



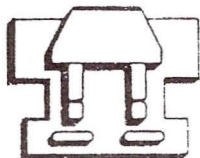
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

CAMPUS "IZTACALA"

EVALUACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE
ASTAXANTINA POR LA LEVADURA
ROJA *Phaffia rhodozyma* USANDO
DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
RICARDO ALFONSO JIMENEZ SUAREZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MA. TERESA PONCE NOYOLA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA
CINVESTAV-IPN



IZTACALA

MEXICO, D. F.

1999.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética Microbiana y bajo la dirección de la Dra. Ma. Teresa Ponce Noyola, en el departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

DEDICATORIAS

A DIOS

Quien sobre toda las cosas ha permitido que llegara a este momento.

A MIS PADRES

Juan Alfonso Jiménez y Olga Lourdes Suárez quienes han esperado este gran momento con gran ilusión y esperanza. A ellos solamente les doy las gracias.

A MI ESPOSA

Yenia Azamar Martínez que con su amor, confianza y dedicación, me ha alentado a cumplir una meta más en mi vida.

A MIS HERMANAS

Mireya y Monica por ayudarme en mi formación como persona y estudiante.

A MIS SOBRINOS

Isabel, Orlando, Viridiana, Brandon y Andrea por los momentos alegres que comparto con ellos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de una manera muy especial a la Dr. Ma. Teresa Ponce Noyola por el apoyo en la realización de este trabajo, por sus consejos, su gran paciencia y sobre todo por el sinnúmero de enseñanzas que de alguna manera me han preparado para seguir en el camino.

A Alfonso Farfán por su ayuda desinteresada, que de muchas maneras cooperó para llevar a cabo este trabajo.

A Juan Daniel Dzul Puc por su ayuda en los análisis estadísticos.

A los miembros del laboratorio: Toño, Angélica, Odilia, Lino, Yolanda por su amistad que me brindan y por su convivencia diaria.

A mis grandes amigos: Mauricio, Ramiro, Verónica, Nicolás, Karina y Mayra por su amistad y compañía en los momentos difíciles y alegres durante la carrera.

A todas aquellas personas que de algún modo me han alentado a superarme.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	54

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.	Fuentes de astaxantina. _____	16
TABLA 2.	Niveles máximos de producción de astaxantina y carotenoides totales producidos por diferentes cepas de <i>P. rhodozyma</i> . _____	23
TABLA 3.	Diseño factorial fraccionado 2^3 . _____	29
TABLA 4.	Composición de medios. _____	30
TABLA 5.	Resultados del diseño factorial por duplicado. _____	31
TABLA 6.	Efecto de diferentes relaciones C/N sobre la producción específica de astaxantina por <i>P. rhodozyma</i> . _____	33
TABLA 7.	Comparación de los parámetros cinéticos de la cepa silvestre y la cepa 79 Δ en medio M3 y M4. _____	44

LISTA DE FIGURAS

- FIG. 1 Estructura química de la astaxantina y de la cantaxantina.	12
- FIG. 2 Estructura química del astaceno.	12
- FIG. 3 Estructura química de isómeros configuracionales de la astaxantina.	13
- FIG. 4 Pasos involucrados en la síntesis de farnesilpirofosfato.	18
- FIG. 5 Vía de síntesis de astaxantina propuesta para <i>P. rhodozyma</i> .	19
- FIG. 6 Porcentaje de distribución normal.	36
- FIG. 7 Efecto de la melaza en la producción específica de astaxantina.	36
- FIG. 8 Efecto del extracto de levadura en la producción específica de astaxantina.	36
- FIG. 9 Efecto de la interacción melaza-sulfato de amonio en la producción específica de astaxantina.	37
- FIG. 10 Efecto de la interacción sulfato de amonio-extracto de levadura en la producción específica de astaxantina.	37
- FIG. 11 Porcentaje de distribución normal.	38
- FIG. 12 Efecto de la melaza en la producción volumétrica de astaxantina.	38
- FIG. 13 Efecto del extracto de levadura en la producción volumétrica de astaxantina.	38
- FIG. 14 Efecto del sulfato de amonio en la producción volumétrica de astaxantina.	38
- FIG. 15 Cinética de crecimiento y producción de astaxantina de la cepa silvestre en medio M4.	40
- FIG. 16 Cinética de crecimiento y producción de astaxantina de la cepa 79Δ en medio M4.	41
- FIG. 17 Cinética de crecimiento y producción de astaxantina de la cepa silvestre en medio M3.	42
- FIG. 18 Cinética de crecimiento y producción de astaxantina de la cepa 79Δ en medio M3.	43

RESUMEN

La levadura *Phaffia rhodozyma* produce un gran número de carotenoides, predominantemente astaxantina (Andrewes y col., 1976). Este pigmento es de gran importancia económica debido a que es incorporado en alimentos de peces y animales de granja, impartiendoles la coloración deseada y necesaria para la aceptación del consumidor (An y col., 1991). La astaxantina obtenida de fuentes naturales puede servir como una alternativa atractiva contra los pigmentos químicamente sintetizados. Un medio de crecimiento simple y económico puede reducir los costos de producción tanto de levadura como de carotenoides e incrementar la potencialidad comercial de *P. rhodozyma* como fuente natural de astaxantina.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo, en la producción específica de astaxantina por *P. rhodozyma*.

Los medios de cultivo probados, se formularon con sales grado industrial y melaza de caña. Se varió la fuente de nitrógeno y la concentración de la misma de manera tal que se tuvieran diferentes relaciones C/N. Así mismo se incluyó el medio complejo YM como un control. Se observó que el mayor rendimiento de astaxantina por la cepa mutante 79Δ, fue en el medio M4, con una relación C/N 0.8. Por otra parte, tanto el crecimiento como la producción de astaxantina de la cepa mutante fue superior a los presentados por la cepa silvestre creciendo en los mismos medios y en las mismas condiciones (Tabla 1).

A nivel fermentador, el medio M3 fue el más adecuado para la producción de astaxantina por la cepa mutante 79Δ, ya que la producción volumétrica fue 2.2 veces mayor que la cepa silvestre creciendo en el mismo medio y 1.5 veces mayor para la misma cepa pero creciendo en el medio M4. Sin embargo los rendimientos son bajos por lo que se pretende evaluar algunos otros parámetros físico-químicos dentro del proceso de fermentación para incrementar los rendimientos en *P. rhodozyma*.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

El uso de los colorantes en la industria alimentaria data de las primeras civilizaciones, aproximadamente 3000 años. Inicialmente los pigmentos eran obtenidos de fuentes naturales como extractos de plantas, animales y minerales, disminuyendo su consumo con el descubrimiento de los colorantes sintéticos en 1856.

Estudios realizados en los años 70's, demostraron que algunos de los colorantes sintéticos presentaban efectos carcinogénicos y embriotóxicos. A partir de ello, se ha observado una tendencia a la sustitución de pigmentos sintéticos por los naturales (Newsome, 1986).

Dentro del grupo de pigmentos naturales que han adquirido mayor importancia se encuentran los carotenoides. Estos compuestos se han utilizado como una alternativa para sustituir a los colorantes rojos y amarillos sintéticos, que fueron prohibidos por la Food and Drug Administration (FDA) en los años 80's (Tafoya y col., 1993).

Los carotenoides además de ser utilizados como aditivos para dar color a los alimentos, participan en diversas funciones en los animales y en el hombre, incluyendo su conversión a vitamina A, además de estimular la respuesta inmune, al proliferar los linfocitos T y B aumentando la actividad de los macrófagos y neutrófilos (Krinsky, 1987). Otra función de relevancia médica, es la de actuar como agentes anticarcinogénicos, por su capacidad de capturar radicales libres, los cuales se han relacionado como causa de algunos tipos de cáncer (Krinsky, 1987; Santamaria y Bianchi, 1987).

Los carotenoides son ampliamente distribuidos en la naturaleza. Más de 630 carotenoides diferentes encontrados naturalmente han sido caracterizados, éstos se dividen según su

estructura química en dos grupos: carotenos y xantofilas, donde el β -caroteno es el principal caroteno y entre las principales xantofilas están la zeaxantina, luteína, cantaxantina y astaxantina (Britton y Goodwin, 1971). De estas xantofilas la astaxantina es un pigmento utilizado ampliamente en la industria de la acuicultura para pigmentar el salmón y la trucha ya que proporciona a su carne el color rosa-anaranjado característico. La carne de estas especies producidas en cautiverio es blanca, pero puede adquirir su color normal cuando el pez es alimentado con una fuente del pigmento. La producción del salmón en granjas acuícolas ha tenido un incremento sustancial en la década de los 80's, lo cual ha creado una necesidad por astaxantina (An y col., 1991).

La principal fuente para pigmentar el salmón es la astaxantina de origen sintética, aprobada por la FDA en 1995 (Fang y Chiou, 1996). Sin embargo, para la producción de astaxantina en forma natural se ha propuesto el uso de fuentes como los crustáceos, el alga *Haematococcus pluvialis* y la levadura roja *Phaffia rhodozyma* (Johnson y col., 1991). Cada fuente natural de astaxantina tiene sus limitaciones y no compiten económicamente con la de origen sintético. No obstante los consumidores prefieren los pigmentos de origen natural por no estar sujetos a las restricciones que impone la FDA a los colorantes sintéticos (Soon y col., 1992).

Considerando lo anterior, además del costo de producción de la fuente sintética, el aumento por la demanda de este pigmento así como los bajos rendimientos obtenidos del exoesqueleto de crustáceos y los problemas técnicos que este proceso representa, se ha propiciado el desarrollo de procesos biotecnológicos utilizando microorganismos. Se ha visto promisoría la producción de astaxantina con *P. rhodozyma* como alternativas a las otras fuentes de obtención. Este microorganismo presenta las siguientes ventajas: a) produce como principal pigmento carotenoides, la astaxantina; b) tiene un metabolismo heterotrófico y c) a nivel de fermentador produce una alta densidad celular (Meyer y Du Preez, 1994). Sin embargo la producción de astaxantina en la cepa silvestre es muy baja, de 200 a 300 $\mu\text{g/g}$ levadura (0.02 a 0.03%) (Johnson y col., 1991); requiriéndose por ello trabajar en el mejoramiento genético del microorganismo y en la optimización del medio de cultivo para incrementar la producción.

GENERALIDADES

DEFINICIÓN Y PROPIEDADES QUÍMICAS

La astaxantina (3,3 -dihidroxi- β,β -caroteno-4,4-diona), es un oxicarotenoide y pertenece al grupo de las xantofilas. Al igual que otros carotenoides, este pigmento está formado por ocho unidades de isopreno que por condensación dan estructuras carbonadas de cuarenta átomos, llamados tetraterpenos (Fig. 1). La fórmula molecular de este carotenoide es $C_{24}H_{30}O_7$ y posee un peso molecular aproximado de 596.86. Este pigmento se identificó químicamente por Kühn y Sorenson (1983) y presenta forma de cristales de color violeta oscuro, su punto de fusión es aproximadamente de 224°C. Es insoluble en soluciones acuosas, pero soluble en diclorometano (30g/l), en cloroformo (10g/l), acetona (0.2g/l), dimetilsulfóxido (0.5g/l) y otros solventes polares. Al igual que otros carotenoides es sensible a la luz, a la temperatura, a los ácidos, al oxígeno y a la presencia de álcalis. En condiciones de saponificación sufre una conversión a astaceno (Fig. 2). La astaxantina presenta 2 carbonos asimétricos en la posición 3 y 3' y puede existir en cuatro configuraciones, incluyendo los enantiómeros idénticos (3S,3'S; 3R,3'R) y formas meso (3R,3'S; 3'R,3S) (Fig. 3) (Muller y col., 1980).

El isómero configuracional 3S, 3'S, se encuentra presente en los huevos de langosta (*Homarus gamarus*), al igual que en la microalga *Haematococcus pluvialis*, hecho que causó controversia y frenó el desarrollo comercial de la producción de astaxantina, utilizando como fuente natural a *P. rhodozyma*, por las restricciones que pudiera imponer la FDA (al considerar que el isómero 3R, 3'R, no se encontraba en la naturaleza y fuera prohibido el uso de astaxantina como aditivo para alimento de peces). Estudios posteriores demostraron que los isómeros meso y sus enantiómeros se encuentran en huevos de langosta, camarón, salmón, zooplankton y el crill del Atlántico y que no tiene relevancia biológica para el salmón, el isómero de astaxantina que ingiera (Johnson y col., 1991).

