

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Bioprospección de levaduras antárticas con potencial biotecnológico para producción de carotenoides

Tesina de grado

Santiago Pena

Orientador:

Dra. Verónica Saravia



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

**Instituto de Ingeniería Química, departamento Bioingeniería,
Facultad de Ingeniería, UdelaR.**

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Verónica por haberme dado la oportunidad de unirme a su equipo de trabajo y todo el aprendizaje que me brindó. A mis padres por su constante apoyo en mis decisiones y motivaciones para seguir adelante. A todos mis amigos y mi novia por su aliento en momentos que se hicieron cuesta arriba.

Índice

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1 Antártida y organismos extremófilos	6
2.2 Carotenoides.....	7
2.2.1 Propiedades y beneficios de los carotenoides.....	10
2.2.1.1 Provitamina A y salud ocular	10
2.2.1.2 Prevención e influencia sobre cáncer y otras enfermedades	11
2.3 Levaduras y su potencial biotecnológico	12
2.4 Mutagénesis.....	13
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Origen y activación de las cepas	17
4.2 Medios de cultivo	18
4.3 Identificación preliminar mediante amplificación y secuenciación de región ITS	19
4.4 Condiciones de crecimiento	20
4.4.1 Temperatura de incubación	20
4.4.2 Composición de medio de cultivo: fuente de carbono y agregado de sales minerales.....	21
4.4.3 Evaluación del medio de cultivo	21
4.5 Ensayo de mutagénesis.....	22
4.6 Extracción de pigmentos	23
4.7 Métodos analíticos.....	24
4.7.1 determinación de biomasa por peso seco	24
4.7.2 Medidas de sustrato residual HPLC	25
4.7.3 Caracterización de pigmentos y cuantificación	25

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
5.1 Identificación de las cepas.....	27
5.1.1 Características macro y micro morfológicas	27
5.1.2 Identificación molecular.....	27
5.3 Condiciones de crecimiento y selección de medio de cultivo.	30
5.4 Ajustes de composición del medio para la cepa P9.....	31
5.4.1 Ecuaciones de absorbancia en relación con la biomasa producida.....	31
5.4.2 Curva de crecimiento de la cepa P9 en medios Tautos y Gli	32
5.5 Fuente de carbono y sales marinas	33
5.6 Mutagénesis.....	36
5.7 Extracción de pigmentos	38
5.8 Análisis de resultados HPLC.....	39
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	46
7. REFERENCIAS	47
8. ANEXO	53
8.1 Secuencias de ITS	53
8.2 Gráficos suplementarios	54
8.3 Espectros de absorbancia HPLC y datos suplementarios	56

1. RESUMEN

La Antártida se caracteriza por sus condiciones adversas para los organismos, por esta razón los que la habitan tuvieron que evolucionar y desarrollar adaptaciones que les permitieran cumplir su ciclo de vida. Esta presión selectiva a la que están sometidos los organismos genera gran interés en el plano de la ciencia para realizar estudios en el ámbito biotecnológico, como la producción de pigmentos de origen natural a partir de microorganismos.

Los carotenoides son compuestos isoprenoides con importancia para los sectores farmacéuticos, cosméticos y alimentarios. La fuerte tendencia social de utilizar pigmentos de origen natural impulsó este campo de investigación, que también tiene como beneficio la independencia de la estacionalidad comparado con cultivos vegetales (fuentes de pigmentos utilizadas en la actualidad).

Este trabajo se centró en el estudio de cepas de levaduras antárticas, aisladas de muestras de hielo y agua en la Península Fildes, Antártida, como potenciales productoras de pigmentos. Se analizó, en ensayos en matraces agitados, el crecimiento y producción de pigmentos bajo diferentes temperaturas de incubación y composición de los medios de cultivo. La incorporación de sales marinas en los medios ensayados no mostró diferencias en cuanto al crecimiento microbiano. La temperatura óptima de crecimiento determinada fue de 25 °C.

La viabilidad económica de la producción de carotenoides a nivel industrial requiere una optimización en el proceso de producción, que abarca desde la composición de los medios y condiciones de cultivo a la obtención de cepas mejores productoras. Es por ello que en este trabajo se buscó la obtención de cepas mutantes superproductoras utilizando radiación UV como mutágeno. Se obtuvieron mutantes que produjeron $35,2 \pm 6,5$ µg de β-caroteno por gramo de biomasa, un valor 4,5 veces superior en comparación con la cepa salvaje y unos valores de carotenoides totales entre 43 y 109 µg de carotenoides por gramo de biomasa. Entre todos los mutantes se observó heterogeneidad en la proporción de carotenoides producidos comparados con la cepa salvaje de *Rhodotorula* sp. generando distintas opciones de acuerdo con la producción del pigmento que sea de interés.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Antártida y organismos extremófilos

El estudio microbiológico antártico ha avanzado mucho, comenzando con estudios taxonómicos, aislamiento e identificación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos que habitan el agua, sedimento, nieve y animales (Marshall, 1990). El desarrollo de métodos modernos de filogenética molecular (metagenómica) entre otros, permitieron un estudio más exhaustivo de la diversidad microbiana que habita este ambiente, promoviendo aún más el interés en la investigación antártica. (Cowan, 2014).

La Antártida se destaca por sus condiciones extremas para los organismos, tales como bajas temperaturas, altos niveles de radiación UV y baja disponibilidad de nutrientes (Zucconi et al., 1996). Los organismos que la habitan tales como bacterias, hongos, líquenes y algas, entre otros, debieron desarrollar estrategias y adaptaciones para sobrevivir estas condiciones. No solo son tolerantes a las condiciones extremas, sino que evolucionaron de forma tal que las requieren para crecer (Madigan, Martinko y Parker, 2009).

Debido a las bajas temperaturas antárticas los microorganismos que se encuentran en mayor proporción son psicrófilos o psicrotolerantes.

La clasificación de los microorganismos de acuerdo con la temperatura de crecimiento se realiza en base a sus temperaturas cardinales. Un organismo psicrófilo se define en base a una temperatura óptima de crecimiento de 15°C o inferior, una temperatura máxima de crecimiento de 20°C y una temperatura mínima de 0°C o menos (Morita, 1975; Arthur et al., 1976). Mientras que los que tienen la habilidad de crecer a temperaturas tan bajas como 0 °C, pero su temperatura optima esta entre 20 y 35 °C se denominan psicrotolerantes. (Van Uden, 1984; Vishniac, 1987) (Figura 1).

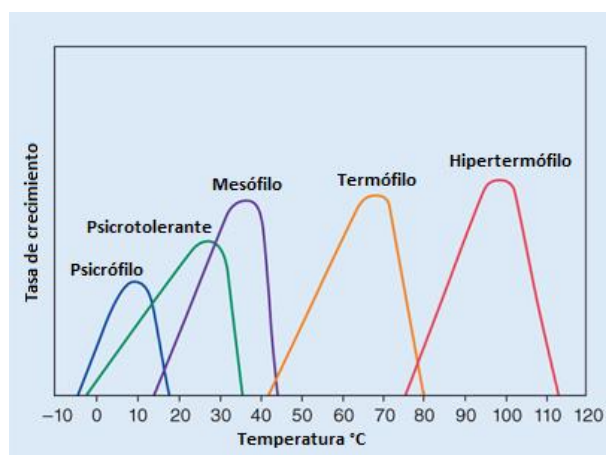


Figura 1. Relación entre temperatura y tasa de crecimiento de organismos psicrófilos, psicrotolerantes, mesófilos e hipertermófilos. Adaptación de (Carrol et al., 2016).

Los organismos psicrófilos producen enzimas que funcionan de modo óptimo a temperaturas bajas y que se desnaturalizan o inactivan a temperaturas no muy altas. En general estas enzimas tienen en su estructura secundaria mayor cantidad de hélices α que hojas β . La disposición en hojas β tiende a ser más rígida que las hélices α , lo que le brinda mayor flexibilidad a la proteína en estas condiciones. En comparación con microorganismos mesófilos y termófilos, la composición aminoacídica de estas enzimas suele tener más aminoácidos polares y menos hidrofóbicos, también presentan menor cantidad de enlaces débiles y una menor interacción entre dominios estructurales. Estas características ayudan a mantener flexibles y enzimáticamente activas sus proteínas a bajas temperaturas (Madigan et al., 2009).

La membrana de estos organismos tiene un mayor contenido en ácidos grasos no saturados, facilitando el estado semifluido de la membrana y asegurando que a baja temperatura no sea inhibido el transporte activo (Madigan et al., 2009).

La producción de pigmentos, como la melanina y carotenoides, es otra de las adaptaciones de varios microorganismos asociados a ambientes extremos. Dichos pigmentos confieren protección contra la radiación UV absorbiendo un amplio rango del espectro electromagnético, previniendo el daño foto inducido. También colaboran para soportar temperaturas extremas, desecación y presiones osmóticas exigentes (Babjeva y Reshetova, 1998).

2.2 Carotenoides

Los carotenoides son el grupo de pigmentos con mayor variedad en la naturaleza, contando con más de 600 estructuras caracterizadas. Están presentes en todos los organismos fotosintéticos y son responsables del color de amarillo a rojo de la mayoría de las frutas y vegetales. A su vez están presentes en los colores característicos de aves, insectos e invertebrados marinos, en estos casos debido a su dieta, ya que, salvo pocas excepciones como los áfidos, los animales no son capaces de sintetizar carotenoides de novo (Fraser y Bramley, 2004; Moran y Jarvik, 2010). No solo son “otro grupo de pigmentos naturales”, sino que cuentan con propiedades que han sido implicadas en la prevención de serias enfermedades humanas como cáncer, enfermedades cardíacas y también en tratamientos de deficiencia de vitamina A, ya que algunos tienen potencial como provitamina A (Bauernfeind, 1981). Esto hace que su rol en las funciones y acciones en todo tipo de organismos vivos sea importante. Sin carotenoides, la fotosíntesis tal como se conoce hoy en día sería inviable (Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia, 2007). Estas

propiedades hacen que los carotenoides sean de gran interés para industrias farmacéuticas, químicas y alimenticias. En la actualidad el interés en pigmentos sintéticos ha disminuido debido a su toxicidad, efectos carcinogénicos y propiedades teratogénicas. Esto impulsó la atención hacia fuentes microbiológicas como alternativa segura para el uso de pigmentos de origen natural (Nelis y Leenher, 1991; Babu y Shenolikar, 1995; Babitha, 2009). Además, la obtención de pigmentos de fuentes microbiológicas remueve el problema de temporadas de producción y ubicación geográfica que se tiene cuando se utilizan vegetales como fuente principal. Levaduras de géneros como *Rhodotorula* y *Phaffia* han mostrado resultados más prometedores frente a algas y mohos para producción de pigmentos a escala de laboratorio y planta piloto de producción (Frengova y Beshkova, 2008).

En cuanto a su estructura, son compuestos isoprenoides que se biosintetizan uniendo cola con cola de dos moléculas de C₂₀ geranilgeranil-difosfato. Esto resulta en la molécula parental con el esqueleto de 40 átomos de carbonos sobre la cual se producen todas las variaciones de los distintos carotenoides (Britton, 1995). La característica más distinguible de su estructura es el largo sistema de doble enlaces alternados con simple enlaces formando la parte central de la molécula (figura 2). Ésta es la que le provee a los carotenoides su distintiva forma molecular, sus propiedades químicas y de absorción lumínica. (Bendich y Olson, 1989)

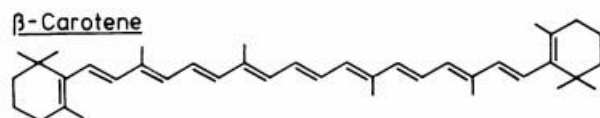


Figura 2. Estructura molecular de β-caroteno (Sies y Stahl, 1995).

Los carotenoides se localizan comúnmente de manera integral en glóbulos lipídicos o en la membrana de los microorganismos, influenciando de forma directa su fluidez, en algunos casos incrementando la rigidez y fuerza mecánica que esta es capaz de soportar (Britton, 1995; Armstrong, 1997). A su vez las modificaciones bioquímicas como hidroxilación y esterificación determinan la localización y orientación en las membranas (Echavarri y Johnson, 2002). También pueden encontrarse fuera de la membrana asociados a proteínas o lipoproteínas (Yound y Lowe, 2001).

La proporción de cada carotenoide es dependiente de la cepa y de las condiciones de cultivo, esto dificulta la comparación con otros estudios sobre la misma especie si las condiciones de crecimiento son diferentes (Buzzini, 2007). Algunas publicaciones muestran

como una misma cepa de *Rhodotorula glutinis* produce carotenoides en distintas proporciones dependiendo de la fuente de carbono, pasando de relaciones tan distintas como 80:17 de β -caroteno y toruleno utilizando glucosa, a 47:49 usando melaza de caña de azúcar en el medio (Frengova y Beshkova, 2008).

Algunos carotenoides tienen una estructura con menos de 40 átomos de carbono y se originan por la pérdida de una parte del esqueleto C_{40} . Estos se definen como apocarotenoides si los átomos se pierden de los extremos de la molécula o norcarotenoides cuando los átomos se pierden dentro de la cadena. (Britton G., 1995).

La síntesis de isoprenoides (precursores de carotenoides) en hongos, arqueobacterias y animales se realiza por la vía de mevalonato, mientras que la mayoría de las eubacterias y protozoos apicomplejos utilizan solo la vía MEP (metileritritol 4-fosfato) (Disch y Rohmer, 1998; Rodriguez, 2010). En la vía de mevalonato se parte de una molécula de Acetil-CoA que por procesos enzimáticos se transforma en ácido mevalónico el cual es transformado en unidades isopentilo-pirofosfato y luego sucesivamente condensado hasta formar fitoeno (figura 3). Las transformaciones sucesivas de fitoeno resultan en los pigmentos de interés en este trabajo y su relación sintética entre sí, puede verse en la figura 4 (Moliné, Libkind y van Broock, 2012).

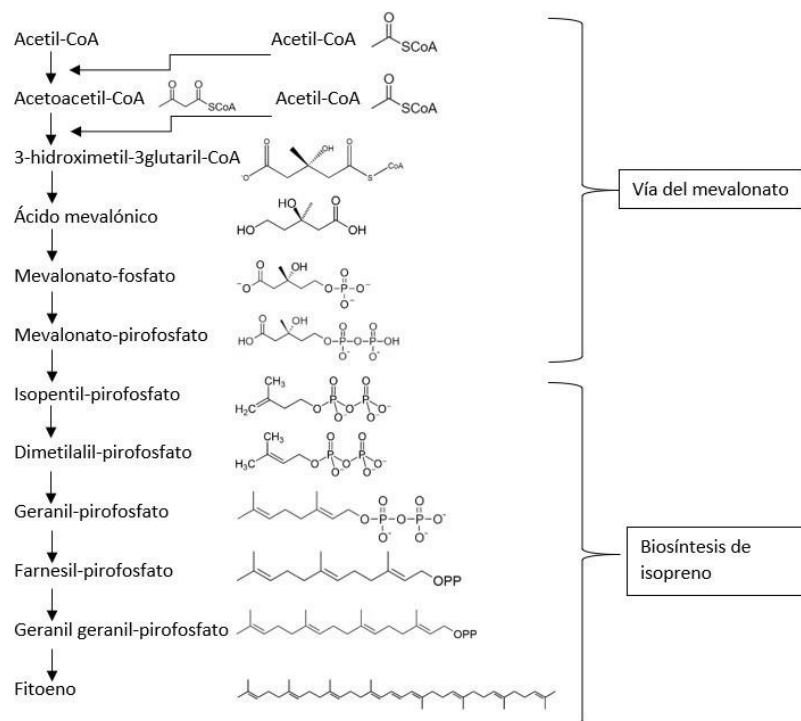


Figura 3. Vía del mevalonato y posteriores transformaciones de la síntesis de isopreno hasta fitoeno. (adaptación de Frengova y Beshkova, 2008).

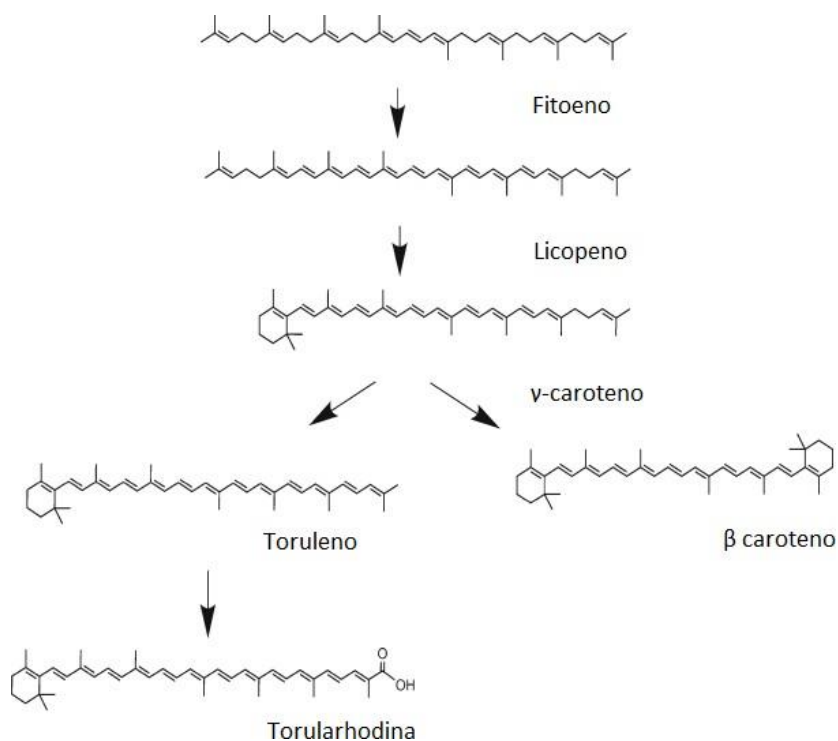


Figura 4. Relaciones biosintéticas fitoeno, licopeno, β -caroteno, γ -caroteno, toruleno y torularhodina (adaptación de Moliné et al., 2012).

