

00562



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA ⁹
DE MEXICO _{2e/11}

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
FACULTAD DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

EFFECTO DE LA AGITACION Y AEREACION EN LA
PRODUCCION MICROBIANA DE ZEAXANTINA CON
FLAVOBACTERIUM SP. 21588 A NIVEL DE
FERMENTADOR DE CUATRO LITROS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

MARTHA ALEJANDRA MASETTO MORALES



MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

265/144



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por la oportunidad que me brindo de trabajar con usted y su grupo de trabajo, por sus conocimientos, paciencia y acertados comentarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. Agustín Lopez-Munguia Canales, y al Dr. Alberto Tecante Coronel, por su tiempo, interés y valiosos comentarios académicos.

A la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte, a la Dra. Socorro Duran, a la Dra. Susana Saval Bohorquez y al Dr. Edmundo Brito de la Fuente por su revisión oportuna de esta tesis.

Al Ing. Abel Blancas Cabrera, por ser un gran compañero y amigo, además del tiempo, conocimientos y equipo facilitado para la realización de este trabajo.

Al Mtro. Luis Bernardo Flores Cotera, un amigo y guía académico, todos tus comentarios fueron acertados tanto en la escuela como en la vida.

A la Mtra. María de los Angeles Sánchez Contreras (amibita) y a la QFB. Ruth Edith Martín de la Fuente (Ruthe). De todos los momentos que he vivido y compartido con ustedes he aprendido siempre lo mejor, a ser cada vez mejor persona y estudiante.

A la QBP. Rosalba González todas las mananas me mostraste la dedicación en el trabajo, paciencia y sabiduría en la vida.

A mis compañeras de laboratorio Itzel, Ivetta, Bety y Lauris, gracias por compartir su tiempo y conocimientos conmigo. Magda muchas gracias por preocuparte por mi y por mi trabajo.

A mi familia:

Desde pequeña mis padres siempre me mostraron lo más importante en esta vida: cariño, amor, esperanza, confianza, respeto y el estudio. Sin este apoyo que me brindaron y valores inculcados no hubiera podido llegar hasta donde estoy, este trabajo contiene muchos de los valores que ustedes tienen y es tan solo un reflejo de lo que ustedes son.

Luis, Paty y Anilu gracias por esos fines de semana que me enseñaron dos cosas muy importantes en la vida de una persona el trabajo y la familia.

Pedro y Gaby gracias por compartir sus inquietudes y deseos en la vida.

Karla eres una gran amiga, gracias por darme esas palabras de aliento cuando más las necesite.

A mi esposo Oscar gracias por todos los momentos en los que escuche tu eco y vi tu vida en mi vida. Me enseñaste que para construir cualquier cimiento en la vida es necesario el amor, la paciencia y el esfuerzo de los dos.

El trabajo experimental y la realizacion de esta tesis se hizo bajo la supervision del Dr. Sergio Sanchez Esquivel.

Este trabajo se realizo en el laboratorio de Microbiologia Industrial en el Departamento de Biotecnologia, del Instituto de Investigaciones Biomedicas, de la UNAM.

INDICE:

	página(s)
1.- Resumen	4
2.- Introducción	5
3.- Antecedentes de la zeaxantina	8
4.- Características del fermentador	10
4.1.- Efecto del oxígeno en los procesos fermentativos	12
4.2.- Efectos de la aereación y agitación en los procesos fermentativos	13
5- Características de <i>Flavobacterium</i> sp	15
5.1.- Ruta biosintética de la zeaxantina en <i>Erwinia herbicola</i>	16
6.- Objetivos	17
6.1.- General	17
6.2.- Particulares	17
7.- Estrategia experimental	18
8.- Materiales y métodos	19
8.1.- Microorganismo	19
8.2.- Medios de cultivo	19
8.3.- Reactivos	19
8.4.- Condiciones de la fermentación	19
8.5.- Cuantificación de oxígeno disuelto	20
8.6.- <i>Diseño experimental</i>	20
8.7.- Cuantificación de crecimiento	21
8.8.- Método de extracción y cuantificación de pigmentos	22
8.9.- Cromatografía en capa fina (TLC)	23
8.10.- Cuantificación de zeaxantina por densitometría (CAMAG)	23
8.11.- Cuantificación de glucosa residual (GOD-PAD)	23
8.12.- Determinación de pH	24
9.- Resultados y discusión	25
9.1.- Estudio del efecto de la aereación a nivel de matraz	25
9.2.- Efecto de la concentración de licor de maíz en el proceso de formación de la zeaxantina	30
9.3.- <i>Diseño factorial completo 2³</i>	35
9.3.1. Primeros cuatro experimentos	35
9.3.2. Experimentos restantes (segunda parte)	45
9.4.- <i>Análisis de compuestos adicionales obtenidos en el proceso de producción de zeaxantina</i>	54
9.5.- <i>Análisis de factores principales e interacciones</i>	56
10.- Conclusiones	60
11.- Referencias	61

TABLAS Y FIGURAS:

	página(s)
1.- Tabla 1. Fuentes de carotenoides usados como aditivos y alimentos	7
2.- Figura 1. Esquema de una jarra de fermentacion	10
3.- Tabla 2. Intermediarios, enzimas y genes responsables de la ruta de biosíntesis de <i>Erwinia herbicola</i>	16
4.- Tabla 3. Factores y niveles probados	20
5.- Tabla 4. Matriz experimental	20
6.- Tabla 5. Resultados y efectos principales de los ocho experimentos	21
7.- Figura 2. Cinética de crecimiento de <i>Flavobacterium</i> sp. 21588 para las diferentes fracciones de llenado	25
8.- Figura 3. Cinética de producción volumétrica de carotenoides por <i>Flavobacterium</i> sp. 21588 para las diferentes fracciones de llenado	26
9.- Figura 4. Cinética de producción volumétrica de zeaxantina por <i>Flavobacterium</i> sp. 21588 para las diferentes fracciones de llenado	28
10.- Figura 6. Cinética de crecimiento de <i>Flavobacterium</i> sp. 21588 en medio STYE y medio STYE con la concentración de licor de maíz aumentada	30
11.- Figura 7. Cinética de producción volumétrica de carotenoides por <i>Flavobacterium</i> sp. 21588 en medio STYE y medio STYE con la concentración de licor de maíz aumentada	31
12.- Figura 8. Cinética de producción volumétrica de zeaxantina por <i>Flavobacterium</i> sp. 21588 en medio STYE y medio STYE con la concentración de licor de maíz aumentada	32
13.- Figura 10. Cinética de crecimiento en los primeros cuatro experimentos de la matriz experimental con <i>Flavobacterium</i> sp. 21588	36
14.- Figura 11. Cinética de producción de carotenoides en los primeros cuatro experimentos de la matriz experimental con <i>Flavobacterium</i> sp. 21588	37
15.- Figura 12. Cinética de producción volumétrica de zeaxantina en los primeros cuatro experimentos de la matriz experimental con <i>Flavobacterium</i> sp. 21588	38
16.- Figura 13. Evolución del oxígeno disuelto en el medio de cultivo en los primeros cuatro experimentos de la matriz experimental	39
17.- Figura 14. Cinética de crecimiento de los cuatro experimentos restantes de la matriz experimental con <i>Flavobacterium</i> sp. 21588	46
18.- Figura 15. Cinética de producción volumétrica de carotenoides en los cuatro experimentos restantes de la matriz experimental con <i>Flavobacterium</i> sp. 21588	47
19.- Figura 16. Cinética de producción volumétrica de zeaxantina en los cuatro experimentos restantes de la matriz experimental con <i>Flavobacterium</i> sp. 21588	48
20.- Figura 17. Evolución del oxígeno disuelto en el medio en los cuatro experimentos restantes de la matriz experimental	49

21.- Figura 26. Zeaxantina y otros carotenoides medidos en porcentajes de los ocho experimentos realizados a las 72 horas	55
22.- Figura 27. Comparación de efectos principales sobre el crecimiento y producción volumétrica de carotenoides y zeaxantina	56
23.- Figura 28. Interacciones de los factores sobre las respuestas de crecimiento y producción volumétrica de carotenoides y zeaxantina	57
24.- Figura 29. Efectos de aumentar la concentración de licor de maíz de 1.6 a 4.6% sobre la producción de carotenoides y de zeaxantina, a baja y alta agitación (la aereación fue alta en todos los casos)	58
25.- Figura 30. Efectos de aumentar la concentración de licor de maíz de 1.6 a 4.6% sobre el crecimiento, a baja y alta agitación (la aereación fue alta en todos los casos)	59

CROMATOGRAFIAS:

	página(s)
1.- Figura 5. Análisis cromatográfico de los pigmentos producidos por <i>Flavobacterium</i> sp. en diferentes fracciones de llenado	29
2.- Figura 9. Análisis cromatográfico de los pigmentos producidos por <i>Flavobacterium</i> sp. a diferentes tiempos de fermentación en medio STYE y medio STYE modificado	34
3.- Figura 14. Análisis cromatográfico 3 del experimento 1 del diseño factorial. Fermentación con 200 rpm, 1 vvm y 1.6% licor de maíz	41
4.- Figura 15. Análisis cromatográfico 4 del experimento 2 del diseño factorial. Fermentación con 600 rpm, 1vvm y 1.6% licor de maíz	42
5.- Figura 16. Análisis cromatográfico 5 del experimento 3 del diseño factorial. Fermentación con 200 rpm, 2 vvm y 1.6% licor de maíz	43
6.- Figura 17. Análisis cromatográfico 6 del experimento 4 del diseño factorial. Fermentación con 600 rpm, 2 vvm y 1.6% licor de maíz	44
7.- Figura 22. Análisis cromatográfico 7 del experimento 5 del diseño factorial. Fermentación con 200 rpm, 1 vvm y 4.6% licor de maíz	50
8.- Figura 23. Análisis cromatográfico 8 del experimento 6 del diseño factorial. Fermentación con 600 rpm, 1 vvm y 4.6% licor de maíz	51
9.- Figura 24. Análisis cromatográfico 9 del experimento 7 del diseño factorial. Fermentación con 200 rpm, 2 vvm y 4.6% licor de maíz	52
10.- Figura 25. Análisis cromatográfico 10 del experimento 8 del diseño factorial. Fermentación con 600 rpm, 2 vvm y 4.6% licor de maíz	53

1. RESUMEN

En los últimos 20 años el interés de los consumidores a cambiado, se ha despertado el interés por adquirir productos naturales en vez de procesados y es por ello que en la rama de los colorantes sintéticos la Food and Drug Administration (FDA) a prohibido el uso de los sintéticos debido a que se ha encontrado que dañan severamente la salud del ser humano y de los animales. Una alternativa es producir estos colorantes por vía microbiológica a nivel industrial teniendo como ventajas los bajos costos y su optimización de producción.

En este trabajo se estudió el efecto que tiene el oxígeno en el medio de cultivo en la producción de zeaxantina con *Flavobacterium* sp. 21588, esto se llevo a cabo en matraces de 250ml variando la fracción de llenado, llegando a la conclusión que la fracción más adecuada para la producción de zeaxantina fue la del 10%. Así mismo, se estudió el efecto de la concentración de licor de maíz a nivel de matraz utilizando una fracción de llenado del 10%, de este experimento se concluye que una concentración de 4.6% de licor de maíz estimulo la producción de zeaxantina y otros carotenoides como β -Caroteno y otros compuestos.

Usando una jarra de fermentación de 4 litros y aplicando un diseño factorial completo 2^3 , en este trabajo se estudió el efecto de la agitación, aereación y concentración del licor de maíz sobre la producción de zeaxantina por *Flavobacterium* sp. 21588. Se realizaron ocho experimentos y se encontró que a las 72 h el microorganismo entró en fase estacionaria y las mejores condiciones de producción volumétrica de carotenoides y zeaxantina se relacionaron a esta hora, a partir de estos datos se hizo un análisis del diseño factorial utilizando el Algoritmo de Yates. Los factores agitación, aereación y concentración de licor de maíz se analizaron de manera independiente, así como también se analizaron las interacciones entre estos tres factores.

La agitación, aereación y la concentración de licor de maíz tuvieron un efecto positivo sobre el crecimiento, la producción de carotenoides y zeaxantina. Los valores mas altos de estas tres respuestas se obtuvieron cuando se usaron conjuntamente los niveles altos de los tres factores estudiados. La agitación y la concentración de licor de maíz tuvieron los efectos más importantes, pero la interacción entre estos dos factores (AG-LM) fue también muy relevante. La aereación y la interacción (AE-LM) fueron de menor importancia, pero sin embargo significativos.

2. INTRODUCCIÓN

Los carotenoides tienen una amplia historia en la familia de los pigmentos. Se han realizado varias investigaciones acerca de la química, bioquímica, propiedades farmacológicas y toxicológicas de algunos de ellos (Johnson y Schroeder, 1995). Los carotenoides son compuestos coloridos y se encuentran de manera abundante en las plantas como pigmentos. Se han identificado entre 500 y 600 carotenoides específicos. Sin embargo sólo un pequeño número de carotenoides se encuentran en cantidades apreciables en sangre y tejidos humanos. Los principales son β -Caroteno, α -Caroteno, luteína, zeaxantina, criptoxantina y licopeno (Davis, 1987).

Los carotenoides se definen como compuestos alifáticos, están compuestos por grupos isopreno de 5 carbonos, contienen también estructuras aromáticas, tienen dos grupos metilo cerca del centro de la molécula en posiciones 1 y 6 y otros dos laterales en posiciones 1 y 5 y también tienen una serie conjugada de dobles enlaces que constituyen el sistema cromóforo (Bauernfeind, 1981). Esta cadena determina no sólo las propiedades de absorción de luz, si no también el aumento de color así como las propiedades fotoquímicas y de fotoprotección de la molécula (Britton, 1995).

Los carotenoides inicialmente fueron sintetizados por bacterias anoxigénicas fototróficas y por procariotes oxigénicas fotosintéticas (cianobacterias). En eucariotes, la capacidad de sintetizar carotenoides fue adquirida por simbiosis con bacterias o con cloroplastos de eucariotas. En plantas terrestres, en algas rojas y verdes, la simbiosis estable fue establecida con las cianobacterias o relacionada con proclorofitas. El origen de los carotenoides en algas no rojas y verdes así como en los hongos parece polifilética y aparece en diferentes grupos taxonómicos (Johnson y Schroeder, 1995).

Los carotenoides tienen diversas funciones biológicas y a pesar de sus semejanzas en estructura juegan diferentes papeles. Algunos carotenoides son precursores de la vitamina A. En este sentido el β -Caroteno es el de mayor potencialidad de proactividad de vitamina A. Otros carotenoides provitaminicos son α -Caroteno y la criptoxantina (Davis, 1987).

Dentro de las funciones de los carotenoides encontramos: que están presentes en sistemas fotosintéticos, tienen un papel de fotorespuesta y fotoprotectivo, tienen un efecto funcional en el ciclo del oxígeno como atrapador del oxígeno singulete, son precursores de la vitamina A y conversión de otros compuestos metabólicos, participan en la regulación de ciertas sustancias en el crecimiento de plantas, e involucran productos de oxidación que funcionan como reguladores de reproducción de hongos (Klaur y Bauernfeind, 1981).

Una de las principales funciones de los carotenoides en los organismos fotosintéticos es la de protegerlos contra las fotooxidaciones. Los carotenoides tienen la especificidad y la habilidad catalítica de capturar el oxígeno singulete (O_2) generado del metabolismo o por las reacciones de triple estado de las porfirinas con el oxígeno. En organismos no fotosintéticos, el papel universal de los carotenoides es el de secuestrar las especies tóxicas del oxígeno del metabolismo o del ambiente, en especial O_2 (Johnson y Schroeder, 1995).

Estudios recientes han sugerido que los carotenoides tienen beneficios en cuestión de salud en humanos y animales previniendo o disminuyendo enfermedades crónicas incluyendo el cáncer, arterioesclerosis, cataratas y otras disfunciones (Johnson y Schroeder, 1995). Los carotenoides refuerzan la respuesta inmune. Estudios en humanos han demostrado que protegen la piel contra las radiaciones UV. La luteína y la zeaxantina son los únicos carotenoides presentes en la región macular de la retina y están asociados a la función normal de la mácula, la cual es responsable de los detalles de la vista. También se cree que sirven como filtros para la luz azul de la mácula y funcionan como atrapadores del oxígeno singlete en los tejidos de la retina (Davis, 1987).

Los carotenoides son importantes a nivel industrial, porque muchos animales mejoran su apariencia con la presencia de estos. Los carotenoides se requieren como complemento alimenticio en la industria avícola y en la acuícola en peces y crustáceos ya que proporcionan una pigmentación brillante a estos y a sus productos; así como también se les utiliza en la coloración de alimentos procesados (Johnson y Schroeder, 1995). Los carotenoides aprobados por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América (FDA) para su uso en alimentos son: β -Caroteno, β -apo-8'-carotenal y cantaxantina (Schwartz, *et al*, 1989).

Tabla 1. Fuentes de carotenoides usados como aditivos y alimentos

Extractos naturales	
Compuesto	Carotenoides
Annatto (<i>Bixa orellana</i>)	Bixina, norbixina
Aceite de zanahoria (<i>Dacus carota</i>)	α -Caroteno, β -Caroteno
Cáscaras de naranja	Esteres de luteína
Aceite de palma	Carotenos, luteína
Paprika (<i>Capsicum annum</i>)	Capsantina, β -Caroteno, criptoxantina, capsorubina
Tomate extractos	Licopeno, β -Caroteno
(<i>Lycopersicon esculentum</i>)	
Azafran (<i>Crocus sativus</i>)	Crocina, β -Caroteno, zeaxantina
Grano de maíz (<i>Zea mays</i>)	Luteína, zeaxantina, criptoxantina, carotenos
Alfalfa	Luteína, zeaxantina, criptoxantina, violaxantina, neoxantina
Extracto de flor de cempasúchitl	Esteres de luteína, β -Caroteno
(<i>Tagetes erecta</i>)	
PRODUCTOS MICROBIANOS	
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina, HDGO, β -Caroteno
<i>Blakeslea trispora</i>	β -Caroteno
<i>Dunaliella salina</i>	β -Caroteno
<i>Haematococcus</i> sp.	Astaxantina
CAROTENOIDES SINTÉTICOS	
β -Caroteno	
β -Apo-8'-carotenal	
β -Apo-8'-esteres carotenoides	
Cantaxantina	
Citranaxantina	
Astaxantina	

(Johnson y Schroeder, 1995)

La zeaxantina se produce por plantas, varias algas, cianobacterias, *Mycobacterium*, *Xanthobacter*, *Erwinia* y *Flavobacterium*. *Flavobacterium* aparece como uno de los microorganismos más importantes en la producción de esta xantofila. *Flavobacterium* produce de 10-40 mg de 3R, 3'R zeaxantina por litro. A los medios de cultivo se le pueden adicionar precursores de isoprenoides y puede aumentar el rendimiento a 335 mg l⁻¹ (Johnson y Schroeder, 1995).

La zeaxantina (3,3-dihidroxi- β -Caroteno) es una xantofila de color amarillo con peso molecular de 568, se encuentra naturalmente en diversos vegetales como el maíz, alfalfa, flor de cempasúchitl. Es soluble en acetona, cloroformo, éter de petróleo y etanol (Nelis y De Leenher, 1989).

En la producción de pigmentos microbianos, se somete a los microorganismos a un medio ambiente determinado, lo que se llama "stress" este se puede imponer alterando la composición del medio de cultivo, por condiciones de pH, temperatura, presencia de algunos elementos inorgánicos y también por suministro de oxígeno como es el caso de fermentaciones aerobias, ya que éste está relacionado tanto en el crecimiento del microorganismo como en la producción de metabolitos primarios y secundarios, pues interviene de forma directa en las rutas de biosíntesis de estos (Bailey y Ollis, 1977).

Debido al gran interés del consumidor por adquirir productos naturales y que no afecten su salud, se están produciendo estos pigmentos por vía microbiológica, tal es caso de la zeaxantina, por *Flavobacterium* sp. 21588 ya que presumiblemente un 90% de los carotenoides que produce es zeaxantina, aunque esta producción se ve limitada por los nutrientes que se le suministren (Alcantara, 1995)

En el caso de los carotenoides se ha visto que la intensidad de la oxigenación que se proporciona al medio de cultivo influye de manera significativa en la apariencia y la proporción de los carotenoides sintetizados (Britton y Goodwin, 1985). Esto se puede realizar a nivel de matraz variando la fracción de llenado, que es la cantidad de medio de cultivo con respecto al nivel del matraz utilizado, encontrando una mayor oxigenación del medio cuando se trabaja con niveles bajos de fracción de llenado, como puede ser 10 y 20% (Mc Neil y Harvey, 1990). Bautista, 1995 determinó en estudios anteriores con *Flavobacterium* sp. 21588, que fracciones del 10% benefician la producción de zeaxantina y aumentan el crecimiento del microorganismo.