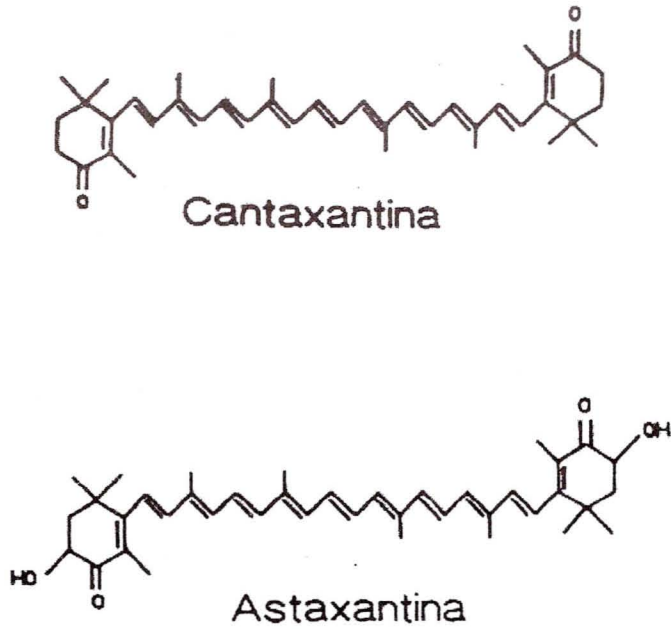


Fig. 1. Estructura química de la cantaxantina y de la astaxantina, carotenoides usados en la acuicultura.

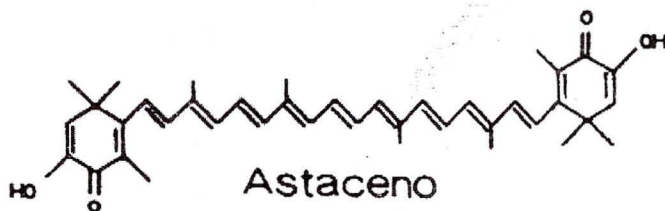


Fig. 2. Estructura química del astaceno.

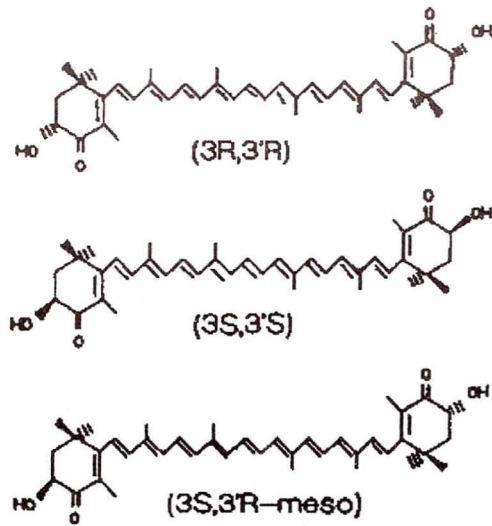


Fig. 3. Estructura química de isómeros configuracionales de la astaxantina.

FUENTES DE ASTAXANTINA

SINTÉTICA

Hoffman-La Roche, (Basel, Suiza), ha desarrollado varios procesos para la síntesis de carotenoides. En 1964 introdujo cantaxantina como pigmento en alimentos (“Carophyll red”) (Johnson y col., 1991). Esta fue utilizada con éxito en acuicultura hasta la aparición de la trans-astaxantina, recientemente lanzada al mercado por Roche la cual comercialmente recibe el nombre de “Carophyll pink”. La astaxantina sintética es la fuente principal, usada para pigmentar el salmón, la cual es preferida por los productores de salmón sobre la cantaxantina porque se absorbe más eficientemente y da una coloración más natural y homogénea a los alimentos procesados; este pigmento sintético tiene un costo de 250 dólares/Kg, basándose en peso seco.

CRUSTÁCEOS

Los crustáceos y su caparazón son otra fuente natural de astaxantina que han sido utilizados como alternativa para la pigmentación del salmón en granjas acuícolas (Johnson y col., 1980). Los niveles de carotenoides extraídos son bajos (hasta 200 mg/Kg) y para obtener una pigmentación satisfactoria se requiere la adición del 10 al 25% de peso en proporción al total de la ración del alimento formulado. Sin embargo, esta fuente contiene altos niveles de cenizas, de quitina y humedad, lo cual ocasiona un problema técnico en la formulación y en la elaboración del alimento. Además el bajo contenido de nutrientes y proteínas no lo hace útil como suplemento en el alimento para peces (Johnson y col., 1980). Otra desventaja se presenta en los costos de extracción, los cuales pueden fluctuar entre 5000 y 15000 dólares/Kg, limitando su uso (Johnson y col., 1991).

MICROBIANAS

A) Levadura: *P. rhodozyma* es un hongo que pertenece a la clase Deuteromycotina del orden de Blastomycetes, fue aislada en los años 70's por Herman Phaff, Martin Miller y Minoru Yoneyama de residuos de árboles caídos en tres regiones, en Japón, Alaska y en la antigua URSS. *P. rhodozyma* es un basidiomiceto, filogenéticamente relacionado con otras levaduras productoras de carotenoides como *Rhodotorula* y *Cryptococcus*, pero se distingue de éstas por su capacidad de fermentar azúcares como glucosa, maltosa, sacarosa y rafinosa (Johnson y col., 1991).

P. rhodozyma es además capaz de asimilar celobiosa, trealosa, almidón soluble, etanol, D-manitol, salicina, α metil glicósido, 2 cetogluconato, lactato, succinato y glicerol. La levadura no crece en lactosa, galactosa, glucosamina, D-ribosa y D-arabinosa (Johnson y An, 1991).

Para la producción de carotenoides por hongos y otros microorganismos se han utilizado gran variedad de fuentes de carbono y nitrógeno, desde las más simples como monosacáridos y sales de amonio, hasta las más complejas como melazas, aceites vegetales y minerales, agua de cocimiento de maíz, etc., (Ninet y Renat, 1979). En la levadura *P. rhodozyma* la influencia de la concentración de azúcares en la producción específica de astaxantina ha sido probada por varios autores. Por otro lado, si bien no se ha demostrado que la limitación de nitrógeno tenga algún efecto en la producción de astaxantina, en mutantes sobreproductoras del pigmento, la asimilación de nitrógeno es lenta (An y col., 1991).

Andrewes y col., (1976), reportaron que el contenido de astaxantina en esta levadura es del 85% del total de carotenoides presentes. Sin embargo, algunas cepas silvestres de *P. rhodozyma* contienen hasta 500 μg de carotenoides/g de células, de las cuales el 40 al 95% es astaxantina dependiendo de la cepa y del medio de cultivo. La astaxantina producida por la levadura se encuentra en forma libre y además ésta puede sintetizar en bajas concentraciones otros carotenoides. La astaxantina obtenida de *P. rhodozyma* se probó en dietas para truchas arcoiris, observándose que este pigmento se deposita eficientemente

cuando la levadura es adicionada previa ruptura celular. Es decir, al suministrarla íntegra, el pigmento no está disponible y por lo tanto no hay pigmentación. (Johnson y col., 1980).

B) Algas: Ciertas algas verdes del subphylum *Chlorophyceae*, contienen astaxantina como su principal carotenoide; por su parte *Haematococcus pluvialis* produce de 0.5 a 2% de astaxantina en peso seco, donde el 87% del pigmento se encuentra en forma de éster (Yobayashi y col., 1991). Otros autores reportan que la presencia de formas esterificadas de astaxantina puede afectar el depósito y metabolismo de los mismos en el salmón, pero este efecto no ha sido confirmado por otros autores. Otro factor limitante que se presenta es la extracción del pigmento y los requerimientos de luz para crecer lo cual aumenta los costos de producción. (Johnson y col., 1991). Por lo anterior esta fuente no puede competir con la astaxantina sintética.

TABLA 1. FUENTES DE ASTAXANTINA

ORIGEN:	ESPECIE:
HONGO/LEVADURA	<i>Phaffia rhodozyma</i>
BACTERIA NO FOTOSINTÉTICA	<i>Mycobacterium lacticola</i> <i>Brevibacterium 103</i>
ALGA VERDE (deficiente de N)	<i>Haematococcus pluvialis</i>
PETALOS DE FLORES	<i>Adonis annua</i>
CRUSTACEOS	"Caparazón"
SINTESIS QUÍMICA	"F. Hoffman-La Roche"

BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA

La astaxantina es un terpenoide producido a partir de la vía del mevalonato. El mevalonato es formado a partir de acetil coenzima A y acetoacetil CoA por medio de la hidroximetilglutaril CoA sintetasa y reductasa (HMGS y HMGR). La vía del mevalonato se encuentra regulada para proveer las cantidades necesarias de isoprenoides y para evitar una acumulación de intermediarios. Debido a la importancia del colesterol en la salud humana, ha sido muy estudiada esta vía en animales superiores. La regulación en animales ocurre primariamente en los primeros pasos que controlan la formación del mevalonato. La regulación del mevalonato en hongos y plantas es poco comprendida.

El mevalonato sufre reacciones de fosforilación para formar el isopentenil pirofosfato el cual se condensa con una molécula de dimetil-pirofosfato para dar geranil-pirofosfato. Con sucesivas adiciones de moléculas de isopentenil-pirofosfato para dar origen a farnesil-pirofosfato (Fig. 4). Este último sufre una segunda adición de isopentenil-pirofosfato para formar geranil.geranil pirofosfato, molécula que al condensarse forma fitoeno. El fitoeno sufre una serie de ciclizaciones y desaturaciones que dan origen al β -caroteno (Goodwin, 1971).

En la síntesis de astaxantina a partir de β -caroteno propuesta por Andrewes (1976), en *Phaffia rhodozyma* se aprecia que el β -caroteno es convertido a equinona directamente, el paso de hidroxiequinona a foenicoxantina supone la presencia de cantaxantina como intermediario. An y col (1991) detectaron toruleno y 3-3 dihidroxi- β -caroteno-4-4-diona en mutantes por lo que se propuso una vía de síntesis alternativa (Fig. 5).

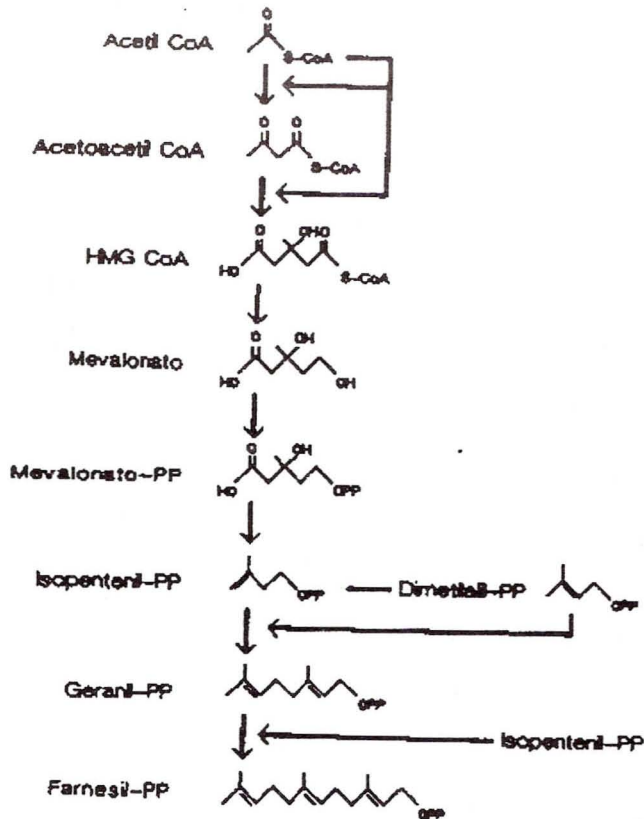


Fig.4. Pasos involucrados en la síntesis de farnesilpirofosfato, intermediario de la vía de producción de astaxantina. Co: Coenzima A, HMG; HMG; Hidroximetilglutaril CoA; PP: Pirofosfato.