2.2.1 Propiedades y beneficios de los carotenoides

2.2.1.1 Provitamina A y salud ocular

La función provitamina A de algunos carotenoides es la mejor establecida, restringida a aproximadamente 50 carotenoides con anillos β en los grupos terminales como β -caroteno y β -criptoxantina. (Fraser y Bramley, 2004).

En humanos, los carotenoides son convertidos en retinaldehído por una enzima llamada BCO (β -Caroteno 15,15'-monooxygenasa) cuando son escindidos del centro de la molécula. Este es el primer paso en la síntesis de vitamina A partiendo de carotenoides adquiridos a través de la dieta y el que se da en mayor proporción. Si la molécula se escinde de forma asimétrica da lugar a una gama de apocarotenoides que podrían ser precursores de ácido retinoico. (Fraser y Bramley, 2004; Lindqvist y Andersson, 2002).

La deficiencia de vitamina A provoca la xeroftalmia, la cual podría ser prevenido incluyendo carotenoides provitamina A en la dieta (Congdon y West, 1999). La incidencia de

otras enfermedades comunes relacionadas con el envejecimiento como cataratas o degeneración macular puede ser reducida con una dieta rica en carotenoides (Fraser y Bramley, 2004).

2.2.1.2 Prevención e influencia sobre cáncer y otras enfermedades

Las primeras publicaciones que relacionaban el consumo elevado de carotenoides y beneficios en la salud aparecieron en la década del 70, donde dietas con alta ingesta de frutas y vegetales estaban asociadas a menor riesgo de enfermedades cardíacas y cáncer. Como consecuencia, se recomienda en la actualidad a consumir cinco porciones de frutas y vegetales por día, lo que contiene un aproximado de 6 mg de carotenoides (Fraser y Bramley, 2004).

Varias investigaciones de cultivos celulares y órganos en los cuales se exponían a agentes mutagénicos (especies reactivas de oxígeno y radiación X) mostraron que con una adición de β caroteno en el medio, éste cumplía un rol de protección contra el intercambio de cromátidas hermanas y otros daños nucleares (Moon, 1989). A su vez se ha visto que in vitro, los carotenoides inhiben la proliferación celular, transformación y formación de micronúcleos, así como también influyen en la modulación de la expresión de ciertos genes. Estas propiedades son consistentes con efectos protectores contra la carcinogénesis (Collins, 2001).

En modelos animales, los carotenoides fueron implicados como agentes quimioprotectores o quimiopreventivos en varios tipos de cáncer, por ejemplo, de piel, enlenteciendo el crecimiento de tumores cuando ratones eran expuestos a radiación ultravioleta. Cabe destacar que, en otros casos, dosis altas de carotenoides no mostraban efectos protectores (Moon, 1989).

Gran número de estudios se han desarrollado con el fin de vincular el efecto positivo del consumo de β -caroteno o licopeno (mayoritariamente consumido a través del tomate o derivados) con tratamientos sobre distintos tipos de cáncer. Los resultados no son concluyentes ya que, en estudios de cáncer de pulmón, colorrectal y de mama, algunos concluyen un resultado positivo en el consumo de carotenoides para el tratamiento, mientras otros no muestran asociación alguna entre el consumo diario de carotenoides con la reducción de riesgo de contraer cáncer. Mientras que en el caso de cáncer de próstata se vio que la ingesta de licopeno a través de tomate o derivados esta inversamente relacionada con el riesgo de desarrollar cáncer de próstata, no es claro si el licopeno es el único compuesto relacionado en esta reducción de riesgo de cáncer (Barber, 2003) (Fraser y Bramley, 2004).

Se ha visto que también cumplen un rol en el sistema inmune aumentando la respuesta proliferativa de linfocitos B y T (Bendich, 1989), eliminando excesivas especies reactivas formadas por varias células inmunoactivas y peróxidos inmunosupresores. También manteniendo la fluidez de la membrana, colaborando en la manutención de receptores de membrana esenciales para funciones inmunológicas, y actuando en la liberación de inmunomoduladores tales como prostaglandinas y leucotrienos (Benedich, 1990).

Otra de las funciones es la de otorgar protección a células del estrés oxidativo actuando sobre radicales libres y protegiendo membranas lipídicas de la peroxidación (Bendich y Olson, 1989).

2.3 Levaduras y su potencial biotecnológico

Las levaduras, por su naturaleza unicelular y alta tasa de crecimiento, pueden ser manipuladas genéticamente en el laboratorio por distintas técnicas como: mutación, transferencia cromosómica y transformación usando tecnología recombinante. Esto permite un amplio espectro de opciones para la biotecnología aplicada. Como ejemplos más conocidos, las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* son utilizadas en la actualidad para expresar genes de proteínas humanas con fines farmacéuticos, producción de etanol y dióxido de carbono para el sector alimenticio, y para la producción de enzimas entre otras aplicaciones (Shivaji, Prasad, Satyanarayana y Gotthard, 2009). Las células pueden ser cultivadas en biorreactores convencionales y la biomasa luego de ser procesada puede ser utilizada como fuente o aditivo en productos farmacéuticos. Además, pueden adaptarse a diferentes condiciones ambientales de crecimiento y utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono (Moliné et al., 2012). El hecho de poder utilizar subproductos agrícolas que frecuentemente crean problemas ambientales como fuentes de carbohidratos de bajo costo para el cultivo microbiano es una ventaja (Loehr, 1974). Un ejemplo de estos compuestos es la melaza resultante de la caña de azúcar, con un alto contenido de sacarosa y minerales. Se probó útil como medio para la producción de lípidos por levaduras del género *Rhodotorula* y de carotenoides por *Phaffia* y *Rhodozyma* (Bhosale y Gadre, 2001).

El género *Rhodotorula*, se clasifica como uno de los géneros más importantes de levaduras marinas productoras de carotenoides (Kutty y Philip, 2008). Se han reportado en algunas especies valores de producción de carotenoides totales entre 234 y 293 µg/g de biomasa seca

(Libkind, 2004). Las levaduras de este género sirven como productoras de carotenoides de gran interés comercial para rubros como la acuicultura, en particular del salmón y también como productos nutraceuticos (Weber, 2007). La especie *Rhodotorula glutinis* es una de las principales productoras de pigmentos dentro del género. Presenta un color rosa, y pertenece a la subdivisión Pucciniomycotina (previamente conocida como Urediniomycetes). Yamazaki y Komogata (1981) y Sampaio y Fonseca (1995) describieron considerable heterogeneidad fenotípica y genotípica en la especie, lo cual sugiere que el concepto de *Rhodotorula glutinis* podría abarcar más de una especie. Además, se observó un gran número de respuestas fisiológicas distintas resultando en una delimitación nutricional vaga (Gadanhó y Sampaio, 2002).

Se ha observado que algunas especies del género *Rhodotorula* además de tener un rango amplio de temperaturas en las cuales pueden crecer, también pueden ser osmofílicas, que se definen por su capacidad de crecer en ambientes con altas concentraciones de azúcares y sales (Madigan et al. 2009). Estos organismos producen carotenoides comercialmente importantes en abundancia como torularhodina (3', 4'-Didehydro- de β , Ψ -caroteno-16'-ácido oico), toruleno (3', 4'-Didehydro- de β , Ψ -caroteno), γ -caroteno (β , Ψ -caroteno) y β caroteno (β , β -caroteno), lo que conlleva a pensar que estas especies de levaduras pueden utilizarse como potenciales fuentes de pigmentos (Frengova y Beshkova, 2008).

A pesar del potencial biotecnológico de *Rhodotorula* por su producción de pigmentos, la baja concentración de carotenoides en biomasa de la cepa salvaje limita su explotación a nivel industrial. Por lo tanto, la obtención de mutantes superproductores de pigmentos, optimización de medios de cultivo y condiciones de crecimiento es necesaria para un desarrollo industrial y económico (Moliné et al., 2012).

2.4 Mutagénesis

Todos los organismos contienen una secuencia específica de bases nucleotídicas en su genoma, una mutación es una modificación heredable en la secuencia de bases y puede resultar en cambios beneficiosos, neutrales o perjudiciales para el organismo dependiendo de la región afectada. Los agentes responsables de inducir las mutaciones se denominan mutágenos y pueden ser de naturaleza química, física o biológica. Las mutaciones pueden ser inducidas si se realizan deliberadamente exponiendo microorganismos a mutágenos, o espontáneas si ocurren sin la

intervención humana. Según el tipo de mutación el fenotipo de la cepa mutante puede o no ser distinto al de la célula progenitora (Madigan et al., 2009).

Una mutación puede ser seleccionable si le confiere una ventaja adaptativa al organismo por sobre la cepa salvaje en una determinada condición ambiental, desplazando y sustituyendo la población original. Un claro ejemplo es el de la resistencia a antibióticos en bacterias, en las cuales, en condiciones de presencia de la sustancia, la cepa mutante sobrevive mientras que la salvaje no (Madigan et al., 2009).

Un ejemplo de una mutación no seleccionable es la pérdida o cambio de color de un organismo pigmentado. Si bien en el contexto del organismo en la naturaleza podrían conferirle algún beneficio por sobre las demás (mayor resistencia a radiación UV, desecación y otras características previamente mencionadas), en general cultivadas en placas de agar no suponen ventajas o desventajas de crecimiento frente a la cepa salvaje. (Madigan et al., 2009).

La mutación física comprende a la radiación en todo su espectro mutagénico (radiación ionizante y no ionizante) (figura 5). Aunque ambos tipos se utilizan en mutagénesis microbiológica, la radiación no ionizante (luz ultravioleta) es la más común. (Madigan et al., 2009)

La radiación UV actúa sobre las bases púricas y pirimidínicas del ADN que absorben a un máximo de 260 nm, generando en cierta frecuencia la muerte celular en consecuencia del daño al ADN que no puede ser reparado. Uno de los efectos más estudiados es la formación de dímeros de pirimidina, que ocurre por un enlace covalente entre dos pirimidinas adyacentes, provocando que la ADN polimerasa no pueda leer esa región o que la replique con error (Madigan et al., 2009). Este tipo de radiación fue la utilizada en este trabajo para lograr cepas mutantes con distintos perfiles de pigmentos, esperando obtener una o más cepas con una producción de carotenoides superior a la salvaje. Publicaciones de los autores Bhosale (2001); Yolmeh y

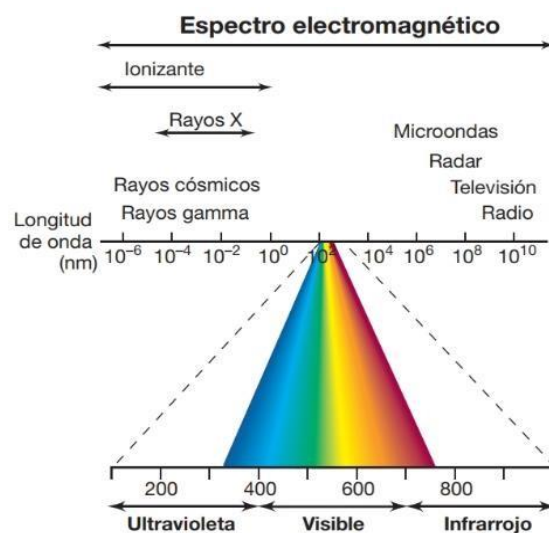


Figura 5. Espectro electromagnético (Madigan T. et al., 2009).

Khomeiri (2017); Moliné, Libkind; van Broock (2012), han comprobado este método como herramienta útil en ensayos de mutagénesis con levaduras del género *Rhodotorula*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar cepas de levaduras aisladas de la Península Fildes, Antártida y evaluar su potencial producción de pigmentos.

3.2 Objetivos específicos

- Identificación preliminar de las cepas aisladas mediante amplificación y secuenciación de la región ITS
- Evaluar condiciones y medios de cultivo para obteniendo curvas de crecimiento a través de ensayos de cultivo en lotes
- Definir un método de extracción de pigmentos a escala de matraces
- Identificar primariamente los pigmentos producidos
- Generar cepas mutantes superproductoras de pigmentos, fenotípicamente distintas a la salvaje mediante radiación UV

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Origen y activación de las cepas

Este trabajo se centró en tres cepas de levaduras colectadas en la península Fildes, Isla rey Jorge, Antártida, durante una expedición en diciembre de 2014 organizada por el IAU (Instituto Antártico Uruguayo). Los distintos medios de cultivo en los que se aislaron y el origen de las cepas se presentan en la Tabla 2. Las cepas fueron conservadas a -80 °C con una relación 4:1 de medio inoculado y glicerol al 80%. Se utilizaron perlas de vidrio sódico-cálcico de 5mm ø (Marienfeld, Republica Checa) contenidas en crioviales para el pasaje de biomasa a placa. La nomenclatura utilizada para referenciar las cepas fue: Rod, P9 y LA1.

Tabla 2. Cepas de trabajo, medios de cultivo en el cual fueron aisladas, origen, temperatura de crecimiento y coloración de las colonias.

Cepa	Medio de aislamiento	Temperatura	Origen	Color de las colonias
Rod	YPMD	20 °C	Agua oceánica	Rosadas
P9	Tautos	20 °C	Agua oceánica	Rosadas
LA1	Gli	20 °C	Hielo	Naranjas

La activación de las cepas se realizó sembrando una perla de vidrio del criovial en una placa de Petri con el medio de cultivo correspondiente y luego incubando a 20°C por 72 horas. Luego de confirmar la viabilidad celular, se sembró parte de esa biomasa en un matraz o en otra placa de Petri dependiendo del objetivo

4.2 Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo utilizados se muestra en la tabla 1. Se esterilizaron en un autoclave Tuttnauer 3870-MLV, configurado para alcanzar una temperatura de 121 °C y 15 psi durante 15 minutos. Cuando se precisó preparar cualquiera de los medios en estado sólido, se le agregó agar a una concentración final de 20 g/L.

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados, composición y concentraciones.

Nombre del medio	Composición	Concentración (g/L)
YPMD	Glucosa	10
	Extracto de levadura	3
	Peptona	5
	Extracto de malta	3
	Sales marinas	10
Tautos	Extracto de levadura	2
	Glutamato monosódico	2
	Sales marinas	20
	Glucosa anhidra	5
Tautos Op	Extracto de levadura	2
	Sales marinas	5
	Glucosa anhidra	18
Gli	Extracto de levadura	2
	MgSO ₄ 7H ₂ O	1,4
	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0,7
	NaCl	0,5
	KH ₂ PO ₄	1
	K ₂ HPO ₄	0,1
	Glicerol	10
Gli SM	Extracto de levadura	2
	Sales marinas	5
	Glicerol	10

4.3 Identificación preliminar mediante amplificación y secuenciación de región ITS

Para llevar a cabo la amplificación de la región ITS mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó como molde lisado celular. El mismo fue preparado bajo dos condiciones:

- Suspensión de una colonia en 20 μ L de NaOH 20 mM
- Se suspensión de dos anzadas en 150 μ L de ddH₂O estéril

Ambas suspensiones fueron incubadas durante 10 minutos a 95 °C. Luego se homogenizó utilizando un agitador tipo vortex y se centrifugó a una velocidad de 13000 rpm.

De ambas preparaciones se retiraron en total diez fracciones de 2 μ L las que fueron utilizadas como molde. La mezcla de la reacción de PCR contenía: 1.25 μ L de polimerasa (Mango Taq, Bioline), 50 μ L solución buffer 5x, 12.5 μ L MgCl₂ 50 mM, 25 μ L dNTP 2.5 mM, 6.25 μ L cebador ITS1 forward (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 20 μ M, 6.25 μ L cebador ITS4 reverse (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 20 μ M y 149 μ L de ddH₂O estéril con un volumen final de 250 μ L. Cada reacción de PCR se realizó en tubos agregando 2 μ L de ADN y 23 μ L de la mezcla de reacción, con un volumen final de 25 μ L por tubo. Los cebadores utilizados se conocen como cebadores universales para la amplificación de región ITS1 e ITS2 junto con el ADN ribosomal 5.8S en levaduras (Fujita, Senda, Nakaguchi y Hashimoto, 2001).

