

03072
12
2ef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
UACP Y P-CCH**

**"EFECTO DE DIVERSAS FUENTES DE CARBONO
SOBRE LA SINTESIS DE CAROTENOIDES EN EL
HONGO *Dacrymyces deliquescens*"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A :
RUBEN ROSAS SANTOS

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

PAGINA

1	RESUMEN.	1
2	INTRODUCCION	2
3	GENERALIDADES DE CAROTENOIDES.	4
3.1	DEFINICION, CLASIFICACION, ESTRUCTURA Y FUNCION.	4
3.2	IMPORTANCIA INDUSTRIAL Y CLINICA.	7
3.3	BIOSINTESIS	13
3.4	ANTECEDENTES DE REGULACION EN HONGOS.	15
4	OBJETIVO.	21
5	METODOS.	22
5.1	MICROORGANISMO.	22
5.2	FUENTES DE CARBONO PROBADAS.	22
5.3	MEDIOS DE CULTIVO.	22
5.4	PREPARACION DEL INOCULO.	23
5.5	FERMENTACION.	23
5.6	METODOS ANALITICOS.	24
5.6.1	CRECIMIENTO MICELIAL.	24
5.6.2	CAROTENOIDES.	24
5.6.2.1	EXTRACCION.	24
5.6.2.2	PURIFICACION E IDENTIFICACION	25
5.6.2.3	CUANTIFICACION.	26
5.6.3	CUANTIFICACION DEL AZUCAR RESIDUAL	27
5.6.4	DETERMINACION DEL pH.	29
5.7	ANALISIS ESTADISTICO	29
6	RESULTADOS Y DISCUSION	30
6.1	SELECCION DE LA CEPA.	30
6.2	TAMAÑO DEL INOCULO Y TIEMPO DE FERMENTACION	35
6.3	MEDIO DE CULTIVO Y pH INICIAL	38
6.4	CONCENTRACION DE CARBONO Y CAROTENOGENESIS	45
6.5	EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO:	50
6.5.1	CRECIMIENTO.	50
6.5.2	CAROTENOGENESIS.	54
6.6	CARACTERIZACION DEL EFFECTO REGULATORIO POR GLUCOSA.	60
6.6.1	EFFECTO Y EFFECTO	60
6.6.2	NIVEL DE ACCION.	67
7	CONCLUSIONES.	70
8	RECOMENDACIONES.	72
9	BIBLIOGRAFIA.	73
10	ANEXO	79

1 RESUMEN.

Dactyryces deliquescens (ATCC-13292) es capaz de crecer y producir carotenoides en un medio químicamente definido a partir del segundo día de incubación a 26°C, 2921 lux y 200 rpm. El perfil de carotenoides que se obtiene incluye: al β -caroteno como el principal componente (56%), seguido por las xantofilas: "A" (24.7%), luteína (3.2%), cantaxantina (2.84), criptoxantina (2.34%); y apóridos de carotenoides (1.1%).

En el presente trabajo se estudio el efecto que tienen diversas fuentes de carbono sobre la producción de carotenoides en D. deliquescens. De entre las fuentes probadas los azúcares promovieron los mayores rendimientos de pigmentos, destacando en orden decreciente la D-glucosa, celobiosa y D-xilosa, cuando se utilizan a concentraciones de 1 %. Una mayor concentración de la fuente de carbono (3 %) resulta en una estimulación de la producción de los carotenoides; distinguiéndose en esta acción la D-xilosa, la celobiosa y el almidón; sin embargo, la D-glucosa y el ácido cítrico, por su parte, tiene un efecto negativo sobre la carotenogénesis.

El efecto negativo de la D-glucosa se explica como una represión transitoria de este azúcar por se con base en las siguientes evidencias experimentales: a) D-glucosa suprime la síntesis de novo de proteínas carotenogénicas al igual que el análogo DOG y la ciclohexanida, b) La síntesis de carotenoides se reanuda después de un periodo de represión fuerte, con una pendiente parecida a la condición no supresiva del azúcar.

Por otra parte, el efecto estimulador de los azúcares que incluyen en su molécula a la D-glucosa se explica por la lenta liberación de éste último, lo cual impide que se acumule y ejerza su efecto. El efecto estimulador de D-xilosa puede ser debido a que este azúcar es una fuente generadora de poder reductor importante en la producción de carotenoides.

Finalmente, el análisis cromatográfico (HPLC y TLC) muestra que en general, el hongo produce los mismos carotenoides y la cantidad de estos depende de la fuente de carbono y de la concentración utilizada.

Se supone que el efecto de la glucosa se realiza sobre los primeros pasos de la vía de biosíntesis de carotenoides, ya que no se altera cualitativamente el perfil de los mismos.

2 INTRODUCCION

Los consumidores juzgan la calidad de un alimento por su color, asociándolo con otras propiedades sensoriales, como el sabor (Newsome, 1986; Newsome, 1989) y olor.

Actualmente existe una marcada tendencia a nivel mundial por el uso de colorantes naturales en lugar de los sintéticos, como consecuencia de las restricciones cada vez mayores, por parte de organismos como la Food and Drug Administration (FDA), para el uso de pigmentos sintéticos debido a sus efectos nocivos sobre la salud. En este contexto la demanda de pigmentos del grupo de los carotenoides de origen natural también se ha visto incrementada en los últimos años debido, además de su origen, a su capacidad pigmentante.

Por otra parte, el interés sobre los carotenoides es cada vez mayor a consecuencia de las actuales evidencias de su efecto anticarcinogénico (Mihir, 1987; Stich, *et al.*, 1987; Bianchi, *et al.*, 1987; Santamaria and Bianchi, 1987; Barua and Olson, 1987; Krinsky, 1987; Kornhauser, 1987)), de su acción en la activación del sistema inmune (Krinsky, 1987; Bendich, 1987), así como del efecto sobre la longevidad en mamíferos (Cluter, 1984) y de la actividad de provitamina A (Erdam, *et al.*, 1988) que presentan algunos de estos compuestos. Finalmente los carotenoides son más atractivos por su aceptación generalizada y sin restricciones (por parte de la FDA) para su uso en alimentos, forrajes, medicamentos y cosméticos (Stern, 1988; Gordon, 1977).

Baste un ejemplo: sólo para el β -caroteno el mercado mundial en 1987 se estimó en 19 millones de dólares. De tal producción total de β -caroteno, el 70% se destinó a la industria alimentaria, el 5.3% a la de cosméticos, el 21% a la medicina, y el 3.7% se distribuyó para diversos fines. El incremento anual de la demanda para este pigmento es del 6% y se predice que de ser aceptadas las propiedades anticarcinogénicas, fotoprotectivas y activadoras del sistema inmune por parte de la FDA, la tasa de crecimiento del mercado mundial para el β -caroteno se incrementará en un 50% anual (Taylor, R.F., 1987).

Así las cosas, el aumento en la demanda de carotenoides de origen natural y su potencial económico, ha resultado en estímulo y presión para la realización de desarrollos biotecnológicos basados en fuentes microbianas que permitan una mayor producción de estos compuestos a nivel industrial (Cerdá-Olmedo, 1989; Nonomura, 1987). Una consecuencia son los procesos de producción a gran escala de β -caroteno y de luteína a partir de hongos y algas, desarrollados en los 60s y que se abandonaron por no ser competitivos con los fabricados sintéticamente (Nelis and De Leenheer, 1989).

A pesar de que la alternativa más atractiva de producción de carotenoides son los microorganismos, poco se conoce sobre el manejo de éstos para una explotación comercial. El β -caroteno es

el único carotenoide producido a nivel industrial de fuentes microbianas, estos es, a partir del hongo Blakeslea trispora, (Cerdá-Olmedo, 1989; Hanson, 1977) y del alga Dunaliella salina (Hanson, 1977; Nonomura, 1987), sin embargo la escala es aún limitada y el costo alto (Nelis and De Leenheer, 1991). Las fermentaciones industriales de zeaxantina con Flavobacterium sp. y de astaxantina con Phaffia rhodozyma se encuentran en etapas finales de desarrollo (Nelis and De Leenheer, 1991).

Por otra parte no existe un proceso de fermentación a escala industrial, ni en desarrollo, para la producción de luteína, debido a que la fuente alternativa, las flores de cempasúchil, es actualmente explotada. La producción microbiana a nivel industrial de cantaxantina se encuentra por ahora en desventaja, ya que actualmente el precio del pigmento de origen microbiano es mayor al de origen sintético. No obstante la tendencia, hacia la utilización de cetocarotenoides de color rojo, estimulará el desarrollo de biotecnologías para la producción de cantaxantina de origen natural (Nelis, and De Leenheer, 1991; Nelis, and De Leenheer, 1989; Nonomura, 1987).

En este sentido, los hongos pueden considerarse como una fuente potencial importante de colorantes para la industria por su cultivo relativamente fácil y sus posibilidades fisiológicas, genéticas, y de manipulación industrial (Cerdá-Olmedo, 1989).

Por lo tanto, para mejorar los rendimientos de la producción de carotenoides en fuentes microbianas y que estos procesos sean factibles a escala industrial, un primer paso es la optimización tanto de las condiciones ambientales de crecimiento como las del medio de cultivo, en este último caso por la identificación de factores regulatorios de la producción; el segundo paso incluye la aplicación de técnicas de mejoramiento genético y manipulación de genes (Nelis and De Leenheer, 1991).

3 GENERALIDADES DE CAROTENOIDES.

3.1 DEFINICION, CLASIFICACION, ESTRUCTURA Y FUNCION.

DEFINICION Y ESTRUCTURA.

Los carotenoides representan uno de los grupos más importantes de pigmentos naturales (Britton and Goodwin, 1971) con colores que van del amarillo al naranja-rojizo (Nelis and De Leenheer, 1991). Una definición completa de los carotenoides requiere detallar la estructura molecular de estos compuestos.

Estructuralmente, y de manera general, los carotenoides tienen un esqueleto tetraterpenoide de 40 carbonos. El polieno consiste de 8 unidades isoprenoideas arregladas de tal forma que los dos metilos centrales (20 y 20') están en la posición 1, 6 mientras que todos los restantes están condensados en posición 1,5 uno con respecto al otro (Cerdá-Olmedo, 1989)(Fig. 1a). Existen también algunos pigmentos de 30 carbonos llamados apocarotenoides, que son triterpenos constituidos por un polieno de 6 unidades isoprenilo. Otros carotenoides de 50 carbonos son denominados homocarotenoides (originados de estructuras de 40 carbonos substituidas). El esqueleto polieno puede ser modificado por desaturación, ciclización, e introducción de funciones oxígeno (Britton and Goodwin, 1971).

Existen algunos carotenoides acíclicos, como el licopeno, pero más comúnmente ocurren los compuestos monocíclicos, como el γ -caroteno y bicíclicos, como el β -caroteno. La ciclización en los carotenoides está restringida a la formación de un anillo de seis carbonos (ocasionalmente cinco) en uno o ambos extremos de la molécula. La ciclización extensiva tal y como se ha visto en triterpenoides no se ha encontrado en los tetraterpenos (Britton, 1985). En el anillo formado por los carbonos 1 al 6 pueden existir dobles enlaces en posición C-4,5 (c), como ocurre en el ϵ -caroteno; en posición C-5,6 (B), como se muestra en el β -caroteno; o una combinación de varios dobles enlaces en posición C-1,2, C-3,4 y C-5,6 como ocurre en el ϕ , χ -leptoteno (Britton and Goodwin, 1971).

En general existen dos tipos de carotenoides, por un lado están los carotenos que son tetraterpenos hidrocarbonados y sus derivados y un segundo grupo que se refiere a aquellos denominados xantofilas que incluye derivados substituidos conteniendo grupos hidroxil-, ceto-, metoxi-, epoxi- o carbonilos (Nelis and De Leenheer, 1991). Dichas funciones oxígeno, especialmente los grupos hidroxil-, oxo- y epoxi- están presentes normalmente en los carbonos 1 al 6 (Britton and Goodwin, 1971).

Tradicionalmente, la distribución natural de los carotenoides ha permitido darles nombres triviales, dependiendo de la fuente biológica de la cual fueron aislados por primera vez. Sin embargo, en años recientes ha sido desarrollada por la IUPAC una nomenclatura semisistemática para los carotenoides (Cerdá-Olmedo,

1989), en la que el nombre incluye información de su estructura; de acuerdo a este esquema, la molécula de los carotenoides esta compuesta por dos mitades, y la naturaleza del grupo terminal de cada mitad es indicado mediante letras griegas ($\tau, \phi, \epsilon, \beta, \kappa, \gamma$ y χ) (fig. 1b). Cada carotenoide se considera formalmente derivado de un caroteno precursor el cual es especificado por dos letras griegas que describen los grupos terminales (fig 1), e indicando con el uso de prefijos y sufijos los cambios en el esqueleto de carbóno (nor-, seco-, apo-, homo-), los niveles de hidrogenación (hidro-, dehidro-, retro-) y la presencia de grupos sustituyentes (metoxy-, epoxi-ol-, -ácido oico, hidroxil-) o para denotar la configuración (cis-, trans-, R y S) (Bramley, 1985). Así por ejemplo el β -caroteno que tiene dos grupos terminales β debe ser llamado β, β -caroteno, el fitoeno es llamado 7,8,11,12,7',8',11',12'-octahidro- γ, γ -caroteno, la luteína es β, ϵ -caroteno-3,3'-diol (Britton, 1985).

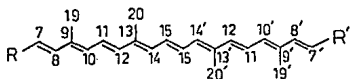


Fig. 1a. Estructura general de los carotenoides y numeración de átomos de carbono en la molécula.

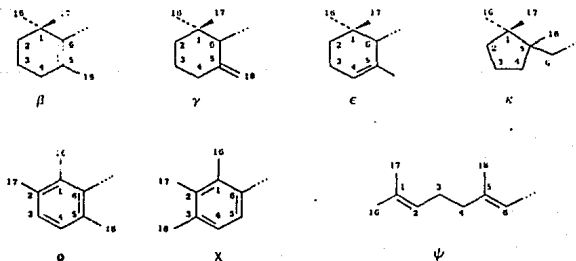


Fig. 1b. Esquema de los diferentes grupos terminales que se presentan en los carotenoides (Britton, 1985).

FUNCION.

Quizá la función más conocida de los carotenoides tales como α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina es la de provitamina A. Humanos y animales convierten estos derivados a retinol y posteriormente a retinol (vitamina A). Similarmente, la luteína es un precursor del 3-dehidroretinol (vitamina A2) en los peces y de 3-hidroxiretinal en ciertos insectos (Nelis and De Leenheer, 1991).

Algunos carotenoides participan como pigmentos secundarios cosechadores de luz en la fotosíntesis, ejercen efectos fotoprotectores contra los efectos letales de la combinación luz y oxígeno (Ruddat and Gaber, 1983) y posiblemente medien el fototropismo y la fototaxis. Los carotenoides son efectivos antioxidantes y atrapadores de oxígeno libre. En consecuencia, a los carotenoides se les ha sugerido un papel fotoprotectivo en bacterias no fotosintéticas y crustáceos. Así estos pigmentos fotosensitivos se comportan como una pantalla, protegiendo moléculas vitales y elementos celulares de los efectos letales de la luz ultravioleta y luz visible (Cerdá-Olmedo, 1989; Nelis and De Leenheer, 1991). Otra función biológica que cumplen los carotenoides es la de ser precursores de otros compuestos, por ejemplo el β -caroteno es precursor del ácido trispórico, una hormona sexual en los hongos Mucorales, lo cual además habla del papel de los carotenoides en la reproducción de estos microorganismos (Bramley, 1985; Ruddat and Gaber, 1983). Las xantofilas y el β -caroteno son precursores de sporopolenina, un polímero de xantofilas altamente estrechamente relacionadas que se encuentra en gametangios y esporas de algunos hongos; el β -caroteno es, también, precursor del retinol que controla el desarrollo de esporangióforos en P. blakesleeanus (Ruddat and Gaber, 1983).

Finalmente, dado que la síntesis intracelular de carotenoides en los hongos está parcialmente asociada al crecimiento, estos compuestos debido a su incierta función biológica en microorganismos no fotosintéticos no pueden ser considerados de igual forma que otros metabolitos secundarios, como meros productos de desecho que remueven un exceso de carbón y/o nitrógeno metabólico. (Nelis and De Leenheer, 1991).

3.2 IMPORTANCIA INDUSTRIAL Y CLINICA.

APLICACION DE LOS CAROTENOIDES.

Los carotenoides son ampliamente aplicados en las industrias de alimentos, forrajes, cosméticos y farmacéutica; recientemente también en medicina han adquirido un lugar importante como agentes terapéuticos contra ciertos tipos de cáncer (Schwartz, R. et al., 1989; Cerdá-Olmedo, 1989).

Los colorantes reconocidos y aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) como aditivos para alimentos, drogas y cosméticos, están actualmente listados en tres tablas diferentes. Cada listado incluye a aquellos colorantes que requieren certificación y aquellos establecidos como exentos de certificación, entre los que se ubican a los colorantes naturales o sus duplicados sintéticos (Newsome, 1989); el status de cada colorante se designa por una letra "L" cuando esta definitivamente listado o no requiere de certificación y una letra "P" cuando esta provisionalmente listado. Los colorantes con status "P" requieren ser sometidos a estudio para establecer su seguridad en un nivel al cual puedan ser elegibles para el status "L" o en el caso de hallazgos insatisfactorios permitir su uso bajo ciertas restricciones o perder su aprobación para ser usados (Stern, 1988).

a) ALIMENTOS.

El hombre al igual que otros animales, necesita carotenoides ya que no es capaz de sintetizarlos. Nuestra principal fuente de estos principios son las frutas y los vegetales; en menor grado y de manera indirecta los hongos, las algas y las bacterias. (Nelis and De Leenheer, 1989). Los carotenoides permitidos como colorantes por la Food and Drug Administration (FDA) para su utilización en alimentos son: el β -caroteno (Amarillo natural 26), β -apo-8'-carotenal (Naranja para alimentos 6) y la cantaxantina (Naranja para alimentos 8). Estos pigmentos están exentos de certificación es decir tienen un status "L" (Stern, 1988; Food Technology, 1986).

Las razones por las cuales se adicionan carotenoides a los alimentos son las siguientes:

- a) Restauración de la apariencia original del alimento cuando el color original ha sido destruido por su procesamiento o almacenamiento.
- b) Obtención de un color uniforme en las frutas recolectadas en diferentes cosechas.
- c) Intensificación del color natural cuando éste es débil.
- d) Protección de agentes saborizantes y vitaminas fotosensibles durante el almacenamiento.

En la Tabla 1 se citan algunos ejemplos de alimentos donde se emplean carotenoides como colorantes.

Existen algunas ventajas y desventajas en el uso de carotenoides como colorantes. Dentro de las ventajas de su utilización están su alta capacidad tintórea, su rango de color al utilizarse en diferentes combinaciones y la actividad de provitamina A que presentan algunos de ellos (Erdman, et al., 1988). Entre las desventajas de su uso se menciona su baja solubilidad, su inestabilidad y su alto costo actual en el mercado, en comparación con los colorantes artificiales (Schwartz, 1989; Gordon, 1977).

b) FORRAJES.

Debido a la importancia económica y comercial del color en el huevo de gallina, muchos investigadores han estudiado el uso de carotenoides naturales y sintéticos para pigmentar la yema del huevo. Ya que las aves convierten los carotenos en vitamina A que es incolora es necesario alimentarlas con xantofilas o apocarotenoides para obtener un adecuado color de la yema. (Johnson, et al. 1980).

Los forrajes para granja basados en productos de desecho agrícola son comúnmente suplementados con carotenoides dihidroxi y diceto-xantofilas (Johnson, et al. 1980)(Tabla 2) o bien el alimento para aves es complementado con pétalos secos de la flor de cepasúchil para impartirle un color naranja a la yema del huevo o a la piel del pollo (Cerdá-Olmedo, 1989; Nelis and De Leenheer, 1991).

Los cetocarotenoides son adicionados a los forrajes destinados a los peces para intensificar el color rosado de la carne de salmón y trucha (Nelis, and De Leenheer, 1991). Además, los carotenoides en los forrajes cumplen la función de ser provitamina A, como es el caso de la zeaxantina, la cantaxantina y la astaxantina (Schiedt, et al. 1985). Finalmente la acumulación de carotenoides en animales depende de la disponibilidad del pigmento (Johnson, et al. 1980a) y de la capacidad de asimilación del animal (Torrison, 1986).

Tabla 1. Aplicación de algunos carotenoides en alimentos (Schwartz, *et al.* 1989)

β-CAROTENO	β-APO-β'-CAROTENAL	CANTAXANTINA
Bebidas	Bebidas	Bebidas
Repostería	Repostería	Confitería
Confitería	Confitería	Lácteos
Pastas	Pastas	Jugos
Salsas	Salsas	Productos con tomate
Lácteos	Lácteos	Helados
Jugos	Jugos	
Aceites	Aceites	
Postres	Postres	
Helados	Conservas	
	Botanas	
	Saichichas	

Tabla 2. PRINCIPALES CAROTENOIDEOS PERMITIDOS COMO ADITIVOS DE ALIMENTOS Y FORRAJES.