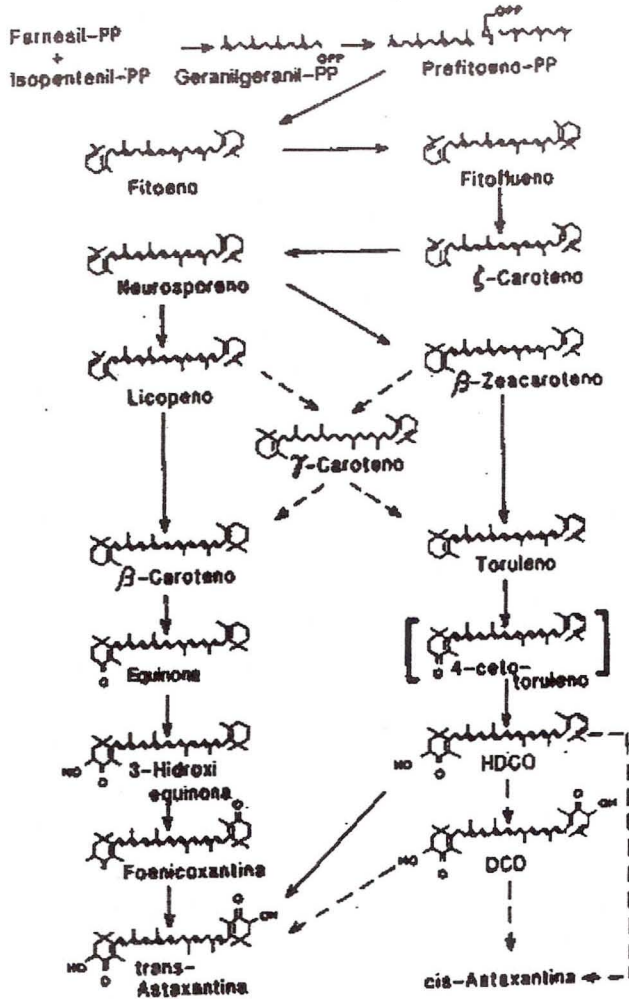


Fig. 5. Vía de síntesis de astaxantina propuesta para *P. rhodozyma*. La vía vertical de la izquierda que va de fitoeno a trans-astaxantina fue propuesta por Andrewes (1976). La vía vertical de la derecha fue propuesta por An (1991). HDCO: 3-hidroxi -3',4'-didehidro - β , ψ , -caroteno 4-ona. DCO: 3,3'-dihidroxi - β , γ -caroteno -4, -4'-diona.

REGULACIÓN DE BIOSÍNTESIS POR FACTORES AMBIENTALES

Los carotenoides específicos producidos por *P. rhodozyma* y el contenido celular están controlados genéticamente pero también pueden ser alterados por cambios en la composición del medio de cultivo y por la influencia de factores ambientales, tales como la intensidad de luz, aireación y nutrición (Meyer y col., 1994; Calo y col., 1995; Meyer y du Preez, 1993; Johnson y An, 1991; Johnson y col., 1994). Muchos de estos factores son no específicos y los cambios son debidos a alteraciones del metabolismo celular en general. Algunos grupos de compuestos químicos que se sabe afectan la carotenogénesis en general incluyen terpenos, iononas, aminas alcaloides y antibióticos como la penicilina (Bramley y Mackenzie, 1988; Calo y col., 1995; Meyer y du Preez, 1993).

En *P. rhodozyma* bajas tensiones de oxígeno y/o altos niveles de glucosa promueven un metabolismo fermentativo, en estas condiciones la producción de astaxantina se reduce notablemente. El rendimiento celular y μ_{max} disminuyen también de manera significativa a concentraciones iniciales de glucosa mayores de 10-15 g/l (Johnson y Lewis, 1979; Fang y Cheng, 1993).

El oxígeno es también muy importante para la producción de astaxantina. En condiciones microaerofilicas la producción es drásticamente reducida debido a la acumulación de β -caroteno principalmente y de β -zaecaroteno. Por otra parte, la equinona se produce en mucho mayor cantidad en condiciones anaerobias (Johnson y Lewis, 1979). Lo anterior sugiere que los grupos hidroxilo de la astaxantina sólo se forman en presencia de ciertos niveles de oxígeno. Johnson ha sugerido mantener una tensión de oxígeno mayor de 30% para la producción de astaxantina por *P. rhodozyma*. En contraste, cuando airearon células de *P. rhodozyma* crecidas anaeróbicamente (en edo. estacionario) no aumentó su contenido de astaxantina.

Otros factores que se han reportado como estimuladores de la formación de carotenoides en diferentes microorganismos incluyen: alimentación incrementada de fuente de carbono, limitación de nitrógeno, presencia de aminoácidos como metionina, valina, glicina, triptófano, fenilalanina, tirosina y leucina; uso de fuentes de carbono como glicerol, acetato,

succinato y citrato de sodio, nivel de oxígeno disuelto, inducción por luz, adición de piridoxina, residuos de tomate, tipo de cultivo (lote alimentado, continuo), altos o bajos niveles de fosfatos, limitación de Fe, Cu, Zn, o Mn, pH, inhibidores de fosfatasas (NaF), α pineno y limoneno (Bramley y Mackenzie, 1988; Johnson y An, 1991; Fleno y col., 1988; Fleno y col., 1994; Johnson y col., 1994).

PRODUCCIÓN FERMENTATIVA

La astaxantina es un pigmento producido por fermentación sumergida por la levadura *P. rhodozyma*. La fermentación de astaxantina se realiza en un intervalo de pH inicial de 4.5 a 5, manteniéndolo con amortiguador ftalato durante la fermentación. Estudios realizados por Johnson y Lewis, (1979), en fermentador de 4 l, probando cuatro niveles de pH (6.5, 5.5, 4.5, 3.5), demostraron que a 4.5, la velocidad de crecimiento de *P. rhodozyma* aumentó al igual que la producción de biomasa y el principal pigmento sintetizado fue la astaxantina. En contraste, a un pH de 3.5 se acumuló principalmente β -Zeaxaroteno.

La temperatura óptima para la producción de astaxantina es de 22°C, por arriba de esta temperatura las velocidades de crecimiento y producción disminuyen, mientras que el contenido de carotenoides se mantiene estable en un intervalo de temperatura de 15 a 22°C. Otros estudios realizados por Johnson y Lewis (1979), han demostrado que cuando se mantienen los niveles de oxígeno por debajo de 30 mmol O₂/h, la producción de astaxantina disminuye, y se acumula β -caroteno y precursores del pigmento menos polares.

Los niveles de producción de astaxantina obtenidos por diferentes cepas de *P. rhodozyma* son muy variados, dependiendo de las condiciones de cultivo y de los medios utilizados.

Se han visto niveles de producción de aproximadamente 150 μ g/g de levadura en 5 días de fermentación (Evans y col., 1991) y niveles más altos de 8004 μ g/g de levadura en este mismo tiempo los cuales fueron obtenidos con una cepa mejorada genéticamente según reporta una patente europea (Prevatt y col., 1991).

Además que se han utilizado diferentes fuentes de carbono como son glucosa, sacarosa, melaza entre otras y como fuente de nitrógeno se han usado el sulfato de amonio en combinación con el extracto de levadura y/o aminoácidos (Tabla 2).

TABLA 2. Niveles máximos de producción de astaxantina y carotenoides totales producidos por diferentes cepas de *P. rhodozyma*.

Cepa	Fuente de carbono	Fuente de Nitrógeno	Carotenoides totales	Carotenoides totales	Tiempo máximo de producción	Astaxantina	Astaxantina	Referencia
*			µg/ml	µg/glev	Horas	µg/ml	µg/glev	
CBS 225-87	Melaza	Sulfato de amonio	36.6	1490	80	23.6	960	Fleno y col. 1988 (Patente)
	Glucosa	Extracto de levadura	9.52	1340	120	6.2	880	-
*QST 11032	Glucosa	Peptona	NR	1375&	120	NR	1100	Chapman y col. 1991 (Patente)
*N9	Jugo de uva	Extracto de levadura y peptona	15.9	2120	120	9.8	1350	Meyer y Du Preez. 1993
*J4-3	Sacarosa	Sulfato de amonio y extracto de levadura	16.6	1153	96	12.96&	900	Meyer y Du Preez. 1993
J4-3	Glucosa	Sulfato de amonio y extracto de levadura	14.9	981	96	11.83&	776	Meyer y Du Preez. 1993
UCD 67-210	Melaza	Peptona, sulfato de amonio y a.a.	15.3	1086	120	12.24&	868.8&	Haard. 1988
*ant-1-4	Glucosa	Extracto de levadura y a.a.	NR	1050	120	NR	840&	An y col. 1983
67-210	Sacarosa	Sulfato de amonio y a.a.	1.4	NR	120	NR	1.12&	Okagbue y Lewis. 1983
67-210	Glucosa	Extracto de levadura y sulfato de amonio	3.2	450	128	2.88	406	Johnson y Lewis. 1979
*NCHUFS 301	Glucosa	Extracto de levadura y peptona	7.8	1633	72	6.2&	1306.4&	Fang y Cheng. 1993
ENZA E4	Sacarosa	Extracto de levadura, sulfato de amonio y peptona	5.25&	2625&	160	4.2	2100&	Evans y col. 1990 (Patente)
*PC 8107	NR	Sulfato de amonio y extracto de levadura	NR	10005&	NR	NR	8004	Prevatt y col. 1991 (Patente)

NR: no reportados

*: cepas obtenidas por mejoramiento genético

&: valores aproximados de acuerdo al 80% de astaxantina

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo, en la producción específica de astaxantina por *P. rhodozyma*.

PARTICULARES

- a) Probar el efecto de glucosa y melaza así como diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de *P. rhodozyma* y producción de astaxantina.
- b) Llevar a cabo un diseño para la optimización de los nutrientes.
- c) Determinar las cinéticas de crecimiento del microorganismo y de producción de carotenoides totales, en el medio de cultivo optimizado.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO:

Se empleó la cepa silvestre de *Phaffia rhodozyma* CDBB-L-685 obtenida de la colección microbiana del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV así como la cepa mutante 79Δ obtenida de trabajos previos en este laboratorio, usando una concentración de nitrosoguanidina (NTG) de 150µg/ml.

MEDIOS DE CULTIVO:

Medio de conservación y propagación.

Las cepas fueron conservadas en tubos inclinados de rosca con medio sintético YM (Difco) agar (extracto de levadura 0.3%; extracto de malta 0.3%; bacto peptona 0.5%; glucosa 1% y agar bacteriológico 2% disueltos en agua destilada a pH 5); después de sembrar los tubos, se incubaron por un periodo de 48 h a 20-22°C. Una vez crecidos, se conservaron en refrigeración a 4°C, efectuándose las resiembras con una periodicidad de aproximadamente cada dos meses.

Medios de producción.

El medio base contenía: glucosa 1.5%; extracto de levadura 0.2%; sulfato de amonio 0.2%; fosfato monobásico de potasio 0.1%; cloruro de calcio 0.01%; sulfato de magnesio 0.05% (Jonhson y Lewis, 1979), el pH se ajustó con ácido ftálico 0.1 M a 4.5. El medio se esterilizó a 121°C durante 15 min. Los reactivos de este medio fueron disueltos en agua de la llave.

Clarificación de la melaza.

La melaza cruda se diluyó al 50%, se calentó a 85°C por 30 min con agitación constante. Se dejó reposar por 24 h. El sobrenadante se recuperó por centrifugación a 6000 rpm por 15 min y los sólidos precipitados se decantaron.

Posteriormente se realizó una hidrólisis ácida con HCl concentrado, utilizando una relación de 10% (v/v), se calentó a 65°C durante 30 min en agitación, se enfrió y neutralizó con NaOH al 40%.

A la melaza clarificada se le determinaron los azúcares reductores presentes.

La melaza clarificada (MCL) tenía aproximadamente un pH de 4; 450 a 500 g de azúcares reductores totales (ART/l) y alrededor de 3% de cenizas.

CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA:**Preparación del inóculo.**

Una suspensión celular obtenida a partir de un tubo de conservación se hizo crecer en un matraz de 500 ml con mamparas conteniendo 100 ml de medio de producción en una agitadora orbital (Gyratory Water Batch Shaker modelo G76, New Brunswick Scientific, Edison, N.J. U.S.A.), a 20 °C y una velocidad de agitación de 150 rpm por 48 h.

100 ml de medio de producción, fueron inoculados a una relación del 10% con el crecimiento anterior en matraces con mamparas de 500 ml, dejándolos crecer por 48 h, con una velocidad de agitación de 150 rpm a 20°C en una agitadora orbital.

FERMENTACIÓN:**En matraces de 500 ml.**

Para la evaluación de los diferentes medios modificados, 5 ml de suspensión celular de *P. rhodozyma* fueron inoculados a matraces de 250 ml con mamparas, conteniendo 50 ml de medio modificado así como de medio YM y MM. Se incubaron a 20°C, a una velocidad de agitación de 150 rpm por 96 h.

En fermentador de 3 l.

Los cultivos fueron crecidos en un fermentador de 3 l de capacidad con un volumen de operación de 2 l (Applikon, Holland). Las condiciones de operación fueron 20°C, a una tasa de flujo de aire de 3.6 vvm y a una velocidad de agitación de 400 rpm. El fermentador fue inoculado con 10 % (v/v) de una suspensión celular de 48 h de crecimiento. Los medios usados en esta etapa fueron los formulados con melaza.

Se tomaron muestras aproximadamente cada 4 h a lo largo de las 72 h de crecimiento del cultivo. A cada una de las muestras se les determinó la concentración de azúcar residual, el crecimiento y la producción de carotenoides.

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO:

La determinación de la masa celular fue por peso seco expresado en g/l. Un ml de muestra se centrifugó 2 veces a 5000 rpm por 5 min, lavando el paquete en cada paso con agua destilada. Posteriormente se resuspendieron en agua destilada y se vaciaron en charolitas de aluminio previamente pesadas, dejándolas secar por 24 h a 60°C.