Se ensayaron diferentes condiciones de amplificación utilizando un gradiente de temperaturas en las etapas de alineamiento y extensión para determinar la temperatura óptima del proceso de amplificación. Las condiciones de amplificación fueron:

- 1- Desnaturalización 10 minutos a 95°C
- 2- 30 ciclos de 30 segundos a 94°C
- 3- 30 segundos en temperatura 42.8 °C (muestra 1 y 6), 46.4°C (Muestra 2 y 7), 49.7°C (Muestra 3 y 8), 54.6°C (Muestra 4 y 9), 58 °C (Muestra 5 y 10)
- 4- 30 segundos a 72°C
- 5- Extensión final 10 minutos a 72 °C

Las diez muestras fueron amplificadas en un termociclador Palm-Cycler™ (Corbett Research, UK Ltd) siendo las muestras de 1 a 5 las sometidas a tratamiento térmico a pH básico y de 6 a 10 las tratadas solo en agua.

Los resultados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1.5% utilizando TBE 1X 39,4 mL, intercalante Goodview 0.5 µL y un marcador de peso molecular Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder que abarca desde 250 hasta 10.000 pares de bases. Se realizaron controles negativos (solamente con agua doblemente destilada estéril) y un control positivo con ADN de levadura *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de un stock del laboratorio.

La secuenciación de los fragmentos fue realizada por Macrogen Inc. (Korea).

Las secuencias fueron editadas en los programas ChromasPro 2.1 y en DNASTAR Lasergene Seqman pro-16 removiendo los extremos poco fiables de la secuenciación. A su vez se comparó la secuencia generada por el ITS1, con la secuencia complementaria de ITS4 para descartar cualquier inconsistencia generando así un resultado más robusto. Ésta secuencia fue luego analizada con la herramienta BLASTn utilizando la preferencia “Highly similar sequences (megablast)” del centro nacional de información de biotecnología (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

4.4 Condiciones de crecimiento

4.4.1 Temperatura de incubación

Se evaluó el crecimiento de las cepas a distintas temperaturas: 4 °C, 10 °C, 25 °C, 30 °C y 35 °C. Se determinó de forma preliminar la temperatura de crecimiento óptima en placas y luego se confirmó en matraces. Los ensayos en placa se realizaron estriando a partir de una colonia en el medio de cultivo en el cual fueron aisladas por triplicado. Se seleccionaron los valores que presentaron mayor crecimiento y coloración mediante observación visual. Se determinó la temperatura óptima de crecimiento mediante ensayos en matraces de 250 mL, con 75 mL del medio correspondiente inoculados con una anizada de biomasa. Los mismos fueron incubados con agitación de 170 rpm, a diferentes temperaturas y se evaluó el crecimiento, por biomasa, tomando muestras cada 7 horas.

4.4.2 Composición de medio de cultivo: fuente de carbono y agregado de sales minerales

Se monitoreó la biomasa producida (sección 4.7.1) de la cepa P9 en dos medios con distintas fuentes de carbono: glucosa (Tautos) y glicerol (Gli). Se incubaron matraces de 250 mL con 75 mL de medio y un inóculo inicial de 0,2 g/L a 170 rpm a 25 °C y 30 °C. El consumo de la fuente de carbono se evaluó según la sección 4.4.2 de métodos analíticos.

Al medio Tautos se le modificó la concentración de glucosa inicial con un nuevo valor de 18 g/L para descartar la posibilidad de que fuera un reactivo limitante en el crecimiento. Se utilizó el medio Gli SM en lugar del medio Gli original para poder comparar con el medio Tautos siendo la única variable la fuente de carbono.

Se evaluó el impacto de distintas concentraciones de sales marinas en el crecimiento de la cepa P9 realizando un seguimiento de la biomasa a través del tiempo en medios Tautos y Gli SM con concentraciones de 5 y 10 g/L de sales marinas.

La composición final de los medios evaluados fue:

- **Gli SM 5:** 10 g/L de glicerol, 5 g/L sales marinas, 2 g/L de extracto de levadura
- **Gli SM 10:** 10 g/L de glicerol, 10 g/L sales marinas, 2 g/L extracto de levadura
- **Tautos 5:** 18 g/L glucosa, 5 g/L sales marinas, 2 g/L extracto de levadura
- **Tautos 10:** 18 g/L glucosa, 10 g/L sales marinas, 2 g/L extracto de levadura

4.4.3 Evaluación del medio de cultivo

Para evaluar el consumo de glucosa o glicerol se tomaron muestras en distintos tiempos y fueron centrifugadas a 6500 rpm, 4 °C por 10 minutos. El sobrenadante fue recuperado y mantenido a -20 °C hasta su análisis, para luego ser procesado bajo las condiciones del punto 4.7.2.

4.5 Ensayo de mutagénesis

Se realizó un recuento de células en cámara de Neubauer mejorada en una dilución de 1/40 de un cultivo de la cepa P9 a las 72 horas, utilizando azul de metileno en relación 1:1 con el volumen de cultivo celular. Se obtuvo una cantidad de células por volumen tal que fuera posible contar con bajo margen de error y extrapolar a la cantidad total de células en el cultivo.

El conteo se realizó bajo un microscopio óptico con un aumento de 400x, sembrándose el volumen necesario entre la cámara y un cubreobjeto para que por capilaridad cubriese toda el área con la suspensión de células y colorante. Se utilizaron los cuatro cuadrados que se presentan en diagonal en el centro de la placa (figura 6) en dos cámaras. La profundidad de la cámara es de 0.1 mm y la superficie de cada cuadrante chico (16 por cada cuadrante mediano coloreado) es de $0,0025 \text{ mm}^2$ lo cual nos permite saber el volumen de muestra por cuadrante. El siguiente cálculo se realizó para obtener un valor de células/mL presentes en el cultivo:

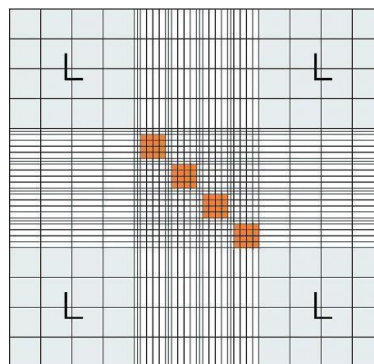


Figura 6. Esquema de cámara de Neubauer mejorada. En color se muestran los cuadrantes utilizados para el recuento.

$$\frac{\text{Células contadas} \times \text{factor de dilución}}{128 \times 2.5 \times 10^{-7} \text{ mL}}$$

128 = total de cuadrantes chicos contados (64 por cámara)

$2.5 \times 10^{-7} \text{ mL}$ = volumen de muestra por cuadrante chico

A partir de un cultivo de la cepa P9 en medio Tautos op líquido, se realizó la dilución necesaria en suero fisiológico para lograr entre 1500 y 3000 células/mL. Se sembró 0,1 mL de suspensión por dispersión con rastrillo en placas con medio Tautos op sólido. Las placas inoculadas se colocaron a 10 cm de distancia de la lámpara UV con una potencia de $6,0 \times 10^2$ a $1,1 \times 10^3 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ y fueron expuestas a tiempos de radiación entre 5 y 300 segundos. Esto permitió definir el tiempo necesario para obtener una LD₇₀ aproximada (dosis UV necesaria para obtener 70% de mortalidad), resultando en 45 a 90 células viables por placa. Luego de irradiadas,

las placas fueron incubadas a 25 °C en completa oscuridad durante 72 horas para evitar activar el sistema de reparación de lesiones en ADN por foto activación (Yolmeh y Khomeiri, 2016). Se seleccionaron colonias que presentaran coloración distinta a la cepa salvaje mediante observación en lupa y se aislaron por método de estriado en placas en mismo medio a 25 °C.

Se evaluó la capacidad de crecimiento y producción de pigmentos de las cepas mutantes obtenidas en medio Tautos op siguiendo el protocolo descrito en 4.7.1 y 4.7.3 Esto permitió comparar los valores con los de la cepa salvaje y definir si se obtuvo una mejora o no en la producción.

4.6 Extracción de pigmentos

Se cosecharon las células de un cultivo en medio Tautos de 48 horas mediante centrifugado a 6500 rpm por 15 minutos, se congelaron a -80 °C y liofilizaron para extraer el agua de la biomasa.

Se utilizó un protocolo de extracción basado en la publicación de Libkind et al. (2007) con modificaciones y detallado a continuación.

Cada muestra de biomasa se fraccionó en 0,05 g y fue colocada en un microtubo de 2 mL (Deltalab, España) junto con dos perlas de acero inoxidable y distintos solventes. Dichos tubos se colocaron en un molino mezclador Retsch MM 400 para facilitar la ruptura de las estructuras celulares y extracción de los pigmentos. Se cubrieron los tubos con papel aluminio para evitar la fotodegradación de pigmentos. En casos en que fue necesario ver la muestra, se hizo bajo luz tenue de color verde.

El procedimiento se detalla a continuación:

- 1- Se agregó 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO, Emsure) en el microtubo con la biomasa y perlas. Se procedió a mezclar en el molino durante 5 minutos a 30 Hz. Luego de finalizado, se centrifugó a 13300 rpm y se recuperó el sobrenadante pigmentado colocándolo en un tubo de vidrio.
- 2- Se agregó nuevamente 1 mL de DMSO en microtubo con la biomasa y se mezcló en el molino durante 10 minutos a 30 Hz. Se repitió el centrifugado del paso anterior y recuperación del DMSO pigmentado. Se repitió hasta que el DMSO no extrajo más pigmento de la biomasa.
- 3- Se añadió 1 mL de acetona en microtubo con biomasa y se mezcló en el molino durante

10 minutos a 30 Hz. Luego se centrifugó a 13300 rpm y se recuperó la acetona pigmentada recolectándola junto con el sobrenadante de los pasos anteriores en tubo de vidrio. Se repitió este paso hasta lograr la decoloración total de la biomasa.

- 4- Se añadió 3 mL de agua destilada saturada con NaCl y 2 mL de éter de petróleo (Emsure) al tubo de vidrio con acetona y DMSO de los pasos anteriores. Se mezcló suavemente y se centrifugó a 3500 rpm a temperatura 10 °C durante 15 minutos. Se recuperó la fase de éter de petróleo en un tubo de vidrio limpio. Se repitió nuevamente este paso.
- 5- Se agregó una fracción de Na₂SO₄ anhidro al tubo con el éter de petróleo recuperado, se agitó suavemente y centrifugó a 3500 rpm a temperatura 10 °C durante 5 minutos. Se recuperó el éter de petróleo y se transfirió a un nuevo tubo.
- 6- Se evaporó el éter de petróleo utilizando nitrógeno gaseoso y se resuspendieron los pigmentos en 1 mL de acetona para analizar en HPLC.

Se transfirió la acetona pigmentada a un tubo Eppendorf 3810X y se centrifugó a 13300 rpm por 20 minutos. Se recuperaron 200 µL de la parte superior de la solución, se transfirieron a una campana de vidrio para análisis de HPLC y ésta se colocó dentro de un vial color ámbar.

4.7 Métodos analíticos

4.7.1 determinación de biomasa por peso seco

A partir de cultivos de la cepa P9 de 36 horas en medio Tautos y en Gli se realizaron 7 diluciones con agua destilada hasta obtener una serie de valores entre 0,1 y 0,9 de absorbancia utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-vis configurado para una longitud de onda de 600 nm.

Para la determinación de biomasa se secaron seis filtros de nitrocelulosa con tamaño de poro 0,22 µm (Sartorius Stedim Biotech, Alemania) en estufa a 60 °C durante 3 horas y fueron colocados en un desecador con sílice hasta alcanzar temperatura ambiente. Su peso fue registrado transcurridas 2 horas en desecador. Se tomaron tres muestras de 10 mL de cada medio y se filtraron utilizando una bomba de vacío hasta el volumen que permitiera el filtro sin saturarse con la biomasa. Posteriormente, los filtros fueron secados nuevamente en estufa a 60 °C durante 24 horas y luego colocados en desecador.

Los filtros cargados de biomasa fueron pesados a las 48, 72 y 96 horas hasta alcanzar un peso constante. Esto permitió obtener una relación entre absorbancia y biomasa utilizada en posteriores instancias para el monitoreo de cambios en concentración de biomasa expresada en g/L.

4.7.2 Medidas de sustrato residual HPLC

Para evaluar el consumo de glucosa o glicerol se tomaron muestras en distintos tiempos y fueron centrifugadas a 6500 rpm, 4 °C por 10 minutos. El sobrenadante fue recuperado y mantenido a -20 °C hasta su análisis,

La concentración de glucosa y glicerol en el sobrenadante de los medios de cultivos se determinó con un equipo de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) Shimadzu (Japón) equipado con una columna Aminex 87H, con detector de índice de refracción RID 10A, en condiciones de temperatura de horno 45 °C y caudal de 0,3 ml/min de agua MilliQ. Se realizaron curvas de calibración con concentraciones de 4, 2 ,1 y 0,5 g/l de glicerol y glucosa para obtener dos ecuaciones que vinculan el área en el gráfico del HPLC con la concentración en g/L del sustrato

4.7.3 Caracterización de pigmentos y cuantificación

La identificación preliminar de carotenoides se basó en el análisis cromatográfico obtenido por espectrofotómetro y HPLC-DAD.

El espectrofotómetro utilizado para la cuantificación de carotenoides totales fue un Thermo Scientific Genesys 10S UV-vis operado a una longitud de onda de 450 nm y 484 nm (máximos de absorbancia de β -caroteno (A2590) y toruleno (A3240) respectivamente) con pigmentos resuspendidos en éter de petróleo.

El equipo de HPLC utilizado fue un cromatógrafo Shimadzu (Japón). La separación se realizó en una columna de fase inversa C18 (150mm x 3 mm, tamaño de partícula de 3 μ m, Hypersil™ BDS C18; Thermo Scientific, USA). El método para la separación de carotenoides se llevó a cabo con un gradiente binario de elusión:

- Composición inicial: 75% acetona y 25% agua MilliQ
- Primer incremento: 95% acetona | 5% agua MilliQ en 10 minutos y mantenido por 7 minutos
- Segundo incremento: 100% acetona en 3 minutos manteniéndose constante por 10 minutos

La temperatura de la columna se mantuvo en 25 °C. El volumen de inyección fue de 20 µL y el flujo de 0,6 mL/min. La detección fue realizada en el rango 250 – 750 nm de longitud de onda con una resolución de 1.2 nm y analizada a 450 nm. Cada muestra se preparó resuspendiendo los carotenoides extraídos a partir de 0,05g de biomasa liofilizada en 1 mL de acetona.

Se realizó una curva de calibración usando como estándar una muestra de β-caroteno comercial con una pureza del 98% (UV) (Extrasynthese, Francia) en el HPLC en mismas condiciones utilizando las concentraciones expresadas en µg/mL detalladas a continuación: 0,095, 0,47, 1,42, 1,90 y 2,85 .

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación de las cepas

5.1.1 Características macro y micro morfológicas

Las características morfológicas de las cepas P9 y Rod fueron similares. Las colonias se observaron en lupa de forma circular, lisa y brillante presentando color rosado anaranjado a partir de las 48 horas. No se observó alteración en el agar (actividad agarolítica). La cepa LA1 presentó un color anaranjado, las colonias de forma circular, lisa y brillante, alterando el agar del medio adhiriéndose al mismo lo que presentó dificultades en su manipulación.

Observadas a un aumento de 1000x por microscopía óptica las cepas Rod y P9 presentaron una morfología ovalada, a diferencia de la cepa LA1 cuya morfología fue más alargada. En los tres frotis se observaron células en gemación (figura 7). No se observó formación de pseudo hifas en ninguno de los tres casos.

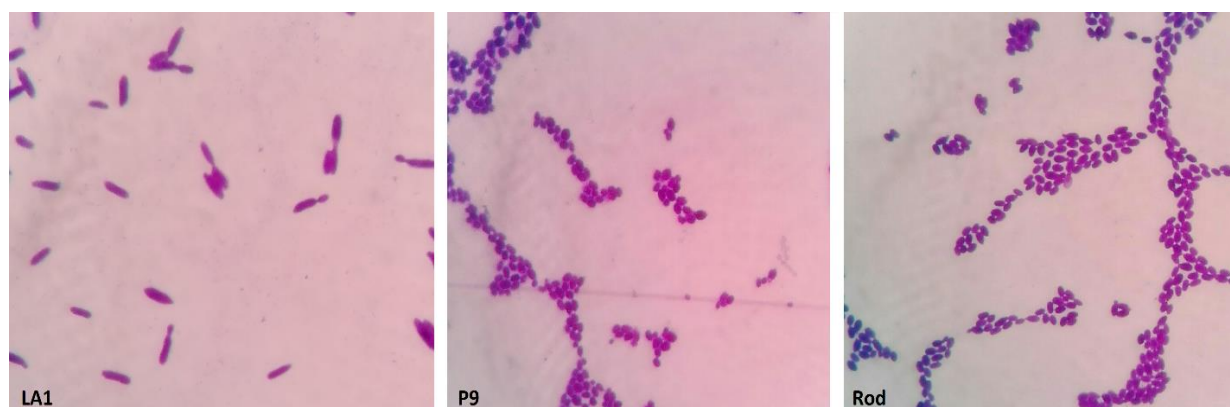


Figura 7. Microscopía óptica x1000 de cepas LA1, P9 y Rod. Tinción simple realizada con cristal violeta.

