

54
2 ej^o



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE
PRODUCCION DE ZEAXANTINA, UTILIZANDO
UNA CEPA DE *Flavobacterium* sp**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

F A B I A N D I A Z L U N A



ASESOR: M. en BIOTECNOLOGIA ANA MARIA OBREGON LIMUS

MEXICO, D.F.

1996

**TESIS CON
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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCION DE ZEAXANTINA
UTILIZANDO UNA CEPA DE Flevobacterium sp."
realizado por Fabián Díaz Luna

con número de cuenta 7938865-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M. en Biotecnología Ana María Obregon Lemus

Propietario M. en C. Juan Sainz Rojas

Propietario Dr. en C. Clara Esquivel Huesca

Suplente Biol. Carmen Noemi Herrera Sanchez

Suplente Biol. Carlos Alberto Castillo Pompeyo

Consejo Departamental de Biología

COORDINACIÓN GENERAL
DE BIOLOGIA

EVALUACION DE LAS CONDICIONES
DE PRODUCCION DE UN PIGMENTO
AMARILLO (ZEAXANTINA)
UTILIZANDO UNA CEPA DE *Flavobacterium* sp.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la participación de cada una de las personas que de un modo u otro contribuyeron a la realización de este trabajo.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por la oportunidad, su apoyo y por las observaciones y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: Elia, Gilberto, Ruben, Daniel, Raúl, Dulce, Donato, Bety, Eneida, Romina, Angeles y Alejandra, por su amistad y compañerismo.

Agradezco de manera especial a mi compañera y Araceli Bautista F. , su sincera amistad, sus frecuentes palabras de animo y su apoyo incondicional.

A mi amigo Sergio Alcantara con quien he tenido la agradable oportunidad de compartir además momentos de trabajo, nuestra experiencia y parecer de la vida cotidiana.

A Laura Escalante y Lulú Sato a quienes admiro como compañeras de trabajo y como madres.

DEDICATORIAS

El bienestar futuro de individuos como yo, se va acuñando con el trabajo y con la ayuda espontanea, sin un "gran plan maestro", en una busqueda necesaria y voluntaria a la que también llegan la disposición y las actitudes de la gente que nos ama.

A mis padres

Pedro Díaz García y María del Carmen Luna Martínez

Quienes se inclinaron por que adquiriera educación de manera libre, lo que yo considero la mejor herencia.

A mis hermanos

María del Carmen María Cristina

Janett y Paulo César

Por su silenciosa pero siempre presente confianza.

A mi asesora *Ana María Obregon Lemus*

Cuya orientación y ejemplo, acrecentaron mi confianza,
iniciando así mi preparación como profesionista;
por su incuestionable disposición y paciencia
también gracias.

A mis compañeros del grupo "*Adictos Anonimos*"

Quienes son para mí: guía, la crítica más sana y sincera
sobre mi conducta y desarrollo personal.



Especialmente a *Fabiola*

mi compañera, mi amiga, mi pareja,
mi apoyo, lugar frecuente de mis reflexiones
y clara realidad sobre la que se dibujan
los sentidos de mi vida.



INDICE

1	INTRODUCCION	
1.1	HISTORIA.....	3
1.2	EL USO DE COLORANTES (SINTETICOS Y NATURALES) EN ALIMENTOS MEDICAMENTOS Y COSMETICOS.....	3
1.3	PROHIBICION DE LOS SINTETICOS.....	5
1.4	MERCADO.....	11
1.5	LOS CAROTENOIDES EN EL MERCADO.....	12
2	GENERALIDADES DE CAROTENOIDES	
2.1	DEFINICION Y ESTRUCTURA.....	14
2.2	BIOSINTESIS.....	15
2.3	IMPORTANCIA (FUNCION BIOLOGICA , EN SALUD, CLINICA Y ECONOMICA).....	20
3	ANTECEDENTES	
3.1	INVESTIGACION EN CAROTENOIDES.....	21
3.2	EL CASO DE LA ZEAXANTINA.....	23
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
5	OBJETIVOS	
5.1	GENERAL	27
5.2	ESPECIFICOS.....	27
6	MATERIALES Y METODOS	
6.1	MATERIAL BIOLOGICO.....	28
6.2	MEDIOS DE CONSERVACION.....	28
6.3	MEDIOS DE PROPAGACION.....	28
6.4	MEDIOS DE PRODUCCION.....	28
6.5	PREPARACION DEL INOCULO.....	29
6.6	FERMENTACION.....	29
6.7	METODOS.....	29
6.7.1	TOMA DE MUESTRAS.....	29
6.7.2	EXTRACCION.....	29
6.7.3	CROMATOGRAFIA.....	30
6.7.4	ESTIMACION DEL CRECIMIENTO.....	30
6.7.5	DETERMINACION DE GLUCOSA.....	30
6.7.6	DETERMINACION DE AMONIO.....	31

6.7.7 DETERMINACION DE FOSFORO.....	31
6.7.8 DETERMINACION DE pH.....	31
7 RESULTADOS Y DISCUSION.....	32
8 CONCLUSIONES.....	72
9 BIBLIOGRAFIA.....	73
ANEXOS.....	78

1 INTRODUCCIÓN

1.1 HISTORIA

El uso de colorantes orgánicos e inorgánicos por el hombre se remonta a tiempos prehistóricos y su uso obedecía a motivos religiosos, culturales, sociales, ambientales etc.

Los egipcios, los utilizaban para colorear dulces, el mineral de cobre para sombrear los ojos, la hena para el cabello, el carmín para los labios, khol y compuestos de antimonio para pintar cejas, párpados y pestañas. En la India la gente empleaba el azafrán para pintarse la cara de amarillo y con hena los pies. En China usaban los extractos vegetales para pintarse los pies y en América las mejillas; de este modo podrían enumerarse mas ejemplos de diferentes culturas, que representan la historia en el uso de los colorantes.

1.2 USO DE LOS COLORANTES EN ALIMENTOS MEDICAMENTOS Y COSMÉTICOS

Es incuestionable que el color es un importante atributo de la comida. Este es probablemente una de las primeras características percibidas por los sentidos y es indispensable para el moderno consumidor como una manera mas rápida para la identificación y última aceptación de la comida. (Noonan, 1980).

Definición del color. El color puede ser considerado como una combinación de un tipo de luz y una característica física de un objeto, percibidos visualmente por cada sujeto en particular; la percepción del color se basa en una serie de procesos físicos, químicos, fisiológicos y psicológicos (Zollinger, 1978). En este caso la fuente de iluminación condiciona fuertemente la apreciación del color por las personas. El color es pues un factor muy importante en la calidad y aceptación de un producto, puesto que las sensaciones que percibe el hombre cuando observa un objeto en particular, las asocia con las cosas que le rodean, esto es especialmente evidente en el área alimentaria donde la relación entre el color y el sabor son muy importantes para que el consumidor adquiera un producto.

El atractivo visual de los alimentos es uno de los primeros factores de elección para el consumidor, esto se debe a que el color exterior es un índice inmediato de calidad, no siempre razonable pero que influye en la aceptación de un producto novedoso. Un producto fresco o procesado debe tener un color que provoque una estimulación de la percepción visual; incluso que evoque un sabor y un olor agradable, así como la sensación de que es bueno para la salud. (Trimolieres, 1979).

En el área de los alimentos los colorantes son usados como aditivos. De acuerdo con el Codex Alimentarius 1988. Un aditivo es aquella sustancia que se añade de manera intencional a los alimentos, por lo general en pequeña cantidad para mejorar su apariencia, sabor, color, para ayudar a su preservación, etc. (Marmion, 1979). De acuerdo con la definición utilizada por la Secretaria de Salud, en México los aditivos son aquellas sustancias que se añaden a los alimentos y bebidas con el objeto de proporcionar o intensificar el aroma, color o

sabor, prevenir cambios indeseables o modificar en general su aspecto físico. No obstante queda prohibido su uso para ocultar sus defectos de calidad (Diario Oficial de la Federación, Ley General de Salud, 1988).

Con respecto a los colorantes, un aditivo colorido es cualquier colorante, pigmento u otra sustancia obtenida por síntesis o arteificio similar o extraída, aislada o derivada, con o sin intermediarios del cambio final de identidad a partir de un vegetal, animal o mineral u otra fuente y que cuando es añadida o aplicada a los alimentos, medicamentos o cosméticos, al cuerpo humano o cualquier parte por sí misma es capaz de impartir color (sola o a través de una reacción con otra sustancia) (FDA, 1986). Esta definición trata de englobar tanto a la fuente de procedencia como a las partes donde puede ser aplicado el colorante.

En México, la Secretaría de Salud en su definición de colorantes atiende el origen de la sustancia, caracterizándola como aquella obtenida de los vegetales, animales, minerales o por síntesis y que es empleada para impartir o acentuar el color a los alimentos y bebidas y mejorar la aceptación de los consumidores (Diario Oficial de la Federación, Ley General de Salud, 1988), sin especificar su uso o aplicación. Los colorantes pueden clasificarse en varias formas, estas se basan en su procedencia o fuente de origen, en su certificación, o por su grupo cromóforo, esto es, el radical que le confiere un determinado color.

En el cuadro 1 tenemos un ejemplo de clasificación de colorantes por su procedencia, según Santos, 1988.

CUADRO 1. CLASIFICACIÓN DE COLORANTES POR SU PROCEDENCIA

NATURALES		SINTÉTICOS	
ORGÁNICOS:		ORGANICOS:	
Vegetales	Antocianinas Betalaínas Carotenoides Flavonoides Clorofila Otros	Azo Atraquinonas Otros	
Animales	Ácido carnínico Ácido kermésico		
INORGÁNICOS:			
Minerales	Azul ultravioleta Negro carbón Dioxido de titanio		

Las mejoras en el procesamiento de los alimentos han hecho necesario el uso de colorantes para cubrir las deficiencias que ocurren por el mismo; la adición de colorantes se utiliza para:

- 1) Reestablecer la apariencia original de los alimentos donde los colorantes originales han sido destruidos por el proceso de manufactura, el almacenamiento y control de los alimentos.
- 2) Uniformar las variaciones naturales en la intensidad del color y asegurar su apariencia constante y aceptabilidad.
- 3) Para ayudar a proteger el sabor.
- 4) Ayudar a preservar la identidad o carácter por el cual los alimentos son reconocidos.
- 5) Para servir como indicativo visual de la calidad del producto (Newsome, 1986; Diario oficial de la federación, 1988).

Según Drew y Lyons, (1988) los colorantes para alimentos; idealmente deben:

- a) Tener una alta fuerza de color, ser baratos y estar disponibles en un rango variado y reproducible de tonos.
- b) Tener consistentemente una alta pureza y ser aceptables toxicológicamente.
- c) Estar disponibles en una forma hidrosoluble y liposoluble.
- d) Ser estables a diversas condiciones de procesamiento y almacenamiento.

Estas condiciones son cubiertas por los colorantes artificiales, sin embargo, aquellos permitidos para alimentos, varían de un país a otro, y además el número de colorantes permitidos ha sido reducido gradualmente.

Los colorantes naturales que se utilizan para alimentos frecuentemente tienen propiedades tintóreas mucho menores que los sintéticos, su pureza varía considerablemente de lote a lote, además de que son relativamente costosos según su nivel de uso. Generalmente están disponibles en un amplio rango de tonos, sin embargo, se encuentran limitados por problemas de solubilidad en el alimento y de inestabilidad durante el proceso y el almacenamiento. A pesar de esto, la mentalidad típica de un consumidor actual tiene preferencia por los alimentos de aspecto natural, asociándolos a una noción subjetiva de inocuidad (Drew y Lyons, 1988); por lo que el interés en el uso de colorantes naturales se ha ido incrementando, y este interés persistirá si los colorantes artificiales continúan siendo prohibidos.

1.3 PROHIBICIÓN DE LOS SINTÉTICOS

Hasta mediados del siglo XIX los colorantes que se utilizaban eran de origen natural, pero en 1856 Perkin desarrolló el primer colorante orgánico sintético (el mauve, púrpura de anilina o púrpura de tiro), el cual fue el primer ejemplo del grupo de colorantes azo derivados del naftaleno. Con este descubrimiento se incrementaron las

investigaciones sobre otros colorantes sintéticos, los cuales demostraron en poco tiempo, ser mejores que los naturales en cuanto a uniformidad, valor tintóreo y en sus propiedades de aplicación. Comparados con los colorantes naturales los sintéticos presentan las siguientes ventajas:

- Gran firmeza en el color
- Amplio intervalo de tinte
- Bajo costo en su uso
- Alta efectividad
- Baja variación de lote a lote
- No presentan aromas o sabores de especias.
(Zollinger, 1978).

Bajo estas bases se inició el auge de los compuestos sintéticos, los cuales incluyeron sustancias nocivas para la salud del consumidor. Uno de los atributos mas grandes de los alimentos es el color; los alimentos pueden adquirir su color de varias fuentes. Una de las principales fuentes es la de los pigmentos naturales de vegetales y animales. Estos pigmentos naturales son altamente susceptibles a los cambios químicos como la maduración de la fruta; también son sensibles a los efectos químicos y físicos durante el procesamiento de los alimentos. Por lo anterior en su procesamiento se lleva a cabo la adición de colorantes naturales o sintéticos que favorecen la apariencia del mismo.

La adición de aditivos en alimentos puede tener riesgos para la salud del consumidor según sea la naturaleza de estos y la susceptibilidad particular del mismo; por lo que el público debe ser protegido en los asuntos relacionados con su salud y su economía, en conceptos tan amplios como la seguridad, pureza, sanidad y valor justo. (Potter, 1973).

En los Estados Unidos después de una serie de trabajos sobre reglamentación en estos aspectos se estableció con carácter obligatoria, el Acta de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (1938). En ella se restringe y especifica el uso de colorantes artificiales. Dentro de esta ley quedó incluida "La Enmienda Sobre Aditivos de Colorantes" en 1960. Esta enmienda incluye en su definición a todos los aditivos colorantes como los tintes, pigmentos y otras sustancias que pueden transmitir color a un alimento, ya sea sintéticos o elaborados de otra manera. Además enumera todos los aditivos colorantes permitidos y sus tolerancias, en los casos en los que estas se hayan establecido. Establece normas de composición para los aditivos colorantes y estipula la certificación por el fabricante de lotes individuales mediante examen químico, por la FDA (La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) para sujetar su pureza y seguridad (Potter, 1973; Noonan, 1980). En su título primero, la FDA trata sobre la permisibilidad de un colorante para cualquier uso, fundamentalmente si este tiene riesgos para inducir cáncer cuando es ingerido por el hombre o un animal; el título

segundo trata sobre la Ley temporal, diseñada para permitir el uso corriente de aditivos de color, pendientes de documentación científica necesaria para determinar los sustituyentes de este material, para la lista permanente. La lista provisional y permanente de la FD&C se agrupa así: (cuadro 2); (Noonan, 1980).

Cuadro 2. Lista provisional y permanente de aditivos de color certificados por la FDA.

Lista provisional	Lista permanente
FD&C Rojo N°2	FD&C Amarillo N°5
FD&C Rojo N°4	FD&C Rojo N°3
FD&C Amarillo N°6	FD&C Azul N°1
FD&C Azul N°2	FD&C Rojo N°40
FD&C Violeta N°1	Naranja B
FD&C Verde N°3	Rojo Citrico N°2

El mismo trabajo incluye la clasificación y estructura de los colorantes certificados (FD&C Dyes); (cuadro 3).

Cuadro 3. Colorantes certificados para alimentos

Nombre oficial	Clasificación	Aplicaciones	Estado actual
Rojo N° 3 (eritrosina)	Xanteno	Rosa -azulado	Listado
Rojo N° 40	Monozano	Rojo-amarillento	Listado
Amarillo N° 5 (tartrazina)	Pirazolona	Verde-amarillo	Listado
Azul N° 1	Trifenilmetano	Verde-azul	Listado
Azul N° 2	Indigoide	Azul intenso	Listado
Verde N° 3	Trifenilmetano	Verde-azulado	Listado
Naranja B	Pirazolona	Rojo-amarillo	Listado

Los colorantes artificiales merecen considerable atención en su uso como aditivos de alimentos, pues posiblemente tienen relación con la hiperquinesis como se reporta en los trabajos de Slamy y Shucard y Col. 1982; y Stare y Col. 1980, los cuales evalúan en sus trabajos la relación entre la hiperquinesis, los salicilatos, colorantes y saborizantes artificiales, los cuales son propuestos por el Dr. Feingold como responsables de este síndrome; y la relación con alergias provocadas en algunos individuos; también por la posible carcinogenicidad de algunos como lo son: el Rojo 8, 9, 19 y 37 D y C y el Naranja 17. (Huls, 1987).

Muchos colorantes al parecer causan ciertos daños menores como por ejemplo el amarillo sunset, al que se asocian problemas de alergia; la tartrazina con reacciones como el asma o la rinitis y parece inducir o agravar síntomas de hiperactividad, especialmente en los niños (Walford, 1980).

Después de 1980, en E.U.A. se permitieron solo ocho colorantes sintéticos y veinte de origen natural (cuadro 4).

Cuadro 4. Colorantes exentos de certificación para los Estados Unidos de América.

Extracto de annato
Betabel deshidratado (polvo)
Azul ultramarino
Cantaxantina
Caramelo
 β -apo-8-carotenol
 β -caroteno
Extracto de cochinilla (carmin)
Harina de semilla de algodón (parcialmente tostada)
Glutamato de hierro
Extracto de cáscara de uva (enocianina)
Oxido de hierro sintético
Jugo de frutas
Jugo de vegetales
Harina de algas secas
Tagetes y extracto (oro azteca)
Aceite de zanahoria
Aceite de endospermo de malz
Paprika
Oleoresina de paprika
Riboflavina
Azafrán
Dioxido de titanio
Turmerico
Oleoresina turmérica

El uso de determinados colorantes varia según el país; en el cuadro 5, se muestran como ejemplo, los colorantes permitidos para la Comunidad Económica Europea y los permitidos para la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (AMC) de los Estados Unidos.

Cuadro 5. Colorantes permitidos por la Comunidad Económica Europea (CEE) y por la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (A.M. y C.)

Color	CEE	A.M. y C.
Sintéticos		
Rojo allura	No permitido	Rojo nº 40
Azul brillante FCF	No permitido	Azul Nº 1
Carmoisina	E122	No permitido
Eritrocina	E127	Rojo Nº 3
Verde rápido FCF	No permitido	Verde Nº 3
Indigotina	E132	Azul Nº 2
Ponceau 4 R	E124	No permitido
Amarillo sunset FCF	E110	Amarillo Nº 6
Tartrazina	E110	Amarillo Nº 5
Colores poliméricos	No permitido	No permitido
Naturales		
Antoclaninas	E163	Permitido
Betaninas	E162	Permitido
Carotenoides	E160	Permitido
Clorofila	E140	Permitido
Riboflavinas	E101	Permitido
Idénticos a los naturales	Permitido	Permitido

En el cuadro 6 se muestran los colorantes permitidos para México. En este cuadro se observa que ambas listas (cuadro 5 y 6) presentan semejanza en cuanto a los colorantes orgánicos naturales. Sin embargo en nuestro país no existe un reglamento específico en la utilización de los colorantes naturales. El primer paso para la solución de este problema es el anteproyecto de normatividad para colorantes naturales que esta desarrollando la CANACINTRA (1988). En el cual pretenden incluirse los colorantes orgánicos que se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 6. Colorantes permitidos en México

1. Colorantes orgánicos naturales

Aceite de zanahoria (*Daucus carota*)
 Achioté, annato (extracto de semillas de *Bixa orellana*)
 Azafrán, (estigmas de *Crocus sativus L.*)
 β -apo-8 carotenol
 Betabel deshidratado
 β -caroteno
 Caramelo
 Clorofila
 Cochinilla (extracto de *Coccus cacti L.* o carmín)
 Curcuma (polvo y oleoresinas del rizoma de *Curcuma longa*)
 Extracto de tegumento de uva (enocianina)
 Harina de semilla de algodón cocida y tostada (parcialmente desgrasada)
 Jugos de frutas
 Jugos de vegetales
 Pimentón
 Riboflavina
 Xantofilas, flavoxantina, rubixantina, zeaxantina y los productos naturales aprobados que las contengan y otros

2. Colorantes orgánicos sintéticos o artificiales

Amarillo N° 5 (tartrazina)
 Azul N° 2 (indigotina)
 Rojo citríen N° 2 (solo se permite para colorear la corteza de la naranja)
 Rojo N° 3 (eritrocina)
 Rojo N° 40
 Verde N° 3

3. Colorantes orgánicos minerales

Gluconato ferroso
 Dióxido de titanio

Cuadro 7. Colorantes orgánicos

Naturales	Sintéticos
Carotenos	Azul, núms. 1 y 2 A.M. y C.
Antocianinas	Amarillos, núms. 5 y 6 A.M. y C.
Riboflavinas	Verde A.M. y C.
Clorofila	Rojo, núm. 3 A.M. y C.
Orcinilla y curcuma	Rojo, núm. 5 A.M. y C.
Xantófilas	Rojo, núm. 6 A.M. y C.
Bija, bixina y uorbixina	Rojo, núm. 40 A.M. y C.
Cochinilla y ác. carmínico	

A.M. y C. (FD&C) significa alimentos medicamentos y cosméticos, según la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA).

1.4 MERCADO

La producción mundial de colorantes fue estimada para 1987 en 700 000 toneladas; mas de la mitad correspondieron a la industria textil, y el 75% de los compuestos producidos fueron inorgánicos.

El porcentaje destinado para el sector alimentos, medicamentos y cosméticos se estimó en 2.2%; y de acuerdo con la Asociación de Productores de Colorantes Naturales, se estima que el crecimiento anual del mercado mundial para estos es del 10%. Para los E.U. se pronostico que se tendrían 135 millones de dólares para este rubro. Sin embargo cerca del 80% de las ventas totales de colorantes para alimentos en E.U. es cubierto por tres químicos. La Tartrazina (amarillo), dos azonaftoles y el rojo FD y C N°40.

En México, el mercado estimado para colorantes (excluyendo el color caramelo) es cubierto en su mayor parte por los amarillo-naranja (55%) y los rojos (25%).

De acuerdo con CANACINTRA, con la Asociación Nacional de la Industria Química y con los datos reportados por SECOFI-BANCOMEXT, las empresas productoras de colorantes son las que ahora presentamos en el cuadro 8.

Cuadro 8. Empresas productoras de colorantes en México, de acuerdo con la CANACINTRA, la Asociación Nacional de la Industria Química y con los datos reportados por SECOFI-BANCOMEXT

· Anyl-Mex, S. A. de C. V.	· Aceites y Esencias
· Argo, S. A.	· Aster Alimentaria
· Basf Mexicana	· Kohnstan de México
· Bayer de México	· Florasynth
· Bioquimex, S. A. de C. V.	· Cuamex, S. A. de C. V.
· Ciba-Geigi Mexicana	· Krauss
· Consejo de Exportadores Mex.	· Rivacolor
· Deshidratamex	· Spectrum
· Industrias Alcosa	· Frutas Concentradas
· Mexini, S. A. de C. V.	· Guillermo Shlemen
· Montan, S. A. de C. V.	· Italsa
· Pigmentos y Oxidos, S. A. de C. V.	· Ortega González
· Química Hoechst, S. A.	· Saborex
· Química Mexibras, S. A.	· Sulcolor, S. A. de C. V.
· Warner Jenkinson, S. A. de C. V.	

