baficados de 250 ml con una fracción de llenado de 0.1 y un pH de 7.2.

## **IX. BIBLIOGRAFIA**

- \*Arancia S.A. de C.V. (1994). *Análisis proximal del licor de maíz*.
- \*Alcantara, SJ. (1995). *Estudio del efecto de los factores nutricionales sobre la producción de zeaxantina en una cepa productora del carotenoide*. Tesis de Maestría. UNAM. (Facultad de Ciencias).
- \*Badui, DS. (1980). *Pigmentos. En Química de alimentos*. Ed. Alhambra. México. pp.223-245.
- \*Badui, DS. (1981). *Aditivos. Diccionario de Química de Alimentos*. Ed. Alhambra, México. pp. 184-190.
- \*Breed, R; Murroy, E and Smith, N. (1957). *Genus III. Flavobacterium. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7th Ed. The Williams and Wilkims Co. pp. 309-322.
- \*Bergey's(1980) *Manual of Systematicve Bacteriology*. 8<sup>a</sup> Ed., Co. Editores R. Buchanan and N. Gibbons.
- \*Bertram, SJ; Kolonel, NL, Meyskens, LF. (1987). *Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans*. Cancer Research 47: 3012-3031.
- \*Bramley, JK and Mackenzie, JK. (1992). *Carotenoid biosynthesis and its regulation in fungi. In Handbook of Applied Mycology*. Vol.4. Eds. Arora D; Elander R. and Mukerji K. Marcel Dekker, N.Y. pp. 401-444.
- \*Britton, G. and Goodwin, TW. (1971). *Biosynthesis of carotenoids. In Methods in Enzymology XVIII*: 654-701.
- \*Britton, G.(1985). *General Carotenoids Methods. In Methods in Enzymology*. III:113-149.
- \*Box. GEP; Hunter, WG and Hunter JS. (1989). *Estadística para investigadores*. Reverté, S.A. pp. 301-362.
- \*Catalogue of Bacteria and Bacteriophages. (1992). *American Type Culture Collection*. Ed. Gherna, Ph.D and Pienta, MS. 18th edition.
- \*Chichester, CO; Yokoyama, H; Nakayama, TO; Lutkon, A; Mackinney, G. (1959). *Leucine metabolism and carotene biosynthesis. J. Biol. Chem.* 234: 598-602.

- \*Cutler, GR. (1984) *Carotenoids and retinol their possible importance in determining longevity of primate species*. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 7627-7631.
- \*Dasek, J; Sheperd, D et Traclnes RK. (1973). *Procédé de production de zéaxanthine*. Patente 7902889. Bélgica.
- \*Díaz, F.(1995) Tesis de Licenciatura. UNAM. (Facultad de Ciencias).
- \*Egon Stahl (1969). *Thin- Layer Chromatography A Laboratory Handbook*. 2ª Ed. Springer- Verlag Berlin. Herdelberg. N.Y. pp. 68, 264-273.
- \*Gary T. Bender, (1987). *Métodos Instrumentales de Análisis en Química Clínica*. Ed. Acribia. pp. 144-145, 254.
- \*Goodwin, TW. (1959) *Biosynthesis and function of carotenoids pigments*. Adv. Enzymology. 21: 295-336.
- \*Goodwin, TW. (1971). *Carotenoid biosynthesis. En: Carotenoids*. Ed. Otto Isler. Birkhauser Verlag Basel. pp. 579-599.
- \*F. Hoffmann-La Roche (1984). *Producción de zeaxantina*. Patente 3,891,504.
- \*Kaplan, L; Lau, J. and Stein, E. (1990). *Carotenod composition, concentrations and relationships in varios humans organs*. Clin. Physiol. Biochem. 8: 1-10.
- \*Klaui, H and Bavernfeind, C.J. (1981). *Carotenoids as food colors. In Carotenoids as colorants*. Ed. Academic Press, N.Y, pp. 48-317.
- \*Krisnky, IN. (1987). *Overview of carotenoids in medicine 8th. International Symposium on Carotenoids*. Boston Massachusetts. USA. jul. 27-31. P42A.
- \*Krisnky, IN; Mathews- Roth. MM; Taylor. RF; (1989). *Carotenoids. in Carotenoids Chemistry and Biology*. pp.41,59,67,79,231,240.
- \*Lehninger, LA. (1981) *Biosntesis de lípidos. En Bioquímica*. Ed. Omega. Barcelona. pp 671-702.
- \*Lowry, HO; Nira, J; Rosebrough, A; Lewis Farr and Rose J. Randall. (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. pp. 265-275.
- \*Manual para CAMAG TLC Software (1990). *Cats versión 3.1*.
- \*McDermott, C; Britton, G and Goodwin, W. (1973). *effect of inhibitors on zeaxanthin synthesis in a Flavobacterium*. J. Gen. Microbiol. 77:161-171.