COMPUESTO	FUENTE		USO
	NO-MICROBIANA	MICROBIANA	
B-caroteno	Zanahoria Síntesis	<u>Blakeslea trispora</u> <u>Dunaliella salina</u>	Alimentos para el hombre.
Licopeno	Tomates	<u>Blakeslea trispora</u> <u>Streptomyces chrestomyceticus</u> subsp. <u>rubescens</u>	Alimentos para el hombre.
Luteína	Alfalfa, maíz, Plantas verdes, Flor de cempasúchil (<u>Tagetes</u>)	<u>Spongioococcus excentricum</u> <u>Chlorella pyrenoidosa</u> <u>Dacrymyces deliquescens</u>	Forraje para aves de corral
Zeaxantina	cf. luteína	<u>Flavobacterium</u> sp.	Forraje para aves de corral y peces.
Centaxantina	Crustáceos Plumas de aves Síntesis	<u>Cantarellus rinnaharinus</u> <u>Brevibacterium</u> NY-4313 <u>Rhodococcus maris</u> (<u>Mycobacterium brevicale</u>) <u>Corynebacterium michiganense</u> (Mutante)	Forraje para aves de corral y peces.
Astaxantina	Crustáceos, Plumas de aves, Flores de <u>Adonis annua</u> , Síntesis	<u>Mycobacterium laticola</u> <u>Brevibacterium</u> 103 <u>Phaffia rhodozyma</u> <u>Pentophora</u> sp.	Alimento para peces.
Rhodoxantina	Hojas de <u>Aulium</u> Pez (<u>Tilapia</u>)	<u>Protomonas extorquens</u>	
Capxantina	<u>Capsicum annum</u> (<u>Paprika</u>)		Alimentos para el hombre y aves de corral
Bixina	<u>Bixa orellana</u> (<u>Anatto</u>)		Alimentos para el hombre y aves de corral
Crocetina	Azafrán (<u>Crocus sativus</u>)		Alimentos para el hombre.
B-Apo-8'-carotenol	Síntesis		Alimentos para el hombre y aves de corral
B-Apo-8'-Ácido etil éster-carotenolco	Síntesis		Alimentos para el hombre y aves de corral
Citraaxantina	Síntesis		Alimento para aves de corral

Goodwin, 1980, 1984; Kläui & Bauernfeind, 1981; Marusich & Bauernfeind, 1981. Nells and De Leenher, 1989 ;Hanson, 1977).

c) MEDICINA.

Fotoprotección.

Los carotenoides poseen funciones biológicas fotoprotectoras. Parece ser que dicha capacidad se debe a su capacidad para secuestrar radicales libres. La fotoprotección ocurre a muchos niveles, desde moléculas y organelos hasta organismos completos. Los carotenoides se utilizan para aminorar los síntomas presentados por pacientes hipersensibles a la luz que sufren de porfiria eritropoyética (Will III and Scovel, 1987; Krinsky, 1987; Schwartz, 1989).

Anticancerígenos.

Se ha observado que los carotenoides son capaces de suprimir los efectos mutagénicos y las aberraciones cromosomales causadas por agentes químicos (Mihir, 1987; Stich, et al., 1987; Schwartz, 1987) o por la luz (Bianchi, et al., 1987). Por ello los carotenoides se emplean actualmente para el tratamiento con radiaciones en caso de cáncer de mama, pulmón, piel, colon, recto y vejiga entre otros. Así mismo, los carotenoides son indicados para frenar el desarrollo de cáncer y evitar posibles recurrencias. (Santamaría, and Bianchi, 1987; Barua, and Olson, 1987; Krinsky, 1987; Kornhauser, et al., 1987).

Activación de la respuesta inmune.

Los carotenoides son capaces de activar la respuesta inmune. Se ha observado que tanto la proliferación de linfocitos T y B, como la actividad de macrófagos y neutrófilos es aumentada al tratar pacientes con carotenoides. Altos niveles de carotenoides han sido asociados con un incremento en la resistencia a la infección en niños. (Krinsky, 1987; Bendich, 1987).

Longevidad.

Se ha encontrado una relación positiva entre la concentración de carotenoides y de retinol (vitamina A) en suero y tejido cerebral, con un incremento en la longevidad de mamíferos. (Cutler, 1984).

INDUSTRIA FARMACEUTICA.

Los carotenoides son utilizados en la industria farmacéutica con el fin de colorear los productos y que el color sirva como indicador en diferentes pastillas. Así también, se utilizan en la fabricación de tabletas, supositorios, jarabes y suspensiones (Schwartz, 1989). El β -caroteno y la cantaxantina son los carotenoides aprobados por la FDA para su uso en fármacos, dichos colorantes no requieren de certificación (Stern, 1988).

INDUSTRIA DE COSMETICOS.

Dentro de la industria de cosméticos el β -caroteno, es utilizado con el fin de dar color a jabones, talcos, lociones, lápices labiales y polvos entre otros (Schwartz, 1989). El β -caroteno es el carotenoide más utilizado en este rubro. El β -caroteno es un colorante exento de certificación en la lista de cosméticos de la FDA. (Stern, 1988).

3.3 BIOSINTESIS

Los carotenoides, como todos los terpenoides, son sintetizados a partir de la unión de tres unidades de acetil-CoA (Fig. 2), para formar el 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMGGCoA). El HMGGCoA también puede ser sintetizado a partir de los aminoácidos leucina y valina en *Phycomyces blakesleeanus*. El HMGGCoA es convertido a ácido mevalónico (MVA) por una reacción irreversible. El MVA es convertido a 5-fosfomevalonato (MVAP) y mevalonil pirofosfato (MVAPP), y posteriormente a isopentenil pirofosfato (IPP), considerado como el precursor fundamental de los carotenoides y cuya estructura es de 5 carbonos. El IPP es convertido a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) por medio de una isomerasa que posee radicales SH. La condensación cabeza-cola de los isómeros isoprenoides forma el geranyl-pirofosfato (GPP), con 10 carbonos; la reacción es catalizada por la prenil transferasa. Posteriormente se transfiere una molécula de IPP al GPP resultando el farnesil pirofosfato (FPP), constituido de 15 carbonos. La formación del geranyl geranyl pirofosfato resulta de la condensación del cuarto IPP. La dimerización cola-cola de los dos pirofosfatos resulta en el fitoeno (octahidro- γ,γ -caroteno), que es el primer tetraterpeno (C40) formado. La deshidrogenación de fitoeno para formar dobles enlaces conjugados involucra la β eliminación de dos hidrogenos alílicos vecinos. Cuatro pasos sucesivos de deshidrogenación dan lugar en orden progresivo al fitoflueno, zetacaroteno, neurosporeno y licopeno respectivamente. Estas deshidrogenaciones son catalizadas por un complejo multienzimático de cuatro unidades de la fitoeno deshidrogenasa, codificada por el gen carB en P. blakesleeanus.

La ciclización de los carotenos acíclicos insaturados resulta en la formación de los anillos ϵ ó δ . Así el licopeno produce τ -caroteno y δ -caroteno, mientras que el neurosporeno forma α -zeacaroteno y β -zeacaroteno; los cuales pueden transformarse por deshidrogenación en τ -caroteno o δ -caroteno respectivamente. Existen evidencias de que la ciclización puede ocurrir un paso antes de la formación del neurosporeno, esto fue observado con la formación de 7',8',11',12'-tetrahidro- τ -caroteno en P. blakesleeanus. El β -caroteno es formado a partir de la ciclización del τ -caroteno. En resumen, β -caroteno es sintetizado a partir del fitoeno mediante un complejo multienzimático que incluye cuatro deshidrogenasas y dos ciclasas (producto del gen carR en P. blakesleeanus).

La incorporación de oxígeno ocurre en varios estados de desaturación y/o ciclización de los carotenoides hidrocarbonados, resultando en una gran variedad de xantofilas (Ruddat and Garber, 1983 y Schwartz, et al., 1989; Bramley, 1985; Goodwin, 1971).

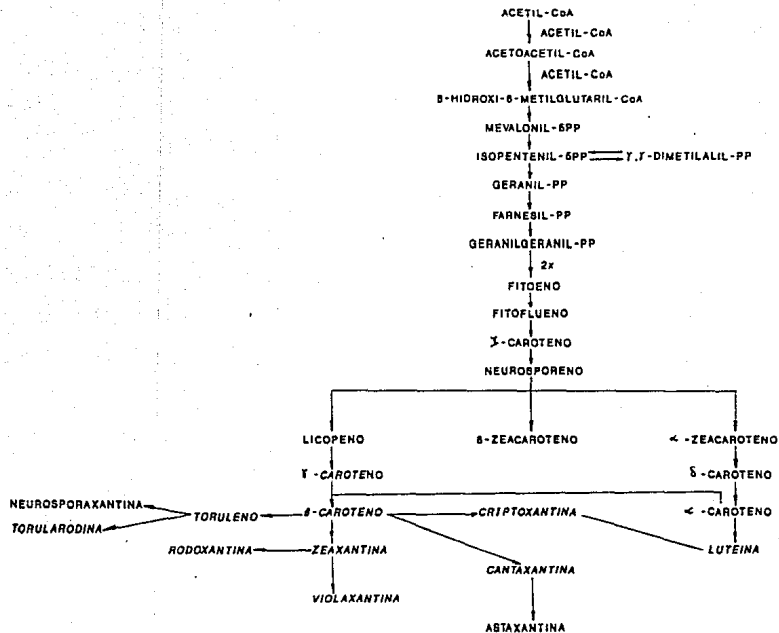


Fig.2. Algunos carotenoides fungales de interés y su posible biosíntesis (Cerdá-Olmedo, 1989; Nelis and De Ieenheer, 1989; Goodwin, 1971).

3.4 ANTECEDENTES DE REGULACION EN HONGOS.

La regulación de la carotenogénesis en hongos esta dada por diversos mecanismos, como son:

- a) Retroregulación por producto final.
 - b) Fotoregulación.
 - c) Efecto del oxígeno.
 - d) Temperatura.
 - e) pH.
 - f) Inhibición química artificial (difenilamina, antibioticos, etc.)
 - g) Estimulación química (β -ionona y la vitamina A).
 - h) Factores de crecimiento (Vitaminas).
 - i) Hormonas o interacción sexual (ácido trispórico).
 - j) Nutrientes en el medio de cultivo (carbono, nitrógeno, fosfato, iones etc.).
 - K) Efecto del AMP cíclico.
- (Bramley, 1985; Goodwin, 1959; Cerdá-Olmedo, 1989; Schwartz, 1989; Cerdá-Olmedo, 1985; Govin, *et al.*, 1981; Thomas, 1967; Rau, 1985; Kritsky, 1982; Dholakia and Modi, 1984; Govin, *et al.*, 1982; Dandekar and Modi, 1980; Okagbue and Lewis, 1984, 1984a, Avalos, 1987; Cerdá-Olmedo, 1985).

Los estudios acerca de la regulación que tienen los nutrientes del medio de cultivo sobre la producción de carotenoides, se ha restringido a la observación del efecto de su adición sobre el nivel de producción. (Schwartz, 1989). En este sentido, pocos son los trabajos que han caracterizado el efecto de los nutrientes sobre la síntesis de carotenoides, como se puede advertir en los siguientes párrafos (tabla 3).

Efecto del carbono y del nitrógeno.

Se han utilizado una gran variedad de fuentes de carbono para la producción de carotenoides por hongos, incluyendo desde compuestos simples, tales como monosacáridos y glicerol, hasta mezclas complejas comúnmente utilizadas en la industria, tales como aceites animales y vegetales, keroseno, melazas, licor de maíz, etc. (Ninet and Renaut, 1979).

En el hongo Blakeslea trispora se ha caracterizado el efecto de represión catabólica ejercido por glucosa a concentraciones de 3.6 y 5.4 % (Dandekar and Modi, 1980). En este mismo microorganismo la producción de β -caroteno con celobiosa como única fuente de carbono es mayor a la obtenida al utilizar glucosa, seguramente por la lenta liberación de glucosa en el medio (Dholakia and Modi, 1982).

En la levadura Phaffia rhodozyma, Johnson, *et al.* (1979), encontraron un efecto negativo de la glucosa a concentraciones mayores de 4%, sobre los rendimientos de astaxantina.

Tabla. 3. REGULACION DE LA CAROTENOGÉNESIS EN HONGOS.

NUTRIENTE			
CONC.	MICROORGANISMO	EFEECTO	REFERENCIA
a) FUENTE DE CARBONO			
0.0%	<u>P. rhodozyma</u>	(*) -	Johnson and Lewis, 1979.
3.4%	<u>B. trispora</u>	Represión	Dandekar and Modi, 1980.
ácetato	<u>P. blakesleeana</u>	Estimulación	Ruddat and Gerber, 1983.
calabaza	<u>B. trispora</u>	+	Dholakia and Modi, 1982.
maíz	<u>P. rhodozyma</u>	(*) +	Haar, 1988.
xilosa	<u>P. blakesleeana</u>	-	Goodwin, 1959.
fructosa	<u>P. blakesleeana</u>	-	Goodwin, 1959.
glicerol	<u>B. trispora</u>	+	Dandekar and Modi, 1980.
	<u>R. samiei</u>	Estimulación	Goodwin, 1959.
0.5%	<u>R. rubrum</u>	+	Schwart, 1989.
b) FUENTE DE NITROGENO			
1. Orgánica.			
leucina	<u>P. blakesleeana</u>	Estimulación	Chichester et al., 1959.
valina	<u>P. blakesleeana</u>	Estimulación	Chichester et al., 1959.
asparagina	<u>L. nichotii</u>	+	
glicina	<u>B. trispora</u>	+	Nelis and De Leenheer, 1989.
	<u>D. deliquescens</u>	+	Orange and Montclair, 1961.
ác. glutámico	<u>D. deliquescens</u>	+	Orange and Montclair, 1961.
2. Inorgánica.			
nitrato de amonio	<u>P. blakesleeana</u>	-	Goodwin, 1959.
	<u>Ucaryvetaceae</u>	+	Orange and Montclair, 1961.
c) EFECTO SINERGICO			
L-triptofano-ác. glutámico	<u>D. deliquescens</u>	↔	Orange and Montclair, 1961.
acetato-extracto de levadura			
	<u>R. samiei</u>	Estimulación	Vuori and Gyllenberg, 1974.
	<u>P. blakesleeana</u>	Estimulación	Friend et al., 1955.
glucosa-extracto de levadura			
	<u>U. violacea</u>	Estimulación	Ruddat and Gerber.
d) PROPORCION CARBONO NITROGENO (C:N)			
C>N	<u>G. fulvikuroi</u>	(*) +	Ruddat and Gerber, 1983.
C<N	<u>G. fulvikuroi</u>	(**) -	Ruddat and Gerber, 1983.
e) EFECTO DE FOSFATO			
1.0%	<u>B. trispora</u>	Estimulación	Dholakia and Modi, 1984.
	<u>P. blakesleeana</u>	Estimulación	Dholakia and Modi, 1984.

*, sobre etanolamina.

**, sobre β-caroteno; se acumula fitoeno.

+, efecto positivo sobre la carotenogénesis.

↔, mayor efecto positivo sobre la carotenogénesis.

-, efecto negativo sobre la carotenogénesis.

conc., concentración del nutriente.

Mientras que en cultivos mixtos de P. rhodozyma y Bacillus circulans WL12 y en monocultivos de la levadura con concentraciones de la fuente de carbono de 1.5 %, la arabinosa seguida de la sacarosa y la glucosa presenta los mayores rendimientos, en ese orden; en tanto que celobiosa presentó los valores más bajos (Okagbue and Lewis, 1983).

En cambio, las melazas B y C promueven se produzcan 2 y 3 veces más astaxantina en P. rhodozyma que cualquier otro de los azúcares mencionados arriba y la supresión sobre la síntesis de astaxantina observada con glucosa (al 4 %) no se registra para sacarosa o para las melazas (Haar, 1988).

En P. blakesleeanus se ha observado que la maltosa y la glucosa son fuentes de carbono igualmente carotenogénicas. La xilosa y la fructosa, por su parte, permiten buen crecimiento pero son poco eficientes para lograr una buena producción de pigmentos (Goodwin, 1959). El acetato, cuando su utiliza como única fuente de carbono, estimula el crecimiento y la carotenogénesis, siendo la producción de carotenoides mayor que la obtenida al utilizar lactato o piruvato (Ruddat and Garber, 1983).

Por su parte el efecto negativo de la glucosa sobre la carotenogénesis en Blakeslea trispora no se observa al utilizar glicerol como única fuente de carbono (Dandekar and Modi, 1980).

El glicerol, en cambio, estimula la carotenogénesis en Rhodotorula sarniei (Goodwin, 1959) y el acetato en presencia de altas concentraciones de nitrógeno ejerce un efecto similar al observado en P. blakesleeanus (Ruddat and Garber, 1983).

En la levadura R. rubrum el glicerol como única fuente de carbono a una concentración de 0.5% incrementa la producción de carotenoides, resultando ser la fuente de carbono más eficiente en este sentido (Schwartz, 1989).

Para la familia Dacrymycetaceae carbohidratos tales como: la glucosa, sacarosa, azúcar invertido, maltosa, galactosa, glicerol, melazas, melazas invertidas, manitol, sorbosa, lactosa, celulosa, almidón, amilosa y dextrinas, todos promueven el crecimiento y producción de carotenoides. La glucosa, la sacarosa, y el azúcar invertido son los carbohidratos con los que se obtienen los mejores rendimientos, aunque otras fuentes de carbono pueden ser utilizadas, tales como proteínas, proteínas hidrolizadas, lípidos, etc. La adición de pequeñas cantidades de proteína o hidrolizado de proteína es estimulador en la carotenogénesis, por ejemplo en Dacrymyces deliquescens la adición de 0.05 a 1% de albúmina de leche, sólidos de leche descremada, proteína de semillas de algodón, caseína, levadura, agua de licor de maíz, proteína de soya de haba, proteína de trigo, fragmento de carne, harina de pescado, etc. pueden estimular el crecimiento y la producción de carotenoides (Orange and Monclair, 1961).

El extracto de levadura, como fuente de nitrógeno, estimula la producción de carotenoides en *P. blakesleeanus* crecido en presencia de acetato; este efecto no se observa al utilizar glucosa. A diferencia de lo que ocurre en este microorganismo, en el hongo *U. violacea* el extracto de levadura es estimulador en presencia de glucosa. La estimulación se puede explicar en términos de los componentes efectivos del extracto de levadura son uno o una combinación de las siguientes vitaminas: tiamina, ácido nicotínico, riboflavina, vitamina A y/o vitaminas del complejo B (Ruddat and Garber, 1983).

El efecto de los aminoácidos sobre la carotenogénesis es variado, así se ha visto que los aminoácidos leucina y valina, además de ser fuente de nitrógeno funcionan como precursores de β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA, un importante intermediario en la síntesis de isoprenoides en *P. blakesleeanus*, estimulando la síntesis de β -caroteno. (Chichester et al., 1959) Sin embargo, el efecto de la leucina no se ha observado en otros microorganismos.

En la familia *Dacrymycetaceae* los aminoácidos son la fuente preferente de nitrógeno orgánico, siendo el ácido glutámico o la glicina los aminoácidos en donde se obtienen los mejores resultados en la producción de carotenoides. Se ha visto que la incorporación de L-triptófano en el medio conteniendo glutámico es particularmente efectivo (Orange and Honclair, 1961).

Por su parte, el aminoácido glicina es incorporado hasta β -caroteno en *P. blakesleeanus* presumiblemente por la vía glicina-serina-piruvato-acetil-coA, resultando en un incremento en la producción de carotenoides (Goodwin, 1959). De igual forma en *Blakeslea trispora* la glicina incrementa la producción de carotenoides (Schwartz, 1989; Nelis and De Leenheer, 1989).

En cuanto a la fuente de nitrógeno inorgánica, el nitrato de amonio reduce la síntesis de carotenoides en *P. blakesleeanus* (Goodwin, 1959); mientras que esta sal es la fuente preferente de nitrógeno inorgánico para la carotenogénesis en la familia *Dacrymycetaceae* (Orange and Honclair, 1961).

Finalmente se ha observado que la proporción de carbono:nitrógeno en el medio de fermentación es un factor importante en la expresión del efecto sinérgico de estos nutrientes sobre la síntesis de carotenoides. Así, en *Gibberella fujikuroi* una baja relación entre carbono:nitrógeno favorece la producción de carotenos sintetizados a partir de fitoeno, si por el contrario la relación de carbono nitrógeno es alta, se produce más fitoeno (Ruddat and Garber, 1983).

Una apropiada proporción de carbono:nitrógeno lleva a *Neurospora crassa* a producir 2.5 mg de carotenoides por gramo peso seco de biomasa (Cerdá-Olmedo, 1989).

Efecto de fosfato.

En B. trispora una concentración del 1% (peso/volumen) de fosfato inorgánico en el medio estimula en cinco veces la producción de β -caroteno comparada con la producción obtenida cuando se utiliza una concentración de 0.01%. En este mismo hongo y en P. blakesleeanus se ha encontrado una relación inversa entre la carotenogénesis y la actividad de fosfatasa intracelulares, por lo que se ha sugerido que el fosfato inorgánico regula los niveles de estas fosfatasas con el consecuente aumento de carotenoides (Dholakia and Modi, 1984).

Efecto del pH.

El estudio del efecto del pH sobre la carotenogénesis en hongos tienen una importancia relevante en este tipo de estudios fisiológicos, ya que mediante el control de esta variable se puede caracterizar el efecto de los nutrientes del medio de cultivo sobre la síntesis de estos pigmentos, por tal motivo se mencionan a continuación los datos reportados en este rubro.