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES:

Para la determinación de azúcares reductores (glucosa) en melaza, se siguió la técnica del DNS (Miller, 1959) expresado en g/l; para esto se tomaron 20µl de muestra más 980 µl de agua destilada agregándole enseguida 3 ml de DNS por muestra, se mezclaron y se colocaron en baño a ebullición por 5 min, se dejaron enfriar agregándole enseguida 6 ml de agua destilada para posteriormente leer la muestra a 550 nm. Determinando la concentración de azúcar usando la siguiente relación:

$$Y = mx + b$$

$$X = \frac{y - b}{m} \quad m = 1.18$$

$$X = y_{D.O. 550nm} / m$$

$$X = [] \text{ mg}$$

DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES:

Se siguió el método reportado por Schroeder y Johnson (1993), el cual consiste en lo siguiente. Se tomó 1 ml de la suspensión celular, se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm, el paquete celular se lavó dos veces con agua destilada y una con acetona, se dejó evaporar la acetona y se agregó un volumen igual de perlas de vidrio (425-600 μ de diámetro) y 1 ml de dimetilsulfóxido precalentado a 55 °C. Se agitaron las células en un vortex para romper las células hasta liberar el colorante. Se agregó entonces 1 ml de acetona, 1 ml de éter de petróleo y 1 ml de NaCl al 20%, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min separando la fracción etérea que contiene el colorante. Posteriormente se leyó a una absorbancia de 474 nm. La cuantificación de los carotenoides totales se realizó utilizando el coeficiente de extinción $E_{1\%}^{1\text{cm}}=2100$ con la siguiente ecuación (An y col., 1989):

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/g de levadura}) = \frac{(\text{ml de éter de petróleo}) \times (A_{474}) \times (100)}{(21) \times (\text{peso seco de la levadura})}$$

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO:

Para la optimización de los componentes del medio de cultivo, se seleccionó un diseño factorial 2^3 dando como resultado una matriz de 8 corridas experimentales (Tabla 3).

Los criterios para la optimización del medio de cultivo fueron: los rendimientos de producto, expresados en μg de colorante/g de levadura y μg de colorante/ml, como respuestas a evaluar, a las 96 h de fermentación.

Para la optimización de los componentes del medio de cultivo, se realizó un diseño con la finalidad de localizar los factores significativamente predictorios y para ajustar las concentraciones.

El tamaño del diseño así como la fracción a utilizar depende del número de variables a evaluar y de la disponibilidad de equipo y material.

Tabla 3. Diseño factorial fraccionado 2³.

Observación	Factor		
	Melaza	Extrac. Lev.	Sulfat. Amonio
1	5	6.6	5
2	15	6.6	5
3	5	2	5
4	15	2	5
5	5	6.6	2
6	15	6.6	2
7	5	2	2
8	15	2	2

Se tomó como punto de partida el medio mineral con la concentración de glucosa original, codificando los componentes de la siguiente manera: melaza, sulfato de amonio, extracto de levadura.

El tamaño de la variación se determinó de acuerdo a la experiencia y a la información preliminar del experimento. El diseño fue corrido en un programa denominado Design-Ease analysis versión 3.0.

Se valoraron los medios por medio de un programa denominado modelo lineal por diferencia mínima significativa, con un alfa de ≤ 0.05 de significancia (Systat).

Cada uno de los experimentos fue realizado por duplicado, tomando como control al medio sintético (YM) y al medio mineral (MM) (Tabla 4).

A partir del medio mineral se hizo una modificación, en la cual, la glucosa como tal fue sustituida por melaza hidrolizada a concentraciones de fuente de carbono de entre 5 y 15 g/l, la concentración de extracto de levadura fue modificado de entre 2 g/l y 6.6. g/l, la de sulfato de amonio de entre 2 g/l y 5 g/l y el fosfato monobásico de potasio se modificó de entre 1 y 2 g/l. El cloruro de calcio y el sulfato de magnesio fueron eliminados de la formulación del medio debido a que todos los componentes fueron mezclados en agua de la llave y por lo tanto están presentes en las cantidades necesarias (Tabla 4).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DISEÑO FACTORIAL PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA.

Para observar el efecto de las distintas concentraciones tanto de fuente de carbono como de nitrógeno en la producción de astaxantina, se realizó un diseño factorial 2^3 obteniéndose una corrida de 8 experimentos (Tabla 5), los cuales se realizaron por duplicado y se evaluaron mediante el programa Design-Ease Analysis.

Tabla 5. Resultados del diseño factorial por duplicado.

Std	Dsn Id	Run	Block	Melaza Factor	Ext Lev. Factor	Amonio Factor	Color especif microg/g Response	Color volum microg/ml Response
1	1	2	1	5.00	2.00	2.00	1145.58	2.90
2	1	10	1	5.00	2.00	2.00	758.80	2.23
3	2	14	1	15.00	2.00	2.00	1168.02	4.95
4	2	11	1	15.00	2.00	2.00	760.66	3.90
5	3	7	1	5.00	6.60	2.00	1160.05	2.20
6	3	15	1	5.00	6.60	2.00	1107.09	2.30
7	4	3	1	15.00	6.60	2.00	1146.62	4.46
8	4	1	1	15.00	6.60	2.00	1071.93	4.23
9	5	9	1	5.00	2.00	5.00	1886.45	2.45
10	5	5	1	5.00	2.00	5.00	2229.44	2.44
11	6	4	1	15.00	2.00	5.00	1263.35	3.89
12	6	16	1	15.00	2.00	5.00	1146.71	4.06
13	7	13	1	5.00	6.60	5.00	732.62	1.42
14	7	12	1	5.00	6.60	5.00	1339.00	2.37
15	8	6	1	15.00	6.60	5.00	689.02	2.10
16	8	8	1	15.00	6.60	5.00	821.72	3.16

Los medios de cultivo probados, se formularon con sales grado industrial y melaza de caña. Se varió la fuente de nitrógeno y la concentración de la misma de manera tal que se tuvieran diferentes relaciones C/N. Así mismo se incluyó el medio complejo YM como un control. Lo anterior con la finalidad de probar el efecto de la melaza como la relación C/N en la producción de astaxantina.

En la Tabla 6 se puede observar que en todos los medios probados excepto MC y M1, la producción específica de astaxantina ($\mu\text{g/g}$) fue superior o igual a la del medio YM (control) por lo que la sustitución de glucosa por melaza como fuente de carbono favoreció la pigmentación y un buen crecimiento de *Phaffia*. Así mismo, la eliminación del extracto de levadura del medio de cultivo, afectó tanto el crecimiento como la producción de colorante (Velázquez, 1995), por lo que se consideró conveniente adicionar tanto el sulfato de amonio como el extracto de levadura en el medio de cultivo. Cabe señalar que el extracto de levadura además de ser una fuente de nitrógeno, proporciona elementos nutricionales necesarios para el buen desarrollo de *P. rhodozyma*.

Se observó también, que la eliminación de sulfato de magnesio y cloruro de calcio de la formulación del medio de cultivo, no afectó el buen desarrollo de la levadura ya que estos elementos están presentes en el agua de la llave, en cantidades suficientes para satisfacer los requerimientos nutricionales de la levadura.

De las diferentes relaciones C/N probadas, se observó que el mayor rendimiento de astaxantina por la cepa mutante, fue en el medio M4, con una relación C/N 0.8, siendo de 2312.47 μg de astaxantina/g de célula. Por otra parte, tanto el crecimiento como la producción de astaxantina de la cepa mutante fue superior a los presentados por la cepa silvestre creciendo en los mismos medios y en las mismas condiciones (Tabla 6).

El medio M4, es un medio simple, formulado con sales grado industrial y una fuente de carbono económica como la melaza de caña.

Tabla 6. Efecto de diferentes relaciones C/N sobre la producción específica de astaxantina por *P. rhodozyma*.

	Medio	Relación C/N	Color esp.	Crecimiento	Color vol.
			$\mu\text{g/g de cél.}$	g/l	$\mu\text{g/ml}$
1	YM WT	2.49	437.641	4.33	1.72
2	YM 79 Δ	2.49	1096.424	5.63	6.07
3	MM 79 Δ	3.66	981.012	3.76	3.44
4	Mar. 79 Δ	1.4	964.421	2.53	2.34
5	Mop. 79 Δ	1.46	620.776	8.2	4.89
6	MA 79 Δ	1.46	1125.231	4	4.45
7	MB 79 Δ	0.48	1206.633	2.16	2.3
8	MC 79 Δ	3.66	1065.666	5.1	4.73
9	MD 79 Δ	1.22	1111.484	3	2.69
10	M1 79 Δ	1.21	815.092	3.8	2.93
11	M2 79 Δ	0.4	1206.159	2.3	2.29
12	M3 79 Δ	2.41	1368.61	3.43	4.58
13	M4 79 Δ	0.8	2312.465	1.4	2.7

De los resultados anteriores podemos concluir que la melaza es una fuente de carbono económica que favorece tanto el crecimiento como la producción de colorante. Así también, es importante la relación C/N para lograr buenos rendimientos.

Se ha examinado el efecto de diversas fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de astaxantina por varios autores (An y col., 1989; Fang y Cheng, 1993; Meyer y Du Preez, 1994, Meyer y col., 1993, 1994; Parajó y col., 1997), estos cultivos han sido realizados al nivel de matraces con mamparas y fermentador de diferentes capacidades y como siempre se reporta, los resultados obtenidos dependen del tipo de cepa (silvestre o mutante) así como las condiciones de cultivo llevadas a cabo y las concentraciones utilizadas de fuente de carbono y nitrógeno.

Yamade y col. (1997) probaron diferentes fuentes de carbono para la producción de astaxantina por *P. rhodozyma*, encontrando que tanto en la fructosa como en la sacarosa, se obtuvieron los rendimientos de pigmento más altos. Johnson y Lewis, (1979), por su parte, reportaron que la producción de astaxantina por gramo de levadura disminuyó al aumentar la concentración de glucosa. Sin embargo, la producción volumétrica, se vio incrementada.

Por lo anterior, diferentes autores, han recomendado el uso de fuentes de carbono no refinadas tales como melaza de caña (Haard, 1998), azúcar de jugo de caña (Fontana y col., 1996), coproductos de maíz macerado (Hayman y col., 1995), jugo de alfalfa residual (Okagbue y Lewis, 1984), jugo de uva (Meyer y Du Preez, 1994) y turba hidrolizada (Acheampong y Martin, 1995; Martin y col., 1993), con el fin de reducir los costos de producción de astaxantina a nivel industrial.

Por lo tanto, puede ser que la producción de astaxantina pueda ser aumentada bajo condiciones tales como limitación de nutrientes, especialmente con una alta relación carbono/nitrógeno (C/N) en el medio.

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LA OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

De acuerdo al programa Systat el análisis de varianza de todos los medios, fueron significativamente diferentes, teniendo una significancia de 0.003 con un alfa de 0.05 de significancia (Anexo 1).

Como se puede observar en la Tabla 6, sólo 7 medios fueron superiores a los controles (YM y MM), pero no todos fueron significativamente superiores, de los cuales sólo el medio M3 y M4 fueron significativamente superiores a los controles. (Anexo 2).

De acuerdo al análisis del color específico, el modelo factorial fue significativo obteniéndose una F calculada de 0.0119 (≤ 0.05). Evaluando todos los factores de acuerdo al Anexo 3, se observó que la melaza, extracto de levadura, sulfato de amonio, la combinación melaza-sulfato de amonio y extracto de levadura-sulfato de amonio fueron significativos.

Corriendo estos cuatro factores en el modelo se observa que se obtiene una F calculada de 0.0053 siendo más significativo el modelo, corroborando el efecto de estos componentes, excepto el sulfato de amonio (Anexo 4).

La mayoría de los medios se encuentran dentro de una probabilidad normal (Fig. 6). De acuerdo a la Fig. 7 y de acuerdo al modelo, se observa que a menor concentración de melaza se obtiene una mayor producción específica de color ($\mu\text{g/g}$ de levadura), observándose el mismo efecto cuando se observa sólo el efecto del extracto de levadura (Fig. 8). Sin embargo, cuando se ve el efecto combinado de dos componentes, se observó que a una baja concentración de melaza y una alta concentración de sulfato de amonio, se vio un incremento en la producción específica de color (Fig. 9). Haciendo la combinación extracto de levadura-sulfato de amonio se vio que a menor concentración del primero y mayor del segundo, hay un incremento en la producción de pigmento (Fig. 10).

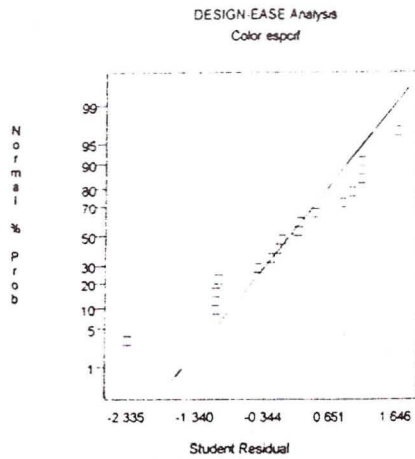


Fig. 6. Porcentaje de distribución normal.