Fuente: ANIC, 1985.

De entre ellas, las empresas productoras y exportadoras de colorantes mas importantes en México son: Laboratorios Bioquimex, fabricantes de colores amarillo naranja, y rojo el cual cubre el 68% del mercado; Industrias Alcosa que cubre el 10.2% del mismo, Deshidratamex con el 6.4%, y Mexicana de Extracción con el 2.2%. (SECOFI BANCOMEXT 1984-1987).

La información sobre mercados señala que se podrá incrementar el volumen de producción para los principales mercados como Estados Unidos, Japón y Europa (8th International Symposium on Carotenoids, 1987). Gran parte de esta producción se dedica a la pigmentación de piel de pollo y yema de huevo, ya que la industria avícola a notado la importancia que tiene la coloración amarillo-dorada de la carne y el huevo de las aves en el mercado; para ello en México se ha comenzado a incorporar en los alimentos para aves un pigmento natural originado de la flor de cempasuchitl la cual contiene una apreciable cantidad de la xantofila denominada luteína, que es la que le confiere el color amarillo dorado a la carne y huevo de ave.

México es un país productor-exportador de diversas mezclas de carotenoides e importador de compuestos sintéticos idénticos a los naturales. Los principales destinos de tales exportaciones son Estados Unidos (62% en volumen), Francia (19%) y España (10%), distribuyéndose el resto en países europeos y latinoamericanos.

Comparando los montos de las exportaciones y las importaciones de colorantes naturales, podemos observar que los valores en las últimas es menor, por lo que podemos inferir que la producción de colorantes naturales en México tiene un mercado en crecimiento y posibilidades de exportación, por que los requerimientos de estos están relacionados con el aumento en la producción de alimentos procesados, el cambio preferencial al uso de colorantes naturales y los ajustes de la reglamentación en el uso de colorantes sintéticos a nivel mundial.

1.5 LOS CAROTENOIDES EN EL MERCADO

La situación y perspectivas actuales de los colorantes se puede ejemplificar con los carotenos, que es uno de los grupos mas importantes en las áreas de alimentos, medicamentos y cosméticos. Este grupo presenta un crecimiento anual en el mercado del 2% para usos tradicionales (Taylor, 1987), no obstante este puede incrementarse si se le confirman nuevas aplicaciones tales como anticancerígenos y agentes radioprotector, propiedades que se han venido investigando por diversos autores. (Banerjee, Kornhauser y Col., 1987).

Si bien los carotenoides han sido usados por muchos años como colorantes en la industria, también lo han sido en varios niveles como protectores de piel humana (Krinshky, 1987).

Al igual que los carotenoides, los retinoides, como la vitamina A, son también de considerable valor comercial como agentes anticancerígenos. (Hanson, 1977; Hennekens y Col., 1986). Los carotenoides son antioxidantes efectivos y capturadores de oxígeno simple. (Will y Scovel, 1987; Leonida y Bianchi, 1987). Además independientemente de su función biológica, los carotenoides son comúnmente usados como colorantes de forrajes, (Klaur y Bauernfeind, 1981; Simson y Col., 1981).

El uso principal de los carotenoides para la alimentación humana, es en el campo de los lácteos y productos de base grasosa como las margarinas, quesos procesados, yoghurt, crema y helados. Los colorantes derivados de *Tagetes erecta*, aceite de palma o de maíz pueden ser utilizados como vehículos en estas aplicaciones. Por su parte, el extracto de zanahoria puede utilizarse en sopas, botanas y

bebidas cítricas. Finalmente, los extractos de cascara de frutas cítricas pueden ser utilizados en bebidas (Coulson, 1978).

Cuadro 9. Principales carotenoides utilizados como aditivos de alimentos

PIGMENTOS	FUENTES NO MICROBIANAS	FUENTES MICROBIANAS	USO
β -Caroteno	Zanahoria Sintético	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Dunaliella salina</i>	Clorantes en alimentos
Licopeno	Tomates	<i>Blakeslea trispora</i> <i>S. chrestomiceticus</i>	Colorantes en alimentos
Luteína	Alfalfa Maíz Plantas verdes Cempasuchil	<i>Spangioecocum</i> <i>excentricum</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Alimentación de aves
Zeaxantina	cf. Luteína	<i>Flavobacterium</i> sp.	Alimentación de aves y peces
Cantaxantina	Crustáceos Pluma de aves sintética	<i>Cantharellus cinnabarinus</i> <i>Brevibacterium</i> KY-4313	Alimentación de aves y peces
Astaxantina	Crustáceos Pluma de aves y flores de <i>Adonis annua</i>	<i>Micobacterium lacticola</i> <i>Brevibacterium</i> 103 <i>Phaffia rhodozyma</i> <i>Piniphora</i> sp	Alimentación de peces
Rodoxantina	Hojas verdes Pescado (Tilapia)	--	--
Captaxantina	Paprika	--	--
Bixina	<i>Bixa orellana</i>	--	Colorantes en alimentos
Crocetina	Azafrán	--	Colorantes en alimentos
β -Apo-8-carotenal	Sintético	--	Colorante en alimentos
β -Apo-8-carotenal ácido etil ester	Sintético	--	Alimentación de aves

2 GENERALIDADES DE CAROTENOIDES

2.1 DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA

Carotenoides es el nombre con el que se definió a los pigmentos amarillos de la zanahoria (*Daves carota*), de la cual fueron aislados estos compuestos en 1931 (Emodi, 1978).

Los carotenoides son uno de los grupos de pigmentos naturales mas importantes, que deben su color a un gran número de átomos de carbono coordinadamente insaturados, dobles enlaces dispuestos sucesivamente o intercalados, se denominan también colorantes poliénicos (Babor e Ibarz, 1977); poseen un esqueleto de cuarenta carbonos, constituido por terpenos (tetra terpenos) liposolubles, usualmente en color amarillo a rojo, formados por la condensación de ocho unidades de isoprenilo (Nelis y Leenheer, 1991); que forman una estructura alifática, alicíclica la mayoría de ellos consiste de hidrocarburos (carotenos) pero también existen sus derivados oxigenados (xantofilas) (Emodi, 1978), ambos contienen cuarenta átomos de carbono (Ninet y col. 1979). Sin embargo existen otros compuestos con menos de cuarenta átomos de carbono en su esqueleto, a los que se les denomina apocarotenoides.

La brillantes del color de los carotenoides se debe al cromóforo de la molécula, la cual consiste como se mencionaba anteriormente en una cadena de dobles enlaces conjugados. Una reducción en la conjugación produce formas amarillas, mientras que una oxidación da formas rojas (Witcoff y Col. 1980).

Los primeros carotenoides fueron descubiertos alrededor de 1800 y ahora mas de cuatrocientos compuestos diferentes son conocidos (Isler, 1977); por su gran número de dobles enlaces carbono-carbono son intrínsecamente inestables cuando se exponen al aire como componentes cristalinos, su solubilidad ocurre generalmente a 25 °C en agua, etanol, aceites vegetales o cloroformo. (Gordon, 1977).

Los carotenoides son también afectados en su estabilidad por diferentes factores como las altas temperaturas, las cuales fragmentan las moléculas de caroteno en los puntos de unión de los anillos; en presencia de ácidos orgánicos como el ascórbico existe una reducción de la molécula; los agentes quelantes como el EDTA son secuestrantes de los metales que inducen la oxidación y se utilizan para evitar pérdidas de vitaminas y cambios en los colores; la mayoría de los antioxidantes estabilizan a los carotenoides; por que en presencia de oxígeno ocurre su oxidación (Emodi, 1978).

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en procariontes, plantas y animales (Nelis, y Leenheer, 1991); sin embargo solo los microorganismos y las plantas tienen los sistemas necesarios para sintetizar un rango natural de estas sustancias. Todos ellos surgen de variaciones menores en los pasos finales de una ruta biosintética común (Goodgwin, 1972; Beytia y Porter, 1976). Los carotenos se presentan principalmente en hongos y algas, mientras que las xantofilas se presentan mas en bacterias y algas (Ciegler, 1956 a Goodgwin, 1972, Weedon, 1971). En las xantofilas se incluyen la luteína, la canthaxantina, criptoxantina, neoxantina, violaxantina, zeaxantina y astaxantina (Ninet y col; 1979). Por su

estructura los carotenos se presentan fundamentalmente en tres formas, alfa, beta y gamma, tal y como ocurre en la zanahoria y en las hojas verdes, asociados a la clorofila (Babor e Ibarz, 1977).

Actualmente el número de carotenoides naturales encontrados de estructura conocida es de 563, para muchos de los cuales ya se encuentran duplicados. La principal razón para este explosivo desarrollo ha sido la aplicación de nuevos métodos físicos y químicos de síntesis. Un número de estos nuevos carotenoides contienen rasgos estructurales originales. Aunque algunos carotenoides son específicos de plantas y animales, la mayoría de los carotenoides naturales existentes, se han encontrado en microorganismos, los cuales sin duda tienen alta inventiva para modificaciones estructurales de la molécula carotenoides (S, Liaaen-Jensen y Andrews, 1972).

2.2 BIOSÍNTESIS

Los estudios de la biosíntesis del colesterol, permitieron elucidar los mecanismos de la biosíntesis de terpenos (Lehninger, 1981).

La biosíntesis de los carotenoides y sus aspectos de regulación han sido estudiados en microorganismos y en plantas (Schwartz y Col., 1989), estos estudios han revelado que los mecanismos son similares en plantas superiores, en algas hongos y bacterias, (Goodwin, 1971). El ácido acético en forma de acetil-CoA es el precursor no solo de los ácidos grasos, esteroides y prostaglandinas sino también de los terpenos y las acetogeninas (Lehninger, 1981). En las etapas de biosíntesis del colesterol, tres moléculas de Acetil-CoA se combinan para dar mevalonato que se fosforila y rinde 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato. Por pérdida de CO₂ y de fosfato, se forma el pirofosfato de 3-isoprenilo. El ensamblaje escalonado de seis moléculas de este último rinde el hidrocarburo lineal escualeno (este último se cicla y forma el lanosterol que a su vez se convierte en colesterol), este es considerado como una de las moléculas precursoras en los carotenoides.

La primera fase de la biosíntesis del colesterol (y otros compuestos, entre ellos los carotenoides) conduce a un intermediario que es el ácido mevalónico (Fig. 1).

En la biosíntesis de los carotenoides se pueden distinguir tres etapas (Fig. 2). 1a) La formación del ácido mevalónico por condensación de tres moléculas de acetil-CoA; 2a) La conversión del ácido mevalónico en geranyl-geranyl pirofosfato a través de reacciones de fosforilación, isomerización y condensación, y la 3a) La formación del primer tetraterpeno denominado fitoeno, pigmento precursor sujeto a transformaciones metabólicas para dar lugar a otros tetraterpenos, según el organismo del que se trate: planta, alga, bacteria, levadura u hongo. De lo que se sabe, los β-carotenos son sintetizados más por hongos y algas, mientras que las xantofilas por algas levaduras y bacterias (Goodwin, 1971).

En la ruta biosintética que se muestra, (Goodwin, 1971; Ninet y Renault, 1979; Schwartz y Col., 1979), los aspectos que destacan son los siguientes: 1a) El ácido mevalónico se forma por la condensación de tres moléculas de acetil-CoA. El intermediario importante de estas reacciones es el 3-hidroxi,3-metil glutaril-CoA (HMG-CoA), que posteriormente es reducido por una reductasa para formar mevalonato.

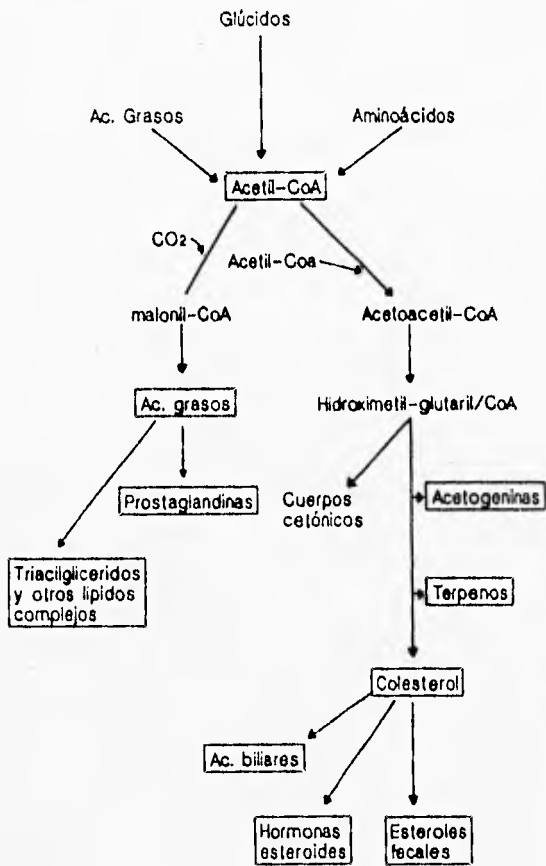


Figura 1. El acetil-CoA como precursor clave de la biosíntesis de numerosos lípidos.

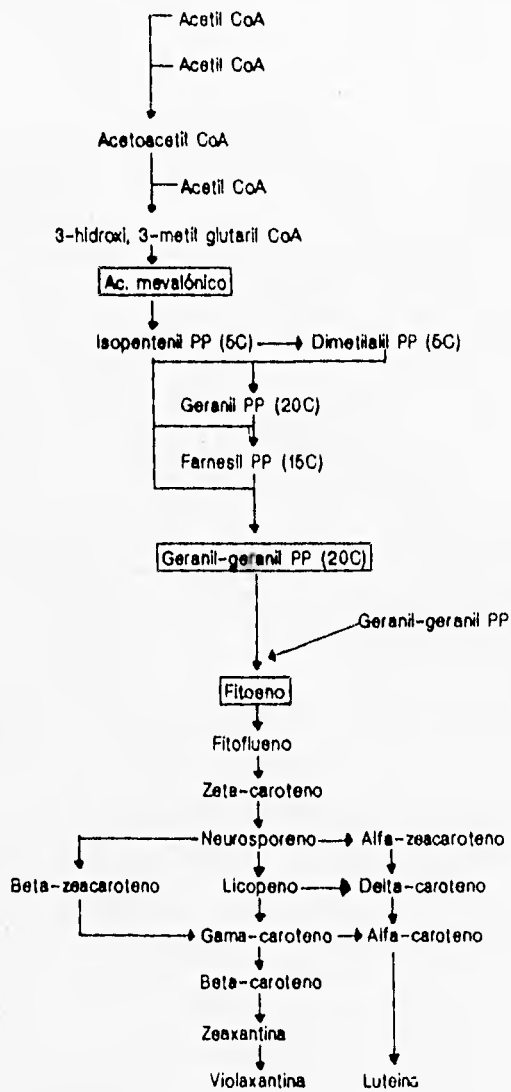


Figura 2. Ruta de la biosíntesis de carotenoides

En la segunda el ácido mevalónico, que es considerado como precursor específico de todos los terpenoides, se fosforila por el ATP, para formar un ester 5-monofosfato y posteriormente ocurre una segunda fosforilación por el ATP para formar un compuesto 5-pirofosfato, el cual luego de una descarboxilación formara el isoprenil pirofosfato (IPP) y a partir de este último, se construyen los terpenoides precursores, iniciando con una isomerización de este compuesto a dimetil alil pirofosfato (DMAPP) que funciona como iniciador de la elongación de la cadena terpenoide. En la secuencia de reacciones siguiente se unen al mevalonato tres grupos fosfato y después el mevalonato fosforilado pierde un grupo carboxilo y un par de átomos de hidrógeno para dar el pirofosfato de Δ^3 -isoprenilo que es una forma activada de una unidad de isopreno.

El pirofosfato de isoprenilo que se deriva de Acetil-CoA es el precursor de otras muchas biomoléculas liposolubles que contienen unidades de isopreno, entre ellas las vitaminas A, D, E y K, los carotenoides, el caucho, la cadena lateral del fitol de la clorofila y muchos aceites esenciales. La propia vitamina A o retinol no aparece en plantas pero muchas de ellas contienen carotenoides que se pueden convertir enzimáticamente en vitamina A (Lehninger, 1985).

La enzima prenil-transferasa transfiere una molécula de IPP a DMAPP para formar geranyl pirofosfato (GPP). Posteriormente, la transferencia de una molécula de IPP a GPP conduce a la formación de farnesil pirofosfato (FPP), a partir del cual mediante una nueva transferencia de IPP se formará geranyl geranyl pirofosfato (GGPP). Finalmente para estas dos etapas, dos moléculas de GGPP se condensan para producir el fitoeno, primer molécula de la síntesis con 40 átomos de carbono.

En la tercera, la desaturación secuencial del fitoeno a licopeno implica una serie de deshidrogenaciones sucesivas que producen en el orden siguiente: fitoflueno, zeta-caroteno, neurosporeno y licopeno. En ciertas bacterias fotosintéticas el zeta-caroteno es reemplazado por su isómero asimétrico el 7,8,11,12-tetrahidroxilicopeno. Mientras que en hongos y bacterias ambos isómeros están presentes. Por otra parte, también se a visto que el licopeno puede ciclizarse para formar γ -caroteno y posteriormente β -caroteno.

En la biosíntesis de carotenoides es generalmente considerada la condensación de dos moléculas de 20 átomos de carbono, del precursor geranyl geranyl pirofosfato, para producir fitoeno vía el intermediario prefitoeno pirofosfato, (prelicoperseno pirofosfato), (Altman y Col., 1972; Qureshi y Col., 1972, 1973; Barnes y Col., 1973). Seguida por una desaturación secuencial del fitoeno quedando sucesivamente, fitoflueno, Z-caroteno, neurosporeno y finalmente licopeno el cual es propuesto como el precursor de los carotenos cíclicos (Fig. 3).

Aunque en la biosíntesis de los carotenos hidrocarbonados se dispone de poca información sobre la introducción de otras modificaciones estructurales como la introducida por la función oxígeno de las xantofilas, (Mc Dermont y Col. 1974), proponen que la introducción de los grupos hidroxilo ocurre en el último estado de la vía biosintética, luteína, zeaxantina, después de una ciclización del

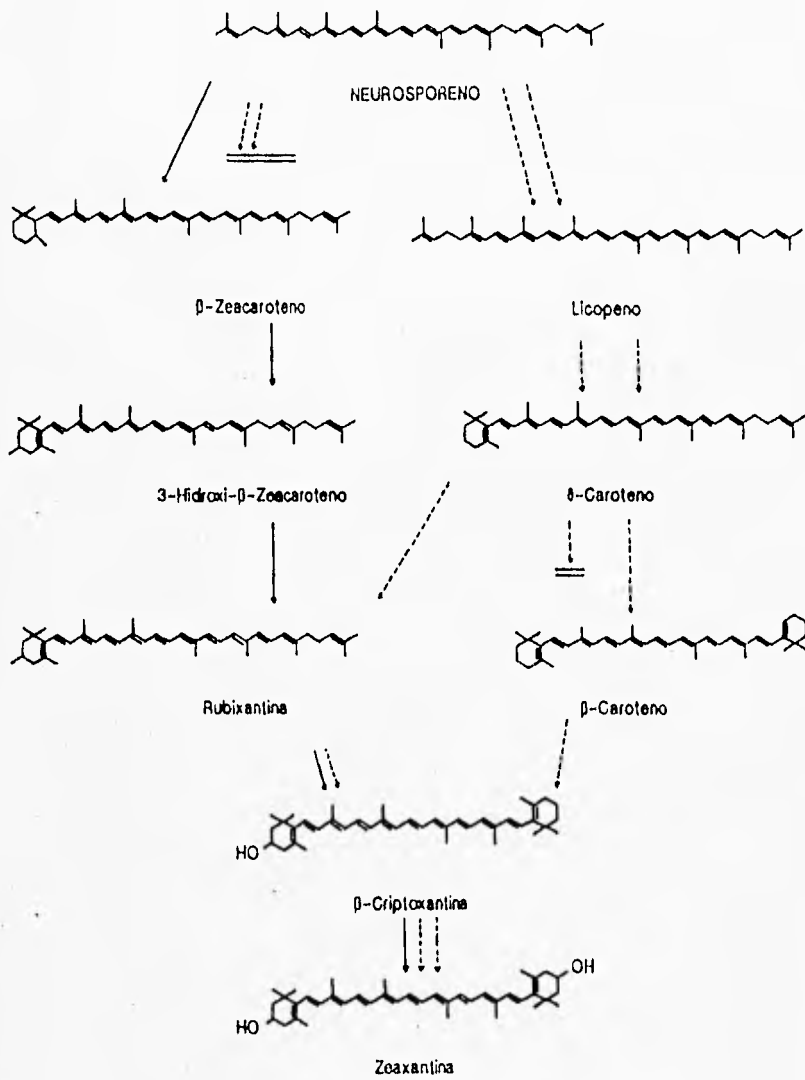


Figura 3. Biosíntesis de zeaxantina. Ruta (a) via β -zeacaroteno, ruta (b) via β -caroteno y ruta (c) via licopeno y rubixantina.

licopeno. Aunque permanece en duda, la detección de β -caroteno y β -criptoxantina, pueden indicar la secuencia licopeno, β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina (Fig. 3).

2.3 IMPORTANCIA (función biológica, en salud, clínica y económica)

En general, aunque no parezca sorprendente, a los carotenoides por su estructura les han sido atribuidas en un tiempo o en otro una larga variedad de funciones (Gordon y Bauernfeind, 1983). En recientes publicaciones se tiene comentado extensivamente lo virtual sobre esto y exhaustivamente revisiones sobre funciones específicas. Los carotenoides han sido implicados en la fotoprotección, para evitar el blanqueamiento junto a la clorofila, y con enzimas de la membrana, contra la fotodestrucción dinámica, en la fotosíntesis como pigmentos accesorios, en los cloroplastos de hojas verdes están asociados en el grana como complejos proteicos solubles en agua, y funcionan también como cofactores en reacciones fotosintéticas, probablemente fijados a la misma proteína para formar los complejos conocidos como "fotosistemas" (La existencia de caroteno proteínas es demostrada según Goodwin 1959, por el fracaso para extraer los pigmentos con un solvente no polar); en fototrofismos, en fototaxis, fotorecepción y como substratos, son áreas en las cuales se han hecho importantes contribuciones (S.Liaaen-Jensen y Andrews, 1972).

Una de las funciones más sostenidas es la fotoprotección sugerida por Stainer, ellos pueden proteger células y tejidos contra el letal daño fotodinámico (Fujimori y Livingston en S.Liaaen-Jensen, y Andrews, 1972); pero tal vez la función mejor conocida de los carotenoides, tales como γ -caroteno, β -caroteno y criptoxantina, es la de ser provitamina A. En humanos y animales este derivado es convertido en retinal y después en retinol (vitamina A) (Nelis y Leenheer, 1990). En humanos estas propiedades tienen relación con la presumida protección contra ciertas formas de cáncer, (Hennekens y Col., 1986). Algunos carotenoides están normalmente presentes en alimentos y estos tienen funciones biológicas esenciales, en vista de estas actividades biológicas, ellos son usados como suplementos de alimentos para prevenir o curar deficiencias vitamínicas. La carencia de vitamina A conduce a una variedad de síntomas característicos en los individuos y animales de laboratorio entre ellos piel seca, xeroftalmia (ojos secos) desecación de las membranas mucosas, desarrollo y crecimiento retrasados, esterilidad en machos y ceguera nocturna. (Lehninger, 1985). En adición con otros carotenoides pigmentados son usados como aditivos de alimentos para intensificar o modificar el color en grasa, aceite, queso y bebidas, y también como suplemento en forrajes y alimentos para aumentar el color de los alimentos tales como yema de huevo y carne de pollo. En estos últimos usos se aplican a los alimentos o forrajes, como aditivos, productos puros derivados de procesos orgánicos, principalmente de las plantas (Ciegler, 1956; Goodwin, 1972; Weedon, 1971).