- \*Mc Dermott, C; Brow, J and Britton, G. (1974). *Alternative pathways of zeaxanthin biosynthesis in a Flavobacterium species*. Biochem. J. 144:231-243.
- \*Nelis, JH and De Leenheer, PA. (1989). *Microbial production of carotenoids other than  $\beta$ -carotene*. In *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*. Elsevier Applied Science. N.Y. pp.43-80.
- \*Neatherburn, WM. (1967). *Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia*. Anal. Chem. 39:871-974.
- \*Nelis, JH and De Leenheer, PA. (1991). *Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds*. J. Appl. Bacteriol. 70:181-191.
- \*Newsome, R.L. (1986). *Food Colors*. Food Technology 40 (julio). pp. 49-56.
- \*Ninet L and Renaut, J. (1979). *Carotenoids*. In *Microbial technology*. 2d. Ed. vol.1. Ed. Pepler, H.J and Perlman, D. N.Y. Academic Press. pp. 529-544.
- \*Orange, WMF and Monclair, BT. (1961). *Microbiological production of carotenoids* United States Patent. Office. Patent Number 2974044.
- \*Ruddat, M and Garber, ED. (1983). *Biochemistry, physiology and genetics of carotenogenesis in fungi*. In *Secondary metabolism and differentiation in fungi*. Ed. Bennett, SH and Ciegler, A. Marcel Dekker Inc. N.Y. pp. 95-155.
- \*Rosas R. (1993). *Efecto de diversas fuentes de carbono sobre la síntesis de carotenoides en el hongo *Dacrymyces deliquescens**. Tesis de maestría. UNAM.
- \*Rosenstein E. (1989). *Pigmentos usados en la Industria Alimentaria. en Diccionario de especialidades para la Industria Alimentaria*. Ed. P.L.M. pp.15-17.
- \*Schwartz, R; Rosas, R; Farrés, A; Paredes, I y Sánchez, S (1989). *Producción microbiana de carotenoides y perspectivas de su utilización*. Boletín de Educación Bioquímica. Volumen 8. N° 3.
- \*Shoher, A et WIS, O. (1972). *Procédé pour la preparation de zeaxanthine*. Patente 770744. Bélgica.
- \*Sheperd, D et Dasek, J (1974). *Procédé de preparation de zeaxanthine*. Patente 816876. Bélgica.
- \*Sheperd, D; Dasek, J et Carels, M.(1974). *Procédé de production de zeaxanthine*. Patente 816767. Bélgica.

\*Weeks, B and Andrewes, G. (1969). *Occurrence of C40 and C45 carotenoids in the C50 carotenoid system of Flavobacterium dehydrogenans*. Arch. Biochem. Biophys. 121. 35-49.

\*Weeks, B and Garner, J. (1967). *Biosynthesis of Carotenoids Flavobacterium dehydrogenans*. Arch. Biochem. Biophys. 121:35-49.

Will, H and Scovel, A (1987). *Photoprotective functions of carotenoids*. 8th. international Symposium on Carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. 27A.