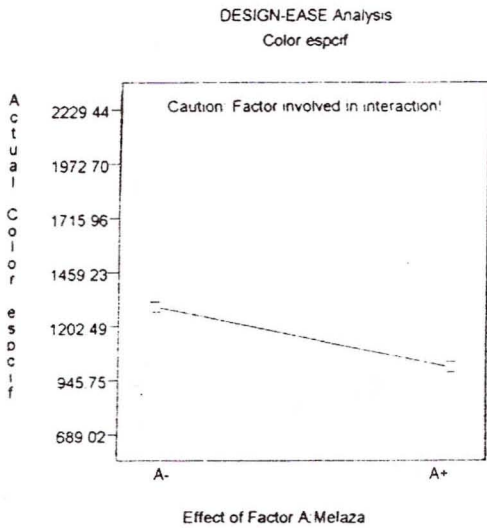


Fig. 7. Efecto de la melaza

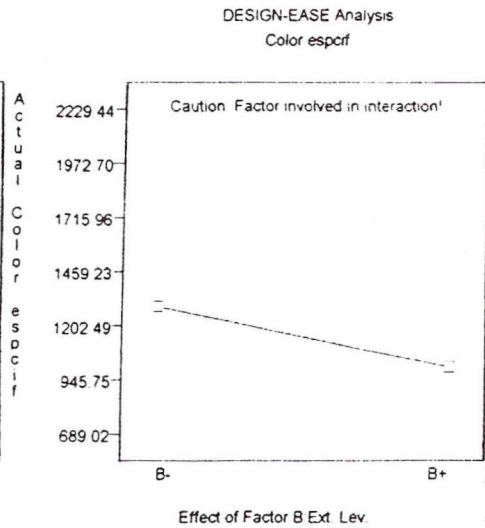


Fig. 8. Efecto del extracto de levadura.

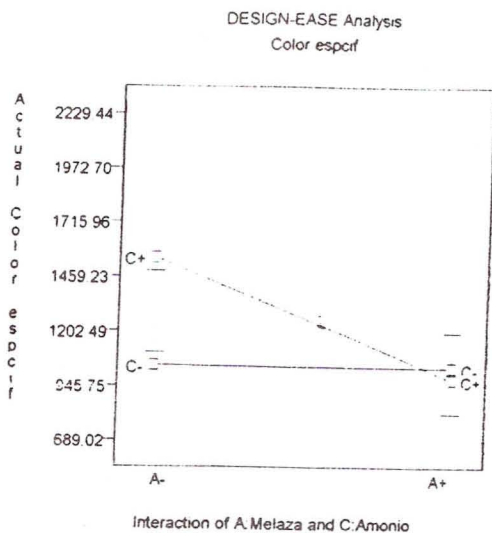


Fig. 9. Efecto interacción melaza-amonio

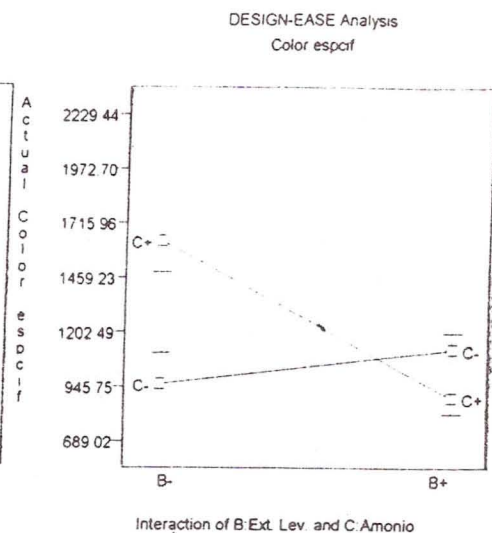


Fig. 10. Efecto interacción amonio-ext. lev.

En la evaluación del color volumétrico, se observó que el modelo factorial fue significativo, obteniéndose una F calculada de 0.0031, siendo significativos los componentes del medio, la melaza, extracto de levadura y sulfato de amonio solos (Anexo 5). Evaluando de nuevo estos tres componentes, se observó una mayor significancia obteniéndose una F calculada de 0.0003 siendo de nuevo significativos los tres componentes (Anexo 6). Se tuvo una probabilidad normal de prácticamente todos los medios observados (Fig. 11).

De acuerdo a la Fig. 12, se observó que a mayor concentración de melaza ocurrió un incremento en la producción volumétrica de color; sin embargo, cuando se trabajó con menor concentración de extracto de levadura (Fig. 13) y/o sulfato de amonio se incrementó la producción volumétrica de color ($\mu\text{g/ml}$) (Fig. 14).

De acuerdo a los resultados anteriores se decidió evaluar la producción de astaxantina por *P. rhodozyma* en los medio M3 y M4 usando un fermentador de 2 l de volumen de operación.

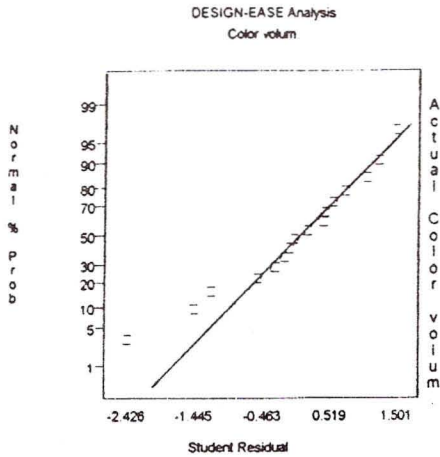


Fig. 11. Porcentaje de distribución normal.

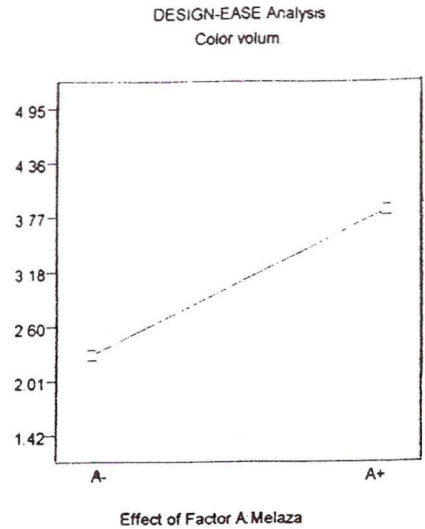


Fig. 12. Efecto de la melaza.

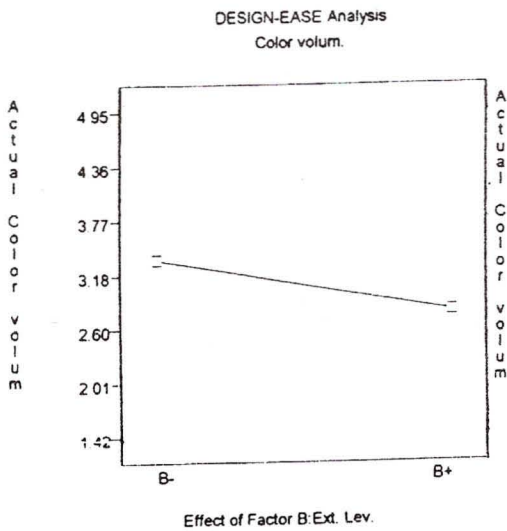


Fig. 13. Efecto del extracto de levadura

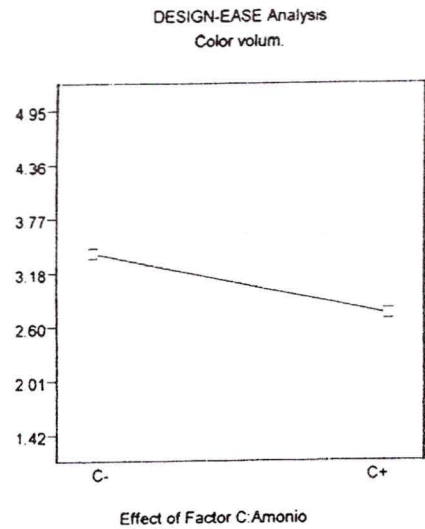


Fig. 14. Efecto del sulfato de amonio.

Generalmente la optimización del medio de cultivo, se realiza al nivel de matraz debido a que es más fácil y económico llevar a cabo un diseño de optimización. Bajo estas condiciones las pérdidas económicas debido a problemas de contaminación o error de experimentación, son mínimas. Sin embargo, las condiciones de crecimiento tanto en matraz como en fermentador son muy diferentes por lo que optimizar las condiciones de cultivo son más favorables en fermentador, ya que los resultados son reproducibles y se tiene un mejor control de las condiciones ambientales.

Con la optimización de un medio de cultivo se busca obtener los mejores rendimientos y/o productividades teniendo como consecuencia un costo menor de la producción, para tener un proceso más redituable.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA POR *P. rhodozyma* A NIVEL DE FERMENTADOR AGITADO DE 3 LITROS.

A) En medio M4.

Como se puede observar en la Fig. 15, la cepa silvestre presentó una fase lag muy corta entrando a la fase exponencial de crecimiento aproximadamente a las 4 h, con una velocidad de crecimiento máxima (μ) de 0.032 h^{-1} , alcanzando su fase estacionaria aproximadamente a las 28 h de crecimiento. La producción de astaxantina fue parcialmente asociada al crecimiento, alcanzando un valor máximo de $1.31 \mu\text{g/ml}$. Así mismo, se puede observar que el consumo de azúcares se dio en las primeras 18 h, llegando a consumirse prácticamente el 95% de la concentración inicial. No obstante bajo estas condiciones, se continuó la cinética hasta las 72 h, observándose un ligero incremento en el crecimiento, pero no así en la producción de pigmento.

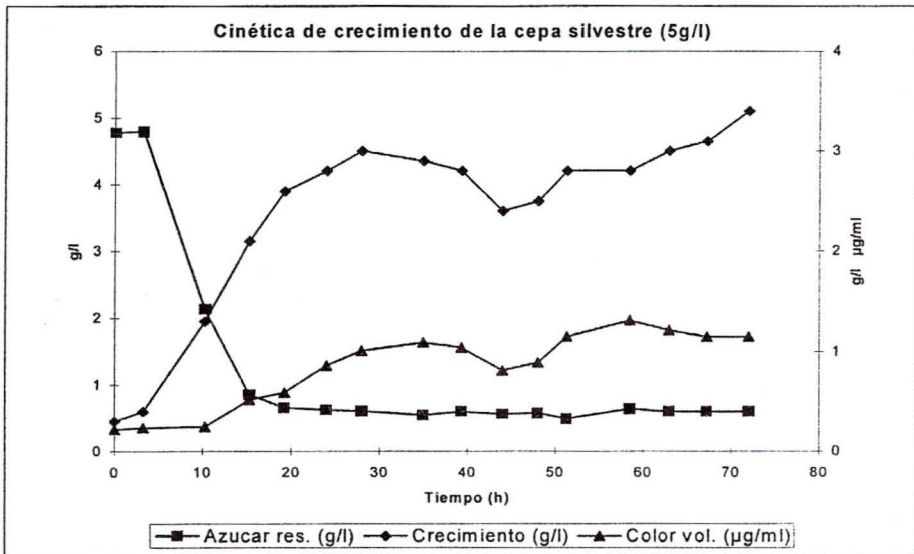


Fig. 15. Cinética de crecimiento y producción de la cepa silvestre en medio M4

Respecto a la cepa mutante 79 Δ creciendo en el mismo medio (Fig. 16), ésta presentó una fase lag más larga (10 h). Durante la fase exponencial de crecimiento alcanzó una velocidad específica de crecimiento de 0.030 h⁻¹, llegando a su fase estacionaria aproximadamente a las 24 h de crecimiento. El consumo de azúcares fue ligeramente más lento que la cepa silvestre, sin embargo, a las 24 h había consumido prácticamente el 90% de los azúcares iniciales. No obstante el haber obtenido parámetros cinéticos inferiores a los de la cepa silvestre, la producción volumétrica de astaxantina fue de 1.7 μ g/ml, 30% más de lo obtenido para la cepa silvestre.