Son escasos los trabajos que en este sentido se han realizado, Jhonson and Lewis (1979) reportaron que el pH del medio afecta los rendimientos y la producción de carotenoides en Phaffia rhodozyma, ellos encontraron que el pH óptimo para la producción de astaxantina es 5.0, y que cambios en el pH resultan en una mayor acumulación de β -zeacaroteno sobrepasando los niveles de β -caroteno, el cual es el principal caroteno a pH óptimo. El cultivo de esta levadura a un pH diferente del óptimo permite la acumulación de carotenos con la concomitante disminución de los rendimientos de astaxantina.

En Phycomyces blakesleeanus el pH del medio de cultivo también tiene un efecto sobre la carotenogénesis. Se ha observado que la acidificación del medio de cultivo de 6.2 a 2.6-3.0 no afectan el crecimiento ni la producción de pigmentos en el hongo, sin embargo, cuando se amortiguan estos cambios el crecimiento no se altera pero la carotenogénesis se inhibe completamente (Goodwin, 1959).

A diferencia de lo mencionado en los párrafos anteriores, Orange and Montclair (1961) afirmaron que variaciones en el pH del medio de cultivo en un intervalo entre valores de 2.1 a 8.5 no alteran de manera importante el crecimiento ni la formación de pigmento en los hongos pertenecientes a la familia Dacrymycetaceae.

Como se puede apreciar los conocimientos que se tienen hasta ahora sobre los mecanismos de regulación por nutrientes tales como el carbono, el nitrógeno y el fosfato, así como el efecto del pH del medio de cultivo sobre la síntesis de carotenoides son escasos y aislados lo que resulta en una limitación para la producción fermentativa de estos terpenoides a escala industrial.

Ya se ha mencionado que los hongos son una fuente importante de carotenoides, no solo de β -caroteno sino también de xantofilas como la luteína, zeaxantina, cryptoxantina y cantaxantina, todas ellas de interés industrial actual, y de xantofilas tales como el toruleno, la torularhodina, el esferoideno y la esferoidenona, que por su color adquieren cada vez mayor importancia (Nelis and De Leenheer, 1989).

Enmarcado en este contexto surge como una respuesta el estudio de la regulación de la carotenogénesis en el hongo Dacrymyces deliquescens. Este microorganismo fue seleccionado por su perfil de carotenoides que incluye a la luteína, cantaxantina, zeaxantina, cryptoxantina, violaxantina, toruleno, torularhodina y el β -caroteno, todos éstos de interés industrial actual y potencial a corto plazo, entre otros carotenoides; además de que su biomasa puede ser utilizada como forraje para aves de corral dadas sus características de organismo tipo GRAS (Orange and Monclair, 1961). Finalmente porque el único estudio realizado en este hongo resultó en una patente para la producción de carotenoides, lo cual habla de su potencial. Dacrymyces deliquescens es un hongo Basidiomyceto, con fructificaciones enrolladas sobre sí mismas de 1 a 4 mm de diámetro, de consistencia gelatinosa-firme, de color anaranjado amarillento cuando están frescas y café-rojizo al secarse; hifas con pinzas de conexión; probasidios hasta de 50 X 6 μ , metabasidios asepatados, bifurcados, esterigmas cilíndricos, hasta de 15 X 3 μ ; basidiosporas septadas en 3 partes, de 11.5-15 X 4-6 μ . La germinación es a través de tubos de germinación o conidios. Su distribución se limita a los bosques de pino de México, Panamá, Argentina y Brazil. Crece sobre la corteza de los troncos caídos de pino (Bernard, 1971 y 1980).

Finalmente, en el entendido de que toda investigación que se desarrolle para evidenciar los mecanismos que regulan la síntesis de carotenoides es relevante, la presente investigación se enfocó al efecto de la fuente de carbono sobre la carotenogénesis en consideración a la existencia de mayor información sobre el efecto glucosa en la carotenogénesis en particular y sobre otros metabolitos secundarios en lo general.

4 OBJETIVO.

Con el fin de evaluar la influencia de diversos principios nutricionales sobre la producción de carotenoides, en este trabajo se planteó como objetivo: El conocer y caracterizar el efecto de diversas fuentes de carbono sobre la producción de carotenoides en el hongo Dacrymyces deliquescens.

5 METODOS.

5.1 MICROORGANISMO.

Las cepas utilizadas fueron:

Dacrymyces deliquescens ATCC-13292.

Dacrymyces deliquescens FSC-307.

Dacrymyces deliquescens BM.

La cepa ATCC-13292 se adquirió de la American Type Culture Collection; la cepa FSC-302 fue proporcionada por la colección de cepas del Servicio Marítimo y Forestal del Canadá; la cepa BM se colectó y aisló de troncos caídos de pino del Desierto de los Leones México, D.F.

La cepa BM fue identificada, en el Laboratorio de Micología del Instituto de Biología de la UNAM, con base en las claves de identificación para especies de la familia Dacrymycetaceae (Bernard, 1971 y 1980). Su aislamiento se realizó por propagación y transferencia en cajas de petri con medio YM-agar conteniendo 3 mg de penicilina y 3 mg de cloranfenicol. La cepa, una vez aislada se activó mediante cultivo a tiempo fijo de 6 días en matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de medio YM-caldo a 200 rpm, 26°C y 2921 lux de iluminación constante.

5.2 FUENTES DE CARBONO PROBADAS.

Las fuentes de carbono probadas para observar su efecto sobre la carotenogénesis fueron: D-glucosa (G), D-fructosa (F), sacarosa (S), maltosa (M), celobiosa (C), L-arabinosa (R), D-xilosa (X), glicerol (g), ácido cítrico (c), ácido succínico (s), ácido acético (a), ácido oleico (o) y ácido butírico (b).

5.3 MEDIOS DE CULTIVO.

El mantenimiento y propagación de las cepas, así como el análisis del contenido de carotenoides en medio completo, se realizó en medio YM-agar (Difco, 1966), de acuerdo a lo reportado para este microorganismo por la ATCC (1982).

Para el estudio del efecto de la fuente de carbono sobre la carotenogénesis fue utilizado el medio mínimo definido balanceado (MMdb) reportado por Reid and Seifert (1982).

El MMdb fue modificado sustituyendo el ácido 2,2-dimetil-succínico (Disaminozido, marca Sigma) por ácido succínico (MMs). Este medio (MMs) fue utilizado en los experimentos de selección de la cepa.

Para algunos experimentos como la caracterización del efecto regulatorio de la glucosa sobre la producción de carotenoides y en experimentos preliminares sobre tamaño del inóculo, tiempo de fermentación y el efecto de la concentración de glucosa, se utilizó un medio denominado MM en el cual se eliminó el ácido succínico.

Los medios MM y MMdb fueron utilizados para definir el efecto del análogo del ácido succínico y del pH sobre la carotenogénesis.

El pH inicial en los medios fue ajustado por la adición de hidróxido de sodio, antes de esterilizarse.

Los medios fueron esterilizados durante 20 minutos a 15 lb/pulgada² de presión. La fuente de carbono, cuando se manejó en concentraciones del 5 y 10%, fue esterilizada por separado.

5.4 PREPARACION DEL INOCULO.

El inóculo se preparó por raspado de colonias de D. deliquescens de una caja de petri, crecido entre 10 y 15 días sobre medio YM-agar. El micelio fue disgregado en solución salina (4 ml) por agitación con perlas de vidrio (15) de 5 mm de diámetro. Con el micelio disgregado se inocularon dos matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de MM. Los matraces fueron inicialmente incubados durante tres días en condiciones estáticas a 26°C y 2921 lux de iluminación (emitidos por una lámpara incandescente de 100 W colocada a 30 cm de altura sobre el medio de cultivo) (Ortiz y Garduño, 1985). Posteriormente se sometieron a una agitación de 200 rpm durante otros tres días (Orange and Monclair, 1961).

5.5 FERMENTACION.

Las fermentaciones se desarrollaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio mínimo. Los matraces fueron inoculados con 0.10 mg de biomasa (peso seco) por ml de medio de cultivo, excepto los experimentos de selección de la cepa que se inocularon con 0.03 mg/ml y los del efecto del tamaño del inóculo sobre la fermentación, que se inocularon con 0.03, 0.05 y 0.10 mg/ml.

Los matraces fueron colocados en una agitadora orbital Gallenkamp a 26°C, 2921 lux y 200 rpm. El tiempo de fermentación varió entre 6 y 11 días.

Los perfiles de producción, crecimiento, azúcar residual y pH en el medio de cultivo fueron obtenidos del análisis de muestras de 2 ml sustraidas de los matraces cada 24 horas durante la fermentación.

5.6 METODOS ANALITICOS.

5.6.1 CRECIMIENTO MICELIAL.

El crecimiento del microorganismo se expresa en mg de biomasa seca por unidad de volumen. La biomasa se secó en una estufa clínica a 60°C durante 24 horas, tiempo en el que se alcanza el peso constante. El micelio de cada muestra fue separado por filtración sobre papel Whatman (450) previamente secado y pesado. El cálculo para la determinación del crecimiento se basó en la siguiente expresión:

$$\text{Crecimiento (mg/ml)} = (SpB - Sp)/V$$

donde:

Sp= Peso seco del papel filtro en mg.

SpB= Peso seco del papel filtro con la biomasa expresado en mg.

V= Volumen filtrado (ml).

5.6.2 CAROTENOIDES.

5.6.2.1 EXTRACCION.

La extracción de los carotenoides se realizó de acuerdo con la técnica, para este efecto, publicada por Britton (1985), y que consiste en el rompimiento mecánico del micelio fresco. La cantidad de micelio procesado fue hasta de 10 mg (peso seco) por muestra. El pellet fue obtenido por centrifugación de las muestras de 2 ml. El rompimiento del micelio se realizó por maceración en un homogeneizador (Tri-R instruments K45). Para la completa extracción de carotenoides se efectuaron entre dos y cuatro pasos de extracción con acetona en promedio, excepcionalmente 5 ó 6, y finalmente 1 ó 2 con éter de petróleo hasta que no existiera más remoción de pigmentos. Cada extracción tuvo una duración de 1 min. Todos los extractos de acetona se combinaron y se mezclaron con igual volumen de éter de petróleo, para transferir los carotenoides al éter; finalmente, se adicionaron unas gotas de solución salina para la separación de fases y un poco de alcohol para el rompimiento de la emulsión que se pudiera haber formado, así como para la eliminación del agua existente en el éter. La fase etérea o epifase conteniendo a los carotenoides, se recuperó con una pipeta pasteur. El volumen total del extracto fue medido y se procedió a su cuantificación.

Debe mencionarse que durante la extracción los carotenoides se protegieron, en lo posible, de la luz directa del sol y la artificial.

5.6.2.2 PURIFICACION E IDENTIFICACION

Fueron obtenidos los perfiles de absorbancia de los extractos de las diferentes cepas en hexano (saponificados y no saponificados) en un espectrofotómetro Hewlett Packard.

Los extractos fueron saponificados para eliminar las grasas y los ésteres de carotenoides presentes en la muestra que pudieran alterar los tiempos de retención (Rt) en las cromatografías por HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) o el frente de referencia (RF) en las cromatografías por TLC (Thin-Layer Chromatography, TLC) (Britton, G.; 1985).

Los perfiles de carotenoides obtenidos mediante corridas por HPLC y TLC, de muestras saponificadas y no saponificadas fueron comparados para asegurarse de que la hidrólisis alcalina no afectara el contenido de carotenoides.

La saponificación se realizó de acuerdo con el método propuesto por Sidney (1984) y por Britton (1985). Por cada 30 ml del extracto fueron agregados 2 ml de una solución de KOH metanólico al 40%, mezclando durante 1 min y dejando reposar por 12 horas a 4°C en condiciones de oscuridad. Posteriormente se agregó igual volumen de éter de petróleo, o del solvente utilizado para extraer los carotenoides, agitándolo por 1 minuto y finalmente se aforó a 100 ml con una solución de sulfato de sodio al 10%, volviéndose a agitar por 1 minuto. La mezcla se dejó reposar por una hora en la oscuridad a 4°C, antes de recuperar la fase orgánica con los carotenoides. Para evitar la dilución del extracto, cuando esto fuera necesario, no se agregó más fase orgánica durante la saponificación.

Para concentrar los extractos se utilizó una corriente de nitrógeno que removiera el solvente. (Britton, G., 1985).

Cromatografía en capa fina (Thin-Layer Chromatography, TLC).

La técnica de cromatografía en capa fina (TLC) se utilizó para la separación, purificación e identificación de carotenoides mediante la comparación de los RF de los pigmentos en las muestras con respecto a aquellos utilizados como estándares.

Los estándares utilizados fueron β -caroteno, cantaxantina (proporcionados por Hoffman Le Roche), luteína, criptoxantina, y zeaxantina (proporcionados por Bioquímex). Así mismo se manejó la oleoresina de flor de capasúchil (Tagetes erecta) como mezcla de referencia (proporcionados también por Bioquímex).

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

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

Las placas fueron analizadas bajo luz ultravioleta y posteriormente reveladas por aspersión con una solución de ácido sulfúrico en metanol al 10% y secadas a 180°C durante 10 minutos.

Cromatografía líquida de alta resolución (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC).

La técnica de cromatografía de líquidos se utilizó con los mismos fines que la de TLC, mediante la comparación de los Rt de los estándares.

Para las corridas por HPLC se utilizó como fase móvil hexano:acetato de etilo (65:35) y como fase estacionaria una columna de sílica 60, 5 µm, Supelcosil TM-LC-SI 250 X 5 mm.

Las corridas se realizaron a un flujo de 1.5 ml/min. y a una absorbancia a 447 nm; el volumen de inyección de las muestras varió entre 10 y 100 µl.

El equipo utilizado consistió en un cromatógrafo para líquidos de alta resolución Millipore con un espectrofotómetro Waters-Millipore Lambda-max LC-481, un inyector Waters U6K, una bomba Waters-590 y un integrador Varian modelo 4400.

5.6.2.3 CUANTIFICACION.

Para la cuantificación espectrofotométrica de los carotenoides se utilizó el coeficiente de absorbancia específica (A cm) [coeficiente de extinción específico E cm] del β -caroteno y que es de 2600 en éter de petróleo (Britton, 1985). Las longitudes de onda a las cuales se leyó la absorbancia fueron 448 y 478 nm, ya que el β -caroteno es el principal componente de los carotenoides en D. deliquescens, y en hongos en general.

El cálculo se realizó aplicando la siguiente fórmula propuesta por Britton (1985).

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

donde:

A, es la absorbancia observada.

y, es el volumen del extracto en ml.

10^6 , es una constante para expresar los carotenoides en μg .

1%, es el coeficiente de extinción específico para β -caroteno en éter de petróleo.

100, constante para eliminar el factor de por ciento.

5.6.3 CUANTIFICACION DEL AZUCAR RESIDUAL

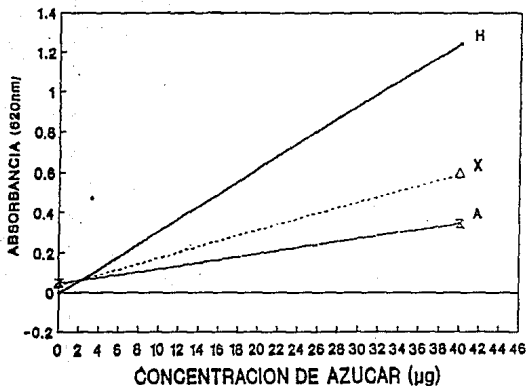
Para la cuantificación de la concentración de los diferentes azúcares probados en este trabajo se manejó la técnica colorimétrica de antrona (Loewus, 1952). Para la mezcla de reacción se utilizaron 400 μl de medio de cultivo ó diluciones del mismo con una concentración teórica entre 0 y 40 μg del azúcar, más 100 μl de solución de antrona más 1000 μl de ácido sulfúrico concentrado (Gráf. 1). Para la cuantificación específica de glucosa se utilizó un paquete para el diagnóstico enzimático de glucosa en suero GOD-PAD (marcas Lakeside y Erlick) (Gráf. 2).

Para la cuantificación de los diferentes azúcares se construyeron tres curvas patrón: la curva para D-xilosa, la curva para L-arabinosa y la curva para las hexosas. Esta última curva resultó de la integración por regresión lineal de las curvas para almidón, celobiosa, maltosa, sacarosa, glucosa y fructosa; la integración pudo realizarse debido a que la diferencia entre las diferentes curvas de las hexosas no fueron significativas estadísticamente, observándose un coeficiente de variación entre tales curvas del 6% (Gráf. 1).

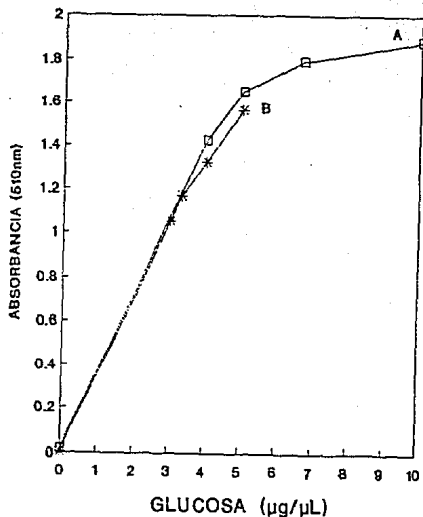
Los datos de absorbancia de cada muestra fueron aplicados en las ecuaciones de las curvas respectivas y el cálculo de la concentración del azúcar en la muestra se realizó considerando el factor de dilución. Las ecuaciones para los diferentes azúcares son:

HEXOSAS (H): $C=A-0.0047/0.031$
 XILOSA (X): $C=A-0.037/0.0137$
 ARABINOSA (A): $C=A-0.05/0.0073$

Donde C = concentración y A = absorbancia registrada a (620nm).



Gráf.1. Curvas patrón de concentración de azúcar VS absorbancia (620nm). Cuantificación colorimétrica por el método de antrona. H, hexosas; X, D-xilosa y A, L-arabinosa.



Gráf.2. Curvas patrón de concentración de glucosa VS absorbancia (510nm). Cuantificación colorimétrica por reacción enzimática GOD-PAP. A, reactivo Erlic y B, Lakeside.

5.6.4 DETERMINACION DEL pH.

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

5.7 ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico de los diferentes tratamientos se realizó mediante la aplicación de la prueba de comparación múltiple de medias LSD, con una significancia de 5%.

En esta prueba se forman grupos homogéneos, es decir grupos entre los que no existe diferencia significativa. Tales grupos se representan como una columna vertical de asteriscos (*), donde cada elemento del grupo presenta un asterisco (*).

La diferencia significativa entre grupos se entiende por la ausencia de traslapamiento entre los grupos homogéneos.

Cuando existe traslapamiento por algunos de los miembros de los grupos homogéneos, estos indicaran cierta semejanza entre los grupos y podran constituirse como un grupo homogéneo intermedio.

Cada dato procesado graficamente o en tablas es el resultado de 4 lecturas. El valor de coeficiente de variación del 25% se estableció como límite máximo para considerar que existía reproducibilidad entre los resultados microbiológicos.

6 RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 SELECCION DE LA CEPA.

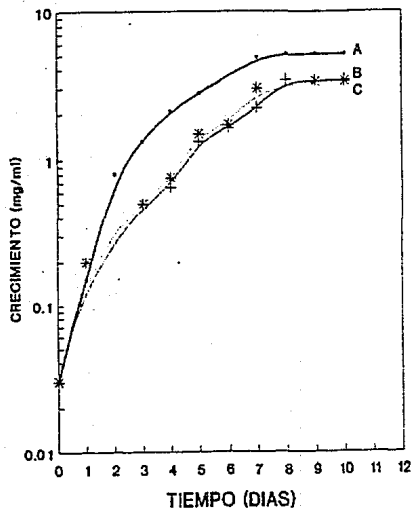
El modelo biológico para realizar la presente investigación fue elegido de entre tres cepas de Dacrymyces deliquescens con las cuales se contaba. Los criterios para la selección de una de las cepas incluyeron: i) producción y productividad específica máxima de carotenoides y ii) composición de los carotenoides sintetizados.

En el perfil de crecimiento de las diferentes cepas (Gráf. 3) se apreció el establecimiento de la fase estacionaria a los 8 días de la fermentación. El análisis estadístico del crecimiento máximo (anexo, p.79) indicó que el crecimiento entre las cepas FSC-307 y BM es similar entre sí, pero diferente si se compara con la cepa ATCC-13292, siendo mayor para esta última cepa.

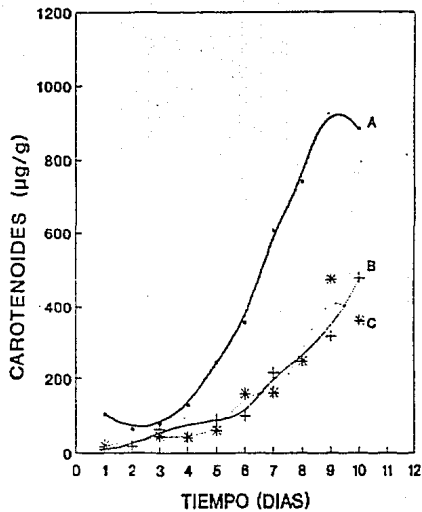
La cinética de producción de carotenoides por las diferentes cepas (Gráf. 4) mostró el máximo de producción a los 9 y 10 días de la fermentación en medio MMS. Se destaca la producción de carotenoides (986 µg/g de biomasa peso seco) por parte de la cepa ATCC-13292, siendo dos veces mayor que el obtenido por las cepas FSC-307 y BM (480 y 475 µg/g respectivamente). A su vez, la productividad específica fue de 110, 48 y 53 µg/g peso seco/día para las cepas ATCC, FSC y BM respectivamente. El análisis estadístico (anexo, p.79) de los datos de producción máxima reveló que no existen diferencias significativas entre los títulos de carotenoides de las cepas FSC y BM y que éstos fueron a su vez diferentes a los de la cepa ATCC-13292.