A nivel de fermentador, la intensidad de la oxigenación se puede lograr variando la agitación y la aereación, logrando en la mayoría de los casos, que se mejore la producción del pigmento o el crecimiento del microorganismo (Ioannis, *et al*, 1996).

3. ANTECEDENTES DE LA ZEAXANTINA

La zeaxantina (3,3'-dihidroxi- β -Caroteno) es un xantófila que imparte el color amarillo a la yema del huevo, a la piel de aves de corral y al maíz. Puede utilizarse como aditivo en la industria de los alimentos y como colorante en la industria de los cosméticos.

En algunas patentes la zeaxantina pura así como las células de los microorganismos que la producen se les utiliza en la industria de los cosméticos, así como también se le usa para impartir color a las piernas, piel, grasa y yema de huevo de las aves de corral. Para los ganaderos, la estabilidad de esta xantofila ha sido uno de los problemas más severos para controlar en su aplicación, ya que la obtenían de la flor de *campasúchitl* y de la alfalfa. Actualmente se combate este problema con la producción microbiana de la zeaxantina y se ha comprobado que tiene mayor estabilidad y es mucho más fácil encontrarla, además de que es de dos a tres veces mayor su pigmentación que la de la flor de *campasúchitl* (Gierhart y Dennis, 1992)

En la producción de pigmentos microbianos, se somete a los microorganismos a un medio ambiente determinado, lo que se llama "stress" este se puede imponer alterando la composición del medio de cultivo, por condiciones de pH, temperatura, presencia de algunos elementos inorgánicos y también por suministro de oxígeno como es el caso de fermentaciones aerobias, ya que éste está relacionado tanto en el crecimiento del microorganismo como en la producción de metabolitos primarios y secundarios, pues interviene de forma directa en las rutas de biosíntesis de estos (Bailey y Ollis, 1977).

Debido al gran interés del consumidor por adquirir productos naturales y que no afecten su salud, se están produciendo estos pigmentos por vía microbiológica, tal es caso de la zeaxantina, por *Flavobacterium* sp. 21588 ya que presumiblemente un 90% de los carotenoides que produce es zeaxantina, aunque esta producción se ve limitada por los nutrientes que se le suministren (Alcantara, 1995)

En el caso de los carotenoides se ha visto que la intensidad de la oxigenación que se proporciona al medio de cultivo influye de manera significativa en la apariencia y la proporción de los carotenoides sintetizados (Britton y Goodwin, 1985). Esto se puede realizar a nivel de matraz variando la fracción de llenado, que es la cantidad de medio de cultivo con respecto al nivel del matraz utilizado, encontrando una mayor oxigenación del medio cuando se trabaja con niveles bajos de fracción de llenado, como puede ser 10 y 20% (Mc Neil y Harvey, 1990). Bautista, 1995 determinó en estudios anteriores con *Flavobacterium* sp. 21588, que fracciones del 10% benefician la producción de zeaxantina y aumentan el crecimiento del microorganismo.

A nivel de fermentador, la intensidad de la oxigenación se puede lograr variando la agitación y la aereación, logrando en la mayoría de los casos, que se mejore la producción del pigmento o el crecimiento del microorganismo (Ioannis, *et al*, 1996).

3. ANTECEDENTES DE LA ZEAXANTINA

La zeaxantina (3,3'-dihidroxi- β -Caroteno) es un xantófila que imparte el color amarillo a la yema del huevo, a la piel de aves de corral y al maíz. Puede utilizarse como aditivo en la industria de los alimentos y como colorante en la industria de los cosméticos.

En algunas patentes la zeaxantina pura así como las células de los microorganismos que la producen se les utiliza en la industria de los cosméticos, así como también se le usa para impartir color a las piernas, piel, grasa y yema de huevo de las aves de corral. Para los ganaderos, la estabilidad de esta xantofila ha sido uno de los problemas más severos para controlar en su aplicación, ya que la obtenían de la flor de cempasúchitl y de la alfalfa. Actualmente se combate este problema con la producción microbiana de la zeaxantina y se ha comprobado que tiene mayor estabilidad y es mucho más fácil encontrarla, además de que es de dos a tres veces mayor su pigmentación que la de la flor de cempasúchitl (Gierhart y Dennis, 1992)

La zeaxantina es sintetizada biológicamente por tan sólo pocas especies del género *Flavobacterium*. Con algunas excepciones a la mayoría de estas especies se les puede catalogar de dos formas: a) altamente proteolíticas (digestión de gelatina, caseína y coagulación de suero) y b) no proteolíticas.

Para la producción de esta xantofila se requiere un medio especial y determinadas características como por ejemplo que la relación entre la fuente de carbono y nitrógeno sea constante; se requiere de una fuente de carbono como la glucosa, almidones, dextrinas, maltosa y lactosa; de una fuente de nitrógeno como licor de maíz, soya y triptona; de factores suplementarios del crecimiento que se obtienen del extracto de levadura; factores que estimulen la producción de pigmentos como ácido láctico, ácido valmítico y metil esterres; también se requiere de elementos traza como por ejemplo sulfatos y fosfatos; se requieren vitaminas y factores que estimulen el crecimiento del microorganismo como el sulfato ferroso o el fosfato disódico (Gierhart y Dennis, 1992).

Para la producción se utiliza la fermentación sumergida, la temperatura que se utiliza esta en el rango de 22 a 35°C, el pH varía entre 6.5 a 8.0 con un óptimo de 7.2 por un tiempo de 24 a 72 h, la máxima producción se registra de las 30 a 36 h. Se tiene el registro de varias patentes.

A) Dasek y Shepherd (1974) U.S. Pat.No 816,766. Utilizan cepas del género *Flavobacterium* involucradas en la producción de zeaxantina usando un método similar a la producción de β -Caroteno. Este proceso involucra el crecimiento del microorganismo en cultivo batch, adicionan glucosa, con la excepción de que al cultivo se le adicionan continuamente los nutrientes para mantener la relación carbono/nitrógeno constante. En esta patente utilizan cepas mutadas, aisladas por su alta producción de pigmento. Estos procedimientos tienen altos rendimientos de producción de zeaxantina, pero no son económicos por el tipo de nutrientes que utilizan.

B) Gerhart y Dennis (1992) U.S. Pat. No 5,308,759. Desarrolla un proceso para la producción de zeaxantina utilizando *Flavobacterium multivorum*. El proceso y el medio nutritivo utilizado en esta patente genera altos rendimientos celulares así como de zeaxantina por litro de medio de cultivo, a muy bajo costo y mucho más rápido que los métodos anteriormente conocidos.

4. CARACTERÍSTICAS DEL FERMENTADOR UTILIZADO

Los fermentadores de tanques agitados consisten en un tubo cilíndrico con un agitador en la parte superior. Estos son los más comunes por su fácil manejo, diseño, operación. Comúnmente se esterilizan en autoclave y pocos *in situ*. Este tipo de fermentadores pueden variar en su tamaño que va desde un litro a 30 litros. La jarra de fermentación contiene impulsores de un diseño específico, deflectores, un difusor de aire y un puerto para la toma de muestra (Mc Neil y Harvey, 1990).

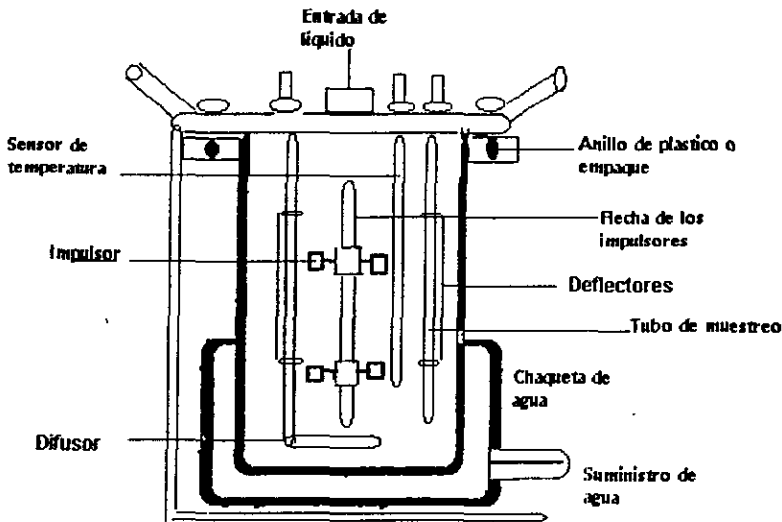


Figura 1. Esquema de una jarra de fermentación.

Este tipo de fermentador tiene determinadas ventajas como son:

- 1.- La facilidad de desmontar sus piezas y hacer más fácil su limpieza, además de seguro para su uso.
- 2.- El motor no está en contacto directo con la jarra lo que permite cambiarlo y manejarlo adecuadamente si así fuera el caso.

Para la agitación generalmente se utilizan de dos a tres impulsores, cada uno con cuatro o seis paletas, dependiendo de los requerimientos de mezclado. Para el suministro de aire, este se hace pasar por un filtro para su esterilización. Este filtro puede retener partículas de $0.2 \mu\text{m}$ de tamaño. El aire estéril se alimenta a la jarra por medio de un dispersor y se mezcla al medio por medio del sistema de agitación (Mc Neil y Harvey, 1990).

Existen muchos tipos de impulsores, por ejemplo los de paletas de cuatro o seis elementos, los de propela, pero los más utilizados son los de turbina de disco, son los más tradicionales y la más populares, requieren de mucha potencia para moverse, pero son simples en su diseño y robustos en su construcción. Y puede ser reemplazada fácilmente en el desarrollo de determinados experimentos (Mc Neil y Harvey, 1990).

Los deflectores generalmente se colocan en las paredes de las jarras de fermentación. Usualmente son cuatro por jarra y se usan para prevenir la formación de remolinos (vortex). Si no se colocan en zonas adecuadas se corre el peligro de formarse zonas inundadas, causando un crecimiento inadecuado de la masa celular. El mezclado más efectivo es aquel que utiliza impulsores de turbina y deflectores (Mc Neil y Harvey, 1990).

Para las fermentaciones aerobias, el aire se suministra por compresores y el aire se introduce por presión a la jarra de fermentación. Se utiliza un dispersor de un orificio colocado en la parte inferior de los impulsores (Mc Neil y Harvey, 1990).

Los matraces tienen un número significativo de desventajas con relación al cultivo en fermentador, incluyendo bajo nivel en transferencia de oxígeno, poco control en las condiciones ambientales, dificultad del manejo aseptico del muestreo y adición de medio. El bajo volumen de medio en un matraz, es mejor para la transferencia de oxígeno. El volumen será dependiente del medio y el tipo de microorganismo. El mínimo volumen que se puede obtener prácticamente es de 50ml en un volumen de 250ml y este va a depender del volumen de la muestra. Poco volumen puede ser utilizado para fermentaciones cortas, porque de otra manera el medio se puede evaporar y los nutrientes se pueden concentrar. Trabajar con un nivel bajo de medio de cultivo, forma una capa muy fina en el frasco y aumenta el área en el $k_L a$ por lo tanto mejora la transferencia de masa (Mc Neil y Harvey, 1990)

4.1 EFECTO DEL OXÍGENO EN LOS PROCESOS FERMENTATIVOS

Todos los microorganismos requieren de nutrientes para sus procesos metabólicos, los cuales son proporcionados por el medio ambiente, algunos de ellos son de más fácil acceso que otros. Tal es el caso del oxígeno que en una fermentación sumergida presenta dificultad para su solubilización, ya que sólo es soluble a una concentración de 7 ppm a una atmósfera de presión (Ioannis, *et al*, 1996).

El crecimiento de los microorganismos depende de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, el cual influye en la actividad celular del mismo directamente por el proceso de respiración (Ioannis, *et al*, 1996). La cantidad de oxígeno requerida por un microorganismo está determinada por su velocidad de respiración, por lo cual el oxígeno debe de ser suministrado continuamente a una velocidad tal, que se evite el agotamiento. Esto significa que la demanda de oxígeno del microorganismo debe de ser satisfecha por la velocidad de transferencia desde la fase gaseosa, cuando el aire es introducido al medio de cultivo, hasta los sitios de utilización dentro de la célula.

El mecanismo de la transferencia de oxígeno se puede explicar si se consideran las resistencias que se presentan en los diferentes microambientes que existen en un cultivo, las cuales se pueden dividir de la siguiente manera:

- 1.- En el interior de la burbuja de aire
- 2.- En la interfase gas-líquido, esto es, en la película del líquido que rodea a la burbuja de aire
- 3.- En el seno del líquido
- 4.- En la interfase líquido-sólido, esto es, en la película de líquido que rodea a la célula
- 5.- En las membranas o paredes celulares
- 6.- Durante la incorporación del oxígeno a la célula para que sea utilizado por los sistemas respiratorios.

El paso limitante para la transferencia de oxígeno se presenta en la interfase gas-líquido, es decir, en la película de líquido que rodea la burbuja de aire. En las paredes o membranas celulares la resistencia se hace despreciable si se compara con la dificultad que presenta la solubilidad de oxígeno en el líquido.

La transferencia de oxígeno durante la fermentación se expresa matemáticamente como

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C^* - C_L) - Q_{O_2}$$

En donde

C_L = Concentración de oxígeno en el seno del líquido

C^* = Concentración de oxígeno que está en equilibrio con la fase gaseosa

Q_{O_2} = demanda de oxígeno del microorganismo

$k_L a$ = coeficiente de transferencia de oxígeno.

t = tiempo

La síntesis de pigmentos es controlada por el estado de oxidación del acarreador de electrones en el sistema celular. Cuando el acarreador se encuentra en su estado reducido la síntesis procede activamente, el acarreador se oxida por la introducción de OH proveniente del agua y por incrementos en la intensidad de la luz, llegando a un estado de oxidación crítica que detiene la síntesis (Britton, 1985). La intensidad de la oxigenación influye de manera significativa en la apariencia y la proporción de los carotenoides sintetizados. Johnson y Schroeder, (1995) comentaron que la producción de cantaxantina se favorece cuando hay oxígeno disponible en el medio de cultivo, pero se puede suspender la síntesis de este pigmento si se trabaja con niveles muy altos de aereación o la cantidad de oxígeno en el medio es demasiado. Este mismo patrón de síntesis lo reportan para la producción de astaxantina.

En los procesos aeróbicos, generalmente la producción de un metabolito esta en función de la concentración de oxígeno, la cual deberá mantenerse por arriba del valor crítico (Karow, *et al*, 1953). Un ejemplo típico es la penicilina, cuya producción es dependiente de la cantidad de oxígeno en el cultivo. En la producción de metabolitos secundarios, los valores óptimos de pH, temperatura y oxígeno disuelto no son los mismos para crecimiento y producción (Lee, *et al*, 1991).

Los aspectos más importantes de la utilización del oxígeno por los microorganismos, incluyen el mantenimiento de las células, la oxidación respiratoria para un mejor crecimiento (más biosíntesis) y la oxidación de sustratos en productos finales del metabolismo (Bailey y Ollis, 1977).

4.2. EFECTO DE LA AEREACIÓN Y AGITACIÓN EN LOS PROCESOS FERMENTATIVOS

Varias de las operaciones industriales, por ejemplo oxidación, hidrogenación y fermentaciones biológicas involucran el contacto de gases y líquidos. El objetivo de dichos procesos es el agitar la mezcla de gas-líquido para generar la dispersión de burbujas de aire y formar una fase líquida continua (Nienow, *et al*, 1985).

La importancia de la aereación y agitación en fermentaciones aeróbicas es muy conocida en los laboratorios y por los tecnólogos en fermentaciones industriales. El objetivo principal de estas variables es suministrar el oxígeno necesario al microorganismo para que realice sus actividades metabólicas. Una función secundaria es mantener a los microorganismos en suspensión. Sin embargo tan sólo una pequeña proporción de esta agitación se utiliza para este fin. A nivel de laboratorio, trabajando con matraces, una variable importante por estudiar es la agitación ya que se ha observado que favorece en muchos de los casos la producción de metabolitos secundarios como son la zeaxantina y la astaxantina (Bautista, 1995 y Velázquez, 1995). Otro factor que se estudia es la fracción de llenado, que es la cantidad de medio de cultivo con el que se trabaja en relación con el nivel de matraz utilizado. Freedman (1969) observo que la fracción de llenado determina la capacidad de transferencia de oxígeno en matraces agitados, y la mejor transferencia se obtiene cuando la fracción de llenado es inferior (20%), en comparación con fracciones de

llenado superiores como 50%. A nivel de planta piloto el oxígeno se suministra por medio de compresoras de aire y por medio de agitación para homogenizar el medio de cultivo.

En organismos unicelulares como bacterias, levaduras y hongos, para llevar a cabo una reacción oxidativa en la célula generalmente el oxígeno se incorpora a través de un intermediario de la molécula del oxígeno disuelto. En otras palabras, los organismos responden a la concentración de oxígeno presente en la fase líquida o a la presión parcial, regulando todas sus actividades metabólicas. En la levadura *Phaffia rhodozyma*, se ha reportado que los factores agitación y aereación en jarras de cuatro litros, son muy importantes para la producción de un oxicarotenoide, astaxantina (Velázquez, 1995).

Una de las limitantes del oxígeno es su baja solubilidad en agua, en una fermentación bajo condiciones normales su solubilidad es menor a 10 mg/l. El oxígeno se incorpora mejor a partir de una reducción de un oxidante químico, que como oxígeno molecular. Por esta razón es importante suministrar al medio de cultivo una cantidad adecuada de oxígeno para satisfacer las demandas metabólicas de los microorganismos.

Los efectos favorables de la agitación son entre otros:

- a) Dispersar el aire en el medio de cultivo en forma de pequeñas burbujas y romper las grandes para formar pequeñas. Se crea así un área interfacial mayor entre el gas y el líquido
- b) Incrementa el tiempo de retención del gas (oxígeno) o el tiempo de contacto con el gas
- c) Previene la coalescencia de burbujas de aire
- d) Se crea una corriente turbulenta en el medio de cultivo y disminuye el espesor de la capa del líquido en la interfase gas-líquido (Vardar y Sukan, 1985).

La agitación también permite la dispersión del aire en el medio de cultivo, la homogenización para equilibrar la temperatura y la concentración de nutrientes en el fermentador, la suspensión de microorganismos, nutrientes sólidos y la dispersión de líquidos inmiscibles (Crueger y Crueger, 1982). Si no hubiera movimiento del líquido los nutrientes se transferirían por un proceso lento de difusión. Existen varios tipos de impulsores como el turbo mixer, el de paletas inclinadas, o paleta curva y estos se eligen de acuerdo al grado de turbulencia deseada (Steel, 1958). Así como también, se pueden utilizar una combinación de impulsores para mejorar la eficiencia de transferencia de oxígeno al medio de cultivo (Oldshue, 1983)

Las condiciones de la aereación influyen en la transferencia de masa afectando el tamaño de la burbuja, el tiempo de retención del aire y la turbulencia generada en el tanque (Vardar y Sukan, 1985). En sistemas en donde la agitación mecánica no es utilizada, se prefiere que el aire que entre en el fermentador se encuentre en burbujas finamente divididas para obtener un área de superficie máxima y una turbulencia adecuada. Cuando se tiene un flujo de aire alto se forman burbujas grandes y pequeñas, las primeras atraviesan rápidamente por el medio de fermentación y no contribuyen como las pequeñas ya que estas son agotadas antes de que puedan escapar (Vardar y Sukan, 1985). Por esta razón, en la mayoría de las fermentaciones se utilizan difusores que produzcan burbujas muy pequeñas y en mayor cantidad porque casi no presentan coalescencia, en lugar de los difusores de un solo orificio. Existen diversos tipos de difusores como son los de anillo o en forma de cruz con varios orificios, el difusor de un solo orificio y los porosos; este último se emplea en estudios de aireación a baja escala (Steel, 1958).

