



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE INGENIERÍA

TESIS DE DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

BACTERIAS ANTÁRTICAS COMO FUENTE DE PIGMENTOS NATURALES

Autor:

María Eugenia Vila

Directoras de Tesis:

Dra. Claudia Lareo

Dra. Verónica Saravia

Montevideo, Uruguay 3 de junio, 2021

Resumen

En la actualidad existe una creciente preferencia de los consumidores por artículos más seguros y ambientalmente amigables. Dado que los pigmentos cumplen un rol preponderante en una amplia variedad de productos, se han buscado fuentes alternativas que cumplan con las exigencias de los consumidores.

Las bacterias tienen un gran potencial como fuente de pigmentos, siendo en los últimos años un campo emergente de investigación. Sin embrago, la mayoría de los procesos de producción con pigmentos bacterianos está todavía en fase de investigación y desarrollo, lo que supone una interesante oportunidad de profundización.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial de bacterias antárticas heterótrofas como fuente de pigmentos, a través de un proceso biotecnológico. Los pigmentos cumplen funciones adaptativas en las bacterias, protegiéndolas de condiciones ambientales extremas como bajas temperaturas, ciclos de luz-oscuridad, poca disponibilidad de agua y/o nutrientes y altas cargas de radiación ultravioleta y visible. Por esta razón, el ecosistema antártico resulta interesante para la búsqueda de potenciales microorganismos como fuentes alternativas de pigmentos.

Se aislaron 30 cepas productoras de pigmentos pertenecientes a siete diferentes géneros bacterianos: Arthrobacter, Salinibacterium, Cryobacterium, Flavobacterium, Zobellia, Chryseobacterium y Panococcus.

Se determinó la naturaleza de los diez pigmentos producidos por las cepas aisladas, siendo mayoritariamente carotenoides. Se identificaron carotenoides C40 (zeaxantina, β-caroteno, β-criptoxantina, β-zeacaroteno y licopeno), carotenoides C50 (decaprenoxantina, sus derivados glicosilados, C.p. 450) y su derivado glicosilado. Las cepas pertenecientes a los géneros *Cryobacterium*, *Salinibacterium* y *Planococcus* fueron identificadas como nuevas fuentes de carotenoides C50. Se detectó la presencia de flexirrubinas en cepas de *Flavobacterium* sp. y *Zobellia* sp. Se seleccionó una cepa del género *Flavobacterium* para evaluar su potencial como fuente de zeaxantina y carotenoides.

Se estudió la influencia de diferentes factores en la producción de zeaxantina, β-criptoxantina y β-caroteno (temperatura, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales) de la cepa *Flavobacterium* sp. P8 en matraces agitados. Se utilizó la metodología de diseño estadístico

de experimentos para formular un medio de cultivo para la producción de zeaxantina. Se determinó inicialmente que la peptona, el extracto de levadura y NaCl fueron los componentes con mayor influencia en la concentración de biomasa. Se realizó un diseño experimental factorial completo para determinar las concentraciones de estos tres componentes que favorezcan la producción de zeaxantina y carotenoides totales. Se formularon dos posibles medios de cultivo (medio 5 y PC). El medio 5 (2 g/L de peptona, 2 g/L de extracto de levadura y 24 g/L de NaCl), presentó mayor contenido y concentración de zeaxantina (105 ± 7 μg_{zeaxantina}/g_{biomasa} y 272 ± 19 μg_{zeaxantina}/L, respectivamente). El medio PC (7 g/L de peptona, 7 g/L de extracto de levadura y 15 g/L de NaCl) presentó las mayores concentraciones de biomasa (4,5 ± 0,1 g/L) y de carotenoides totales (426 ± 29 μg/L). Estas formulaciones se utilizaron para cultivar la cepa de *Flavobacterium* sp. P8 bajo condiciones de aireación controlada. Se seleccionó el medio PC por alcanzar una concentración de zeaxantina de 2184 ± 75 mg/L, siendo el 98% del total de carotenoides.

Se realizó el escalado del proceso a un biorreactor de laboratorio para estudiar el efecto de la concentración de oxígeno disuelto sobre el crecimiento y la producción de carotenoides de la cepa *Flavobacterium* sp. P8. La disponibilidad de oxígeno tuvo efecto sobre la concentración de biomasa y la producción de zeaxantina y carotenoides totales. Los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de oxígeno disuelto del 10% de saturación, alcanzando un contenido y concentración de zeaxantina de $442 \pm 12~\mu g_{zeaxantina}/g_{biomasa}$ y $2833 \pm 76~\mu g_{zeaxantina}/L$, respectivamente.

Por último, se estudió la modalidad de operación *fed-batch* en el biorreactor. Se obtuvo una concentración de biomasa mayor y un contenido de carotenoides totales similar al obtenido en modo *batch* (530 μg/g_{biomasa}). Sin embargo, la conversión de carotenoides a zeaxantina fue menor (86% en modo *batch* y 26% en modo *fed-batch*), obteniéndose una concentración de zeaxantina menor (2149 ± 99 μg_{zeaxantina}/L). Por lo tanto, el modo de operación *fed-batch* en las condiciones ensayadas en esta tesis no presentó mejoras para la producción de zeaxantina, pero incrementó la concentración de carotenoides totales debido al aumento de la concentración de biomasa.

Flavobacterium sp. P8 mostró ser una cepa con potencial biotecnológico para la producción de zeaxantina, β-criptoxantina y β-caroteno. Los requisitos de oxígeno para el crecimiento microbiano y la biosíntesis de zeaxantina incorporan una variable que requerirá

consideraciones adicionales en trabajos futuros. Los rendimientos alcanzados en las condiciones estudiadas fueron similares a los de otros microorganismos mesófilos.

Palabras clave: Antártida, pigmentos, bacterias, carotenoides, Flavobacterium sp., zeaxantina, biorreactor

Estructura de la tesis

Este trabajo de tesis se organizó en cinco capítulos. Se detalla a continuación, el alcance de cada uno, incluyendo las actividades de divulgación en eventos y publicaciones en revistas científicas.

En el Capítulo 1 se realiza una reseña del estado actual de la producción de pigmentos bacterianos, su rol como mecanismo de adaptación en ambientes fríos y el mercado actual, reviendo los productos disponibles y perspectivas.

En el Capítulo 2 se presentan el objetivo general y los objetivos específicos de esta tesis.

En el Capítulo 3 se describe el proceso de aislamiento y la identificación de bacterias productoras de pigmentos a partir de muestras extraída de la Isla Rey Jorge, Antártida.

Parte de este capítulo fue presentado en el Primer y Segundo Encuentro de Jóvenes Microbiólogos de la Sociedad Uruguaya de Microbiología (Uruguay, 2014 y 2016).

En el Capítulo 4 se presentan los resultados obtenidos sobre la identificación de los pigmentos producidos por las cepas aisladas seleccionadas. El trabajo experimental de esta sección se realizó en el marco de una pasantía en el Laboratorio de Fitoquímica de los Alimentos, Instituto de la Grasa - CSIC, Sevilla, España.

Los resultados obtenidos en los capítulos 3 y 4 fueron publicados en Biotechnology Reports, Elsevier. La cita completa es: Vila, E., Hornero-Méndez, D., Azziz, G., Lareo, C., & Saravia, V. (2019). Carotenoids from heterotrophic bacteria isolated from Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Biotechnology Reports*, 21, e00306,

https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00306

Se adjunta el artículo al final de la tesis.

En el Capítulo 5 se detallan los estudios realizados a escala de matraces con el fin de diseñar un medio de cultivo adecuado para la producción de zeaxantina y carotenoides con la

cepa seleccionada. También se presentan los resultados obtenidos del escalado del bioproceso en un biorreactor de laboratorio. En el biorreactor, se estudiaron las condiciones de aireación requeridas para la producción de pigmentos. Por último, se estudió el desempeño de la cepa en cultivo en modo *fed - batch*.

Los resultados obtenidos en este capítulo fueron presentados en los siguientes eventos: VIII Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica (Uruguay, 2015), 8th International Congress Pigments in Food (Rumania, 2016), 18th International Symposium on Carotenoids (Suiza, 2017), XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos (Brasil, 2017), 12th European Congress of Chemical Engineering / The 5th European Congress of Applied Biotechnology (Italia, 2019) y XXII Simpósio Nacional de Bioprocesos e XIII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (Brasil, 2019).

Parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en el Journal of Biotechnology, Elsevier. La cita completa es: Vila, E., Hornero-Méndez, D., Lareo, C., & Saravia, V. (2020). Biotechnological production of zeaxanthin by an Antarctic *Flavobacterium*: Evaluation of culture conditions. *Journal of Biotechnology*, 319, 54-60. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.014

Índice

Resumen		i
Estructura d	e la tesis	iv
Lista de tabl	as	ix
Lista de figu	ıras	xii
Agradecimi	entos	xviii
Nomenclatu	ra	xv
1 Introdu	cción	1
1.1 Me	ecanismos de adaptación en ambientes extremos	1
1.2 Pig	mentos producidos por bacterias en ambientes fríos	3
1.3 Tee	cnologías de producción de pigmentos microbianos	11
1.4 Me	ercado y perspectivas	13
2 Objetiv	os	17
2.1 Ob	jetivo general	17
2.2 Ob	jetivos específicos	17
3 Búsque	da, aislamiento e identificación de cepas productoras de pigmentos	18
3.1 Ma	arco teórico	18
	iteriales y métodos	
3.2.1	Recolección de muestras	
3.2.2 conserv	Procesamiento de muestras, aislamiento de bacterias productoras de pignación	•
3.2.3	Temperaturas de crecimiento de las cepas aisladas	22
3.2.4	Identificación de aislamientos productores de pigmentos por técnicas mo 22	leculares
3.3 Re	sultados y discusión	24
3.3.1	Identificación de cepas productoras de pigmentos	24
3.3.2	Estudio de las temperaturas de crecimiento	29
3.4 Co	nclusiones	29
4 Identifi	cación de nigmentos hacterianos	30

	4.1 Ma	arco teórico	30
	4.1.1	Métodos para la identificación de carotenoides	30
	4.2 Ma	nteriales y métodos	34
	4.2.1	Cultivo de cepas para identificación de carotenoides	34
	4.2.2	Extracción de los pigmentos	35
	4.2.3	Análisis de los extractos por cromatografía líquida (HPLC-DAD)	35
	4.2.4	Espectrometría de masas (LC-MS (APCI+))	35
	4.2.5	Pruebas químicas	36
	4.3 Re	sultados y discusión	37
	4.3.1	Identificación de pigmentos bacterianos	37
	4.3.2	Selección de la cepa de trabajo	44
	4.4 Co	nclusiones	46
5	Produce	ción de zeaxantina por <i>Flavobacterium</i> sp. P8	47
	5.1 Ma	arco teórico	47
	5.1.1	El género Flavobacterium	47
	5.1.2	Zeaxantina	48
	5.1.3	Efecto de la temperatura sobre la producción de carotenoides	49
	5.1.4	Síntesis de zeaxantina en Flavobacterium sp.	50
	5.2 Ma	nteriales y métodos	55
	5.2.1	Estudio de las condiciones de cultivo para la cepa seleccionada	55
	5.2.2 Placket	Selección de componentes del medio de cultivo a través de un diseño experimento – Burman.	
	5.2.3	Optimización de la composición del medio de cultivo en matraces	58
	5.2.4	Producción de pigmentos en biorreactor	59
	5.2.5	Determinaciones analíticas	61
	5.3 Re	sultados y discusión	62
	5.3.1 Flavobo	Estudio de la temperatura de crecimiento y producción de carotenoides para acterium sp. P8	62
	5.3.2	Estudio de asimilación de fuentes de carbono	63
	5.3.3	Estudio de la concentración de sales marinas	65
	5.3.4	Estudio de la asimilación de fuentes de nitrógeno	67

	5.3.	5 Diseño del medio de cultivo	68
	5.3. zeaz	6 Efecto de la concentración de oxígeno disuelto en el crecimiento y producción de xantina y carotenoides totales por <i>Flavobacterium</i> sp. P8	
	5.3. P8	7 Producción de zeaxantina en biorreactor en modo <i>fed-batch</i> por <i>Flavobacterium</i>	_
	5.3. en r	Comparación de resultados para la producción de zeaxantina y carotenoides total modo <i>batch</i> y <i>fed-batch</i> por <i>Flavobacterium</i> sp. P8. con literatura científica	
	5.4	Conclusiones	02
6	Cor	nclusiones y trabajo futuro	04
	6.1	Conclusiones generales	04
	6.2	Perspectivas	06
7	Bib	liografía1	08
8	Ane	exo	27
	8.1	Determinaciones analíticas y curvas de calibración	27
	8.2	Medios de cultivo	27
	8.3	Aislamiento de cepas productoras de pigmentos	27
	8.4	Patrones de bandas obtenidos por TP-RAPD	27
	8.5	Análisis estadístico 1	27
	8.6	Perfiles de biomasa en función del tiempo, para las cepas preseleccionadas es estudias 127	r
	8.7 matra	Diseño factorial (factores glucosa, peptona y extracto de levadura) para el cultivo en ces de <i>Flavobacterium</i> sp. P8	27
	8.1	Determinaciones analíticas	28
	8.1.	1 Determinación de glucosa	28
	8.1.	2 Determinación de zeaxantina, β-criptoxantina y β-caroteno	29
	8.2	Composición de los medios de cultivo	30
	8.3	Aislamiento de cepas productoras de pigmentos.	31
	8.4	Patrones de bandas obtenidos por TP-RAPD	35
	8.5	Análisis estadísticos	39
	8.6	Estudio preliminar de los niveles de glucosa consumidos por <i>Flavobacterium</i> sp. P8. 142	

Lista de tablas

Tabla 1.1. Pigmentos bacterianos reportados en ambientes fríos, estructura molecular y función
en la célula.
Tabla 1.2. Pigmentos microbianos de grado alimentario autorizados y disponibles en el mercado
mundial (Adaptado de Nigam y Luke, 2016).
Tabla 1.3. Diferentes productos industriales y suplementos nutricionales que utilizan pigmentos
(Adaptado de Saini y Keum 2018)
Tabla 3.1. Características de las cepas aisladas y los resultados de la amplificación del gen
ARNr 16S
Tabla 4.1. Carotenoides identificados en los extractos bacterianos, perfiles cromatográficos y
patrón de espectrometría de masas
Tabla 4.2. Resultados de las fermentaciones para las cepas preseleccionadas a 15°C y 200 rpm.
Tabla 5.1. Niveles de concentración de nutrientes estudiados en el diseño factorial fraccionado
(Placket-Burman)
Tabla 5.2. Diseño de Plackett-Burman para las 11 variables estudiadas (X_1-X_{11}) y 4 variables
" $dummy$ " ($X_{12} - X_{15}$). 58
Tabla 5.3. Corridas del diseño factorial completo 2 ³
Tabla 5.4. Concentración de biomasa, velocidades específicas de crecimiento, y contenido de
carotenoides por gramo de biomasa seca a diferentes temperaturas, 200 rpm y 12 h de
fermentación. 62
Tabla 5.5. Resultados de la fermentación de Flavobacterium sp. P8 en diferentes fuentes de
carbono, a 20°C y 200 rpm
Tabla 5.6. Concentraciones de biomasa y velocidades específicas máximas de crecimiento para
Flavobacterium sp. P8 cultivada a 20°C y 200 rpm, con diferentes concentraciones de sales
marinas
Tabla 5.7. Concentración de biomasa para Flavobacterium sp. P8 obtenida utilizando diferentes
fuentes de nitrógeno, en cultivos realizados a 200 rpm y 20°C