Para comparar el perfil de pigmentos presentado por las diferentes cepas, se obtuvieron barridos espectrofotométricos (Gráf. 5) de extractos saponificados y no saponificados en hexano. Los barridos presentaron picos de absorbancia iguales, independientemente del tratamiento alcalino, lo cual indicó una composición cualitativa de los pigmentos muy similar. Esto se confirmó mediante el análisis de los diferentes extractos por HPLC (Gráf. 6), lográndose identificar los siguientes carotenoides: 8-caroteno, como el principal carotenoide; cantaxantina, criptoxantina, luteína, y un pigmento desconocido al que se le llamo "A", y que fue el más importante de las xantofilas por su cantidad en los extractos. Como se observa en la Gráf. 7 la composición y proporción de cada pigmento se conservó para los diferentes medios mínimos utilizados en este trabajo.

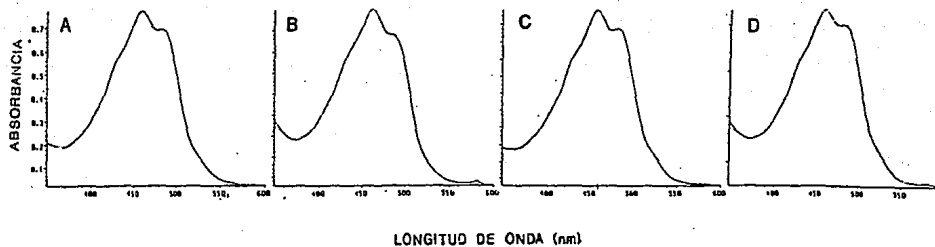
Los resultados obtenidos del análisis cualitativo por HPLC coinciden parcialmente con los publicados por Orange and Monclair (1961) para los miembros de la familia Dacrymycetaceae, ya que



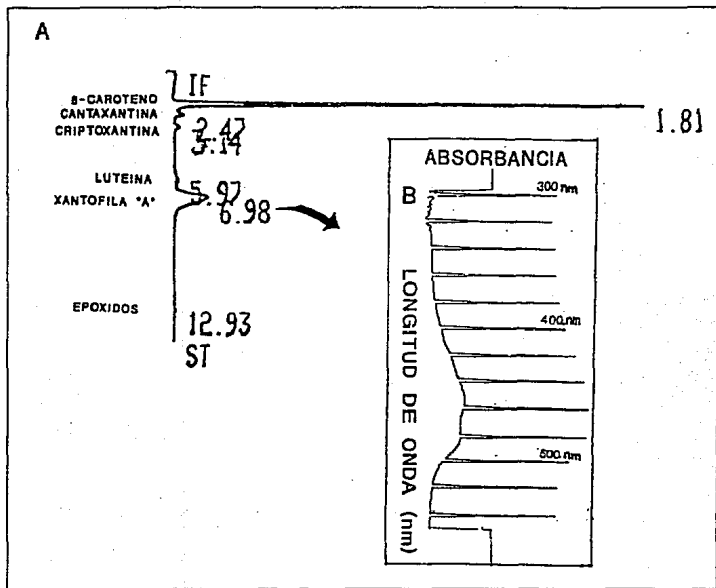
Gráf.3. Cinética de crecimiento de diferentes cepas de *Dactyomyces deliquescens*, en medio MM. A, ATCC-13292; B, FSC- 307 y C, BM.



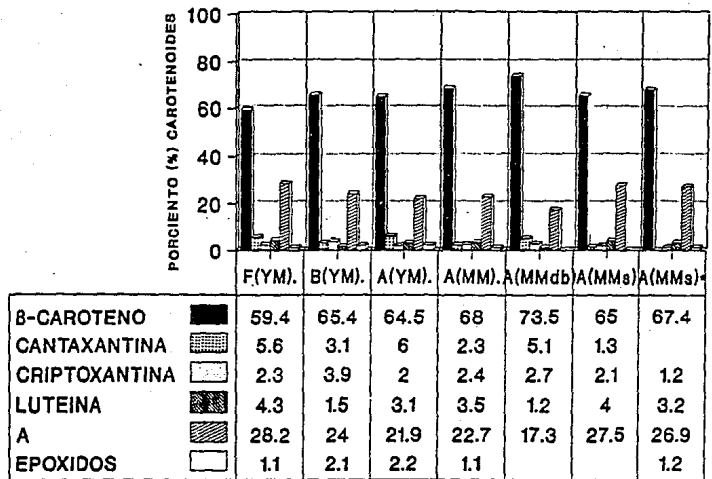
Gráf.4. Perfil de producción de carotenoides por diferentes cepas de *Dactyomyces deliquescens*, en medio MM. A, ATCC 13292; B, FSC- 307 y C, BM.



Gráf.5. Perfiles espectrototométricos de diferentes cepas de *Dacrymyces deliquescens*. Las diferentes cepas fueron crecidas en medio YM-agar, durante 6 días. El registro se realizó en hexano. A, FSC-307 (extracto saponificado). B, FSC-307; C, ATCC- 13292 y D. BM (extractos no saponificados).



Gráf. B. A) Cromatografía por HPLC y perfil de carotenoides presentes en *Dacrymyces deliquescens*. B) Barrido espectrofotométrico (300-550nm) del pico A (Rt 6.98), las marcas se registran cada 20nm.



CEPA Y MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO

Gráf.7. Análisis cualitativo por HPLC del perfil de carotenoides de diferentes cepas de *Dacrymyces deliquescens*. Las cepas F, FSC-307; B, BM y A, ATCC-13292 se crecieron en medio completo (YM), medio mínimo definido balanceado (MMdb), medio mínimo modificado (MM) y medio mínimo con ácido succínico (MMa). El asterisco (*) indica un extracto no saponificado.

estos autores no contemplan la presencia de luteína reportada en este trabajo y anteriormente por Nelis and De Leenheer (1989) para *Dacrymyces deliquesens*; aunque estos últimos autores, mencionan la presencia de zeaxantina, violaxantina, toruleno y torularhodina, pigmentos que no reveló el análisis cromatográfico en ninguno de los extractos de nuestra cepa. Cabe mencionar que el barrido espectrofotométrico del pico A (Gráf. 6) mostró máximos de absorbancia en 426, 450 y 480 nm en hexano, pudiendo corresponder a violaxantina o un epóxido de luteína de acuerdo con Britton (1985).

Las diferencias cualitativas y cuantitativas encontradas hasta aquí con respecto a lo publicado por Orange and Monclair (1961), son explicables desde el punto de vista de la composición del (ó los) medio(s) que se utiliza(n) en este trabajo y los utilizados por ellos, así como por las condiciones de iluminación y agitación que también fueron diferentes, y que estos mismos investigadores afirman que influyen directamente sobre la síntesis de carotenoides específicos.

De acuerdo con estos resultados se seleccionó a la cepa ATCC-13292 para el desarrollo del presente trabajo.

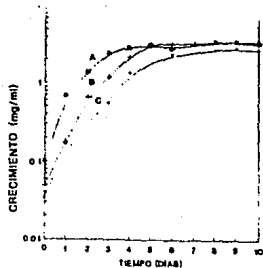
6.2 TAMAÑO DEL INOCULO Y TIEMPO DE FERMENTACION

Para acortar los tiempos de producción máxima de carotenoides (disminuyendo así los riesgos de contaminación), se probaron diferentes tamaños de inóculo.

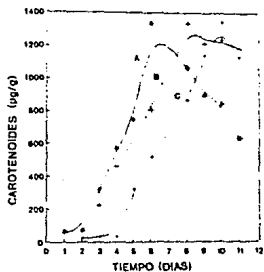
Los perfiles de crecimiento con inóculos de 0.03, 0.05 y 0.10 mg peso seco de biomasa/ml de medio (Gráf. 8), mostraron diferencias en el tiempo en el que se alcanza la fase estacionaria de crecimiento siendo de 7, 5 y 4 días para cada inóculo respectivamente. No obstante el anterior resultado el crecimiento máximo no se afectó de manera importante.

En cuanto a la producción de carotenoides (Gráf. 9) el máximo de producción que se alcanzó fue similar para los diferentes inóculos, sin embargo el tiempo en el que se alcanzó dicho máximo de producción disminuyó en relación inversa al tamaño del inóculo, lo cual se vio reflejado en las productividades específicas (Gráf. 10). Y esto es lógico si se entiende que la producción de los carotenoides está parcialmente asociada al crecimiento del hongo (Ruddat and Garber, 1983).

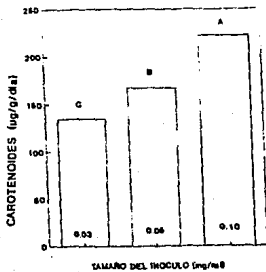
Con base en estos resultados se optó por el inóculo de 0.10 mg/ml para el desarrollo de las posteriores fermentaciones, ya que con dicha biomasa inicial se alcanzaría el máximo de crecimiento (3.3 mg peso seco/al en promedio) a los 4 días de fermentación y la producción máxima de carotenoides (de 1396µg/g de peso seco en promedio) a los 6 días (foto 1).



Gráf. 8. Efecto del tamaño del inóculo sobre la cinética de crecimiento por *Saccharomyces deliquescens* (ATCC-13293). A, 0.1; B, 0.05 y C, 0.03 mg/ml de medio (pase seco).



Gráf. 9. Efecto del tamaño del inóculo sobre el perfil de producción específica de carotenoides por *Saccharomyces deliquescens* (ATCC-13293). A, 0.1; B, 0.05 y C, 0.03 mg/ml de medio (pase seco).



Gráf. 10. Efecto del tamaño del inóculo sobre la producción específica de carotenoides por *Saccharomyces deliquescens* en MM.

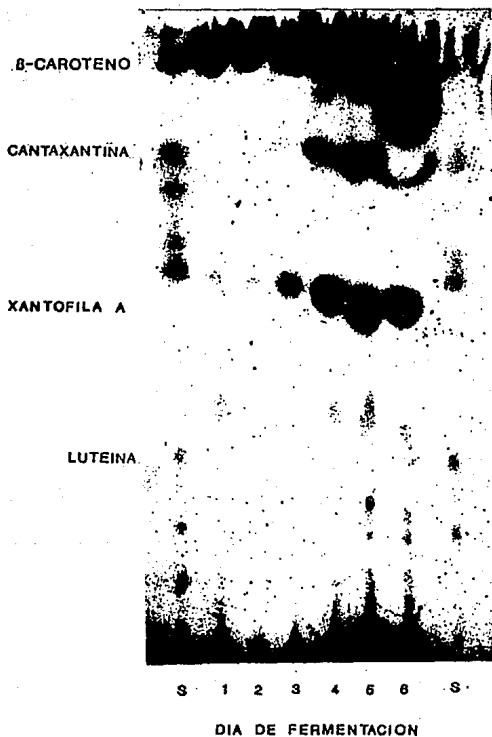


Foto.1. Cromatografía por TLC de la producción de carotenoides por *D. deliquescens* en medio MM, durante los diferentes días de fermentación. S, mezcla estándar de carotenoides (oleoresina de *Tsgetes erecta*).

Cabe mencionar que durante las fermentaciones siempre se observó un solo pico de producción, ocurriendo la principal acumulación de pigmentos después de que se alcanzó la fase estacionaria lo cual es congruente con lo reportado por Ruddat and Garber (1983) y que habla de los carotenoides como metabolitos secundarios.

6.3 MEDIO DE CULTIVO Y pH INICIAL

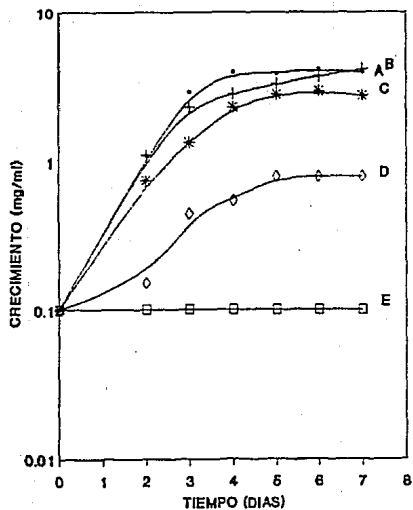
Para poder realizar un mejor estudio del efecto de la fuente de carbono, se requiere trabajar con un medio químicamente definido, de tal modo que se evite la interferencia de fuentes complejas de carbono y nitrógeno.

El medio mínimo balanceado definido (MMdb) fue probado en su capacidad para soportar el crecimiento y la producción de carotenoides de *D. deliquescens* (cepa ATCC-13292). Este medio tiene la particularidad de contener un análogo del ácido succínico (ácido 2,2-dimetil succínico diaminozido). Los resultados a lo largo de este trabajo muestran que el MMdb permite el crecimiento y la carotenogénesis, inclusive en la misma composición cualitativa y cuantitativa a la obtenida en medio completo.

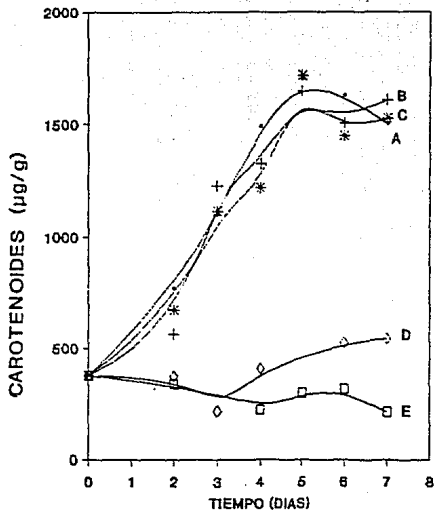
Con el fin de observar el efecto del análogo sobre el crecimiento, la carotenogénesis, el consumo de la fuente de carbono y la evolución del pH del medio, el MMdb se modificó mediante la sustitución del análogo por ácido succínico (MMs) en su caso y por la eliminación del análogo (MM) en otro. Para este estudio se utilizaron como controles los medios MMdb-sin glucosa y el MMs-sin glucosa.

Los perfiles de crecimiento (Gráf. 11) indicaron que el análogo no es metabolizable (MMdb-sin glucosa); mientras que el ácido succínico, en el medio MMs-sin glucosa, es utilizado como fuente de carbono, pero dada la concentración en la que se encontraba (0.03M) el crecimiento fue limitado. En cuanto a los medios MMdb, MMs y MM no se observó diferencia estadística (anexo, p.81) entre el crecimiento máximo presentado por el hongo, alcanzando en dichos medios, prácticamente, los mismos niveles de biomasa y la fase estacionaria a tiempos similares de 4 días de fermentación.

En cuanto a la producción específica de carotenoides (Gráf. 12) se observó que el ácido 2,2-dimetil succínico y el ácido succínico no influyeron sobre la carotenogénesis en presencia de glucosa (MMdb y MMs), ya que los niveles máximos de producción específica fueron semejantes y sin diferencia significativa respecto al MM (anexo, p.81). Ahora bien, como se puede apreciar en la cinética del control MMdb-sin glucosa, el análogo del ácido succínico no es metabolizable y en consecuencia tampoco es carote



Gráf.11. Cinéticas de crecimiento de *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292) en diferente medio mínimo, con pH inicial de 4.5. A, MM; B, MMs; C, MMdb; D, MMs-sin glucosa y E, MMdb-sin glucosa.



Gráf.12. Perfiles de producción específica de carotenoides de *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292) en diferente medio mínimo, con pH inicial de 4.5. A, MM; B, MMs; C, MMdb; D, MMs-sin glucosa y E, MMdb-sin glucosa.

nogénico; por otra parte, el ácido succínico es una fuente de carbono carotenogénica aunque la producción de carotenoides soportada por éste es muy baja.

Con respecto a los perfiles de consumo de glucosa (Gráf. 13) se observó que la presencia del análogo de succínico retrasó el consumo de glucosa y en un menor grado se observó también el mismo efecto por parte del ácido succínico; sin embargo este efecto sobre el consumo de la fuente de carbono no alteró de manera importante ni el crecimiento ni la producción específica de carotenoides como se mencionó arriba. Una vez que se inicia el consumo de glucosa este consumo presentó una pendiente semejante en todos los medios probados.

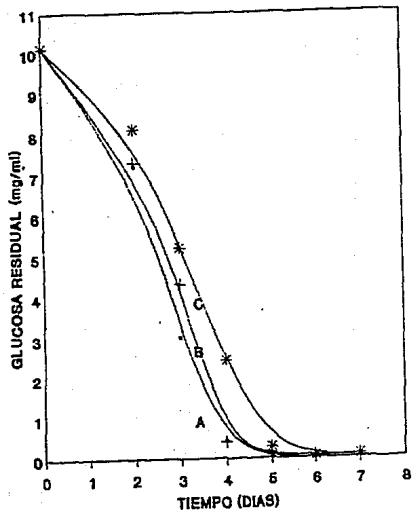
En los perfiles de pH del medio (Gráf. 14) se puede apreciar que el análogo en presencia de glucosa, participa como un amortiguador de los cambios de pH en el medio de cultivo manteniendo este constante (4.5) y este mismo perfil se conservó para el medio MMdb-sin glucosa. En el MMs-sin glucosa se observó una tendencia hacia la alcalinidad a partir del 5º día de la fermentación; este aumento en el pH puede ser explicado por la lisis celular que libera moléculas básicas y que afectan el pH ó también en términos de algún cambio en el metabolismo por parte del microorganismo. Este comportamiento en el cambio del pH hacia valores alcalinos se ha observado en cultivos de Blakeslea trispora con celobiosas como fuente de carbono (Dholakia and Modi, 1982).

En los medios MM y MMs, los cuales contienen glucosa, el pH cayó rápidamente durante los primeros dos días a los valores más bajos (aproximadamente 1.7), manteniéndose así durante el resto de la fermentación.

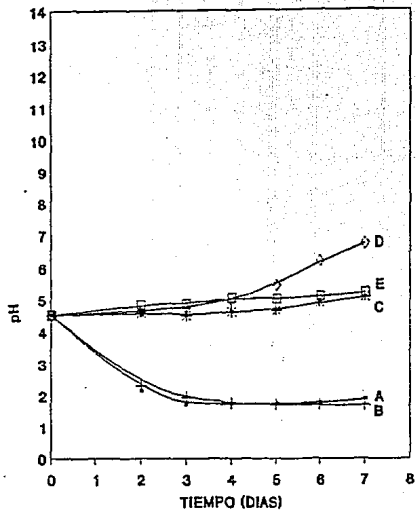
Dado que los niveles de producción en los medios con glucosa como fuente de carbono no se modificaron en presencia o en ausencia del ácido, 2,2-dimetil succínico, se puede afirmar que el cambio del pH, entre valores de 6.2 y 1.7, a lo largo de la fermentación no afecta el crecimiento ni la carotenogénesis en el hongo D. deliquescens, lo cual coincide con los reportado por Orange and Montclair (1961).

El análisis cualitativo por HPLC de los diferentes medios, YM-líquido, MMdb, MMs y MM (Gráf. 7) mostró que la composición y la proporción de los carotenoides presentes es muy semejante; por lo que se puede decir que el medio mínimo presenta los nutrientes necesarios para la carotenogénesis por el hongo y que en él la glucosa es el nutriente que soporta la producción de carotenoides y el crecimiento del microorganismo.

Para analizar el efecto del pH inicial (pHi) sobre la carotenogénesis se manejaron los MMdb y MM a pHi de 4.5 y 6.0.



Gráf.13. Perfiles de consumo de glucosa por *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292) en diferentes medios. A, MM; B, MMa y C, MMdb.



Gráf.14. Perfiles de pH de diferentes medios en los que se creció a *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292). A, MM; B, MMa; C, MMdb; D, MMa-sin glucosa y E, MMdb-sin glucosa

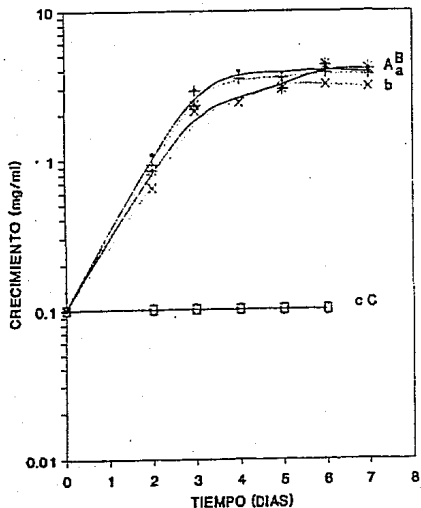
Los perfiles de crecimiento (Gráf. 15) y valores máximos alcanzados en los mismos fueron semejantes (anexo, p.83) para los medios conteniendo glucosa, en los cuales se llegó a la fase estacionaria prácticamente el mismo día (4to día) de la fermentación. El medio MMdb-sin glucosa fue utilizado como control y en el no se presentó crecimiento.