5. CARACTERÍSTICAS DE *FLAVOBACTERIUM*

Son bacilos con lados paralelos y redondeados en la parte final, típicamente de 0.5 μm de ancho y 1.0-3.0 μm de largo. Tiene ausencia de granos intracelulares de poli- β -hidroxibutirato. No forma esporas. Es Gram negativo, no tiene movilidad, no tiene deslizamiento. Es aerobio, tiene un metabolismo estrictamente respiratorio. El aislamiento del medio ambiente se realiza a temperaturas de 5-30°C. El crecimiento en medio sólido es típicamente pigmentado (amarillo-naranja) pero también hay cepas que no producen pigmentos. Las colonias son translúcidas (ocasionalmente opacas) circulares (diámetro 1-2 mm) convexas o poco convexas, planas, brillantes y con bordes enteros (Buchanan y Gibbons, 1980)

El color y la intensidad de la pigmentación varía considerablemente y puede ser afectada por el medio de crecimiento, la temperatura y el periodo de incubación. El grado de pigmentación puede ser pronunciado a bajas temperaturas (15-20°C) la luz de día se requiere para una máxima pigmentación. El crecimiento en caseína, leche y agar con almidón puede aumentar la pigmentación. Los pigmentos no son fluorescentes en luz UV y son insolubles en el medio de crecimiento (Buchanan y Gibbons, 1980)

A las pruebas bioquímicas es catalasa y oxidasa positivo. No digiere el agar. Es quimioorganotrófico. Produce ácido pero no gas de carbohidratos en medio que tiene baja concentración en peptona. El porcentaje mol G + C de DNA es de 31-42.

Los carbohidratos más atacados son glucosa, sacarosa, glicerol, maltosa y trehalosa. No se produce ácido a partir de adonitol, dulcitol, inositol y sorbitol. Celulosa, agar y otros carbohidratos de alto peso molecular no son atacados. La mayoría de las cepas son proteolíticas, hidrolizan caseína y gelatina. Se encuentra extensamente distribuido en agua, suelo y tierra, algunas veces se encuentra en carnes crudas, leche y otros alimentos.

Requiere para su crecimiento de aminoácidos y factores suplementarios de crecimiento y la mayoría no crece en medios simples de sales/glucosa.

Las cepas de *Flavobacterium* en particular aquellas de interés clínicas son resistentes a muchos antimicrobianos, como estreptomina, ampicilina, omicina, etc (Buchanan y Gibbons, 1980).

5.1. RUTA BIOSINTÉTICA DE LA ZEAXANTINA EN *ERWINIA HERBÍCOLA*

Una ruta de biosíntesis de carotenoides específicamente de zeaxantina no se conoce para *Flavobacterium sp.* Se han llegado a elucidar posibles rutas de formación (McDermott *et al.*, 1974) pero aun no se conoce una definitiva. *Flavobacterium sp.* como *Erwinia herbicola* son bacterias gram negativas y comparten algunas características como son la formación de carotenoides de color amarillo, la primera los forma como medio de protección cuando se somete a algún tipo de stress y la segunda como estrategia para sobrevivir fuera de su medio ambiente (superficie de las plantas) (Goodfellow *et al.*; 1976).

Algunas cepas de *E. herbicola* forman carotenoides como por ejemplo derivados hidroxilados de β -caroteno y sus correspondientes glucósidos (Sandmann, *et al.*, 1990).

Se ha encontrado una ruta de síntesis de carotenoides en esta bacteria *Eho 13*, cuyos genes producen un color anaranjado; consta de seis genes *crtE*, *crtB*, *crtl*, *crtY*, *crtZ*, y *crtX*; los cuales se transcriben en una sola dirección y probablemente estén organizados en un sólo operón. Cuando *Escherichia coli* se transforma con los genes de la síntesis de carotenoides (*crt*) de *E. herbicola* es más resistente a la radiación UV y a los agentes fototóxicos que cuando la célula no tiene estos genes (Kin-Ying, *et al.*; 1994).

Estos genes son empaquetados en un fragmento de 12.4 Kb. Estudios genéticos han revelado que para que se expresen estos genes se requiere de cAMP. Se han comprobado la función de estos genes por medio de una bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus* cuyos genes se han aislado y transformado en *E.coli* (Schnurr, *et al.*, 1991). La siguiente Tabla 2 nos muestra la ruta de biosíntesis, las enzimas y los genes responsables de la formación de zeaxantina en *Erwinia herbicola*.

Tabla 2. Intermediarios, enzimas y genes responsables de la ruta de biosíntesis de zeaxantina por *E. herbicola*

Intermediario	Enzima responsable	Gene
Farnesil pirofosfato	Geranil-geranil pirofosfato sintetasa	<i>crtE</i>
Geranil-geranil pirofosfato	Fitoeno sintasa	<i>crtB</i>
Fitoeno	Fitoeno desaturasa	<i>crtL</i>
Licopeno	Licopeno ciclasa	<i>crtY</i>
β -Caroteno	β -Caroteno hidroxilasa	<i>crtZ</i>
Zeaxantina	3-hidroxi- β -Caroteno glicosilasa	<i>crtX</i>
Zeaxantina- β -diglucósido		

(Kin-Ying, *et al.*; 1994)

6. OBJETIVOS

6.1. GENERAL

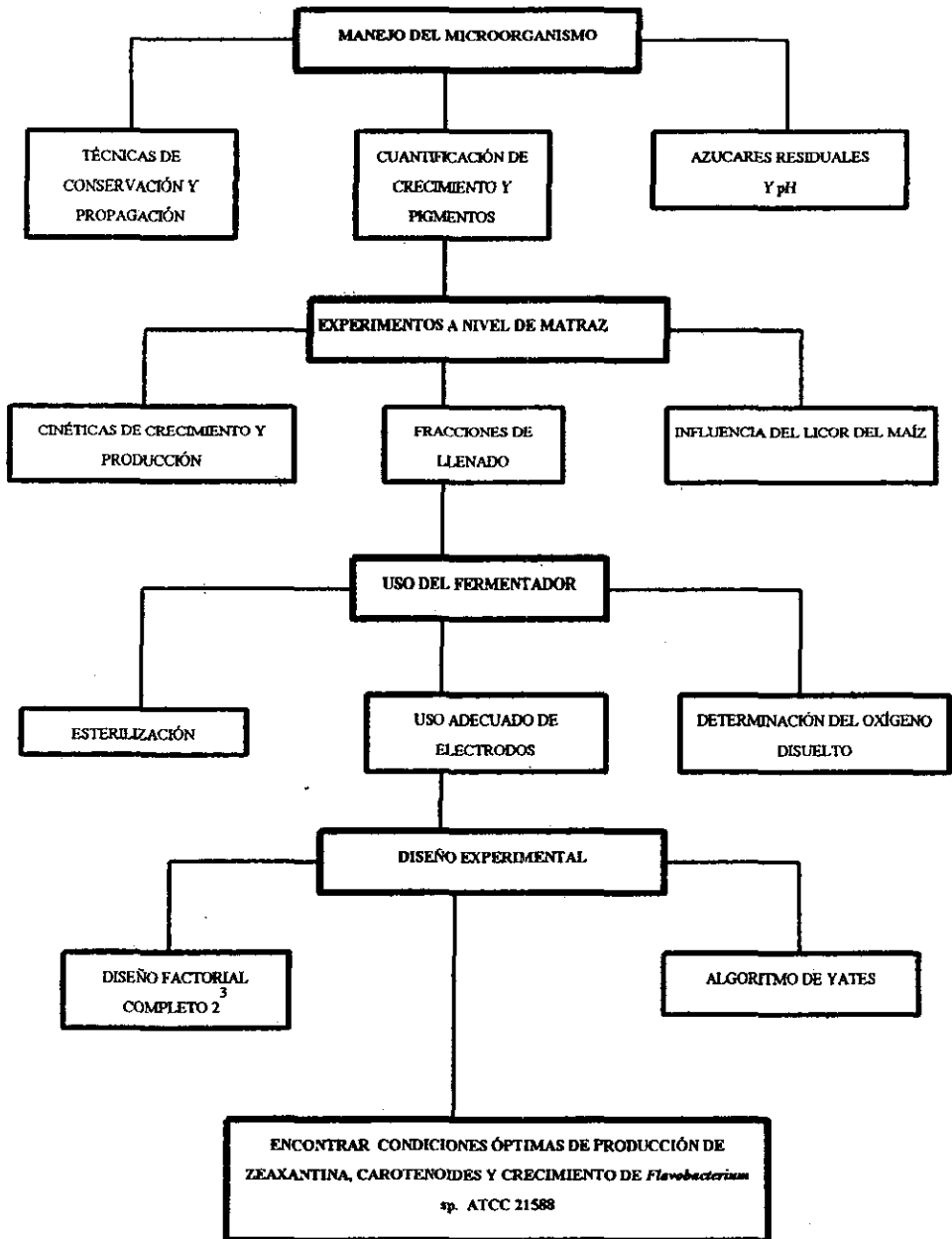
Observar el efecto de la aereación y agitación en la producción de zeaxantina en un fermentador de cuatro litros equipado con turbina Rushton de seis paletas y un dispersor de aire sencillo.

6.2. PARTICULARES

Observar como se ve afectada la producción volumétrica y el crecimiento a través de variar la agitación, aereación y concentración de licor de maíz en un fermentador de cuatro litros equipado con turbina Rushton de seis paletas y un dispersor de aire sencillo

Determinar las condiciones más adecuadas de agitación, aereación y concentración de licor de maíz para la producción volumétrica de zeaxantina en un fermentador de cuatro litros equipado con turbina Rushton de seis paletas y un dispersor de aire sencillo

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y METODOS

8.1. *Microorganismo:*

La cepa que se utilizó para este estudio fue *Flavobacterium* sp. ATCC 21588. Obtenida de la American Type Culture Collection, Rockville, MD. Su conservación fue en glicerol- medio YTN en proporción 40/60. Se mantuvo en congelación -20°C.

8.2 *Medio de cultivo:*

Para el mantenimiento y propagación se utilizaron los medios reportados en el Catalogue of Bacteria and Bacteriophages ATCC (Gherna y Pienta, 1992). Se sembraron cajas de YTN con 0.1 ml del microorganismo conservado en glicerol a -20 °C por la técnica de plaqueo. Se sometió a incubación a 29 °C por 48 horas. Posteriormente se tomaron de 3 a 5 asadas de las cajas y se resuspendieron en 5 ml de solución salina hasta obtener una densidad óptica de 0.3. Se inoculó 1 ml de esta solución en 50 ml de medio YTN en matraces Erlenmeyer de 250ml con deflectores en la parte inferior marca "Sigma". Los matraces se incubaron por 24 h en una incubadora New Brunswick Scientific Psychrotherm de tipo orbital a 180 rpm y 29 ° C.

Medios de cultivo:

La composición del medio YTN en (g/l) Triptona, 10; Extracto de levadura, 10; Glucosa, 1; Cloruro de sodio, 30; Elementos traza, 1; y se ajustó el pH a 7.2 con hidróxido de sodio al 10 %.

El medio de fermentación base para la producción del pigmento fue el siguiente en (g/l) Aceite de maíz, 0.8; Cloruro de magnesio, 15; Licor de maíz, 16; Glucosa, 20. El medio se completo con agua de la llave llegando a un litro (Bautista, 1995). Se ajustó el pH a 7.2 con hidróxido de sodio al 10%. La glucosa y los demás componentes del medio de cultivo se esterilizan por separado a 121°C por 20 minutos.

La composición de los elementos traza fue la siguiente (g/l) H₃BO₃, 2.85; MnCl₂·4H₂O, 1.8; FeSO₄, 1.36; Na₂C₄H₄O₆ · 4H₂O, 1.77; CuCl₂·2H₂O, 0.0269; ZnCl₂, 0.0208; CoCl₂·6H₂O, 0.0404; NaMoO₄·2H₂O, 0.0252.

8.3. *Reactivos:*

Analíticos: Carbonato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso, cloruro de cobre, cloruro de zinc, fosfato monobásico y dibásico de potasio, glucosa, molibdato de sodio, sulfato de fierro, sulfato de cobre, tartrato doble de sodio y potasio de la J.T. Baker de México, S.A. Extracto de levadura, hidróxido de sodio de Merck de México S.A. Peptona, triptona y agar DIFCO Laboratorios de Estados Unidos.

Industriales: Aceite de maíz, Wesson de Wesson Foods U.S.A. Licor de maíz de Arancia Comercial S.A. de C.V. y Cloruro de magnesio de la Droguería Cosmopolita S.A. de C.V.

8.4. *Condiciones de fermentación:*

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un sistema marca Fermentation Design equipado con impulsores de turbina tipo Rushton y un dispersor con una sola entrada de aire en una jarra de 4 litros conteniendo 3 litros de medio base. Al fermentador se le adicionó 5% v/v de inóculo. La temperatura fue de 29°C y la fermentación se siguió por 120 h.

8.5. Cuantificación de oxígeno disuelto:

La concentración de oxígeno disuelto se determinó directamente sobre el caldo de cultivo con un electrodo de membrana intercambiable marca New Brunswick serie 900. Este electrodo es de tipo galvánico que contiene un ánodo de plomo y el cátodo de platino, con una membrana de etilen fluorado (FEP) de 25 micras de espesor para una respuesta rápida. La mayoría de los fermentadores para controlar el suministro de flujo de aire contienen una válvula que da un control muy fino del suministro de oxígeno, también indica la presión y un área variable en el indicador de flujo indica instantáneamente el intervalo del flujo de aire. Estos indicadores pueden calibrarse para gases (o líquidos) como aire, oxígeno, dióxido de carbono (Mc Neil y Harvey, 1990).

8.6. Diseño experimental:

Un diseño factorial es aquel en el que se investigan simultáneamente los efectos de un cierto número de factores. Un diseño factorial completo consta de todas las combinaciones que pueden formarse de los distintos factores (Box y Hunter, 1989). En este estudio se practicó un diseño factorial completo 2^3 que consistió de un total de ocho experimentos. En la Tabla 3 se muestran los valores (+) y (-) correspondientes a los factores estudiados y en la Tabla 4 se muestran los niveles (+) y (-) de cada factor en cada uno de los ocho experimentos realizados.

Tabla 3. Factores y niveles probados

Factor	Nivel (-)	Nivel (+)
Agitación rpm (AG)	200	600
Aereación vvm (AE)	1	2
Licor de maíz % (LM)	1.6	4.6

Tabla 4. Matriz experimental

EXPERIMENTO	AGITACIÓN	AEREACIÓN	LICOR DE MAÍZ
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Un efecto principal de un factor es la respuesta promedio observada (por ejemplo carotenoides, zeaxantina o densidad óptica) al cambiar dicho factor de su nivel (-) a su nivel (+). Cuando los factores no son independientes, el efecto principal de un factor depende del nivel de otro factor, en este caso se dice que hay una interacción entre estos dos factores. A partir de los resultados de

los ocho experimentos (Tabla 5) y aplicando el Algoritmo de Yates se obtuvieron los efectos principales de los factores, así como sus interacciones (Box, *et al*, 1989). La desviación típica se calculó haciendo réplicas de los tres experimentos del diseño factorial de la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados y efectos principales de los ocho experimentos

Experimento	AG	AE	LM	C.T.	Zea	D.O.
1	-	-	-	1.44	0.35	1.62
2	+	-	-	1.33	1.33	1.83
3	-	+	-	1.47	0	7.71
4	+	+	-	0.102	0.026	9.99
5	-	-	+	0.74	0	6.83
6	+	-	+	5.82	3.38	16.68
7	-	+	+	1.56	0.27	12.2
8	+	+	+	11.46	9.83	19.6
b	3.38	1.31	3.81			
b₁	3.49	1.27	2.94			
b₂	4.94	5.64	8.54			

C.T.= Producción volumétrica carotenoides, se determinó a las 72 h $y_1 = 2.99$

Zea = Producción volumétrica zeaxantina, se determinó a las 72 h $y = 1.90$

D.O. = Densidad óptica a 540 nm, se determinó a las 72 h $y_2 = 9.96$

b = Efecto principal de carotenoides para cada factor, desviación típica = 0.0725

b₁ = Efecto principal de zeaxantina para cada factor, desviación típica = 4.5×10^{-4}

b₂ = Efecto principal de densidad óptica para cada factor, desviación típica = 1.72

METODOS ANALÍTICOS

8.7 Cuantificación de crecimiento:

El crecimiento se estimó por medio de densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm.

Se hizo una curva de calibración para determinar el tiempo óptimo de lectura de células y asegurarnos de no incurrir en un error. Se hicieron diluciones con solución salina 0.85% y se leyeron las muestras en un espectrofotómetro Bausch and Lomb E - 21.

Se centrifugaron las muestras para que todas las células presentes se precipiten en el fondo del tubo y posteriormente se lavaron con solución salina 0.85% para evitar que los sólidos del licor de maíz interfirieran en la determinación.

Curva de determinación óptima de lectura:

- 1.- Tener muestra suficiente para la determinación (± 50 ml)
- 2.- Agitar vigorosamente la muestra y tomar inmediatamente una muestra por duplicado.
- 3.- Cada minuto tomar una muestra por duplicado hasta llegar a 20 min.
- 4.- Centrifugar las muestras a 6500 rpm por 10 min.

- 5.- Lavar las células dos veces con solución salina al 0.85% y repetir el paso 4.
- 6.- Leer las células a una longitud de onda de 540 nm y hacer diluciones correspondientes para leer adecuadamente en el espectrofotómetro

Tratamiento de la muestra:

- 1.- Tomar una muestra de 2 ml, agitar vigorosamente y esperar 15 min.
- 2.- Centrifugar la muestra a 6500 rpm por 10 min y guardar el sobrenadante para determinación del pH.
- 3.- Resuspender el pellet formado con 5 ml de solución salina al 0.85% y volver a centrifugar a 6500 rpm por 10 min, este paso se repite una vez más.
- 4.- Una vez obtenido el pellet se resuspende con solución salina al 0.85% y se hacen diluciones para poder leer en el espectrofotómetro.
- 5.- Se utiliza de blanco solución salina al 0.85%.
- 6.- Estas determinaciones se realizan por duplicado.

8.8. Método de extracción y cuantificación de pigmentos:

La técnica que se empleo fue la reportada por Britton (1985) y fue la siguiente:

- 1.- Se toma 1 ml de muestra del cultivo de matraz o fermentador, centrifugar a 7500 rpm por 15 min y separar el sobrenadante para la determinación del pH
- 2.- Resuspender el pellet en 4 g de perlas de vidrio
- 3.- Agregar 2 ml de acetona pura y agitar por 1 min (agitación mecánica)
- 4.- Agregar 2 ml de una mezcla de dietil éter-éter de petróleo 1/1 y agitar por 10 s
- 5.- Agregar 2 ml de agua destilada y agitar por 10 s
- 6.- Centrifugar a 5000 rpm por 7 min y extraer la fase etérea con una pipeta Pasteur
- 7.- Secar la muestra con nitrógeno y protegerlo de la luz
- 8.- Resuspender el pigmento con 1 ml de éter de petróleo
- 9.- Leer a 449 nm en un espectrofotómetro Bausch and Lomb E-21, utilizando el coeficiente de extinción de 2348 (1%, 1 cm).

Para determinar la concentración del pigmento se utilizó la fórmula propuesta por Britton (1985).

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

En donde:

A = absorbancia de la muestra

y = volumen del extracto en ml

10^6 = constante para expresar los carotenoides en μg

$A_{1\text{cm}}$ = coeficiente de extinción específico para zeaxantina

100 = constante para eliminar el factor de porcentaje

8.9. Cromatografía en capa fina (TLC):

Para la determinación de zeaxantina se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina, esta técnica nos ayuda a identificar el pigmento que nos interesa, además de que podemos también identificar pigmentos presentes como β -Caroteno y se cuantificaron en densitómetro (Stahl,

1969). Se utilizo como referencia un patrón puro de zeaxantina y β -Caroteno con una concentración determinada. Los estándares fueron proporcionados por Hoffman La Roche.

El material que se utilizó fueron placas de silica gel 60 (Kieselgel DC-alufolien sin indicador fluorescente) de 10 x 20 cm x 0.2 mm. Se uso una cámara de vidrio, la cual se satura con una mezcla de diclorometano/acetato de etilo (80/20).

8.10. Cuantificación de zeaxantina por densitometría (CAMAG):

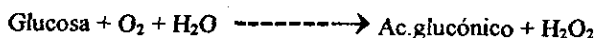
Para la determinación de zeaxantina se utilizó un densitómetro de marca CAMAG TLC SCANNER II. Su funcionamiento es el siguiente se monta la placa y éste la va moviendo a través de un haz de luz, mide las absorbancias de las distintas regiones de la placa y el área bajo los distintos picos y ésta es proporcional a la cantidad de pigmento presente, el cual se determina utilizando estándares puros, específicos para cada pigmento (Manual CAMAG TLC, 1990).

8.11. Cuantificación de glucosa residual (GOD-PAD):

La glucosa presente en el medio de cultivo se cuantifico utilizando un paquete enzimático de glucosa en suero llamado GOD - PAD. Cuyo fundamento es el siguiente:

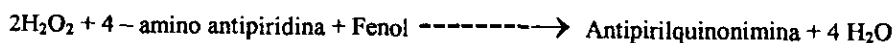
La glucosa oxidasa (GOD) (β -D-glucosa: oxígeno-1-oxidorreductasa) cataliza la oxidación de la glucosa:

GOD



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

PAD



Mezcla de reacción:

Disolver el contenido del frasco 1 con 200 ml de agua destilada y añadir el contenido del frasco 2. Mezcla suavemente. Conservar en un frasco ámbar en refrigeración.