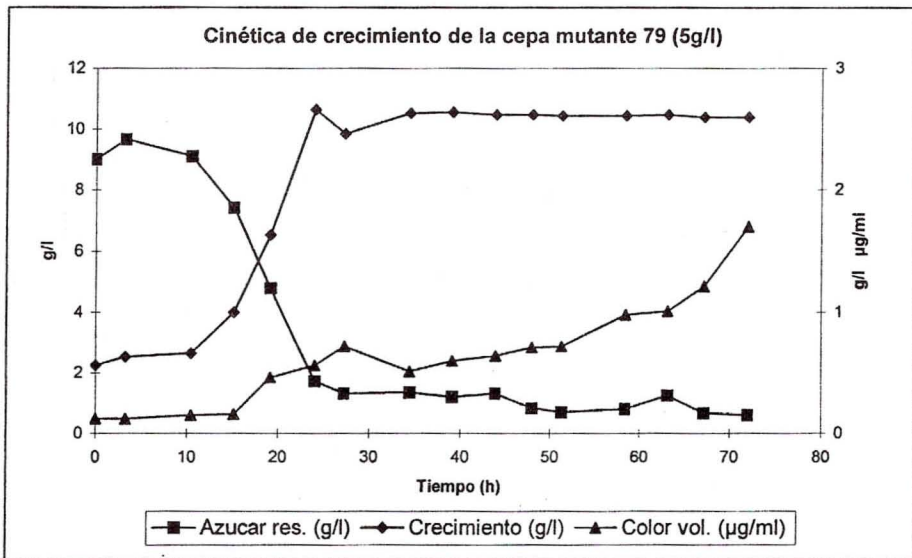


Fig. 16. Cinética de crecimiento y producción de la cepa 79 Δ en medio M4.

B) En medio M3.

La cepa silvestre creciendo en este medio (Fig. 17), presentó una fase lag más larga que cuando creció en el medio M4, sin embargo su velocidad específica de crecimiento fue de 0.062 h^{-1} . Bajo estas condiciones alcanzó un crecimiento máximo de 5 g de células/l; y una producción de pigmento de $1.2 \text{ }\mu\text{g/ml}$. El consumo de sustrato no decayó demasiado rápido, consumiéndose cerca del 90% hasta las 70 h.

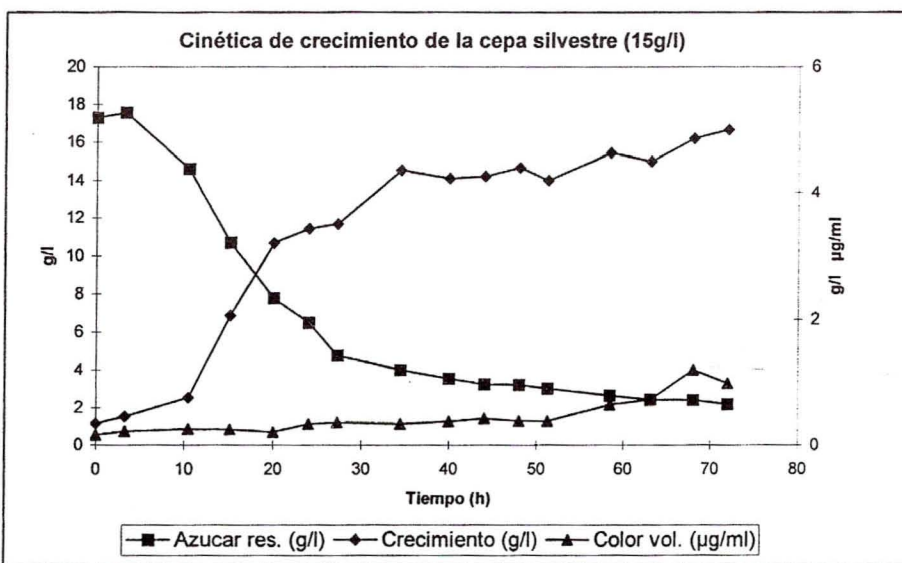


Fig. 17. Cinética de crecimiento y producción de la cepa silvestre en medio M3.

Por otra parte, la cepa mutante 79Δ , creciendo bajo las mismas condiciones que la cepa silvestre, no presentó fase lag disparándose inmediatamente el crecimiento exponencial con una velocidad específica de crecimiento de 0.041 h^{-1} . El máximo crecimiento logrado fue 3.66 g de células/l, 30% menos que el alcanzado por la cepa silvestre. No obstante la producción volumétrica de astaxantina fue de $2.58 \text{ }\mu\text{g/ml}$, 2.2 veces mayor que la cepa silvestre en este mismo medio (Fig. 18)

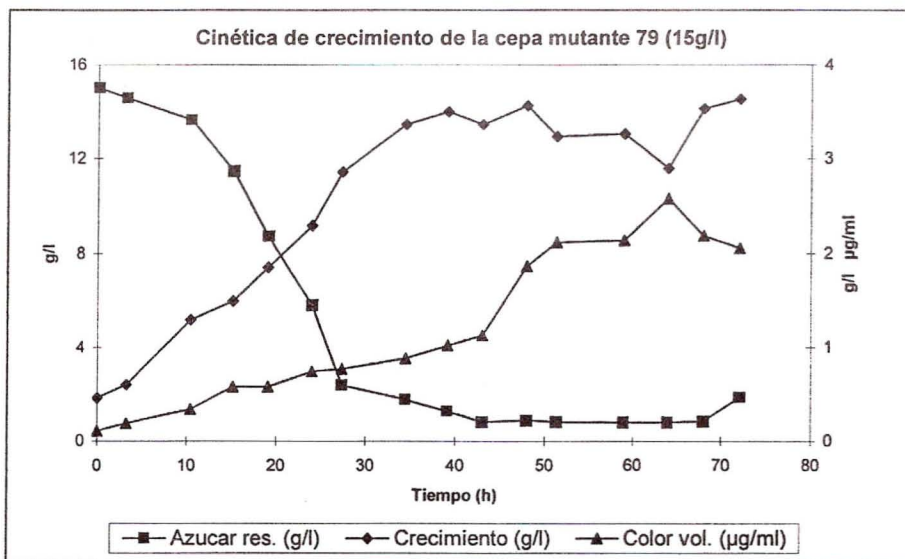


Fig. 18. Cinética de crecimiento y producción de la cepa 79Δ en medio M3.

De los resultados anteriores se puede observar que el medio M3 fue el más adecuado para la producción de astaxantina por la cepa mutante 79Δ, ya que la producción volumétrica fue 2.2 veces mayor que la cepa silvestre creciendo en el mismo medio y 1.5 veces mayor para la misma cepa pero creciendo en el medio M4. Cabe señalar que los parámetros cinéticos de la cepa mutante fueron menores que los de la cepa silvestre independientemente del medio evaluado (Tabla 7). Este comportamiento ha sido observado para mutantes de *P. rhodozyma* por Johnson y An (1991), Meyer y col. (1993), y por Fang y Chiou (1996), mencionando que la tasa de crecimiento y el rendimiento celular de mutantes hiperproductoras de astaxantina, decrecen con el incremento del contenido de astaxantina. El decremento en el rendimiento celular, puede ser consecuencia de un alto contenido de astaxantina, ya que en esas mutantes, menos carbono y energía puede estar disponible para la biosíntesis celular. Además la baja tasa de crecimiento en tales mutantes, indica posiblemente que la producción de carotenoides retarda el crecimiento.

Tabla 7. Comparación de los parámetros cinéticos de la cepa silvestre y 79Δ en medio M4 y M3.

Medios	Cepa	Parámetros Cinéticos				
		Crecimiento g/l	Color vol. μg/ml	μ h ⁻¹	$Y_{x/s}$ g células/g sustrato	$Y_{p/x}$ μg pig./g células
M4	Silvestre	3.4	1.31	0.032	0.738	0.351
	79Δ	2.66	1.70	0.030	0.232	0.519
M3	Silvestre	5	1.20	0.062	0.302	0.223
	79Δ	3.63	2.58	0.041	0.223	0.779

Como se sabe, la astaxantina es formada durante el crecimiento en *P. rhodozyma*, pero continua sintetizándose después de que el crecimiento ha cesado.

La coloración roja característica de *P. rhodozyma*, es un indicativo de la síntesis de astaxantina, comenzando a aparecer en las etapas tempranas del periodo de crecimiento. La concentración de astaxantina en la levadura incrementa en los estadios tempranos del crecimiento hasta la fase exponencial de crecimiento. Después de esta etapa se sigue incrementando aunque a una velocidad menor.

Con estos resultados se puede inferir que la síntesis de astaxantina en este trabajo fue parcialmente asociada al crecimiento. Más sin embargo, Johnson y Lewis (1979), establecen que la formación de astaxantina en *P. rhodozyma* es asociada al crecimiento pero su formación no coincide exactamente con el incremento de biomasa. Así mismo, ha sido reportado que la astaxantina continúa sintetizándose después de que su crecimiento ha cesado y la glucosa prácticamente ha sido consumida (Johnson y An, 1991). Se ha sugerido que *P. rhodozyma* excreta intermediarios de carbono durante el crecimiento, los cuales son aprovechados más tarde, estimulando la carotenogénesis (Johnson y An, 1991). En contraste, la producción de carotenoides en *Sporobolomyces roseus* (Bobkova, 1965) y

Rhodotorula glutinis (Vecher y Kulikova, 1968) ha sido reportado que ocurre sólo después de que la levadura ha detenido su crecimiento, lo que sugiere que el agotamiento de nutrientes o un cambio en la fisiología del microorganismo, disparan en estos casos la carotenogénesis. Igualmente, Goodwin (1972), ha reportado que la carotenogénesis en *Rhodotorula rubra*, ocurre principalmente después de que el crecimiento ha cesado. De la misma manera, se ha encontrado que la carotenogénesis en *R. rubra*, ocurre en tres fases, un periodo de síntesis activo llegando hasta su máxima concentración, un periodo de persistencia durante el cual la concentración permanece relativamente constante y un periodo durante el cual, el pigmento desaparece gradualmente de la levadura (Goodwin, 1972).

Sin embargo, autores como Meyer y Du Preez (1994), observaron que los pigmentos totales y la producción de astaxantina ($\mu\text{g/ml}$) fueron claramente asociado al crecimiento, incrementándose durante la fase exponencial de crecimiento, llegando a sus niveles máximos de producción después del consumo de la fuente de carbono. Una disminución de biomasa después de que el consumo de la fuente de carbono ha ocurrido, no puede ser atribuido a la lisis celular ya que en el sobrenadante no se observó un incremento en la coloración. La acumulación de astaxantina y demás carotenoides contenidos en la biomasa seca ($\mu\text{g/g}$), ocurre principalmente durante la fase exponencial de crecimiento pero también se da un incremento a una velocidad mucho más baja durante la fase estacionaria. El continuo incremento del contenido de pigmento en *P. rhodozyma* durante la fase estacionaria puede ser debido al decremento en biomasa y no por que la biosíntesis de pigmento se haya prolongado. Esto es comprobado por el gradual decremento en la concentración de la pigmentación volumétrica ($\mu\text{g/ml}$) durante la segunda mitad de la fermentación.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo y los reportados por otros investigadores, puede decirse que la formación de carotenoides en *P. rhodozyma*, ocurre tanto asociado al crecimiento como una vez que éste ha cesado, dependiendo de las condiciones de cultivo, es decir, fuentes de carbono y nitrógeno, la relación de los mismos, aireación, temperatura, etc.

Por otra parte, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se encontró un medio que soporta una buena pigmentación, reduciendo algunos costos de formulación de medios usando melaza como fuente de carbono, más sin embargo los resultados obtenidos a escala fermentador son bajos respecto a lo reportado por otros autores, debido a que las condiciones de operación dentro de la fermentación son muy diferentes a nivel matraz, por lo que es necesario optimizar las condiciones de operación dentro el proceso fermentativo.

CONCLUSIONES

La fuente de carbono es un factor importante tanto para el crecimiento de *P. rhodozyma* como para la producción de astaxantina, ya que en el medio formulado con melaza de caña se obtuvieron rendimientos 40% más que un medio sintético comercial formulado con glucosa.

La producción de astaxantina se vio fuertemente influenciada por la relación C/N siendo 0.8 la óptima en las condiciones probadas en este trabajo.

El extracto de levadura es un componente importante en la formulación del medio para *P. rhodozyma*, ya que le proporciona precursores vitamínicos importantes para su desarrollo.

De las mejores condiciones de crecimiento y producción encontradas, la cepa mutante 79 Δ fue la que dio los mejores resultados.

De acuerdo al diseño factorial, éste nos permite visualizar hacia qué niveles de concentración de los componentes del medio, son necesarios para poder incrementar los niveles de producción de astaxantina.

BIBLIOGRAFIA

- *- An, G. H., Schuman, D. B. and Johnson, E. A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 116-124.
- *- An, G. H., Bielich, J., Auerbach, R. and Johnson, E. A. (1991). Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnology.* 9: 70-73.
- *- Andrewes, A. G., Phaff, H. J. and Starr, M. P. (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry.* 15: 1003-1007.
- *- Acheampong, E. A. and Martin, A. M. (1995). Kinetic studies on the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Basic. Microbiol.* 35: 147-155.
- *- Bobkova, T. S. (1965). Carotenoid pigments of mycobacteria and yeast. *Mikrobiologiya* (English Translation). 34: 229-233.
- *- Bramley, P. M. and Mackenzie, A. (1988). Regulation of carotenoid biosynthesis. In Horecker, B. L. and Stadtman eds, E. R. *Current topics in cellular regulation.* Vol. 29. Academic Press, San Diego, Cal.
- *- Britton, G. and Goodwin, T. W. (1971). Biosynthesis of carotenoids. In *Methods in enzymology.* Vol. XVIII: 654-701.