Para los perfiles de producción específica de carotenoides (Gráf. 16) se observó un comportamiento similar en la carotenogénesis para los diferentes medios a diferente pH. Los medios MMdb y MM presentaron cinéticas semejantes al alcanzar ambos los máximos niveles de producción al 5º día de fermentación, independientemente del pH. El análisis estadístico (anexo, p.83), no indicó diferencias significativas entre los niveles máximos de producción específica de carotenoides alcanzados por estos medios con un pH de 4.5 y 6.0. Así se llega a la conclusión de que el pH y la caída en el pH observada en las fermentaciones no afectan al crecimiento ni a la producción de carotenoides. Obsérvese que el medio sin glucosa (MMdb-sin glucosa) no mostró producción de carotenoides.

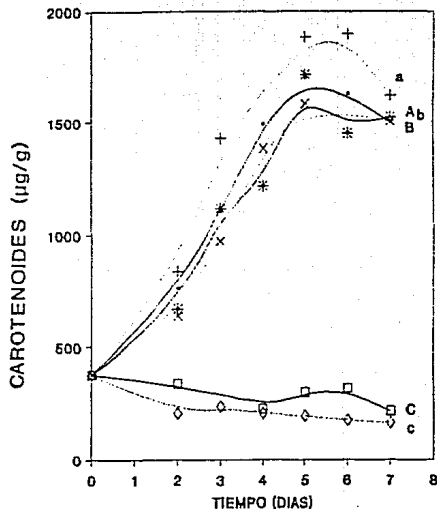
En cuanto al consumo de glucosa (Gráf. 17) se observó que el patrón de consumo en los medios conteniendo este azúcar como única fuente de carbono (MM y MMdb) no se alteró por efecto del pH, presentándose el mismo comportamiento para el MM y para el MMdb a los dos pH (4.5 y 6.0) respectivamente y que las diferencias entre estos medios son explicables por efecto del análogo del ácido succínico, como se observa en la gráfica 13.

Ahora bien, los perfiles de pH (Gráf. 18) fueron similares para el mismo medio independientemente del pH; así, los medios MM presentaron una caída de pH a valores cercanos a 2.0 durante los primeros dos días de la fermentación y se mantuvieron en este nivel sin cambios importantes durante el resto de la fermentación. El medio MMdb se mantuvo a pH 4.5 durante la fermentación. Y el MMdb con pH de 6.0 presentó una caída hasta valores de 4.5 manteniéndose en este nivel por el resto de la fermentación. Finalmente los medios MMdb-sin glucosa, prácticamente, no experimentaron cambio en los valores de pH; la tendencia hacia la alcalinidad mostrada por el MMdb-sin glucosa con pH de 6.0 en los últimos días de la fermentación puede ser explicada por la liberación de metabolitos, que actúan como bases, a consecuencia de la lisis celular, o también a un cambio en el metabolismo, dado que esta tendencia en mayor o menor medida también se observa en los otros medios mínimos utilizados.

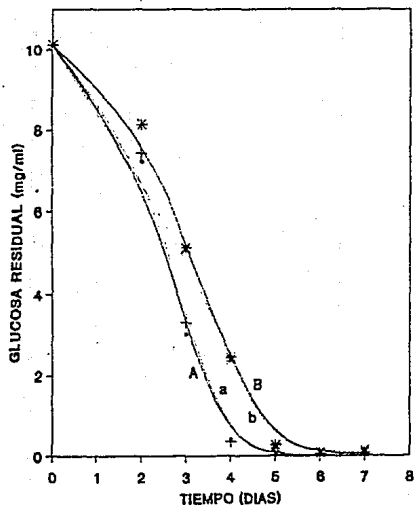
De manera general se puede afirmar que en el hongo D. deliquescens, la glucosa soporta la carotenogénesis y el crecimiento, así mismo, el cambio en el pH es resultado del metabolismo de esta fuente de carbono que trae como consecuencia



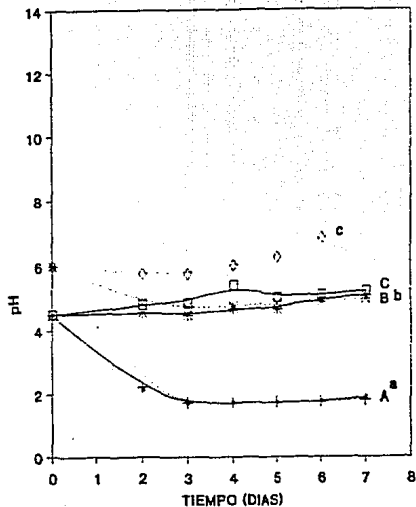
Gráf.15 Efecto del pH inicial (pHi), del medio de cultivo, sobre la cinética de crecimiento de *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292) en diferentes medios pHi de 4.5: A, MM; B, MMdb; y C, MMdb-sin glucosa. pHi de 6.0: a, MM; b, MMdb y c, MMdb-sin glucosa.



Gráf.16. Efecto del pH Inicial (pHi), del medio de cultivo, sobre el perfil de producción específica de carotenoides por *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292) en diferentes medios pHi de 4.5: A, MM; B, MMdb y C, MMdb-sin glucosa. pHi de 6.0: a, MM; b, MMdb y c, MMdb-sin glucosa.



Gráf.17. Efecto del pH Inicial (pHi), del medio de cultivo, sobre el consumo de glucosa por *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292) en diferentes medios. pH de 4.5: A, MM y B, MMdb. pH de 6.0: a, MM y b, MMdb.



Gráf.18. Efecto del pH Inicial (pHi), del medio de cultivo, sobre los perfiles de pH de diferentes medios en los que se creció a *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292). pH de 4.5: A, MM; B, MMdb y C, MMdb-sin glucosa. pH de 6.0: a, MM; b, MMdb; y c, MMdb-sin glucosa.

la liberación de ácidos orgánicos al medio y consecuentemente éste se acidifica, a menos que exista un amortiguador como el ácido 2,2-dimetil succínico con la capacidad de neutralizar los productos de la glucólisis; así también, se observó que en el momento que la glucosa prácticamente se agota en el medio de cultivo, el microorganismo deja de crecer para entrar a la fase estacionaria; finalmente, la producción de carotenoides esta parcialmente asociada al crecimiento y el mayor almacenamiento de carotenoides se observó cuando se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento y la glucosa se agotó en el medio, viéndose entonces limitada la carotenogénesis por la falta del azúcar. Estas observaciones coinciden con los resultados publicados por Johnson and Lewis (1979), Goodwin and Willmer (1952), Vencher and Kulikova (1968), Hsu et al. (1974), Hashimoto et al. (1978) y Davies (1973).

Es de considerarse que los perfiles de variación del pH en los medios sin amortiguador, obtenidos en este trabajo, así como la ausencia de efecto por parte del pH y las variaciones mismas del pH a lo largo de la fermentación sobre el crecimiento y carotenogénesis en el hongo D. deliquescens ha sido reportada también por Orange and Monclair para el caso de la familia Dacrymycetaceae (1961) para un rango de pH entre 2.1 y 8.5.

6.4 CONCENTRACION DE CARBONO Y CAROTENOGENESIS

La fuente de carbono per se o algún producto del metabolismo de ésta, pueden tener diferentes efectos regulatorios sobre la producción de metabolitos secundarios; los efectos pueden ser divididos en dos grupos: a) efectos negativos que incluyen a la represión catabólica y la inhibición o inactivación enzimática; y b) efectos positivos como la inducción y la activación. Estos efectos pueden llevarse a cabo a través de diferentes mecanismos regulatorios (Tabla 4) que inciden sobre la síntesis de enzimas o sobre la actividad de las enzimas existentes (Sánchez y Ferrés, 1987).

Por otra parte, es sabido que la concentración de un determinado nutriente en el medio es un factor importante para evidenciar el efecto que éste pueda tener sobre la síntesis del metabolito de interés. En este caso, la síntesis de carotenoides no es la excepción; por ejemplo, Johnson and Lewis (1979) reportan la supresión en la síntesis de astaxantina en Phaffia rhodozyma cuando se utiliza glucosa como única fuente de carbono a concentraciones iguales o mayores que 4%; por su parte Dandekar and Modi (1980) sugieren la existencia de represión catabólica en la formación de β -caroteno por Blakeslea trispora cuando se utiliza glucosa en concentraciones de 5.4%.

Tabla 4. Mecanismos regulatorios del metabolismo general (Sánchez y Farrés, 1987).

Activación
Inactivación catabólica
Inducción
Inhibición por producto
Modulación catabólica
Permeabilidad
Regulación por carga energética
Regulación por enzimas
Regulación por vías cruzadas
Regulación de la síntesis de RNA por aminoácidos
Represión catabólica
Represión nitrogenada
Represión por producto
Represión transitoria

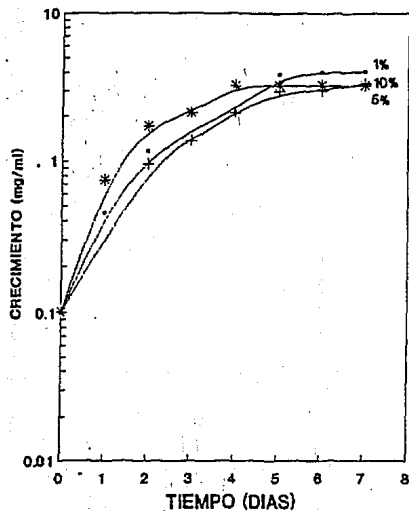
Debe considerarse sin embargo, que el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de carotenoides, depende tanto de la naturaleza de esta fuente y de su metabolismo, como de la sensibilidad particular de cada sistema a la misma, de tal forma que un sustrato dado no siempre tendrá el mismo efecto sobre la carotenogénesis en diferentes microorganismos.

Por la existencia de mayor información del efecto de la concentración de glucosa sobre la carotenogénesis en particular y sobre otros metabolitos secundarios en lo general (Escalante et al., 1982, Escalante, 1988), además de que glucosa es la única fuente de carbono en los medios mínimos utilizados en esta investigación, se decidió probar si existía algún efecto de la concentración de glucosa sobre la síntesis de carotenoides en el hongo *D. deliquescens*. De existir algún efecto, se establecería la concentración a la cual se ejerce tal acción como la concentración a ser probada para observar la existencia de posibles efectos por parte de otras fuentes de carbono.

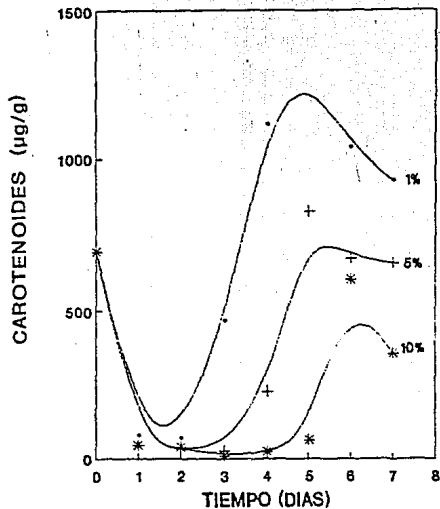
En cuanto al efecto de la concentración de glucosa sobre el crecimiento del hongo (Gráf. 19), se observó que la concentración del azúcar parece no haber tenido efecto sobre los niveles máximos de crecimiento (anexo, p.85), alcanzando en tiempo semejante la fase estacionaria, inclusive.

En cambio, la producción específica de carotenoides en diferentes concentraciones de glucosa (Gráf. 20) como única fuente de carbono se vio disminuida al aumentar la concentración de 1 a 5 y 10% (anexo, p.85). Al mismo tiempo fue evidente la existencia de un retardo en el inicio de la síntesis de carotenoides conforme se incrementó la concentración del azúcar, lo cual repercutió en una disminución de la productividad específica de carotenoides en concentraciones altas del azúcar. Cabe destacar que una vez que se inició la síntesis de carotenoides, ésta se mantuvo con una pendiente semejante independientemente de la concentración de azúcar empleado; esto puede explicarse como consecuencia de la utilización del carbohidrato que es la fuente de carbono para la síntesis de los carotenoides, ya que la pendiente del consumo de la glucosa como fuente de carbono fue muy semejante a la condición de glucosa de baja concentración, una vez que el efecto supresivo terminó.

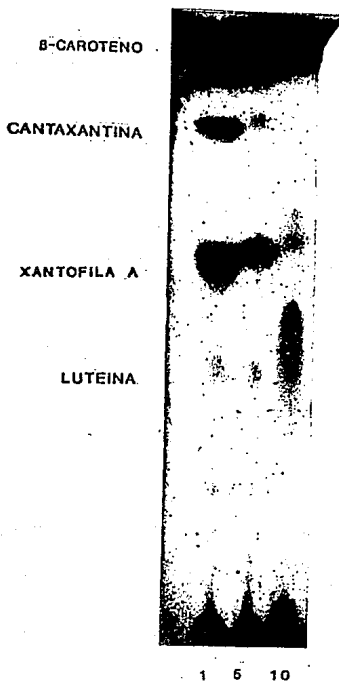
El análisis cualitativo del contenido de pigmentos (por TLC) para las diferentes condiciones de concentración del azúcar (foto 2), mostró que los carotenoides sintetizados son los mismos, y que se mantiene la misma proporción entre los distintos carotenoides presentes. En otras palabras, la composición sólo se vio alterada cuantitativamente por efecto de la concentración de glucosa. En consecuencia podemos suponer que el efecto negativo de la concentración de glucosa sobre la síntesis de carotenoides se podría ejercer sobre los primeros pasos de la vía de síntesis.



Gráf.19. Efecto de la concentración de glucosa, como única fuente de carbono, sobre el crecimiento por *Dacrymyces deliquescens* (ATCC- 13292) en MM. .



Gráf.20. Efecto de la concentración de glucosa, como única fuente de carbono, sobre el perfil de producción específica de carotenoides por *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292) en MM.



CONCENTRACION DE GLUCOSA (%)

Foto 2. Cromatografía por TLC del efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de carotenoides por *Dacrymyces deliquescens*. Para la extracción de carotenoides de cada muestra aplicada se utilizó la misma cantidad de bio masa en peso seco.

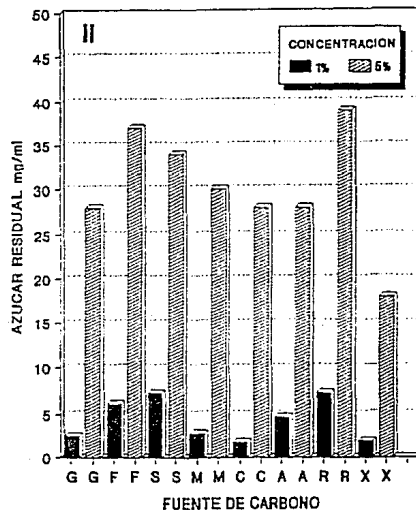
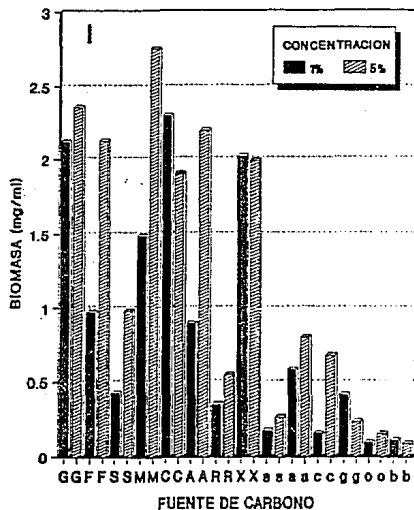
Cabe mencionar que en los perfiles de producción específica de carotenoides se observan las etapas de desaparición gradual inicial, síntesis y acumulación, mantenimiento y por último, disminución de carotenoides reportada por Goodwin and Willmer (1952), Hau *et al.* (1974), van Eijk *et al.* (1979) para hongos y levaduras. La etapa de desaparición gradual inicial, que se observó en los primeros días de fermentación, se debió a un efecto de dilución de carotenoides ya que, aun y cuando el inóculo presentaba una cantidad alta de carotenoides, el microorganismo se dedicó a crecer más que ha sintetizar los mismos. La síntesis de carotenoides se inició al segundo día de la fermentación, cuando el microorganismo esta en franco crecimiento y fue en consecuencia, paralela al crecimiento; posteriormente, cuando el crecimiento cesa por limitación de la fuente de carbono, se dió la etapa de acumulación de carotenoides, hasta que se alcanzó un pico máximo y finalmente sobrevino la desaparición de pigmentos por degradación.

6.5 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO:

6.5.1 CRECIMIENTO.

De manera general los carbohidratos, de entre las fuentes de carbono probadas, soportaron los más altos niveles de crecimiento por el hongo *Dacrymyces deliquescens* (Gráf 21, I). Se observó, también, que la concentración de la fuente de carbono tuvo efecto sobre el crecimiento del hongo (Tabla 5). Así, en concentraciones de 5% de maltosa, fructosa, almidón, arabinosa, sacarosa, ác. cítrico, entre otras fuentes de carbono, se observó un incremento en los niveles máximos de biomasa alcanzados por el hongo, comparativamente con los resultados obtenidos en estas mismas fuentes de carbono en concentraciones de 1%. En el caso de celobiosa y glicerol el efecto sobre crecimiento fue el inverso al descrito arriba. En cambio no se observó ningún efecto sobre crecimiento, independientemente de la concentración de la fuente de carbono, cuando se crece al hongo en xilosa, glucosa y ácido succínico.

El ácido butírico y oleico no permitieron el crecimiento del hongo independientemente de la concentración utilizada, lo cual puede reflejar un problema de transporte de tales fuentes de carbono. Por otra parte, entre los ácidos orgánicos el máximo crecimiento se presentó en el ácido acético seguido por los ácidos cítrico y succínico en condiciones de 1% de la fuente de carbono y la secuencia se invierte para estos últimos en condiciones de 5% (Gráf. 21, I). Ahora bien, mientras que el ácido succínico es una fuente de carbono que permite un crecimiento moderado en la levadura *Phaffia*, soporta un crecimiento pobre en el hongo *D. deliquescens*.



Gráf.21. Efecto de la fuente de carbono y su concentración sobre: I) el crecimiento y II) el consumo de glucosa por *Dacrymyces deliquescens*. G, glucosa; F, fructosa; S, sacarosa; M, maltosa; C, celobiosa; A, almidón; R, arabinosa; X, xilosa; s, ácido succínico; a, ácido acético; c, ácido cítrico; g, glicerol; o, ácido oléico y b, ácido butírico.

En términos de rendimiento relativo de biomasa, (mg peso seco de biomasa / mg utilizados de la fuente de carbono) para cultivos en concentración de 1% de la fuente de carbono, la glucosa registró los más altos niveles, seguida de la celobiosa, la xilosa, la fructosa y la maltosa en este orden (Tabla 5; Gráf. 21, II). Estos resultados concuerdan parcialmente con los reportados por Johnson and Lewis para la levadura carotenogénica Phaffia rhodozyma (1979), en el sentido de que glucosa, seguida celobiosa son las fuentes de carbono que en una concentración de 1%, soportan los máximos rendimientos de biomasa.

Sacarosa y L-arabinosa fueron los azúcares que presentaron el crecimiento más bajo, aunque un incremento en la concentración de tales azúcar favoreció el crecimiento. Así mismo, para estos carbohidratos los títulos de azúcar residual indican que la asimilación de estos azúcares, junto con fructosa, es también baja en relación a los otros sacáridos probados (Gráf. 21, I y II; Tabla 5).

Mientras que en Phaffia rhodozyma L-arabinosa permite el doble de crecimiento que D-xilosa, en Dacrymyces deliquescens D-xilosa permitió 3 veces mayor crecimiento que L-arabinosa. Cabe mencionar que D-xilosa soportó la tercera parte del crecimiento de Phaffia que se obtiene en glucosa; mientras que para Dacrymyces deliquescens el crecimiento alcanzado en D-xilosa y D-glucosa es semejante, lo anterior permite suponer diferencias regulatorias metabólicas importantes entre dichos microorganismos carotenogénicos.

Ahora bien, mientras que Dacrymyces deliquescens alcanzó valores similares de crecimiento cuando se cultiva en D-glucosa, D-xilosa en ambas concentraciones manejadas y en maltosa y fructosa en condiciones de alta concentración (5%); otro hongo carotenogénico llamado Phycomyces blakesleeanus en dichos azúcares alcanza niveles semejantes de crecimiento en condiciones de concentración de 1% (Goodwin, 1959). De tales resultados podemos inferir que también existen diferencias metabólicas importantes para la utilización en de maltosa y fructosa como fuentes carotenogénicas entre tales hongos.

Finalmente el aumento en la concentración de glicerol en el medio, pareció suprimir en cierto grado el crecimiento de D. deliquescens; a diferencia de lo que ocurre en Rhodotorula rubra, donde este compuesto es la mejor fuente de carbono (Goodwin, 1959).

En conclusión los carbohidratos cuando se utilizan como única fuente de carbono soportaron los máximos crecimientos, a diferencia de lo que ocurrió con los ácidos orgánicos y el glicerol, donde los valores de biomasa alcanzados fueron muy bajos. Por otra parte, si consideramos que los carotenoides son productos del metabolismo secundario que se sintetizan

Tabla. 5. RENDIMIENTOS

FUENTE DE CARBONO	CONC. (%)	BIOMASA (mg/ml)	CONSUMO (mg/ml)	CDES (µg/g)	RENDIMIENTOS (%)	
					CDES	BIOMASA
GLUCOSA	1	2.12	7.4	905	12.2	28.5
GLUCOSA	5	2.36	11.0	564	5.1	21.5
FRUCTOSA	1	0.97	3.9	245	6.3	24.9
FRUCTOSA	5	2.13	13.0	424	3.3	16.4
SACAROSA	1	0.43	2.8	377	13.4	15.3
SACAROSA	5	0.98	16.0	748	4.7	6.1
MALTOSA	1	1.49	7.1	216	3.0	21.0
MALTOSA	5	2.75	20.0	769	3.9	13.8
CELOBIOSA	1	2.30	8.1	718	8.8	28.3
CELOBIOSA	5	1.90	22.0	992	4.5	8.6
ALMIDON	1	0.89	5.3	302	5.7	16.8
ALMIDON	5	2.20	22.0	770	3.5	10.0
ARABINOSA	1	0.36	2.8	276	9.9	12.9
ARABINOSA	5	0.55	11.0	350	3.2	5.0
XILOSA	1	2.02	8.0	601	7.5	25.3
XILOSA	5	1.99	32.0	1144	3.6	6.2

CONC., CONCENTRACION DEL AZUCAR.
 CDES, CAROTENOIDES.