## **X. APENDICES:**

### **APENDICE 1.**

**Colorantes usados en la industria de alimentos y sus especificaciones.**

#### **Colorantes Alimenticios Naturales.**

**\*Descripción:** Los colorantes naturales, generalmente se obtienen de fuentes vegetales, ejemplos de ellos son, la paprika, annato y curcuma. Los colorantes se procesan con diferentes vehículos inertes para presentarlos como acuarresinas, oleorresinas y en polvo.

**\*Propiedades:** Se aplican en concentraciones de 0.1 a 2% dependiendo de la tonalidad, del color deseado en el alimento. El annato puede reemplazar al color amarillo N° 6. FD & C (Food Drug and Cosmetic) o mezclas del color N° 5 y N° 6 (FD & C). La curcuma puede reemplazar al color amarillo N° 5 (FD & C). La paprika produce un color rojo-naranja cuya tonalidad depende de la concentración del pigmento usado en el alimento.

**\*Aplicaciones:** En quesos, mantequilla, botanas, bebidas, cereales, helados, dulces, productos horneados, aderezos, sopas, margarinas, productos para repostería, carnes procesadas, salsa, etc.

**\*Especificaciones:** Se usa en forma líquida o en polvo y se ajustan de acuerdo al pigmento activo del color como % de bixina en annato, % de curcumin en cúrcuma y unidades internacionales de color en paprika. Los colorantes naturales son inócuos a la salud (Amer. Spice Trade Assoc.)

#### **Colorantes Alimenticios Sintéticos.**

**\*Descripción:** Son fabricados a partir de diversos productos químicos para obtener colores grado FD & C (Food Drug and Cosmetic) es decir, aprobados para uso en alimentos como: amarillo N° 5 y N° 6, azul N° 1 y N° 2 y rojo N° 3, N° 5 y N° 40. Estos colorantes llamados primarios se pueden mezclar para obtener una variedad de colores llamados secundarios. A partir de los colorantes se derivan las laca de concentración simple y doble. Los colorantes se manejan en diferentes formas.

**\*Propiedades:** Los colorantes sintéticos se usan en concentraciones menores a 0.03%. Son materias primas estables que no imparten olor o sabor ajenos al producto.

Son compuestos que no deben reaccionar con el producto o los envases, son fáciles de aplicar y económicos.

**\*Especificaciones:** Los colorantes primarios, deben tener un mínimo de 85% de concentración del color, las lacas de concentración simple desde un 12% (azul laca N° 1) al 27% (amarillo laca N° 5) y las lacas dobles de concentración desde un 36% a un 40% (azul laca doble y rojo laca doble conc. N° 3 y N° 40). Su uso esta controlado por la FDA (Food and Drug Administration) y la Secretaría de Salud.

Características de los colorantes FD&C (Food Drug and Cosmetic)			
	Color primario	Laca	
		Simple conc.	Doble conc.
Pureza %	85-93	12-27	36-41
Aplicación %	0.01-0.03	0.2-0.3	0.1-0.2
Solubilidad	agua, glicerina, propilenglicol	insolubles en la mayoría de solv.	

**Aplicaciones:**

Tipo de alimento	Colores primarios	Lacas
Chicle o goma para mascar	Mezcla con lacas	Adecuado
Bebidas carbonatadas	Adecuado	No se recomienda
Dulces (tabletas) comprimidas	Previa granulación	Muy adecuado
Aceites hidrogenados	No se recomienda	Adecuado
Dulces "macizos"	Adecuado	No se recomienda
Bebida en polvo	Adecuado	Previa encapsulado
Gelatinas	Muy adecuado	No se recomienda
Confitados	Previa disolución en glicerina	Muy adecuados
Relleno para galletas y pasteles	Adecuado	Muy adecuado