- *- Calo, P., De Miguel, T., Velázquez, J. B. and Villa, T. J. (1995). Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Letters* 17(6): 575-578.
- *- Evans, Ch. T. and Adams, D. (1991). Yeast and their use in astaxanthin production. European Patent Application, 0427 405 A1.
- *- Fang, T. J. and Chiou, T. Y. (1996). Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. *J. Ind. Microbiol.* 16: 175-181.
- *- Fang, T. J. and Cheng, Y. S. (1993). Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 75: 466-469.
- *- Fleno, B., Christensen, Y., Larsen, R. (1988). Astaxanthin producing yeast cells, methods for their preparation and their use. WO 88/ 08025 (Danisco Bioteknologi).
- *- Fleno, B., Christensen, Y., Larsen, R., Johansen, S. R. and Johnson, E. A. (1994). Astaxanthin producing yeast cells, methods for their preparation and their use. US Pat. 5, 356, 810 (Gist-brocades N. V.).
- *- Fontana, J. D., Guimaraes, M. F., Martins, N.T., Fontana, C.A. and Baron, M. (1996). Culture of the astaxanthinogenic yeast *Phaffia rhodozyma* in low-cost media. *Appl Biochem Biotechnol* 57-58: 413-422.
- *- Goodwin, T. W. (1959). The biosynthesis and function of the carotenoid pigments. *Adv. Enzymol.* 21: 295.
- *- Goodwin, T. W. (1971). Biosynthesis. In *Carotenoids*. Isler, O., Ed., Birkhäuser-Verlag, Basel. 577.

- *- Goodwin, T. W. (1972). Carotenoids in fungi and non-photosynthetic bacteria. *Prog. Ind. Microbiol.* 11: 29.
- *- Hayman, T. G., Mannarelli, B. N. and Leathers, T. D. (1995). Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products. *J. Ind. Microbiol.* 14: 389-395.
- *- Haard, N. (1988). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnol. Lett.* 10: 609-614.
- *- Johnson, E. A. and Lewis, M. J. (1979). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 115: 173-183.
- *- Johnson, E. A., Villa, T. G. and Lewis, M. J. (1980). *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture.* 20: 123.
- *- Johnson, E. A., Schreiber, D. and Hall, W., Yang, H., Geldiay, T. (1991). Processes for *in vivo* production of astaxanthin and *Phaffia rhodozyma* yeast of enhanced astaxanthin content. US Patent Application, WO 91/02060.
- *- Johnson, E. A. and An, G. H. (1991). Astaxanthin from Microbial Sources. *Crit. Rev. in Biotechnol.* 11(4): 297-326.
- *- Johnson, E. A., Yang, H. H., Geldiay-Tuncer, B., Hall, W. T., Schreiber, D. and Ho, K. (1994). Process for *in vivo* production of astaxanthin and *Phaffia rhodozyma* yeast of enhanced astaxanthin content. US Pat. 5, 356, 809 (Ingene Biotechnology Inc).
- *- Kühn, R and Sorenson, N. A. (1983). Über astaxanthin and ovoerdin. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 71: 1879.

- *- Krinsky, N. I. (1987). Overview of carotenoids in medicine. 8th. International Symposium on Carotenoids in medicine. Boston Massachusetts. USA. Jul. 27-31. pp. 42A.
- *- Martin, A. M., Acheampong, E. and Patel, T. R. (1993). Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate. J. Chem. Tech. Biotechnol. 58: 223-230.
- *- Meyer, P. S. and Du Preez, J. C. (1993). Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol. Lett. 15: 919-924.
- *- Meyer, P. S. and Du Preez, J. C. (1994). Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15: 780-785.
- *- Meyer, P. S. and Du Preez, J. C. (1994). Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. World J. Microbiol. Biotechnol. 10: 178-183.
- *- Meyer, P. S., Du Preez, J.C. and Kilian, S. G. (1993). Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. World J. Microbiol. Biotechnol. 9: 514-520.
- *- Meyer, P. S., Du Preez, J. C. and Van Dyk, M. S. (1994). The effect of monoterpenes on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol. Lett. 16: 125-128.
- *- Miller, M., Yoneyama, M. and Soneda, M. (1976). *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). Int J Syst Bacteriol 26: 286-291.
- *- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31: 426-428.

- *- Muller, R. K., Bernhard, K., Mayer, H., Ruttimann, A. and Vecchi, M. (1980). Beitrag zur analytik und synthese von 3-hydroxy-4-oxocarotinoiden. Helv. Chim. Acta. 63: 1654.
- *- Newsome, T. S. (1986). Food colors. In: Food technology. pp. 49-56.
- *- Ninet, L. and Renaut, J. (1979). Carotenoids. Microbial technology. 2d. Vol. 1. In: Pepper, H. J., and Perlman, D. New York Academic Press. pp. 529-544.
- *- Okagbue, R. N. And Lewis, M. W. (1983). Mixed culture of *Bacillus circulans* WL-12 and *Phaffia rhodozyma* on different carbon sources: yeast-wall lytic enzyme production and extractability of astaxanthin. Biotechnol. Lett. 5(11): 731-736.
- *- Parajó, J. C., Santos, V. and Vázquez, M. (1997). Co-production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Biotechnol. Lett. 19: 139-141.
- *- Prevatt, W. D., Batelsville, Dickson, T. D. and Harris, R. L. (1991). Novel strains of *Phaffia rhodozyma* containing high levels of astaxanthin. European patent application 0438182.
- *- Santamaria, L. and Bianchi, A. (1987). Cancer chemoprevention by carotenoids in animal models and perspectives in human interventions. 8 th International Symposium on Carotenoids. Boston Massachusets. USA. Jul. pp. 27-31.
- *- Schroeder, W. and Johnson, E. (1993). Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. J. Gen. Microbiol. 139: 907-912.
- *- Soon, B. C., Chin, J. E. and An, G. H. (1992). Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. FEMS Microbiol. Letters. 93: 221-226.

*- Tafoya, A. y García, F. (1993). Colorantes. En: Biotecnología Alimentaria. Ed. Por: García Garibay, Quintero Ramírez y López Munguía. pp. 479-517. ED. Limusa Noriega Editores.

*- Vecher, A. S. and Kulikova, A. (1968). Changes in the polyene compounds at various stages of carotenoid development of *Rhodotorula glutinis*. Mikrobiologiya (English Translation). 37: 558-560.

*- Velázquez, E. M. (1995). Producción de astaxantina por fermentación sumergida de *Phaffia rhodozyma*. Tesis de Maestría, Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del CCH, UNAM.

*- Yamane, Y., Higashida, K., and Nishio, N. (1997). Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. Applied. Environ. Microbiol. 63: 4471.

*- Yobayashi Makio, Kakizono Toshihide and Nagai Shiro. (1991). Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 5: 335-339.

ANEXOS

ANEXO 1

LE IN USE IS MEDIOS1.SYS

LH VERSION 5.03

VARIABLES IN SYSTAT RECT FILE ARE:
RELACION COLOR

LEVELS ENCOUNTERED DURING PROCESSING ARE:

RELACION	1.000	2.000	3.000	4.000	5.000	6.000
	7.000	8.000	9.000	10.000	11.000	12.000

VAR: COLOR N: 24 MULTIPLE R: 0.914 SQUARED MULTIPLE R: 0.835

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
RELACION	2833010.726	11	257546.430	5.526	0.003
DR	559290.571	12	46607.548		

ANEXO 2

>
>
>
>
>
>
TEST FOR EFFECT CALLED: RELACION

A MATRIX

1	2	3	4	5
0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
6	7	8	9	10
-2.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	12			
0.000	0.000			

TEST OF HYPOTHESIS

SOURCE	SS	DF	MS	F	P
HYPOTHESIS	37605.013	1	37605.013	0.807	0.387
ERROR	559290.571	12	46607.548		

>
>
>
>
>
>
TEST FOR EFFECT CALLED: RELACION

A MATRIX

1	2	3	4	5
0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
6	7	8	9	10
0.000	-2.000	0.000	0.000	0.000
11	12			
0.000	0.000			

TEST OF HYPOTHESIS

SOURCE	SS	DF	MS	F	P
HYPOTHESIS	65852.823	1	65852.823	1.413	0.258
ERROR	559290.571	12	46607.548		

TEST FOR EFFECT CALLED: RELACION

MATRIX

	1	2	3	4	5
	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
	6	7	8	9	10
	0.000	0.000	-2.000	0.000	0.000
	11	12			
	0.000	0.000			

TEST OF HYPOTHESIS

SOURCE	SS	DF	MS	F	P
HYPOTHESIS	705.931	1	705.931	0.015	0.904
ERROR	559290.571	12	46607.548		

TEST FOR EFFECT CALLED: RELACION

MATRIX

	1	2	3	4	5
	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
	6	7	8	9	10
	0.000	0.000	0.000	-2.000	0.000
	11	12			
	0.000	0.000			

TEST OF HYPOTHESIS

SOURCE	SS	DF	MS	F	P
HYPOTHESIS	157.202	1	157.202	0.003	0.955
ERROR	559290.571	12	46607.548		

>
>
>
>
>
TEST FOR EFFECT CALLED: RELACION

A MATRIX

	1	2	3	4	5
	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
	6	7	8	9	10
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	11	12			
	-2.000	0.000			

TEST OF HYPOTHESIS

SOURCE	SS	DF	MS	F	P
HYPOTHESIS	11900.386	1	11900.386	0.255	0.622
ERROR	559290.571	12	46607.548		

>
>
>
>
>
TEST FOR EFFECT CALLED: RELACION

A MATRIX

	1	2	3	4	5
	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
	6	7	8	9	10
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	11	12			
	0.000	-2.000			

TEST OF HYPOTHESIS

SOURCE	SS	DF	MS	F	P
HYPOTHESIS	92713.228	1	92713.228	1.989	0.184
ERROR	559290.571	12	46607.548		

>
>
>
>
>

TEST FOR EFFECT CALLED: RELACION

A MATRIX

	1	2	3	4	5
	0.000	3.000	3.000	2.000	2.000
	6	7	8	9	10
	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000
	11	12			
	2.000	2.000			

TEST OF HYPOTHESIS

SOURCE	SS	DF	MS	F	P
HYPOTHESIS	1662415.668	1	1662415.668	35.668	0.000
ERROR	559290.571	12	46607.548		

ANEXO 3

Analysis of Color espcf

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F VALUE	PROB > F
MODEL	2143325.88	7	306189.4	5.83	0.0119
RESIDUAL	420240.70	8	52530.1		
*PURE ERROR	420240.70	8	52530.1		
COR TOTAL	2563566.58	15			
ROOT MSE	229.19		R-SQUARED	0.84	
DEP MEAN	1151.69		ADJ R-SQUARED	0.69	
C.V. :	19.90		PRED R-SQUARED	0.34	

~~Produced~~ Residual Sum of Squares (PRESS) = 1680962.8

* ~~Residual~~ = Lack-Of-Fit + Pure Error

FACTOR	COEFFICIENT ESTIMATE	DF	STANDARD ERROR	t FOR H0 COEFFICIENT=0	PROB > t
INTERCEPT	1151.69094	1	57.29861		
A	-143.18756	1	57.29861	-2.50	0.0370
B	-143.18581	1	57.29861	-2.50	0.0370
C	111.84531	1	57.29861	1.95	0.0867
AB	67.00269	1	57.29861	1.17	0.2759
AC	-140.15094	1	57.29861	-2.45	0.0402
BC	-224.76319	1	57.29861	-3.92	0.0044
ABC	76.11506	1	57.29861	1.33	0.2207

Final Equation in Terms of Coded Factors

Color espcf =

$$\begin{aligned}
 & 1151.691 \\
 - & 143.188 * A \\
 - & 143.186 * B \\
 + & 111.845 * C \\
 + & 67.003 * A * B \\
 - & 140.151 * A * C \\
 - & 224.763 * B * C \\
 + & 76.115 * A * B * C
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Uncoded Factors

Color espcf =

$$\begin{aligned}
 & -603.282 \\
 + & 78.121 * Melaza \\
 + & 261.939 * Ext. Lev. \\
 + & 731.307 * Amonio \\
 - & 9.617 * Melaza * Ext. Lev. \\
 - & 37.660 * Melaza * Amonio \\
 - & 109.273 * Ext. Lev. * Amonio \\
 + & 4.412 * Melaza * Ext. Lev. * Amonio
 \end{aligned}$$