Las xantofilas como la luteína, cantaxantina, criptoxantina, neoxantina, violaxantina y zeaxantina, son agentes coloreados utilizados en farmacia y ordinariamente incluidos en la dieta, son susceptibles de adicionarse en forrajes como biomasa seca de algunos microorganismos que las producen (Ninet y Renault, 1979).

3 ANTECEDENTES

3.1 INVESTIGACIÓN EN CAROTENOIDES

Una alternativa ya comprobada, para la producción de colorantes naturales es la vía microbiana, que tiene sus mejores ejemplos en la producción de carotenoides, pues existen múltiples ejemplos de optimizaciones de su producción con distintos organismos.

Los carotenoides no se encuentran particularmente en los hongos, pero estos han sido detectados en unas doscientas especies y se examinan otras ciento treinta donde han sido mostrados, los grupos mas importantes en este sentido son los Phycomycetes y Ascomycetes.

La familia Dacrymycetaceae son especialmente adaptables para producir xantofilas en condiciones controladas (Mortin en Moore, 1958). Ellos tratan en su trabajo sobre las condiciones de fermentación y en particular la composición de nutrientes en los medios para la producción de carotenoides y xantofilas que señalan, requieren de un cierto mínimo de condiciones especiales para practicar operaciones de escalamiento; su método comprende el cultivo de hongos de la familia Dacrymycetaceae en géneros como: *Dacrymyces*, *Dacrymitra*, *Dacryopinax*, *Guepinopsis*, *Femsjonia*, *Clalocera* y otros (Moore, 1958).

Johnson y Lewis (1979) consideran que los parámetros mas importantes a ser optimizados en una fermentación son el pH, el nivel de aireación, los requerimientos de vitaminas (extracto de levadura) una fuente metabolizable de nitrógeno y particularmente la naturaleza y concentración de las fuentes de carbono. En general los procedimientos para mejoramiento de las condiciones de cultivo, coinciden en señalar que los elementos a tratar, son las condiciones de fermentación, en particular la composición de nutrientes de los medios de producción.

En general se consideran como nutrientes básicos del medio: una fuente de nitrógeno orgánico asimilable; una fuente de nitrógeno como el amonio; una fuente de carbono metabolizable; minerales traza; un mantenimiento del cultivo bajo condiciones de aireación y agitación; además de radiación del material fungico en el espectro visible de luz. Sin embargo otros nutrientes pueden ser adicionados para obtener ventajas; aclaran que los nutrientes pueden ser adicionados desde el principio o adicionados en porciones para varios estados de la fermentación.

La composición de nutrientes del medio es responsable del buen crecimiento fungico y resulta en una sustancial producción de carotenoides y en particular xantofilas (Moore, 1958). En otros ejemplos se reportan efectos positivos por nutrientes o condiciones de fermentación diferentes. En *Dacrymyces deliquescens* la irradiación con una longitud de onda de 5300 A favorece un amplio radio de xantofilas del total de carotenoides con luz verde, y la máxima producción de xantofilas ocurre con luz sobre 6200 A. (Moore, 1958) En la familia Chlorophyceae la limitación en nitrógeno es un factor clave para la acumulación de astaxantina. El acetato y la glicina se han demostrado como estimuladores de la formación de astaxantina en *H. plusuhalis*, habilidad para asimilar nitrógeno se relaciona con la con la capacidad de incrementar la producción de carotenoides. En Dacrymycetaceae los aminoácidos como la glutamina, sal de glutamato o glicina son preferidos para esta familia.

Dacrymyces deliquescens cultivado cinco días en medio líquido con glucosa, glicerol y licor de maíz e iluminación externa produce 40 mg/l de xantofilas, 4 mg/g de micelio seco. (Farrow y Tabekin, 1961). En la producción de xantofilas con *Spongiococum exentricum* y *Chorella pyreneidosa* se utilizaron 1% de dextrosa, 0.3% de extracto de malta, 0.3% de extracto de levadura, 0.5% bactopectona, y 1% de licor de maíz. Con esto se obtienen altas concentraciones de xantofilas con bajos niveles de ingredientes cuando la fermentación progresa en el tiempo (Peppler, 1977).

Entre los nuevos activadores de la producción de carotenos esta la dimetil formamida, usada como un solvente para el antioxidante y numerosas amidas y componentes nitrogenados de similar o mayor actividad (Ninet y Renault, 1979). La *s*-pirrolidina y succinamida adicionadas en una relación de 3 o 4 g/l, muestran alguna actividad, pero mejores resultados se observan con la adición de isoniacida, iponiacida y 4-formilpiridina que junto con β -Ionona en el cultivo o con 2,6,6 Trimetil-1 acetil cyclohexano logran una producción de hasta 3g/l, o bien, 30 mg/g de micelio seco (Ninet y Col; 1963b, 1965b, 1966, 1969).

Sin conocer todavía bien si estas sustancias son agentes de permeación para *Blakeslea trispora* o actúan como inductores o activadores de enzimas operando en la ruta de carotenoides (Paplet, 1977).

Hesseltine y Anderson en estudios con *Choanephora cucurbitarum*, *C. conjuteta*, *Blakeslea trispora* y *B. circinans*. observaron que al adicionar β -Ionona en el cultivo, esta aparece como tóxico al adicionarlos en medios básicos, y estimula la síntesis de β -carotenos en combinación con aceites vegetales. Como la β -Ionona no es incorporada al β -caroteno (Reyes y Col. 1964), se han examinados compuestos para remplazar en el ciclo de Krebs a los cetoácidos. Los bicicloterpenos de turpenina son sustitutos parciales o totales de la β -Ionona, también se han probado otras sustancias incluidas isoprenos dimeros y trimeros pero ninguna con mejores resultados.

La adición de lípidos, detergentes y β -Ionona es un proceso patentado por Anderson. Se utilizan mezclas de aceites de semilla de algodón y aceite de soya; detergentes como sucrosa-dipalmitato; y para un mejor desarrollo de la fermentación para β -caroteno, se trata el keroseno con ácido sulfúrico. La adición de antioxidantes en el medio de cultivo también estimula la producción de carotenos en 2-6 ditetrabutyl-4 metilfenol fue el mejor antioxidante (Hanson, 1977). La estabilidad del β -caroteno seco en fermentación sólida con adición de etoxiquin en este medio de fermentación o en el producto seco, fue probada por Hall, Ciegler y Nelson (1962).

El efecto de aceites naturales en la producción de carotenos como grasa blanca, aceite de semilla de algodón y aceite de soya, es positivo, pero el mas adecuado fue la grasa blanca (Hanson, 1977).

Los primeros carotenoides capaces de colorear fueron obtenidos por extracción de recursos naturales, pero en los años 1950s los laboratorios Hoffman-La Roche desarrollaron una síntesis química de β -caroteno; esta síntesis fue posteriormente extendida a la producción comercial de apo-carotenal y cantaxantina. La síntesis de β -caroteno creo una interesante controversia a causa de su naturaleza sintética

sujeta a certificación, y también sobre si este compuesto podía ser llamado color natural (Noonan, 1980).

3.2 EL CASO DE LA ZEAXANTINA

Dentro de los carotenoides e incluida en el grupo de las xantofilas, la zeaxantina aparece en una lista de principales carotenoides que están legalmente permitidos en alimentos y forrajes en muchos países; se forma junto con la luteína, es utilizada en alimentos para peces y cerdos, la produce una bacteria no fotosintética *Flavobacterium* sp. (Goodwin 1980, 1984 Klau, & Bauernfeind 1981; Marussich & Bauernfeind 1981). Es también producida por algas del género *Chlorella* y en algas de la especie *Spongiococum excentricum* (Mc Dermont, 1987; Hanson, 1977).

La zeaxantina es un típico pigmento cloroplastico que también se produce en cianobacterias y en un limitado número de bacterias no fotosintéticas; la zeaxantina a sido demostrada en una flavobacteria marina (Nelis y Leenheer, 1990).

Aunque la información sobre la producción de zeaxantina por *Flavobacterium* es muy escasa, aparentemente puede ser aprovechado un estado de comercialización de una mutante reportada que produce 335 mg/l con un medio que contiene glucosa, "licor de maíz", con esterios palmíticos, metionina piridoxina y sales ferrosas y con el crecimiento del organismo a una temperatura reducida, un número de patentes de producción de zeaxantina ha sido asignado a diferentes compañías (Ninet y Renault, 1979). Otros autores también hacen referencia a recientes estudios desarrollados para la producción de zeaxantina que están concentrados en el uso de una flavobacteria marina, cuando ella es crecida en un medio basado sobre glucosa y "licor de maíz", el contenido de zeaxantina aumenta a alrededor de 40 µg/ml y suplementando con ester palmítico; metionina piridoxina y sales ferrosas, la zeaxantina es producida sobre 190 µg/ml (Schorer y Wiss, 1972; Shepherd y Dasek, 1974; Shepred y Col., 1974). Cuando la temperatura es reducida y los nutrientes están adicionados continuamente, un contenido de 335 mg/l pueden obtenerse con una mutante del género *Flavobacterium* (Dasek y Col., 1973).

Los métodos de extracción de zeaxantina son similares a otros para carotenoides y sirven de ejemplo para otras xantofilas. En la patente Belga de la Sociedad de Productos Nestle S.A. se reporta el proceso de fabricación de zeaxantina desarrollado por Dasek Joroslau, Shephard D. y Knut R.T., quienes de manera general plantean las condiciones y composición de los medios para una mejor producción de zeaxantina con *Flavobacterium* sp. (Patente 790.289 año 1973 Bélgica y Patente 816.767 año 1974 Bélgica). Un medio general de fermentación acuoso es el siguiente:

Composición: carbohidratos de 15 a 35 mg/ml (por lo menos) o de 6 a 8 % en peso del medio de cultivo. Entre las recomendaciones ellos sugieren mantener las sustancias nutritivas principalmente carbohidratos y la fuente de nitrógeno, en un rango sensiblemente constante, añadiéndolas progresivamente según el débito que se presente. Aclaran que la obtención por biosíntesis es delicada y requiere mucho cultivo para tener cantidades apreciables del pigmento. En la patente se muestra como ejemplo un medio de cultivo del cual se parte y un medio nutritivo que se va añadiendo al primero. Inicia con

una temperatura entre 28 y 30 °C y al llegar a una concentración de carbohidratos entre 15 y 30 mg/ml la temperatura se ajusta entre 22 y 25°C. El pH se ajusta entre 7 y 7.5 preferentemente con amonio; y la aireación se logra por agitación violenta y en presencia de luz. De la información anterior, nosotros elegimos manejar el medio base reportado en esta patente, para realizar nuestra evaluación.

Descripción del género

Flavobacterium es un género de afiliación incierta, pero según Margulis (1985), puede incluirse en su clasificación general en el Phylum M-14 de las Omnibacterias, un grupo grande y diverso que se caracteriza por tener formas alternativas de metabolismo; y dentro de un subgrupo, de las enterobacterias, sin pertenecer todavía a una clase específica.

El género *Flavobacterium* sp. contempla a bacilos gramnegativos, aerobios a anaerobios facultativos (Holmes, 1992); es un género de afiliación incierta. (Delaat, 1983); son células que varían de forma cocobacilo a delgadas o planas redondas, no móviles, estas no presentan movimiento deslizante o enjambramiento, crecen sobre agar nutritivo, no forman esporas. Su crecimiento sobre medio sólido es pigmentado amarillo, naranja, rojo o café y puede variar con el medio y la temperatura. Ambientalmente crecen separadas a temperaturas entre (5-30 °C), pero en aislamientos de análisis clínicos también crecen a 37 °C. El crecimiento en medio sólido es típicamente pigmentado amarillo a naranja, pero las no pigmentadas se les puede inducir a producir pigmentos (Weeks en Bergey y Col 1923,97).

La intensidad de la pigmentación varía considerablemente y puede afectarse por el medio de crecimiento, la temperatura y el periodo de incubación. La graduación de la pigmentación puede ser pronunciada por una menor temperatura (15-20 °C) y la luz coloreada puede ser requerida para un máximo de pigmentación. El crecimiento en caseína o leche puede también aumentar la pigmentación. Los pigmentos no son fluorescentes en luz ultravioleta y están insolubles en el medio de crecimiento. (Weeks en Bergey y Col 1923,97).

El color es más pronunciado sobre papa, gelatina o leche contenidos en el medio y a menores temperaturas (15-20 °C); frecuentemente se requiere luz para una máxima pigmentación, los pigmentos no son solubles en el medio, y no han sido caracterizados pero se cree que son carotenoides. Las colonias típicamente son translúcidas, parcial o enteramente; y ocasionalmente son opacas.

Son quimiorganotróficas, y sus cultivos frecuentemente son difíciles de mantener después de la separación primaria; han sido asociadas con requerimientos de nitrógeno y comúnmente son proteolíticas. El metabolismo fermentativo usualmente no es notable, las reacciones ácidas comúnmente no se desarrollan de carbohidratos cuando es viable el contenido de nitrógeno orgánico en el medio, no se produce gas de carbohidratos de acuerdo con los cultivos usuales de prueba (Holmes, 1992). Necesitan de metabolitos exógenos como el complejo vitamínico B o condiciones físicas como la concentración de agar en el medio.

En su metabolismo respiratorio; las reacciones ácidas son comunes cuando tales cultivos son agitados drásticamente y en concentraciones bajas de peptona en el medio. Los carbohidratos más frecuentemente

utilizados son la glucosa, fructuosa, glicerol, maltosa y tetralosa; y el ácido no es producido de adonitol, dulcitol, inositol y sorbitol. Celulosa, agar y otras moléculas largas de carbohidratos no son atacadas, pero son proteolíticas hidrolizando caseína y gelatina, (Weeks, en Bergey y Col. 1923.97).

La incubación se realiza en temperaturas cercanas a 30 °C. Naturalmente están distribuidas en suelo, carne y aguas marinas; comúnmente sobre vegetales durante procesos comerciales y en productos secos; también han sido identificadas y separadas de infecciones humanas (Holmes, 1992).

Han sido reportadas con dos distintos rangos de proporción de nucleótidos base (G+C en moles %) en el DNA a saber: (30-42) y (63-70). *Flavobacterium* tuvo esta acepción, como un genero de color. (Bergey y Col. 1980) y ha tenido que ser taxonómicamente heterogéneo en un principio, pero tal heterogeneidad ha sido disminuida por la exclusión de especies Gram-positivas (Breed y Col. 1957) y esto ha continuado en arreglo con la exclusión de especies no móviles las cuales muestran deslizamiento sobre el agar, además del problema todavía no bien resuelto de la diferenciación de bacterias no móviles, de *Cytophaga* (Mitchell y Col. 1969; Weeks, 1969). Las bacterias que muestran la propiedad deslizante son asumidas como *Cytophaga*, y los cultivos que no exhiben esta propiedad han tenido que ser retenidos en *Flavobacterium*; también existen dudas por los dos diferentes o contrastantes proporciones de nucleótidos en el DNA.

Debido a las actuales circunstancias todavía no resueltas, *Flavobacterium* es sugerido como un concepto taxonómico incierto (genus incerta sedis) por Owen y Weeks en Genus *Flavobacterium* Bergey y Col. 1923. Holmes, (1992) hace una revisión mas detallada sobre la historia de la clasificación del genero y los problemas que se han presentado para definir su situación.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se obtuvo una cepa de *Flavobacterium* sp. de la American Type Culture Collection (ATCC 25 582) productora de zeaxantina, con la cual se decidió realizar una evaluación de las condiciones de producción de este pigmento, en los siguientes aspectos: la fuente de carbono (glucosa); diferentes fuentes de nitrógeno orgánico (extracto de levadura, triptona, agua de cocimiento de maíz); así como los requerimientos de sales (Mg^{2+} , Fe^{2+} y P) y algunas condiciones físicoquímicas (pH y aireación). Todo esto con el propósito de obtener un medio en mejores condiciones para una mayor producción de zeaxantina.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO

GENERAL:

- Evaluar algunas de las condiciones de producción de zeaxantina utilizando una cepa de *Flavobacterium* sp. (ATCC 25 582).

5.2 OBJETIVOS

ESPECÍFICOS:

- Evaluar la fuente de carbono (glucosa)
- Evaluar diferentes fuentes de nitrógeno orgánico (extracto de levadura, triptona, licor de maíz)
- Evaluar los requerimientos de sales (Mg^{2+} , Fe^{2+} y P)
- Evaluar algunas condiciones físicoquímicas (pH y aireación)
- Obtener un medio con mejores condiciones para la mayor producción de zeaxantina, que pueda ser optimizado posteriormente.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

Se utilizó una cepa de Flavobacterium sp. (ATCC 25 582), para la producción de zeaxantina, la cual fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC).

6.2 MEDIOS DE CONSERVACIÓN

La cepa se conservó en los medios con glicerol reportados en el Catalogue of Bacteria and Bacteriophages ATCC (1982) para Flavobacterium sp. ATCC (21 588).

6.3 MEDIO DE PROPAGACIÓN

YTN ATCC (665) composición: extracto de levadura 1%, triptona 1%, cloruro de sodio 3%, glucosa 0.1%, solución de elementos traza 0.1%, agar 1.5%; disueltos en agua destilada y pH ajustado con NaOH a 7.2 antes de esterilizar; el medio se esteriliza 17 minutos a 121 °C.

YTN

COMPOSICIÓN:	%	
Extracto de levadura	1	Disueltos en agua destilada y
Triptona	1	ajuste de pH inicial con NaOH
Cloruro de sodio	3	antes de esterilizar
Glucosa	0.1	17 min. a 121 °C.
Solución de elementos traza	0.1	

6.4 MEDIOS DE PRODUCCIÓN

YTN Líquido ATCC (665)

Medio de producción para la obtención de zeaxantina de acuerdo al ejemplo 1 reportado en la patente con título: (Patente 790.289. 1973, Bélgica).

COMPOSICIÓN:	%	
Extracto de levadura	1.8	Disueltos en agua de la llave,
Triptona	0.8	ajuste de pH inicial con NH ₄ OH a
Licor de maíz	1.6	7.2 antes de esterilizar; el
MgSO ₄	0.5	medio se esteriliza 17 min a 121
Aceite de maíz	0.08	°C
Glucosa	7.0	

6.5 PREPARACIÓN DEL INOCULO

La bacteria se propaga tomando 0.1 ml del medio de conservación (glicerol-skim) en cajas de petri con medio YTN-agar; se incuban a 29 °C 36 h, después de la incubación se realiza un raspado de las colonias para formar una suspensión celular en solución salina estéril al 0.85% ; la suspensión se ajusta a una densidad óptica (D.O.) de 0.295 a 540 nm en onda larga; esta suspensión se agrega al medio YTN en razón de un 2% en volumen. El inocular se incubó a 29 °C, 180 r.p.m. por 24 h, en matraces Erlen meyer de 250 ml lisos.

6.6 FERMENTACIÓN

Los cultivos se realizan por triplicado en matraces Erlen meyer de 250 ml lisos, con 50 ml de medio, inoculados a razón de 5% del volumen del medio, manteniendo a 29 °C y 180 r.p.m. por 96 h.; los matraces fueron colocados en una estufa de calor graduable Psycotherm TM New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison; N.J.; los perfiles de producción de zeaxantina, crecimiento, glucosa residual, amonio residual y pH fueron obtenidos por análisis de muestras tomadas cada 24 h a partir del tiempo en que se inicia la fermentación y hasta las 96 h.

6.7 MÉTODOS

6.7.1 TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras se realizó a partir del momento en que se inició la fermentación (T 0), inmediato a la inoculación, con volúmenes de 2 ml para estimar crecimiento; posteriormente cada 24 h y hasta las 96 h, se tomó 1 ml para crecimiento y 2 ml para la extracción del pigmento; el sobrenadante obtenido de las centrifugaciones de las muestras del medio, se guardaron para hacer las determinaciones de pH, glucosa, amonio, y fósforo inorgánico como fueron requeridas.

6.7.2 EXTRACCIÓN

La técnica de extracción se realizó de acuerdo a una modificación de la técnica reportada por (Britton, 1985), que consiste en una centrifugación de las muestras del medio de cultivo, se retiró el sobrenadante a partir del cual se realizaron las distintas determinaciones (pH, glucosa, amonio o fósforo inorgánico) al tubo con el botón de asentamiento se le agregaron 3 g de perlas de vidrio de 0.45-0.50 mm de diámetro marca B. Braun Melsungen ; se añadieron 2 ml de acetona; se agitaron un minuto para romper paredes y membranas celulares, posteriormente se agregaron 2 ml de una mezcla de eter-dietileter de petróleo (1 a 1); esta mezcla de solventes tiene mas afinidad por el pigmento, y para separar las fases se agregaron 2 ml de agua destilada; la epifase (eter-dietileter) se retiró con pipetas pasteur a tubos de vidrio donde se dejaron desecar por 12 h . El pigmento obtenido se resuspende con 2.5 ml de etanol absoluto, para leer densidades ópticas (D.O) en espectrofotometro (Bausch & Lomb

Spetronic 21) a 450 nm en onda corta; el D.O. registrado se sustituye en la expresión:

$$\text{carotenoides totales } \frac{1\ 000\ 000 \times \text{D.O.}}{\mu\text{g/ml} \times \text{factor de extinción } 254 \text{ (100)}} \times \frac{\text{factor de dilución}}{\text{ml de muestra}}$$

6.7.3 CROMATOGRAFIA

La técnica de cromatografía (Thin-Layer Chromatography. TLC) utilizada en la identificación de la zeaxantina, por comparación de los Rf obtenidos con una oleorresina de la flor de cempasuchitl (*Tagetes erecta*) (de una muestra proporcionada por la compañía Bioquímex Querétaro, Méx.), utilizada como standard; y muestras del pigmento obtenido en las extracciones de nuestros medios de cultivo; para estas muestras de pigmento se utilizaban 10 ml de medio, dicho pigmento fue separado de acuerdo a la técnica de extracción ya descrita; después de desecado se resuspendió en 0.5 ml de acetona y se aplicaron 150 µl para la muestra en la cromatografía de algunos de los medios de cultivo probados.

La cromatografía se corrió sobre una placa de sílice-gel 60 de 20 x 20 cm; los solventes utilizados para el arrastre, fueron una mezcla de diclorometano-acetato de etilo 80:20 en una cámara de cristal sobresaturada. Las muestras fueron colocadas en la placa a 1.5 cm de la base y la placa conservada en la cámara un tiempo aproximado de 4 h.

6.7.4 ESTIMACIÓN DE CRECIMIENTO

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA APLICAR EL MÉTODO LOWRY

Las muestras para crecimiento se centrifugaron en tubos de plástico a 6500 r.p.m. 15 minutos (el sobrenadante se guarda junto con el obtenido en extracción); se resuspendió el botón con 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%, y se agitaron 20 seg. ; se centrifugaron a 7500 r.p.m. 10 min., se tiró el sobrenadante y se resuspendió con 1 ml de NaOH 0.4 N.; para estimar el tiempo cero (T 0) se tomó 0.5 ml de alícuota de la suspensión con NaOH y de los tiempos 24, 48, 72 y 96 h se tomó 0.2 ml de alícuota, los que se aforaron a 1 ml con agua destilada para aplicar el método reportado por (Lowry, 1951).