## APENDICE 2.

### ANALISIS PROXIMAL DEL LICOR DE MAIZ.

#### I) ANALISIS GENERAL

	%	Arancin
	Base comercial	
Agua,	45-55	47-49
Nitrógeno total (Kjeldahl)	2.7-4.7	5.5-8.0 (base seca)
Nitrógeno amino	1.0-1.8	
Nitrógeno volátil	0.15-0.40	
Azúcares	0.1-11.0	11 max.
Reductores directos.		(base seca)
Acido láctico	5-15	16-26 (base seca)
Cenizas	9-10	12-15 (base seca)
Acidos volátiles (como acético)	0.1-0.3	
Dioxido de azufre	0.01-0.015	

#### II) COMPOSICION DE LAS CENIZAS.

	% base seca.
Calcio	0.5-1.5
Cobre	0.0-0.001
Fierro	0.01-0.05
Manganeso	0.004
Magnesio	0.5-1.0
Fósforo	2.0-3.0
Potasio	1.0-2.0
Azúfre	0.34
Zinc	0.005

### III) MICROBIOLOGIA: Colonias/ml.

Bacterias aeróbicas.	30,000-1,000,000
Bacterias anaerobias	5,000-20,000
Bacterias microaerofilicas	10,000,000-10,000,000,000
Levaduras	10-1,000,000

### IV) NITROGENO TOTAL Y SU DISTRIBUCION

1.- Nitrógeno total : 7.3 g/100 gr de sólidos.

2.- Distribución en % del nitrógeno total.

SOLUBLE	89.1	INSOLUBLE	
Amino ácidos libres	36.9	Proteína	10.9
Amoníaco libre	6.1	No identificados	1.0
Péptidos	38.3		
Nitrógeno cuaternario	1.0		
Heterocíclicos			
No identificados	4.7		

### V. DISTRIBUCION DE AMINOACIDOS: mg nitrógeno/100 g.

Alanina	579
*Leucina	384
Prolina	506
Ornitina	224
*Lisina	363
*Arginina	489
Acido p- amino butírico	174
Asparagina	-
*Valina	290
Serina	263
*Glicina	433
*Fenilalanina	129
*Isoleucina	151
*Treonina	197
*Metionina	94
Acido glutámico	515
*Histidina	348
Acido aspártico	245
Etanolamina	8
Tirosina	47
Cistina	125

\*Aminoácidos esenciales.

**VI) VITAMINAS: mg/100 g de sólidos.**

<b>Tiamina</b>	<b>0.6</b>
<b>Riboflavina</b>	<b>1.2</b>
<b>Niacina</b>	<b>16.3</b>
<b>Piridoxina</b>	<b>1.8</b>
<b>Acido pantoténica</b>	<b>3.0</b>
<b>Acido fólico</b>	<b>0.3</b>
<b>Biotina</b>	<b>0.04</b>

**Datos proporcionados por Arancia S.A de C.V. (06/16/94).**

### **APENDICE 3.**

#### **ANALISIS ESTADISTICO.**

**La investigación científica es un proceso de aprendizaje dirigido. El objeto de los métodos estadísticos es hacer que ese proceso sea lo más eficiente posible. El diseño de experimentos nos permite conocer las zonas oscuras que tenemos con el conocimiento actual del problema y cuya iluminación consideramos un avance importante.**

**Para un investigador es posible realizar una investigación sin estadística, sin embargo es mucho mejor el científico que utiliza métodos estadísticos. Aun cuando los datos no sufran ninguna perturbación causada por un control incompleto del entorno del experimento o por errores de medida. La inducción de la realidad propia de sistemas complejos es muy difícil. La existencia de errores experimentales hace la tarea aún más difícil. En estas circunstancias se aprovecha mejor la inteligencia y el conocimiento del tema del investigador cuando tiene herramientas estadísticas a su disposición.**

**Los experimentos se pueden realizar secuencialmente, de modo que la información obtenida en un grupo de experimentos pueda ser utilizada directamente en la elección de los siguientes, obteniendo resultados congruentes, sin dejar de evaluar zonas importantes del sistema a evaluar.**