OBS ORD	ACTUAL VALUE	PREDICTED VALUE	RESIDUAL	LEVER	STUDENT RESID	COOK'S DIST	OUTLIER T VALUE	RUN ORD
1	1.15E+03	9.52E+02	1.93E+02	0.500	1.193	0.178	1.231	2
2	7.59E+02	9.52E+02	-1.93E+02	0.500	-1.193	0.178	-1.231	10
3	1.17E+03	9.64E+02	2.04E+02	0.500	1.257	0.197	1.312	14

4	7.61E+02	2.64E+02	-2.04E+02	0.500	-1.257	0.197	-1.312	11
5	1.16E+03	1.13E+03	2.65E+01	0.500	0.163	0.003	0.153	7
6	1.11E+03	1.13E+03	-2.65E+01	0.500	-0.163	0.003	-0.153	15
7	1.15E+03	1.11E+03	3.73E+01	0.500	0.230	0.007	0.216	3
8	1.07E+03	1.11E+03	-3.73E+01	0.500	-0.230	0.007	-0.216	1
9	1.89E+03	2.06E+03	-1.71E+02	0.500	-1.058	0.140	-1.067	9
10	2.23E+03	2.06E+03	1.71E+02	0.500	1.058	0.140	1.067	5
11	1.26E+03	1.21E+03	5.83E+01	0.500	0.360	0.016	0.339	4
12	1.15E+03	1.21E+03	-5.83E+01	0.500	-0.360	0.016	-0.339	16
13	7.33E+02	1.04E+03	-3.03E+02	0.500	-1.871	0.437	-2.333	13
14	1.34E+03	1.04E+03	3.03E+02	0.500	1.871	0.437	2.333	12
15	6.89E+02	7.55E+02	-6.64E+01	0.500	-0.409	0.021	-0.387	6
16	8.22E+02	7.55E+02	6.64E+01	0.500	0.409	0.021	0.387	8

ANEXO 4

 Analysis of Color especif

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F VALUE	PROB > F
MODEL	1979800.07	5	395760.0	6.77	0.0053
RESIDUAL	584766.50	10	58476.7		
*LACK OF FIT	164525.81	2	82262.9	1.57	0.2667
*PURE ERROR	420240.70	8	52530.1		
COR TOTAL	2563566.58	15			
ROOT MSE	241.82		R-SQUARED	0.77	
DEP MEAN	1151.69		ADJ R-SQUARED	0.66	
C.V. %	21.00		PRED R-SQUARED	0.42	

Predicted Residual Sum of Squares (PRESS) = 1497002.3

* Residual = Lack-Of-Fit + Pure Error

FACTOR	COEFFICIENT ESTIMATE	DF	STANDARD ERROR	t FOR H0 COEFFICIENT=0	PROB > t
INTERCEPT	1151.6909	1	60.4549		
A	-143.1876	1	60.4549	-2.37	0.0394
B	-143.1858	1	60.4549	-2.37	0.0394
C	111.8453	1	60.4549	1.85	0.0940
AC	-140.1509	1	60.4549	-2.32	0.0429
BC	-224.7632	1	60.4549	-3.72	0.0040

Final Equation in Terms of Coded Factors

Color especif =

$$\begin{aligned}
 & 1151.691 \\
 & - 143.188 * A \\
 & - 143.186 * B \\
 & + 111.845 * C \\
 & - 140.151 * A * C \\
 & - 224.763 * B * C
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Uncoded Factors

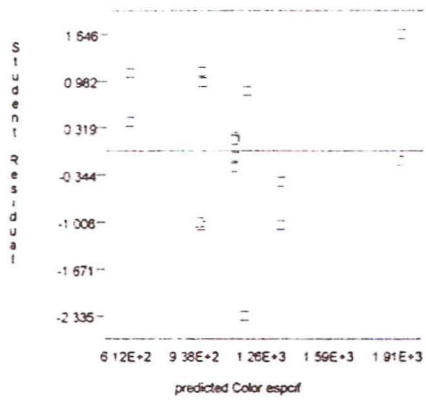
Color especif =

$$\begin{aligned}
 & -189.738 \\
 & + 36.766 * \text{Melaza} \\
 & + 165.766 * \text{Ext. Lev.} \\
 & + 541.571 * \text{Amonio} \\
 & - 18.687 * \text{Melaza} * \text{Amonio} \\
 & - 65.149 * \text{Ext. Lev.} * \text{Amonio}
 \end{aligned}$$

OBS ORD	ACTUAL VALUE	PREDICTED VALUE	RESIDUAL	LEVER	STUDENT RESID	COOK'S DIST	OUTLIER T VALUE	RUN ORD
1	1.15E+03	9.61E+02	1.84E+02	0.375	0.964	0.093	0.960	2
2	7.59E+02	9.61E+02	-2.03E+02	0.375	-1.059	0.112	-1.066	10
3	1.17E+03	9.55E+02	2.13E+02	0.375	1.113	0.124	1.128	14
4	7.61E+02	9.55E+02	-1.95E+02	0.375	-1.018	0.104	-1.020	11
5	1.16E+03	1.12E+03	3.56E+01	0.375	0.186	0.003	0.177	7
6	1.11E+03	1.12E+03	-1.74E+01	0.375	-0.091	0.001	-0.086	15
7	1.15E+03	1.12E+03	2.82E+01	0.375	0.148	0.002	0.140	3
8	1.07E+03	1.12E+03	-4.65E+01	0.375	-0.243	0.006	-0.231	1

9	1.89E+03	1.91E+03	-2.84E+01	0.375	-0.148	0.002	-0.141	9
10	2.23E+03	1.91E+03	3.15E+02	0.375	1.646	0.271	1.828	5
11	1.26E+03	1.35E+03	-8.48E+01	0.375	-0.444	0.020	-0.425	4
12	1.15E+03	1.35E+03	-2.01E+02	0.375	-1.054	0.111	-1.060	16
13	7.33E+02	1.18E+03	-4.46E+02	0.375	-2.335	0.545	-3.283	13
14	1.34E+03	1.18E+03	1.60E+02	0.375	0.837	0.070	0.824	12
15	6.89E+02	6.12E+02	7.68E+01	0.375	0.402	0.016	0.384	6
16	8.22E+02	6.12E+02	2.09E+02	0.375	1.096	0.120	1.108	8

DESIGN-EASE Analysis
Color espaf



ANEXO 5

 Analysis of Color volum.

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F VALUE	PROB > F
MODEL	14.34568	7	2.0494	8.94	0.0031
RESIDUAL	1.83470	8	0.2293		
*PURE ERROR	1.83470	8	0.2293		
COR TOTAL	16.18038	15			
ROOT MSE	0.47889		R-SQUARED	0.89	
DEP MEAN	3.06625		ADJ R-SQUARED	0.79	
C.V. *	15.61816		PRED R-SQUARED	0.55	

Predicted Residual Sum of Squares (PRESS) = 7.3388

* Residual = Lack-Of-Fit + Pure Error

FACTOR	COEFFICIENT ESTIMATE	DF	STANDARD ERROR	t FOR H0 COEFFICIENT=0	PROB > t
INTERCEPT	3.066250	1	0.119723		
A	0.777500	1	0.119723	6.49	0.0002
B	-0.286250	1	0.119723	-2.39	0.0438
C	-0.330000	1	0.119723	-2.76	0.0248
AB	-0.070000	1	0.119723	-0.58	0.5749
AC	-0.211250	1	0.119723	-1.76	0.1157
BC	-0.187500	1	0.119723	-1.57	0.1560
ABC	-0.128750	1	0.119723	-1.08	0.3136

Final Equation in Terms of Coded Factors

Color volum. =

	3.06625	
+	0.77750 * A	
-	0.28625 * B	
-	0.33000 * C	
-	0.07000 * A * B	
-	0.21125 * A * C	
-	0.18750 * B * C	
-	0.12875 * A * B * C	

Final Equation in Terms of Uncoded Factors

Color volum. =

	1.87420	
+	0.16793 * Melaza	
-	0.13460 * Ext. Lev.	
-	0.02558 * Amonio	
+	0.02004 * Melaza * Ext. Lev.	
+	0.00393 * Melaza * Amonio	
+	0.02029 * Ext. Lev. * Amonio	
-	0.00746 * Melaza * Ext. Lev. * Amonio	

OBS ORD	ACTUAL VALUE	PREDICTED VALUE	RESIDUAL	LEVER	STUDENT RESID	COOK'S DIST	OUTLIER T VALUE	RUN ORD
1	2.90	2.56	0.335	0.500	0.989	0.122	0.988	2
2	2.23	2.56	-0.335	0.500	-0.989	0.122	-0.988	10
3	4.95	4.43	0.525	0.500	1.550	0.300	1.734	14

4	3.90	4.43	-0.525	0.500	-1.550	0.300	-1.734	11
5	2.20	2.25	-0.050	0.500	-0.148	0.003	-0.138	7
5	2.30	2.25	0.050	0.500	0.148	0.003	0.138	15
7	4.46	4.35	0.115	0.500	0.340	0.014	0.320	3
9	4.23	4.35	-0.115	0.500	-0.340	0.014	-0.320	1
9	2.45	2.44	0.005	0.500	0.015	0.000	0.014	9
10	2.44	2.44	-0.005	0.500	-0.015	0.000	-0.014	5
11	3.89	3.98	-0.085	0.500	-0.251	0.008	-0.236	4
12	4.06	3.98	0.085	0.500	0.251	0.008	0.236	16
13	1.42	1.89	-0.475	0.500	-1.403	0.246	-1.511	13
14	2.37	1.89	0.475	0.500	1.403	0.246	1.511	12
15	2.10	2.63	-0.530	0.500	-1.565	0.306	-1.758	6
16	3.16	2.63	0.530	0.500	1.565	0.306	1.758	8

ANEXO 6

 Analysis of Color volum.

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F VALUE	PROB > F
MODEL	12.72553	3	4.2418	14.73	0.0003
RESIDUAL	3.45485	12	0.2879		
*LACK OF FIT	1.62015	4	0.4050	1.77	0.2287
*PURE ERROR	1.83470	8	0.2293		
COR TOTAL	16.18038	15			
ROOT MSE	0.53657		R-SQUARED	0.79	
DEP MEAN	3.06625		ADJ R-SQUARED	0.73	
C.V. †	17.49913		PRED R-SQUARED	0.62	

Predicted Residual Sum of Squares (PRESS) = 6.1420

* Residual = Lack-Of-Fit + Pure Error

FACTOR	COEFFICIENT ESTIMATE	DF	STANDARD ERROR	t FOR HO COEFFICIENT=0	PROB > t
INTERCEPT	3.066250	1	0.134142		
A	0.777500	1	0.134142	5.80	< 0.0001
B	-0.286250	1	0.134142	-2.13	0.0542
C	-0.330000	1	0.134142	-2.46	0.0300

Final Equation in Terms of Coded Factors

Color volum. =

$$\begin{aligned}
 & 3.06625 \\
 & + 0.77750 * A \\
 & - 0.28625 * B \\
 & - 0.33000 * C
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Uncoded Factors

Color volum. =

$$\begin{aligned}
 & 2.81641 \\
 & + 0.15550 * \text{Melaza} \\
 & - 0.12446 * \text{Ext. Lev.} \\
 & - 0.22000 * \text{Amonio}
 \end{aligned}$$

OBS ORD	ACTUAL VALUE	PREDICTED VALUE	RESIDUAL	LEVER	STUDENT RESID	COOK'S DIST	OUTLIER T VALUE	RUN ORD
1	2.90	2.90	-0.005	0.250	-0.011	0.000	-0.010	2
2	2.23	2.91	-0.675	0.250	-1.453	0.176	-1.532	10
3	4.95	4.46	0.490	0.250	1.054	0.093	1.060	14
4	3.90	4.46	-0.560	0.250	-1.205	0.121	-1.231	11
5	2.20	2.33	-0.132	0.250	-0.285	0.007	-0.274	7
6	2.30	2.33	-0.033	0.250	-0.070	0.000	-0.067	15
7	4.46	3.89	0.572	0.250	1.232	0.126	1.262	3
8	4.23	3.89	0.343	0.250	0.737	0.045	0.722	1
9	2.45	2.24	0.205	0.250	0.441	0.016	0.426	9
10	2.44	2.24	0.195	0.250	0.420	0.015	0.405	5
11	3.89	3.80	0.090	0.250	0.194	0.003	0.186	4
12	4.06	3.80	0.260	0.250	0.560	0.026	0.543	16
13	1.42	1.67	-0.252	0.250	-0.543	0.025	-0.527	13
14	2.37	1.67	0.698	0.250	1.501	0.188	1.595	12

15	2.10	3.23	-1.128	0.250	-2.426	0.491	-3.255	6
16	3.16	3.23	-0.068	0.250	-0.145	0.002	-0.139	8

DESIGN-EASE Analysis
Color volum.