5.1.2 Identificación molecular

Se eligió una metodología frecuentemente utilizada en laboratorios para la identificación de levaduras y hongos filamentosos: la secuenciación de la región ITS del genoma. Esta región es menos conservativa que los genes codificantes de ARN ribosomal (Bruns, White y Taylor, 1991), preserva un bajo polimorfismo intraespecífico y una alta variabilidad interespecífica. Esta característica es de utilidad para identificar variabilidad genética entre especies y para propósitos taxonómicos (Guillamón et al., 1998; Granchi, Bosco, Messini y Vincenzini, 1999). La

secuenciación de esta región generalmente es suficiente para lograr una identificación a nivel de género y en algunos casos de especie.

Se utilizaron los cebadores universales ITS1 e ITS4 para amplificar la región ITS del ARN ribosomal (ARNr). Dicha región incluye dos regiones no codificantes designadas como espaciadores internos transcritos (ITS I e ITS II) y el gen de 5.8S ARNr (Guillamón, Sabaté, Barrio, Cano y Querol, 1998). A modo representativo se observa la estructura de esta región en la Figura 8.

La amplificación se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%, presentando bandas de entre 500 y 750 pares de bases. Todas las temperaturas utilizadas resultaron en amplificación de la región ITS (42.8 °C a 58 °C). Sin embargo, en el carril de control positivo no se observó ninguna banda, lo que podría indicar una degradación del ADN de la muestra, que no logró amplificación (figura 9). Las secuencias resultantes pueden verse en el anexo 8.1

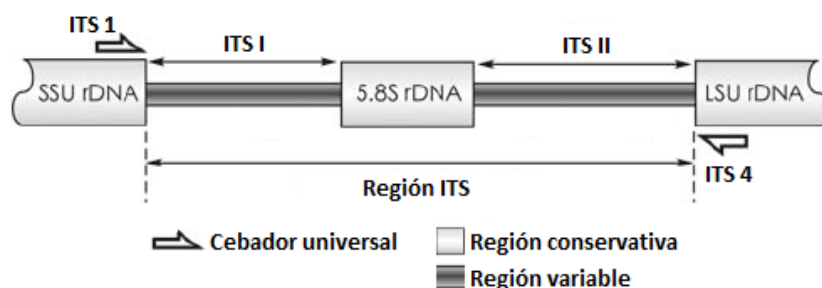


Figura 8. Diagrama de región entre ADNr de la subunidad pequeña (SSU) y la subunidad grande (LSU), que incluye ITS I, ITS II y 5.8S ADNr (Horisawa, Sakuma y Doi, 2009).

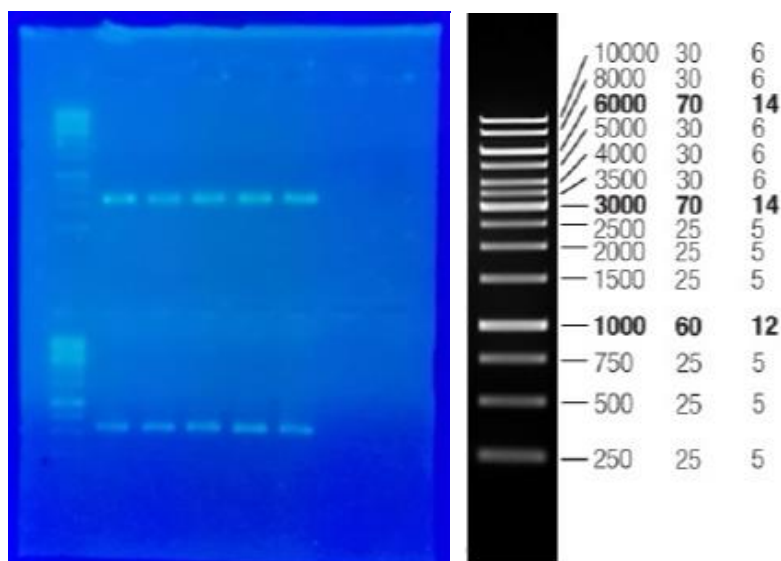


Figura 9. Gel de electroforesis agarosa 1,5% (arriba cepa P9, abajo cepa La1). Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2, 3 ,4 ,5 ,6 corresponden al resultado de la amplificación en las cinco temperaturas distintas utilizadas en el proceso de amplificación (42.8 °C, 46.4 °C, 49.7 °C, 54.6 °C, 58 °C). Carril 7 corresponde a control negativo con ddH₂O. Carril 8 control positivo con ADN de levadura. La figura de la derecha corresponde al marcador de peso molecular utilizado.

Mediante los resultados del BLAST de las secuencias, se pudo identificar a nivel de género a la cepa P9 como *Rhodotorula*, dejando varias opciones a nivel de especie como *R. kratochvilovae* o *R. glutinis* ya que el porcentaje de identidad fue de 99.81% en ambos casos (Tabla 3). Si se quisiera lograr la identificación a nivel de especie habría que secuenciar y comparar otras regiones de su genoma además de realizar ensayos bioquímicos.

En el caso de LA1 no es clara la definición del género habiendo dos posibles opciones: *Tricellula sp.* y *Thelebolus stercoreus*, ambos con puntaje alto de identidad mayor a 99% (tabla 3).

La cepa Rod fue identificada en un trabajo previo (Morales, Bruzzone, Lupo y Loperena, 2013) perteneciendo al género *Rhodotorula*.

Tabla 3. Resultados de análisis de secuencias mediante BLAST para las cepas LA1 y P9. En todos los casos el valor E fue de 0,0.

Cepa	Microorganismo	puntaje	Identidad	Código de acceso
P9	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	948	99,81%	MN128863.1
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	948	99,81%	KX017572.1
	<i>Rhodospiridiobolus sp</i>	928	99,03%	MG471218.1
	<i>Rhodotorula araucariae</i>	922	98,84%	AF387781.1
LA1	<i>Tricellula sp.</i>	965	99,81%	MH858506.1
	<i>Thelebolus stercoreus</i>	863	99,17%	AY957548.1

5.3 Condiciones de crecimiento y selección de medio de cultivo.

Del ensayo de incubación a distintas temperaturas se evidenció un mayor crecimiento cualitativo a 25 °C en las tres cepas. A 30 °C y 35 °C solo presentó crecimiento la cepa P9 y en baja concentración de biomasa. En todas las cepas, a temperaturas menores a 25 °C el crecimiento fue más lento y las colonias se apreciaron con menor pigmentación. Los resultados obtenidos sugieren un enlentecimiento del metabolismo y síntesis de pigmentos a medida que desciende la temperatura.

Dado que las tres cepas presentaron crecimiento a temperaturas de 4 °C y hasta 30 °C, se clasificaron como psicrotolerantes (Joanne, Sherwood y Woolverton, 2013).

Del ensayo en el que se sembraron las tres cepas de trabajo en cada medio de cultivo, se observó escaso crecimiento de la cepa Rod, mientras que P9 y LA1 mostraron mayor cantidad de biomasa y coloración en el medio YPMO. En el medio Gli las tres cepas mostraron crecimiento, pero con ausencia de coloración. Podría ser que en medio Gli las levaduras necesiten de mayor tiempo de incubación para producir pigmentos o algún nutriente que el medio no provee originalmente como sales marinas. En el medio Tautos las tres cepas presentaron mayor crecimiento e intensidad de color que en los demás, por esta razón se consideró Tautos como el mejor medio de cultivo (Figura 10).

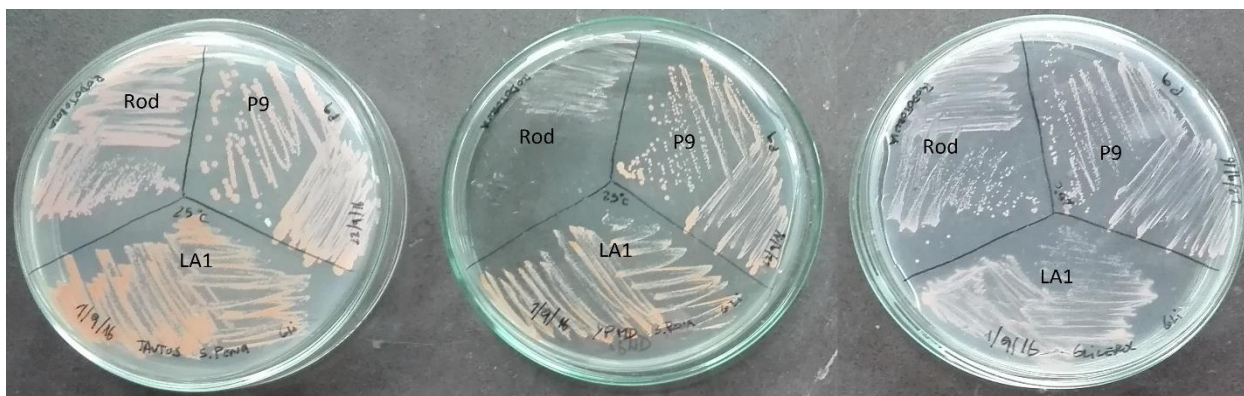


Figura 10. Placas sembradas con las cepas P9, LA1 y Rod. Medios de cultivo de izquierda a derecha: Tautos, YPMD y Gli. Incubación a 25 °C por 48 horas.

La cepa LA1 cuando fue cultivada en medio Tautos líquido presentó agregaciones de biomasa, lo que no permitió obtener valores de absorbancia representativos de la cantidad de biomasa ya que no estaba distribuida equitativamente en el medio. Por estas razones, se decidió no seguir trabajando con la cepa LA1. Estas características presentarían dificultades para la correcta mezcla de medio de cultivo y biomasa. En caso de no haber una mezcla homogénea, parámetros como oxigenación, disponibilidad de nutrientes entre otros, no serían iguales para todas las células.

Considerando el tiempo requerido para el estudio planteado en el presente trabajo fue necesario elegir una cepa de trabajo. Como ambas cepas Rod y P9 pertenecen al género *Rhodotorula*, presentaron coloración y crecimiento similar, se optó por trabajar con la cepa P9 para los estudios de producción y mejora del medio. Esta cepa presentó buena intensidad de coloración en sus colonias y un crecimiento rápido en los medios Tautos y Gli.

5.4 Ajustes de composición del medio para la cepa P9

5.4.1 Ecuaciones de absorbancia en relación con la biomasa producida

Se obtuvieron dos ecuaciones utilizando el método de determinación de biomasa (gráficos en anexo 8.2) que relacionan la absorbancia a 600 nm con biomasa seca expresada en g/L para los medios Tautos y Gli.

Las ecuaciones resultantes fueron las siguientes:

$$\text{Tautos: } Y = 0,4429x + 0,0141$$

$$\text{Gli: } Y = 0,494x - 0,0172$$

Donde 'Y' es la biomasa expresada en g/L y 'x' es la absorbancia.

5.4.2 Curva de crecimiento de la cepa P9 en medios Tautos y Gli

Las curvas de crecimiento de la cepa P9 en medios Tautos y Gli no presentaron una diferencia significativa en la concentración de biomasa entre si desde las 10 hasta las 35 horas (gráfico 1). A partir de las 38 horas se observaron diferencias en concentración de biomasa hasta el tiempo final, obteniendo valores de 3,25 y 2,73 g/L para Gli y Tautos, respectivamente.

En el cultivo en el medio Tautos se cuantificó la concentración de glucosa en el medio a tiempo final, a las 42,5 horas de incubación no se detectó glucosa en el sobrenadantes del medio de cultivo, esto se vio reflejado en la curva de crecimiento. El rendimiento $Y_{X/S}$ para Tautos fue de 0,55 g/g.

En el cultivo en el medio Gli, a las 42,5 horas de incubación había un remanente de 3,6 g/L de glicerol en el medio de cultivo. El rendimiento $Y_{X/S}$ en este caso fue de 0,51 g/g .

Se observó una diferencia de 0,04 g/g en los valores de rendimiento de biomasa, un valor que no fue significativamente distinto.

Para evaluar el comportamiento del cultivo frente a una mayor concentración de glucosa inicial, se planteó aumentar la concentración inicial de glucosa a 18 g/L para evitar que fuese un factor limitante (Medio Tautos op).

Por otro lado, para evaluar el factor tiempo en el medio Gli, se continuó su estudio prolongando el tiempo del ensayo.

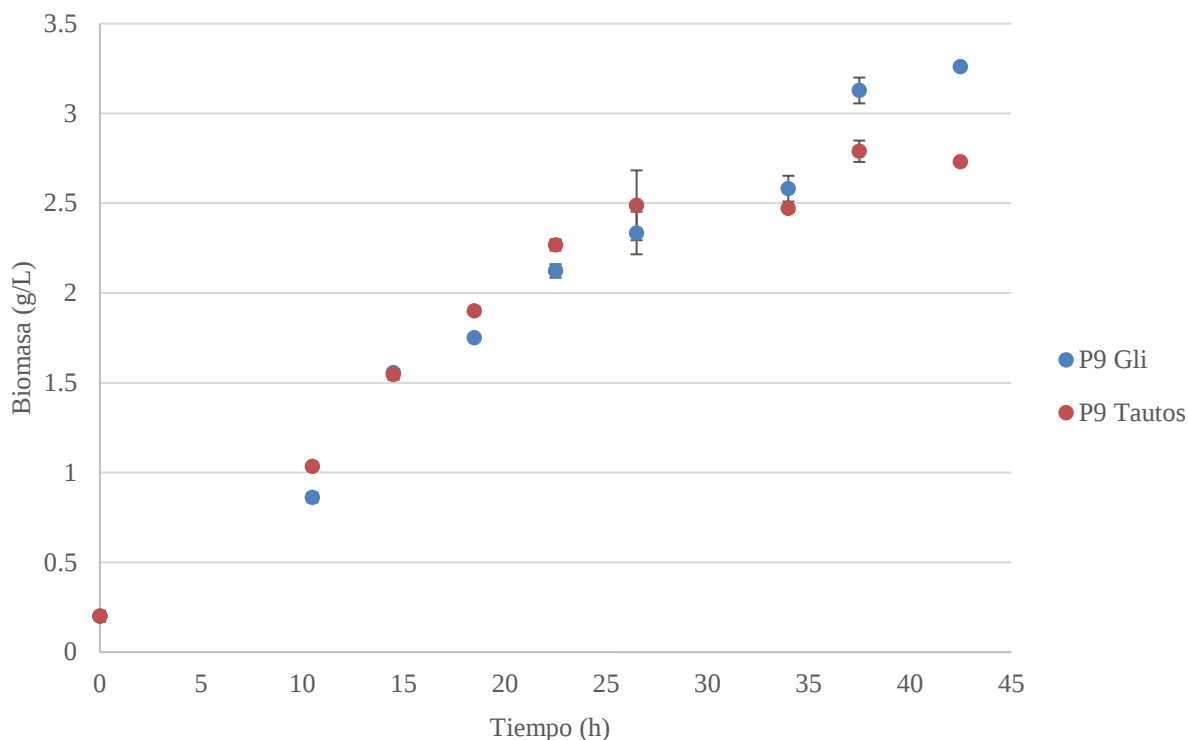


Gráfico 1. Curva de crecimiento de la cepa P9 en medios sin optimizar Gli y Tautos.

5.5 Fuente de carbono y sales marinas

Debido a que el departamento se vio desabastecido de glutamato monosódico, en el medio Tautos op no se utilizó dicho reactivo para su preparación. Como se comenta a continuación, esta modificación no pareció influir en el crecimiento.

En el medio Tautos op se observó un crecimiento sostenido de la biomasa hasta las 120 horas, logrando entre 7,0 g/L y 7,2 g/L de biomasa (Gráfico 2). El incremento a 18 g/L de concentración de glucosa permitió un mayor crecimiento de biomasa y un tiempo de cultivo mayor sin entrar en fase estacionaria. Si bien se obtiene una mayor producción de biomasa, el valor $Y_{X/S}$ es de 0,4 g/g.

Las distintas concentraciones de sales marinas no afectaron de forma significativa el crecimiento del cultivo ya que los valores de biomasa y el comportamiento observado en el gráfico 2 son similares.