**Los diseños factoriales facilitan el descubrimiento de similitudes y simplificaciones entre variables y así ayudan en el proceso de construcción de modelos. Estos diseños también proporcionan estimaciones con el mínimo de contaminación por error experimental posible, de los "efectos" de los cambios. Con el diseño el comportamiento de cada variable a distintos niveles de otras variables puede ser inmediatamente apreciado, facilitando la elección de un modelo. Por el contrario en un ordenamiento al azar, es muy difícil o imposible hacer las comparaciones de un modelo.**

Para realizar un diseño factorial general, el investigador selecciona un número fijo de "niveles" para cada una de un conjunto de variables (factores) y luego hace experimentos con todas las combinaciones posibles. Si hay  $l_1$  niveles para la primera variable,  $l_2$  para la 2ª, ..., y  $l_k$  para la k-ésima, el conjunto de todas las  $l_1 \times l_2 \times \dots \times l_k$  condiciones experimentales se llama diseño factorial  $l_1 \times l_2 \times \dots \times l_k$ . Por ejemplo un diseño factorial  $2 \times 3 \times 5$  comprende 30 experimentos elementales.

Es posible evaluar un factor cada vez, obteniendo una estimación del efecto de una única variable a condiciones seleccionadas y fijas de las demás.

**\*Importancia:**

- 1.- Requieren relativamente pocos experimentos elementales por cada factor y pueden indicar tendencias y con ello determinar una dirección prometedora para futuros experimentos.
- 2.- La interpretación de las observaciones producidas por estos diseños se puede realizar en gran parte a base de sentido común y aritmética elemental.

**Desviación típica.** Es la variación entre las observaciones asociadas, nos permite conocer que variables de un determinado experimento son significativamente importantes sobre la respuesta.

**Algoritmo de Yates.** Es un método que nos permite calcular de manera rápida los efectos de las variables sobre la respuesta de interés, se puede utilizar para un diseño factorial  $2^k$  replicado. Se aplica una vez que las observaciones se han ordenado al azar en orden estándar. Un diseño factorial está en orden estándar cuando, la 1ª columna de la matriz de diseño consta de signos menos y mases alternados; la 2ª, es de parejas de signos alternados; la 3ª, de cuatro signos menos seguidos de cuatro signos más y así sucesivamente. La matriz del diseño da las condiciones experimentales en orden estándar.

El análisis estadístico de los diferentes tratamientos se realizó mediante la aplicación de diseños factoriales completos a dos niveles, usando el algoritmo de Yates y el método de Box-Wilson. El análisis de varianza, sirvió para simplificar cálculos y generar un estudio más completo, lo cual permitió conocer que variables fisicoquímicas y nutrientes afectaban de manera significativa la producción de zeaxantina.

En un diseño factorial completo se toman en cuenta todas aquellas variables que se cree afectan la producción de manera positiva ó de manera negativa. Se elaboran matrices  $2^n$  donde  $n$  es el número de variables a evaluar, al realizar el análisis se conoce que variables son las más importantes en la respuesta y para el siguiente experimento nos indica que tanto aumentar o disminuir dichos parámetros en el medio base.

Cada condición evaluada se realizó por triplicado para reducir errores de variabilidad. Se estableció un coeficiente de variación de 25% como límite máximo por tratarse de sistemas biológicos y poder considerar reproducibilidad entre los resultados.

**ANÁLISIS DE VARIANZA DEL EFECTO DEL pH, VOLUMEN DE LLENADO  
Y MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA POR  
Flavobacterium sp 21588.**

Se realizó un estudio de optimización de las condiciones necesarias para la producción de zeaxantina en dos medio de cultivo (PM Y STYE), con dos valores de pH (6.5 y 7.2) y dos fracciones de llenado (0.1 y 0.2). Cada análisis se realizó por triplicado.

DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3 V3 5 V4 7 V5 9-12,  
FORMATS V5 (F4.2).

BEGIN DATA.