Tabla 5.8. Diseño experimental de Plackett - Burman para los 11 factores nutricionales
estudiados y las respuestas concentración de biomasa y consumo de glucosa
Tabla 5.9. Efecto de los factores, intervalos de confianza (-% IC, +% IC), p-valor y porcentaje
de suma de cuadrados (SS) para la concentración de biomasa en el diseño de Plackett-Burman. 70
Tabla 5.10. Resultados del diseño factorial 2 ³ +1
Tabla 5.11. Efecto de los factores para las respuestas biomasa, concentración de zeaxantina y
carotenoides totales. Los p-valores menores a 0,05 indican significancia del factor
Tabla 5.12. Resultados de fermentación en matraces agitados, de cepas productoras de
zeaxantina en matraces agitados
Tabla 5.13. Resultados de ensayos en biorreactor, medios punto central (7 g/L peptona, 7 g/L
extracto de levadura, 15 g/L NaCl) y 5 (2 g/L peptona, 2 g/L extracto de levadura, 24 g/L NaCl).
81
Tabla 5.14. Resultados de los cultivos de <i>Flavobacterium</i> sp. P8 en el medio PC a 20°C, 1 vvm
y diferentes concentraciones de oxígeno disuelto (OD)
Tabla 5.15. Comparación de resultados entre fermentaciones en biorreactor a 20°C y OD=10%
97
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados en la literatura. 100
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados en la literatura. 100 Tabla 8.1. Sitios de muestreo y procedencia de las muestras recogidas en la campaña Antártida
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados en la literatura. 100 Tabla 8.1. Sitios de muestreo y procedencia de las muestras recogidas en la campaña Antártida de diciembre de 2014, medio de aislamiento y dilución a la cual se repicaron las cepas
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados en la literatura. 100 Tabla 8.1. Sitios de muestreo y procedencia de las muestras recogidas en la campaña Antártida de diciembre de 2014, medio de aislamiento y dilución a la cual se repicaron las cepas pigmentadas, con su respectiva codificación. 131
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados en la literatura
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados en la literatura
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados en la literatura. 100 Tabla 8.1. Sitios de muestreo y procedencia de las muestras recogidas en la campaña Antártida de diciembre de 2014, medio de aislamiento y dilución a la cual se repicaron las cepas pigmentadas, con su respectiva codificación. 131 Tabla 8.2. Cepas productoras de pigmentos aisladas en la campaña antártica de diciembre de 2014. 133 Tabla 8.3. Análisis de varianza (ANOVA) para la velocidad específica de crecimiento en
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados en la literatura. 100 Tabla 8.1. Sitios de muestreo y procedencia de las muestras recogidas en la campaña Antártida de diciembre de 2014, medio de aislamiento y dilución a la cual se repicaron las cepas pigmentadas, con su respectiva codificación. 131 Tabla 8.2. Cepas productoras de pigmentos aisladas en la campaña antártica de diciembre de 2014. 133 Tabla 8.3. Análisis de varianza (ANOVA) para la velocidad específica de crecimiento en función de la temperatura (SC tipo III). Se utilizó el método de Tukey para comparación de
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados en la literatura. 100 Tabla 8.1. Sitios de muestreo y procedencia de las muestras recogidas en la campaña Antártida de diciembre de 2014, medio de aislamiento y dilución a la cual se repicaron las cepas pigmentadas, con su respectiva codificación. 131 Tabla 8.2. Cepas productoras de pigmentos aisladas en la campaña antártica de diciembre de 2014. 133 Tabla 8.3. Análisis de varianza (ANOVA) para la velocidad específica de crecimiento en función de la temperatura (SC tipo III). Se utilizó el método de Tukey para comparación de medias, con un nivel de significancia de 5%. 139
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados en la literatura. 100 Tabla 8.1. Sitios de muestreo y procedencia de las muestras recogidas en la campaña Antártida de diciembre de 2014, medio de aislamiento y dilución a la cual se repicaron las cepas pigmentadas, con su respectiva codificación. 131 Tabla 8.2. Cepas productoras de pigmentos aisladas en la campaña antártica de diciembre de 2014. 133 Tabla 8.3. Análisis de varianza (ANOVA) para la velocidad específica de crecimiento en función de la temperatura (SC tipo III). Se utilizó el método de Tukey para comparación de medias, con un nivel de significancia de 5%. 139 Tabla 8.4. Análisis de varianza (ANOVA) para la velocidad específica de crecimiento para
Tabla 5.16. Resultados obtenidos en biorreactor para la producción de carotenoides reportados en la literatura. 100 Tabla 8.1. Sitios de muestreo y procedencia de las muestras recogidas en la campaña Antártida de diciembre de 2014, medio de aislamiento y dilución a la cual se repicaron las cepas pigmentadas, con su respectiva codificación. 131 Tabla 8.2. Cepas productoras de pigmentos aisladas en la campaña antártica de diciembre de 2014. 133 Tabla 8.3. Análisis de varianza (ANOVA) para la velocidad específica de crecimiento en función de la temperatura (SC tipo III). Se utilizó el método de Tukey para comparación de medias, con un nivel de significancia de 5%. 139 Tabla 8.4. Análisis de varianza (ANOVA) para la velocidad específica de crecimiento para diferentes fuentes de carbono (SC tipo III). Se utilizó el método de Tukey para comparación de diferentes fuentes de carbono (SC tipo III). Se utilizó el método de Tukey para comparación de diferentes fuentes de carbono (SC tipo III). Se utilizó el método de Tukey para comparación de diferentes fuentes de carbono (SC tipo III). Se utilizó el método de Tukey para comparación de diferentes fuentes de carbono (SC tipo III). Se utilizó el método de Tukey para comparación de diferentes fuentes de carbono (SC tipo III).

Tabla 8.6. Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de zeaxantina. Diseño experimental
$2^{3}+1$
Tabla 8.7. Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de carotenoides totales. Diseño
experimental 2 ³ +1.
Tabla 8.8. Análisis de varianza (ANOVA) para la concentración de zeaxantina. Diseño
experimental 2 ³ +1.
Tabla 8.9. Análisis de varianza (ANOVA) para la concentración de carotenoides totales. Diseño
experimental 2 ³ +1.
Tabla 8.10. Resultados de consumo de glucosa y producción de biomasa para el diseño factorial
de los factores glucosa, peptona y extracto de levadura

Lista de figuras

Figura 1.1. Orientación de zeaxantina y β-caroteno en la membrana celular (Ram et al., 2020). 4
Figura 3.1. Puntos de recolección de muestras de la campaña Antártica de diciembre de 2014. 21
Figura 3.2. Productos de PCR obtenidos a partir del TP-RAPD para el género Arthrobacter. En
los carriles 1, 6 y 11 se utilizó un marcador de peso molecular (MM)
Figura 3.3. Árbol filogenético construido en base a las secuencias del ARNr 16S de los
aislamientos de estudio. El árbol fue construido empleando el método de Máxima Parsimonia.
Los valores de bootstrap (1000 réplicas) se indican en los nodos, exceptuando los valores
menores a 50
Figura 4.1. a) Molécula de isopreno b) molécula de licopeno, formada por la condensación de 8
unidades de isopreno
Figura 4.2. a) Grupos terminales presentes en los carotenoides (Rodríguez - Concepción et al.,
2018), b) moléculas de β-caroteno (arriba) y licopeno (abajo) con sus grupos terminales
indicados por círculos rojos, grupos β y Ψ respectivamente
Figura 4.3. Estructura fina del espectro de absorción de un carotenoide. Adaptado de Lu et al.
(2001)
Figura 4.4. Desarrollo de color en prueba con KOH 20% en metanol (1) extracto crudo, (2)
extracto con el agregado de solución potásica, (3) extracto neutralizado
Figura 4.5. Extractos metánólicos de las cepas estudiadas. De izquierda a derecha: Planococcus
sp. P48, Flavobacterium sp. P8, Flavobacterium sp. P33, Chryseobacterium sp. P36,
Arthrobacter sp. P40, Flavobacterium sp. P14, Cryobacterium sp. P19, y Salinibacterium sp.
P15
Figura 4.6. Cromatogramas obtenidos en HPLC-DAD a 450 nm y espectros UV-visible de los
carotenoides para las cepas de Arthrobacter, Salinibacterium, Cryobacterium y Planococcus 39
Figura 4.7. Cromatogramas obtenidos en HPLC-DAD a 450 nm y espectros UV-visible de los
carotenoides para las cepas de <i>Flavobacterium</i> y <i>Chryseobacterium</i>
Figura 4.8. Perfiles de biomasa en función del tiempo, para las cepas preseleccionadas
cultivadas a 15°C y 200 rpm. 45