Los datos de las muestras se correlacionaron con la curva patrón construida al aplicar el mismo método a diferentes volúmenes de alícuotas de una solución de albúmina de 500 µg/ml.

6.7.5 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

En la determinación de glucosa residual en el medio, se tomaron muestras del sobrenadante del medio de cultivo de los distintos tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 h), y se diluyeron a una cuarentava parte (0.5 ml en 19.5 ml de agua destilada); en la determinación fue utilizado el método del paquete de diagnóstico marca Erlick Glucosa-

God Pad, (método enzimático colorimétrico) basado en Trinder, (1969); y se realizaron los cálculos aritméticos para la estimación de las concentraciones de glucosa de las muestras.

6.7.6 DETERMINACIÓN DE AMONIO

La determinación de amonio se realizó de acuerdo a una modificación del método de (Neatherburn, 1967), tomando una alícuota de cada una de las muestras del sobrenadante de las centrifugaciones del medio realizadas en la técnica de extracción, esta alícuota fue diluida (0.5 ml en 9.5 ml de agua destilada) y posteriormente se le aplicó el método. Los datos obtenidos fueron relacionados con los de una curva patrón elaborada a partir de una solución con cloruro de amonio 0.1 M.

6.7.7 DETERMINACIÓN DE FOSFATOS

La determinación se realizó en el sobrenadante de las centrifugaciones de las muestras de cultivo (sin diluir) en los diferentes tiempos de muestreo (0, 24, 48, 72 y 96 h) comparando contra una curva patrón utilizando K_2HPO_4 y aplicando el método de Summer-B. Jones, (1944).

6.7.8 DETERMINACIÓN DE pH

Se determinó en el sobrenadante de cada una de las muestras del medio de cultivo centrifugado, en los diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 h), con un potenciómetro digital marca Beckman modelo 3500.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SELECCIÓN DE LOS MEDIOS

La selección del medio de producción se realizó primeramente por una revisión bibliográfica, la cual nos ayudo a escoger las condiciones básicas de producción de zeaxantina, los medios escogidos fueron el medio YTN y el reportado en una "patente" (1) para el género *Flavobacterium* .

Originalmente los criterios de comparación fueron: la producción volumétrica de carotenoides totales crecimiento, la producción específica; y las productividades tanto volumétrica como específica, de todos los anteriores la producción volumétrica fue el principal, ya que los aminoácidos presentes en el agua de cocimiento de maíz del medio patente no garantizaban una exacta cuantificación del crecimiento pero si una cuantificación que permitió una estimación del crecimiento con el método Lowry; por lo mismo tampoco se garantizaba exactitud en la producción específica. Por lo anterior, se decidió considerar como parámetro principal la producción volumétrica

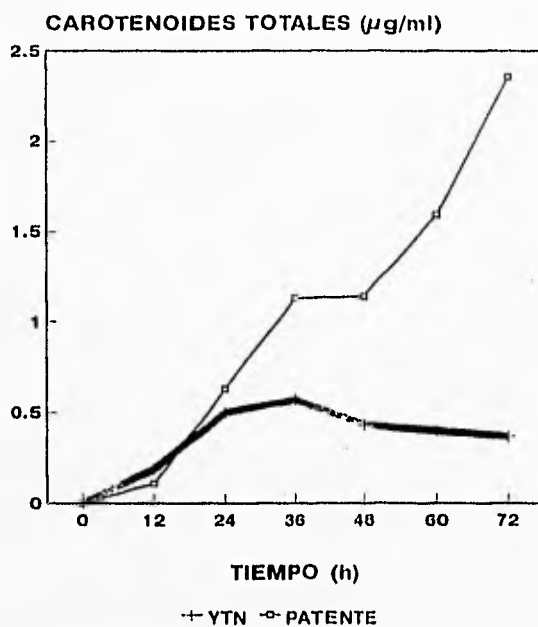
Al comparar los dos medios (Graf. 1) , se encontró que el máximo de producción volumétrica de carotenoides totales, en el medio "patente" fue de 2.28 $\mu\text{g/ml}$ y esta se alcanzo a las 72 h y en el "YTN" de 0.57 $\mu\text{g/ml}$ a las 36 h y este valor no se incremento durante la fermentación. En crecimiento máximo, se obtuvieron 2.29 mg/ml de proteína en el medio "patente" y 0.74 mg/ml en "YTN" (Graf.2), observamos también que la toma de muestras cada 24 h era adecuada para seguir la dinámica del cultivo; sin embargo, al tomar muestras a las 12 h en otros experimentos, ya se podía cuantificar producción de pigmentos.

Al relacionar el crecimiento y la producción volumétrica se observo una cierta correspondencia, es decir con mayor crecimiento se obtuvo mayor producción volumétrica, pero no de una manera directamente proporcional.

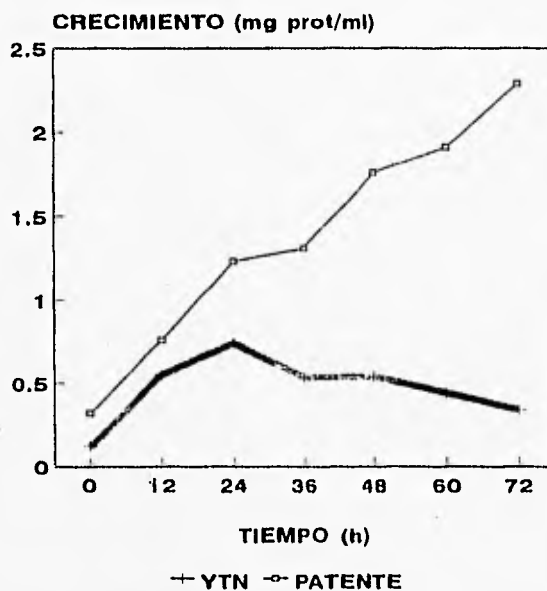
Como resultado de las ventajas comparativas de crecimiento y producción de pigmentos entre el medio "patente" y el medio "YTN", se eligió al primero como medio base para llevar a cabo el establecimiento de las condiciones de producción de zeaxantina.

En cuanto al comportamiento del pH, podemos observar un aumento sobre su valor inicial entre las 0 y 48 horas, momento a partir del cual tiende a estabilizarse; este aumento de pH lo podemos atribuir al aumento de amonio en el medio lo cual en consecuencia tiene un efecto alcalinizante (Graf.3). El comportamiento antes descrito tendera a repetirse en general para casi todas las condiciones.

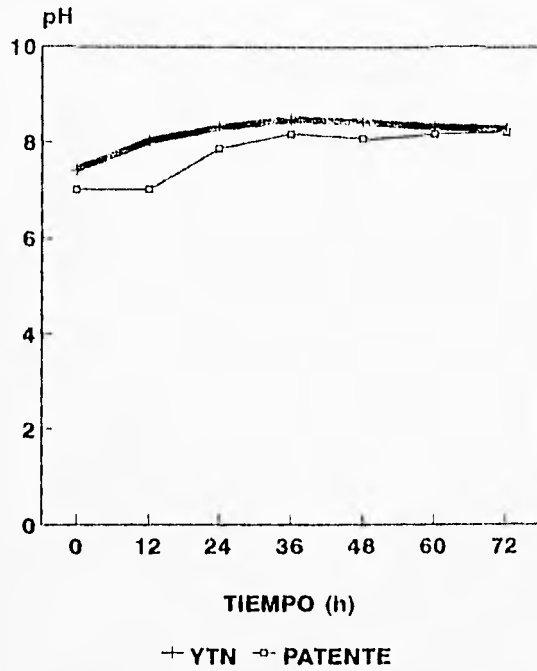
Por otra parte la información obtenida a partir de las determinaciones en el sobrenadante, también sugirió modificaciones en la composición de los mismos. Por ejemplo, realizar las determinaciones de glucosa residual, se observó que en el medio "YTN" con una concentración inicial del 0.1% ocurrió una rápida disminución a casi 0 en 24 horas, mientras que en medios "patente" con 7% de glucosa esta concentración disminuyó únicamente un 1% (Graf. 4 y 5).



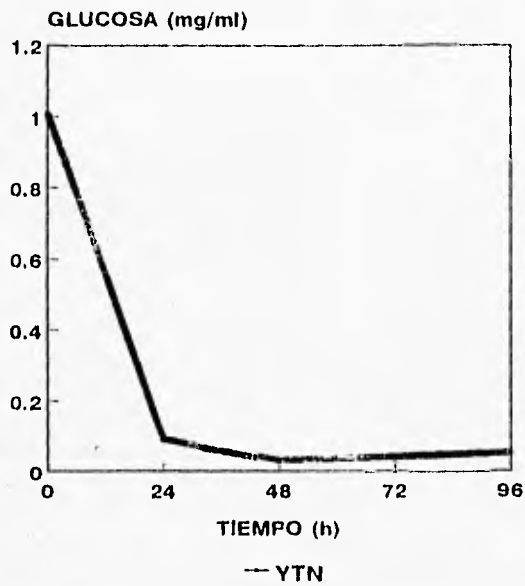
Gráfica.1 Producción volumétrica de carotenoides totales en medios "YTN" y "patente original"



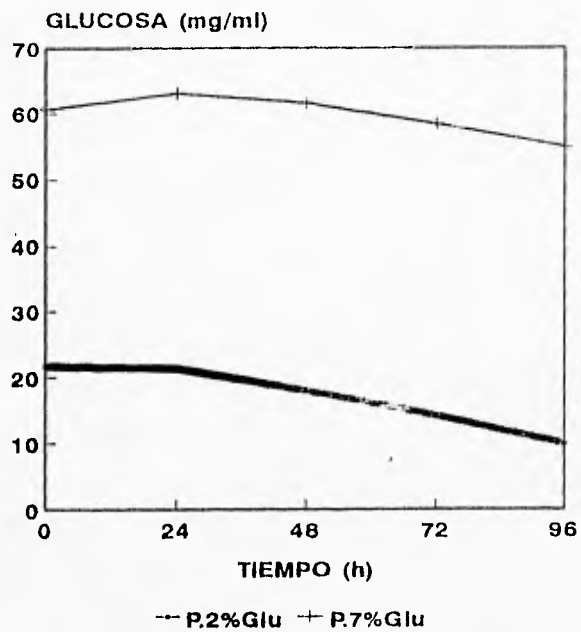
Gráfica.2 Crecimiento de *Flavobacterium* sp. en los medios YTN y "patente original"



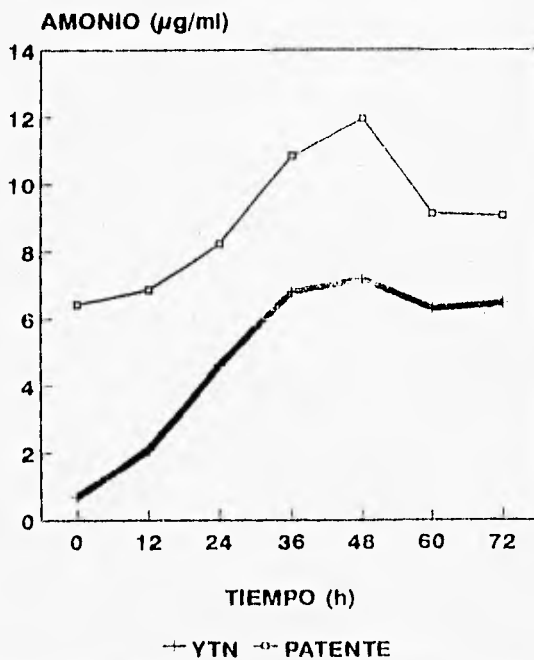
Gráfica.3 Evolución de los valores de pH en los medios YTN y "patente"



Gráfica.4 Consumo de glucosa con cultivos crecidos en medio YTN



Gráfica.5 Consumo de glucosa por cultivos crecidos en medio "patente"



Gráfica.6 Evolución en los niveles de amonio en los medios YTN y "patente"

Al observar la evolución del amonio, advertimos un aumento del ion en ambos medios, partiendo de 0.67 $\mu\text{g/ml}$ en el tiempo 0 (T-0) en "YTN" y un aumento a 12.4 $\mu\text{g/ml}$ las 72 horas. En el medio "patente" se inicia con 16.9 $\mu\text{g/ml}$ llegando a un máximo de 27.7 $\mu\text{g/ml}$ a las 48 horas y disminuyendo a 24.4 a las 96 horas (Graf.6). Atribuimos el aumento de amonio a las desaminaciones ocurridas al metabolizar aminoácidos como fuente de carbono y su disminución, ocurre al dejar de utilizar las fuentes que los contienen. Sin embargo en YTN el descenso de amonio ocurre hasta las 72 h, pero su crecimiento y producción se detiene a las 24 o 48 h; suponemos que esto ocurre por la baja concentración de glucosa que se utiliza en el medio a la que no consideramos fuente principal pero si es importante en las primeras horas del cultivo.

EVALUACIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DE NUTRIENTES EN EL MEDIO BASE

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

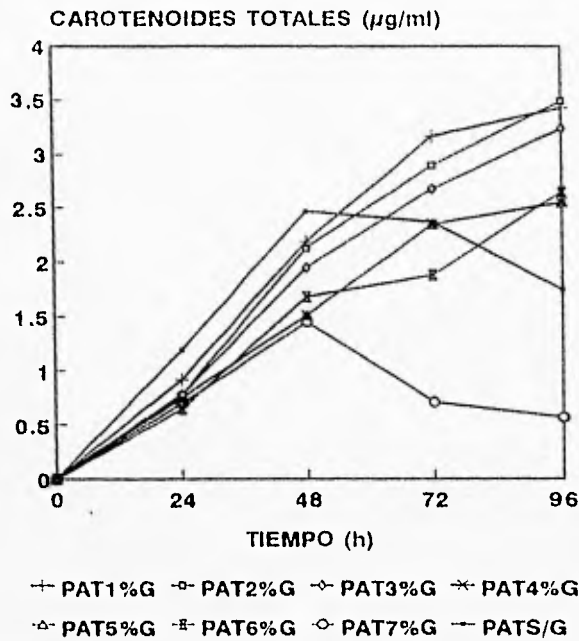
Los resultados de la cuantificación del crecimiento y la producción de pigmentos en los experimentos anteriores; así como las determinaciones de glucosa residual que indicaban una disminución del 1%, nos sugirió realizar un experimento para evaluar los requerimientos de glucosa; para verificar lo anterior se llevó a cabo un experimento donde se probaron diferentes concentraciones de glucosa (1-7%), con un control sin glucosa, en donde encontramos que los medios con 1 y 2% de glucosa (Graf.7), produjeron a las 96 h, 3.49 y 3.43 $\mu\text{g/ml}$ de carotenoides totales respectivamente.

Una concentración del 2% pareció adecuada por ser superior al 1% que se consume generalmente en estos cultivos, sin quedar de este modo como factor limitante.

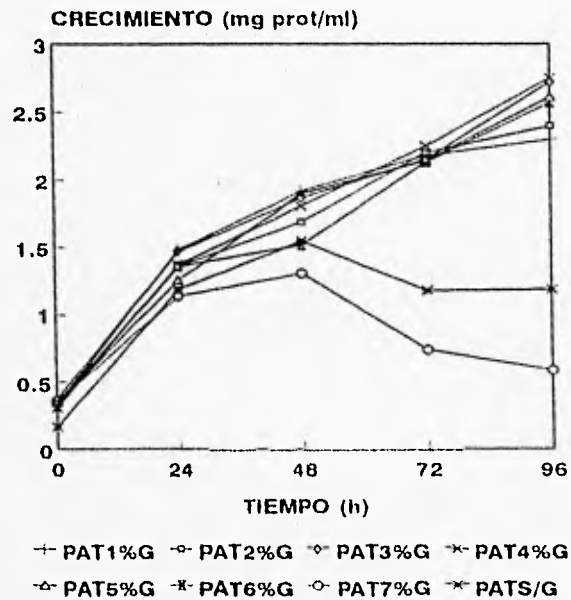
Resultó interesante descubrir que en la condición donde no se adicionó glucosa la producción de pigmentos fue de 2.47 $\mu\text{g/ml}$ a las 48 h, esta producción disminuye a 1.75 $\mu\text{g/ml}$ a las 96 h; sin embargo no tenemos una explicación clara de dicha disminución, puede ser una simple degradación después de la muerte celular de las bacterias por falta de una fuente de carbono asimilable.

En cuanto al comportamiento del crecimiento este fue congruente con los resultados obtenidos en producción volumétrica es decir a mayor crecimiento mayor producción del pigmento, aun que existieron condiciones donde se obtuvo una buena producción con menor crecimiento como fue el caso de la condición con 2% de glucosa (Graf.8).

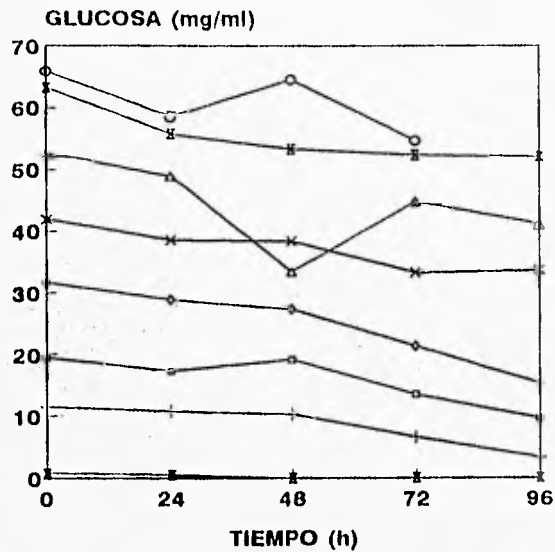
Se cuantificó la glucosa residual en el sobrenadante de las centrifugaciones de las muestras de cultivo en las distintas condiciones, en esta determinación observamos que el consumo fue muy semejante en todas (Graf.9) es decir lo máximo que llega a consumir el microorganismo es de 1% independientemente de la concentración original. El consumo de la glucosa no parece tener un correlación



Gráfica.7 Efecto de la concentración de glucosa en la producción de carotenoides totales

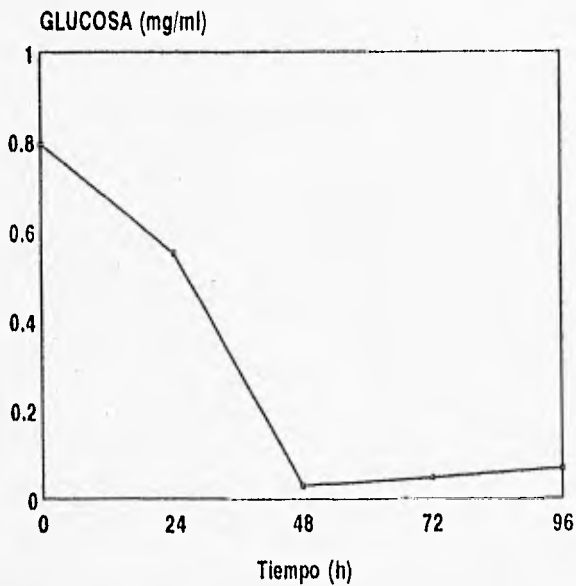


Gráfica.8 Efecto de la concentración de glucosa en el crecimiento



+ PAT1%G - PAT2%G - PAT3%G * PAT4%G
 ☆ PAT5%G # PAT6%G ○ PAT7%G # PATS/G

Gráfica.9 Consumo de glucosa en el medio patente con distintas concentraciones de glucosa



Gráfica.9b Consumo de glucosa en el medio "patente" sin glucosa

estrictamente proporcional al crecimiento o a la producción del pigmento.

El comportamiento del pH fue también, muy similar en las diferentes condiciones, las variaciones observadas fueron de 7.2 a 8.3 (Graf.10).

EVALUACIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA

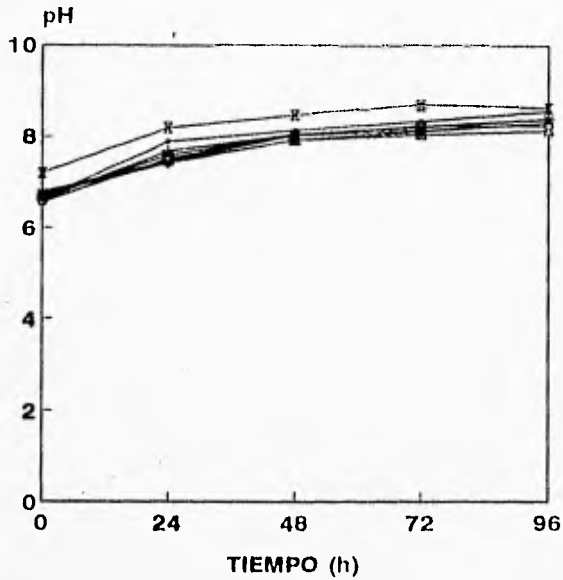
El extracto de levadura representó una fuente de nitrógeno compleja, para evaluar esta fuente de nitrógeno se probaron distintas concentraciones (1 - 4%) de la misma, con un control sin extracto de levadura en el medio base (PS/EX), conservando el resto de los nutrientes en su concentración original.

Como se observa en la (Graf.11), la máxima producción volumétrica de pigmentos se determinó a las 96 h en los medios sin extracto de levadura (5.17 $\mu\text{g/ml}$). Es interesante resaltar que al incrementarse la concentración de la fuente de nitrógeno los carotenoides totales disminuyen esto posiblemente se deba a que algún componente de este nutriente esté afectando negativamente la formación de los carotenoides, al agregarlo en concentraciones de 1 y 2%, ya que en concentraciones mayores del 2% se está afectando crecimiento y por tanto la producción. La segunda mejor producción se obtuvo con 1% de extracto de levadura (3.75 $\mu\text{g/ml}$), y la tercer mejor producción se obtuvo en la condición con 4% de extracto de levadura (2.84 $\mu\text{g/ml}$); las restantes condiciones alcanzan su máximo de producción a las 72 h, y todas ellas son producciones menores.

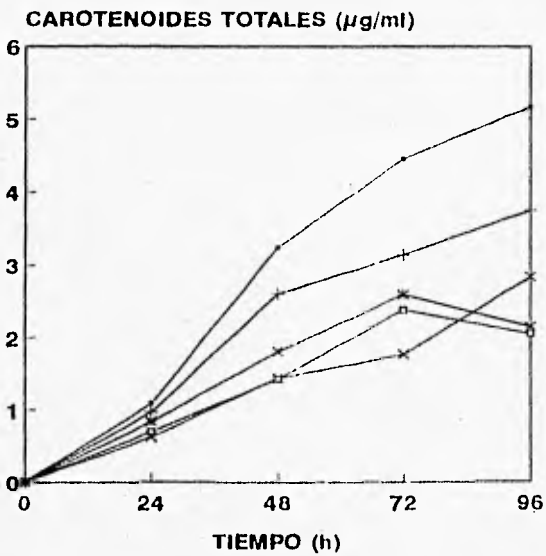
En cuanto al crecimiento (Graf.12), se observa que en los medios sin extracto y con 1 y 2%, el microorganismo crecen prácticamente al doble de lo obtenido en los medios con 3 y 4% de extracto de levadura. Esto sugiere que una concentración de extracto de levadura del 3% ó mayor, resulta desfavorable para el crecimiento y para la producción del pigmento.