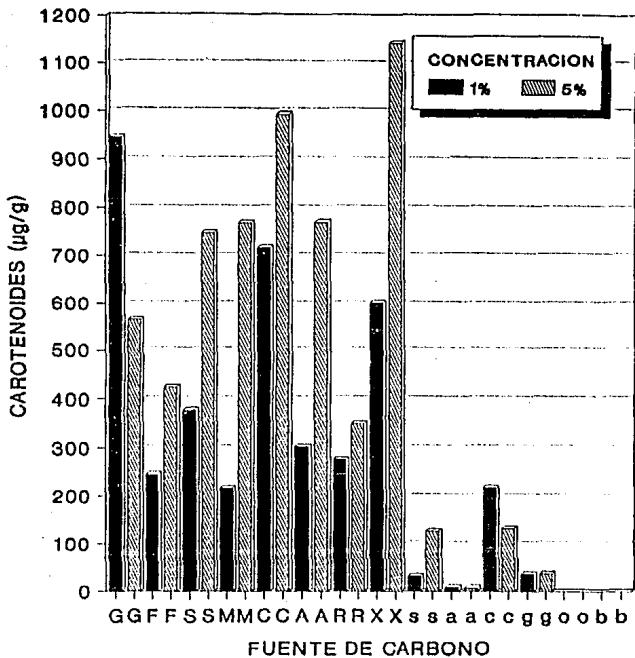
conjuntamente con el crecimiento del microorganismo productor, entenderemos el porqué cuando el crecimiento es bajo existe también una producción baja de carotenoides. Finalmente cabe destacar que ninguna de las fuentes de carbono probadas tuvo ningún efecto negativo por concentración sobre el crecimiento de D. deliquescens, aunque los rendimientos disminuyeron con el incremento de la concentración de la fuente de carbono, en el caso de los azúcares (Tabla 5).

6.5.2 CAROTENOGENESIS.

La producción específica de carotenoides por el hongo D. deliquescens dependió de la fuente de carbono y la concentración utilizada de la misma (Gráf. 22). Como puede observarse en el análisis estadístico de la producción específica de carotenoides por D. deliquescens (anexo, p.87) pocos son los grupos conformados por 2 o más fuentes de carbono entre los que no existen diferencias significativas; de manera generalizada cada fuente de carbono probada y cada concentración de dicha fuente de carbono (1 y 5%) presenta diferencias significativas que las ubican como un grupo aparte.

Sólo existen 3 grupos de producción específica cuyas fuentes de carbono y concentración son perfectamente distinguibles e independientes, dichos grupos son: I) D-xilosa (5%), II) celobiosa (5%) y III) D-glucosa (1%), en orden de mayor a menor producción. Además de estos grupos de producción de carotenoides se forma, como consecuencia del rango de producción específica soportado por cada fuente de carbono probada en las concentraciones establecidas, un gradiente en el existe un traslapamiento entre las producciones. Dentro de este gradiente de producción se encuentran otros 15 grupos, entre los que se incluyen a los grupos conformados de la siguiente forma: a) almidón (5%) y maltosa (5%), b) arabinosa (5%) y almidón (1%), c) ác. cítrico (5%) y ác. succínico (5%), d) glicerol (5 y 1%) y ác. succínico (1%), y e) ác. acético (1 y 5%), ác. butírico (1 y 5%) y ác. oleico (1 y 5%) en orden de mayor a menor producción; el resto de las fuentes de carbono en su respectiva concentración forman grupos independientes.

Si se establece arbitrariamente la D-glucosa, en una concentración del 1%, como la fuente de carbono con un rendimiento de carotenoides del 100%, se observa que todos los azúcares probados, excepto la sacarosa, son menos eficientes que la D-glucosa para promover la carotenogénesis (Tabla 5). Observándose, también, que la glucosa es una de las fuentes de carbono con los mejores rendimientos de carotenoides (mg producción específica de carotenoides/mg de azúcar).



Gráf.22. Efecto de la fuente de carbono y su concentración sobre la producción específica de carotenoides por *Dactyomyces deliquescens* (ATCC-13292). G, glucosa; F, fructosa; S, sacarosa; M, maltosa; C, celobiosa; A, almidón; R, arabinosa; X, xilosa; s, Ácido succínico; a, ácido acético; c, ácido cítrico; g, glicerol; o, ácido oléico y b, Ácido butírico.

Cuando se utilizan los mismos azúcares en una concentración del 5%, se observa que la D-xilosa y la celobiosa resultan en una mayor producción específica (121 y 105% respectivamente) que la D-glucosa al 1% , mientras que con los demás azúcares y fuentes de carbono se obtienen producciones inferiores.

En general se observó que la fuente de carbono en la cual se obtuvo la mayor producción de carotenoides es la D-glucosa cuando se utilizó a baja concentración (1%), sin embargo este monosacárido en alta concentración (5%) tuvo un efecto negativo sobre la síntesis de pigmentos, disminuyendo su producción específica hasta en un 40%. Efectos negativos por concentración de glucosa sobre la producción de carotenoides han sido reportados por Dholakia and Modi (1980) y Johnson and Lewis (1979).

Por su parte D-Fructosa resultó ser el monosacárido del grupo de las hexosas con la más pobre producción de carotenoides (Gráf. 22). Tal resultado es equiparable con el publicado para Phycomyces blakesleeanus, en el sentido de que esta fuente de carbono permite menores producciones de carotenoides que la glucosa (Goodwin, 1959).

La D-xilosa en alta concentración (5%) permitió la más alta producción de carotenoides, si se compara con las otras fuentes de carbono utilizadas en este trabajo. La producción específica obtenida cuando se utilizó D-xilosa en una concentración de 1% se sitúa por debajo de la obtenida con D-glucosa a 1% de concentración. En tanto que un aumento en la concentración del azúcar permitió un incremento en la producción de carotenoides, tal efecto positivo de la concentración, puede ser explicado en términos de producción de poder reductor (NADPH) generado por el metabolismo de la D-xilosa a través de la vía de las pentosas, y que es importante en la producción de carotenoides. Los rendimientos de producción específica para esta pentosa, sin embargo, cayeron por debajo de los obtenidos para glucosa (Tabla 5).

La D-xilosa, en cambio, es una fuente que soporta una mediana producción en Phaffia (Johnson and Lewis, 1979) y en Phycomyces blakesleeanus (Goodwin, 1959).

La L-arabinosa permitió en Dacrymyces deliquescens una producción específica pobre de entre las obtenidas para los azúcares probados, aunque se distingue un efecto positivo de la concentración de este azúcar sobre la carotenogénesis y el crecimiento. Sin embargo los rendimientos de producción en condiciones de baja concentración de la fuente de carbono lo ubican en tercera posición, siguiendo a la glucosa; es decir hay una canalización importante del azúcar consumido hacia la síntesis de pigmentos. A diferencia de lo observado aquí este azúcar en Phaffia permite una producción equiparable a la de glucosa (Johnson and Lewis, 1979).

D-Celobiosa con una concentración de 5% fue el disacárido en el que la producción de pigmentos se situó en lugar intermedio entre la D-xilosa (5%) y la D-glucosa (1%) y cuya concentración también tiene un efecto positivo sobre la carotenogénesis. En rendimientos de producción D-celobiosa supera a la D-xilosa (Tabla 5). En cambio, para Phaffia rhodozyma D-Celobiosa es la mejor fuente de carbono para la producción de carotenoides (Johnson and Lewis, 1979); y cuando se utiliza en cultivos de Blakeslea trispora resulta en un incremento de 10 veces la producción de carotenoides en comparación con D-glucosa. En general el efecto positivo de D-celobiosa sobre la síntesis de carotenoides se explica por la lenta liberación de D-glucosa, lo cual impide que se observe el efecto negativo que la glucosa tiene sobre la carotenogénesis en Phaffia rhodozyma, en Blakeslea trispora (Dholakia and Modi, 1982) y en Dacrymyces deliquescens. Esta explicación también podría ser válida para el efecto positivo de la concentración sobre la carotenogénesis en Dacrymyces deliquescens cuando se utilizó como única fuente de carbono almidón, D-maltosa y D-sacarosa.

La sacarosa, a una concentración de 1%, por su parte presentó los más altos rendimientos en producción específica superando a la glucosa; y en condiciones de 5% el rendimiento es muy semejante al de glucosa en la misma concentración.

Entre los ácidos orgánicos probados, el ácido cítrico soportó la mayor producción de carotenoides. Mientras que el acetato fue la fuente de carbono que generó los más bajos niveles de carotenoides, independientemente de la concentración utilizada. El incremento en la concentración de ácido cítrico tuvo un efecto negativo sobre la síntesis de carotenoides. Por su parte, el incremento en la concentración de ácido succínico parece haber tenido un efecto positivo sobre la carotenogénesis en D. deliquescens.

El glicerol en ambas concentraciones probadas (1 y 5%), rindió producciones bajas de carotenoides, a diferencia de lo que ocurre en Blakeslea trispora donde soporta una producción mayor que la permitida por glucosa (Dandekar and Modi, 1980), o como en Rhodotorula rubra donde es la mejor fuente de carbono para la carotenogénesis (Schwartz, 1989).

Los ácidos oleico y butírico independientemente de la concentración probada no permitieron la producción de carotenoides. Esto pudiera ser explicado en términos de un problema de transporte.

Con base en lo anterior podemos afirmar que Dacrymyces deliquescens es un microorganismo que fermenta azúcares, puesto que las máximas producciones se obtuvieron cuando se utilizaron azúcares como única fuente de carbono. Así también, este hongo tiene las enzimas para atacar enlaces tipo α y β y permitir la hidrólisis de los diferentes disacáridos y polisacáridos

probados. Aunque la diferencia en rendimientos de producción supone dificultades metabólicas para la utilización y/o canalización del azúcar a la síntesis de carotenoides.

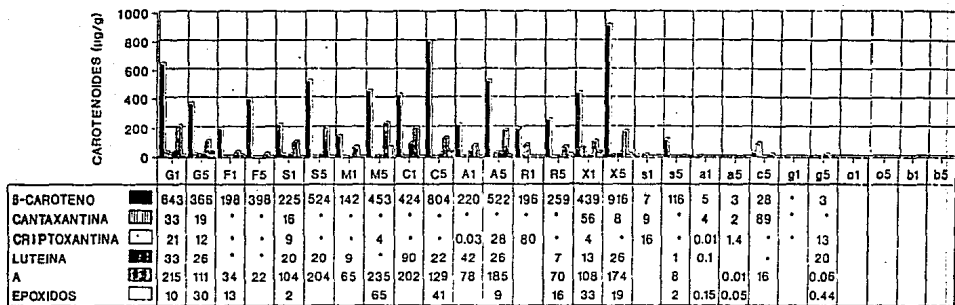
El análisis por cromatografía de líquidos (HPLC) de la composición de los carotenoides producidos en las diferentes fuentes de carbono y en las concentraciones establecidas (Gráf. 23) muestra diferencias cuantitativas y cualitativas en el contenido de carotenos y xantofilas en las diferentes fuentes de carbono y para las diferentes concentraciones probadas. De manera general, en todas las fuentes de carbono se sintetizan los mismos carotenoides aunque en algunas fuentes de carbono y bajo determinada concentración la cantidad es tal que aun registrándose (el pico) el carotenoide en el cromatograma el cromatógrafo no lo integra y en consecuencia no aparece en el registro cuantitativo. Estos carotenoides son denotados por un asterisco (*) en la gráfica 23.

Dentro de los monosacáridos utilizados, en D-glucosa la composición de carotenoides es la misma en ambas concentraciones, siendo el β -caroteno el principal componente seguido de la xantofila "A", la luteína y la cantaxantina, en igual cantidad y finalmente la criptoxantina. En fructosa la composición es semejante a la de glucosa solo que la única xantofila integrada es la xantofila "A". En L-arabinosa, el β -caroteno también es el carotenoide predominante y a baja concentración del carbohidrato solo se detecta como xantofila a la criptoxantina, mientras que a 5% del azúcar no se detecta esta xantofila y en cambio se registran luteína y xantofila "A", en orden decreciente. Para D-xilosa, el β -caroteno también es el carotenoide predominante y el único caroteno detectado; entre las xantofilas, cuando se cultiva en una baja concentración de xilosa destaca la xantofila "A", seguida de cantaxantina, luteína y criptoxantina. En alta concentración del azúcar el orden es xantofila "A", luteína y cantaxantina, no se integró criptoxantina para esta condición.

Por lo que se refiere a los disacáridos, en sacarosa se logra integrar bajas concentraciones de cantaxantina y criptoxantina. Fuera de estas xantofilas la composición es semejante a la D-glucosa. En maltosa el patrón de pigmentos es semejante al de D-glucosa, solo que criptoxantina se integró en altas concentraciones y luteína en bajas. Para celobiosa, el patrón es similar al de glucosa lográndose integrar a la xantofila "A" y la luteína.

Para el almidón el perfil es el mismo que en D-glucosa sólo que no se integró cantaxantina.

Dentro de los ácidos empleados, en el ácido succínico en concentraciones de 1% predominó de entre los carotenoides la criptoxantina seguida por la cantaxantina y el β -caroteno; en esta condición las xantofilas son los principales carotenoides.



FUENTE DE CARBONO

Gráf.23. Efecto de la fuente de carbono sobre el perfil y la producción específica de carotenoides por *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292). G, glucosa; F, fructosa; S, sacarosa; M, maltosa; C, celobiosa; A, almidón; R, arabinosa; X, xilosa; s, ácido succínico; a, ácido acético; c, ácido cítrico; g, glicerol; o, ácido oléico y b, ácido butírico. La concentración se indica como 1, 1% y 5, 5%. Los análisis de las muestras se realizaron por HPLC. (*) carotenoides no integrados que aparecen en el cromatograma.

En altas concentraciones la proporción de carotenos:xantofilas se invierte y predomina el β -caroteno seguido de la xantofila "A" y luteína; aun y cuando se registran cantaxantina y criptoxantina, estas no se integran. Para el ácido acético predomina el β -caroteno seguido de la cantaxantina; la luteína, criptoxantina y xantofila "A", se registraron en cantidades muy bajas.

En el ác. cítrico las xantofilas superan a los carotenos en la composición de pigmentos. La cantaxantina predominó sobre el β -caroteno en ambas concentraciones. Solo en la concentración de 5% fue posible registrar la presencia de xantofila "A", sin embargo su cantidad es menor que la de β -caroteno.

En glicerol sólo se detectaron carotenoides en alta concentración de la fuente de carbono. Los componentes principales fueron las xantofilas, destacando la luteína y la criptoxantina sobre el β -caroteno; la xantofila "A" se registró en una concentración por abajo del glicerol.

No se detectan carotenoides en las condiciones de ác. oleico y ác. butírico.

Estas diferencias en la composición de carotenoides evidencian efectos de regulación importantes que dichas fuentes de carbono ejercen posiblemente sobre el metabolismo de los carotenoides en el hongo D. deliquescens.

6.6 CARACTERIZACION DEL EFECTO REGULATORIO POR GLUCOSA.

6.6.1 EFECTOR Y EFECTO

Para caracterizar el efecto negativo sobre la producción de carotenoides observado cuando se crece al microorganismo en glucosa como única fuente de carbono a concentraciones de 5 y 10%; se realizaron adiciones de glucosa al 5% de concentración, a fermentaciones desarrollándose en condiciones no inhibitorias para la carotenogénesis, es decir con una concentración de 1% de glucosa en el medio de cultivo (MM) como única fuente de carbono. Las adiciones se efectuaron en los días 0, 2 y 3 de la fermentación; estos tiempos se establecieron considerando que el "disparo", es decir la mayor velocidad, de síntesis de carotenoides en el hongo Dacrymyces deliquescens, se inicia el

día 2 de la fermentación bajo las condiciones de cultivo manejadas. Así, la adición al día 0 se consideró como control positivo del efecto.

Por otra parte se adicionó el antibiótico cicloheximida en estos mismos tiempos, como un control positivo de represión, considerando que este compuesto inhibe la síntesis de proteínas de novo y se manifestaría por la supresión de la síntesis de carotenoides (Dandekar and Modi, 1980).

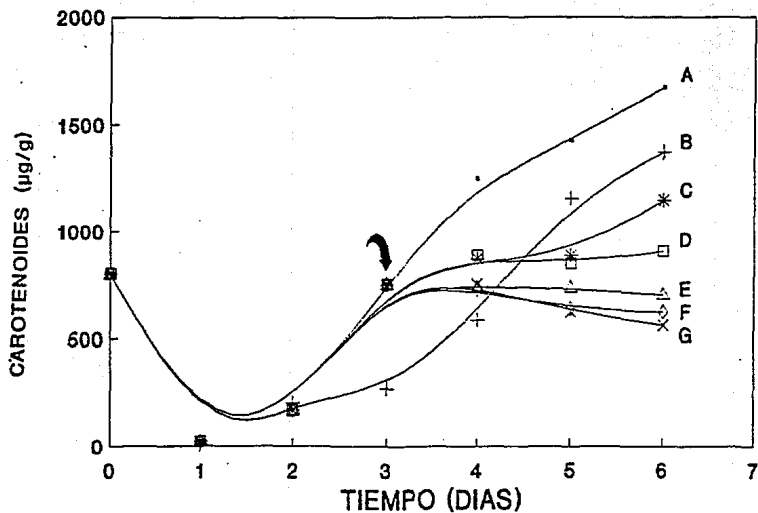
El 2-deoxiglucosa (2-DOG) un análogo no metabolizable de la glucosa, fue utilizado en este sistema para saber si el efector era glucosa per se o un producto del metabolismo de la glucosa. Este análogo de glucosa ha sido empleado por Escalante, L., et al. (1982 y 1992); Demain, A., (1985) y Hodgson, D., (1982) con el fin de identificar a la glucosa como el efector.

Finalmente, las mezclas glucosa-cicloheximida y DOG-cicloheximida permitirían observar, de existir, el efecto de inhibición de la actividad de las enzimas existentes que participan en la síntesis de carotenoides.

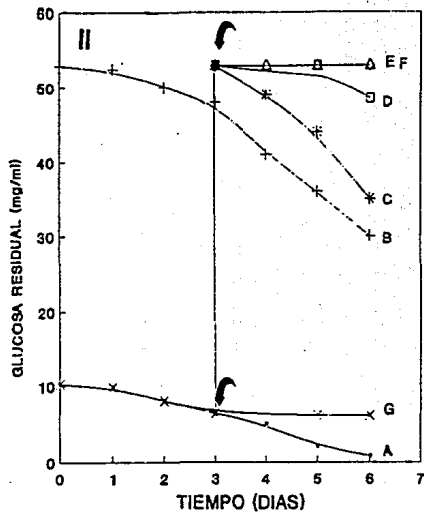
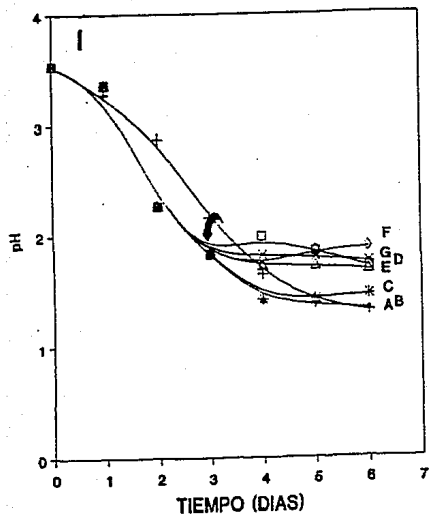
Los perfiles de producción específica de carotenoides resultantes de las diferentes adiciones al día tres de la fermentación (Gráf. 24) mostraron el efecto negativo de la alta concentración (5%) de glucosa sobre la síntesis de carotenoides después de la adición, en comparación con la condición no supresora observada cuando se utilizó glucosa en una concentración baja (1%) sin adición posterior.

En las mismas cinéticas de producción se observó que las producciones resultantes a la adición de glucosa y de su análogo siguieron un comportamiento semejante en los días siguientes a la adición, lo cual indica que el efector es glucosa per se y no un producto de su metabolismo, ya que el 2-DOG no es metabolizable. Además es de notarse que la supresión total de la síntesis de carotenoides duró solo dos días restableciéndose ligeramente a partir del día 5 en el caso de adición de glucosa y fue permanente en el caso del DOG donde el efecto supresivo fue más intenso. El hecho de que la síntesis de carotenoides se inicie nuevamente sugirió que el efector se consume generando nuevamente una condición de no supresión, lo cual se confirma con la disminución en el pH (Gráf. 25 Ic), un aumento en el consumo de glucosa (Gráf. 25 IIc), y el aumento en la biomasa (Gráf. 26). El efecto supresivo de glucosa disminuye por debajo de los 38 mg de glucosa por ml.