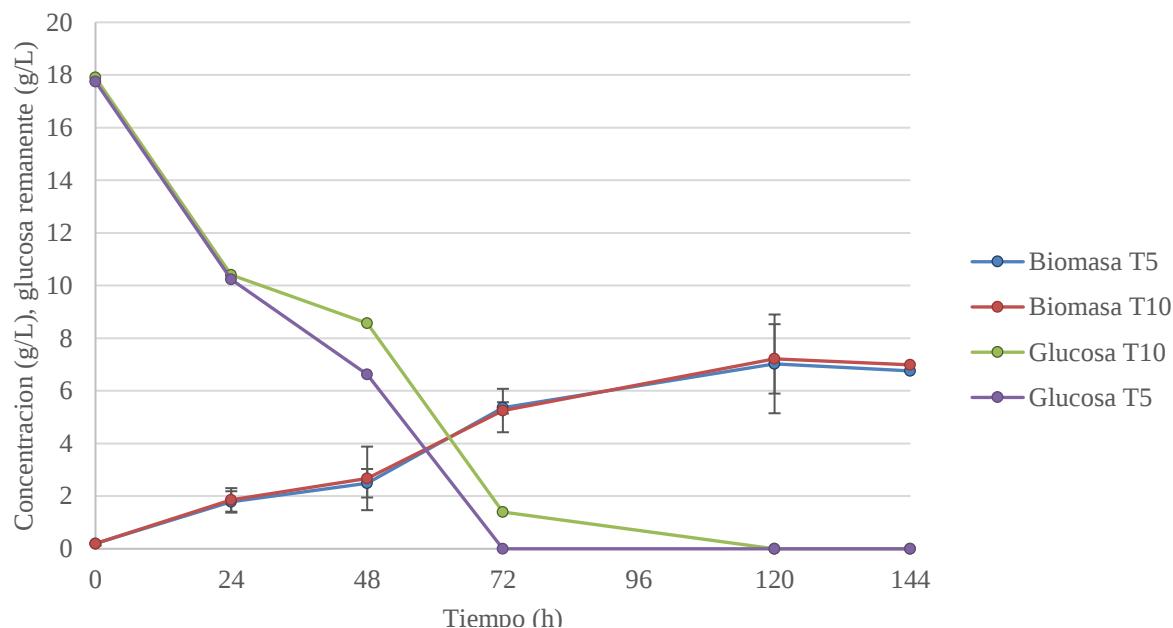


Gráfico 2. Consumo de glucosa y crecimiento de la cepa P9 en medio Tautos op con concentración de glucosa inicial en 18 g/L y sales marinas en 5 g/L y 10 g/L. Biomasa T5 y T10 muestran la concentración de biomasa en medio Tautos op con 5 y 10 g/L de sales marinas respectivamente. Glucosa T5 y Glucosa T10 muestra la concentración de glucosa en medio Tautos op con 5 y 10 g/L de sales marinas respectivamente.

En el medio Gli SM con una concentración inicial entre 7,3 y 7,8 g/L de glicerol, la cepa P9 presentó un crecimiento sostenido hasta las 120 horas. En este tiempo se llegó al consumo total de glicerol en el medio y alcanzó un valor de 5,25 g/L de biomasa, como se muestra en el Gráfico 3. El valor de $Y_{X/S}$ es de 0,67 g/g para esta experiencia. En cuanto a las concentraciones de sales marinas, la concentración final de biomasa fue la misma en ambos casos.

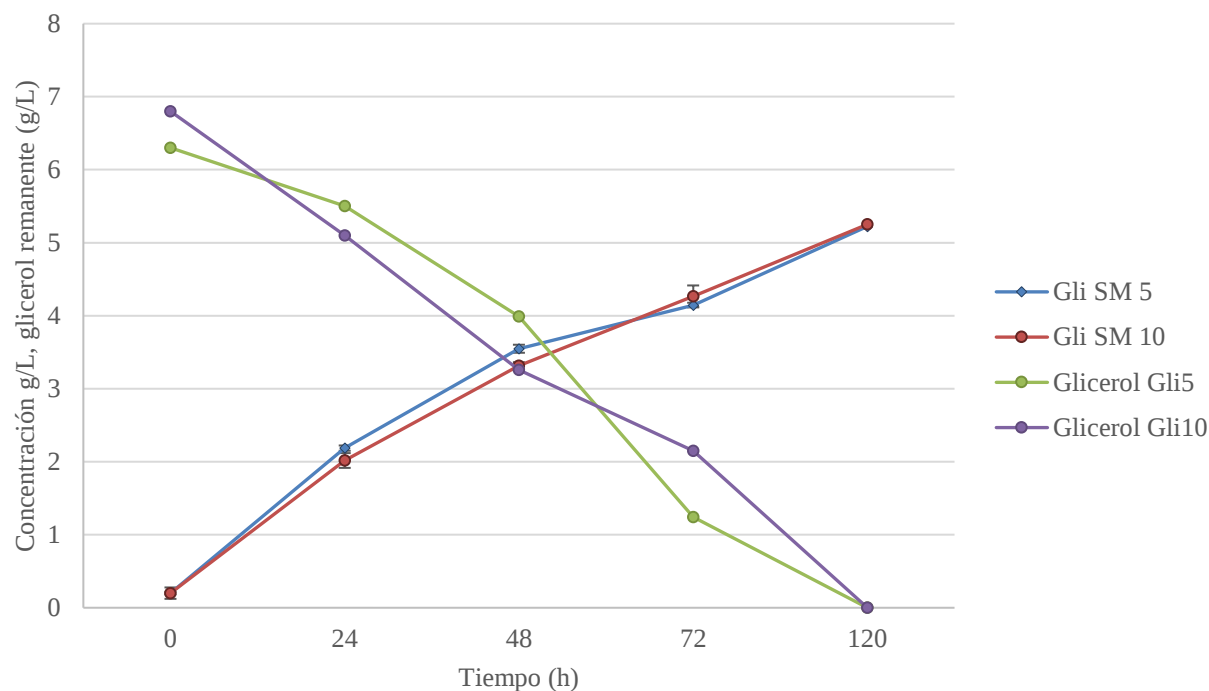


Gráfico 3. Consumo de glicerol y crecimiento de la cepa P9 en medio Gli SM expresado en cantidad de biomasa g/L. Gli SM 5 y Gli SM 10 muestran la concentración de biomasa en medios con 5 y 10 g/L de sales marinas. Glicerol Gli5 y Glicerol Gli10 muestra la variación en concentración de glicerol en los medios con 5 y 10 g/L de sales marinas.

Se repitió la experiencia con una concentración de glicerol de 10 g/L y un tiempo final de 144 horas. Se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 4.

Tabla 4. Evolución de concentración de biomasa de la cepa P9 en medios de cultivo Gli SM y Tautos con 5 y 10 g/L de sales marinas.

Tiempo de incubación (h)	Biomasa Gli SM 5 (g/L)	Biomasa Gli SM 10 (g/L)	Biomasa Tautos op 5 (g/L)	Biomasa Tautos op 10 (g/L)
0	0,20	0,20	0,20	0,20
24	1,86	1,68	1,78	1,85
48	3,77	3,43	2,49	2,67
72	4,82	4,48	5,25	5,35
120	5,63	5,38	7,02	7,21
144	5,64	5,51	6,76	6,98

El valor máximo de biomasa alcanzado es de 7,02 – 7,21 g/L en medio Tautos op y 5,51 - 5,64 g/L en medio Gli SM a las 120 horas. Ambos cultivos parecieron entrar en fase estacionaria a partir de las 120 horas, que coincidió con el consumo total de glucosa y glicerol. Esta diferencia de biomasa es estadísticamente significativa ($p < 0,001$)

Entre las 24 y 48 horas, el medio Gli SM mostró un mayor crecimiento de biomasa comparado con Tautos op. A partir de las 72 h, el cultivo en medio Tautos op aumentó su producción de biomasa por encima del cultivo en Gli SM. Se tomó en cuenta la cantidad de biomasa producida para evaluar los distintos medios, ya que los carotenoides se encuentran localizados intracelularmente, por lo tanto, forma parte de la biomasa final del cultivo.

En referencia a la concentración de sales marinas, no hay diferencias significativas en cuanto al crecimiento con 5 o 10 g/L que justifique utilizar una mayor concentración de sales. La pigmentación de la biomasa se hizo notoria a partir de las 48 horas independientemente de la concentración de sales.

Por lo tanto, se seleccionó el medio Tautos op 5 por presentar mayor crecimiento y biomasa con pigmentación.

5.6 Mutagénesis

La radiación UV utilizada generó cambios en el fenotipo de las colonias. Al ser mutaciones aleatorias, cada experiencia es única, si bien las condiciones como tiempo de exposición, distancia de la lámpara UV y condiciones de incubación fueron siempre las mismas.

El resultado del recuento de células del cultivo de partida de los ensayos de mutagénesis fue en el orden de 10^7 células/mL, que se mostraron restringentes al azul de metileno y fueron determinadas por conteo en cámara de Neubauer mejorada. Se sembraron entre 240 a 290 células por placa de Petri realizando diluciones sucesivas. Se definió un tiempo óptimo de 25 segundos de exposición en las que se obtuvo un número de aproximadamente 50 a 80 colonias por placa, lo que representa una supervivencia del 24% (Figura 11).

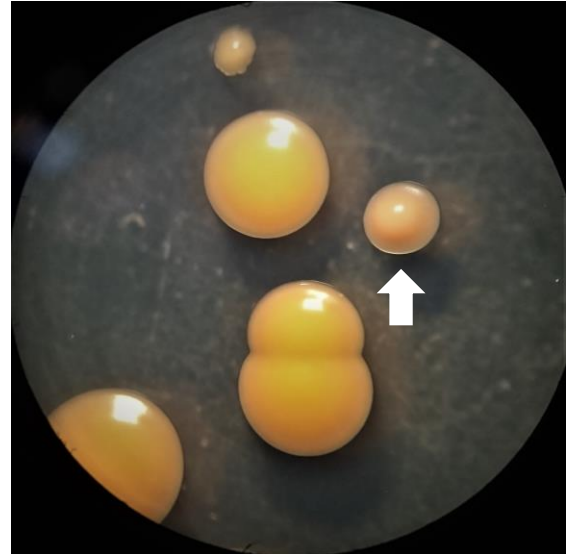
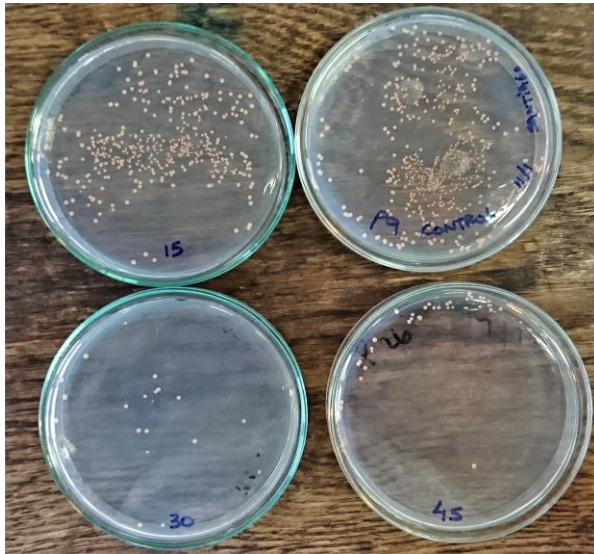


Figura 11. En la imagen de la izquierda se observan placas sembradas con la cepa P9 expuestas a radiación UV por 15, 30 y 45 segundos y un control sin exposición. A la derecha se observa en lupa con aumento 20x indicada con una flecha una colonia de distinto color resultado de mutación.

De estos ensayos se aislaron 38 mutantes con color distinto al de la cepa salvaje. Estos colores fueron: rojo, naranja, amarillo y blanco (Figura 12). Se seleccionaron dos mutantes por cada color observado en placa para análisis de pigmentos o carotenoides por HPLC. Las colonias de color blanco no fueron seleccionadas.

Los mutantes seleccionados para el análisis de pigmentos se denominaron con la siguiente nomenclatura:

- R5 y R7 de color rojo
- A5 y A6 de color amarillo
- N2 y N3 de color naranja

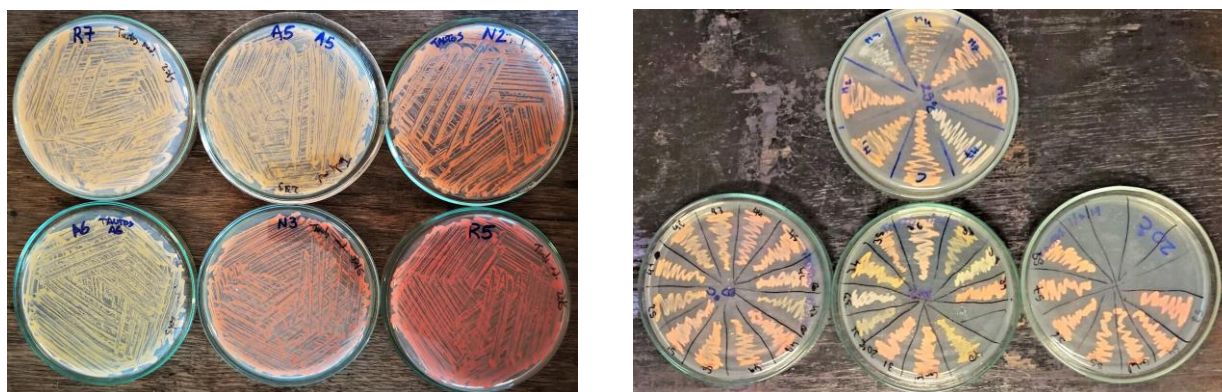


Figura 12. A la derecha los seis mutantes seleccionados para extracción de pigmentos: R7, R5, A5, A6, N2, N3. A la izquierda se ven los 38 mutantes originales aislados del ensayo de mutagénesis por UV.

El mutante R7 presentó coloración amarilla luego de ser reactivado de un stock a -80°C y en posteriores cultivos (Figura 12). Originalmente esta cepa fue de color rojo. A pesar del cambio de coloración su nomenclatura se mantuvo. Resultando en tres cepas amarillas, dos naranjas y una roja para análisis de carotenoides por HPLC.

5.7 Extracción de pigmentos

El protocolo de extracción con DMSO/acetona antes descrito fue utilizado exitosamente en artículos de autores como Davoli, Mierau y Weber (2004); Madhour, Anke, Mucci y Davoli (2005) para la extracción de pigmentos de diferentes clases de hongos dentro de los cuales se encuentra la división Basidiomycota, a la que pertenece el género *Rhodotorula* (Weber, Anke y Davoli, 2007).

En todos los casos de este trabajo se logró una extracción casi total de pigmentos con la tercera etapa en DMSO (Figura 13), quedando la biomasa de color rosa pálido. La extracción total se logró luego del segundo tratamiento con acetona.



Figura 13. Tubos con DMSO pigmentado resultado del proceso de extracción. En proceso de descongelado (conservados en freezer a -20°C).

5.8 Análisis de resultados HPLC

El espectro ultravioleta-visible (UV/Vis) provee información para una aproximación inicial en la caracterización primaria de carotenoides. Estos presentan generalmente tres picos de absorbancia característicos cuando no presentan átomos de oxígeno en su molécula.

Los cromatogramas proveen el tiempo de retención en la columna de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas de los pigmentos, información que ayuda para la caracterización. El cromatograma de la cepa *Rhodotorula* sp. P9 (Wt) presentó 4 picos de elusión (Figura 14) y se utilizaron como referencia para los mutantes. Los picos en orden del tiempo de elusión del menor al mayor se referenciaron como pigmentos A, B, C y D.

Las características de los espectros UV/Vis se observan en la tabla 5 junto con los valores de estructura fina de cada carotenoide (%III/II) (figura 15). Los cromatogramas de los mutantes R7, R5 y N3 presentaron cuatro picos de elusión.

Los tiempos de retención y proporción de los pigmentos de los mutantes A5, A6 y N2 no fueron reportados ya que al momento de procesar las muestras hubo un malfuncionamiento del equipo de HPLC, resultando en tiempos de retención del doble de lo esperado.

El pigmento A presentó un tiempo de retención de 15,2 minutos. En las cepas Wt, R7, R5, y N3 los máximos centrales característicos del espectro presentaron valores entre 494 y 496 nm, lo que sería indicativo que producen el mismo pigmento.

El pigmento B presentó un tiempo de retención de 17,8 minutos y espectros muy similares entre las cepas Wt, R5, R7 y N3.

El pigmento C presentó tiempo de retención de 18,1 minutos en Wt y los mutantes R5, R7 y N3, con diferencias de hasta 1 nm de absorbancia entre sus máximos centrales.

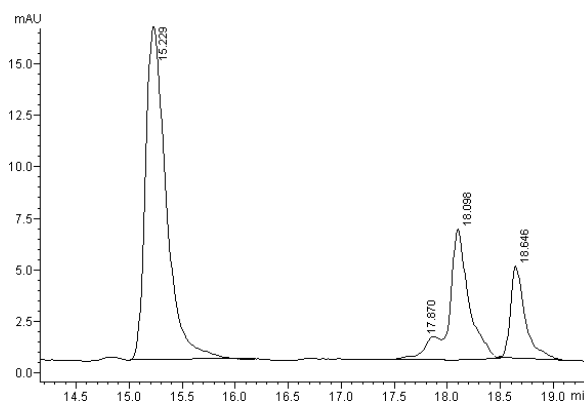


Figura 14. Cromatograma de extracción de la cepa Wt, presentando 4 picos de elusión.