24 cases are written to the uncompressed active file.

This procedure was completed at 0:27:01  
DISPLAY.

-----  
Page 2 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
PRODUCCION DE ZAEXANTINA POR Flavobacterium sp  
V1 - \* No label \*  
V2 - \* No label \*  
V3 - \* No label \*  
V4 - \* No label \*  
V5 - \* No label \*

LIST.

-----  
Page 3 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
PRODUCCION DE ZAEXANTINA POR Flavobacterium sp

V1	V2	V3	V4	V5
1	1	1	1	2.46
1	1	1	2	3.09
1	1	1	3	2.95
1	1	2	1	3.57
1	1	2	2	3.05
1	1	2	3	3.36
1	2	1	1	2.14
1	2	1	2	2.05
1	2	1	3	1.92
1	2	2	1	1.67
1	2	2	2	1.85
1	2	2	3	1.84
2	1	1	1	1.75
2	1	1	2	1.58
2	1	1	3	1.70
2	1	2	1	1.31
2	1	2	2	1.34
2	1	2	3	1.36
2	2	1	1	.76

V1 V2 V3 V4 V5  
 2 2 1 2 .98  
 2 2 1 3 1.26  
 2 2 2 1 1.04  
 2 2 2 2 1.62  
 2 2 2 3 1.06

Number of cases read = 24 Number of cases listed = 24

This procedure was completed at 0:27:17

VARIABLE LABELS V1 'MEDIOS'  
 V2 'VOLUMEN DEL INOCULO'  
 V3 'PH'  
 V4 'REPETICIONES'  
 V5 'ZEAXANTINA PRODUCIDA (ug/mL)'.  
 VALUE LABELS V1 1 'MEDIO PATENTE'  
 2 'MEDIO ( ) / STYB'  
 V2 1 '25 mL INOCULO'  
 2 '50 mL INOCULO/'  
 V3 1 'pH 6.5'  
 2 'pH 7.2/'  
 V4 1 'REPETICION 1'  
 2 'REPETICION 2'  
 3 'REPETICION 3'.

DISPLAY.

V1 - MEDIOS  
 V2 - VOLUMEN DEL INOCULO  
 V3 - PH  
 V4 - REPETICIONES  
 V5 - ZEAXANTINA PRODUCIDA (ug/mL)

ONEWAY V5 BY V1 (1,2) /STATISTICS ALL.

----- O N E W A Y -----

Variable V5 ZEAXANTINA PRODUCIDA (ug/mL)  
 By Variable V1 MEDIOS

Analysis of Variance						
Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.	
Between Groups	1	8.3898	8.3898	30.6516	.0000	
Within Groups	22	6.0218	.2737			
Total	23	14.4116				

----- O N E W A Y -----

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	12	2.4958	.6711	.1937	2.0694 To 2.9222
Grp 2	12	1.3133	.3115	.0899	1.1154 To 1.5112
Total	24	1.9046	.7916	.1616	1.5703 To 2.2388
Fixed Effects Model			.5232	.1068	1.6831 To 2.1261
Random Effects Model				.5913	-5.6080 To 9.4171
Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance					.6763

Group	Minimum	Maximum
Grp 1	1.6700	3.5700
Grp 2	.7600	1.7500
Total	.7600	3.5700

Tests for Homogeneity of Variances

Cochrans C = Max. Variance/Sum(Variances) = .8228, P = .017 (Approx.)  
 Bartlett-Box F = 5.691, P = .017  
 Maximum Variance / Minimum Variance 4.642

This procedure was completed at 0:27:46  
 ONEWAY V5 BY V2 (1,2) /STATISTICS ALL.