Procedimiento técnico:

1.- Marcar tres tubos de ensayo con M (muestra) P (patrón) y B (blanco) y proceder como sigue:

	BLANCO (ml)	PATRÓN (ml)	MUESTRA (ml)
Agua destilada	0.02		
Patrón		0.02	
Muestra			0.02
Mezcla de reacción	2.0	2.0	2.0

- 2.- Mezclar bien e incubar 10 min a 37° C. Evitar la luz directa del sol.
- 3.- Determinar las absorbancias a 510 nm durante 10 minutos posteriores a la incubación.

Cálculos:

$$\text{Glucosa (mg/100 ml)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 100$$

8.12. Determinación de pH:

La determinación del pH se realizó en un potenciómetro marca Beckman modelo 3500. El análisis se determinó al medio de cultivo, después de la centrifugación y antes de la extracción del pigmento.

9. RESULTADOS y DISCUSION

9.1. Estudio del efecto de la aereación a nivel de matraz

Lo primero que se realizó fue familiarizarse con el microorganismo, las técnicas de conservación y propagación del mismo. Posteriormente fue el manejo adecuado de los aparatos y técnicas de cuantificación del pigmento. Todo esto se llevó a cabo con la finalidad de conocer las cinéticas de crecimiento y producción del microorganismo además de corroborar los antecedentes que se tenían en el laboratorio.

Se realizó un experimento a nivel de matraz Erlenmeyer de 250ml con deflectores probando diferentes fracciones de llenado (0.1-0.5). La fracción de llenado es el volumen de medio utilizado con respecto al volumen del matraz, se usó el medio STYE (ya optimizado para la producción de zeaxantina) (Bautista, 1995).

El objetivo de este experimento fue el observar cual era la fracción de llenado más adecuada para la producción de zeaxantina e identificar por medio de cromatografía en capa fina los productos y posibles intermediarios que se formaban en la fermentación bajo las diferentes condiciones de trabajo. En la figura 2 se muestran los resultados de crecimiento de *Flavobacterium* sp. 21588.

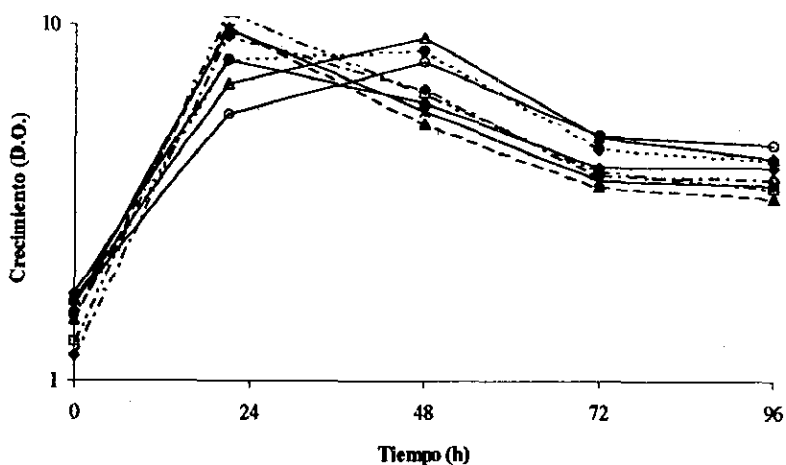


Figura 2. Cinética de crecimiento de *Flavobacterium* sp. 21588 para las diferentes fracciones de llenado. Símbolos: Fracción 10% (◆); Fracción 20% (*); Fracción 25% (~); Fracción 30% (□); Fracción 35% (◇); Fracción 40% (*); Fracción 45% (ρ); Fracción 50% (o).

El crecimiento se determinó como densidad óptica, debido a los problemas que presenta el licor de maíz en el medio, éste tiene un contenido del 50.37% (anexo) lo cual ocasiona un alto grado de interferencia a la hora de determinar crecimiento por métodos como peso seco o determinación de proteína (Lowry, *et al*, 1951). Para la determinación de la densidad óptica se lavaron las células dos veces con solución salina al 0.85%, para eliminar la interferencia del licor de maíz, se resuspendieron éstas con la misma solución y esta misma se utilizó como blanco para leerlas posteriormente en el espectrofotómetro.

En la figura 2 se observa que dentro de las primeras 21 h de la fermentación el microorganismo se encuentra en la fase exponencial, observándose los máximos de crecimiento en este tiempo para las fracciones de llenado 20-25-30 y 35%. En la fase logarítmica generalmente los microorganismos almacenan lípidos, carbohidratos, hay división celular y sintetizan las enzimas necesarias para el desarrollo de metabolitos secundarios (Rose, 1979). A partir de las 21 h el microorganismo entró en fase estacionaria y posteriormente se vió una disminución en el crecimiento. Para las fracciones 40-45 y 50% el máximo crecimiento se encontró a las 48 horas, conforme aumenta la fracción de llenado, la cantidad de medio en cada matraz fue mayor y por consiguiente la cantidad de sustrato (licor de maíz principalmente) aumento, el oxígeno disponible fue menor debido a la relación matraz-fracción de llenado, en estas condiciones el microorganismo creció y tardó más tiempo en alcanzar su máximo crecimiento, la producción de metabolitos secundarios esta asociado con un crecimiento limitado o subóptimo (Rose, 1979).

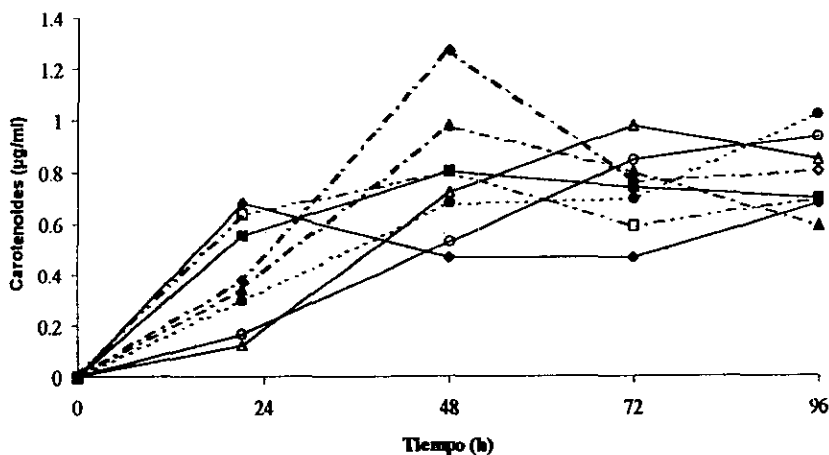


Figura 3. Cinética de producción volumétrica de carotenoides por *Flavobacterium* sp. 21588 para las diferentes fracciones de llenado. Símbolos: Fracción 10% (◆); Fracción 20% (*); Fracción 25% (~); Fracción 30% (□); Fracción 35% (◇); Fracción 40% (* *); Fracción 45% (ρ); Fracción 50% (o).

Observando la figura 3, la producción volumétrica de carotenoides para las fracciones de llenado del 10, 20, 25 y 30%, se encontró que a partir de las 21 h de la fermentación empezó la producción de carotenoides registrándose un aumento hasta las 48 h, después de esta hora la producción disminuyó. Cuando se trabajó con fracciones del 40-45 y 50%, lo que se observó fue que la producción de carotenoides aumentó, en comparación con las anteriores y su producción máxima fue a las 48 horas; así también Mc Neil y Harvey (1990) mencionaron que la transferencia de oxígeno es menor cuando se trabaja con un volumen más grande de medio en comparación con el matraz utilizado, es decir, conforme aumenta la fracción de llenado es menor la transferencia de oxígeno al medio de cultivo. De manera tal que la producción de carotenoides estuvo asociada al crecimiento, a mayor crecimiento mayor formación de carotenoides, pero es menor la proporción de oxicarotenoides, en este caso de zeaxantina como se observó en la figura 5, así también se observó la separación de varios carotenoides y oxicarotenoides incluyendo β -Caroteno, un desconocido cuyo Rf fue 0.6097 y zeaxantina. Los dos primeros se encontraron en fracciones de llenado del 30 al 50%. Britton y Goodwin (1971) vieron la importancia del oxígeno en la formación de carotenoides y oxicarotenoides, entre más oxígeno se suministre al medio de cultivo la proporción de los carotenoides sintetizados por el microorganismo como el β -Caroteno disminuye notablemente y aumenta la cantidad de oxicarotenoides como la zeaxantina. Así también Bautista (1995) mencionó que una fracción de llenado del 10% influye de manera positiva sobre el crecimiento y producción de pigmentos por *Flavobacterium* sp. 21588; observándose un máximo de producción y crecimiento en un tiempo menor que si se utiliza una fracción de llenado de mayor porcentaje.

Lo que se observó en la figura 4 de producción volumétrica de zeaxantina fue que para las fracciones 40-45 y 50%, no se registró producción alguna del oxicarotenoide (zeaxantina), sin embargo en las demás fracciones se registró producción de este oxicarotenoide siendo la fracción de mayor importancia la del 10%, conforme aumentaba la fracción de llenado la proporción de este oxicarotenoide iba disminuyendo hasta llegar a ser insignificante y la cantidad de carotenoides aumento como se pudo observar en la figura 5, la primer mancha que se observó de abajo hacia arriba de la placa fue zeaxantina, esta fue mucho más intensa en la fracción del 10% que en las demás, seguido se observó una mancha intermedia entre zeaxantina y β -Caroteno, desconocido por nosotros cuyo Rf fue de 0.6097, en la parte superior de la placa se encontró la mancha de β -Caroteno que conforme aumentó la fracción de llenado fue mucho más intensa, así como también la del intermediario; un ejemplo claro se observó comparando las fracciones 10 y 50%.

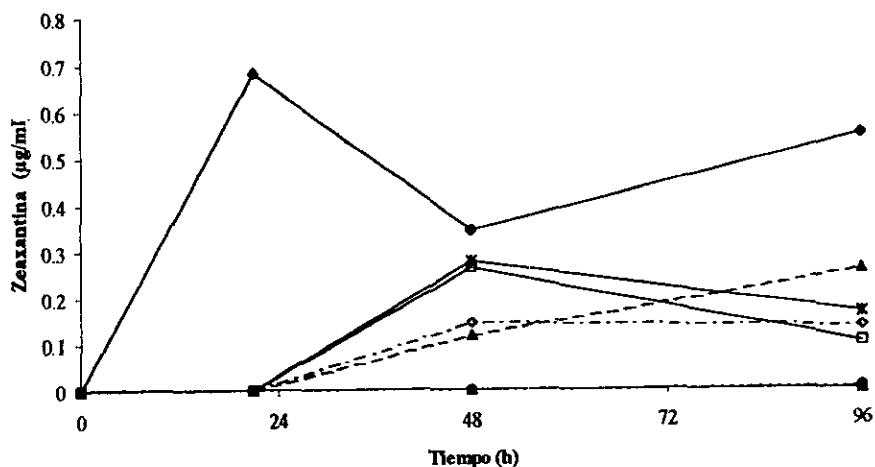


Figura 4. Cinética de producción volumétrica de zeaxantina por *Flavobacterium* sp. 21588 para las diferentes fracciones de llenado. Símbolos: Fracción 10% (◆); Fracción 20% (*); Fracción 25% (~); Fracción 30% (□); Fracción 35% (◇); Fracción 40% (•); Fracción 45% (ρ); Fracción 50% (o).

A manera de conclusión se puede decir que la producción volumétrica de zeaxantina se vio favorecida cuando la relación medio de cultivo con el volumen del matraz fue pequeña, en esta existe una cantidad mayor de oxígeno presente en el medio (Mc Neil y Harvey, 1990) y puede ser utilizado para sintetizar este oxicarotenoide. Sin embargo, para la producción volumétrica de carotenoides las características fueron diferentes, la producción fue mayor cuando esta relación aumenta, el oxígeno en el medio fue menor y la ruta de biosíntesis de este oxicarotenoide se quedó en sus precursores como el β -Caroteno, el crecimiento tuvo un comportamiento similar al antes descrito para los carotenoides, *Flavobacterium* sp. 21588 creció más cuando la fracción de llenado fue de un porcentaje mayor (30–50%) y cuando no hubo mucho oxígeno disponible en el medio de cultivo.

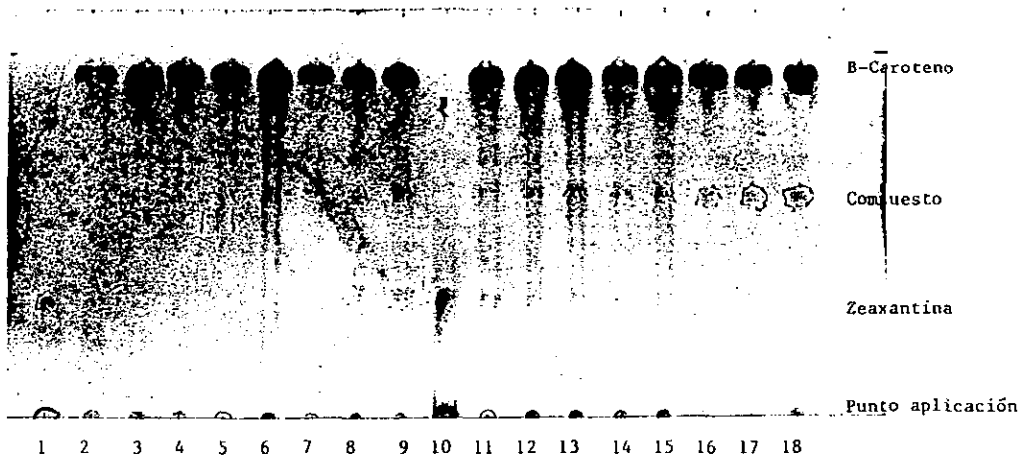


Figura 5. Análisis cromatográfico 1 de los pigmentos producidos por *Flavobacterium* sp. en diferentes fracciones de llenado a los tiempos 48 y 72 h. Carriles: 1. Estándar de zeaxantina, 2. 10%, 3. 20%, 4. 25%, 5. 30%, 6. 35%, 7. 40%, 8. 45%, 9. 50%. 10. Estándar de zeaxantina, 11. 10%, 12. 20%, 13. 25%, 14. 30%, 15. 35%, 16. 40%, 17. 45%, 18. 50%.

9.2. Efecto de la concentración del licor de maíz en el proceso de formación de la zeaxantina

Se corrió una fermentación a nivel de matraz Erlenmeyer de 25ml con deflectores en la parte inferior con 25ml de medio de producción (STYE). El objetivo de este experimento fue el determinar la influencia que tiene el licor de maíz en la producción de zeaxantina y otros carotenoides, de acuerdo a los antecedentes en el laboratorio, se determinó que a mayor cantidad de licor de maíz hay mayor producción de β -Caroteno y disminuye la producción de zeaxantina, esto a nivel de matraz de 250ml con deflectores en la parte inferior y con 25ml de medio de producción (Bautista, 1995).

De acuerdo a un registro de patente de producción de zeaxantina con *F. multivorum* (Gierhart y Dennis, 1992) en el proceso de producción aumentan la cantidad de licor de maíz (3-10%) y adicionan factores de crecimiento que estimulan la producción de este oxicarotenoide. En nuestro caso, se trabajó con *Flavobacterium* sp. ATCC 21588 se probó una concentración alta de licor de maíz (4.6%) y se mantuvo la concentración de 1.6% como control y de esta manera fue determinado el efecto de la concentración de licor de maíz en la producción de zeaxantina, los resultados de crecimiento se muestran en la figura 6.

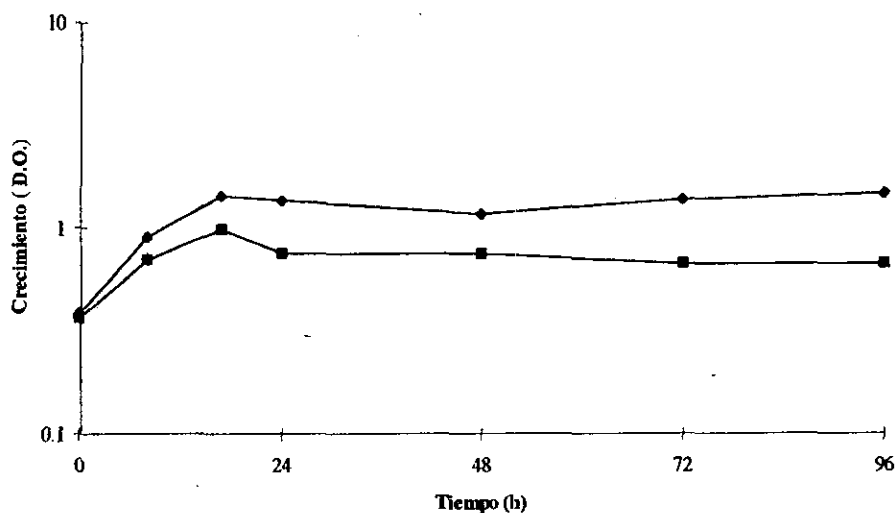


Figura 6. Cinética de crecimiento con *Favobacterium* sp. 21588 en medio STYE y medio STYE con la concentración de licor de maíz aumentada. Símbolos: Medio STYE (■); Medio STYE con concentración de licor de maíz aumentada (◆).

En la figura 6, cinética de crecimiento, se pudo observar que dentro de las primeras 24 h de la fermentación se desarrolló la fase logarítmica de crecimiento de *Flavobacterium* sp. 21588. En el caso del medio STYE (1.6%), se llegó a un máximo de 0.97 de densidad óptica a las 17 h, pasado este tiempo se registró una caída ligera en el crecimiento y entró en la fase estacionaria manteniéndose así durante toda la fermentación. En el caso del medio STYE con una concentración mayor de licor de maíz (4.6%) el máximo de crecimiento se registró a las 17 h, llegando a un máximo de 1.42 de densidad óptica, pasado este tiempo la pendiente del crecimiento cayó y se mantuvo este patrón hasta las 48 h, para después subir ligeramente. El licor de maíz es una fuente rica en aminoácidos, minerales y factores suplementarios de crecimiento, es ampliamente utilizada en fermentaciones por su bajo costo y su fácil adquisición (Gierhart y Dennis, 1992). *Flavobacterium* necesita de aminoácidos y minerales para su crecimiento (Buchanan y Gibbons, 1980). Suministrar de manera independiente aminoácidos y factores suplementarios de crecimiento elevaría el costo de producción de zeaxantina, ya que estos se encuentran de manera pura y tienen un costo muy elevado en el mercado. En esta misma gráfica pudimos observar que una elevada concentración de licor de maíz (4.6%) estimuló el crecimiento cerca de 2 veces comparando este resultado con el control que tuvo una concentración de 1.6%.

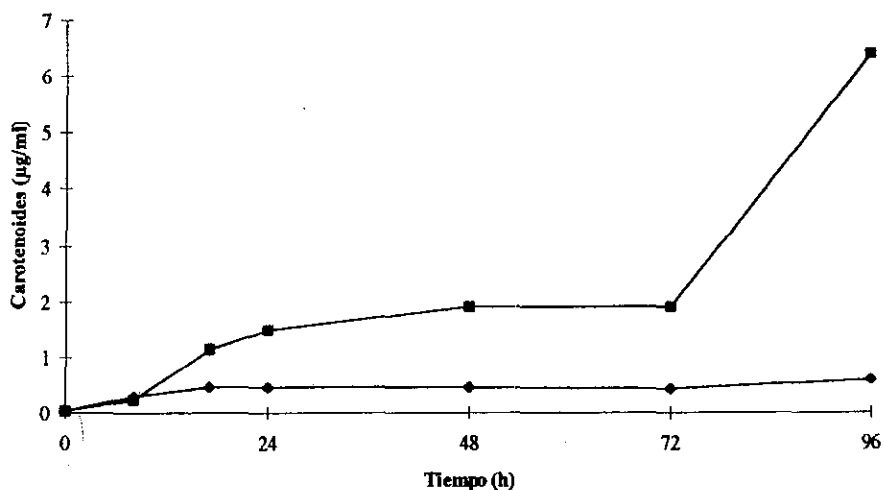


Figura 7. Cinética de producción volumétrica de carotenoides por *Flavobacterium* sp. 21588 en medio STYE y medio STYE con la concentración de licor de maíz aumentada. Símbolos: Medio STYE (◆); Medio SYTE con la concentración de licor de maíz aumentada (■).