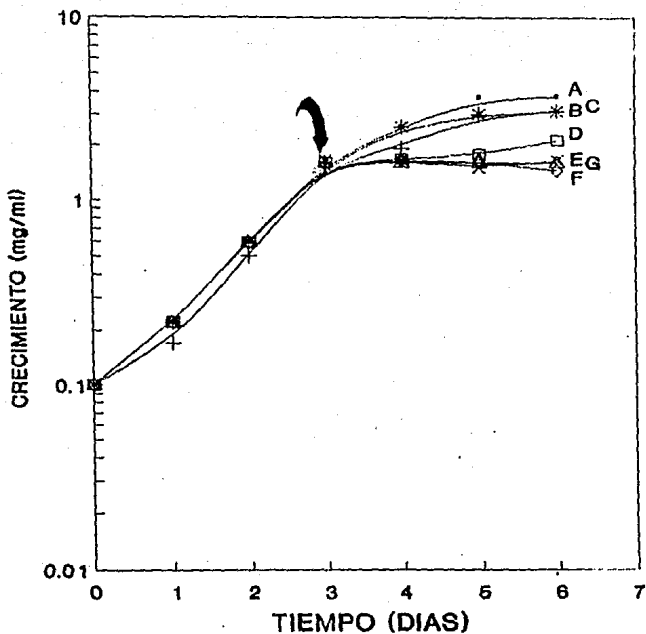
Ahora bien, la cicloheximida inhibió completamente la síntesis de proteínas de novo y esto incluyó la síntesis de enzimas carotenogénicas ya que no se observó aumento en la producción específica y volumétrica (Gráf. 24 y 27 respectivamente) de los carotenoides, del crecimiento (Gráf. 26), y del metabolismo de



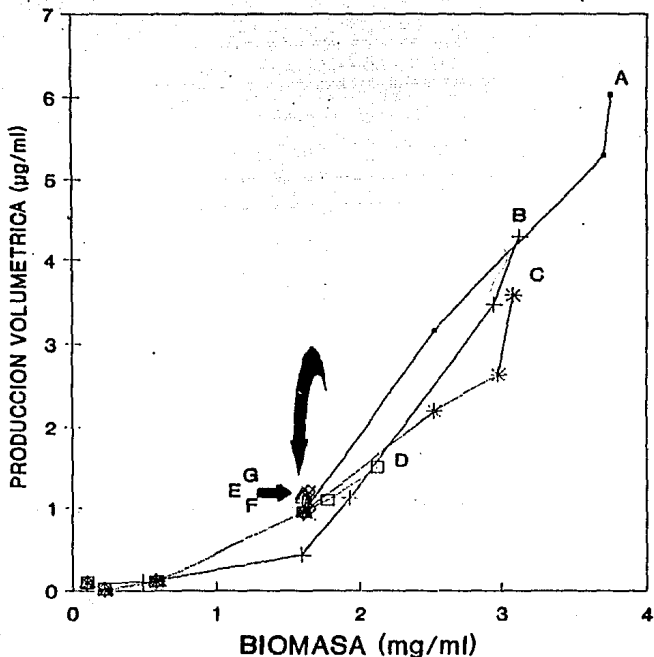
Gráf.24. Efecto de la adición de glucosa sobre la producción específica de carotenoides por *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292). A, glucosa (g) 1% (Control sin adición); B, glucosa (g) al 5% (control supresivo). Adiciones: C, g 5%; D, 2-deoxiglucosa (DOG) 5%; E, cicloheximida (CHM) 100µg/ml + DOG 5%; F, CHM + g 5% y G, CHM (control positivo de represión). La flecha (↙) indica el tiempo de la adición.



Gráf.25. Efecto de la adición de glucosa sobre el: I) pH y II) consumo de glucosa por *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292). A, glucosa (g) 1% (control sin adición) ; B, g 5% (control supresivo) . Adiciones: C, g 5%; D, 2-deoxi-glucosa (DOG) 5% ; E, cicloheximida (CHM) 100ug/ml + DOG 5%; F, CHM + g 5% y G, CHM (control positivo de represión). La flecha (↴) indica el tiempo de la adición.



Gráf.26. Efecto de la adición de glucosa sobre el crecimiento de *Dacrymyces deliquescens* (ATCC-13292). A, glucosa (g) 1% (control sin adición); B, g 5% (control de supresión). Adiciones: C, g 5%; D, 2-deoxiglucosa (DOG) 5%; E, cicloheximida (CHM) (100 µg/ml) + DOG 5%; F, CHM + g 5%; y G, CHM (control positivo de represión). La flecha (↓) indica el tiempo de la adición.



Gráf.27. Biomasa vs producción volumétrica de carotenoides. El efecto de la adición de glucosa sobre la síntesis de carotenoides en *Dactyomyces deliquescens* (ATCC- 13292). A, glucosa (g) 1% (control sin adición); B, g 5% (control de supresión). Adiciones: C, g 5%; D, 2-deoxiglucosa (DOG) 5%; E, cicloheximida (CHM) 100 µg/ml + DOG 5%; F, CHM+g 5% y G, CHM (control positivo de represión). La flecha (↷) indica el tiempo de la adición.

glucosa (Gráf. 25 II). En consecuencia, se limitó la producción de ácidos orgánicos por lo que se conservó el pH al nivel en que se encontraba en el momento de la adición (Gráf. 25 I).

Por su parte los perfiles obtenidos, de todos los parámetros medidos, para las condiciones en las que se adicionó la cicloheximida mezclada con la glucosa o con su análogo, fueron semejantes a los resultantes con la adición de cicloheximida sola (control represor), lo que indicó que no existe efecto de inhibición por glucosa per se o un producto del metabolismo de la glucosa, puesto que ni la glucosa, ni el 2-DOG tuvieron efecto sobre la actividad de las enzimas carotenogénicas presentes.

El análisis estadístico de la producción específica al sexto día de la fermentación (anexo, p.90), indicó la existencia de diferencias significativas en este parámetro entre el control, con baja concentración de glucosa y todas las otras condiciones en las que se muestra cierta semejanza entre sí. En este análisis se formaron 4 grupos entre los que no existen diferencias y que fueron: i) glucosa en concentración no supresiva, ii) glucosa en concentración supresiva, iii) adición de glucosa y DOG, y iv) el grupo de cicloheximida sola, con glucosa y con DOG. Esto confirmó lo mencionado arriba.

En cuanto al crecimiento, se formaron dos grupos entre los que se observaron diferencias significativas en biomasa (anexo, p.90); tales grupos fueron: i) control no supresivo (glucosa 1%), el control supresivo (glucosa 5%) y la condición supresiva de adición de glucosa (5%) al día tres de la fermentación, y ii) condición supresiva de adición de DOG al 5%, control de represión por la adición de cicloheximida y sus variantes con glucosa y DOG en concentración supresiva de la carotenogénesis. Finalmente en cuanto a la producción volumétrica se refiere, se formaron 3 grupos i) aquél formado por la condición de concentración de glucosa no supresiva, ii) el formado por el control de la condición supresiva y aquella supresiva por la adición de glucosa, y iii) formada por las condiciones de represión con cicloheximida y supresiva por la adición de DOG. Cabe resaltar que el análisis estadístico se realizó para el día 6 de la fermentación, es decir después de que para el control de glucosa al 5%, de adición de glucosa y de adición del análogo se había reasumido en alguna medida la síntesis de proteínas.

Debido a que el comportamiento que guardaron los diferentes perfiles que resultaron de la adición de glucosa, 2-DOG y cicloheximida fue semejante (ver análisis estadístico), el efecto de supresión de la glucosa per se sobre la carotenogénesis puede ser explicado en términos de un efecto de represión por carbono, evidenciándose la necesidad de síntesis de novo para la producción de carotenoides, mismo efecto que ha sido observado para la síntesis de β -caroteno en B. trispora por Dandekar and Modi (1980).

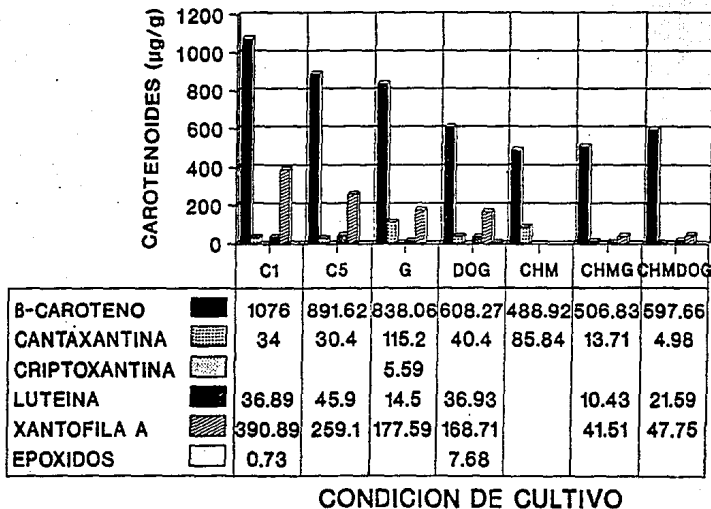
Finalmente el hecho de que el efecto observado fue evidente por un tiempo, restableciéndose posteriormente la síntesis de carotenoides (Gráf. 27) indica una represión transitoria. Este tipo de represión ha sido reportado para otros metabolitos secundarios, como lo es la síntesis de eritromicina por Escalante, et al. (1982) y de β -galactosidasa por Tyler, et al. (1967).

Por otra parte, los efectos que sobre los diferentes parámetros causaron la adición de glucosa, DOG y cicloheximida fueron también observados para adiciones al día 0 y 2 de la fermentación (datos no mostrados).

6.6.2 NIVEL DE ACCION.

Para determinar a que nivel o niveles de la vía de biosíntesis de los carotenoides tiene su efecto la glucosa, se realizaron análisis por cromatografía de HPLC y TLC. Las cromatografías (Gráf. 28 y foto 3) mostraron que la cantidad de carotenoides totales producidos disminuyó bajo concentraciones represivas de glucosa, y sin embargo la composición y proporción de los diferentes carotenos y xantofilas fue semejante al control de no represión. En base a esto, podemos afirmar que la represión de glucosa se ejerció en los primeros pasos de la vía de síntesis de carotenoides. Estos resultados fueron reproducibles para las condiciones de represión ejercidas a los tiempos 0, 2 y 3 días de la fermentación. Sin embargo, el efecto por cicloheximida fue más intenso cuando se adiciona al día 0 y en consecuencia no se pudo detectar la presencia de xantofilas por TLC, mientras que sí se detectaron xantofilas para las adiciones en los días 2 y 3. Las diferencias observadas entre la cantidad de pigmentos registrados en condiciones de represión por glucosa y/o DOG con respecto a cicloheximida se pueden explicar como resultado de transición del efecto regulatorio, ya que las muestras corresponden al día 6 de la fermentación, tiempo en el que la síntesis de carotenoides se había reasumido en alguna medida en aquellas condiciones que no incluían a la cicloheximida.

Similarmente, Dandekar and Modi (1980) reportan para la síntesis de β -caroteno que la enzima mevalonato kinasa, en Blakeslea trispora, está sujeta a represión catabólica aunque es derreprimida a través de la acción del ácido trispórico. De tal suerte que se podría suponer también que en D. deliquescens la acción regulatoria de glucosa se podría ejercer a través de reprimir la síntesis de la mevalonato kinasa.



Gráf.28. Análisis por HPLC del efecto de la adición de glucosa, al día 3 de la fermentación, sobre la producción específica de carotenoides por *Dacrymyces deliquescens*. (ATCC-13292). C1, (Control no supresivo) glucosa 1% ; C2, (control supresivo) glucosa 5%. Adiciones: G, glucosa 5%; DOG, 2-deoxiglucosa 5% ; CHM, cichoheximida (control positivo de represión) 100 µg/ml; CHMG, CHM + G 5% y CHMDOG, CHM + DOG 5% .

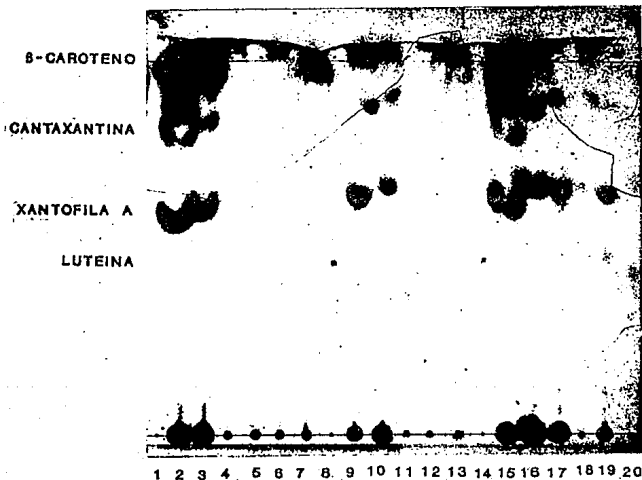


Foto.3. Cromatografía TLC del efecto de la adición de glucosa sobre el perfil de carotenoides en *Dacrymyces deliquescens*. Los carriles 1, 8, 14 y 20 contienen una mezcla estándar de carotenoides; el carril 2, glucosa 1% (control no supresivo); el carril 3, glucosa 5% (control supresivo). Adiciones: los carriles 8 y 16 glucosa (G) 5%; 4, 10 y 16, 2-deoxiglucosa (DOG) 5%; 5, 11 y 17 cicloheximida (CHM) 100 µg/ml; 8, 12 y 18 CHM-G 5% y 7, 13 y 19 CHM-DOG 5%. Los carriles 2 al 7 corresponden a las adiciones al día 0; del 9 al 13 a las del día 2; y del 16 al 19 a las del día 3 de la fermentación.

7 CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES FISIOLÓGICAS

* D-xilosa fue la mejor fuente carotenogénica en concentraciones del 5%, quizá por ser generador de poder reductor.

* D-glucosa en una concentración del 1% permitió los más altos rendimientos de carotenoides, seguida por celobiosa y xilosa.

* La glucosa en concentraciones de 5% o mayores ejerció un efecto negativo regulatorio sobre la producción de carotenoides que se explicó como represión de la síntesis.

* El análogo de glucosa, 2-deoxiglucosa (DOG) no fue metabolizado por *D. deliquescens* y presentó el mismo efecto de represión sobre la carotenogénesis que glucosa. Este resultado apoya la hipótesis de que el efector es la glucosa per se y no un producto de su metabolismo, explicando su acción como un fenómeno de represión transitoria.

* Para la carotenogénesis se requiere de síntesis de novo.

* La lenta liberación de glucosa como resultado de la hidrólisis de celobiosa, almidón, maltosa y sacarosa en concentraciones de 5%, no permitieron observar el efecto represivo de la glucosa sobre la carotenogénesis, manifestandose en cambio, un efecto positivo de la concentración de estos azúcares sobre la síntesis de carotenoides.

* El perfil de carotenoides producido por *D. deliquescens* es muy semejante desde el punto de vista cualitativo, sin embargo la cantidad de cada carotenoide dependen de la fuente de carbono y de la concentración de la misma. Dentro del perfil predomina β -caroteno seguido de una xantofila con Rt de 6.98 min. (pico "A") denominada xantofila "A".

* El efecto de represión por glucosa altera solo cuantitativamente la producción de carotenoides, respetando la proporción entre los componentes, lo cual indica que el efector actúa sobre los primeros pasos de la biosíntesis de carotenoides.

CONCLUSIONES TECNICAS.

* La cepa ATCC-13292 de Dacrymyces deliquescens presentó los mejores rendimientos de producción específica de carotenoides, comparada con las otras dos cepas probadas.

* El tamaño del inóculo tuvo un efecto directo sobre la productividad de carotenoides.

* No se observa diferencia entre las cinéticas de crecimiento y producción de carotenoides por D. deliquescens en los medios MMdb, MMs y MM.

* El pH y las variaciones en el pH entre 1.7 y 7 no generaron ningún efecto sobre el crecimiento y la producción de carotenoides.

* El ácido 2,2-dimetil succínico diaminozido, análogo del ácido succínico, no fue metabolizado por este microorganismo y actuó como un amortiguador en el MMdb.

* El consumo de glucosa se vió afectado ligereamente por la presencia del ácido 2,2- dimetil succínico, sin embargo su efecto no alteró ni el crecimiento ni la producción de carotenoides.

* Los azúcares fueron las fuentes de carbono con mejores rendimientos en crecimiento y producción de carotenoides.

6 RECOMENDACIONES.

* Bajo condiciones de represión por glucosa se sugiere medir la actividad de la enzima mevalonato kinasa para comprobar si la glucosa ejerce su efecto sobre esta enzima.

* Verificar las actividades de los sistemas de transporte y de las enzimas que permitan el metabolismo de las fuentes de carbono utilizadas.

* Realizar un análisis de espectrometría de masa para definir que xantofila es el pico "A" con Rt de 6.98 min. y en su caso evaluar su interés industrial.

* Realizar HPLC a las 12 horas después de la adición de efectores, esto con el fin de observar el perfil y proporción de los carotenoides en el momento en el que se ejerce la represión y comparar con aquellas cromatografías obtenidas después de que se reasume la producción de carotenoides.

9 BIBLIOGRAFIA.

- American Type Culture Collection (1982). Catalogue of strain I. Rockville, Maryland. Bound Printed Matte R Bulk RT.
- Avalos, J.; Rau, W. and Schrott, E. (1987). Photoinduction of carotenoid biosynthesis in Gibberella fujikuroi. 8th. International Symposium on Carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. P26.
- Barua, B.A. and Olsow, J.A. (1987). Synthesis, metabolism and biological actions of vitamin and glucuronides. 8th. International Symposium on Carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. P27A.
- Bendich, A. (1987). Carotenoids and the Immune System. 8th. International Symposium on Carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. P46.
- Bernard, L. (1971). Tremellales. Flora neotropica. N.Y. 6:117-125.
- Bernard, L. (1980). Tremellales. Flora neotropica. N.Y. 6(suplemento):8-16.
- Bianchi, L.; Pizzala, R.; Bianchi, A. and Santamaria, L. (1987). Beta carotene and canthaxanthin prevent photomutagenesis induced by furocoumarins in Salmonella typhimurium. 8th. International Symposium on Carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. P49.
- Bramley, P.M. (1985). The *in vitro* biosynthesis of carotenoids. Advances in Lipid Research 21:243-279.
- Britton, G. (1985). General Carotenoids Methods. Methods in Enzymology 111:115-149.
- Britton, G. and Goodwin. (1971). Biosynthesis of carotenoids. Methods in Enzymology XVIII:654-701.
- Cerdá-Olmedo, E. (1985). Carotene mutants of Phycomyces. Meth. Enzymol. 110:220-243.
- Cerdá-Olmedo, E. (1989). Production of carotenoids with fungi. In: Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. Elsevier Applied Science. New York. pp 27-43.
- Chichester, C. O., Yokoyama, H., Nakayama, T.O., Lutkon, A., and Mackinney, G. (1959). Leucine metabolism and carotene biosynthesis. J. Biol. Chem. 234:598-602.
- Cutler, G.R. (1984). Carotenoids and retinol: their possible importance in determining longevity of primate species. Proc. Natl. Acad. Sci. 81:7627-7631.

Dandekar, S. and Modi, V.V. (1980). Involvement of cyclic AMP in carotenogenesis and cell differentiation in Blakeslea trispora. Biochim. Biophys. Acta 628:398-406.

Davies, B.H. (1973). Carotene biosynthesis in fungi. Pure Applied Chemistry 35: 1-28

Demain, A. (1985). Control of secondary metabolism in actinomycetes. Sixth Int. Symp. on Actinomycetes Biology. Szabó, G.; Biró, S.; Goodfellow, M. 215-225.

Dholakia, J.N. and Modi, V.V. (1982). Fermentative production of β -carotene and extracellular β -glucosidase by Blakeslea trispora grown on cellobiose. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15:33-35.

Dholakia, J.N. and Modi, V.V. (1984). Regulation of carotenogenesis by inorganic phosphate in Blakeslea trispora. J. Gen. Microbiol. 130:2043-2049.

Difco. (1966). Supplementary literature. Difco. USA. pp 373.

Erdman, J.W.; Christopher, L.P. and Dietz, M.J. (1988). Factors affecting the bioavailability of vitamin A, carotenoids, and vitamin E. Food Technology. 216-221.

Escalante, L. (1988). Efecto de la fuente de carbono sobre la biosíntesis de gentamicina en Micromonospora purpurea NRRL-2953. IIB-UNAM. 92pp.

Escalante, L.; López, H.; Mateos, G.; Lara, F. and Sánchez, S. (1982). Transient repression of erythromycin formation in Streptomyces erythraeus. J. of General Microbiology. 128:211-215.

Escalante, L.; Gonzalez, R.; Obregon, A. and Sanchez, S. (1992). Carbon catabolite regulation of gentamicin formation. J. Antibiotic 45(4):465-469.

Friend, J., Goodwin, T.W., and Griffiths, L.A. (1955). Studies in carotenogenesis. 15. The role of carboxylic acids in the biosynthesis of β -carotene by Phycomyces blakesleeanus. Biochem. J. 60:649-655.

Goodwin, T.W. and Willmer, J.S. (1952). Studies in carotenogenesis. 4. Nitrogen metabolism and carotene synthesis in Phycomyces blakesleeanus. Biochem. J. 51:213-217.

Goodwin, T.W. (1959). Biosynthesis and function of carotenoids pigments. Adv. Enzymology 21:295-336.