Figura 5.1. a) Morfología de colonia en placa en medio TSA suplementado con sales marinas y
b) morfología celular de <i>Flavobacterium</i> sp. P8
Figura 5.2. Estructura de la molécula de zeaxantina
Figura 5.3. Primeros pasos de la vía biosintética para la formación de zeaxantina (Adaptado de
Zhang et al. (2018))
Figura 5.4. Vías de formación de β-caroteno propuestas para <i>Flavobacterium</i> R 1560 (Britton et
al., 1977)
Figura 5.5. Vías de formación de zeaxantina en Flavobacterium R 1560 (Britton et al., 1977). 54
Figura 5.6. Imagen de un cultivo de Flavobacterium sp. P8 del biorreactor Biostat A Plus
(Sartorius)
Figura 5.7. Curvas de crecimiento de <i>Flavobacterium</i> sp. P8 a diferentes temperaturas
Figura 5.8. a) Perfiles de biomasa y b) consumo de sustratos en función del tiempo para
Flavobacterium sp. P8 a 20°C y 200 rpm. 63
Figura 5.9. Perfiles de concentración biomasa en función del tiempo para Flavobacterium sp. P8
cultivada a 20°C y 200 rpm, con diferentes concentraciones de sales marinas
Figura 5.10. Gráfico de Pareto para los efectos estandarizados (valores absolutos). Efecto sobre
respuesta Biomasa (g/L). MS Residual = 0,01583
Figura 5.11. Gráfico de optimización de biomasa en función de los niveles de peptona, extracto
de levadura y NaCl
Figura 5.12. Grafico de optimización para el contenido de zeaxantina en función de los niveles
de peptona, extracto de levadura y NaCl
Figura 5.13. Grafico de optimización para el contenido de carotenoides totales en función de los
niveles de peptona, extracto de levadura y NaCl
Figura 5.14. Gráfico de optimización para la concentración de zeaxantina en función de los
niveles de peptona, extracto de levadura y NaCl
Figura 5.15. Gráfico de optimización para la concentración de carotenoides totales en función de
los niveles de peptona, extracto de levadura y NaCl
Figura 5.16. Perfiles de biomasa y carotenoides en fermentación en biorreactor a 20°C, OD
20%: a) medio punto central (7 g/L peptona, 7 g/L extracto de levadura, 15 g/L NaCl), b) medio
5 (2 g/L peptona, 2g/L extracto de levadura, 24 g/L NaCl)

Figura 5.17. Perfiles de a) concentración de biomasa y b) consumo de glucosa en función del
tiempo, para las experiencias con diferentes concentraciones de oxígeno disuelto utilizando el
medio PC (7 g/L peptona, 7 g/L extracto de levadura y 15 g/L NaCl)
Figura 5.18. a) OD (%) vs. tiempo y b) perfiles de contenido y concentración de zeaxantina, β-
criptoxantina y β-caroteno para el cultivo de <i>Flavobacterium</i> sp. P8 en biorreactor a 20°C, 300
rpm, 1 vvm. Las líneas continuas corresponden a concentraciones y las líneas discontinuas a
contenidos de carotenoides, respectivamente.
Figura 5.19. a) OD (%) vs. tiempo y b) perfiles de contenido y concentración de zeaxantina, β-
criptoxantina y β-caroteno para el cultivo de <i>Flavobacterium</i> sp. P8 en biorreactor a 20°C, 300
rpm, 1 vvm, OD = 5%. Las líneas continuas corresponden a concentraciones y las líneas
discontinuas a contenidos de carotenoides, respectivamente
Figura 5.20. Perfiles de OD (%) vs. tiempo (h) y contenidos y concentraciones de zeaxantina, β -
criptoxantina, β-caroteno y carotenoides totales para el cultivo de Flavobacterium sp. P8 en
biorreactor a 20°C, 1 vvm y a) OD = 10%; b) OD = 20% y c) OD = 40%. Las líneas continuas
corresponden a concentraciones y las líneas discontinuas a contenidos de carotenoides,
respectivamente
Figura 5.21. Velocidad de agitación en función del tiempo para las primeras 35 h de
fermentación
Figura 5.22. a) Perfiles de OD y velocidad de agitación (N) vs. tiempo y b) perfiles de biomasa,
glucosa y concentración de carotenoides en función del tiempo para el cultivo de Flavobacterium
sp. P8 en modo fed - $batch$ a 20°C y OD = 10%
Figura 8.1. Curva de calibración típica para determinación de glucosa por HPLC 128
Figura 8.2. Curva de calibración típica para determinación de zeaxantina, β-criptoxantina y β-
caroteno por HPLC. 129
Figura 8.3. Productos de PCR obtenidos a partir del TP-RAPD para el género Arthrobacter 135
Figura 8.4. Productos de PCR obtenidos a partir del TP-RAPD para el género Arthrobacter 136
Figura 8.5. Productos de PCR obtenidos a partir del TP-RAPD para los géneros Salinibacterium
y <i>Planococcus</i> . En los carriles 1 y 8 se utilizó el marcador de peso molecular
Figura 8.6. Productos de PCR obtenidos a partir del TP-RAPD para el género Flavobacterium.
138

Nomenclatura

ADN: ácido desoxirribonucleico

APCI: siglas en inglés para atmospheric-pressure chemical ionization (Ionización química a

presión atmosférica)

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

AMD: siglas en inglés para age macular degeneration (degeneración macular relacionada con la

edad)

BLAST: siglas en inglés para Basil local aligment search tool

C40: carotenoides de 40 carbonos

C50: carotenoides de 50 carbonos

CrtB: fitoeno sintetasa

CrtE: geranilgeranil pirofosfato sintasa

CT: carotenoides totales

DAD: siglas en inglés para diode-array detector (detector de arreglo de diodos)

DMAPP: dimetil-alil-difosfato

DXP: 1-deoxyxilulosa-5-fosfato

FPP: farnesil-di-fosfato

FPS: farnesil-di-fosfato sintasa

GGPP: geranilgeranil pirofosfato

GPP: gerail-pirofosfato

GPS: geranil pirofosfato sintetasa

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

HPLC: siglas en inglés para high performance liquid chromatography (cromatografía líquida de

alta eficiencia)

IPP: isopentenil difosfato

MEP: 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato

MS: sigles en inglés para mass spectrometry (Espectrometría de masas)

MVA: mevalonato

N: velocidad de agitación (unidades: revoluciones por minuto, rpm)

NCBI: siglas en inglés para *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)

OD (%): porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de cultivo con respecto a la concentración de saturación

PC: punto central

PCR: siglas en inglés para Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

q_{zeaxantina}: velocidad específica de producción de zeaxantina (mg_{zeaxantina}/gh)

Qz: productividad volumétrica de zeaxantina (mgzeaxantina/Lmedioh)

QCT: productividad volumétrica de carotenoides totales (mgcarotenoides totales/Lmedioh)

ROS: siglas en inglés para reactive oxygen species (especies reactivas del oxígeno)

TOF: siglas en inglés para time-of-flight spectrometry (espectrometría de tiempo de vuelo)

TP-RAPD: siglas en inglés para Two Primers Random Amplified Polymorphic DNA

TSA: siglas en inglés para *Tryptic Soy Agar* (agar tripticasa de soja)

TSB: siglas en inglés para *Tryptic Soy Broth* (caldo tripticasa de soja)

UV: ultravioleta

vvm: tasa de aireación (volumen de aire por volumen de medio por minuto)

Y_{X/S}: rendimiento de biomasa en base al consumo de sustrao (g_{biomasa}/g_{sustrato})

Agradecimientos

A Claudia y Verónica por su supervisión, aliento y apoyo a lo largo de este trabajo de tesis, por su orientación, cariño y paciencia.

Al tribunal, Dra. Sofía Barrios, Dr. Antonio Meléndez-Martínez y Dra. Silvana Vero por aceptar formar parte de la evaluación de este trabajo y por sus devoluciones, las cuales han sido muy enriquecedoras.

A las organizaciones que participaron en la financiación de este trabajo: a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el apoyo financiero durante mis dos primeros años del posgrado y por financiar mi estancia en España. También quiero agradecer a la Comisión Académica de Posgrado (CAP) por el apoyo financiero en los últimos años de mi doctorado. Por último, al Instituto Antártico Uruguayo por el apoyo logístico y por mi estadía en la Base Artigas.

Al Dr. Dámaso Hornero-Méndez y al Instituto de la Grasa-CSIC, por permitirme realizar una pasantía en el Laboratorio de Fitoquímica de los Alimentos. Gracias Dámaso por tu paciencia y dedicación a la hora de orientarme durante mi estancia en tu laboratorio. Gracias también a Lourdes por el tiempo compartido, y principalmente por el cariño, la amistad y hacerme sentir siempre como en casa.

Al Dr. Gastón Azziz por dirigirme en las actividades de biología molecular. Gracias por tu paciencia, conocimientos transmitidos y orientación.