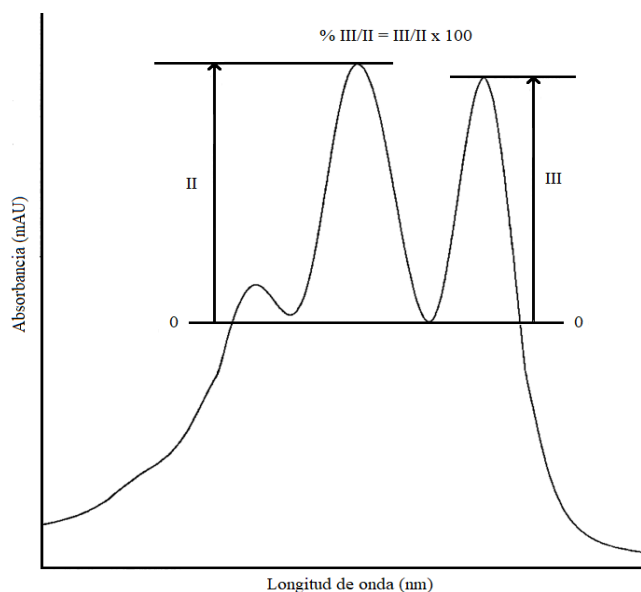


Figura 15. Ejemplo del cálculo de la estructura fina del espectro de un carotenoide de tres picos (%III/II). Adaptación de Wehne *et al.* 2001.

El pigmento D se observó en todas las cepas sin diferencia en sus máximos centrales de absorbancia comparadas con el estándar de β -caroteno. El tiempo de retención fue de 18,6 minutos para las cepas Wt, R5, R7, N3 y el estándar de β -caroteno. Los tiempos de retención específicos de cada pigmento y cepa se observan en la tabla 6.

Tabla 5. Espectro UV/Vis de las distintas muestras en Acetona presentando el valor porcentaje de estructura fina “% III/II”. El asterisco (*) indica valor estimado del máximo del cromatograma por presentar baja resolución, mientras que ‘n/a’ indica la ausencia total de un pico en ese tiempo de elusión.

Muestras	Pigmento A (nm UV/VIS)	Pigmento B (nm UV/VIS)	Pigmento C (nm UV/VIS)	Pigmento D (nm UV/VIS)
Wt	467, 495, 524 (% III/II 79)	460*, 488, 518 (% III/II 69)	437, 464, 492 (% III/II 85)	426, 454, 479 (% III/II 84)
R7	465*, 494, 526 (% III/II 74)	457, 485, 519 (% III/II 84)	437, 463, 493 (% III/II 88)	427, 454, 479 (% III/II 88)
R5	464, 496, 527 (% III/II 83)	462, 486, 518 (% III/II 74)	438, 463, 492 (% III/II 79)	427, 454, 479 (% III/II 85)
N3	468, 496, 525 (% III/II 80)	461, 486, 519 (% III/II 78)	438, 463, 493 (% III/II 86)	426, 454, 479 (% III/II 87)
β -caroteno	n/a	n/a	n/a	426, 454, 478 (% III/II 85)

Tabla 6. Tiempos de retención de cada carotenoide de las muestras Wt, R7, R5, N3 y estándar de β -caroteno. Los tiempos se definieron como t1, t2, t3 y t4 para los pigmentos A, B, C y D respectivamente.

Muestras	t1 (min)	t2 (min)	t3 (min)	t4 (min)
β-caroteno	n/a	n/a	n/a	18,643
Wt	15,229	17,870	18,098	18,646
R7	15,260	17,868	18,111	18,651
R5	15,252	17,897	18,101	18,652
N3	15,250	17,880	18,098	18,652

Se logró obtener mutantes con distinta proporción de carotenoides comparados con la cepa salvaje. El género *Rhodotorula* es conocido por producir principalmente cuatro pigmentos: torularhodina, toruleno, γ -caroteno y β -caroteno. La proporción en la que se encuentran en la célula determina el color de la biomasa (Peterson et al., 1958; Perrier, Dubreucq y Galzy, 1995).

El pigmento D presentó un espectro de absorción muy similar al del estándar de β -caroteno utilizado (figura 16) y además el tiempo de elusión fue el mismo que en las cepas a los 18,6 minutos (figura 17). Estos resultados sugirieron que este pigmento podría ser β -caroteno. Sin embargo, un análisis de espectrometría de masa (HPLC-MS) sería necesario para confirmar la identidad. Para los demás compuestos no se contó con un estándar por lo que para establecer que los pigmentos A, B y C corresponden a los pigmentos torularhodina, toruleno y γ -caroteno es imprescindible la realización de más análisis como HPLC-MS.

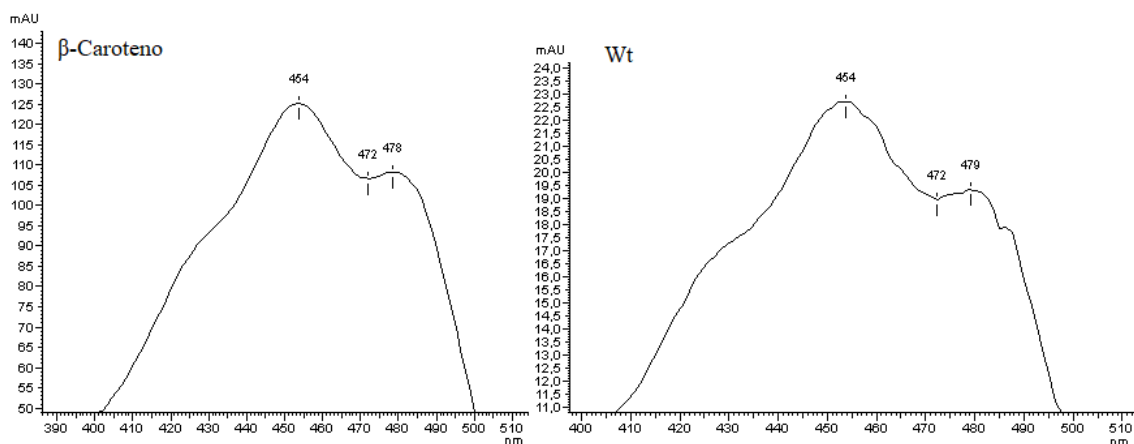


Figura 16. Espectro de absorbancia en tiempo 18,6 minutos. A la izquierda el estándar de β -caroteno y a la derecha extracción de la cepa salvaje.

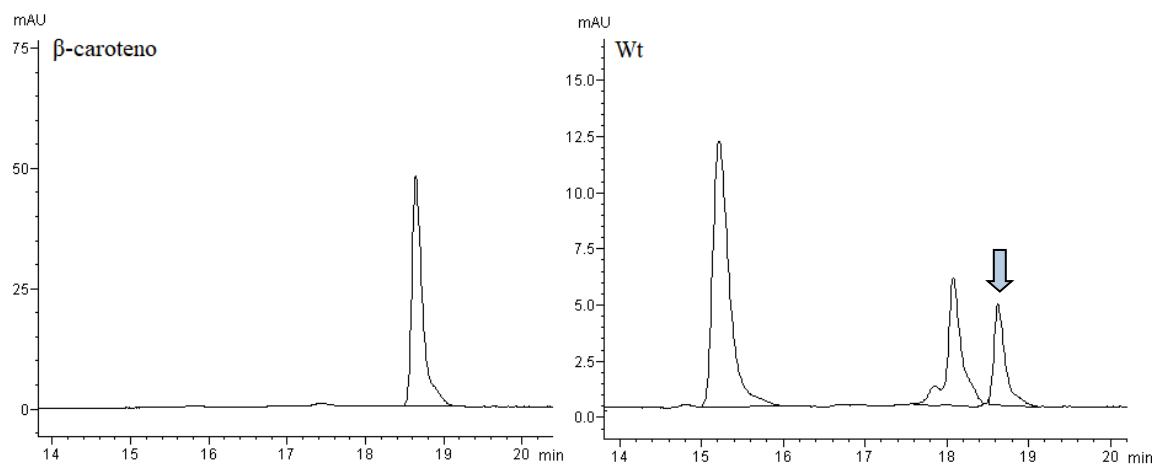


Figura 17. Tiempos de retención de pigmentos. A la derecha se observa el estándar de β -caroteno y a la izquierda la extracción de la cepa salvaje presentando cuatro picos de elusión (pigmentos A, B, C y D respectivamente). La flecha marca el tiempo de elusión de posible β -caroteno en el cromatograma de Wt (pigmento D).

Se comparó la proporción de cada carotenoide de la cepa salvaje y los mutantes individualmente. Las concentraciones relativas fueron medidas como β -caroteno a una longitud de onda de 450 nm ($\lambda=450$) (Gráfico 4). Los carotenoides que presentan su pico de absorción máximo cercano a los 480 nm fueron ligeramente subestimados en estos resultados por realizar las medidas a $\lambda=450$ nm. La cepa Wt presentó una mayor producción del pigmento A comparado con los otros pigmentos, seguido por el

pigmento C, D y por último el pigmento B siendo el de menor proporción. Los valores obtenidos para la cepa R5 presentaron una variación muy grande en el set de datos por lo que no fue posible afirmar diferencias significativas en la proporción de carotenoides. La cepa R7 por otro lado presentó menor proporción de los pigmentos A y B comparado con los pigmentos C y D que se observaron en mayor proporción. La cepa N3 presentó una proporción similar entre todos los pigmentos.

La proporción del pigmento D en la cepa R7 fue la más alta en comparación con las demás cepas. Además, se observó una reducción de la proporción de pigmento A y B comparado con la Wt. En cuanto a la cepa N3, mostró una menor proporción del pigmento A comparado con la cepa Wt, que parecería estar complementada por un incremento en la proporción de los demás pigmentos.

La proporción del pigmento D en la cepa R7 fue la más alta en comparación con las demás cepas. Además, se observó una reducción de la proporción de pigmento A y B comparado con la Wt. En cuanto a la cepa N3, mostró una menor proporción del pigmento A comparado con la cepa Wt, que parecería estar complementada por un incremento en la proporción de los demás pigmentos.

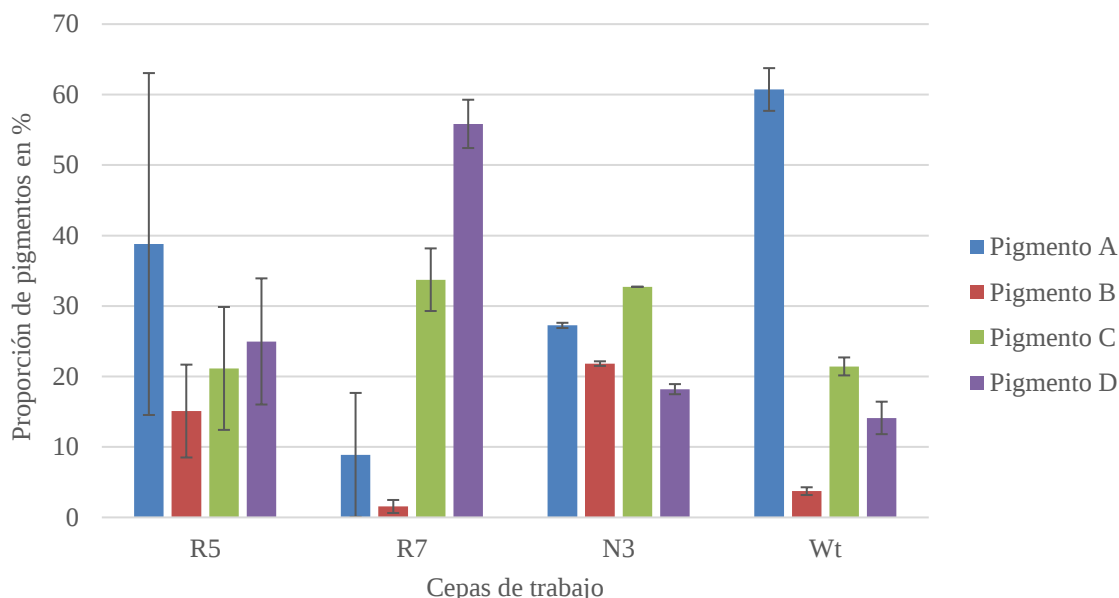


Gráfico 4. Proporción de pigmentos extraídos de cepas mutantes y Wt expresada en porcentaje sobre la producción de cada cepa individualmente. Los valores se obtuvieron utilizando $\lambda=450$ nm en HPLC.

Utilizando espectrofotómetro se midió la concentración de carotenoides totales a $\lambda=450$ nm y $\lambda=484$ nm (Gráfico 5). En la medida a $\lambda=450$ nm se observó que R7 y N3 presentan una producción estimada de 80 $\mu\text{g/g}_x$ de carotenoides por gramo de biomasa ($\mu\text{g/g}_x$) mientras que R5 y Wt presentaron un valor de 40 $\mu\text{g/g}_x$. En cambio, cuando se analizaron los resultados a $\lambda=484$ nm, la cepa N3 presentó una concentración de carotenoides totales de 110 $\mu\text{g/g}_x$, seguida por R7 con un valor de 80 $\mu\text{g/g}_x$, Wt un valor de 56 $\mu\text{g/g}_x$ y R5 de 50 $\mu\text{g/g}_x$.

Como se mencionó anteriormente, dependiendo del máximo de absorción de cada pigmento, si el valor λ no coincidía con el máximo del pigmento, su concentración iba a verse subestimada. En el caso de la cepa Wt presenta una mayor proporción del pigmento A y C que del pigmento D, por lo tanto, el valor de $\lambda=484$ sería el más representativo de la concentración de carotenoides totales con un valor de $56,4 \pm 2,0$ $\mu\text{g/g}_x$. La cepa R7 al tener una mayor proporción de pigmento D que presenta su máximo a 454 nm resultó en que el valor a $\lambda=450$ fuera ligeramente superior al de $\lambda=484$, con una producción de carotenoides totales de $82,8 \pm 7,9$ $\mu\text{g/g}_x$. La cepa N3 presentó una producción similar entre todos los carotenoides por lo que el valor de $\lambda=484$ sería más representativo ya que se tendrían más en cuenta los pigmentos A, B y C, obteniendo el valor de producción de carotenoides totales de $110 \pm 13,3$ $\mu\text{g/g}_x$. La cepa R5 mostró una mayor producción de carotenoides totales a $\lambda=484$ con un valor de $50,7 \pm 1,8$ $\mu\text{g/g}_x$. Este resultado sugiere que el pigmento D no está en altas proporciones en la cepa R5, aunque debido a la gran variabilidad del set de datos no es posible realizar afirmaciones al respecto.

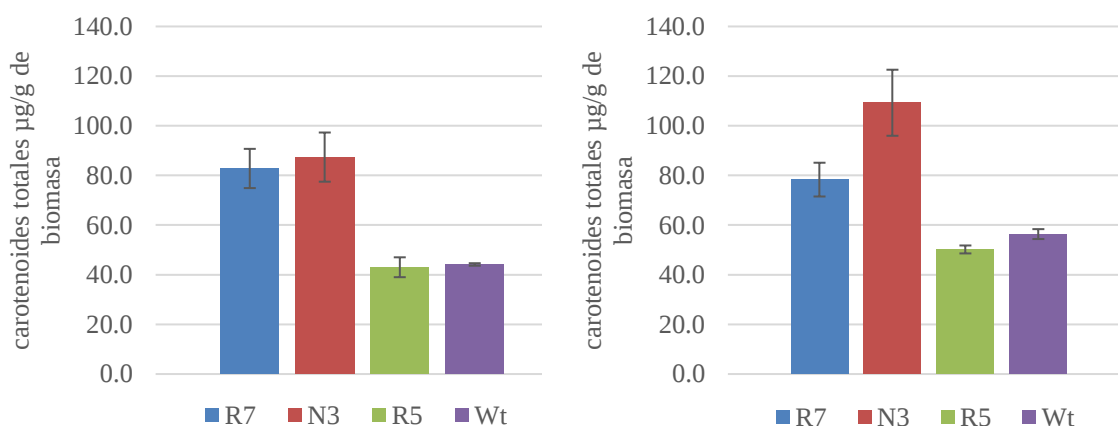


Gráfico 5. Concentración estimada de carotenoides totales de las cepas R7, N3, R5 y Wt medidos por espectrofotometría a $\lambda=484$ nm (derecha) y $\lambda=450$ nm (izquierda).

Se cuantificó la concentración de β -caroteno de cada cepa mediante HPLC (Tabla 7) y se observó un incremento de hasta 4,5 veces la producción en el caso de la cepa R7 comparada con Wt. Si bien la producción en las cepas R5 y N3 fue menor que en R7, en todas se logró aumentar la producción en comparación con la cepa Wt.

Tabla 7. Valores obtenidos de concentración de β -caroteno de la extracción de las cepas R7, R5, N3 y Wt expresados en microgramo por gramo de biomasa ($\mu\text{g/g}_x$).