Relacionando el crecimiento con la producción, se observó en general que en los medios donde las células crecen más hay mayor formación del pigmento.

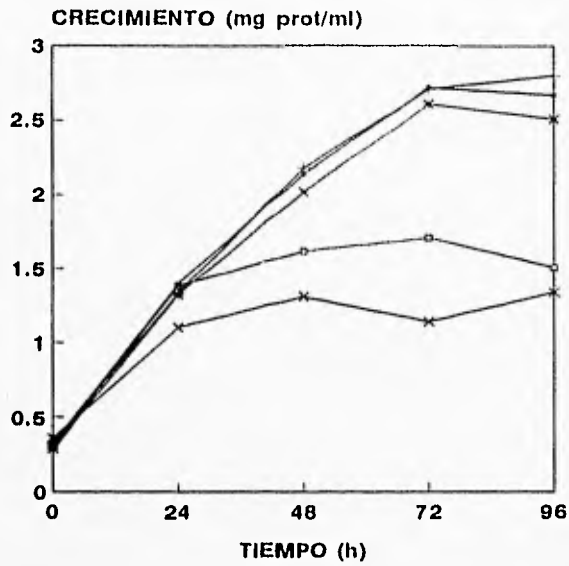
El comportamiento del pH en los medios, es el típico, el aumento notable de 0 a 24 h y después una tendencia a la estabilización determinándose valores cercanos a 8.3 . En las diferentes condiciones se inicia con un pH entre 6.58 y 6.71, a las 24 h se encuentran entre 7.25 y 7.66, y finalizan entre 8.04 y 8.2 excepto cuando se adicionó 4% del extracto, el cual terminó con 7.7, este descenso parece corresponder con el ultimo aumento del crecimiento y producción en este medio, y llama la atención ya que lo común es que al aumentar el crecimiento, se alcalinice el medio.



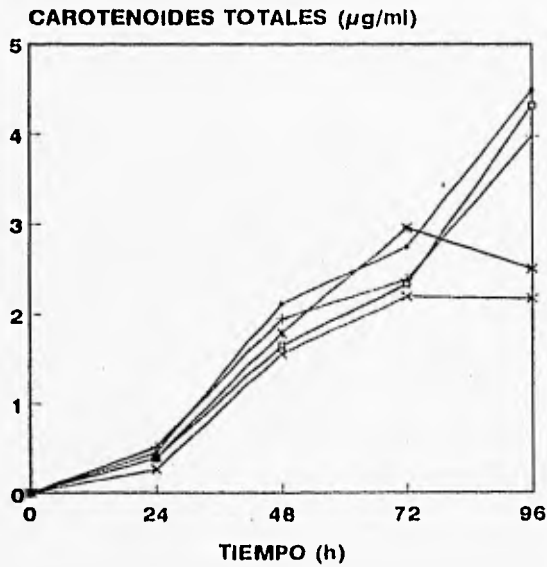
— PAT1%G + PAT2%G * PAT3%G □ PAT4%G
 * PAT5%G + PAT6%G □ PAT7%G * PATS/G
Gráfica.10 Cambios en los valores de pH en el medio "patente" con diferente concentración de glucosa



— PS/EX + P1%EX * P2%EX □ P3%EX * P4%EX
Gráfica.11 Efecto de la concentración de extracto de levadura en la producción de carotenoides totales



-- PS/EX + P1%EX * P2%EX -o- P3%EX * P4%EX
Gráfica.12 Efecto de la concentración de extracto de levadura en el crecimiento



-- PS/T + P0.5%T * P0.8%T -o- P1%T * P2%T
Gráfica.13 Efecto de la concentración de triptona en la producción de carotenoides totales

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TRIPTONA

Las variaciones en la concentración de triptona en el "medio base" son parte de las pruebas de variación en las concentraciones de cada uno de los nutrientes en el "medio base" original, y fue considerada como otra fuente de nitrógeno a evaluar.

Se utilizaron diferentes concentraciones de triptona (0.5, 0.8 1 Y 2%) y se corrió un control sin ella (PS/T). Los máximos de producción volumétrica de pigmento se obtuvieron a las 96 h (Graf.13).

La condición con 2% del nutriente fue la de menor producción de pigmentos y a partir de las 72 h dejó de producir en cambio en los medios con una concentración de triptona menor al 2% tienen una producción similar y conservan su tendencia a seguir creciendo y a continuar produciendo aún a las 96 h. de su incubación. Pero la mejor producción se obtuvo en la condición sin triptona (4.49 µg/ml). Este resultado nos indica que la fuente de nitrógeno se encuentra en exceso en el medio base. Además, se observa el mayor crecimiento en la condición sin triptona (Graf.14).

El comportamiento del pH en estos medios fue el típico, un aumento notable entre las 0 y 24 h de 6.60 a 6.70 al inicio y de 7.14 a 7.73 a las 24 h; posteriormente de 7.98 a 8.27 a las 48h, tendiendo a un establecimiento que permanece casi constante hasta las 96 h.

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL LICOR DE MAÍZ (AGUA DE COCIMIENTO DE MAÍZ)

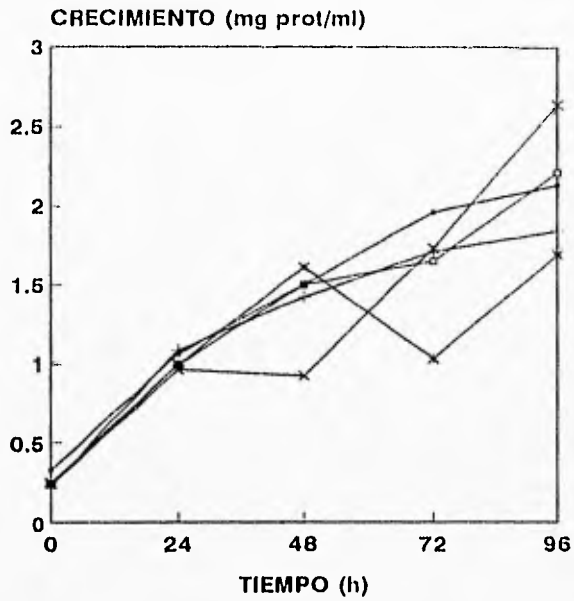
Continuando con las pruebas de fuentes de nitrógeno se decidió también probar variaciones en la concentración del licor de maíz (0.5- 2.5% v/v) (o agua de cocimiento de maíz), incluyendo una condición sin el nutriente (PS/L).

Al observar las dinámicas de los cultivos (Graf.15), encontramos que en todos los medios se desarrolla un vigoroso aumento de la producción desde las 24 h hasta las 96 h, excepto en la condición sin el licor de maíz donde es menos acelerado. La mayor producción se obtuvo con una concentración de 1% (3.34 µg/ml), en las demás condiciones las producciones son muy parecidas excepto la condición con 2.5 % que obtuvo una producción baja. Un hecho que destaca es que la ausencia de licor de maíz en el medio base provoca una baja en la producción de pigmentos pero una concentración mayor al 2% resulta excesiva, ya que afectó de manera negativa.

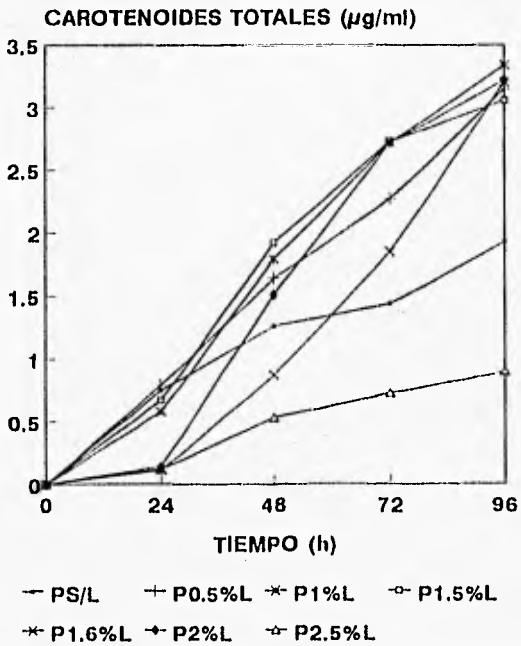
En cuanto al crecimiento, fue ligeramente mayor en la condición sin el licor de maíz (Graf.16), en comparación con los otros medios. Es decir creció bien pero su producción fue mucho menor.

El crecimiento en el medio con 2.5%, fue congruente con su baja producción, creció poco y produjo poco.

Consideramos la condición con 1% como la mas adecuada por tener la mejor producción, ya que no es muy diferente de la obtenida en otros medios pero tenemos la ventaja de utilizar menor cantidad de licor de maíz.



Gráfica.14 Efecto de la concentración de triptona en el crecimiento



Gráfica.15 Efecto de la concentración de licor de maíz en la producción de carotenoides totales

En las determinaciones de pH destacan los datos que muestran mayor acidez a las 24 h como fueron los que contenían 1.6% con 6.78; 2%, 6.90 y 2.5%, 6.78. Los otros medios se encuentran en los niveles típicos entre 7.64 y 8.03 y tienden a nivelarse a las 48 h entre 7.67 y 8.24, finalmente terminan a las 96 h entre 7.67 y 8.23. Esta disminución en el pH a las 24 h afectó de manera significativa el crecimiento y la producción.

EFEECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO

En los primeros experimentos donde se realizaron determinaciones de fósforo se observó claramente una brusca disminución de este nutriente desde el inicio del cultivo, pasando de niveles de concentración de 2 y 3 ($\mu\text{g/ml} \times 10^{-4}$) a 0.5 ($\text{mg/ml} \times 10^{-4}$) en el medio. Observamos también que el comportamiento de la concentración de fósforo era inverso al del crecimiento, es decir, cuando creció la bacteria disminuyó el fósforo y si dejaba de crecer se mantenía y si se iniciaba la muerte en el cultivo se determinaba un aumento en la concentración del fósforo. Nosotros atribuimos este aumento a una liberación de fósforo al medio por lisis celular.

Al observar el rápido descenso de la concentración de fósforo en las primeras 24 h, pensamos que un aumento en la concentración original del fósforo en el medio, favorecería el crecimiento y así mismo la producción de pigmentos, decidimos entonces probar la adición de distintas concentraciones (0-0.25%) de fósforo en forma de K_2HPO_4 en la condición control no se adicionó K_2HPO_4 (PS/P).

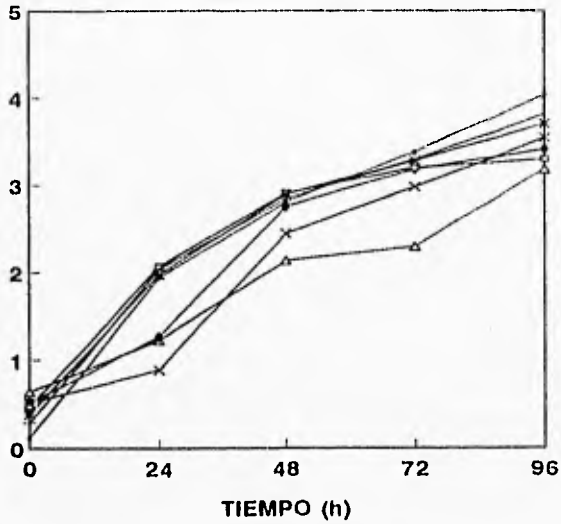
Como se muestra en la (Graf.17), no existe un efecto del fosfato en la biosíntesis de los carotenoides en las concentraciones probadas ya que no hubo diferencias entre las condiciones con fosfato y sin el. La máxima producción de pigmentos obtenida a las 96 h fue con una concentración de fosfato 0.1% (3.84 $\mu\text{g/ml}$) mientras que sin el ion se obtuvo 3.69 y con la concentración mas alta de fosfato que fue de 0.25% la producción fue de 3.58 $\mu\text{g/ml}$ como se observa los valores son muy parecidos, con lo cual podemos decir que no es indispensable agregar K_2HPO_4 al medio para producir los pigmentos.

Al observar los datos de crecimiento (Graf.18), observamos que hay condiciones cuyo crecimiento desacelera a partir de las 48 h de estas, la condición con 0.2% recupera un buen ritmo de crecimiento y alcanza los mismos niveles de crecimiento que los otros medios a las 96 h; la condición con 2.5% disminuye su crecimiento a las 48 h, a las 72 h deja de crecer y a las 96 h se registra la caída del crecimiento.

Lo desconcertante es que estas dos últimas condiciones conservan los niveles de producción de pigmentos, hasta las 96 h como el resto de las condiciones (sin K_2HPO_4 , o con 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 y 0.15 %) que siguen un ritmo constante de crecimiento hasta las 96 h.

El comportamiento del pH fue el mismo en todos los medios inician entre 6.31 y 6.46 continúan con el típico aumento hacia las 24

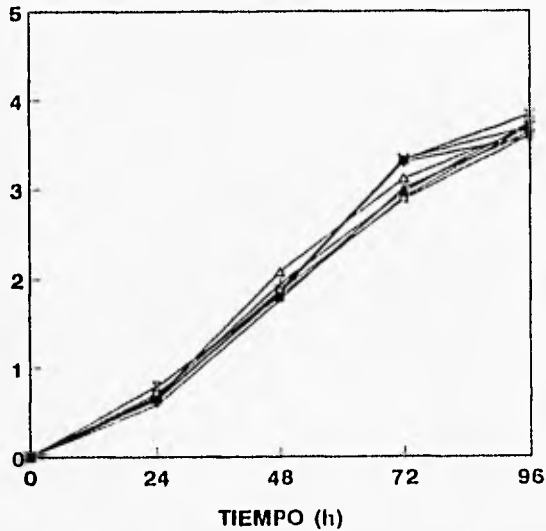
CRECIMIENTO (mg prot/ml)



+ PS/L + P0.5%L * P1%L ◊ P1.5%L
 * P1.6%L + P2%L ◊ P2.5%L

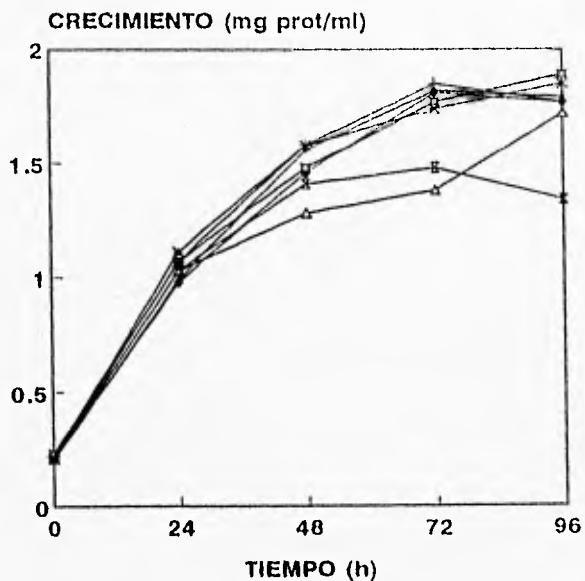
Gráfica.16 Efecto de la concentración de licor de malz en el crecimiento

CAROTENOIDES TOTALES (µg/ml)



-- PS/P + 0.025% * 0.05% ◊ 0.075%
 * 0.1% + 0.15% ◊ 0.2% * 0.25%

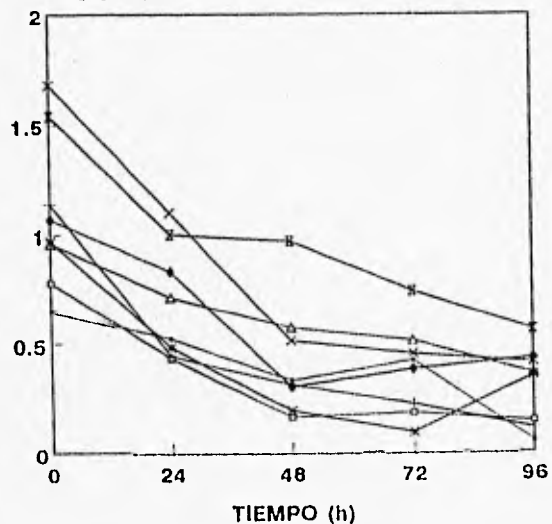
Gráfica.17 Efecto de la concentración del fósforo (K₂HPO₄) en la producción de carotenoides totales



+ PS/P + 0.025% * 0.05% ◊ 0.075%
 * 0.1% ◆ 0.15% ◡ 0.2% ▣ 0.25%

Gráfica.18 Efecto de la concentración de fósforo (K₂HPO₄) crecimiento

PI (μg/ml) x 10⁻⁴



+ PS/P + 0.025% * 0.05% ◊ 0.075%
 * 0.1% ◆ 0.15% ◡ 0.2% ▣ 0.25%

Gráfica.19 Consumo de fósforo (K₂HPO₄) en medios con diferente concentración de este ion

h donde se ubicaron entre 7.39 y 7.47, terminando a las 96 h entre 8.10 y 8.25. excepto P0.15% que resulto un poco menos básico 7.81 y P0.1% también menos básico con 7.25.

Al hacer la determinación del consumo de fósforo se observó que en las concentraciones mas bajas (0.025, 0.05, 0.075%) se consume casi en su totalidad el fosfato. En las condiciones de mayor concentración de fósforo aunque éste no es consumido totalmente, existe una disminución del ion principalmente en las primeras 48 h (Graf.19).

EVALUACIÓN DE SALES MINERALES

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE $MgSO_4$ y $MgCl_2$

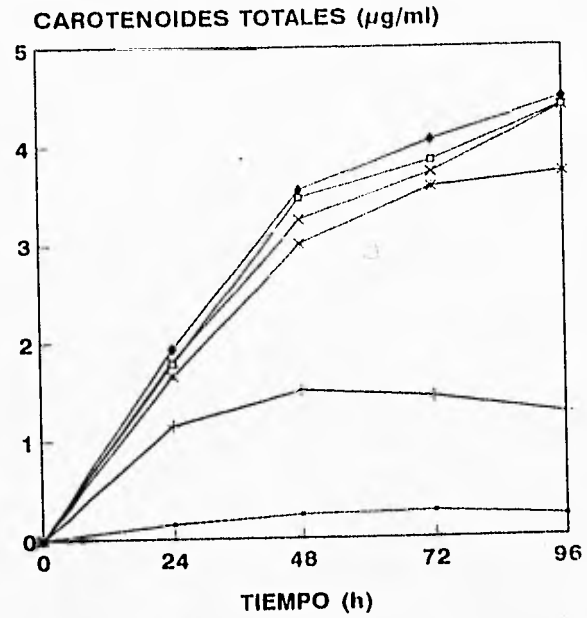
En reportes de la literatura (las patentes revisadas), se mencionan que el magnesio es importante para la biosíntesis de los pigmentos carotenoides y también importante para el crecimiento de *Flavobacterium*. Lo anterior nos dio pauta a llevar a cabo un experimento en donde se probaron diferentes concentraciones de $MgSO_4$ y de $MgCl_2$ para descartar una posible influencia del ion sulfato. Las concentraciones de sulfato y de cloruro de magnesio que se utilizaron fueron de 0-1.5%. En la condición control no se adicionó ni $MgSO_4$ ni $MgCl_2$ (PS/Mg)

Existe una clara diferencia entre la producción del pigmento al comparar los medios con mayor concentración de $MgSO_4$ (Graf.20), se observo que estos son claramente mejores productores, mientras que los medios con menos del 0.25% de $MgSO_4$ tienen producciones bajas. Cuando el ion no es adicionado al medio el pigmento no se produce. Se observa que estas diferencias en las producciones se definen desde las primeras 24 h, suponemos que este comportamiento muestra una indispensabilidad del $MgSO_4$.

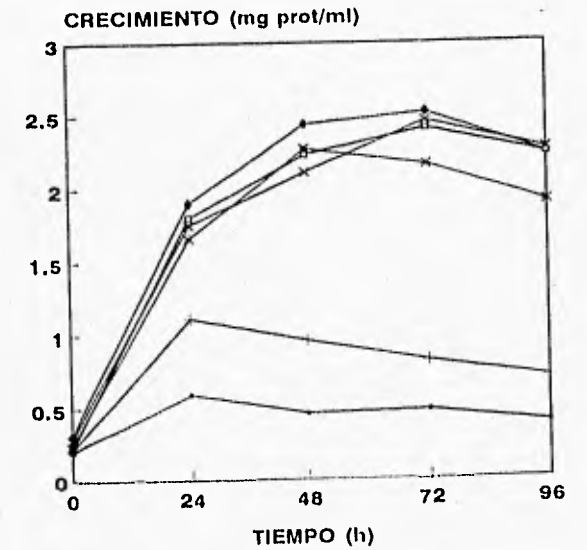
Las máximas producciones fueron registradas a las 96 h con 1.5% de $MgSO_4$ fue de 4.47 $\mu g/ml$, mientras que con $MgCl_2$ a la misma concentración fue de 5.76 $\mu g/ml$ (Graf.22). Al observar los máximos de producción registrados, notamos que las condiciones con mayor concentración de magnesio en forma de $MgSO_4$ o $MgCl_2$, son las que mas pigmentos producen, y que estas máximas producciones fueron registradas a las 96 h conservando una tendencia al aumento otro dato claro fue el que las mejores producciones se lograron en las condiciones con $MgCl_2$.

La condición menos favorecida fue con 0.25% de $MgSO_4$ la cual produjo 1.5 $\mu g/ml$ de pigmento (esta baja producción ya se había demostrado en un experimento anterior) mientras que con $MgCl_2$ fue de 3.29 $\mu g/ml$ a la misma concentración, este resultado es el doble de la producción obtenida con sulfato de magnesio; por otra parte, quedó demostrado que sin la sal de magnesio no se producen pigmentos, apenas se registraron niveles detectables (un máximo de 0.27 $\mu g/ml$).

Estos resultados nos sugieren que el magnesio es indispensable para el microorganismo, y para la producción de pigmentos, y además es adecuado cuando se agrega en forma de $MgCl_2$.



-- PS/Mg + 0.25% * 0.5% □ 0.75% * 1% △ 1.5%
Gráfica.20 Efecto de la concentración de MgSO_4 en la producción de carotenoides totales



-- PS/Mg + 0.25% * 0.5% □ 0.75% * 1% △ 1.5%
Gráfica.21 Efecto de la concentración de MgSO_4 en el crecimiento

Cuando se utilizó sulfato de magnesio en concentraciones de 0.5, 0.75 1.0 y 1.5% no hubo diferencias en cuanto a los niveles de crecimiento alcanzados, mientras que al adicionar 0.25% creció muy poco (50% menos) y al no adicionarlo no creció el microorganismo (Graf.21). Estos datos de crecimiento fueron congruentes con los de producción de pigmentos, es decir entre mas crecimiento se logro, se produjo más pigmento, y en las condiciones donde no creció, tampoco se produjo (Graf.21).