A mis compañeros y compañeras de Bioingeniería, a todos los que estuvieron presentes a lo largo de estos años: Lauri, las Flores, Mairan, Elo, Vale, Maxi, Cami, Mage, Santi, Milton, Mario, por el apoyo, las charlas eternas, las discusiones y consejos.

Gracias a Sylvia y a Erika por su disponibilidad y amabilidad a la hora de asistirme con el liofilizador.

A mis amigos y amigas, por su apoyo incondicional y su inmensa confianza.

A mi familia: a mis padres, a mi hermano y abuelos, por su apoyo en mis estudios y por confiar en mí más de lo que yo lo hago. Gracias a sus esfuerzos y sacrificio, me ayudaron a ser quien soy hoy.

A Seba, por acompañarme en este camino, por el apoyo y la motivación cuando las cosas no iban bien, por las discusiones y tus opiniones siempre enriquecedoras, y por creer en mí.

1 Introducción

Las nuevas tendencias mundiales de consumo se inclinan por productos más seguros tanto para la salud humana, como para el medio ambiente. Estas preferencias han llevado a un aumento en el interés por la producción de pigmentos de origen natural (Venil et al., 2013). Los colorantes naturales son aquellos que provienen de fuentes naturales como plantas y microorganismos. Dentro de todas estas fuentes, la producción en biorreactores a partir de microorganismos presenta ventajas sobre la producción a partir de plantas. Algunas de estas ventajas son: facilidad para optimizar condiciones de crecimiento y producción, velocidades de crecimiento mayores, independencia de la estacionalidad o del clima y procesos de separación de producto más simples, entre otros.

La bioprospección en ambientes extremos tiene como objetivo encontrar microorganismos poco estudiados, que sean posibles fuentes de productos con aplicaciones biotecnológicas. Por esta razón, las investigaciones en el área de la microbiología y biotecnología en ambientes antárticos han estado en continuo crecimiento en los últimos años (Godinho et al., 2013; Bianchi et al., 2014; Krishnan et al., 2016). Las comunidades microbianas que habitan ambientes extremos están constantemente expuestas a condiciones de estrés, como temperaturas extremadamente bajas, condiciones oligotróficas, ciclos de congelación-descongelación, radiación ultravioleta (UV) y mayor salinidad. Para sobrevivir a estas condiciones, los microorganismos desarrollan estrategias que incluyen alteraciones morfológicas y la producción de diversos metabolitos. La mayoría de estos metabolitos despiertan interés debido a sus importantes aplicaciones biotecnológicas e industriales (Cavicchioli et al., 2011).

1.1 Mecanismos de adaptación en ambientes extremos

Las bajas temperaturas generan una reducción de la energía térmica de los sistemas, incrementan la viscosidad de los líquidos y la solubilidad de los gases (como el oxígeno y las especies reactivas de oxígeno (ROS)), reducen la solubilidad de los nutrientes, disminuye la difusión, amplificando la desecación, el estrés osmótico y la formación de hielo (Sajjad et al., 2020). Para hacer frente a estas condiciones, las bacterias desarrollan mecanismos especiales de adaptación. La habilidad de estos microorganismos para adaptarse a condiciones de bajas

temperatura depende, en principio, de su habilidad para detectar los cambios de temperatura. La membrana celular, al estar en contacto directo con el ambiente externo, es el sensor primario de estos cambios (Rowbury, 2003). A bajas temperaturas, las bacterias modifican la composición y el funcionamiento de su membrana celular para proteger a la célula, regulando la permeabilidad, fluidez, el transporte de nutrientes y la división celular, entre otras. Estos cambios consisten en la modificación de la composición de la bicapa lipídica (aumento en la concentración de ácidos grasos poliinsaturados, formación de ácidos grasos de cadena corta, ramificaciones, isomerización cis/trans) (Chattopadhyay et al., 1997; Kiran et al., 2004), la regulación de las proteínas transportadoras de membrana para aumentar la difusión a bajas temperaturas (Bakermans et al., 2007; De Maayer et al. 2014), regulación de la síntesis de peptidoglicanos para proteger la célula de procesos de congelamiento-descongelamiento, formación de hielo y presión osmótica (Mykytczuk et al. 2013), entre otros.

En estos microorganismos, las rutas metabólicas como la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la cadena transportadora de electrones y la vía de las pentosas – fosfato son reguladas de manera de protegerse contra el daño oxidativo y poder conservar energía celular a largo plazo (Piette et al., 2011; Tribelli et al., 2015).

También se ha reportado la producción de sustancias poliméricas extracelulares como crioprotectores y osmoprotectores (Caruso et al., 2018) y la adaptación de sus enzimas extracelulares a trabajar a altas velocidades en condiciones de bajas temperaturas (Santiago et al., 2016).

Otro mecanismo de adaptación desarrollado por algunos microorganismos en ambientes fríos es la producción de pigmentos. Estudios de especies bacterianas antárticas han mostrado preponderancia de bacterias pigmentadas (Chauhan y Shivaji, 1994), habiéndose reportado aislamientos procedentes de glaciares y núcleos de hielo (Shen et al. 2018). En líneas generales se ha estudiado que los pigmentos cumplen un importante rol fotoprotector, protegiendo a las moléculas de la radiación UV-visible, actúan como crioprotectores, antioxidantes, antimicrobianos, entre otras funciones (Dieser et al., 2010). También se ha reportado su implicancia en procesos de *quorum sensing* y formación de biofilms (Burt et al., 2014).

1.2 Pigmentos producidos por bacterias en ambientes fríos

A continuación, se describen brevemente las características de los pigmentos microbianos más comúnmente encontrados en ambientes fríos producidos por bacterias y en la Tabla 1.1 se resumen los diferentes pigmentos microbianos, su estructura y propiedades.

Carotenoides

Los carotenoides son los pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo conocidos hasta el momento 1183 estructuras, clasificados en 702 fuentes por la Carotenoid Database Japan (https://carotenoiddb.jp). Pueden encontrarse en la naturaleza en animales, plantas o en microorganismos fotosintéticos y no fotosintéticos.

Los carotenoides son pigmentos pertenecientes a la familia de los isoprenoides. Su estructura consiste, en una cadena de dobles enlaces conjugados, que, según su número, generalmente exhiben una gama de colores desde el amarillo al rojo. El esqueleto central de dobles enlaces conjugados puede presentar en sus extremos diferentes grupos sustituyentes, los cuales pueden incluir átomos de oxígeno. Estas características hacen que los carotenoides sean capaces de absorber la radiación UV, protegiendo a las células del daño foto-oxidativo, inhibiendo la formación de las especies reactivas del oxígeno (Tian y Hua, 2010). Sus características estructurales también les infieren una alta hidrofobicidad, siendo más o menos polares según los sustituyentes que presenten.

En bacterias, los carotenoides se localizan en las membranas celulares (Shivaji y Prakash, 2010). Según su orientación, se ha reportado su capacidad de modular la flexibilidad de la membrana, reforzar su estabilidad y disminuir la peroxidación de los lípidos (Krinsky, 1978; Subczynski et al., 1992; Miller et al., 1996; Jagannadham et al., 2000). Esta plasticidad hace que las bacterias puedan adaptarse eficientemente a las bajas temperaturas y los ciclos de congelamiento-descongelamiento (Singh et al., 2017). En la Figura 1.1 se muestra una representación de la orientación de los carotenoides en las membranas celulares.

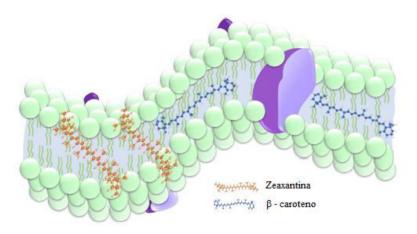


Figura 1.1. Orientación de zeaxantina y β–caroteno en la membrana celular (Ram et al., 2020)

En la literatura científica se pueden encontrar diversos estudios que correlacionan la producción de carotenoides con microorganismos provenientes de ambientes fríos. Dieser et al. (2010) reportaron la producción de carotenoides en bacterias heterótrofas de la Antártida, como una estrategia para mitigar el estrés ambiental. Se ha reportado la producción de bacteriorruberina y sus glicósidos en la bacteria psicrótrofa *Arthrobacter agilis*, aislada de muestras de hielo, como responsable de la regulación de la fluidez de la membra a bajas temperaturas (Fong et al., 2001). Otro estudio, sobre cepas antárticas de *Sphingobacterium antarcticus* y *Micrococcus roseus* reporta la producción de carotenoides polares y no polares (Chattopadhyay y Jagannadham, 2001). Para la misma especie, Silva et al. (2019) reportó la producción de zeaxantina, β-criptoxantina y β-caroteno.