Goodwin, T.W. (1971). Biosynthesis. In: Carotenoids.(Ed.) Otto Isler Press. New York. pp.578-599.

- Gordon, H.T. (1977). The carotenoids-current status as food colorants. Ed. Furia, T.E. Current aspects of food colorants. 41-47.
- Govin, N.S., Mehta, B., Sharma, M., and Modi, V. (1981). Protease and carotenogenesis in Blakeslea trispora. Phytochemistry 20:2483-2485.
- Govin, N.S., Amin, A.R. and Modi, V.V. (1982). Stimulation of carotenogenesis in Blakeslea trispora by cupric ions. Phytochemistry 21:1043-1044.
- Haar, N.F. (1980). Astaxanthin formation by the yeast Phaffia rhodozyma on molasses. Biotechnology Letters 10(9):609-614.
- Hanson, A.M. (1977). Microbial Production of pigments and vitamins. In: Microbial Technology. Krieger. New York. pp 222-250.
- Hashimoto, T., Pollack, J.H., and Blusenthal, H.J. (1978). Carotenogenesis associated with arthrosporeulation of Trichophyton mentagrophytes. J. Bacteriology 136:1120-1126.
- Hodgson, D. (1982). Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in Streptomyces coelicolor A3(2) and perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. J. General Microbiology 128:2417-2430.
- Hsu, W.J., Allion, D.C., and Delbrück, M. (1974). Carotenogenesis in Phycomyces blakesleeanus. Phytochemistry 13: 1463-1468.
- Johnson, A.E. and Lewis, J.M. (1979). Astaxanthin formation by the yeast Phaffia rhodozyma. J. General Microbiology 115:173-183.
- Johnson, A.E.; Lewis, M.J. and Grau, C.R. (1980). Pigmentation of egg yolks with Astaxanthin from the Phaffia rhodozyma. Poultry Science 59:1777-1782.
- Johnson, A.E., Villa, G.T. and Lewis, J.M. (1980a). Phaffia rhodozyma as an astaxanthin source in salmonid diets. Aquaculture 20:123-134.
- Kornhauser, W. W., Lambert, L., Giles, A. (1987). In vivo protection by β -carotene against phototoxicity. 8th. International Symposium on Carotenoids, Boston Massachusetts, USA, Jul. 27-31. P44A.
- Kritsky, M.S., Sokolovsky, V.Y., Belozerskaya, T.A. and Chernysheva, E.K. (1982). Relationship between cAMP level and accumulation of carotenoid pigments in Neurospora crassa. Arch. Microbiol. 133:196-208.

Krtinsky, I.N. (1987). Overview of carotenoids in medicine. 8th. International Symposium on Carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. P42A.

Loewus, F.A. (1952). Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. Analytical chemistry 24(1):219.

Mihir, R., (1987). 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced neoplastic transformation and influence of β -carotene. 8th. International Symposium on Carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. P43.

Nelis, H.J. & De Leenheer, A.P. (1989). Microbial production of carotenoids other than β -carotene. In: Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. Elsevier Applied Science. New York. pp 43-80.

Nelis, H.J. & De Leenheer, A.P. (1991). Microbial sources of carotenoid pigments in food and feeds: A review. Journal of applied Bacteriology 70:181-191.

Newsome, L.R. (1986). Food colors. Food technology. 49-56.

Newsome, L.R. (1989). Natural and Synthetic Coloring Agents. International food regulation handbook. Middlekauff, R.; Shubik, P. New York. Ed. Marcel Dekker. 327-344.

Nonomura, M.A. (1987). Industrial biosynthesis of carotenoids. 8th. International Symposium on Carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. P52.

Okagbue, R.N. and Lewis, M.J. (1984). Use of alfalfa residual juice as a substrate for propagation of the red yeast Phaffia rhodozyma. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:33-39.

Okagbue, R.N. and Lewis, M.J. (1984a). Inhibition of the red yeast Phaffia rhodozyma. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:278-280.

Orange, W.M.F. and Montclair, B.T. (1961). Microbiological production of carotenoids. United States Patent Office. Patent Number 2,974,044.

Ortiz, J.M.A. y Garduño, O.R.A. (1985). El MR-2: Un aparato que facilita el manejo de cultivos de algas unicelulares. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 27: 293-299.

Rau, W. and Mizka-Schnabel, U. (1985). Carotenoids synthesis in Neurospora crassa. Meth. Enzymology 110:253-267.

Reid and Seifert, A.K. (1982). Effect an atmosphere of oxygen on growth, respiration and lignin degradation by whitherot fungi. Cand. J. Bot. 60(3):252-260.

Ruddat, M. and Garber, E.D. (1983) Biochemistry, physiology, and genetics of carotenogenesis in fungi. in Secondary metabolism and differentiation in fungi. Ed. Bennett, J.W. and Ciegler, A. Marcel Dekker, Inc. New York. 95-155.

Sánchez, S. y Farrés, A. (1987). Regulación de enzimas microbianas. Ed. López, H.C. y Quintero, R.R. UNAM. 37-46.

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. P44.

Schiedt, K.; Leuenberger, F.J.; Vecchi, M. and Glinz, E. (1985). Absorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken. Pure & Appl. Chem. 57 (5):685-692.

Schwartz, J., Sloene, D. and Shklar, G. (1987). Immune surveillance enhancement associated with carotenoid inhibition of oral cancer in Hamster buccal pouch model. 8th. International Symposium on Carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. P50.

Schwartz, R.; Rosas, R.; Farrés, A.; Paredes, L. y Sanchez, S. (1989). Producción microbiana de carotenoides y perspectivas de su utilización. Boletín de Educación Bioquímica 8: (En prensa).

Sidney, W. (1984). Carotenes and xanthophylls in dried plant materials and mixed feeds. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). pp 835-836.

Stich, H.F., Rosin, M.P., Hornby, A.P., Mathew, B., Sankaranarayanan, R. and Nair, K.M. (1987). Human intervention studies with carotenoids. 8th. International Symposium on Carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. P45.

Stern, W.P. (1988). Food, drug, and cosmetic colors. In Pigments Handbook Volume I. Properties and economics. Ed. Peter Lewis. New York. pp 925-945.

Taylor, F.R., (1987). Established and future markets for B-carotene. 8th. International Symposium on Carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. P54.

Thomas, D.M., Harris, R.G. and Kirk, J.T. (1967). Studies on carotenogenesis in Blakeslea Trispora. Phytochemistry 6:361-366.

Torrissen, J.O. (1986). Pigmentation of salmonids a comparison of astaxanthin and cantaxanthin as pigment sources for rainbow trout. Aquaculture 53:271-278.

Tyler, B. Loomis, W.F. and Magasanik, B. (1967). Transient repression of lac operon. J. Bacteriology 94:2001-2011.

Vencher and Kulikova (1968). Changes in polyene compounds at various stages of development of Rhodotorula gracilis. Mikrobiologiya 37: 558-560.

Vuori, A. t. , and Gyllenberg, H.E. (1974). Effect of regulation of nitrogen metabolism on the carotenoids synthesis in Rhodotorula sarniei. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infectiouskr. Hyg. Abt. 2(126):552-559.

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

10 ANEXO

1) Comparación entre las cepas de Dacrymyces deliquescens para la selección de una de ellas.

SIMBOLOGIA.

CEPAS: 1. ATCC-13292.
2. FSC-307.
3. BM.

PE1. PRODUCCION ESPECIFICA DE CAROTENOIDES ($\mu\text{g/g}$)

CREC1. CRECIMIENTO (mg/ml).

REP. CEPA	PE1	CREC1
1 1.	947.	3.15
2 1.	1005.	3.10
3 1.	857.	3.00
4 1.	453.	3.75
5 1.	421.	3.15
6 1.	551.	3.55

One-Way Analysis of Variance

Data: PE1

Level codes: CEPA

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	344444.33	2	172222.17	37.933	.0024
Within groups	13620.58	3	4540.17		
Total (corrected)	358064.93	5			

0 missing values; have been excluded.

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.452256 P = 0.982411
 Bartlett's test: 1.04169 P = 0.558472
 Hartley's test: 1.02515

Multiple range analysis for PEI by CRPA

Method: 95 Percent LSD Intervals

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
3	2	475.80000	*
2	2	480.00000	*
1	2	556.00000	*

One-Way Analysis of Variance

Data: CRCI

Level codes: CRPA

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	4.1658333	2	2.0829167	17.652	.0016
Within groups	.3415000	3	.1138333		
TOTAL - corrected	4.5073333	5			

0 missing values: have been excluded.

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.775680 P = 0.357509
 Bartlett's test: 3.97334 P = 0.238671
 Hartley's test: 225

Multiple range analysis for CRCI by CRPA

Method: 95 Percent LSD Intervals

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
3	2	3.3060000	*
2	2	3.3750000	*
1	2	5.1250000	*

2) Comparación entre diferentes medios mínimos.

SIMBOLOGIA

TX: TRATAMIENTO, MEDIO MINIMO: 1. MM.
 2. MMs.
 3. MMdb.
 4. MMs-sin glucosa.
 5. MMdb-sin glucosa.

PE. PRODUCCION ESPECIFICA DE CAROTENOIDES (µg/g).

C. CRECIMIENTO (mg/ml).

Edw TI	PE	C
1 1.	1471.	5.30
2 1.	1456.	4.50
3 1.	1437.	5.75
4 1.	1460.	4.30
5 1.	1445.	5.75
6 1.	1435.	5.00
1 4.	1416.	5.61
2 4.	1441.	5.50
3 4.	1401.	5.00
4 4.	1411.	5.15

One-Way Analysis of Variance

Data: PE

Level codes: TI

Labels:

Range test: ISC

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	3657724.6	4	914431.15	46.426	.0001
Within groups	101411.0	5	20282.20		
Total (corrected)	4059135.6	9			

Missing values have been excluded.

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.344854 P = 5.80176E-3

Bartlett's test: 11.8639 P = 0.0520504

Hartley's test: 896.254

Multiple range analysis for PK by TI

Method: 95 Percent LSD Intervals

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
5	2	360.0000	*
4	2	534.0000	*
3	2	1605.5000	*
2	2	1770.5000	*
1	2	1716.5000	*

One-Way Analysis of Variance

Data: C

Level codes: TI

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. Level
Between groups	22.338500	4	5.5846250	16.854	.0141
Within groups	1.458750	8	.1823438		
Total corrected	23.797250	12			

0 missing values have been excluded.

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.72419 P = 0.158251

Bartlett's test: 6.39021 P = 0.157471

Harley's test: 951

Multiple range analysis for C by TI

Method: 91 Percent LSD Intervals

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
5	2	11250000	*
4	2	17600000	*
3	2	2.6750000	*
2	2	3.5500000	*
1	2	3.7500000	*

- 3) Comparación del efecto del pH (4.5 y 6.0) sobre la producción específica de carotenoides y el crecimiento.

SIMBOLOGIA

T: TRATAMIENTO, MEDIO Y pH : 1. MM pH 4.5.
 2. MM pH 6.0.
 3. MMdb pH 4.5.
 4. MMdb pH 6.0.

PE: PRODUCCION ESPECIFICA DE CAROTENOIDES ($\mu\text{g/g}$)

C: CRECIMIENTO (mg/ml).

Row T	PE	C
1 1.	1471.	3.30
2 2.	1536.	4.20
3 2.	1597.	3.40
4 2.	2087.	4.20
5 3.	2381.	2.75
6 3.	2507.	4.58
7 4.	2514.	2.80
8 4.	1651.	3.30

One-Way Analysis of Variance

Data: C

Level codes: T

Labels:

Range test: LSD Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	.6373375	3	.2124458	.503	.7245
Within groups	1.6354500	4	.4113625		
Total (corrected)	2.2727875	7			

; missing value(s) have been excluded.

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.523514 P = 0.668277
 Bartlett's test: 1.36488 F = 0.630662
 Hartley's test: 11.9556

Multiple range analysis for C by T

Method: 95 Percent LSD Intervals

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
4	2	3.1060550	*
3	2	3.4150000	*
1	2	3.7500000	*
2	2	3.8090000	*

One-Way Analysis of Variance

Data: PK

Level codes: T

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	174611.50	3	58203.833	.525	.5059
Within groups	292095.00	4	53023.250		
Total (corrected)	466706.50	7			

4 missing value(s) have been excluded.

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.476213 P = 0.788807

Bartlett's test: 1.98025 P = 0.587253

Bartley's test: 15.1235

Multiple range analysis for PK by T

Method: 95 Percent LSD Intervals

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
3	2	1444.0000	*
4	2	1582.5000	*
1	2	1710.5000	*
2	2	1842.0000	*

4) Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción específica y el crecimiento.

SIMBOLOGIA

 CC: CONCENTRACION DE GLUCOSA: 1. 1%
 2. 5%
 3. 10%

PE: PRODUCCION ESPECIFICA DE CAROTENOIDES (µg/g)

C: CRECIMIENTO (mg/ml).

RCM CC	PE	C
1 1.	1264.	1.33
1 2.	1151.	1.56
1 3.	1042.	1.65
4 1.	771.	1.33
4 2.	535.	1.23
4 3.	626.	1.23

One-Way Analysis of Variance

 Data: C

Level codes: CC

Labels:

Range test: LSD Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	.1005333	2	.0502667	.269	.7635
Within groups	.5625000	3	.1875000		
Total (corrected)	.6630333	5			

0 missing value(s) have been excluded.

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 2.5 P = 0.87856

Bartlett's test: 1 P = 1

Hartley's test: 1

Multiple range analysis for C by CC

Method: 95 Percent LSD Intervals

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
1	2	2.8750000	*
2	2	2.9750000	*
3	2	2.1500000	*

One-Way Analysis of Variance

Date: FE

Level codes: CC

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of Variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	951608.85	2	276484.17	20.018	.0164
Within groups	40391.50	3	13463.83		
Total corrected	992000.35	5			

Missing values have been excluded.

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.682688 P = 0.163947

Bartlett's test: 2.842399 P = 0.364333

Martley's test: 30.8128

Multiple range analysis for FE by CC

Method: 95 Percent LSD Intervals

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
1	1	568.0000	*
2	2	903.0000	*
3	2	1306.5000	*

5) Comparación del efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción específica de carotenoides.

SIMBOLOGIA

PEC: PRODUCCION ESPECIFICA DE CAROTENOIDES ($\mu\text{g/g}$)

FCTX: FUENTE DE CARBONO (TRATAMIENTO)

- | | |
|----------------------|----------------------|
| 1. GLUCOSA 1% | 2. GLUCOSA 5% |
| 3. FRUCTOSA 1% | 4. FRUCTOSA 5% |
| 5. SACAROSA 1% | 6. SACAROSA 5% |
| 7. MALTOSA 1% | 8. MALTOSA 5% |
| 9. CELOBIOSA 1% | 10. CELOBIOSA 5% |
| 11. ALMIDON 1% | 12. ALMIDON 5% |
| 13. ARABINOSA 1% | 14. ARABINOSA 5% |
| 15. XILOSA 1% | 16. XILOSA 5% |
| 17. AC. SUCCINICO 1% | 18. AC. SUCCINICO 5% |
| 19. AC. ACETICO 1% | 20. AC. ACETICO 5% |
| 21. AC. CITRICO 1% | 22. AC. CITRICO 5% |
| 23. GLICEROL 1% | 24. GLICEROL 5% |
| 25. AC. OLEICO 1% | 26. AC. OLEICO 5% |
| 27. AC. BUTIRICO 1% | 28. AC. BUTIRICO 5% |

Row	FCTX	PEC	Row	FCTX	PEC
1	1.	957.00	31	16.	1080.00
2	1.	933.00	32	16.	1209.00
3	2.	624.00	33	17.	32.00
4	2.	504.00	34	17.	
5	3.	282.00	35	18.	128.00
6	3.	209.00	36	18.	126.00
7	4.	361.00	37	19.	8.30
8	4.	488.00	38	19.	10.00
9	5.	349.00	39	20.	6.23
10	5.	405.00	40	20.	7.50
11	6.	837.00	41	21.	218.00
12	6.	660.00	42	21.	
13	7.	186.00	43	22.	103.00
14	7.	273.00	44	22.	163.00
15	8.	651.00	45	23.	36.00
16	8.	887.00	46	23.	
17	9.	773.00	47	24.	37.00
18	9.	659.00	48	24.	
19	10.	835.00	49	25.	0.00
20	10.	1130.00	50	25.	0.00
21	11.	269.00	51	26.	0.00
22	11.	335.00	52	26.	0.00
23	12.	736.00	53	27.	0.00
24	12.	804.00	54	27.	0.00
25	13.	288.00	55	28.	0.00
26	13.	264.00	56	28.	0.00
27	14.	314.00			
28	14.	387.00			
29	15.	540.00			
30	15.	663.00			

One-Way Analysis of Variance

Data: PBC

Level codes: ICTX

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	6298975.0	27	233295.37	41.598	.0000
Within groups	134600.2	24	5608.34		
Total (corrected)	6433575.2	51			

4 missing value(s) have been excluded.

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.280924 P = 0.136564

Bartlett's test: 4.39093 P = 0.121967

Hartley's test: 48400

Multiple range analysis for PFC by PCTX

Method: 95 Percent LSD Intervals			
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
25	2	.0000	*
26	2	.0000	*
27	2	.0000	*
28	2	.0000	*
29	2	6.8750	*
19	2	9.1500	*
17	1	32.0000	**
23	1	36.0000	**
24	1	37.0000	**
18	2	127.0000	***
22	2	135.0000	***
7	2	216.5000	****
21	1	218.0000	*****
1	2	245.5000	*****
13	2	276.0000	*****
11	2	302.0000	*****
14	2	350.5000	*****
5	2	377.0000	*****
4	2	424.5000	**
2	2	564.0000	**
15	2	601.5000	**
9	2	716.0000	***
6	2	748.5000	**
8	2	769.0000	*
12	2	770.0000	*
1	2	945.0000	*
10	2	992.5000	**
16	2	1144.5000	*

- 6) Efecto entre la adición de glucosa, 2-deoxiglucosa y cicloheximida sobre la producción específica de carotenoides, producción volumétrica de carotenoides y el crecimiento.

SIMBOLOGIA

 ADD. TRATAMIENTO DE ADICION:

1. SIN ADICION (CONTROL).
2. ADICION DE GLUCOSA 5% AL DIA 0.
3. ADICION DE GLUCOSA 5% AL DIA 3.
4. ADICION DE 2-DEOXIGLUCOSA 5% AL DIA 3.
5. ADICION DE CICLOHEXIMIDA.
6. ADICION DE CICLOHEXIMIDA Y GLUCOSA 5% AL DIA 3.
7. ADICION DE CICLOHEXIMIDA Y 2-DEOXIGLUCOSA AL DIA 3.

PE: PRODUCCION ESPECIFICA DE CAROTENOIDES ($\mu\text{g/g}$).

PV: PRODUCCION VOLUMETRICA DE CAROTENOIDES ($\mu\text{g/ml}$).

C: CRECIMIENTO (mg/ml).

Row ADD	PE	PV	C
1 1.	1525.	5.77	3.25
2 2.	1559.	6.30	3.55
3 3.	1342.	4.50	3.55
4 4.	1112.	3.67	3.30
5 5.	1197.	3.95	3.30
6 6.	1115.	3.25	2.85
7 7.	876.	1.90	2.25
8 8.	1045.	2.15	2.05
9 9.	630.	1.67	1.45
10 10.	486.	1.90	1.65
11 11.	621.	1.90	1.45
12 12.	524.	1.85	1.70
13 13.	645.	1.60	1.55
14 14.	701.	1.50	1.60

One-Way Analysis of Variance

Data: PE

Level codes: ADD

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	1675247.6	6	279207.93	17.557	.0007
Within groups	126983.5	7	18140.5		
Total (corrected)	2001323.5	13			

0 missing value(s) have been excluded.

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.591734 P = 0.2433
 Bartlett's test: 2.00465 P = 0.740532
 Hartley's test: 45.9321

Multiple range analysis for PE by ADD

Method: 95 Percent LSD Intervals

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
6	2	543.0000	*
5	2	572.5000	**
7	2	672.5000	**
4	2	862.5000	**
3	2	1151.0000	**
2	2	1227.0000	*
1	2	1604.0000	*

One-Way Analysis of Variance

Data: C

Level codes: ADD

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	10.046285	6	1.6743810	21.711	.0002
Within groups	.540022	7	.0771429		
Total (corrected)	10.586296	13			

0 missing value(s) have been excluded.

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.453704 P = 0.46929
 Bartlett's test: 2.08185 P = 0.713947
 Hartley's test: 195

Multiple range analysis for C by ADD

Method: 95 Percent LSD Intervals

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
6	2	1.5750000	*
7	2	1.5750000	*
5	2	1.8500000	*
4	2	2.1500000	*
3	2	3.0750000	*
2	2	3.4750000	*
1	2	3.6000000	*

One-Way Analysis of Variance

Date: PV

Level codes: ADD

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 99

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	49.387871	6	8.2313118	26.438	.0001
Within groups	1.493871	7	.2134101		
Total corrected	49.881742	13			

1 missing value(s) have been excluded.

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C test: 0.919269 P = 0.919119

Bartlett's test: 16.1079 F = 0.0059851

Martens's test: 15029

Multiple range analysis for PV by ADD

Method: 99 Percent LSD Intervals

Level Count Average Homogeneous Groups

9	1	1.850000	*
8	2	1.895000	*
7	2	1.960000	*
4	2	1.835000	*
3	1	3.580000	*
2	1	4.285000	*
1	1	6.015000	*