Muestra	Producción β -caroteno ($\mu\text{g/g}_x$)
Wt	$7,8 \pm 0,1$
R7	$35,2 \pm 6,5$
R5	$12,1 \pm 2,6$
N3	$23,5 \pm 0,5$

Dependiendo de los pigmentos que sean de interés, dada su heterogeneidad en la proporción producidos entre mutantes, será recomendable elegir una cepa de las antes mencionadas sobre las demás.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se logró identificar a nivel de género a la cepa P9 como *Rodhotorula* sp. P9. En el caso de la cepa LA1 no se logró una identificación.

Reduciendo la concentración de sales y aumentando la de glucosa del medio Tautos, se logró evitar el uso excesivo de reactivos, obteniendo una mayor producción de biomasa y por ende mayor cantidad de pigmentos. Factores tales como oxígeno disuelto en el medio durante el cultivo, velocidad de agitación, uso de distintas fuentes de carbono y nitrógeno podrían evaluarse para lograr un medio y condición de cultivo optimizado, resultando en mayor producción y perfiles de pigmentos.

Mediante los ensayos de mutagénesis se obtuvieron mutantes con distintos perfiles en la producción de carotenoides, generando cepas como R7 con una proporción de pigmento D (β -caroteno) muy superior comparado con los demás pigmentos, logrando una producción 4,5 veces mayor comparado con la cepa Wt. Debido a la variedad de perfiles obtenidos en los mutantes, se cuenta con la opción de elegir la cepa de trabajo de acuerdo con los pigmentos que se desee producir.

Si bien la capacidad de almacenar carotenoides intracelularmente tiene una limitante física, ensayos a mayor escala de mutagénesis y utilizando distintas técnicas de presión selectiva podrían llevar a mejorar aún más la producción de carotenoides obtenida en este trabajo en comparación con cepas salvajes.

Estos resultados muestran el potencial de estos microorganismos como fuentes de β - caroteno y otros carotenoides en escala de laboratorio. La pregunta restante es: ¿es un proceso económicamente sustentable para el escalado industrial en biorreactores como alternativa a la obtención de carotenoides a partir de vegetales? Futuros ensayos deberían realizarse para optimizar aún más el medio de cultivo y para posterior escalado a producción en biorreactores, realizando análisis más específicos de condiciones de crecimiento, oxigenación del medio y optimización de este. Teniendo en cuenta la importancia de lograr una economía circular, debería plantearse la posibilidad de utilizar subproductos de industrias ya establecidas como el glicerol como fuentes de carbono y energía.

7. REFERENCIAS

- Armstrong, G. A. (1995) Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale, Annual Review of Microbiology.
- Arthur, H.; Watson, K. (1976) Journal of Bacteriology.
- Babjeva, P.; Reshetova, I. (1998) Yeast resources in natural habitats at polar circle latitude. Food Technology and Biotechnology.
- Babitha, S (2009) Biotechnology for Agro-Industrial. Residues Utilization II, Microbial Pigments.
- Babu, S.; Shenolikar, I. S. (1995) Health and nutritional implications of food colours, Indian Journal of Medical Research.
- Barber, N. (2003) The tomato: an important part of the urologist's diet? BJU International.
- Bauernfeind, J.C. (2012) Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors: Technological and Nutritional Applications, Academic Press, New York, 1981.
- Bendich, A. (1989) Carotenoids and the immune response. Journal of Nutrition.
- Bendich, A.; Olson, J. A. (1989) Biological actions of carotenoids. The FASEB Journal.
- Bendich, A. (1990) Carotenoids and the immune system, in Carotenoids: Chemistry and Biology, Krinsky N. I.; Mathews-Roth, M. M.; Taylor, R. F., Plenum Press, New York, NY, USA.
- Bhosale, P.B.; Gadre, R.V. (2001) Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. Applied Microbiology and Biotechnology.
- Cowan, D. A. (2014) Antarctic Terrestrial Microbiology: Physical and Biological Properties of Antarctic Soils.
- Britton, G. (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function, The FASEB journal.

- Bruns, T.D.; White, T.J.; Taylor, J.W. (1991) Fungal molecular systematics. Annual Review of Ecology and Systematics.
- Buzzini, P.; Innocenti, M.; Turchetti, B.; Libkind, D.; van Broock, M.; Mulinacci, N. (2007) Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. Canadian Journal of Microbiology.
- Carroll, K.C.; Hobden, J.A.; Miller, S.; Morse, S.A.; Mietzner, T.A.; Detrick, B.; Mitchell, T.G.; McKerrow, J.H.; Sakanari, J.A. (2016) Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 27th Edition. Mcgraw Hill, New York, New York.
- Collins, A.R. (2001) Carotenoids and genomic stability. Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.
- Cong, L.; Chi, Z.; Li, J.; Wang, X. (2007) Enhanced carotenoid production by a mutant of the marine yeast *Rhodotorula* sp. *hidai*. Journal of Ocean University of China.
- Congdon, NG; West, KP Jr. (1999) Current Opinion Ophthalmology.
- Davoli, P.; Mierau, V.; Weber, R.W.S. (2004) Carotenoids and Fatty Acids in Red Yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. Applied Biochemistry and Microbiology.
- Di Caprio, F.; Visca, A.; Altimari, P.; Toro, L.; Masciocchi, B.; Iaquaniello, G.; Pagnanelli, F. (2016) Two stage process of microalgae cultivation for starch and carotenoid production.
- Disch, A.; Rohmer, M. (1998) On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. FEMS Microbiology Letters.
- Echavarri, C.; Johnson, E. (2002) Fungal carotenoids.
- Fraser, P.D.; Bramley, P.M. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. Progress in lipid research.

- Frengova, G.I.; Beshkova, D.M. (2008) Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*, yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.
- Fujita, S.-I.; Senda, Y.; Nakaguchi, S.; Hashimoto, T. (2001) Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Gadanho, M.; Sampaio, J.P. (2002) Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinissensu stricto* and *Rh. dairenensiscomb.* *FEMS Yeast Research*.
- Granchi, L.; Bosco, M.; Messini, A.; Vincenzini, M. (1999) Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology*.
- Guillamón, J.M.; Sabaté, J.; Barrio, E.; Cano, J.; Querol, A. (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*.
- Horisawa S.; Sakuma Y.; Doi S. (2009) Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi. *Journal of Wood Science*.
- Joanne W.; Sherwood L.; Woolverton C. (2013) Prescott's Microbiology ninth edition, New York, NY: McGraw-Hill.
- Kutty, S.N.; Philip, R. (2008) Marine yeasts - a review.
- Libkind, D.; Moliné, M.; de García, V.; Fontenla, S.; van Broock, M. (2007) Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.
- Lindqvist, A.; Andersson, S. (2002) Biochemical Properties of Purified Recombinant Human β -Carotene 15,15'-Monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry*.

- Loehr, R.C. (1974) Waste characteristics. In: Loehr, R. C. (Ed.). *Agricultural Waste Management. Problems, Processes and Approaches*, Academic Press, London.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (2009) *Brock Biología de los Microorganismos* (12 ed.). Madrid: Pearson Prentice.
- Madhour, A.; Anke, H.; Mucci, A.; Davoli, P.; Weber, R.W.S. (2005) Biosynthesis of the xanthophyll plectanixanthin as a stress response in the red yeast *Dioszegia* (*Tremellales*, *Heterobasidiomycetes*, Fungi). *Phytochemistry*.
- Marshall K.C. (1990) *Advances in microbial ecology* volume II.
- Meléndez-Martínez, A.; Vicario, I.; Heredia, F. (2007) Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*.
- Merckmillipore (2017) Ethyl methanesulfonate SDS disponible en https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-820774.
- Moliné, M.; Libkind, D.; van Broock, M. (2012) Production of Torularhodin, Torulene, and β -Carotene by *Rhodotorula* Yeasts. *Methods in Molecular Biology*.
- Moon, R. C. (1989) Comparative aspects of carotenoids and retinoids as chemopreventative agents for cancer. *Journal of Nutrition*.
- Morales, D.; Bruzzone, J.; Lupo, S.; Loperena, L. (2013) Evaluación de levaduras marinas provenientes de la Antártida como productoras de enzimas de interés industrial y ácidos grasos poli-insaturados, poster VII Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica.
- Moran, N. A.; Jarvik, T. (2010) Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids, *Science*, vol. 328.
- Morita, R. Y. (1975) *Bacteriological Reviews*.
- Nasrabadi, M. R. N.; Razavi, S.H. (2011) Optimization of β -carotene production by a mutant of the lactose-positive yeast *Rhodotorula acheniorum* from whey ultrafiltrate. *Food Science and Biotechnology*.

- Nelis, H. J.; Leenheer A. P. (1991) Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds, *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 70.
- Perrier, V.; Dubreucq, E.; Galzy, P. (1995) Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch Microbiol*.
- Peterson, W.J.; Evans, W.R.; Leece, E.; Bell, T.A.; Etchells, J.L. (1958) Quantitative determination of the carotenoids in yeast of the genus *Rhodotorula*. *Journal of Bacteriology*.
- Raspor, P.; Zupan, J. (2006) Yeasts in Extreme Environments. En G. & Peter, Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, Springer.
- Rodriguez-Concepción, M. (2010) Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- Shivaji, S.; Prasad, G.S.; Satyanarayana, T.; Gotthard, K. (2009) Yeast biotechnology diversity and Applications.
- Takaichi, Shinichi. (2000). Characterization of carotenes in a combination of a C18 HPLC column with isocratic elution and absorption spectra with a photodiode-array detector. *Photosynthesis research*.
- Vishniac, H.S. (1987) Proceedings of an international symposium on the perspectives of taxonomy, ecology and phylogeny of yeasts and yeast-like fungi.
- Weber, R.W. S.; Anke, H.; Davoli, P. (2007) Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi). *Journal of Chromatography*
- Wenhe, L.; Haynes, K.; Wiley, E.; Clevidence, B. (2001). Carotenoid Content and Color in Diploid Potatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*.
- Yolmeh, M.; Khomeiri, M. (2016) Using physical and chemical mutagens for enhanced carotenoid production from *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5256). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*

- Yolmeh, M.; Khomeiri, M. (2017) Effect of mutagenesis treatment on antimicrobial and antioxidant activities of pigments extracted from *Rhodotorula glutinis*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology
- Young, A.; Lowe, G. (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Arch. Biochem. Biophys.
- Zucconi, L.; Pagano, S.; Fenice, M.; Selbmann, L.; Tosi, S.; Onofri, S. (1996) Growth temperature preferences of fungal strains from Victoria Land, Antarctica. Polar Biology, 1996.

8. Anexo

8.1 Secuencias de ITS

P9 524 pb:

GATCATTAGTGAATCTAGGGTGTCCAATTTAACTTGGAGCCCGAACTCTCAC
TTTCTAACCCTGTGCATCTGTTATTGGTTAGTAGCTCTTCGGAGTGAAGTCCA
TTCACCTTACAAACACAAAGTCTATGAATGTATACAAAATTATAACAAAACA
AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCA
TGAAATCTTCAACCCACCTCTTTCTTAGTGAATCTGGTGGTGCTTGGTTTCTG
AGCGCTGCTCTGCTTCGGCTTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAAC
CGAACTTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGATTCTAGTCT
CGTACTAGAGCCGGGTTGGGTAAAGGGAAGCTTCTAATCCTAAAGTCT

LA1 532 pb:

GAAGGATCATTACCGAAGTACAGGCCCTCTCGAGGGCTAACTTCCACCCTT
TGTTTATTATACTATGTTGCTTTGGCGGATCGCCCTTGGGCCACCGGCTTCGG
CTGGTGCGTGTCCGCCAGAGACCCTCAAACCCAAACCATTATACGTGTCGTC
TGAAAACAAGTTTAAATTATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTG
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGG
GGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTATCACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTG
GGGCCTGCCCCGTCACAGGGCAGCCCTTAAAAGCAGTGGCGGTGCCATCTGG
CTCTAAGCGTAGTAATACTCCTCGCTATAGATGTCTGGTGGTGTCTGCCAA
AACCCCCCATATTTTAAATGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG
AACTTA

8.2 Gráficos suplementarios

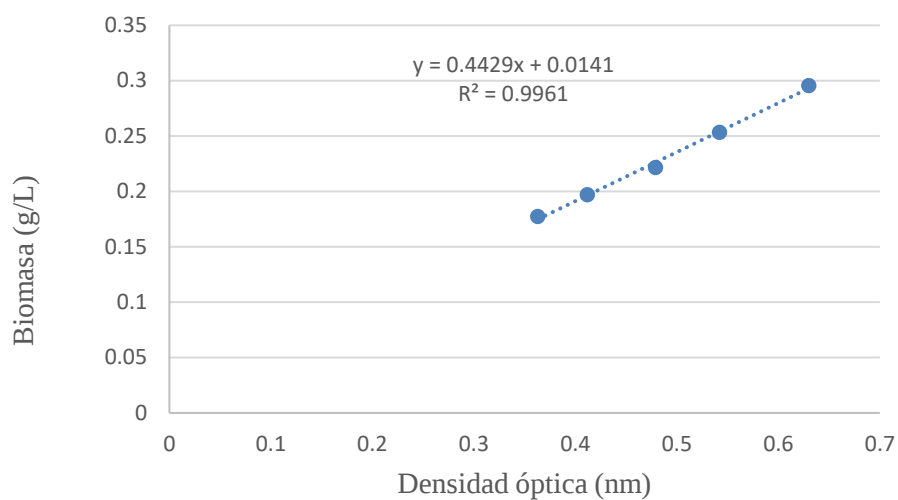


Gráfico complementario 1. Relación entre densidad óptica y biomasa de cepa P9 cultivada en medio Tautos.

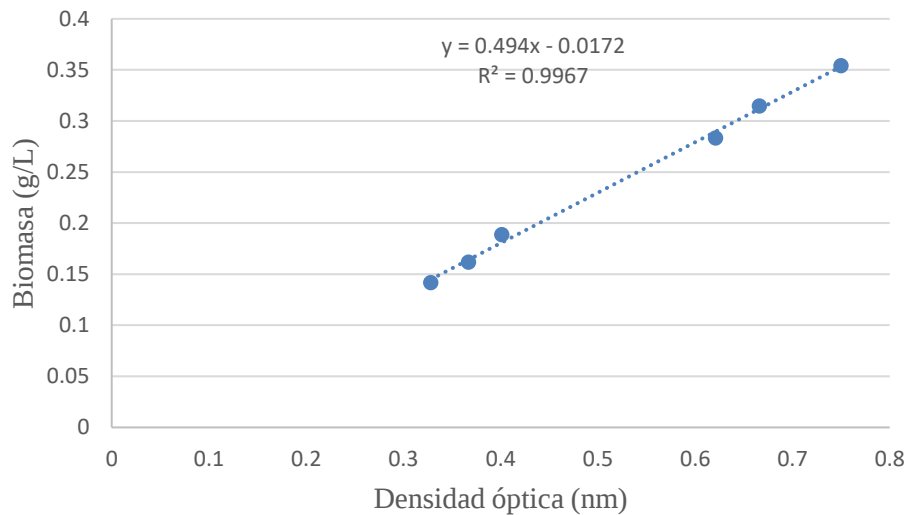


Gráfico complementario 2. Relación entre densidad óptica y biomasa de cepa P9 cultivada en medio Gli.

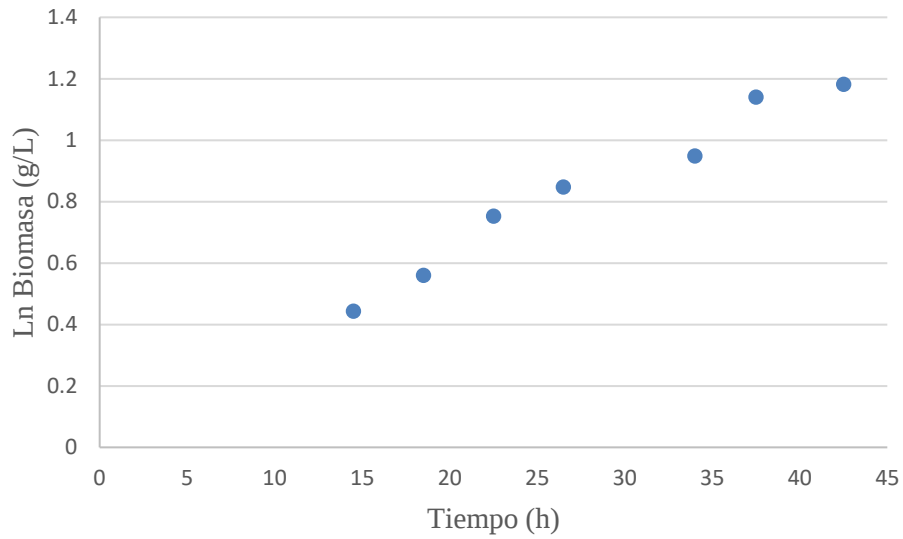


Gráfico suplementario 3. Logaritmo neperiano de biomasa de la cepa P9 en medio Gli vs tiempo.