Flexirrubinas

Las flexirrubinas son una clase de pigmentos de color anaranjado, y su estructura consiste en un grupo terminal cromóforo de ácido ω-fenil-loctaenico esterificado con resorcinol (Venil et al., 2014). Las flexirrubinas fueron aisladas por primera vez de cepas de *Flexibacter elegans* (Reichenbach et al., 1974). Luego se identificaron estructuras similares en otros géneros bacterianos como *Cytophaga*, *Sporocytophaga* y *Chryseobacterium*, presentando para cada uno, modificaciones específicas, lo que permite utilizarlo como marcador químico taxonómico (Reichenbach et al., 1974). Las modificaciones pueden ser variaciones en el largo o sustituyentes de las cadenas hidrocarbonadas en el resorcinol y la adición de sustituyentes en el anillo ω-fenilo, surgiendo una gran variedad de estructuras moleculares (Stafsnes et al., 2013).

Las flexirrubinas se localizan en la membrana celular y se han detectado en concentraciones hasta 10 veces mayores que los fosfolípidos en membranas de bacterias Gram negativas, por lo que se le atribuyen funciones fotoprotectoras. También podrían estar involucradas en la cadena respiratoria. Su presencia en las membranas en concentraciones elevadas podría tener implicancia estructural (Irschik y Reichenbach, 1978). Jiménez et al. (2019) estudiaron la capacidad antioxidante de flexirrubinas obtenidas de *Chryseobacterium* sp. UTM-3T, mediante diferentes técnicas, obteniendo valores significativos, similares a xantofilas. Su capacidad antioxidante es atribuida a los grupos -OH de los fenoles y a la cadena de doble enlaces conjugados.

Indigoidinas

Las indigodinas son pigmentos azules sintetizados por muy pocas bacterias (Suttiwong et al., 2014). Por su estructura química, se clasifican como piridonas, y son sintetizados a partir de L-glutamina. Su rol en la célula podría estar asociado a la protección contra el daño oxidativo (Reverchon et. al, 2002) y actividad antimicrobiana en cepas de *Leisingera* sp. (Gromek et al., 2016). De esta manera, la producción de indigoidina proporciona a las células protección antioxidante y antibiótica, brindando una ventaja competitiva en ambientes hostiles. También se ha reportado, que este pigmento participa como señalizador interno de moléculas relacionadas con la movilidad (Reverchon et al., 2002; Cude et al., 2012).

En cuanto a su incidencia en ambientes fríos, se ha reportado que la indigoidina provee de adaptabilidad a cepas de *Vogesella* sp. en ambientes ricos en hierro de la Patagonia Andina (Day et al., 2017) y se ha detectado en el genoma de una cepa ártica de *Pseudoalteromonas fuliginea* BSW20308 la presencia de genes que codifican para su síntesis (Liao et al., 2019). Cepas antárticas pertenecientes al género *Arthrobacter* han sido identificadas como productoras de indigoidina (Sutthiwong et al., 2014).

Melaninas

Las melaninas son un grupo de pigmentos heterogéneos, cuyo rango de color va desde el amarillo al negro y se caracterizan por tener alto peso molecular. Esta clase de pigmentos se forman por la polimerización de compuestos fenólicos o indólicos (Tarangini y Mishra, 2014).

Se clasifican según su estructura molecular y color en feomelaninas (amarillas o rojas), eumelaninas (marrones o negras) y alomelaninas (negras). Debido a la gran variedad de estructuras moleculares se ha propuesto que no existe una ruta única de biosíntesis (Solano, 2014). Sin embargo, todas las vías para la síntesis de melanina implican la oxidación de compuestos aromáticos hidroxilados. Algunos de estos compuestos son sintetizados por tirosinasas, lacasas o policétido - sintasas en vías biosintéticas sujetas a regulaciones específica. Otros compuestos aromáticos hidroxilados son intermedios en vías catabólicas, como la degradación de la tirosina, y pueden acumularse como resultado de desequilibrios o interrupciones en vías de degradación (Pavan et al., 2019). Su formación se asocia a los mecanismos de resistencia contra la radiación UV - visible, protector contra agentes oxidantes y reductores, y como agente antiviral (Castro-Sowinski et al., 2007; Solano, 2014). También están implicadas en la interacción entre biofilms bacterianos y otros organismos (Pavan et al., 2019).

En cuanto a su presencia en ambientes extremos, se ha extraído y purificado melanina de una cepa psicrotolerante de *Lysobacter oligotrophicus* aislada en la Antártida (Fukuda et al., 2013). En otro estudio con la misma cepa, se identificó que la melanina producida protegió a esta cepa contra la radiación UV y los radicales ROS (Kimura et al., 2015). Por lo tanto, la biosíntesis de melaninas puede jugar un rol adaptativo en ambientes fríos con altas tasas de radiación y oxidación por radicales.

Prodigiosinas

La prodigiosina es un pigmento rojo, descrito por primera vez en 1987 por Boger y Patel en la bacteria *Serratia marscecens*. En la actualidad se describe como una familia de pigmentos rojos, que están formados por un esqueleto de pirrolil- pirrometeno que contiene un sistema de anillos 4-metoxi, 2-2 bi-pirrol (Darshan y Manonmani, 2015). Su biosíntesis está controlada por *quorum - sensing* (Thomson et al., 2000). En cuanto a su rol fisiológico en bacterias, se ha propuesto como precursor de NAD(P)H o prolina (Hood et al., 1992), almacenamiento de energía

(Ryazantseva et al., 1995), intercambiador iónico (Seganish y Davis, 2005) y agente antimicrobiano (Starič et al., 2010). Se ha estudiado su rol protector contra la radiación UV en cepas de *Vibrio* sp. DSM 14379 (Borić et al., 2011). En cuanto a bacterias pertenecientes a ambientes fríos con capacidad para producir prodigiosina, existe poca información en la

bibliografía científica, destacándose un trabajo sobre una cepa de *Janthinobacterium lividum* aislada de Alaska (Schloss et al., 2010).

Violaceína

La violaceína es un pigmento de color violeta producido como metabolito secundario. Su estructura química está constituida por tres unidades: un 5-hidroxi-indol, un oxi-indol y una 2-pirrolidona (Hoshino, 2011). Presenta un máximo de absorción en el UV en 260 nm lo que confiere protección a las células de radiaciones UV-visible (Füller et al., 2016). También se ha reportado propiedades antibacterianas, antivirales, antitumorales, entre otras (Duran et al., 2007; Soliev et al., 2011). Su producción es regulada a través de *quorum - sensing* y su presencia se relaciona con la formación de biofilms (Burt et al., 2014).

En cuanto a la producción de este pigmento en ambientes fríos, existen trabajos sobre bacterias de varias zonas del Ártico, como cepas pertenecientes a la especie *Janthinobacterium svalbardensis* (Ambrožič et al., 2013), y a los géneros *Collimonas* sp. (Hakvag et al., 2009) y *Janthinobacterium* sp. (Kim et al., 2012). Por otro lado, Mojib et al. (2010) reportaron la producción de un pigmento violeta (similar a la violaceína) en cepas de *Janthinobacterium* sp. aisladas del lago Podprudnoye, Schirmacher Oasis en la Antártida. Este pigmento inhibió el crecimiento de *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis* y cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos (Huang et al., 2012). Matz et al. (2004) le atribuyen actividad contra protozoarios. Por lo tanto, la producción de violaceína se presenta como un mecanismo adaptativo para la supervivencia en ambientes hostiles, que beneficia a aquellas bacterias que han adquirido la capacidad de sintetizarla.