----- O N E W A Y -----

Variable V5 ZEAXANTINA PRODUCIDA (ug/mL)  
 By Variable V2 VOLUMEN DEL INOCULO

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	1	3.8270	3.8270	7.3990	.01254
Within Groups	22	10.7846	.4902		
Total	23	14.4116			

PRODUCCION DE ZAEANTINA POR Flavobacterium sp

----- O N E W A Y -----

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean	
Grp 1	12	2.2933	.8706	.2513	1.7402	To 2.8465
Grp 2	12	1.5158	.4717	.1362	1.2161	To 1.8155
Total	24	1.9046	.7916	.1616	1.5703	To 2.2388
Fixed Effects Model			.7001	.1429	1.6082	To 2.2010
Random Effects Model				.3888	-3.0350	To 6.8441
Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance						.2614

Page 13 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
 PRODUCCION DE ZAEANTINA POR Flavobacterium sp

Group	Minimum	Maximum
Grp 1	1.2100	3.5700
Grp 2	1.2600	2.1400
Total	.7600	3.5700

Tests for Homogeneity of variances

Cochrans C = Max. Variance/Sum(Variances) = .7730, P = .054 (Approx.)  
 Bartlett-Eox F = 3.733, F = .054  
 Maximum Variance / Minimum Variance 3.406

Page 14 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
 PRODUCCION DE ZAEANTINA POR Flavobacterium sp

This procedure was completed at 01:28:04  
 ONEWAY V5 BY V3 (1,2) /STATISTICS ALL.

Page 15 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
 PRODUCCION DE ZAEANTINA POR Flavobacterium sp

----- O N E W A Y -----

Variable V5 ZEAXANTINA PRODUCIDA (ug/mL)  
 By Variable V3 PH

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	1	.0077	.0077	.0118	.9146
Within Groups	22	14.4039	.6547		
Total	23	14.4116			

Page 16 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80

FALLA DE ORIGEN

----- ONE WAY -----

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	12	1.8867	.7155	.2065	1.4321 To 2.3413
Grp 2	12	1.9225	.8930	.2578	1.3551 To 2.4999
Total	24	1.9046	.7916	.1616	1.5703 To 2.2388
Fixed Effects Model			.0091	.1652	1.5620 To 2.2471
Random Effects Model				.1652	-.1941 To 4.0032

WARNING - Between component variance is negative  
 it was replaced by 0.0 in computing above random effects measures

Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance - .0539

Page 17 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
 PRODUCCION DE ZEAXANTINA POR Flavobacterium sp

Group	Minimum	Maximum
Grp 1	.7600	3.0000
Grp 2	1.0400	3.5700
Total	.7600	3.5700

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C = Max. Variance/Sum(Variances) = .6091, P = .474 (Approx.)  
 Bartlett-Box F = .513, P = .474  
 Maximum Variance / Minimum Variance 1.358

Page 18 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
 PRODUCCION DE ZEAXANTINA POR Flavobacterium sp

This procedure was completed at 0:28:23  
 ANOVA V5 BY V1 (1,2) V2 (1,2) V3 (1,2).

'ANOVA' PROBLEM REQUIRES 986 BYTES OF MEMORY.

Page 19 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
 PRODUCCION DE ZEAXANTINA POR Flavobacterium sp

\* \* \* ANALYSIS OF VARIANCE \* \* \*

BY V5 ZEAXANTINA PRODUCIDA (ug/mL)  
 V1 MEDIOS  
 V2 VOLUMEN DEL INOCULO  
 V3 PH

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Signif of F
Main Effects	12.025	3	4.008	84.427	> .000
V1	8.390	1	8.390	176.721	> .000
V2	3.627	1	3.627	76.399	> .000
V3	.008	1	.008	.162	< .692

\*\*\*\*\*

2-way Interactions			.971	3	.324	6.816	>	.004
V1	V2		.917	1	.917	19.305	>	.000
V1	V3		.044	1	.044	.931	>	.349
V2	V3		.010	1	.010	.211	<	.652

Page 20 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
 PRODUCCION DE ZAEXANTINA POR Flavobacterium sp

3-way Interactions			.657	1	.657	13.833		.002
V1	V2	V3	.657	1	.657	13.833		.002
Explained			13.652	7	1.950	41.080		.000
Residual			.760	16	.047			
Total			14.412	23	.627			

24 Cases were processed.  
 0 CASES ( .0 PCT) were missing.

Page 21 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
 PRODUCCION DE ZAEXANTINA POR Flavobacterium sp

This procedure was completed at 0:28:46  
 ANOVA V5 BY V1 (1,2) V2 (1,2) V3 (1,2) /OPTIONS 3.