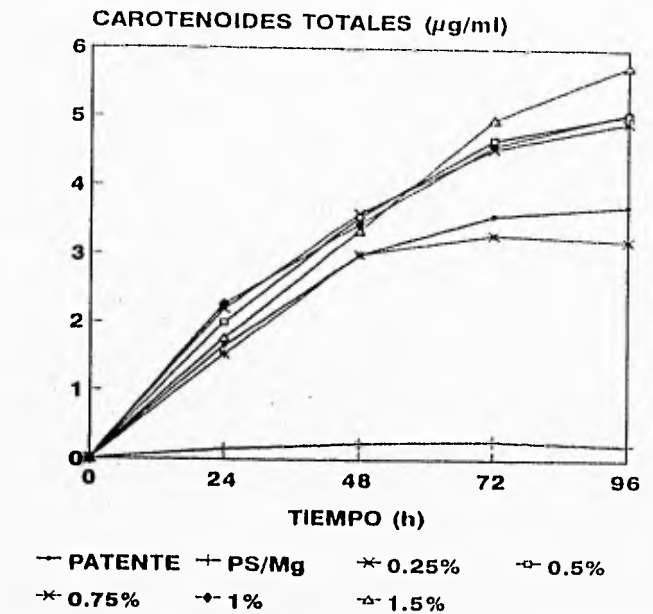
En el caso de cloruro de magnesio donde hubo un mayor crecimiento fue en la condición donde se agregó 0.75% (Graf.23), y a diferencia del sulfato, la condición con 0.25% generó mas crecimiento con cloruro de magnesio. La excepción ocurrió en el caso de 0.75% de $MgCl_2$ donde se obtuvo un buen crecimiento pero una producción similar a la de otras condiciones que tienen menores crecimiento. Por otra parte al comparar los logros de crecimiento de medios con $MgSO_4$ y $MgCl_2$, encontramos que fueron casi iguales.

Al graficar los máximos de producción de pigmentos contra la concentración de $MgCl_2$, encontramos que con una concentración de 0.5% de $MgCl_2$ se eleva la producción de pigmentos notablemente y aunque con 1.5 de $MgCl_2$ se obtiene una mejor producción, las diferencias no son tan grandes.

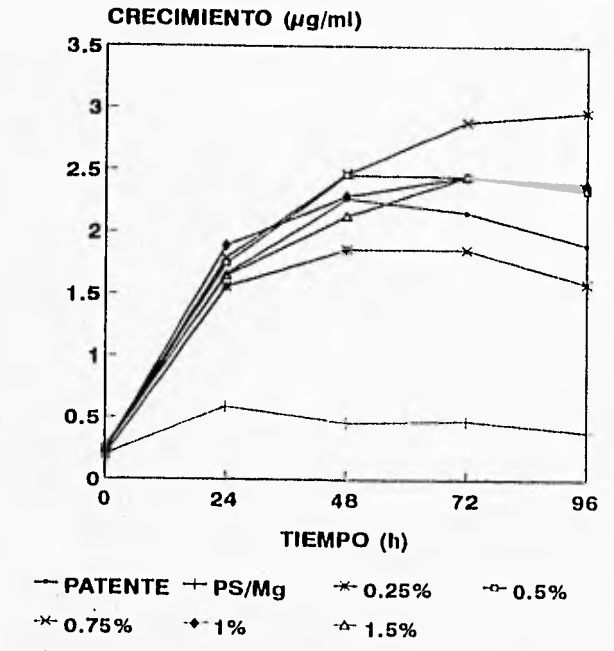
Las condiciones con $MgSO_4$ que presentaron un comportamiento típico en cuanto al pH fueron las condiciones con 0.5%, 0.75%, 1.0 y 1.5%, a diferencia de lo que ocurrió en las condiciones PS/Mg ó con 0.25%. La condición PS/Mg parte de 7.14 asciende a 7.68 a las 24 h, momento en que tiende a estabilizarse, y hacia las 96 h registra un valor de 8.11.

La menor alcalinidad registrada para estas dos últimas condiciones se podría relacionar con el bajo crecimiento obtenido, el pH más bajo se registro en la condición sin magnesio que es también la de menor crecimiento, estos resultados nos indican que la ausencia de magnesio o la baja concentración del mismo (menos de 0.5%) no favorecen el crecimiento y por esto mismo tampoco la producción de pigmentos.

En las condiciones con $MgCl_2$ se observa un comportamiento casi idéntico solo con una ligera menor alcalinidad en las últimos tiempos, para las condiciones 0.75% y 1.5%; al relacionar estos datos de pH con los de crecimiento se observa que el mejor crecimiento se logró en 0.75% (2.94 mg prot/ml) condición que mantuvo su tendencia a seguir creciendo, y a seguir produciendo, pero la cual presenta una estabilidad en su pH. La condición de 1.5% registró un buen crecimiento (2.45 mg prot/ml) como máximo, y es en la que mas pigmentos se produjeron y tampoco su pH tuvo variaciones importantes cuando se compara con los de las otras condiciones, solo fue ligeramente mas básico.



Gráfica.22 Efecto de la concentración de MgCl_2 en la producción de carotenoides totales



Gráfica.23 Efecto de la concentración de MgCl_2 en el crecimiento

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE FeSO_4

En las patentes de la compañía Nestlé reportadas para la producción de zeaxantina con el género *Flavobacterium*, se mencionan pruebas con el ion Fe^{2+} donde sugieren adicionarlo en concentraciones no mayores de 0.2M en el medio; y para evaluar su efecto decidimos probar también Fe en el medio base, bajo la forma de FeSO_4 . Tratándose de un metal como el Mg decidimos probarlo en las mismas concentraciones que el MgSO_4 (0-0.75%), en la condición control no se adiciona FeSO_4 (PS/Fe).

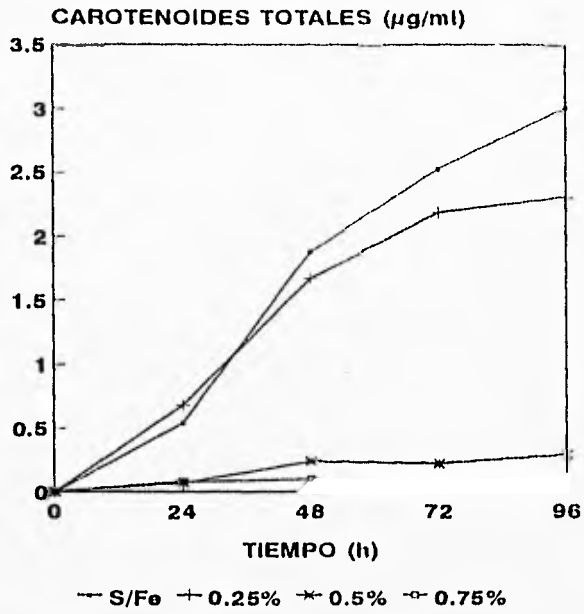
Al observar los niveles de producción fue claro que las concentraciones de 0.5% y 0.75% de FeSO_4 (Graf.24), resultaron excesivas, o tóxicas por que no se logró una buena producción de pigmentos, sin embargo hay que considerar que si se logró producir alguna cantidad detectable.

La mejor producción se logró en la condición PS/Fe. Una concentración de 0.25% de FeSO_4 mostró un efecto negativo en la producción de pigmentos, pero no así en el crecimiento (Graf.25).

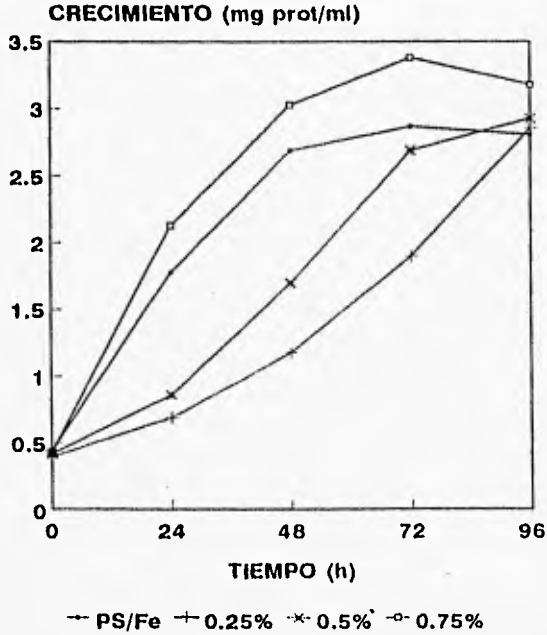
Las dinámicas de crecimiento sin FeSO_4 y en 0.25% fueron muy parecidas, presentaron un crecimiento vigoroso de 0 a 48 h, antes de entrar en fase estacionaria y después de las 72 h iniciaron una caída, mas pronunciada en 0.25% de FeSO_4 . En la condición con 0.5% el crecimiento se retrasó, 24 h y solo después de este tiempo el crecimiento se aceleró alcanzando los mismos niveles que en los medios PS/Fe y con 0.25% a las 72 h. A partir de este momento se inició la fase estacionaria. La condición con 0.75% presentó un ligero crecimiento hasta las 24 h pero a partir de ese momento dejo de crecer. Estos resultados muestran que concentraciones mayores de 0.5% de FeSO_4 afectaron negativamente el crecimiento de *Flavobacterium* sp y por tanto su producción.

El comportamiento del pH si mostró diferencias notables. Todas las condiciones partieron de un rango entre 6.13 y 6.44. Las condiciones sin FeSO_4 y 0.25% tienen el típico aumento de 0 a 24 h a 7.41 y 7.76 respectivamente, a partir de ese momento el aumento fue lento y a las 96 h se alcanzaron 8.21 y 8.17. Muy diferente fue el comportamiento en los medios con 0.5% y 0.75%, la tendencia a la acidificación ocurrió desde un principio, con 0.5% partió de 6.44 y descendió de una manera constante hasta 5.31. Con 0.75% mostró también una clara acidificación, lentamente pero a la baja; inició en 6.13 y llegó a 5.95 a las 96 h, esta condición es en la que *Flavobacterium* sp. menos creció y menos pigmentos produjo.

Con estos resultados se mostró claramente que entre menor fue la concentración de FeSO_4 , mejor fue la producción de pigmentos, así, la condición en donde no se agrego apareció como la mas adecuada, pero debemos tomar en cuenta que tal vez las concentraciones probadas fueron realmente excesivas. Sugerimos entonces probar concentraciones de FeSO_4 menores a 0.25%.



Gráfica.24 Efecto de la concentración de FeSO_4 en la producción de carotenoides totales



Gráfica.25 Efecto de la concentración de FeSO_4 en el crecimiento

EFFECTOS POR PRESENCIA O AUSENCIA DE FUENTES DE NITRÓGENO

Al evaluar las diversas fuentes de nitrógeno, se hicieron pruebas con condiciones donde se suprimía en el medio base, el extracto de levadura, la triptona o el licor de maíz.

Al suprimir el extracto de levadura y la triptona del medio de producción, se encontró una mayor producción de pigmentos pero al no adicionar el licor de maíz ocurrió una baja en la producción de pigmentos aún con la presencia del extracto de levadura y de la triptona por tanto el licor mostró ser indispensable para la producción de pigmentos. Decidimos entonces probar algunas condiciones donde se suprimieran dos fuentes de nitrógeno en el "medio base" (S/EX,T), o las tres, extracto de levadura, triptona y licor de maíz (S/EX,T,Lic M), para observar su importancia en el medio para el crecimiento de *Flavobacterium* sp. y su producción de pigmentos.

Las máximas producciones de pigmento registradas fueron de mayor a menor las siguientes: sin extracto de levadura ni triptona 4.44 µg/ml; patente con 2% de glucosa (PATENTE) 4.2 µg/ml; y patente sin extracto de levadura, triptona ni licor de maíz 0.26 µg/ml es decir, observamos que la mejor producción fue lograda en la condición sin extracto de levadura y sin triptona, pero con licor de maíz. En esta condición se obtuvo una producción incluso superior a la condición que contenía las tres fuentes de nitrógeno (PATENTE); en cambio fue claro que al retirar las fuentes de nitrógeno cayó la producción de pigmentos (Graf.26).

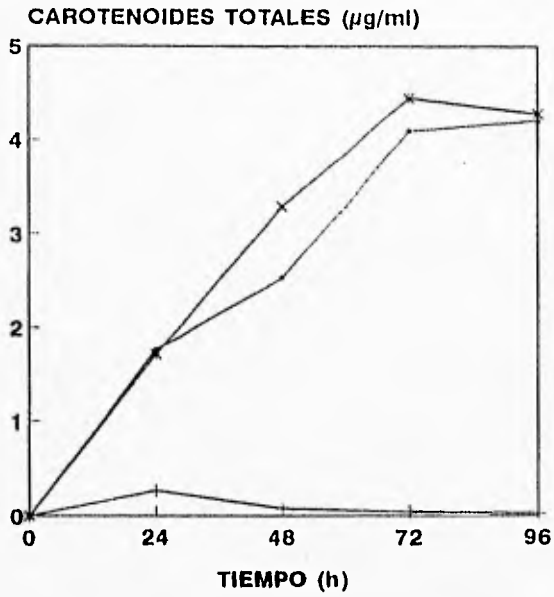
Los máximos de crecimiento, registrados a las 72 h fueron los siguientes: en el medio con las tres fuentes de nitrógeno 2.30 mg/ml; sin extracto y sin triptona pero con licor de maíz (S/EX,T) 2.28 mg/ml y sin fuente de nitrógeno (S/EX,T,Lic M) 0.55 mg/ml. Es decir, se alcanzaron los mismos niveles de crecimiento en la condición con las tres fuentes de nitrógeno y la que tiene únicamente licor de maíz (Graf.27).

El comportamiento del pH es el típico aumento de 0 a 24 h, partiendo de 6.50 y 6.40 respectivamente, alcanzando 8.20 y 8.13, para terminar en 8.60. La condición PS/EX,T.Lic M inició con 8.07, bajó a 7.35 a las 24 h y todavía tuvo una acidificación mas fuerte a 4.46 en las 48 h y finalmente registró a las 96 h 4.43. En esta última condición no hubo crecimiento, pero no sabemos a que atribuir la acidificación del medio.

EVALUACIÓN DE ALGUNAS CONDICIONES FISICOQUÍMICAS

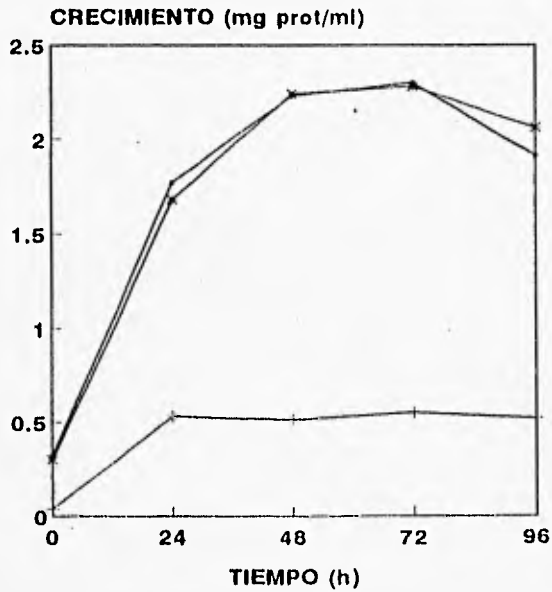
EFFECTOS DEL AJUSTE DE pH INICIAL CON NaOH ó CON NH₄OH

En los experimentos anteriores se realizó el ajuste del pH con NH₄OH, como se recomendaba en la patente; sin embargo las determinaciones de



— PATENTE + S/EX,T,Lic M * S/EX,T

Gráfica.26 Efecto de la presencia o ausencia de fuentes de nitrógeno orgánico sobre la producción de carotenoides



— PATENTE + S/EX,T,Lic M * S/EX,T

Gráfica.27 Efecto de la presencia o ausencia de fuentes de nitrógeno orgánico sobre el crecimiento

amonio realizadas, al relacionarlas con el crecimiento, parecen mostrarnos que el amonio puede resultar tóxico cuando sus concentraciones aumentan en el medio; por otra parte los costos disminuyen al utilizar NaOH en lugar de NH_4OH .

Decidimos entonces comparar los efectos en producción y crecimiento por el ajuste de pH inicial con NaOH ó con NH_4OH ; en esta prueba esperábamos que el crecimiento de *Flavobacterium* sp. y su producción de pigmentos mejorara al ajustar con NaOH en valores iniciales inferiores a 7.2.

CONDICIONES EXPERIMENTALES

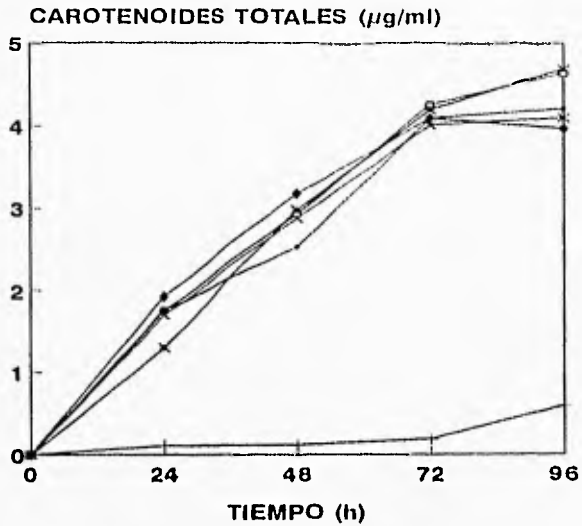
Se probaron los siguientes valores de pH :

Ajuste de pH con NaOH	Ajuste de pH con NH_4OH
pH 5.5	pH 5.5
pH 6.5	pH 6.5
pH 7.2	pH 7.2
pH 8.0	pH 8.0
pH 8.5	pH 8.5

Los máximos de producción de pigmentos en las condiciones de ajuste con NaOH, fueron registrados a las 96 h de fermentación y fueron de mayor a menor los siguientes: pH 6.5 con 4.68; pH 7.2 con 4.63; pH 8.0 con 4.09; y pH 8.5 con 4.09 $\mu\text{g/ml}$ este último a las 72 h y con tendencia a disminuir. El comportamiento de las dinámicas fue muy parecido, excepto en la condición pH 5.5 que no produjo sino hasta a partir de las 72 h de incubación logrando solo 0.59 $\mu\text{g/ml}$ hasta las 96 h (Graf.28).

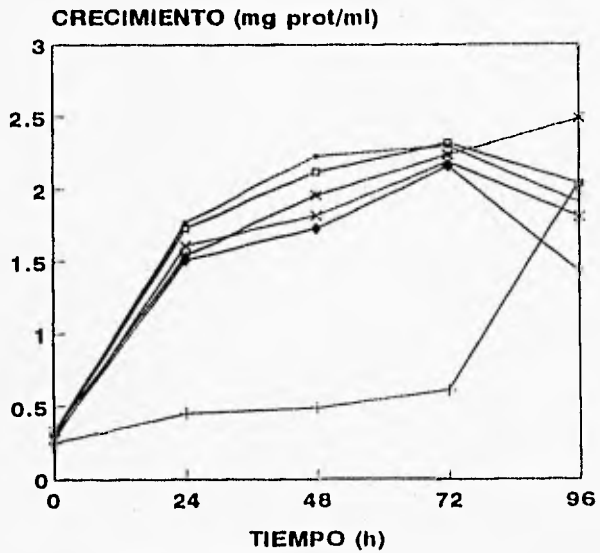
Los máximos de producción de pigmentos, en las condiciones de ajuste con NH_4OH se registraron a las 96 y 72 h de fermentación, y fueron de mayor a menor los siguientes: pH 5.5 con 0.12; pH 6.5 con 5.11; pH 7.2 con 4.20; pH 8.0 con 4.04 y pH 8.5 con 3.26 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Graf.30). El comportamiento de las dinámicas fue muy semejante hasta las 24 h, después de este tiempo empiezan a diferenciarse las producciones y a las 96 h se observan claramente diferentes; a pH 5.5 no se logro producir; las condiciones de pH 8.0 y 8.5 dejan de producir a las 72 h y solo el control a 7.2 y pH 6.5, conservaron su tendencia a seguir produciendo a las 96 h.

Los máximos de crecimiento en las condiciones de ajuste inicial con NaOH se registraron a las 96 y 72 h, y fueron de mayor a menor las siguientes: a pH 6.5 de 2.49; a pH 7.2 de 2.32; a pH 8.0 de 2.1; a pH 8.5 de 2.16 y a pH 5.5 de 2.05 (mg prot/ml) respectivamente. Se observó que a pH 5.5 el crecimiento inició de manera acelerada, a partir de las 72 h, por esto solo logró producir pigmentos a partir de este tiempo. Observamos también el cese del crecimiento a partir de las 72 h. en las condiciones con pH mayores a 6.5 y que contrariamente, en la condición a pH 6.5 se mantuvo la tendencia a seguir creciendo y produciendo aún a las 96 h (Graf.29).