Pigmento	Estructura	Función	Referencias
Carotenoides	HO HO HO HO HO HO HO HO HO HO	Protección foto-oxidativa, modulador de membranas, estabilizante	Krinsky (1978) Subczynski et al. (1992) Miller et al. (1996) Jagannadham et al (2000) Chattopadhyay et al. (2001) Fong et al. (2001) Shivaji y Prakash (2010) Tian y Hua (2017)
Flexirrubinas	H ₂ C	Fotoprotección, estabilizador de membranas, anti-oxidante	Reichenbach et al. (1974) Irschik y Reichenbach (1978) Stafsnes et al. (2013) Venil et al. (2014) Jimenez et al. (2019)

Indigoinas

RHN

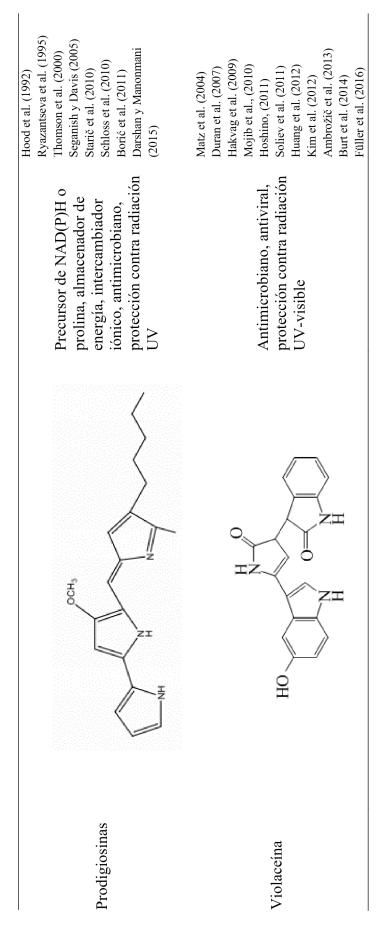
Protector contra daño oxidativo, actividad antimicrobiana

Reverchon et. al (2002)
Cude et al. (2012)
Suttiwong et al. (2014)
Gromek et al. (2016)
Day et al. (2017)
Liao et al. (2019)

Melaninas

Resistencia a la radiación UV-visible, antioxidante y antirreductora, agente antiviral

Castro-Sowinski et al. (2007) Fukuda et al. (2013) Solano (2014) Tarangini y Mishra (2014) Kimura et al., (2015)



1.3 Tecnologías de producción de pigmentos microbianos

Los microorganismos productores de pigmentos naturales son mayoritariamente bacterias, microalgas, levaduras y hongos filamentosos. La producción a través de estas fuentes se encuentra aún, con algunas excepciones, en etapas de investigación y desarrollo, en vías de aumentar la viabilidad técnica y económica de los procesos de producción (Ram et al., 2020).

La producción de pigmentos microbianos a escala industrial está limitada en gran medida por los costos de producción. Tomando como ejemplo el costo de producción del β-caroteno, uno de los pigmentos que está disponible tanto de fuentes microbianas como sintéticas, se estima que el costo de su producción, a través de una fuente natural, es aproximadamente U\$S 1000/kilo, mientras que el costo de su producción de manera sintética es la mitad (Sánchez-Muñoz et al., 2020).

En la literatura científica se encuentran diferentes modos de producción vía fermentación, dependiendo de la cepa utilizada y del pigmento a producir. Sin embargo, se destaca como aspecto común y de vital importancia, la optimización de las condiciones de fermentación, de manera de maximizar el rendimiento de producción. La optimización del proceso dependerá de varios factores como: composición del medio de cultivo, temperatura, pH, agitación, aireación, modalidad de operación, entre otros. Técnicas como el diseño estadístico de experimentos son ampliamente reportadas para realizar *screenings* y optimización para la producción de varios pigmentos (Zhai et al., 2014; Elkenawy et al., 2017).

La fermentación microbiana y la manipulación genética están siendo ampliamente estudiadas para desarrollar la producción de pigmentos microbianos a gran escala. La producción biotecnológica suele tener dos enfoques típicos: (i) la búsqueda de nuevas fuentes de pigmentos y la mejora de la capacidad de producción; (ii) realizar un mejoramiento de cepas y optimización de las condiciones de producción de las fuentes que ya se conocen y se reconocen como seguras. Los avances en el área de Ingeniería Genética tienen como objetivo crear "cell factories" para la producción de pigmentos a través de la expresión heteróloga de las vías biosintéticas de productores de pigmentos nuevos o ya reportados.

La optimización de los parámetros de fermentación es una estrategia necesaria e importante a la hora de alcanzar altos rendimientos de producción en procesos biológicos (Parekh et al., 2000).

Uno de los factores más importantes a optimizar es la composición del medio de cultivo, de manera de maximizar la producción de pigmentos. La metodología clásica de estudiar un factor a la vez sigue siendo aceptada a la hora de estudiar un proceso. Sin embargo, puede llegar a ser muy tedioso por el número de experimentos resultantes, el gasto de recursos y el tiempo consumido en completar las experiencias, entre otros. Las metodologías de diseño estadístico de experimentos y particularmente los diseños de superficie de respuesta han ganado importancia en los últimos años, en el campo de la producción de pigmentos con microorganismos. Con esta metodología, se estudia más de un factor a la vez, con un enfoque multivariado, de manera que no sólo se determina la influencia de los factores sobre las respuestas, sino también, el efecto de las interacciones de los factores y efectos cuadráticos. Además, se reduce significativamente el número de experimentos necesarios para tener resultados, siendo menos laborioso y obteniendo más resultados que con el enfoque clásico (Montgomery, 2017).

La ingeniería metabólica se ha empezado a utilizar en los últimos años, como una herramienta eficaz para el desarrollo de biocatalizadores para síntesis de productos naturales de interés. Los catalizadores microbianos proporcionan un medio práctico para obtener productos valiosos en cantidades suficientes, para que, la viabilidad económica sea satisfactoria. Muchas bacterias salvajes tienen mecanismos eficientes para la síntesis de productos naturales. Sin embargo, sus rendimientos pueden ser incrementados con la aplicación de modificaciones genéticas. Estas modificaciones pueden provocar desregulaciones en la cepa salvaje, que aumente considerablemente la producción del producto de interés. La desregulación se produce mediante manipulaciones genéticas para eludir y/o eliminar los mecanismos reguladores negativos y/o mejorar los mecanismos reguladores positivos (Sánchez-Muñoz et al., 2002). Por otro lado, la disponibilidad de microorganismos industrialmente relevantes como Escherichia coli, Corynebacterium glutamicum, Bacillus subtilis, Pseudomonas putida permite la construcción de cepas recombinantes hechas a medida mediante ingeniería metabólica, para modificar sus perfiles metabólicos de acuerdo con los propósitos de producción individuales. Dado que los microorganismos recombinantes generalmente carecen de vías que compitan con la vía expresada de forma heteróloga, los productos naturales deseados se elaboran típicamente en la célula como sustancias químicamente distintas (Chemler y Koffas, 2008).

En cuanto a las estrategias más novedosas que se han investigado en los últimos años, se encuentra el estudio basado en las respuestas bacterianas a bacterias que se encuentran en sus inmediaciones (*quorum sensing*) y a su ambiente más cercano. La investigación en esta área se ha limitado a la biomedicina. Sin embargo, tiene un gran potencial para ser usada en comunicación entre bacterias para fines industriales (Raina et al., 2011). Como se mencionó en 1.2, la producción de pigmentos bacterianos como prodigiosina y violaceína es controlada por *quorum sensing*. En este proceso, las células pueden detectar la densidad celular por la acumulación de moléculas señalizadoras, por lo que la producción de este tipo de pigmentos podría regularse por comunicación entre bacterias, pudiéndose desarrollar métodos para la superproducción de compuestos de interés.

1.4 Mercado y perspectivas

Se estima que existen aproximadamente 2500 tipos de aditivos alimentarios que se utilizan a nivel mundial, produciéndose 200 mil toneladas por año (Nagam et al., 2016). A la hora de evaluar patrones de aceptación de productos, el color es un aspecto fundamental para los consumidores.

Los pigmentos naturales están gradualmente sustituyendo a los sintéticos, especialmente en su uso como aditivos alimentarios, textiles y cosméticos, debido a que se los considera más seguro para la salud humana y son biodegradables. Existen cada vez mayor cantidad de estudios sobre los efectos adversos de la utilización de colorantes artificiales, destacándose su efecto cancerígeno, alergeno y teratogénico (Amchova et al., 2015; Feketea y Tsabouri, 2018). Además, los pigmentos naturales no solo se limitan a dar color, también tienen impactos positivos en la salud, como propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anticáncer, anti-inflamatorias, entre otras (Nagam et al., 2016).