En la figura 7 de producción volumétrica de carotenoides se observó que en las dos concentraciones de licor de maíz probadas, se siguieron diferentes tendencias en la producción. Para el medio STYE (1.6%) en las primeras horas de la fermentación se registró poca producción de carotenoides, a las 24 h la pendiente varió muy poco con respecto a los tiempos anteriores manteniéndose la producción, a partir de las 24 h entró en la fase estacionaria y se mantuvo así a lo largo de la fermentación. Para el medio STYE con aumento en la concentración de licor de maíz (4.6%) se observó que la producción de carotenoides empezó a partir de las 8 h, punto que coincidió con el medio STYE (1.6%) para las 17 h de la fermentación, la pendiente de producción tendió a la alza y fue muy diferente a la otra condición, a partir de las 24 h entró en la fase estacionaria, y se registraron ligeros aumentos manteniéndose así hasta las 72 h, para las 96 h hubo un aumento en la concentración de carotenoides de 3 veces más en comparación al punto anterior. Comparando la producción de carotenoides a las 96 h hubo un aumento en la producción de 6 veces más cuando se trabajó con 4.6% de licor de maíz que con el control (1.6%).

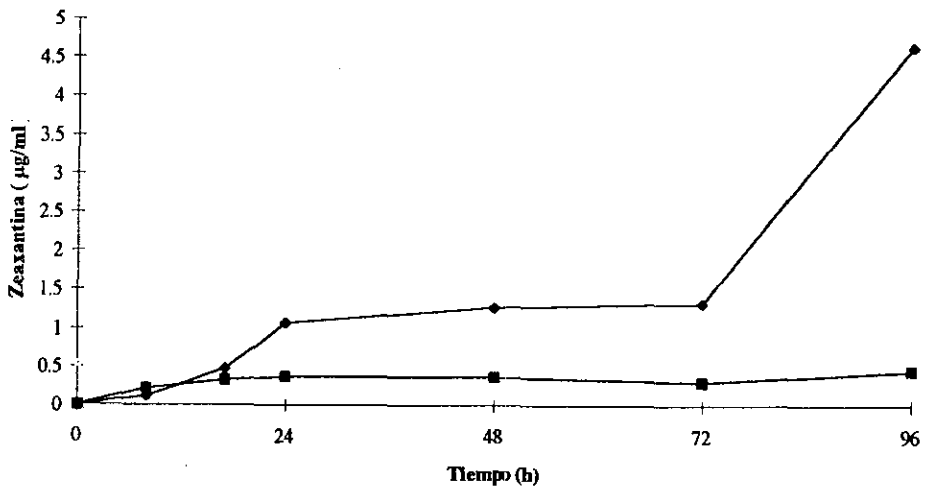


Figura 8. Cinética de producción volumétrica de zeaxantina por *Flavobacterium* sp. 21588 en medio STYE y medio STYE con la concentración de licor de maíz aumentada. Símbolos: Medio STYE (■); Medio STYE con la concentración de licor de maíz aumentada (▲).

Para la condición del medio STYE, en la figura 8 se observó que dentro de las primeras horas de fermentación hubo poca producción de zeaxantina, a las 17 h se registró poca producción, ligeramente esta aumentó a las 24 h, a partir de este punto se puede decir que entró en la fase estacionaria y a las 72 h hubo un declive ligero en la producción. Para el medio STYE con aumento en la concentración de licor de maíz (4.6%) se observó una producción gradual de zeaxantina, a las 24 h entró a la fase estacionaria, en este punto comparado con el medio STYE (1.6%) hubo un aumento en la producción aproximadamente del 30%, de las 72 a las 96 horas en el medio STYE con concentración de 4.6% de licor de maíz, se registró un aumento considerable en la producción pasando de 1.3 a 4.7 $\mu\text{g/ml}$ de zeaxantina. A pesar de que se observó un aumento discreto en el crecimiento en este punto, la producción volumétrica de carotenoides y de zeaxantina aumentó, no se tiene una explicación clara de lo sucedido, a pesar de que las muestras se realizaron y analizaron por triplicado, los resultados concuerdan con estos datos. La fermentación no se monitorió más tiempo porque se corría el riesgo de concentrar los componentes del medio de cultivo debido a una evaporación del mismo, además de que el microorganismo estuviera ya en una fase de muerte.

Con base en estos resultados se pudo confirmar que una concentración mayor de licor de maíz en el medio favoreció la producción de carotenoides y de zeaxantina. Relacionando las figuras de crecimiento, producciones de carotenoides y zeaxantina, se pudo decir que la producción de los pigmentos ocurrió en la fase estacionaria después de que el microorganismo alcanzó su máximo crecimiento, en las primeras horas de la fermentación se observó poca producción de pigmentos pero gran crecimiento y a partir de las 24 h cuando empezó la fase estacionaria fue cuando se dieron los máximos de producción en estos casos el crecimiento cayó ligeramente y no se mantuvo constante. Este patrón fue normal cuando hablamos de síntesis de metabolitos secundarios en las primeras horas de la fermentación el microorganismo desarrolló las enzimas necesarias para la producción del metabolito acumuló lípidos y carbohidratos para utilizarlos en la fase estacionaria (Rose, 1979).

Utilizando la técnica de separación de pigmentos por medio de cromatografía en capa fina pudimos observar en la figura 9, que con el medio STYE (1.6%) hubo formación de zeaxantina y β -Caroteno además de estos hubo formación de un intermediario cuyo Rf fue 0.68. Observando la placa de abajo hacia arriba se apreció una primera mancha correspondiente a zeaxantina, después de esta mancha se observó otra muy tenue y en la parte superior de la placa se vió la acumulación de β -Caroteno, en contraste, en la condición con medio STYE con aumento en la concentración de licor de maíz (4.6%) se observaron además de zeaxantina y β -Caroteno dos intermediarios cuyos Rf fueron 0.43 y 0.68 la mancha que se observó para el primero fue muy tenue y para el segundo fue mucho más intensa, también en la placa se observó que la acumulación de β -Caroteno fue mucho mayor y más definida que para la primera condición de medio STYE (1.6%).

A manera de conclusión se pudo decir que un incremento en el porcentaje de licor de maíz en el medio de cultivo, favorece el crecimiento y la producción volumétrica de carotenoides y zeaxantina. En el análisis cromatográfico el mismo incremento favorece la aparición de dos compuestos, desconocidos por nosotros, además de que las manchas de zeaxantina y β -Caroteno fueron más intensas que las del control (1.6% licor de maíz).

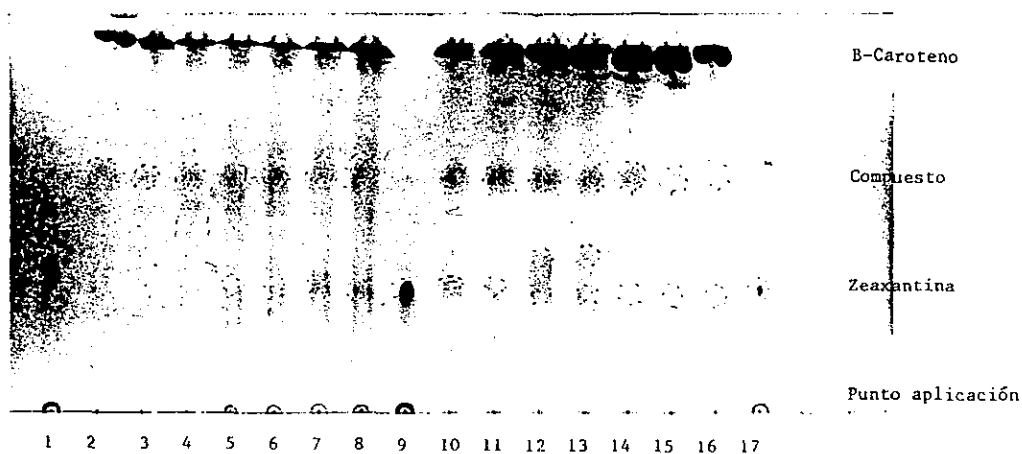


Figura 9. Análisis cromatográfico de los pigmentos producidos por *Flavobacterium* sp. a diferentes tiempos de fermentación en medio STYE y STYE modificado. Carriles: 1. Estándar de zeaxantina, 2. 0 h, 3. 8 h, 4. 17 h, 5. 24 h, 6. 48 h, 7. 72 h, 8. 96 h, 9. Estándar de zeaxantina, 10. 0 h, 11. 8 h, 12. 17 h, 13. 24 h, 14. 48 h, 15. 72 h, 16. 96 h, 17. Estándar de zeaxantina.

9.3. DISEÑO FACTORIAL COMPLETO 2³

9.3.1. Primeros cuatro experimentos

El diseño factorial completo consta de una matriz con ocho experimentos, en los cuales se estudian tres variables: agitación, aereación y concentración de licor de maíz a dos niveles (+) y (-); tal como se muestra en la tabla 5 (materiales y métodos). Para poder ordenar y analizar mejor los resultados de los experimentos se decidió separar la matriz en dos partes, analizando en esta sección la producción volumétrica de zeaxantina, carotenoides, y el crecimiento, bajo diferentes combinaciones de agitación y aereación, manteniendo constante la tercer variable (concentración de licor de maíz) en su nivel mínimo (-) 1.6%.

En la Tabla 4 (pág. 20), se muestra la matriz experimental y en las figuras 10, 11 y 12 se muestran las cinéticas de crecimiento, producción de carotenoides y de zeaxantina. En la figura 10 se observó que con excepción del experimento 4, las primeras ocho horas de la fermentación fueron de adaptación del microorganismo al medio de cultivo, observándose una fase "lag" por lo tanto no hubo un crecimiento significativo. Seguido de estas horas el microorganismo entró a la fase exponencial, alcanzándose los valores máximos de crecimiento. Para los diferentes experimentos los resultados obtenidos fueron muy diferentes, se obtuvieron valores de 1.62 (exp 1) hasta 9.99 (exp 4) de densidad óptica, siendo el más significativo este último, la cinética del experimento 3 también fue muy diferente aunque no se alcanzaron resultados muy altos 7.71 (de densidad óptica) nunca se vio una disminución pronunciada del crecimiento como se pudo observar en los tres experimentos restantes, en cambio en el experimento 1 (niveles bajos de los tres factores) y 2 (niveles bajos de dos factores exceptuando la agitación) el crecimiento fue muy pobre.

Después de las 24 horas se observó que los cuatro experimentos entraron a la fase estacionaria, hubo ligeros aumentos en el crecimiento (exp 1 y 3) pero nunca llegaron a los máximos resultados obtenidos (exp 4). La condición en la que se tuvo un mejor crecimiento (9.99), fue cuando se trabajó con niveles altos de aereación y agitación (exp 4) y también cuando el factor aereación por sí mismo estuvo en su nivel máximo (+) como fue el caso del experimento 3 (7.71). Ioannis, *et al*, (1996) comentó que el oxígeno, es un elemento esencial para el crecimiento aerobio y es muy difícil de suministrar debido a su baja solubilidad. El crecimiento del microorganismo depende de la concentración del oxígeno disuelto en el medio de cultivo, el cual influye en la actividad celular de este, por los efectos que tiene en la generación de energía celular ya que esta es suministrada por la respiración.

La cinética de la producción volumétrica de carotenoides se observó en la figura 11, en las primeras horas no hubo producción de carotenoides, toda la energía del microorganismo se enfocó principalmente al crecimiento, inmediatamente después de que se alcanzó el máximo crecimiento *Flavobacterium* sp. 21588 empezó la producción de carotenoides, esto fue a las 24 h de la fermentación, Rose (1979) comenta que la producción de metabolitos secundarios se lleva a cabo en la fase estacionaria, en esta fase que suele durar aproximadamente 48 h se alcanzan las producciones máximas antes de que el microorganismo muera.

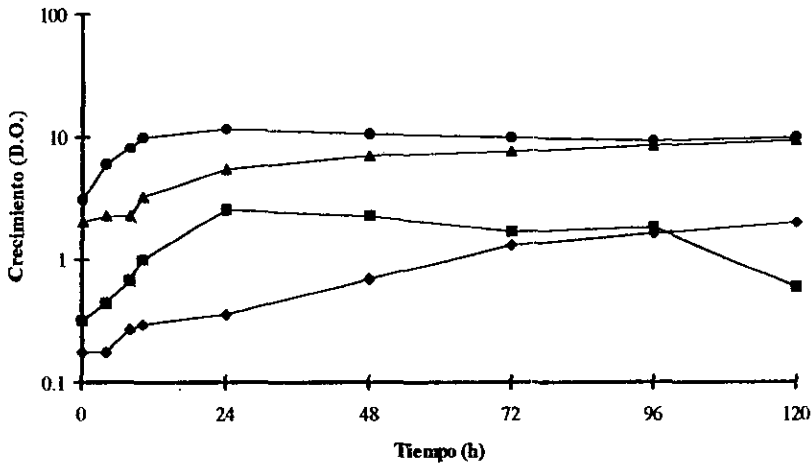


Figura 10. Cinética de crecimiento en los primeros cuatro experimentos de la matriz experimental con *Flavobacterium* sp. 21588. Símbolos: Experimento 1 (◆); Experimento 2 (■); Experimento 3 (▲); Experimento 4 (*).

Las mejores condiciones de producción de carotenoides fueron en los experimentos 1, y 3, en las que se manejaron niveles mínimos de los tres factores o el factor aereación por sí solo estuvo en su nivel alto; en contraste cuando el factor agitación por sí sólo y los factores agitación y aereación estuvieron en sus niveles máximos (exp 2 y 4) la producción de carotenoides se vio disminuida. Una posible explicación para este fenómeno pudo ser que la cantidad de oxígeno presente en estos experimentos hubiera sido demasiado y hubiera afectado la producción de carotenoides en el microorganismo. Para que se lleve a cabo la producción de metabolitos secundarios, es necesario un nivel determinado de oxígeno en el medio de cultivo (Ioannis, *et al*, 1996). Johnson y Lewis (1979) demostraron que cuando se mantienen niveles por debajo de 30mmol O₂/h, la producción de astaxantina en cepas de *P. rhodozyma* disminuye, y se acumulan β-Caroteno y precursores del pigmento menos polares. Sin embargo cuando hay un exceso de éste como fue el caso del experimento 4 y cuando la fuente de carbono y nitrógeno fue pobre (1.6%) no hubo producción de carotenoides viéndose limitada ésta por este último factor, que por la presencia de oxígeno, tal como lo pudimos observar en los cuatro experimentos siguientes de la matriz experimental que tuvieron una concentración de licor de maíz elevada (4.6%)

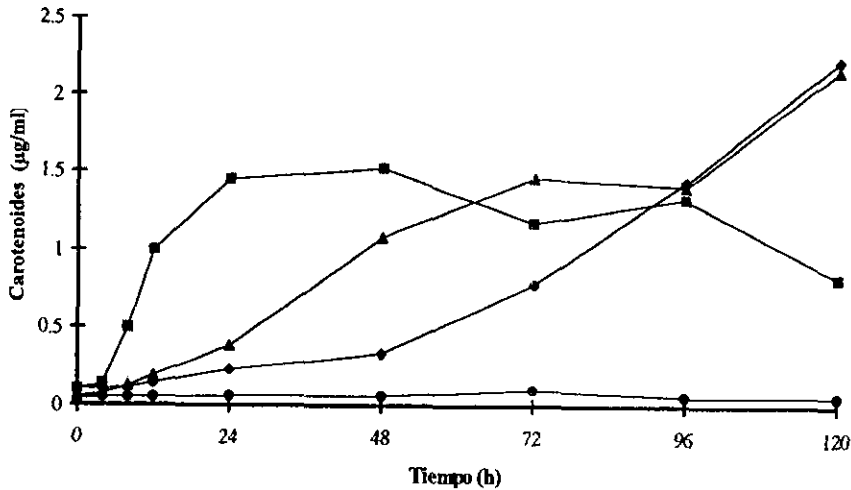


Figura 11. Cinética de producción de carotenoides en los primeros cuatro experimentos de la matriz experimental con *Flavobacterium* sp. 21588. Símbolos: Experimento 1 (♦); Experimento 2 (■); Experimento 3 (▲); Experimento 4 (•).

Para la producción volumétrica de zeaxantina, figura 12, se observó que el pigmento se produjo a partir de las 48 h de la fermentación cuando *Flavobacterium* sp. 21588 entró en fase estacionaria. Los experimentos en los que se observó una mejor producción fueron 2 (niveles bajos de dos factores exceptuando la agitación) y 1 (nivel bajo de los tres factores) respectivamente. Para los experimentos 3 y 4, se vio que la producción fue muy pobre, llegando a ser nula, en donde, el factor aereación estuvo en su nivel alto (+) y una combinación de factores agitación y aereación estuvieron en sus niveles altos (+). Estos resultados nos indicaron que la producción de zeaxantina se vio favorecida con un nivel determinado de oxígeno, así como lo fue para la producción de carotenoides, un exceso de oxígeno con una combinación baja de fuente de nitrógeno y carbono, afectaron de manera directa la producción de este oxicarotenoide.

En la figura 13 se observó un perfil de oxígeno disuelto en el medio de cultivo medido en los cuatro experimentos realizados. Vimos que cuando los factores agitación, y aereación en combinación con agitación estuvieron en sus niveles altos (+) el oxígeno disuelto se recuperó después de las 24 h (exp 2 y 4), en contraste cuando los tres factores en estudio estuvieron en sus niveles mínimos (-) y la aereación por sí sola también estuvo en su nivel mínimo (-) el oxígeno disuelto nunca se recuperó (exp 1 y 3).

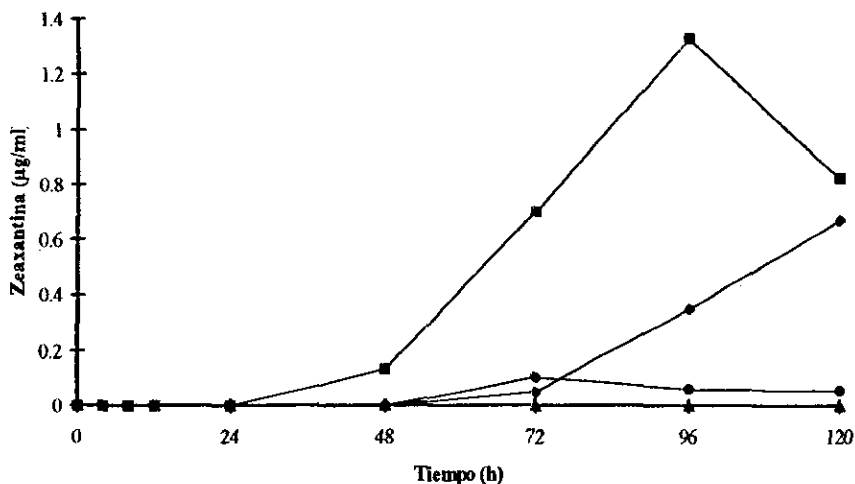


Figura 12. Cinética de producción volumétrica de zeaxantina en los primeros cuatro experimentos de la matriz experimental con *Flavobacterium* sp. 21588. Símbolos: Experimento 1 (◆); Experimento 2 (■); Experimento 3 (▲); Experimento 4 (●).

En el experimento 1 hubo poco crecimiento, alta producción de carotenoides y alta producción de zeaxantina. En el experimento 2 también hubo poco crecimiento, mediana producción de carotenoides y la producción más alta de zeaxantina de estos cuatro experimentos, se pudo ver que la diferencia entre estos dos experimentos fue los factores agitación y aereación, esto nos permitió concluir que para que exista una mejor producción de zeaxantina se requiere que el factor agitación este en su nivel alto. Como lo vimos en el experimento 1 (0.35 µg/ml) el factor aereación fue menos importante en comparación con el factor agitación observada en el experimento 2 (1.33 µg/ml).

En el experimento 3 se registró un buen crecimiento y producción de carotenoides, pero sin embargo la producción de zeaxantina fue nula, el factor aereación por si solo no estimuló la producción de zeaxantina. Para el experimento 4 en el que se obtuvo el mejor crecimiento de los cuatro experimentos realizados, la producción de carotenoides al igual que la de zeaxantina fue muy baja en comparación con los demás experimentos. Con estos resultados pudimos concluir que el factor aereación fue de menor importancia que el factor agitación en la producción volumétrica de zeaxantina, pero no así para la producción de carotenoides esto se pudo deber a la concentración de oxígeno en el medio de cultivo y la baja concentración de licor de maíz (1.6%).