'ANOVA' PROBLEM REQUIRES 410 BYTES OF MEMORY.

Page 22 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
 PRODUCCION DE ZAEXANTINA POR Flavobacterium sp

\*\*\* ANALYSIS OF VARIANCE \*\*\*

BY V5 ZEAXANTINA PRODUCIDA (ug/mL)  
 V1 MEDIOS  
 V2 VOLUMEN DEL INOCULO  
 V3 PH

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Signif of F
Main Effects	12.025	3	4.008	33.583	.000
V1	8.390	1	8.390	70.296	.000
V2	3.627	1	3.627	30.390	.000
V3	.008	1	.008	.065	.802
Explained	12.025	3	4.008	33.583	.000
Residual	2.387	20	.119		
Total	14.412	23	.627		

Page 23 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
 PRODUCCION DE ZAEXANTINA POR Flavobacterium sp

24 Cases were processed.  
 0 CASES ( .0 PCT) were missing.

Page 24 ANALISIS ESTADISTICO DE OPTIMIZACION DE CONDICIONES 1/1/80  
 PRODUCCION DE ZAEXANTINA POR Flavobacterium sp

This procedure was completed at 0:29:01

**Tabla 1. VARIABILIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES Y ZEAXANTINA EN UN MISMO EXPERIMENTO.**

N° Matraz	Carot. totales ( $\mu\text{g/ml}$ )	Zeaxantina ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	3.99	3.63
2	3.74	3.40
3	3.10	2.82
4	4.05	3.68
5	4.04	3.67
6	4.57	4.15
7	3.74	3.40
8	3.85	3.59
9	4.26	3.87
10	3.36	3.05
Promedio	3.88	3.52
Desviación estándar	$\pm 0.4229$	$\pm 0.383$
Coefficiente de variación	10.99%	10.87%

El experimento se llevó a cabo en matraces bafleados de 250 ml con 25 ml del medio STYE (reactivos analíticos-industriales), incubados durante 48 h a 29 °C y 180 rpm.

**Tabla 2. VARIABILIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES EN DIFERENTES EXPERIMENTOS.**

N° Exp.	Carot. Totales (µg/ml)			Promedio	Desv. st (%)	C.V (%)
1	2.82	3.25	3.07	3.046	.021	7.08
2	3.89	3.45	3.69	3.69	0.22	6.0
3	3.99	4.05	4.03	4.02	0.03	0.7
4	4.20	4.07	5.45	4.37	0.76	16
5	4.57	4.28	3.75	4.2	0.41	9.9

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en fechas diferentes, en matraces bafleados de 250 ml con 25 ml de medio STYE, incubados 48 h a 29°C y 180 rpm.

**Tabla 3. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA EN DIFERENTES EXPERIMENTOS.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F	Significancia (P < 0.05)
Diferentes experimentos	4	2.3435	0.5859	10.3173	***
En un mismo experimento	10	0.5679	0.0568		

El análisis se realizó con los datos presentados en la tabla 5.7, utilizando la prueba de Cochran a un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 4. ANÁLISIS DE HOMOGENEIDAD DE GRUPOS DE LA PRODUCCIÓN DE ZEAXANTINA EN DIFERENTES EXPERIMENTOS.**

<b>N° Experimento</b>	<b>N° Repeticiones</b>	<b>Medio de Producción (µg/ml)</b>	<b>Homogeneidad de grupos</b>
1	3	3.70	**
2	3	4.02	**
3	3	4.20	**
4	3	3.05	*
5	3	3.83	**