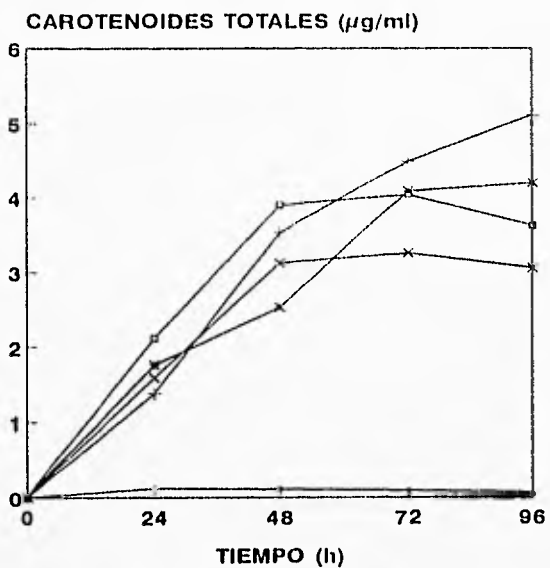
--- PAT 7.2 + pH 5.5 * pH 6.5
 -o- pH 7.2 * pH 8.0 + pH 8.5

Gráfica.28 Efecto del pH Inicial en la producción de carotenoides totales (ajuste con NaOH)

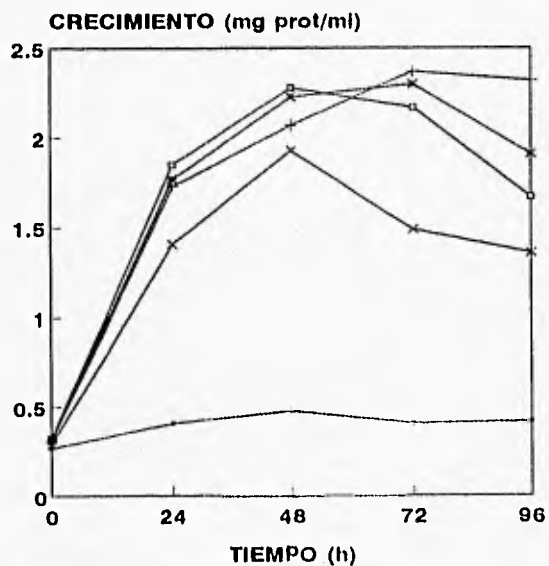


--- PAT 7.2 + pH 5.5 * pH 6.5
 -o- pH 7.2 * pH 8.0 + pH 8.5

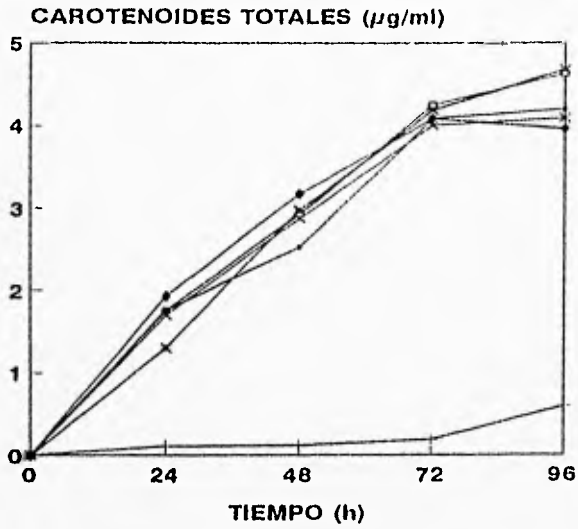
Gráfica.29 Efecto del pH inicial sobre el crecimiento (ajuste con NaOH)



--- pH 5.5 + pH 6.5 * PATpH 7.2 -□- pH 8.0 * pH 8.5
Gráfica.30 Efecto del pH Inicial en la producción de carotenoides totales (ajuste con NH_4OH)

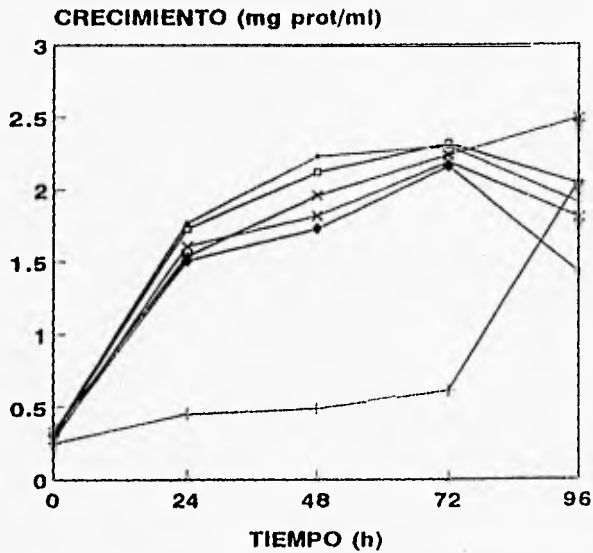


--- pH 5.5 + pH 6.5 * PATpH 7.2 -□- pH 8.0 * pH 8.5
Gráfica.31 Efecto del pH Inicial en el crecimiento (ajuste con NH_4OH)



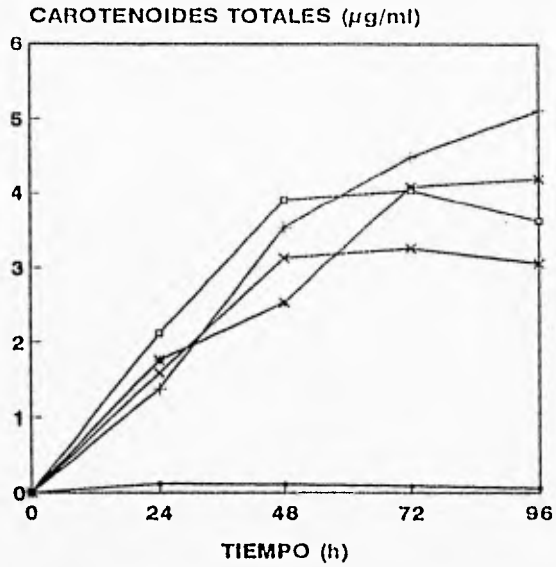
— PAT 7.2 + pH 5.5 * pH 6.5
 — pH 7.2 * pH 8.0 — pH 8.5

Gráfica.28 Efecto del pH Inicial en la producción de carotenoides totales (ajuste con NaOH)

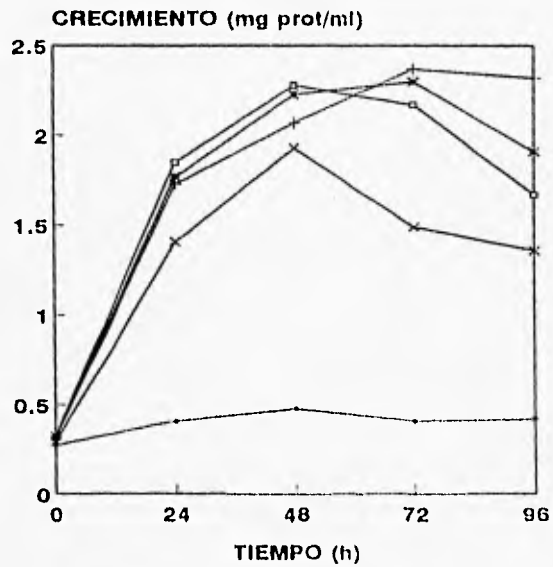


— PAT 7.2 + pH 5.5 * pH 6.5
 — pH 7.2 * pH 8.0 — pH 8.5

Gráfica.29 Efecto del pH inicial sobre el crecimiento (ajuste con NaOH)



○ pH 5.5 △ pH 6.5 * PATpH7.2 □ pH 8.0 * pH 8.5
 Gráfica.30 Efecto del pH Inicial en la producción de carotenoides totales (ajuste con NH_4OH)



○ pH 5.5 △ pH 6.5 * PATpH7.2 □ pH 8.0 * pH 8.5
 Gráfica.31 Efecto del pH Inicial en el crecimiento (ajuste con NH_4OH)

Los máximos de crecimiento en las condiciones de ajuste con NH_4OH , se registraron a diferentes tiempos, siendo de mayor a menor los siguientes: a pH 6.5 de 2.36; a pH 7.2 de 2.30; a pH 8.0 de 2.28; a pH 8.5 de 1.93 y a pH 5.5 de 0.48 mg prot/ml respectivamente. Se observó que la condición a pH 5.5 no logró desarrollar crecimiento; a pH 6.5 creció muy bien hasta las 72 h; y en las condiciones con pH mayor a se 6.5 registró un cese del crecimiento a partir de las 48 h (Graf.31). Los datos anteriores nos muestran en este experimento que valores de pH inferiores a 6.5 no favorecieron el desarrollo del crecimiento, independientemente de la sustancia que se utilice en el ajuste y que las condiciones con ajuste de pH inicial superiores a 6.5 dejaron de crecer antes de las 96 h (esta vez, incluso a pH 7.2 con NH_4OH), solo la condición de pH 6.5 con NaOH tendió a conservar el aumento del crecimiento hasta las 96 h.

Al observar el comportamiento del pH en la condiciones de ajuste inicial con NaOH encontramos curiosamente que el comportamiento fue casi idéntico para casi todas las condiciones; es decir ocurrió el aumento típico de 0 a 24 h (excepto a pH 5.5), independientemente del pH inicial, llegando a las 24 h a un pequeño rango entre 8.09 y 8.49 y después continuaba su incremento en hacia las 96, h entre 8.57 y 8.91. La condición pH 5.5 inició en 6.01 y se mantuvo casi igual y a las 96 h registró 5.70.

En las condiciones con NH_4OH ocurrió prácticamente lo mismo, partió de un rango entre 5.60 y 7.76; a las 24 se encontró entre 7.98 y 8.25, aumentó ligeramente para a las 96 h registrarse entre 8.39 y 8.65; la excepción también fue la condición pH 5.5 que inició en 5.60 y a las 96 h registró 5.78, tal vez ligeramente menos ácido por el crecimiento ocurrido después de las 72 h.

AIREACIÓN

TIPO DE MATRAZ Y FRACCIÓN DE LLENADO

En la evaluación de las condiciones fisicoquímicas consideramos a la aireación que se muestra como un factor determinante para el crecimiento y la producción de distintos principios en diferentes especies de microorganismos.

Dentro de nuestra evaluación tratamos esclarecer si la aireación tenía un efecto significativo en el crecimiento de *Flavobacterium* sp. y su producción de pigmentos; para ello decidimos probar diferentes tipos de matraces de diversos tamaños y varios volúmenes de medio. Las condiciones manejadas fueron las siguientes:

"Medio base" en diferente tipo de matraz Erlenmeyer y variando el volumen del medio.

CONTROL

50/250 Liso (L) A y B

EXPERIMENTALES

MATRACES LISOS

(vol. ml/capacidad ml)

50/250 A control

100/250

150/250

50/500

100/500

200/500

MATRACES BAFLEADOS

(vol. ml/capacidad ml)

25/250 (3 matraces por tiempo)

50/250 B cont 0,24,48 72 96 h)

100/250

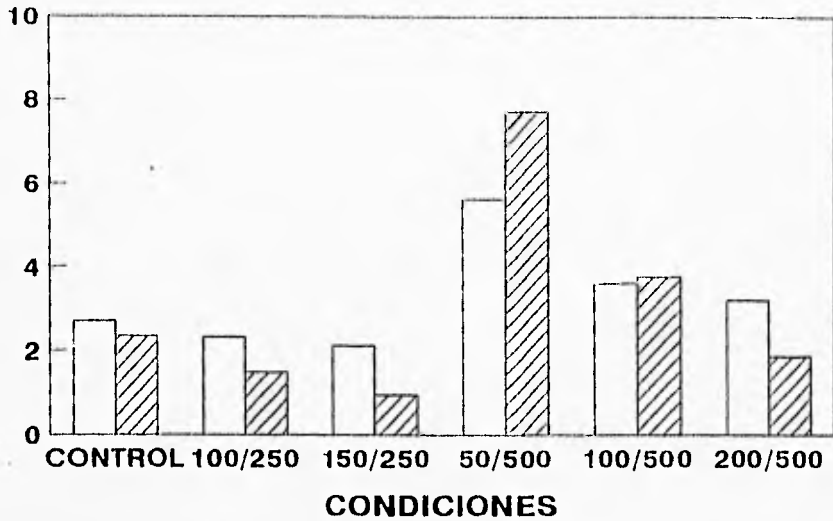
150/250

Los máximos de producción volumétrica ($\mu\text{g/ml}$) de pigmentos logrados en matraz liso, se registraron en general a las 72 h ; y fueron de mayor a menor los siguientes: en 50/500 dio 7.70; en 100/500 dio 3.77; en 50/250 dio 2.35 y 2.91; en 200/250 dio 1.87; en 100/250 dio 1.49 y en 150/250 dio 0.95 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente este último a las 96 h.

Al comparar las dinámicas de producción, destacó la condición de 50/500 por que fue la que tuvo un aumento vigoroso y constante en la síntesis. De las condiciones fue la mas aireada, por su fracción de llenado y en comparación con las otras, observamos también que el comportamiento de las dinámicas ocurrió en función de las fracciones de llenado, es decir cuanto mayor fue el volumen de aire en relación al volumen del medio, se produjeron mas pigmentos (Graf.32).

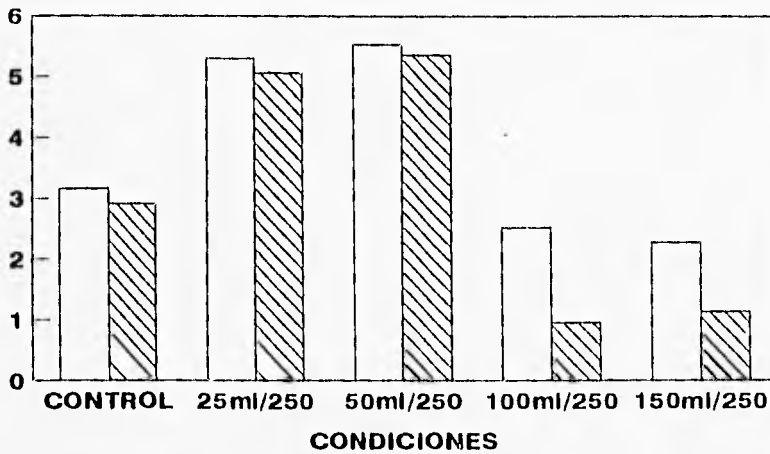
Los máximos de producción de pigmentos, en las condiciones con matraces bafleados, se registraron en casi todos los casos a las 72 h; siendo de mayor a menor los siguientes: en 50/250 dio 5.36; en 25/250 dio 5.06; en 150/250 dio 1.13 y en 100/250 dio 0.95 μg de pigmento/ml respectivamente (a las 48 h), (Graf.33).

Respecto a las dinámicas de producción, también fue claro que las condiciones con volúmenes de aire cada vez mayores en comparación con su volumen medio (que es la fracción de llenado), produjeron mas pigmentos, sin embargo se observó que en la condición 25/250 se produjo menos que en la condición 50/250, hay que recordar que las condiciones para la toma de muestra en la condición 25/250 era toma de muestra y eliminación del matraz; para evitar variaciones derivadas de una reducción importante del volumen del medio; así entonces se tomaron tres matraces para la muestra de cada tiempo (24,48,72 y 96 horas). Estos resultados nos cuestionan sobre si este mayor volumen de aire pudo llegar a afectar negativamente la producción de pigmentos. Existe una condición que tiene igual fracción de llenado que la condición 25/250 esta es la de 50/500, que produjo casi el doble, pero en matraz liso; nos preguntamos entonces si la fracción de llenado y el matraz tipo bafleado provocaron algún nivel de aireación con efecto negativo para la producción de pigmentos. Seria conveniente hacer mas pruebas al respecto, y al mismo tiempo hacer cromatografias de los pigmentos producidos, para su identificación.



□ Prot.(mg/ml) ▨ Prod.Vol.(µg/ml)

Gráfica.32 Efecto de la aeración en el crecimiento máximo y en las producciones máximas de carotenoides totales utilizando diferentes volúmenes de medio en matraces lisos de 250 ml y 500 ml de capacidad



□ Prot.(mg/ml) ▨ Prod.Vol.(µg/ml)

Gráfica.33 Efecto de la aireación en el crecimiento máximo y en las producciones máximas de carotenoides totales utilizando diferentes volúmenes en matraces bafleados de 250 ml de capacidad

Los máximos de crecimiento (mg prot/ml) logrados en las condiciones con matraz liso, fueron registradas a las 72 resultaron de mayor a menor las siguientes: en 50/500 dio 5.63; en 100/500 dio 3.61; en 200/500 dio 3.21; en 50/250 dio 2.71 (control A matraces lisos); y 3.16 (control B matraces bafleados); en 100/250 dio 2.32 y en 150/250 dio 2.12 mg prot/ml respectivamente.

Se observó claramente en estas dinámicas que el mayor crecimiento en 50/500 también logró la mayor producción de pigmentos. el crecimiento en estas condiciones también guardó relación con su fracción de llenado, es decir las condiciones con mayor volumen de aire en relación con el volumen de medio, fueron las que presentaron mayor crecimiento (Graf.32).

Los máximos de crecimiento logrados en matraces bafleados, fueron de mayor a menor los siguientes: en 50/250 dio 5.53 a las 48 h; en 25/250 fue 5.30 a las 96 h; en 100/250 fue 2.52 a las 24 h; y en 150/250 fue 2.28 mg prot/ml respectivamente, (a las 72 h) (Graf.33). Se observó que los niveles de crecimiento fueron congruentes con la producción de pigmentos, es decir entre más se creció mas pigmentos se produjeron. los datos sobre los que existe duda en cuanto a la dinámica dibujada son los que correspondieron a las 72 h que resultaron mas bajos en crecimiento y producción que los matraces de las 48 h, hay que recordar que este muestreo se realizó tomando muestras de matraz por tiempo, así pues los matraces de las 48 h y 72 h pudieron tener un desarrollo diferente.

Se sugiere la realización de mas pruebas de muestreo con la condición 25/250 pero sin descarte de matraz y comparar así las dinámicas que describen y las variaciones en los resultados.

Un aspecto que quedo claro fue la relación entre aireación y crecimiento; entre mejor aireación mayor crecimiento, comparando los resultados obtenidos en todas las condiciones

Al comparar las dinámicas del comportamiento de pH en los medios con matraz liso, encontramos la tendencia a la alcalinización en todas las condiciones, pero los datos que destacan son los de menor alcalinidad para los medios menos oxigenados de las condiciones 150/250 y 100/250, menos básicos que el control; y mas básicos que el control 200/500, 100/500 y el más básico de todos 50/500; lo que sugiere que la aireación del medio esta relacionada con la alcalinización o acidificación del medio dependiendo del tipo de metabolismo favorecido o desfavorecido por la aireación.

Los medios más aireados son los más básico son los que más crecieron y más produjeron y los menos aireados son los menos básicos, los que menos crecieron y menos produjeron. En las condiciones con matraces bafleados observamos también que las menos aireadas fueron las menos básicas; la condición 100/250 tuvo casi el mismo pH que el control (50/250 liso), pero en 100/250 creció y produjo más; así también las condiciones más aireadas fueron las más básicas, las que más crecieron y las que mas pigmentos produjeron.

MEDIO BASE Y CONDICIONES MODIFICADAS

Al finalizar las pruebas de evaluación de nutrientes, en fuente de carbono (glucosa); en fuentes de nitrógeno (extracto de levadura, triptona y licor de maíz); así como las pruebas físicoquímicas de ajuste de pH inicial con NH_4OH o NaOH ; el tipo de matraz y el nivel de aireación. Comparamos los logros en producción volumétrica de pigmentos y el comportamiento de sus dinámicas en todas las condiciones; así mismo con los logros de crecimiento y pH con el objeto de seleccionar las condiciones más favorables y hacerlas coincidir en una sola. La gráfica resumen (Graf.34), muestra un conjunto amplio de los resultados mas notables obtenidos en los experimentos.

Las condiciones seleccionadas fueron las siguientes:

- Medio patente original con 2% de glucosa en vez de 7% (P2%G).
- La condición 1.6% licor de maíz, igual que la anterior pero solo 1.6% de licor de maíz y sin extracto de levadura ni triptona.
- La condición 1.5% MgCl_2 igual que (P2%G) pero con 1.5% de MgCl_2 en vez de 0.5% de MgSO_4 .
- La condición (P2%G) con ajuste a pH inicial a 6.5 con NH_4OH .
- La condición (P2%G) utilizando matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad y con 50 ml de medio.

Sabíamos que los logros en producción de pigmentos y en crecimiento no necesariamente tendrían que ser mayores con esta condición, la intención era precisamente evaluar el resultado de conjuntar estas condiciones seleccionadas y compararlas con las del medio base original y las condiciones hasta entonces probadas.

Las condiciones probadas fueron:

CONTROL

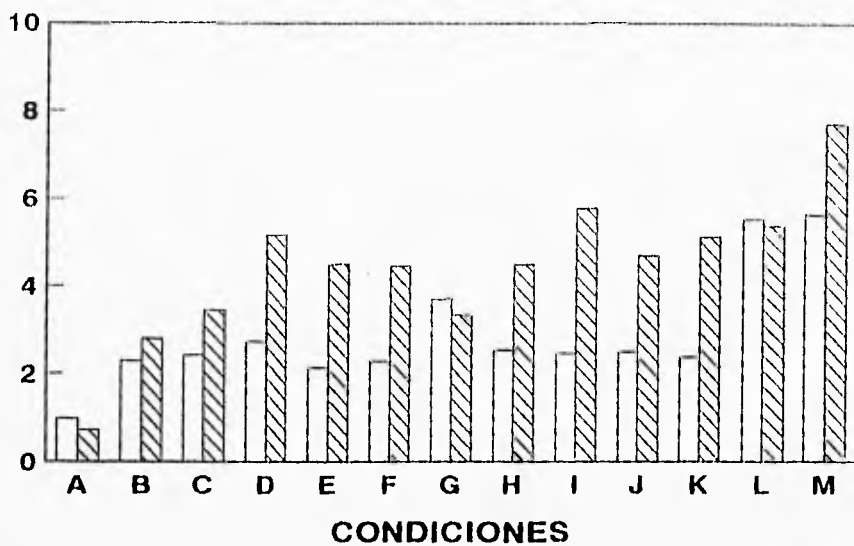
P2%G (medio con la composición original pero con 2% de glucosa en vez de 7%)

EXPERIMENTALES

Medio modificado, (Med. Modif.) con las siguientes características: Licor de maíz 1.6%, cloruro de magnesio 1.5%, aceite de maíz 0.08%, y glucosa 2% (esterilizada por separado) y agua de la llave; el pH se ajusto con NH_4OH a 6.5, en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 50 ml de medio.

Medio Modificado con 3% de Licor de Maíz, (Med.Modif.3% LM).

Las máximas producciones volumétricas de pigmento se registraron a las 96 h En la condición Med.Modif. se logran 4.6 $\mu\text{g/ml}$ y en P2%G

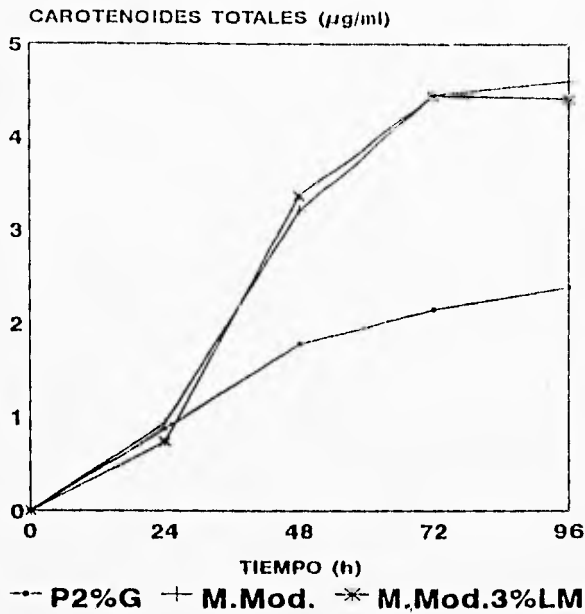


□ PROT.(mg/ml) ▨ PROD.VOL.(µg/ml)

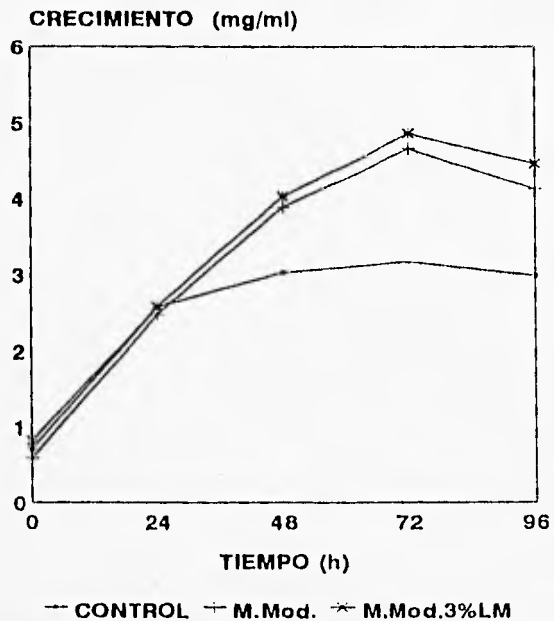
Gráfica.34 Maximos de producción de carotenoides totales y maximos de crecimiento con *Flavobacterium* sp. en distintas condiciones (gráfica resumen)

CONDICIONES

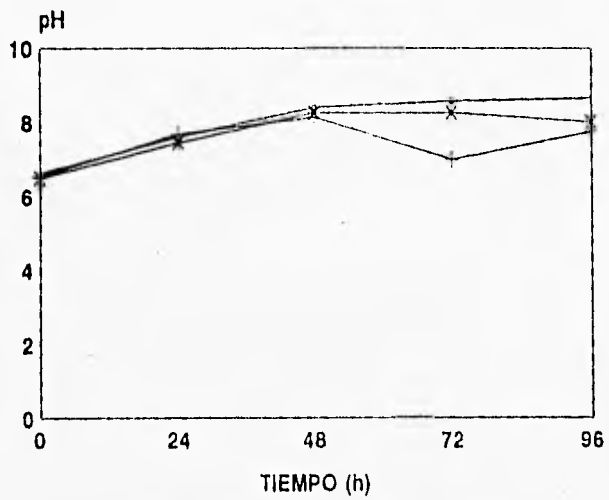
- A. TYN
- B. PATENTE 7 % DE GLUCOSA
- C. PATENTE 2 % DE GLUCOSA (P 2 % G)
- D. P 2% G SIN EXTRACTO DE LEVADURA
- E. P 2% G SIN TRIPTONA
- F. P 2% G SIN EXTRACTO NI TRIPTONA
- G. P 2% G 1 % LICOR DE MAIZ
- H. P 2% G CON 1.5 % DE $MgSO_4$
- I. P 2% G CON 1.5 % DE $MgCl_2$
- J. P 2% G pH INICIAL 6.5 (NaOH)
- K. P 2% G pH INICIAL 6.5 (NH_4OH)
- L. AEREACION (MATRACES BAFLEADOS DE 250 ml, 50 ml DE MEDIO)
- M. AEREACION (MATRACES ERLLEN MEYER DE 500 ml, 50 ml DE MEDIO)



Gráfica.35 Efecto en la producción de carotenoides totales por modificaciones a la patente original, condiciones: patente 2% de glucosa P2%G; medio modificado M.Mod; y M.Mod 3 % licor de maíz



Gráfica.36 Efecto de las modificaciones a las condiciones de cultivo en el crecimiento, condiciones: "patente" medio modificado y medio modificado con 3% de licor de maíz



→ CONTROL + M.Mod. * M.Mod.3%LM

Grafica 37. Evolución de los valores de pH en los medios Control (P2%G) medio modificado y medio modificado con 3% de Licor de Maíz

2,39 µg/ml, claramente mayor producción con las modificaciones a las condiciones originales; y Med. Modif.3% LM 4.44 µg/ml, (Graf.35).