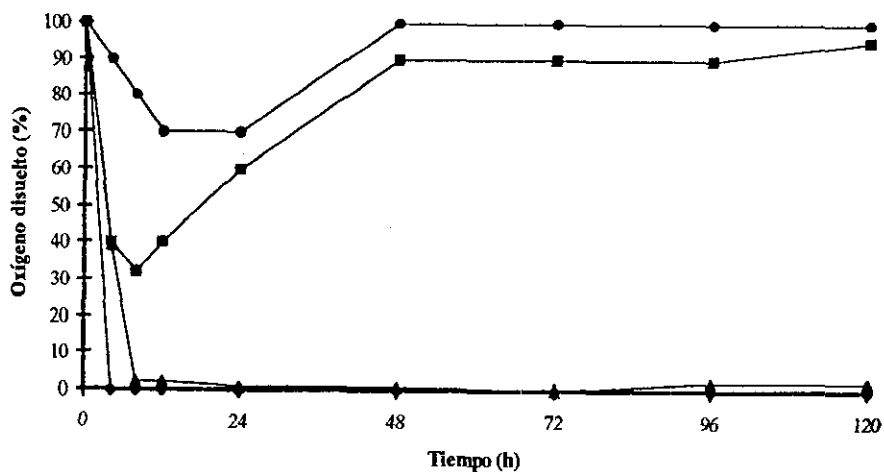


Figura 13. Evolución del oxígeno disuelto en el medio de cultivo en los primeros cuatro experimentos de la matriz experimental. Símbolos: Experimento 1 (◆); Experimento 2 (■); Experimento 3 (▲); Experimento 4 (*).

A manera de explicar que es lo que está pasando con la formación de los carotenoides nos podemos valer de un análisis cromatográfico que nos ayuda a identificar productos en base en un estándar, como puede ser β -Caroteno y zeaxantina. En la figura 14, análisis cromatográfico 3 (exp 1) se pudo observar la formación de zeaxantina, dos compuestos cuyos Rf fueron 0.40 y 0.65 y la formación de β -Caroteno. Al inicio de la fermentación se pudo observar que hubo una gran acumulación de β -Caroteno y conforme pasó el tiempo de la fermentación las manchas de zeaxantina y la de los compuestos fueron apareciendo llegando a su máximo a las 72 h, después de esta hora las manchas fueron menos intensas. En la figura 15, análisis cromatográfico 4 (exp 2) se observó la formación de zeaxantina, de dos compuestos cuyos Rf fueron 0.49 y 0.84, y β -Caroteno; al igual que en el experimento anterior al inicio de la fermentación se observó la acumulación de β -Caroteno y seguido aparecieron zeaxantina y los compuestos, pero conforme transcurrió el tiempo de la fermentación las manchas se hicieron más nítidas. La diferencia entre estos dos experimentos fue que la agitación pasó de su nivel inferior (-) al superior (+), observándose claramente un aumento en la formación de β -Caroteno cuando la agitación estuvo en su nivel inferior.

En la figura 16, análisis cromatográfico 5 (exp 3) se observó la formación de zeaxantina, dos compuestos cuyos Rf fueron 0.62 y 0.77 y β -Caroteno. Los tiempos máximos de formación de zeaxantina fueron de las 17 hasta las 48 h de la fermentación pasado este tiempo, las manchas se hicieron más nítidas. En la figura 17, análisis cromatográfico 6 (exp 4) se observó la presencia

únicamente de un intermediario cuyo Rf fue de 0.57, no hubo producción de zeaxantina y la formación de β -Caroteno se vió acumulada conforme aumentó el tiempo de la fermentación a diferencia de los tres experimentos anteriores. La diferencia entre estos dos experimentos fue que el factor agitación pasó de su nivel inferior (-) al superior (+) manteniendo un nivel de aereación alto en ambos experimentos. Cuando se trabaja con niveles inferiores de agitación hay producción de zeaxantina y compuestos aun no identificados por el grupo, pero cuando se trabajó con niveles altos de agitación no hubo producción de zeaxantina y la cantidad de compuestos disminuyó, lo que nos pudo indicar que fue demasiado oxígeno en el medio y la producción de carotenoides y oxicarotenoides también disminuyó.

Lo que se pudo concluir de estos cuatro experimentos fue que para aumentar la producción volumétrica de zeaxantina se necesitó de una agitación de 600 rpm y una aereación baja (1 vvm), esto trabajando con la concentración de licor de maíz de 1.6%.

Para la producción volumétrica de carotenoides es conveniente trabajar con niveles altos de aereación (2 vvm) y bajos de agitación. Con respecto al crecimiento es que un flujo de aire de 2 vvm y una agitación de 600 rpm fue favorable para el crecimiento de *Flavobacterium* sp. 21588.

La concentración mínima de licor de maíz 1.6% fue la probada anteriormente a nivel de matraz y de acuerdo a Bautista (1995), este porcentaje fue el más adecuado para la producción de zeaxantina en un volumen de 50 ml de medio base para la producción de pigmento en matraces de 250ml con deflectores en la parte inferior con *Flavobacterium* sp. 21588.

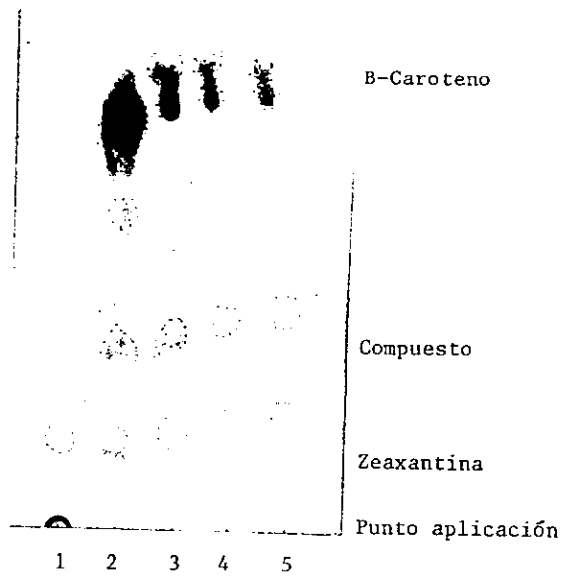


Figura 14. Análisis cromatográfico 3 del experimento 1 del diseño factorial. Fermentación 200 rpm, 1 vvm y 1.6% licor de maíz. Carriles: 1. Estándar de zeaxantina, 2. 24 h, 3. 48 h, 4. 72 h, 5. 120 h.

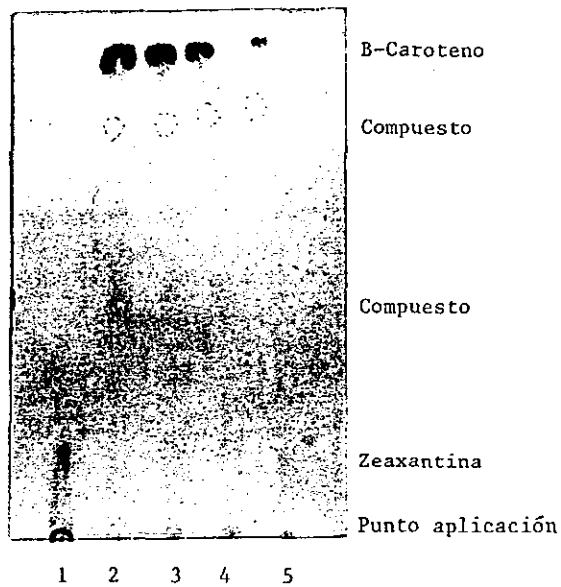


Figura 15. Análisis cromatográfico 4 del experimento 2 del diseño factorial. Fermentación 600 rpm, 1 vvm y 1.6% licor de maíz. Carriles: 1. Estándar de zeaxantina, 2. 2 h, 3. 24 h, 4. 74 h, 5. 120 h.

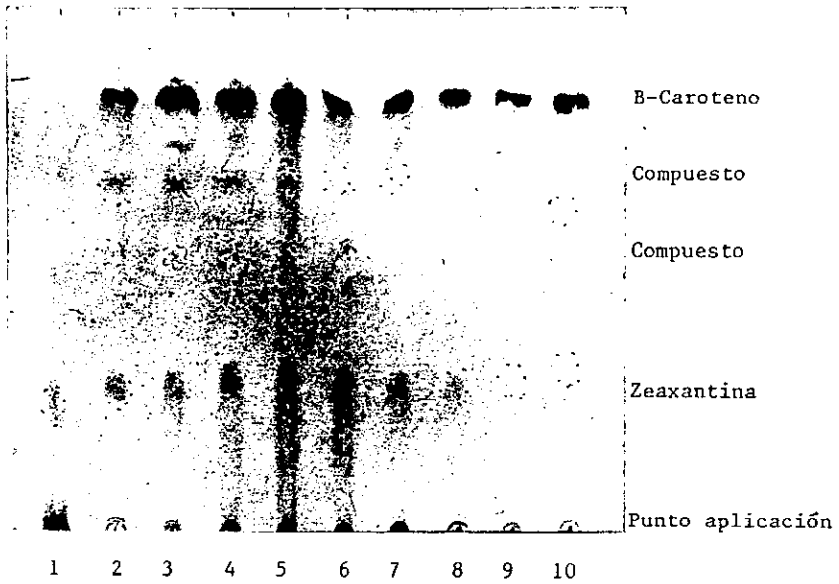


Figura 16. Análisis cromatográfico 5 del experimento 3 del diseño factorial. Fermentación 200 rpm, 2 vvm y 1.6% licor de maíz. Carriles: 1. Estándar de zeaxantina, 2. 0 h, 3. 8 h, 4. 17 h, 5. 24 h, 6. 48 h, 7. 72 h, 8. 96 h, 9. 120 h.

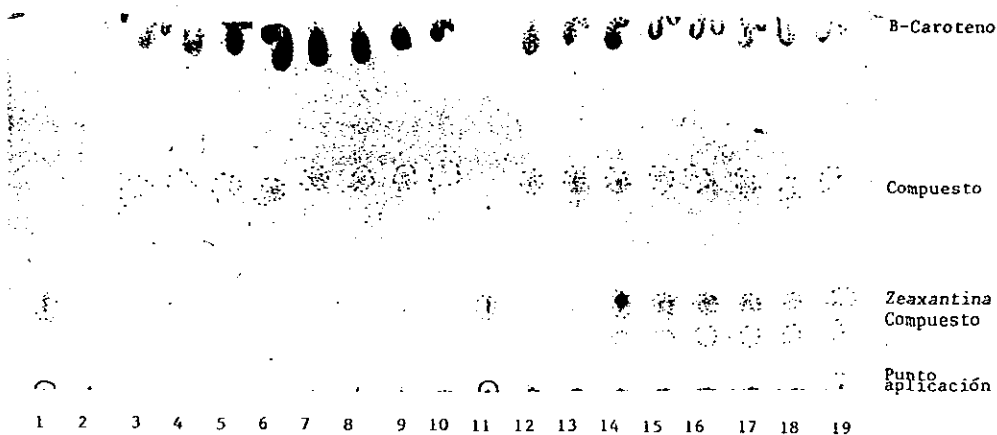


Figura 17. Análisis cromatográfico 6 del experimento 4 del diseño factorial. Fermentación 600 rpm, 2 vvm y 1.6% licor de maíz. Carriles: 1. Estándar de zeaxantina, 2. Estándar β -Caroteno, 3. 10 h, 4. 10 h, 5. 48 h, 6. 48 h, 7. 72 h, 8. 72 h, 9. 120 h, 10. 120 h. Otros carriles fermentación 600 rpm, 1 vvm y 4.6% licor de maíz.

9.3.2. Experimentos restantes (segunda parte)

En los siguientes cuatro experimentos de la Tabla 4 se pudo observar que los factores agitación y aereación estuvieron en sus niveles máximos (+) y mínimos (-) y el tercer factor concentración de licor de maíz estuvo en su nivel máximo (+) de 4.6%.

El objetivo de estos experimentos fue el observar como se ve afectada la producción volumétrica de zeaxantina, carotenoides y crecimiento, bajo las diferentes condiciones de agitación, aereación y una concentración de licor de maíz mayor que en los experimentos anteriores. Este incremento se pensó sobre la base de que el licor de maíz es una fuente rica en aminoácidos, minerales y factores suplementarios de crecimiento (Gierhart y Dennis, 1992). *Flavobacterium* sp. 21588 para aumentar la producción de zeaxantina necesita de estos aminoácidos y factores suplementarios de crecimiento (Alcántara, 1995).

En las figuras 18, 19 y 20 se muestran las cinéticas de crecimiento, producción de carotenoides y de zeaxantina de los experimentos 5 al 8 de la matriz experimental. En la primer figura se observó una fase "lag" dentro de las primeras 8 h de la fermentación, pasada esta hora el microorganismo entró en la fase exponencial encontrándose en los cuatro experimentos a las 24 h el máximo crecimiento, posteriormente a esta hora entró a una fase estacionaria en donde el crecimiento se mantuvo constante hasta las 72 h de la fermentación, después de esta hora experimentos 6 y 8 entraron a la fase de lisis. Los experimentos en los que hubo mayor crecimiento fueron el 8 (los tres factores en su nivel alto) y 6 (dos factores en nivel alto, exceptuando la aereación), estos fueron diferentes por el factor aereación, se observó que al pasar este factor de su nivel (-) a su nivel (+) hubo una diferencia en el crecimiento de 1.6 veces más. En los experimentos 5 (dos factores en su nivel bajo, exceptuando el licor de maíz) y 7 (dos factores en su nivel alto, exceptuando la agitación) se vio que tuvieron en común el factor agitación éste estuvo en su nivel (-) y el licor de maíz estuvo en el nivel (+), el factor determinante en estos dos experimentos fue la aereación que paso de su nivel (-) a su nivel (+) y el resultado de esta diferencia afectó el crecimiento en 1.8 veces. Con base a estos resultados y comparaciones se vio que dentro de los factores estudiados el que más influyó positivamente en el crecimiento fue la aereación.

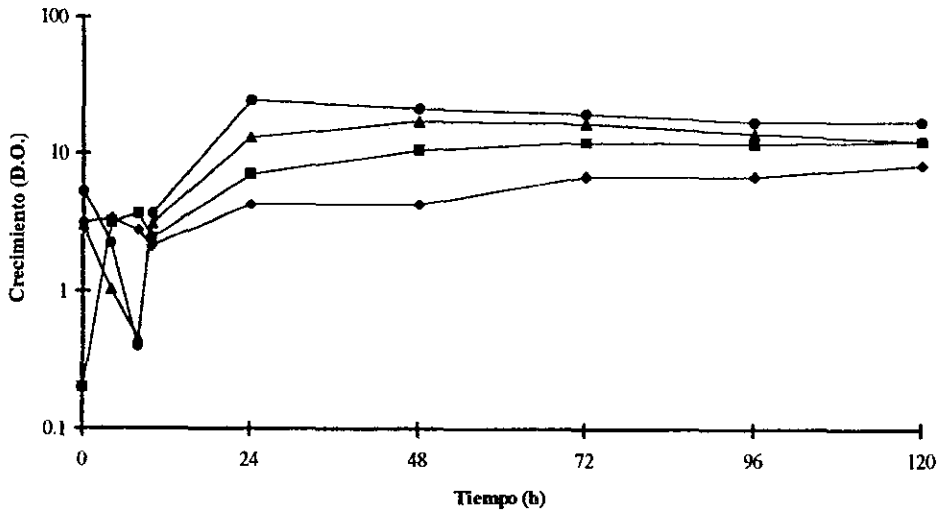


Figura 18. Cinética de crecimiento de los cuatro experimentos restantes de la matriz experimental con *Flavobacterium* sp. 21588. Símbolos: Experimento 5 (◆); Experimento 6 (▲); Experimento 7 (■); Experimento 8 (●).

Haciendo una comparación con los primeros cuatro experimentos de la matriz del diseño factorial podemos decir que los factores aereación y licor de maíz estimularon el crecimiento. Comparando los experimentos 4 (niveles altos de la agitación y aereación exceptuando el licor de maíz) y 8 (niveles altos de los tres factores) en los que se varió únicamente el factor concentración de licor de maíz que paso de su nivel (-) a su nivel (+) se tuvieron resultados de 9.99 y 19.6 respectivamente. Esto corroboró con lo encontrado en la literatura por Gierhart y Dennis (1992) y Buchanan y Gibbons (1980) quienes comentaron que el licor de maíz estimula favorablemente el crecimiento de *Flavobacterium* gracias a la presencia de factores suplementarios de crecimiento y su alto contenido en aminoácidos.

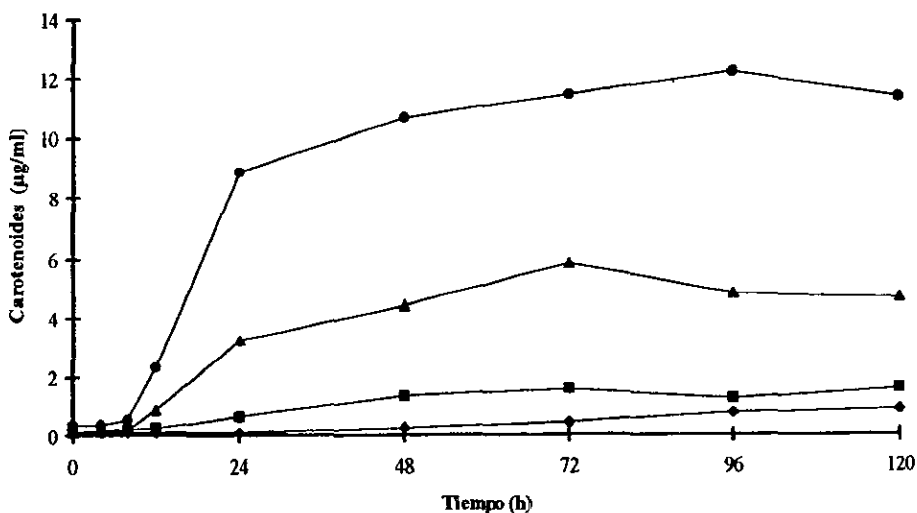


Figura 19. Cinética de la producción volumétrica de carotenoides de los cuatro experimentos restantes de la matriz experimental con *Flavobacterium* sp. 21588. Símbolos: Experimento 5 (◆); Experimento 6 (▲); Experimento 7 (■); Experimento 8 (●).

En la figura 19 se observó que la producción de carotenoides, empezó en la fase estacionaria del crecimiento de *Flavobacterium* sp. 21588, manteniendo una tendencia de incremento en toda la fermentación, y alcanzando su máxima producción a las 72 h. Los experimentos en los que hubo mayor producción fueron el 8 (tres factores en sus niveles altos) y el 6 (dos factores en sus niveles altos exceptuando la aereación), la diferencia de producción al pasar este factor de su nivel (-) a su nivel (+) fue de 1.95 veces más, esto quiso decir que al aumentar el flujo de aire de 1 vvm a 2 vvm se logró que la producción de carotenoides aumentara de 5.82 a 11.4 µg/ml. En los experimentos 5 (dos factores en sus niveles bajos exceptuando el licor de maíz) y el 7 (dos factores en sus niveles altos exceptuando la agitación), al pasar el factor aereación de su nivel (-) a

su nivel (+) la producción se vio aumentada 2.10 veces más, haciendo que la producción aumentara de 0.74 a 1.56 $\mu\text{g/ml}$.

En comparación con los cuatro primeros experimentos se vio claramente el impacto que tuvo el factor licor de maíz en la producción de carotenoides, comparando el experimento 4 (dos factores en sus niveles altos, exceptuando el licor de maíz) y 8 (los tres factores en sus niveles altos) se tuvieron valores que fueron desde 0.102 $\mu\text{g/ml}$ y 11.46 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, estos experimentos se pudieron comparar por que lo único que varío fue la concentración de licor de maíz que paso de 1.6% a 4.6% y se tuvieron en sus valores altos la agitación y la aereación.

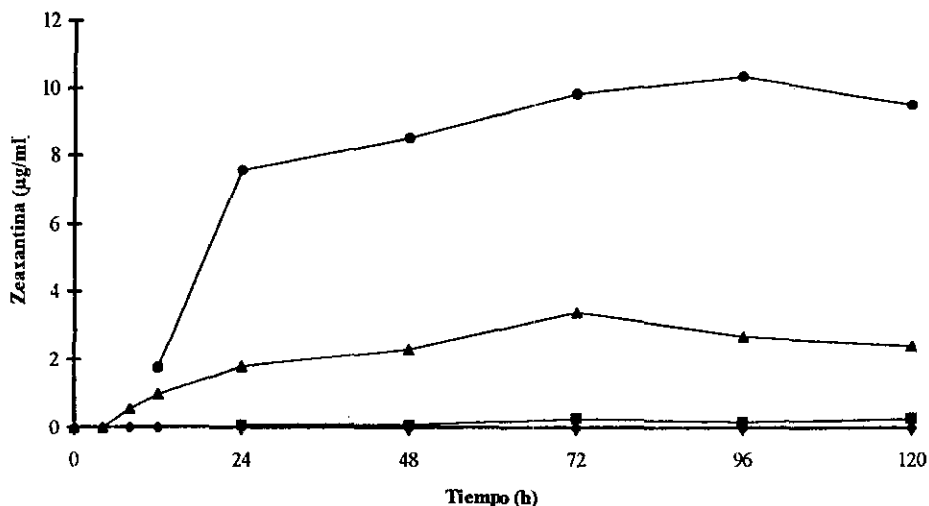


Figura 20. Cinética de la producción volumétrica de zeaxantina en los cuatro experimentos restantes de la matriz experimental con *Flavobacterium* sp. 21588. Símbolos: Experimento 5 (◆); Experimento 6 (▲); Experimento 7 (■); Experimento 8 (●).