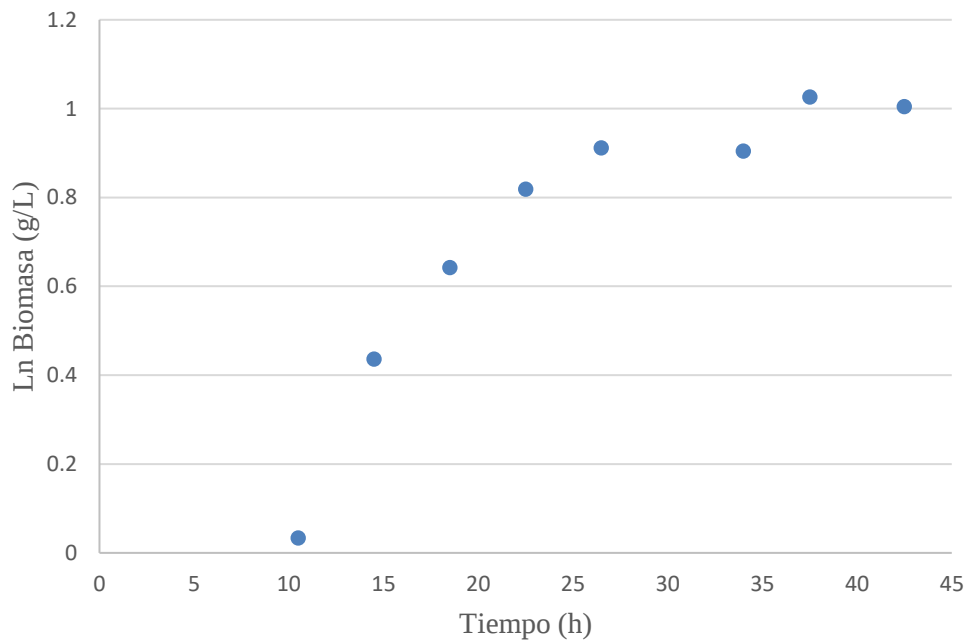


Gráfico suplementario 4. Logaritmo neperiano de biomasa de la cepa P9 en medio Tautos op vs tiempo.

8.3 Espectros de absorbancia HPLC y datos suplementarios

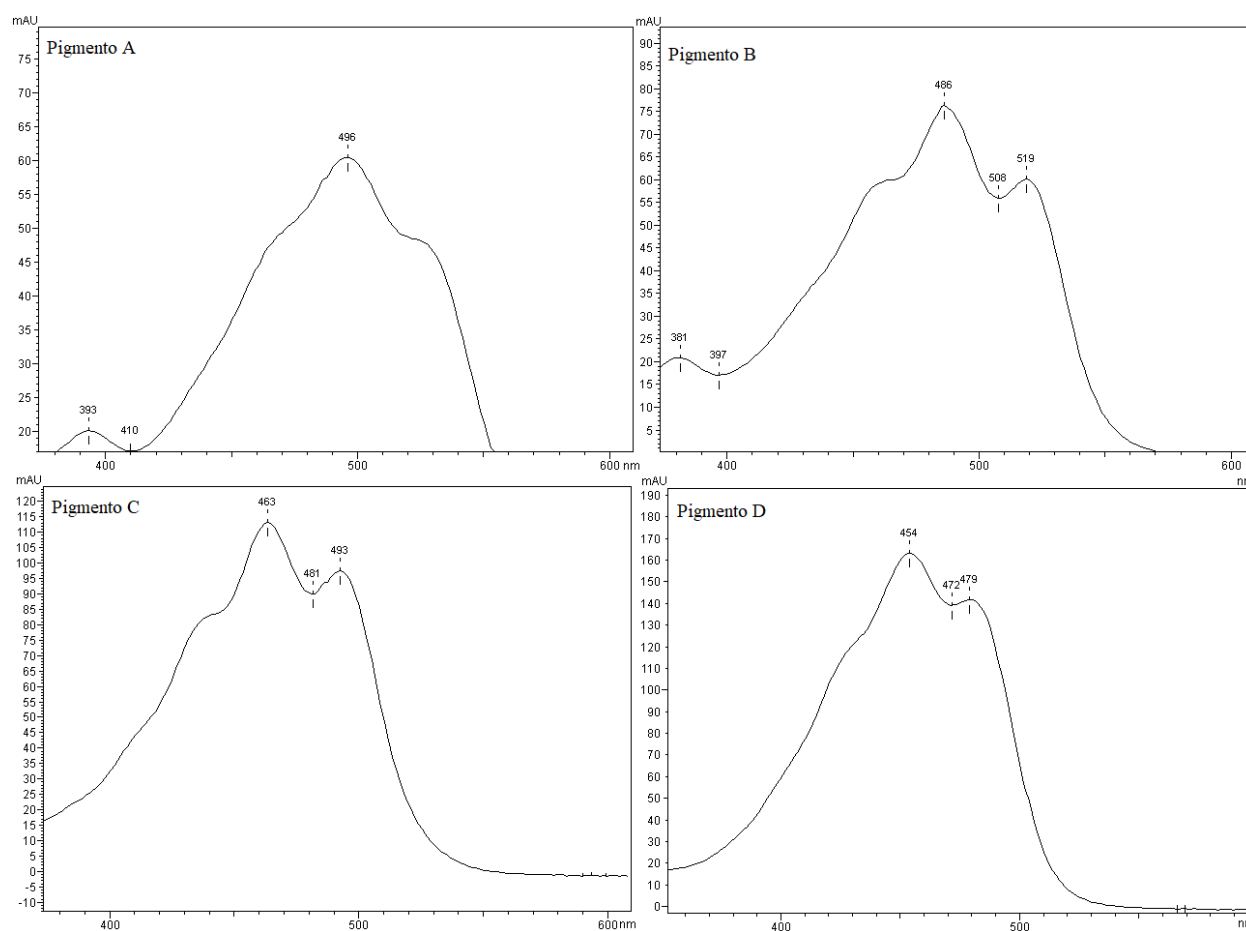


Figura complementaria I. Espectro UV/Vis de los pigmentos del mutante N3 a sus tiempos de elusión correspondientes.

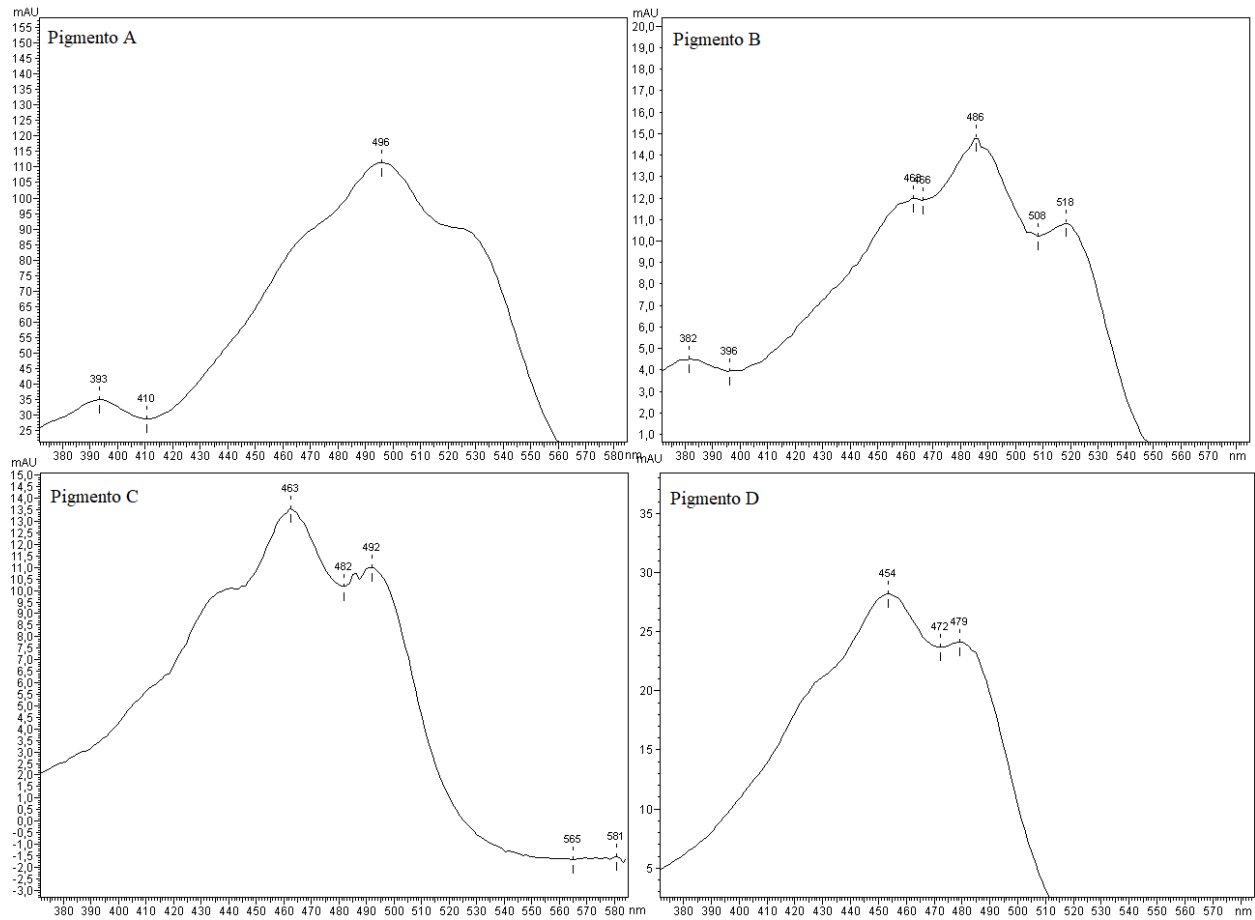


Figura complementaria II. Espectro UV/Vis de los pigmentos del mutante R5 a sus tiempos de elusión correspondientes.

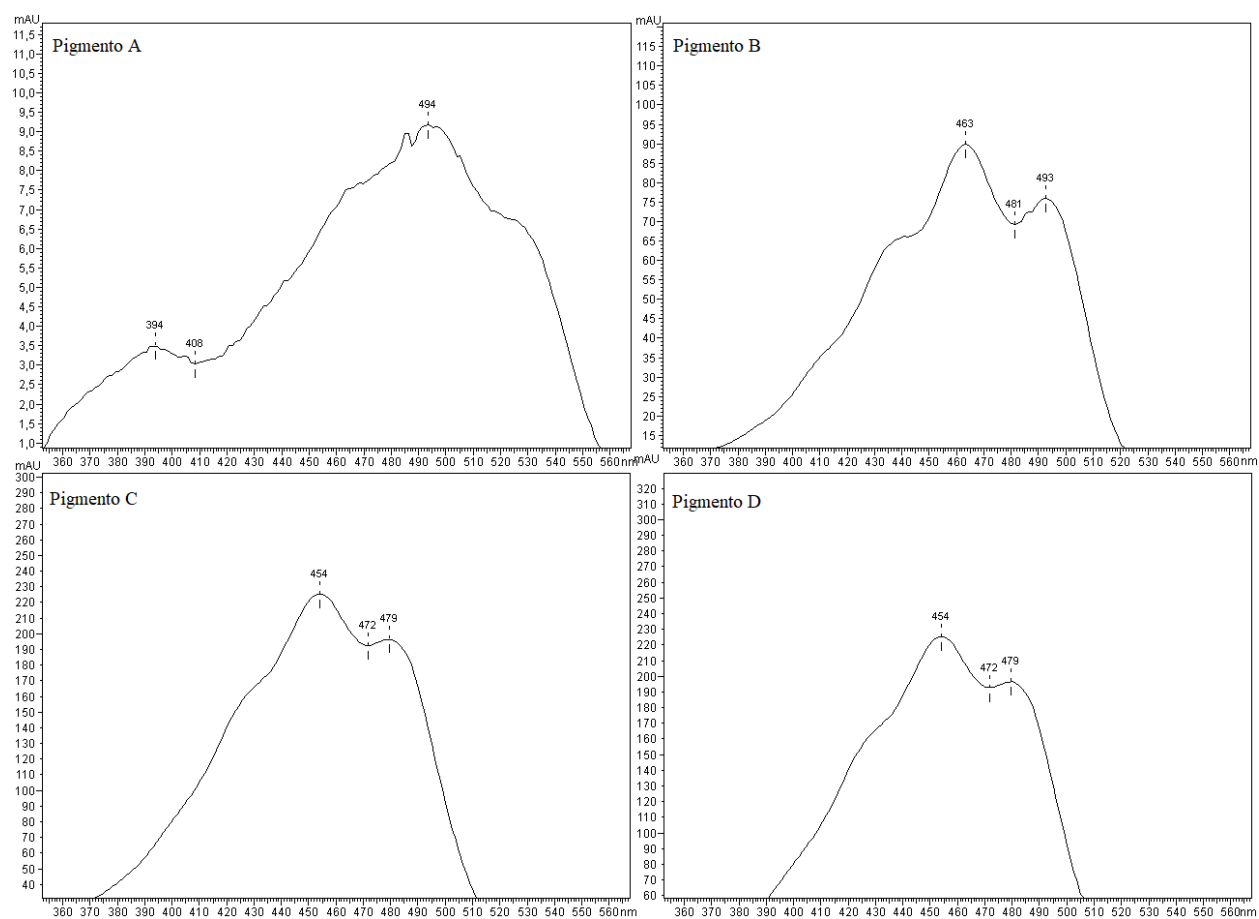


Figura complementaria III. Espectro UV/Vis de los pigmentos del mutante R7 a sus tiempos de elusión correspondientes.

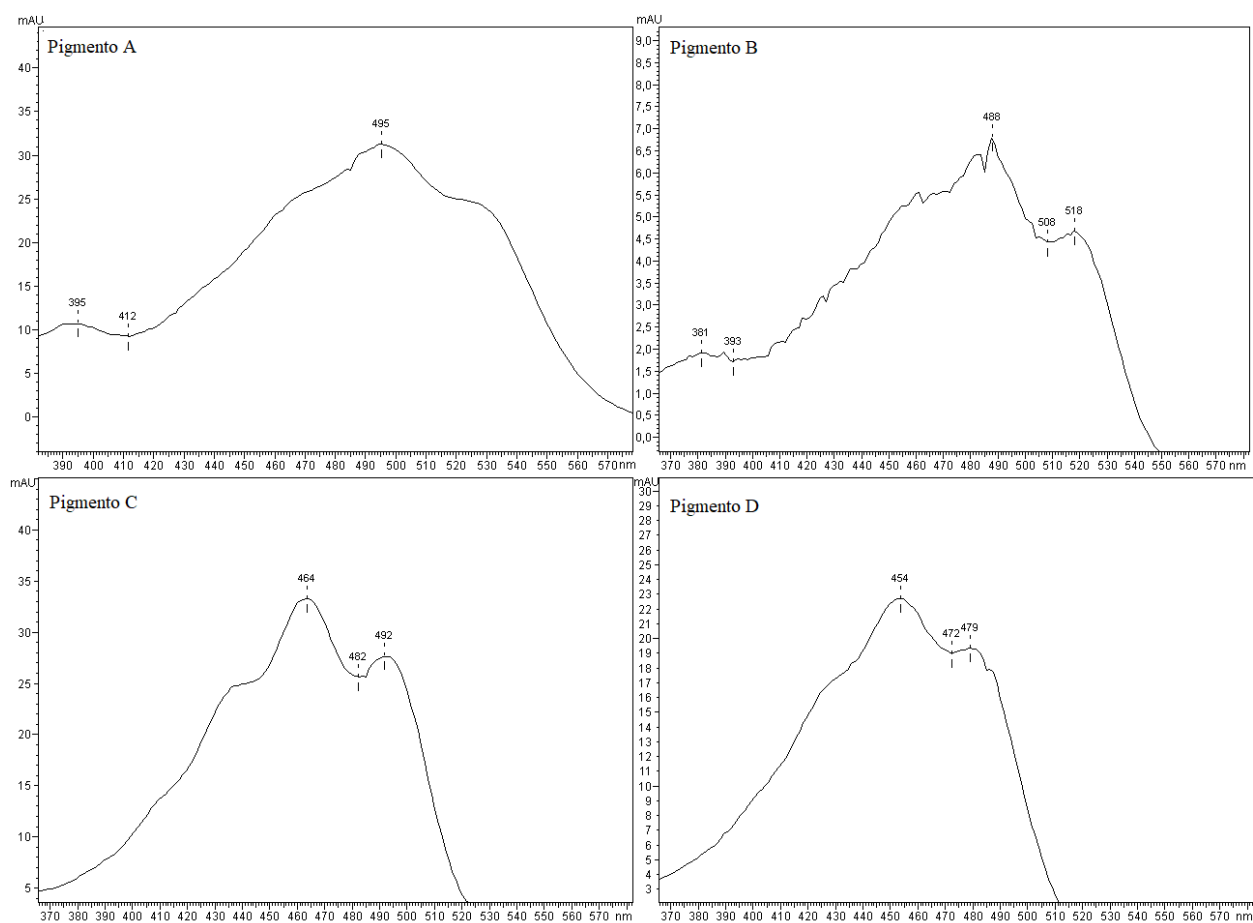


Figura complementaria IV. Espectro UV/Vis de los pigmentos de la cepa Wt a sus tiempos de elusión correspondientes.