El mayor crecimiento (mg prot/ml) se logró en Med.Modif., registrando 4.66 a las 72 h; y en P2%G se registró como máximo 3.18 a las 72 h y Med.Modif.3% LM 4.86, (Graf.36).

En cuanto a pH, P2%G partió de 6.61 y aumentó, a las 24 h registró 7.61, 8.40 a las 48 h momento en que empezó a estabilizarse, y a las 96 h registró 8.66. La condición Med.Modif partió de 6.53, a las 24 h registró 7.62, 8.14 a las 48 h y finalizó las 96 con 7.75, con una menor alcalinidad. Se ha observado que las condiciones en que mas creció y mas pigmentos produjo, tendieron a hacerse un poco menos básicas en los tiempos finales; esto mismo ocurre con Med.Modif.3% LM, (Graf.37).

CROMATOGRAFIAS

Con objeto de identificar los pigmentos producidos por *Flavobacterium* sp. en las diferentes condiciones, se realizaron cromatografías sobre capa fina, utilizando una muestra de *Tagetes erecta* (flor de cempasuchitl) como standard.

CROMATOGRAFIA I

Con esta cromatografía quisimos verificar si los pigmentos producidos por *Flavobacterium* sp. en las condiciones YTN y P2%G (patente original con 2% de glucosa en vez del 7% de glucosa original), eran los mismos.

RESULTADOS (Ilustración 1)

Se observaron a luz natural las manchas de los pigmentos producidos en las dos condiciones y se identificaron dos manchas al mismo nivel para ambas condiciones, como zeaxantina, según la comparación por la observación en placas de cromatografía anteriores en las cuales se compara una muestra de pigmentos de un standard del extracto de *Tagetes erecta* o flor de cempasuchitl, donde se muestra la ubicación de zeaxantina (material proporcionado por el Mtro. Sergio Alcántara). En nuestras placa se observan las muestras de pigmento contenidas en los cultivos con medio YTN y medio "patente" con 2% de glucosa. Por de bajo de la mancha de zeaxantina se observaron, en la muestra de la condición P2%G, otras dos manchas poco nítidas, producidas en una menor proporción, también se observaron otras manchas en la parte superior, de una forma irregular y que parecen corresponder a beta-caroteno.

Con esta cromatografía se pudo observar que los pigmentos producidos por *Flavobacterium* sp. pueden variar según las condiciones de cultivo,

CROMATOGRAFIA I



ILUSTRACION 1

fue notable que en el medio P2%G se produjo mas zeaxantina que con el medio YTN, aclaramos también que lo que se cuantificó en espectofotometro fue la producción de carotenoides totales.

CROMATOGRAFIA II

CONDICIONES:

St *Tagetes erecta* (muestra control)

P2%G	(Patente con 2% de glucosa)
P2%G L.M.	(P2%G con 1.6% de licor de maíz pero sin extracto de levadura ni triptona)
P2%GS/EX	(P2%G sin extracto de levadura)
P2%G1.5%MgCl ₂	(P2%G con 1.5% de MgCl ₂ , envés de MgSO ₄ ,
P2%G50/500	(P2%G, 50 ml de medio en matraz Erlenmeyer de 500 ml liso)

RESULTADOS (Ilustración 2)

Comparando las condiciones, la que más produjo zeaxantina fue P2%G1.5%MgCl₂; P2%GS/EX se mostró como la segunda condición mas productora de zeaxantina, sin embargo estas condiciones y también las restantes mostraron una mayor producción de otros pigmentos (tal vez beta-caroteno), solo P2%G1.5%MgCl₂ fue la condición en la cual se produce mas zeaxantina que otros pigmentos.

CROMATOGRAFIA III

CONDICIONES:

St *Tagetes erecta* (muestra control)

1 P2%G	(Patente con 2% de glucosa)
2 Med.Modif.	(Medio modificado según las mejores condiciones)
3 P2%GS/EX	(P2%G sin extracto de levadura)
4 P2%GL/M	(P2%G sin triprona ni extracto de levadura)
5 P2%G1.5%MgCl ₂	(P2%G con 1.5% de MgCl ₂ en vez de MgSO ₄ ,
6 P2%G50/500	(P2%G con 50 ml de medio en matraz Erlenmeyer de 500 ml liso)
7 YTN	(Composición antes descrita)

CROMATOGRAFIA II



ILUSTRACION 2

RESULTADOS (Ilustración 3)

Se observa que la condición en la cual se muestra mayor producción de zeaxantina fue en P2%G1.5%MgCl₂ y en P2%GS/EX, en la condición Med.Modif. apareció una mancha menos nítida, y con una producción de zeaxantina menor las restantes condiciones; en YTN la zeaxantina se produjo bien, pero apareció en mayor proporción el beta-caroteno, y en menor proporción unas manchas poco claras por debajo de la mancha de zeaxantina.

Observaciones: en YTN las manchas se mostraron muy claras por que se concentro la muestra tres veces más que en las otras condiciones, debido a que en otra cromatografía con menor concentración se había mostrado muy poco nítida.

Todas las condiciones produjeron mayor cantidad otros pigmentos, principalmente beta-caroteno. Sin embargo, algunos de estos resultados no coincidieron con los de la "Cromatografía II" donde P2%G1.5%MgCl₂ mostró a la zeaxantina como principal pigmento producido. Se sugiere la realización de más pruebas de identificación y cuantificación de los pigmentos producidos en las diferentes condiciones con métodos más finos (HPLC) por ejemplo, o en capa fina con cuantificación de la producción con aparatos de mayor precisión como el "CAMAG TLC SCANNER II" el cual se basa en la cuantificación de las manchas por su absorbancia y fluorescencia.

CROMATOGRAFIA III



ZEAXANTINA

ILUSTRACION 3

CONCLUSIONES

- La glucosa no es utilizada como principal fuente de carbono en las condiciones probadas para *Flavobacterium* sp ya que el microorganismo fue capaz de crecer y producir pigmentos al no adicionarla a los medios de producción (que ya la contienen en una pequeña cantidad), sin embargo consideramos su presencia necesaria en concentraciones cercanas al 1%; por que sin ella la producción de carotenoides es comparativamente menor a la de los medios que la contienen.

- La composición original del, medio probado tiene tres fuentes de nitrógeno; el extracto de levadura, la triptona y el licor de maíz. Con base en los resultados obtenidos, consideramos que la fuente de nitrógeno se encuentra excedida; ya que se observó que al eliminar del medio de producción al extracto de levadura y la triptona, se lograron obtener mejores producciones de pigmentos. A diferencia, fue necesario adicionar el licor de maíz, aún cuando en el medio se encontraban la triptona y el extracto de levadura, pues sin este nutriente la producción disminuyó. Consideramos por lo tanto que este nutriente fue el que más benefició la producción de pigmentos.

- La adición de magnesio fue muy importante tanto para el crecimiento del microorganismo como para la biosíntesis de pigmentos; si este no es adicionado al medio el microorganismo es incapaz de crecer y por tanto de producir pigmentos. Agregarlo en forma de cloruro de magnesio resulto más conveniente.

- En cuanto al fósforo, no se requirió de una adición especial, el que se encuentra contenido en los nutriente suficiente.

- Respecto al pH inicial son recomendables los ligeramente ácidos no inferiores a 6.5, para favorecer el crecimiento y la producción de pigmentos. A pesar de las pocas diferencias se recomienda ajustar con NaOH que favorece la continuidad del crecimiento y por ser este un producto mas barato.

- Consideramos que la aireación es favorable, las pruebas demuestran que un mayor volumen de aire para igual volumen de medio, benefició el crecimiento y la producción de pigmentos, sin embargo la calidad de estos puede verse afectada al obtener otros carotenoides en lugar de zeaxantina, como también sucedió en otras condiciones al variar la composición de los nutrientes.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, R.F. (to U.S.), U.S. Patent 2,890,989 (June 16,1959).
- Arancia S.A. de C.V. (1994). *Analisis proximal del licor de maíz*.
- Asociación Nacional de la Industria Química, A.C. (1985). *Anuario Estadístico de la Industria Química Mexicana en 1986*. ANIQ., A.C., México, p. 385.
- Barenjee, M. R. (1987). *2, 12-Dimethylbenz (A) anthracene (DMBA)-induced neoplastic transformation and influence of B-carotene*. 8th International Symposium On Carotenoids. Boston Massachusetts. USA Jul 27-31 . Abstrac. p.: 43.
- Baruq, A. B. and Olson, J. A. (1987). *Synthesis metabolism and biological actions of vitamin A glucuronides*. 8th International Symposium On Carotenoids. Boston Massachusetts. USA Jul 27-31 Abstrac. p.: 37.
- Bendich, A. (1987). *Carotenoids and the inmuner system*. 8th International Symposium On Carotenoids. Boston Massachusetts. USA Jul 27-31 Abtrac. p.: 46.
- Bergey's (1980). *Manual of Systematicve Bacteriology*. 8* Ed., Co. Editores R. Buchanan and N. Gibbons.
- BIOQUIMEX, (1990). *Metodo 43.018-43.023 . del "Official method of analisis of the association of official analitical chemists" (A.O.A.C.)*. Laboratorios Bioquimex S.A. de C.V. México. p.p.: 5
- Britton, G. (1985). *General Carotenoid Methods In Methds in Enzymology*. U.S.A. 1985. Academic Press. p.p: 113-149.
- CANACINTRA, (1988). *"Anteproyecto de normatividad para colorantes naturales"*. Camara Nacional de la Industria de la Transformación.
- Catalogue of Bacteria and Bacteriophages*. (1992). American Type Culture Collection. Ed. gGherna, Ph. D and Pienta, MS. 18th edition.
- Ciegler, A., Nelson, G.E.N., and Hall. H.H., *Appl. Microbiol.* 10,132 (1962).
- Coulson, J. (1978). *Prospects For The Use of Natural Colouring Materials in The Food Industry*. IFFA Sept/Oct. p.p.: 207-210.
- Dasek, J., Shepred,D. y Traelnes,K.L. *Procedé de fabrication de zéaxanthine*. Societé des Produits Nestlé S.A., Patente No. 790.289, Bélgica (1973).

Dasek, J., Shepred, D. y Traelnes, K.L. *Procedé de fabrication de zéaxanthine*. Societé des Produits Nestlé S.A., Patente No. 8167.767, Bélgica (1974).

Delaat, N. C. (1983). *Microbiología*, 2da. ed. Interamericana S.A. de C.V. México. p.: 85.

Diario Oficial de la Federación, (1988). *Ley Ferderal de Salud*, Diario Oficial, Secretaria de Salud. 2 tomos. México.

Drew, K. y Lyons, H. (1988). *Reaction to Attitudes Consumers and Colorants*, Food Process. Vol.57 No. 6. p.p.: 15-18.

Erdman, W. J., et al. (1988). *Factors affecting the broovailability of vitamin A, carotenoids, and vitamin E*. Food technology. p.p.: 216-221.

Emodi, A. (1978). *Carotenoids Properties and Applications*. Food Technology. Mayo. p.p.: 38-42.

Farrow, W.M. and Tabenkin, B. (to Hoffman -La Roche and Co., French Patent 1.376;-o27 23 oct, 1964).

Francis, F.D. (1986). *Handbook of a colorant patents*, Food and Nutrition. Press.Inc. West Point Connecticut. U.S.A. p.p.: 62-68.

Freeman, B. A. (1983). *Tratado de microbiología de Burrows*. Edit. Interamericana. S.A. de C.V. México p.p.: 90-95.

Gama, G. M. A. (1992). *Nuevas aplicaciones de colorantes naturales (*Tagetes erecta* y *Capsicum annum*) en alimentos para consumo humano y su desarrollo comercial*. Universidad Iberoamericana. México D.F.

Goodwin, T. W. (1959). *Biosynthesis and function of carotenoid pigments*. in Adv. Enzymol 21, 295. p.p.: 289-323.

Goodwin, T. W. (1971). *Biosynthesis In Carotenoids*. Edited by O. Isler : Basel : Birkhauser Verlag. p.p.: 577-636.

Gordon, H. T. (1977). *Current Aspects of Food Colorants*. Chap (4) ed. T.E.Furia, Boca Raton, Flo.

Gordon, H.T. y Bauernfeind, J.C. (1983). *Carotenoids as food colorants*. In "CRC. Critical Reviews in Food Science and Nutrition," Vol.18, No.1, ed. T.E. Furia, Boca Raton, Flo.

Hanson, M. A. (1977). *Microbial production of pigments and vitamins*, in Microbial technology. Eds. Peppler, H. J. Academic Press. 2da. ed. Vol 1. p.p.: 222-250.

Holmes, B. (1992). *The Prokaryotes*, Chap. 198 Vol. IV. The Genera Flavobacterium, Sphingobacterium, and Weeksella. 2a.Ed.Springer-Verlag New York.

Hulmus, M. F. (1987). *Adverse effects of food additives*. Research Review. Iowa State University. p.p.: 3-14.

"8th International Symposium on Carotenoids, Abstracts of Representations". (1987). Boston Massachusetts, E.U.A., Julio.

Jensen, L. S. (1987). *Microbiological carotenoid*. The Norwegian Institute of Technology. University of Trondheim. Trondheim. Norway. p.p.: 225-247.

Kantor, A. M. y Col. (1984). *Food Dyes Produce Minimal Effects on Locomotor Activity and Vitamin B-6 Levels in Postweanling Rats*. American Institute of Nutrition.

Kassner, E. J. (1987). *Modern Technologies in the Manufacture of Certified Food Colors*. Food Technology abril 1987 p.p.: 74-76.

Kornhauser, A., et al. (1987). *In vivo protection by β -carotene against phototoxicity*. 8th International Symposium On Carotenoids. Boston Massachusetts. USA Jul 27-31 . Abstract.: 44A.

Krinsky, N. T. (1987). *Overview of carotenoids in medicine*. 8th International Symposium On Carotenoids. Boston Massachusetts. USA Jul 27-31 . Abstract.: 42A.

Little, D. A. (1987). *Established and future markets for β -carotene*. 8th International Symposium On Carotenoids. Boston Massachusetts. USA Jul 27-31. Abstract.: 54.

Lowry, H. O., et al. (1951). *Protein measurement whit the Folin reagent*. J. Bio. Chem. 193. p.p.: 265-275.

Margulis, L y Schwartz, K. (1985). *Cinco Reinos. Guia ilustrada de los phyla de la vida*. Edit. Labor; Barcelona. p.p: 56-59

Marmion, D. M. (1979). *Handbook of us colorants for foods, drugs and cometics*. John Wiley y Sons, E.U.A. p.: 350.

Mc Dermont, J. B., et al. (1987). *Biochem. J. Vol. 144. p.p.: 231-243.*

Moore, W. F. and Tabekin, B.M. (1958). *Microbiological production of carotenoids*. Patented . assignors to Hoffmann-La roche Inc., Nutley, N.J. p.p.: 1-16.

Neatherburn, W. M. (1967). *Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia*. Anal. Chem. 39: p.p.: 871-974.

Neli, L. and Leenneer, De A. P. (1987). *J. Appl. Bacteriol. Vol.70. p.p.: 181-191.*

- Ninet, L. and Renault, J. (1979). *Carotenoids*. in *Microbial technology*. Eds. Peppler, H. J. Academic Press. 2da. ed. Vol. 1. p.p.: 529-542.
- Ninet, L., Renault, J. and Tissier, R. (1969). *Biotechnology and bioengineering*. Vol. XI. p.p.: 1195-1210.
- Noonan, J. and Meggos, H. (1980). *Syntetic food colours*. in *Handbook of Aditives*. Ed. CRC. p.p.: 339-383.
- Noonan, J. and Meggos, H. (1980). *Color Additives in Food*, Chap (14). *Handbook of Additives*. Ed. CRC p.p.: 587-615.
- Pollard, A. J. and Tissier, R. (19). *Food Preservatives*. Chap 13 *Legislative4 Asoects*. p.p.: 234-263.
- Pumarola, A., et al. (1992). *Microbiología y Parasitología Médica*. Masson- Salvat Medicina. Ediciones Cientificas y Tecnicas, S.A. Barcelona p.p.: 69-79.
- Santos, F. E. (1988). "Colorantes naturales en la industria alimentaria." *Avances en aditivos para la industria de alimentos*. PUAL. UNAM. México, p.p.: 3-140.
- Salamy y Shucard, y Col. (1982). *Physiological changes in hyperactive children following the ingestion of food aditives*. *Intern. J. Neuroscience*, Vol.16,. Gordon and Breach Science Publishers, Inc. Great Britain. p.p: 241-246.
- Santamaria, L. and Bianchi, A. (1987). *Cancer chemoprevention by carotenoids in animal models and perspectives in human interventions*. 8th International Symposium On Carotenoids. Boston Massachusetts. USA Jul 27-31. Abstrac. p.: 44.
- SECOFI-BANCOMEXT, (1984). *Estadísticas de Comercio Exterior e Interior de México*. SECOFI-BANCOMEXT, México.
- SECOFI BANCOMEXT, . *Estadísticas de Comercio Exterior e Interior de México*. Secofi Bancomext. México D.F. 1987-1987: sin número.
- Secretaria de Salud,. (1988). *Ley General de Salud*. Diario oficial 2do. tomo. Sin número.
- Stare, J. F. y Col. (1980). *Diet and Hyperactivity: Is there a Relationship?* in *Pediatrics* Vol. 66 No.4 October. New York. p.p.: 521-526.
- Stich, H. F. et al. (1987). *Human intervention studies with carotenoids*. 8th International Symposium On Carotenoids. Boston Massachusetts. USA Jul 27-31. Abstract.: 45.
- Summer, B. (1944). *Determination of inorganic phosphate*. *Science*. 100: 413

Tafoya, F. M. A. (en prensa) *Producción de colorantes naturales por vía biotecnológica*. Tesis de especialidad en Biotecnología. UACEPyP, CCH, UNAM, México.

Trimolieres, J. (1979). *Qu' est aliment pour le consommateur ?* Bull. Techn. Info. Número especial: *Qualité des produits agricoles et alimentaires*. 1974 p.p.: 117-122.

Trinder, P. (1969) *Annals of Clinical Biochemistry*. 6, 24.

Walford, J. (1980). "*Historical development in food coloration*". *Development in food colours 1*, Walford, J. (comp.), J. Applied Science Publishers, Londres, p.p.: 1-23.

Weeks, B. O. (1967). *Genus Flavobacterium Bergey y Ccol. 1923, 97*. Part 8 Gram-Negative Facultatively Aerobic Rods. p.p.: 357-363.

Will, O. H. and Scovel, C. A. (1987). *Protective functions of carotenoids*. 8th International Symposium On Carotenoids. Boston Massachusetts. USA Jul 27-31 . Abstract.: 27A.

Witcoff, A. H., Rubein, M. A. y Bryanli, A. (1980). *Industrial Organic Chemicals. in Perspective part two: Technology Formulation and Use*. 1st ed USA. John Wiley and Sons. p.: 502.

Zollinger, H. (1978) *Color chemistry synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments*. UCA Alemania Federal P.: 367.

ANEXOS

Composición del Licor de Maíz (ARANCIA S.A. de C.V.)

1) ANÁLISIS GENERAL.

	%	ARANCIA
	Base Comercial	
Agua	45 - 55	47-49
Nitrógeno total (Kjendahl)	2.7 - 4.5	5.5 - 8.0
Nitrógeno Amino	1.0 - 1.8	
Nitrógeno Volátil	0.15 - 0.40	
Azúcares Reductores Directos	0.1 - 11.0	11 máximo (base seca)
Ácido láctico	5 - 15	16 - 26 (base seca)
Cenizas	9 - 10	12 - 15
Ácidos Volátiles (como acético)	0.1 - 0.3	
Dioxido de azufre	0.01 - 0.015	

2) COMPOSICIÓN DE LAS CENIZAS % base seca

Calcio	0.5 - 1.5
Cobre	0.0 - 0.001
Fierro	0.01 - 0.05
Magnesio	0.5 - 1.0
Manganeso	0.004
Fósforo	2.0 - 3.0
Potasio	1.0 - 2.0
Azufre	0.34
Zinc	0.005

3) MICROBIOLOGÍA: col/ml.

Bacterias Aeróbicas	30,000 - 1,000,000
Bacterias Anaeróbicas	5,000 - 20,000
Bacterias Microaerofílicas (Bacilos lácticos)	10,000,000 - 10,000,000,000
Levaduras	10 - 1,000,000

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

4) NITRÓGENO TOTAL Y SU DISTRIBUCIÓN

a) NITRÓGENO TOTAL : 7.3 gr/100 gr de sólidos.

b) DISTRIBUCIÓN EN % DE NITRÓGENO TOTAL

SOLUBLE	89.1
Aminoácidos libres	36.9
Amoníaco libre	6.1
Péptidos	38.3
Nitrógeno cuaternario	1.0
Heterocíclicos	2.1
No identificados	4.7
INSOLUBLE	10.9
Proteína	9.9
No identificados	1.0

5) DISTRIBUCIÓN DE AMINOÁCIDOS: mg Nitrógeno/100 gr sólidos.

Alanina	579
* Leucina	384
Prolina	506
Ornitina	224
* Lisina	363
* Arginina	489
Ácido p- Aminobutírico	174
Asparagina	--
* Valina	290
Serina	263
* Glicina	433
* Fenilalanina	129
* Isoleucina	151
* Treonina	197
* Metionina	94
Ácido Glutámico	515
* Histidina	348
Ácido Aspártico	245
Etanolamina	8
Tirosina	47
Cistina	125
* Aminoácidos esenciales	

6) VITAMINAS: mg/100 gr de sólidos.

Tiamina	0.6
Riboflavina	1.2
Niacina	16.3
Piridoxina	1.8
Ácido pantoténico	3.0
Ácido fólico	0.3
Biotina	0.04