La producción volumétrica de zeaxantina se vio favorecida con el aumento en la concentración de licor de maíz. En la figura 20 se pudo observar que hubo dos condiciones en las que se produjo una cantidad mayor de zeaxantina, tal fue el caso del experimento 6 y 8, en estos experimentos se manejó una concentración de licor de maíz de 4.6% y lo que varío fue el flujo de aire pasando de un nivel de 1 vvm a 2 vvm y la diferencia en la producción fue de 6.45 $\mu\text{g/ml}$. En el

experimento 5 en donde los niveles de agitación y aereación fueron bajos no hubo producción de zeaxantina a pesar de que la concentración de licor de maíz se aumentó, en el experimento 7 cuya condición fue el aumentar el flujo de aire hubo poca producción de zeaxantina 0.27 $\mu\text{g/ml}$ y cuando se trabajó con niveles altos de agitación como fue el caso de los experimentos 6 y 8 la producción de zeaxantina aumentó 3.38 $\mu\text{g/ml}$ y 9.83 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Es muy importante resaltar que la concentración del licor de maíz fue muy importante para la producción de zeaxantina, esto se pudo corroborar comparando los experimentos 4 y 8 en los que sólo se varió la concentración de licor de maíz y los resultados experimentales obtenidos fueron 0.026 $\mu\text{g/ml}$ y 9.83 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. No fue sólo importante la concentración de licor de maíz para la producción volumétrica de zeaxantina, también lo fue para la producción volumétrica de carotenoides y crecimiento de *Flavobacterium* sp. 21588.

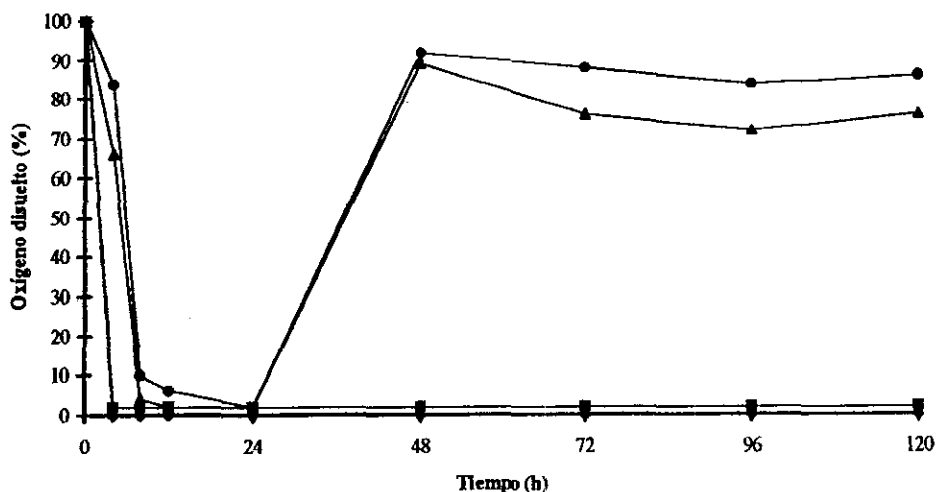


Figura 21. Evolución del oxígeno disuelto en el medio en los cuatro experimentos restantes de la matriz experimental. Símbolos: Experimento 5 (◆); Experimento 6 (▲); Experimento 7 (■); Experimento 8 (*).

En la figura 21, perfil del oxígeno disuelto en el medio para los diferentes experimentos desarrollados (5, 6, 7 y 8) se observó que en sólo dos condiciones el oxígeno se recuperó en los experimentos 6 y 8. En estas condiciones fue cuando se presentó una producción volumétrica más grande de zeaxantina, carotenoides y crecimiento de *Flavobacterium* sp. 21588. En los experimentos 5 y 7 de la misma figura, el oxígeno disuelto nunca se recuperó y bajo estas

condiciones no hubo producción de zeaxantina o fue muy poca. Por medio de la técnica por cromatografía en capa fina (figuras 22, 23, 24 y 25) se pudieron separar diferentes pigmentos además de la zeaxantina, sin embargo, la identificación de estos no se pudo realizar, se tuvieron como referencia sus Rf que fueron: para zeaxantina 0.22; para β -Caroteno 0.98; compuesto A 0.085; compuesto B 0.1707, y compuesto C 0.5.

Con esto se quiere decir que para que pueda haber una producción de zeaxantina se necesita de una cantidad de oxígeno determinada, se vio que con poco oxígeno en el medio de cultivo se formaron compuestos desconocidos a parte de zeaxantina, y con oxígeno suficiente en el medio de cultivo se formaron zeaxantina y pocos compuestos.

En la tabla 5 se observaron los resultados de estos experimentos y lo que se vio fue que para la producción volumétrica de carotenoides, zeaxantina y crecimiento sus máximas producciones fueron cuando las tres variables estuvieron en sus máximos niveles esto fue 600 rpm, 2 vvm y 4.6% de licor de maíz.

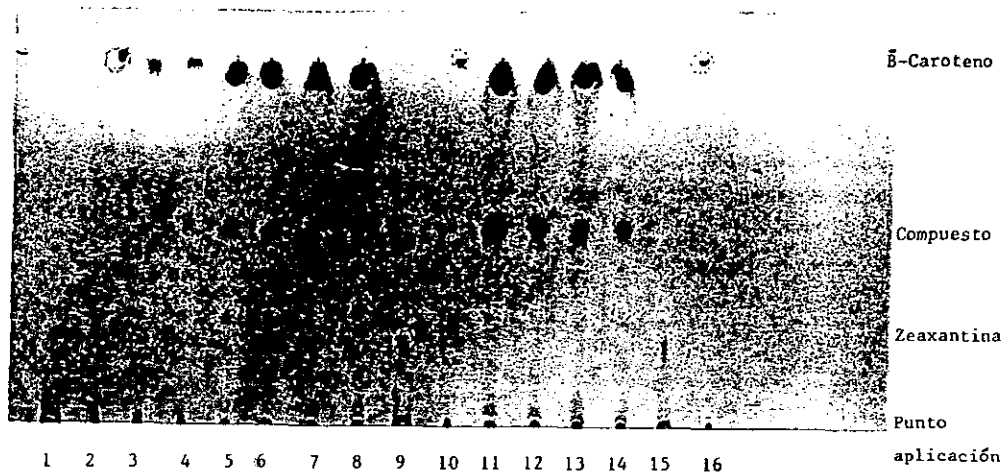


Figura 22. Análisis cromatográfico 7 del experimento 5 del diseño factorial. Fermentación 200 rpm, 1 vvm y 4.6% licor de maíz. Carriles: 1. Estándar de zeaxantina, 2. Estándar β -Caroteno, 3. Medio de cultivo, 4. Medio de cultivo 5. 9 h, 6. 9 h, 7. 48 h, 8. 48 h, 9. Estándar de zeaxantina, 10. Estándar de β -Caroteno, 11. 72 h, 12. 72 h, 13. 120 h, 14. 120 h, 15. Estándar de zeaxantina, 16. Estándar β -Caroteno.

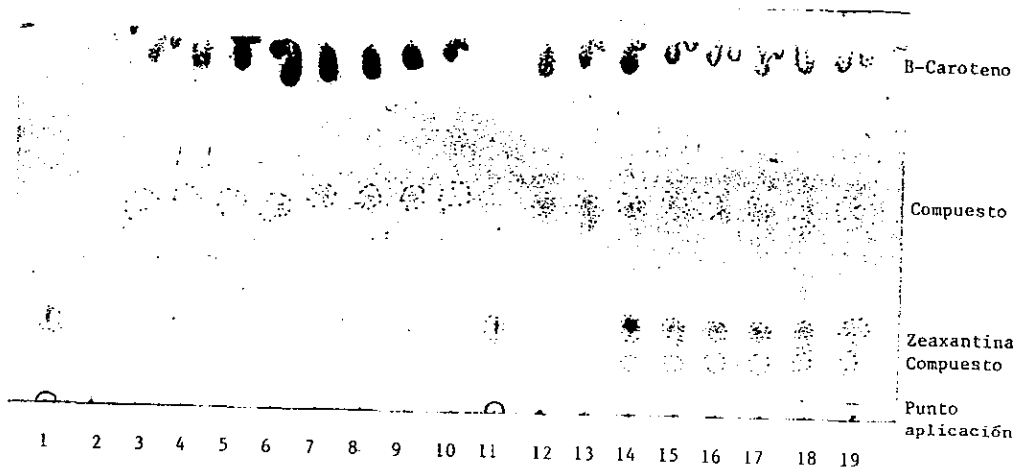


Figura 23. Análisis cromatográfico 8 del experimento 6 del diseño factorial. Fermentación 600 rpm, 1 vvm y 4.6% licor de maíz. Carriles: primeros 10 fermentación 600 rpm, 2 vvm y 1.6% licor de maíz. 11. Estándar de zeaxantina, 12. 9 h, 13. 9 h, 14. 48 h, 15. 48 h, 16. 72 h, 17. 72 h, 18. 120 h, 19. 120 h.

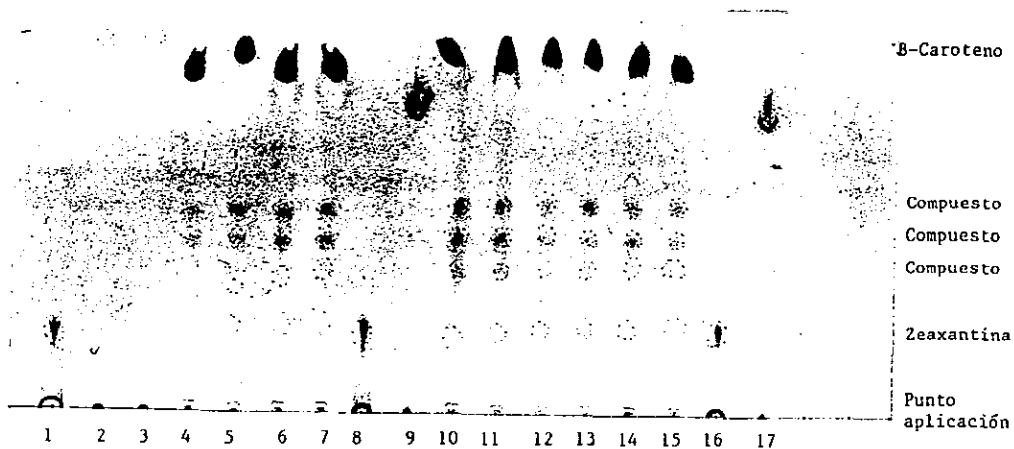


Figura 24. Análisis cromatográfico 9 del experimento 7 del diseño factorial. Fermentación 200 rpm, 2 vvm y 4.6% licor de maíz. Carriles: 1. Estándar de zeaxantina, 2. Inóculo, 3. Inóculo, 4. 10 h, 5. 10 h, 6. 24 h, 7. 24 h, 8. Estándar de zeaxantina, 9. Estándar de β -Caroteno, 10. 72 h, 11. 72 h, 12. 96 h, 13. 96 h, 14. 120 h, 15. 120 h, 16. Estándar de zeaxantina, 17. Estándar de β -Caroteno.



Figura 25. Análisis cromatográfico 10 del experimento 8 del diseño factorial. Fermentación 600 rpm, 2 vvm y 4.6% licor de maíz. Carriles: 1. Estándar de zeaxantina, 2. Medio de cultivo, 3. Medio de cultivo, 4. Medio de cultivo, 5. 11 h, 6. 11 h, 7. 24 h, 8. 24 h, 9. 72 h, 10. 72 h, 11. Estándar de zeaxantina, 12. Estándar de β -Caroteno, 13. 96 h, 14. 96 h, 15. 120 h, 16. 120 h, 17. Estándar de zeaxantina, 18. Estándar de β -Caroteno.

9.4. Análisis de compuestos adicionales obtenidos en el proceso de producción de zeaxantina.

En los experimentos realizados hasta ahora se observó, por medio de la técnica de cromatografía en capa fina, la formación de zeaxantina y de algunos de los compuestos adicionales obtenidos en las fermentaciones realizadas. En la figura 26 se muestran los datos expresados en porcentaje de los diferentes carotenoides encontrados.

En el experimento 1, cuando se trabajó con los niveles bajos de las tres variables, se observó la presencia de zeaxantina, dos compuestos y β -Caroteno, siendo el primer compuesto más polar que los demás pero menor que la zeaxantina. En contraste, en el experimento 8, cuando se trabajó con los niveles altos de las tres variables un gran porcentaje fue zeaxantina y uno pequeño fue β -Caroteno, en esta condición no se registró la presencia de compuestos.

Cuando se trabajó con un nivel de agitación alto (600 rpm) y una concentración baja de licor de maíz (exp 2), se observó que la producción de zeaxantina fue del 100%, no registrándose ningún compuesto adicional. Y cuando se trabajó con el mismo nivel de agitación pero con una concentración mayor de licor de maíz (exp 6 y 8) se observó que un gran porcentaje fue zeaxantina, hubo formación de β -Caroteno y en menor proporción un compuesto que decidimos llamar compuesto 1.

En contraste, cuando se trabajó con niveles bajos de agitación y una concentración baja de licor de maíz (exp 1, 3) se registró poca formación de zeaxantina y grandes porcentajes de los otros carotenoides como β -Caroteno, y compuestos adicionales 1 y 2. Con los mismos niveles de agitación pero con una concentración mayor de licor de maíz (experimentos 5 y 7) se observó el mismo patrón, poca formación de zeaxantina, pero gran acumulación de β -Caroteno y otros compuestos.

Con estos resultados se puede concluir que para que se forme la zeaxantina, que es un oxicarotenoide se necesita la presencia de oxígeno (Britton y Goodwin, 1974). En un fermentador, el oxígeno se suministró de dos maneras por medio de la agitación y por medio de la aereación que es la entrada de aire u oxígeno al reactor. En las fermentaciones realizadas cuando el oxígeno se abatía rápidamente y nunca se recuperaba la formación de zeaxantina era poca, en contraste la formación de β -Caroteno y compuestos adicionales aumentaba. En los casos contrarios, cuando el oxígeno se abatía rápidamente y se recuperaba posteriormente, la formación de zeaxantina aumentaba en comparación con las condiciones anteriores y la formación de β -Caroteno y compuestos adicionales disminuía. Por lo que se pudo concluir que para que se de la formación de zeaxantina, fue necesario una concentración determinada de oxígeno en el medio de cultivo, como sucede en algunos casos para la producción de metabolitos secundarios. Ioannis, *et al*, (1996) reportó que una alta producción de β -lactamasa se dio en condiciones altas de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, en cambio cuando se trabajó con niveles bajos de oxígeno disuelto la producción de β -lactamasa disminuyó considerablemente, además de que se prolongó la fase "lag" del microorganismo. Así también Henriksen, *et al*, (1997) reportó que a concentraciones altas de oxígeno disuelto en el medio favorece la

producción de penicilina, en contraste cuando disminuye esta concentración favorece la producción de subproductos de ésta.

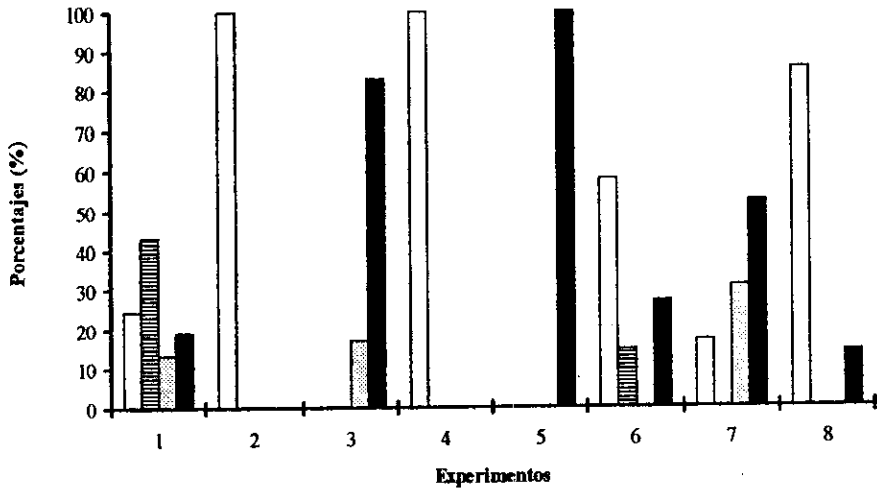


Figura 26. Zeaxantina, β -Caroteno y otros compuestos medidos en porcentajes de los ocho experimentos realizados a las 72 h. Símbolos: Zeaxantina (\square); Compuesto 1 (\equiv); Compuesto 2 (\square); β -Caroteno (\blacksquare).

9.5. Análisis de factores principales e interacciones.

En virtud de que a las 72 h de la fermentación los cultivos se encontraban ya en fase estacionaria, para determinar los efectos de los factores se consideraron los valores de crecimiento, carotenoides y de zeaxantina a esta hora. Al comparar el experimento 1 con el experimento 8 (Tabla 5) se observó que al cambiar todos los factores de (-) a (+) se obtuvo un crecimiento de 12 veces más, una producción volumétrica de carotenoides 7.9 veces mayor y una producción volumétrica de zeaxantina 28 veces mayor, lo que indicó claramente el efecto positivo de aumentar el nivel de los factores estudiados. Sin embargo, un análisis completo requirió que los resultados de los ocho experimentos se consideraran para estimar los efectos debidos a cada factor, tal como se muestra en la figura 27. Como pudo observarse en la misma, los tres factores tuvieron un efecto positivo sobre el crecimiento, producción volumétrica de carotenoides y de zeaxantina. En los niveles de los factores estudiados, la concentración de licor de maíz fue el factor que más estimuló el crecimiento, mientras que la agitación y la aereación tuvieron efectos positivos pero menores. La producción volumétrica de carotenoides y de zeaxantina se estimularon al aumentar la concentración de licor de maíz y la agitación principalmente, mientras que la aereación tuvo un efecto positivo pero comparativamente menor.

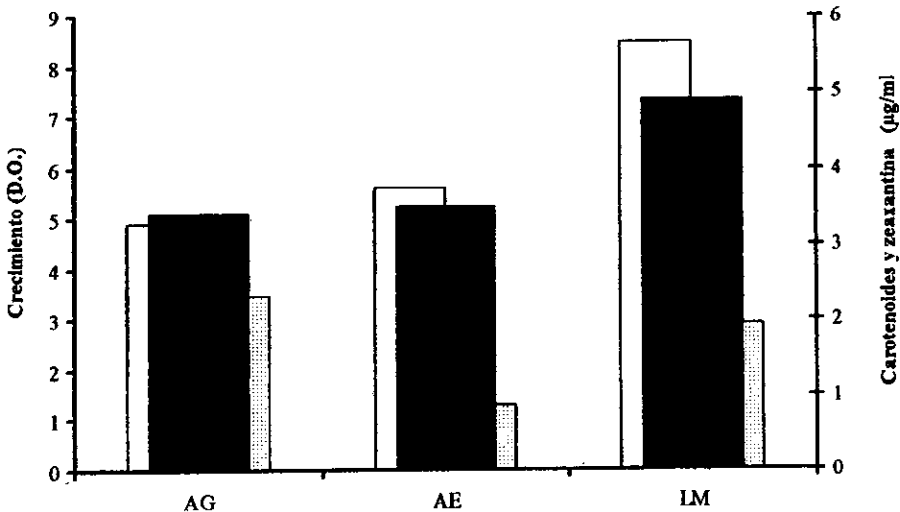


Figura 27. Comparación de efectos principales sobre el crecimiento y producción volumétrica de carotenoides y zeaxantina. En donde: AG=agitación; AE=aereación; LM=licor de maíz. Símbolos: Zeaxantina (≡); Carotenoides (■); Crecimiento (□)

Cuando se incrementa un factor y la respuesta depende del nivel de otro factor, se dice que hay una interacción (Montgomery, 1984). De las cuatro posibles interacciones entre los factores estudiados, [agitación-aereación (AG-AE); agitación-licor de maíz (AG-L); aereación-licor de maíz (AE-L); agitación-aereación-licor de maíz (AG-AE-L)] la interacción entre AG-LM fue la única que tuvo efectos positivos importantes sobre todas las respuestas estudiadas, en el caso de la producción volumétrica de carotenoides y de zeaxantina, el efecto debido a esta interacción fue del mismo orden de magnitud o ligeramente mayor que la debida a los efectos principales (figura 28). Velázquez (1995) reporto que la levadura *P. rhodozyma* requiere de niveles de saturación de oxígeno por arriba del 30% para la producción de carotenoides, este nivel lo obtuvo con altas velocidades de agitación en una jarra de cuatro litros.

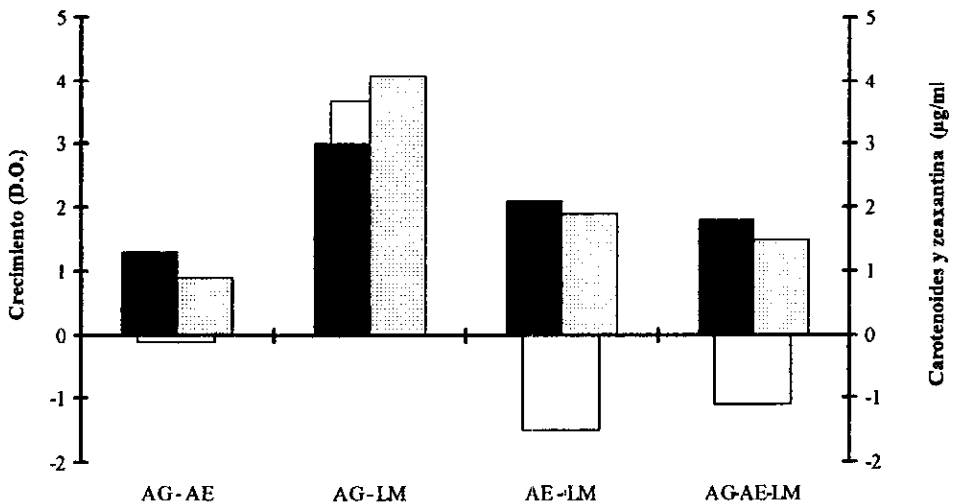


Figura 28. Interacciones de los factores sobre las respuestas crecimiento y producción volumétrica de carotenoides y zeaxantina. En donde AG=agitación; AE=aereación; LM=licor de maíz. Símbolos: Zeaxantina (≡); Carotenoides (■); Crecimiento (□).

Las interacciones AE-LM y AG-AE-LM tuvieron efectos negativos sobre el factor crecimiento, los valores obtenidos en la figura 28 son importantes porque indicaron que estaban afectando de manera negativa el factor en estudio, peor no fueron suficientemente significativos para disminuir el crecimiento.

La naturaleza de la interacción AG-LM pudo analizarse mejor con la ayuda de las figuras 29 y 30 en las que se incluyeron los resultados de los cuatro experimentos

con una aereación alta (+). En la figura 29 se pudo observar que cuando la agitación fue alta, la producción de carotenoides y de zeaxantina se incrementaron notablemente al aumentar la concentración de licor de maíz de 1.6 a 4.6%, sin embargo si la agitación fue baja no se observó una respuesta apreciable. Se sabe que la desaturación de algunos intermediarios de la ruta de biosíntesis de zeaxantina, así como la oxidación de sus precursores, requieren de un nivel mínimo de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (Britton, 1985; Mc Dermott, *et al*, 1974). Cuando la agitación fue baja, el factor limitante para la producción de carotenoides y de zeaxantina fue la disponibilidad de oxígeno, de aquí que un incremento en la concentración de licor de maíz no produjera un aumento significativo en ninguna de ellas. En contraste, cuando la agitación fue alta, hubo una mayor disponibilidad de oxígeno (Van't Riet y Tramper, 1991), de manera que al incrementar la concentración de licor de maíz se produjo un aumento considerable en el crecimiento y en la producción de carotenoides y zeaxantina.

Por lo que toca al crecimiento, en la figura 30 se observó que en el nivel bajo de agitación, un aumento en la concentración de licor de maíz de 1.6 a 4.6% produjo un incremento del 58% en el crecimiento, mientras que con un nivel de agitación alto, el mismo aumento en la concentración de licor de maíz produjo un aumento del 100%.

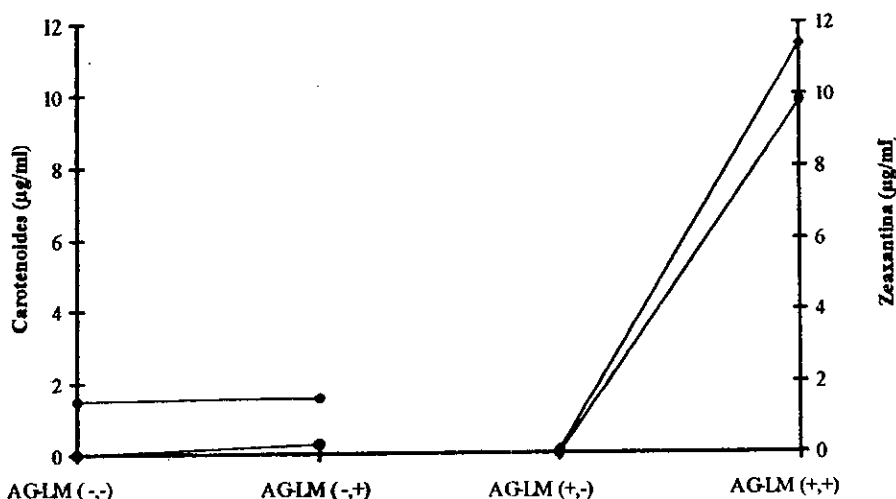


Figura 29. Efectos sobre la producción de carotenoides y de zeaxantina al aumentar la concentración de licor de maíz de 1.6 a 4.6%, a baja y alta agitación (en todos los casos la aereación fue alta). AG=agitación; LM=licor de maíz. Símbolos: Carotenoides (♦); Zeaxantina (◐).

La interacción AE-LM tuvo también un efecto estimulante sobre la producción de carotenoides y de zeaxantina, pero en menor grado que la interacción AG-LM. Es bien conocido que el coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}) depende de la velocidad de agitación y de la aereación de acuerdo a la ecuación $k_{La} = a (N)^b (F)^c$ en la que F es el flujo volumétrico de aire (vvm); N es la velocidad de agitación (rpm); a, b y c son constantes (Van't Riet y Tramper, 1991; Aiba, *et al*, 1973). El exponente "b" relacionado a la agitación, tiene valores de 1.2 a 2.1, mientras que el exponente "c" relacionado con la aereación generalmente esta en el rango de 0.2 a 0.5. Si además se considera que la aereación se varió sólo por un factor de dos, y la agitación por un factor de tres, estas diferencias explican porque al aumentar la agitación, se tiene un mayor efecto sobre la oxigenación del medio y la producción de carotenoides en comparación con el efecto de la aereación.

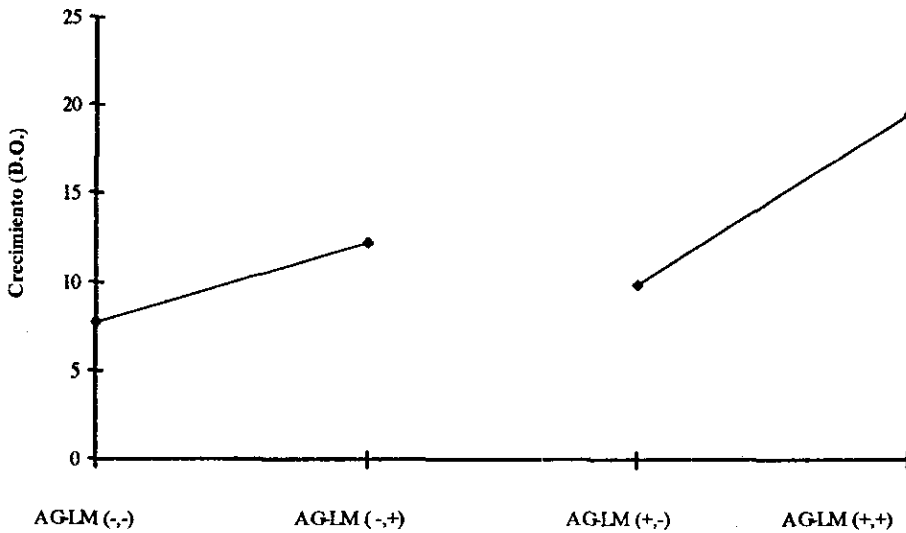


Figura 30. Efectos sobre el crecimiento al aumentar la concentración de licor de maíz de 1.6 a 4.6%, a baja y alta agitación (en todos los casos la aereación fue alta). AG=agitación; LM=licor de maíz. Símbolo: Crecimiento (♦).

Estas observaciones concordaron bien con el mayor efecto principal de la agitación en comparación con la aereación, así como con el mayor efecto de la interacción AG-LM en comparación con la interacción AE-LM.

10. CONCLUSIONES

De los experimentos realizados en matraz, se pudo concluir que la máxima producción volumétrica de zeaxantina se obtuvo cuando la fracción de llenado fue del 10%, conforme aumento la relación medio de cultivo-matraz empleado, la presencia del oxicarotenoide disminuyo y aumento la de β -Caroteno. Esto indico que cuando la presencia de oxigeno en el matraz fue mayor, se favoreció la producción de zeaxantina disminuyendo la presencia de los intermediarios como β -Caroteno.

Cuando se aumento la cantidad de licor de maíz en el medio de cultivo, trabajando con una fracción de llenado del 10%, se obtuvo una mayor producción de zeaxantina pero, además de la misma manera aumentaron los carotenoides y se observo la presencia de compuestos aun no identificados por nuestro grupo.

La realización de un diseño experimental fue de gran utilidad para poder determinar la importancia de los factores que afectan la producción de zeaxantina, y carotenoides. De los experimentos realizados a nivel de fermentador todos los factores estudiados (agitación, aereación y concentración de licor de maíz) tuvieron un efecto positivo sobre la producción de carotenoides, zeaxantina y crecimiento, los valores más altos de estas tres respuestas se obtuvieron cuando se usaron conjuntamente los niveles altos (+) de los tres factores estudiados. La agitación y la concentración de licor de maíz tuvieron los efectos principales más importantes, pero la interacción entre estos dos factores (AG-LM) fue también muy relevante. La aereación y la interacción (AE-LM) fueron de menor importancia que los efectos arriba descritos, pero sin embargo significativos.

De lo anterior se desprende que incrementando la agitación, la aereación y la concentración de licor de maíz más allá de los niveles estudiados se podrían esperar todavía mejores respuestas, sin embargo se debe considerar que al incrementar aun más la agitación y la aereación, tarde o temprano se formará espuma, como fue el caso en algunos de los experimentos a 600 rpm. A mayores velocidades de agitación podría también presentarse lisis celular debido a un aumento en el esfuerzo de corte. Al aumentar la aereación podría presentarse el fenómeno de "canalización" que como su nombre lo indica, se forman canales de aire, de este modo, la velocidad de agitación que se emplea no es la suficiente para romperlo y el aire que entra al fermentador no es dispersado adecuadamente.

En esta misma jarra de fermentacion se podrían probar diferentes tipos de impulsores como son: la propela de tres paletas, un cordón helical, o una turbina rushton con diferentes ángulos; así como también se podrían probar diferentes tipos de impulsores en una misma flecha para tener un mejor mezclado del medio de cultivo. Para solucionar el problema de una alta aereación se podría cambiar el tipo de difusores intentando tener una mayor cantidad de oxigeno en el medio de cultivo probando el anillo o uno en forma de cruz que tienen varios orificios de salida de aire, o los platos porosos que permiten la salida de aire en forma de burbujas muy pequeñas y en una mayor cantidad.

Otra manera de mejorar la producción de zeaxantina sería cambiar el tipo de fermentador, cambiar por una jarra con geometría diferente a la jarra de cuatro litros con la que se trabajó. El cambio de los impulsores o dispersores no representan un alto costo económico y serían propuestas viables para continuar con este estudio, en cambio cambiar el tipo de fermentador si lo sería.

Por otra parte, es bien sabido que niveles altos de glucosa inhiben la formación de carotenoides en *Flavobacterium* sp. 21588, de manera que al aumentar todavía más la concentración de licor de maíz podría esperarse un fenómeno de este tipo. Sin embargo esta dificultad podría resolverse usando otras estrategias de fermentación como el cultivo en lote alimentado, en el que el licor de maíz podría adicionarse gradualmente para evitar un problema de represión catabólica.

11. REFERENCIAS

- Arancia S.A. de C.V. (1994). *Análisis proximal de licor de maíz*.
- Aiba S. Humphrey A.E. and Millis F.N. (1973). Aeration and agitation. In: *Biochemical Engineering*. 2nd. New York: Academic Press. pp. 163-181.
- Alcántara SJ. (1995). Estudio del efecto de los factores nutricionales sobre la producción de zeaxantina en una cepa productora del carotenoide. Tesis de Maestría. UNAM. (Facultad de Química). México
- Bailey J and Ollis D. (1977). *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York, McGraw Hill Book Company.
- Bauernfeind C. J. (1981). Natural Food Colors. In: Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. New York: Academic Press. pp:1-26
- Bautista Araceli. (1995). Selección de una bacteria productora de zeaxantina y optimización del medio de producción. Tesis Licenciatura. UNAM (Facultad Química). México
- Box GE Hunter W. and Hunter SJ. (1989). Diseños factoriales a dos niveles. En: *Estadística para investigadores*. Barcelona: Reverté, S.A. pp:317-362
- Britton, G. (1985). General Carotenoids Methods. In *Methods in Enzymology III*, pp 113-149.
- Britton, G (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*. 9:1551-1558.
- Buchanan RE and Gibbons NE (1980). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8^a edition. Baltimore, The Williams and Wilkins Co. pp:308-313,529-542
- Crueger W. and Crueger A (1982). Biotechnology: a textbook of Industrial Microbiology 2^a edition. Sunderland, MA. Sinauer Associates Inc.
- Davis, (1987). Oxygen Radicals and Human Disease. *Ann Int Med*. 107: 526-545.
- Dasek, J; Shepherd, D y Traelnes, KR. (1973). *Procedé, de fabrication de zeaxanthine*. International Patente Bélgica / 790289.
- Freedman, D. (1969). The shaker in bioengineering. *Process Biochem*. March:35-40
- Gherna; Pienta, MS. (1992). *Catalogue of Bacteria and Bacteriophages*. American Type Culture Collection 18th edition.

Gierhart, DL and Dennis. L. (1992). *Production of zeaxanthin and zeaxanthin-containing compositions*. International Patente Fenton / 5308759.

Goodwin, TW. (1971) Carotenoid biosynthesis In: *Carotenoids*. New York: Birkhauser Verlag Basel.

Goodfellow, M; et al. (1976). Numerical taxonomy of some yellow-pigmented bacteria isolated from plants. *J Gen Microbiol* 97:219-233

Harnby N; Edwards FM. and Nienow W. A. (1985). A review of liquid mixing equipment. In : *Mixing in the process industries*. London : Butterworths and Co. pp: 115 -118.

Henriksen, MC; et al.(1997). Influence of the dissolved oxygen concentration on the penicillin biosynthetic pathway in steady-state cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Prog* 13, 776-782

Ioannis, G; et al. (1996). Effect of oxygen limitation on B-lactamase production. *Biotechnol. Progr.* Vol 12 No 6: 786-792

Johnson AE and Lewis MJ (1979). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Journal of general microbiology*. 115:173-183

Johnson E. A. Schroeder W. A. (1995). Microbial Carotenoids. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, Vol 53.

Karow, EO; Bartholomew, E and Sfat, R (1953). Oxygen transfer and agitation. *Agric Food Chem.* 1 (4):302-306.

Kin-Ying, T; Erh-Min, L; Kan-Ying, L; Tsuey-Pin, L; Chien-Hui, H; Chi-Liang, C; Yu-Sun, C and Shih-Tung, L (1994). Analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Erwinia herbicola* Eho 13. *Microbiology* 140: 331-339

Klauri, H and Bauernfeind, C J. (1981). Carotenoids as food colors. In *Carotenoids as colorants*. New York, Academic Press, pp. 48-317.

Lee, SC; Hwang, YB; Chang, HN; Chang, YK (1991). Adaptive control of dissolved oxygen concentration in a bioreactor. *Biotechnol. Bioeng* 37: 597-607

Manual para CAMAG TLC Software (1990). Cats versión 3.1.

Mc Dermott, G; Brow, J and Britton, G. (1974). Alternative pathways of zeaxanthin biosynthesis in a *Flavobacterium* species. *Biochem, J.* 144: 231-244

Mc Neil, B; Harvey, L.M. (1990). *Fermentation a practical approach*. IRL PRESS.

Montgomery, DC(1984). *Design and analysis of experiments*. 2^a ed John Wiley and sons

Nelis, JH and De Leenheer, PA. (1989). Microbial production of carotenoids other than β -carotene. In Biotechnology of vitamins, pigments and grow factors. New York, Elsevier Applied Science pp: 443-80

Orndorff SA Campbell EA and Medwid RD (1994). *Zeaxanthin producing strains of Neospengiococcum excentricum*. Pat. No, 05,360,730.Fort Collins,Co. U.S.A.

Oldshue Y James (1985). Mechanical design of fluid mixers. In: *Fluid mixing technology* New York, Mc Graw Hill. pp 375-390

Rose A. H. (1979). Secondary products of metabolism. Vol 3 Economic Microbiology. London, Academic Press.

Sandmann G; Schmidt A. and Schnurr G (1990). *FEMS Microbiol. Lett* 71: 77-82

Schnurr G; Schmidt A and Sandmann G (1991). *FEMS Microbiol. Lett.* 78: 157-162

Schwartz R. Rosas R. Farrés A. Paredes L. y Sánchez S. (1989). Producción microbiana de carotenoides y perspectivas de su utilización. *BEB Vol 8* No 3 Septiembre. Mexico. D. F.

Stahl, E (1969). Thin- Layer Chromatography a Laboratory Handbook. 2^a New York, Sringer-Verlag Berlin. Hardelberg. 68: 264-274.

Steel, R (1958). Biochemical Engineering. Unit process in fermentation. London Heywood & Company.

Van't Riet K. and Tramper J. (1991). Mass transfer. In : Basic Bioreactor Design. New York : Marcel Dekker. pp. 236-274

Vardar, B. and Sukan, F. (1985). Dynamics of oxygen mass tranfer in bioreactors I. New York, *Process biochemistry.* 20 (6): 181-184.

Velázquez M Elia (1995). Producción de astaxantina por fermentación sumergida por *Phaffia rhodozyma*. Tesis de Maestría. UNAM (Facultad de Química)México



arancia, s. a. de c. v.

CERTIFICADO DE ANALISIS

CLIENTE: ENMEX S.A. DE C.V.

FECHA: 29 DE SEPTIEMBRE DE 1994.

PRODUCTO: NUTRIFERM LIQUIDO

No. CARROTANQUE: TAMBORES

LOTE: 9283

PARAMETRO	RESULTADO	ESPECIFICACION
°Baumé	27.7	
Sólidos, %	50.37	
pH:		
50% n/m		
directo	4.1	
Dextrosa Equivalente	1.1	
SO ₂ , ppm.		
Color:		
Original		
% Trasmittancia (0.4%, 610 nm)		
Absorbancia (0.4%, 610 nm)		
Viscosidad, Centipoises a 20 ° C.		
Insolubles, ppm.		
ACIDEZ LACTICA (BC.) %	14.2	


ELABORADO POR: VICENTE PALACIOS ORTEGA.
ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

ARANCIA, S. A. DE C. V.

FULTON No. 61 • TLALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO • C. P. 54030 • TEL.: 565-17-00

PARAISO No. 1944 • COL. DEL FRESNO • C. P. 44900 • GUADALAJARA, JAL. • TEL.: 611-97-97

I) ANALISIS GENERAL.

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

II) COMPOSICION DE LAS CENIZAS. % base seca.

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

III) MICROBIOLOGIA: col/ml.

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

IV) NITROGENO TOTAL Y SU DISTRIBUCION

1. NITROGENO TOTAL : 7.3 gr/100 gr de sólidos.

2. DISTRIBUCION EN % DEL NITROGENO TOTAL.

SOLUBLE	89.1
---------	------

Amino ácidos libres	36.9
Amoniaco libre	6.1
Péptidos	38.3
Nitrógeno cuaternario	1.0
Heterocíclicos	2.1
No identificados	4.7

INSOLUBLE	10.9
-----------	------

Proteína	9.9
No identificados	1.0

V. DISTRIBUCION DE AMINO-ACIDOS: Mg Nitrógeno/100 gr sólidos.

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

* = Amino-ácidos esenciales.

VI) VITAMINAS: mg/100 gr de sólidos.

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