En el año 2011, las ventas mundiales de colorantes naturales fueron estimadas en U\$S 600 millones, representando un aumento de casi un 30% respecto al año 2007 y un crecimiento anual de más del 7% (Tuli et al., 2015). En el caso particular de los carotenoides, el mercado global fue de U\$S 1,5 billones en 2017 y se estima un crecimiento a U\$S 2 billones para el 2022, con un crecimiento compuesto anual de 5,7% entre el 2017 y 2022 (Kumar et al., 2018). Este mercado se reparte según sus aplicaciones en: alimentación (26,1 %), productos farmacéuticos (9,2 %), cosmética (6,5 %), alimentación animal (34,8%) y suplementos alimenticios (23,5%). Sin embargo, entre el 80 y el 90% de la demanda de carotenoides es abastecida por los de origen sintético (Saini y Keum, 2019). Esto es debido principalmente al alto costo de producción de los

carotenoides naturales en comparación con los sintéticos, lo cual también ocurre con otro tipo de pigmentos. La capsantina, astaxantina, β-caroteno, luteína, anatto, licopeno y cantaxantina constituyen el 90% del valor del mercado total, siendo la alimentación animal (avicultura y acuicultura) los de mayor crecimiento (Saini y Keum 2018).

El mercado mundial de colorantes para la industria alimentaria crece entre un 10-15% por año (Nigam y Luke, 2016). La legislación vigente en la Unión Europea aprobó 43 colorantes alimentarios y en los Estados Unidos existen aprobados unos 30. Dentro de ellos, 6 son aditivos de origen microbiano. Los mismos se detallan en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Pigmentos microbianos de grado alimentario autorizados y disponibles en el mercado mundial (Adaptado de Nigam y Luke, 2016).

Pigmento	Naturaleza	Fuente	Color	Número E
Riboflavina	Flavina	Bacillus subtilis	Amarillo	E 101 (iii)
β-caroteno	Carotenoide	Blakeslea trispora	Anaranjado - amarillo	E 160a (ii)
β-caroteno	Carotenoide	Dunaliella salina	Anaranjado - amarillo	E 160 (iv)
Licopeno	Carotenoide	Blakeslea trispora	Rojo	E 160d (iii)
Astaxantina	Carotenoide	Haematococcus pluvialis	Anaranjado - amarillo	E 161j
Cantaxantina	Carotenoide	Haematococcus lacustris	Anarajado - rojo	E 161g

Existen actualmente en el mercado, colorantes y suplementos alimentarios basados en pigmentos naturales. El mercado de pigmentos naturales crece a rápida velocidad debido a las numerosas aplicaciones que tienen estos productos. En la Tabla 1.3 se mencionan algunos productos que se encuentran actualmente disponibles en el mercado, basados en pigmentos naturales.

Tabla 1.3. Diferentes productos industriales y suplementos nutricionales que utilizan pigmentos (Adaptado de Saini y Keum 2018).

Pigmento ^a	Nombre comercial	Uso	Empresa
β-caroteno (10 – 20%)		Suplemento alimenticio, colorante	BASF
Astaxantina (10%)	Lucantin Pink	Acuicultura	BASF
β-caroteno (10%)	Lucarotin	Acuicultura	BASF
Cantaxantina (10%)	Lucentin Red	Acuicultura y avicultura	BASF
Zeaxantina (5%)	EZ Eyes	Suplemento alimenticio	Chrysantis
y luteína (0,5%)		(salud ocular)	
Zeaxantina (10%)	EZ Eyes, suspension	Suplemento alimenticio	Chrysantis
y luteína (1%)	oleosa	(salud ocular)	
Zeaxantina (2,5%)	EZ Eyes 50/50	Suplemento alimenticio	Chrysantis
y luteína (2,5%)		(salud ocular)	
Zeaxantina (2,5%)	EZ Eyes 50/50,	Suplemento alimenticio	Chrysantis
y luteína (2,5%)	suspension oleosa	(salud ocular)	
Capsasinoides (2%)	Capsimax	Suplemento alimenticio (salud ocular)	Omniactive
Isómeros de zeaxantina y luteína	Lutemax 2020	Suplemento alimenticio (salud ocular)	Omniactive
Esteres de luteína	Lutemax	Suplemento alimenticio (salud ocular)	Omniactive
3R,3'R zeaxanthin	OmniXan	Suplemento alimenticio (salud ocular)	Omniactive
trans-β-apo- 8'-carotenal (10%)	Apocarotenal	Colorante alimentario	DSM
Astaxantina (10%)	AstaSana®	Suplemento alimenticio	DSM
Cantaxantina (10%)		Avicultura	DSM
Luteína (5 - 20%)	FloraGLO®	Suplemento alimenticio (salud ocular)	DSM

R corretore	CaroCare® Colorante alimentario y suplemento alimenticio	Colorante alimentario y	DSM
β-caroteno		DOM	
Licopeno	Redivivo®	Suplemento alimenticio	DSM
		(salud de la piel)	
Zeaxantina	Optisharp®	Suplemento alimenticio	DSM
		(salud ocular)	
Licopeno (6 – 15%)	Lycomato	Suplemento alimenticio	LycoRed
α-caroteno	AlphaBeads	Suplemento alimenticio	LycoRed
β -caroteno (7,5 – 15%)	BetaBead	Suplemento alimenticio	LycoRed
β -caroteno (7,5 – 20%)	Lyc-O-Beta	Suplemento alimenticio	LycoRed
Luteína (30% en aceite	PataCata	Suplemento alimenticio	LycoRed
de girasol)	BetaCote,		
Luteína (5 – 10%)	Lyc-O-Lutein	Suplemento alimenticio	LycoRed
Astaxantina (2%)	AstaPure	Suplemento alimenticio	LycoRed
Astaxantina	AstaReal®	Suplemento alimenticio	AstaReal
Astaxantina (5%)	BioAstin®	Suplemento alimenticio	Cyanotech
Annatto, β-caroteno, Apo		Colorante alimentario	ADM
-8-carotenal		Colorante annientario	ADM
Astaxantina (2,1% polvo		Acuicultura	NoCoast
de Paracoccus sp.)			Aquatics
Zeaxantina	ZeaGold®	Suplemento alimenticio	Kalsec
		(salud ocular)	

^a Entre paréntesis se indica el contenido del pigmento en el producto comercial.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue estudiar la producción de pigmentos a través de un proceso biológico con bacterias antárticas, y contribuir al conocimiento del potencial biotecnológico de estas poblaciones microbianas como fuente de pigmentos naturales.

2.2 Objetivos específicos

- Seleccionar e identificar cepas bacterianas productoras de pigmentos de muestras extraídas de la Isla Rey Jorge, Antártida.
- Determinar la naturaleza química de los pigmentos producidos por las bacterias seleccionadas.
- Definir las condiciones del bioproceso para la producción pigmentos para las bacterias seleccionadas (medio de cultivo, condiciones de cultivo en biorreactor).

3 Búsqueda, aislamiento e identificación de cepas productoras de pigmentos

3.1 Marco teórico

La identificación de las especies bacterianas aisladas en esta tesis se realizó través de la secuenciación del gen ARNr 16S. El ARN ribosómico (ARNr) 16S es una macromolécula comúnmente utilizada en identificación bacterianas, debido a que presenta regiones estructurales y funcionalmente conservadas en todas las bacterias, pero contiene variaciones que permiten resolver relaciones filogenéticas. Estas características lo han llevado a ser considerado un cronómetro molecular (del Rosario y Mendoza, 2004).

Los estudios filogenéticos se basan en la comparación de secuencias de nucleótidos que están relacionadas por un ancestro común. Una vez que se obtiene la secuencia de ADN del gen de interés, se realiza el alineamiento de esta con las secuencias de genes homólogos de otras cepas o especies. De esta manera se pueden detectar las diferencias entre secuencias del gen (deleciones o inserciones). Las secuencias de estudio son comparadas con secuencias existentes en bases de datos, utilizando herramientas como el BLAST en el Genebank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Las regiones de no apareamiento y huecos constituyen una hipótesis sobre cómo han divergido las secuencias del gen desde una única secuencia ancestral común. Para reconstruir la historia evolutiva a través de las secuencias, se realiza la construcción de árboles filogenéticos (Madigan et al., 2009).

Para clasificar una cepa según esta metodología, se puede utilizar un criterio de homología entre secuencias del gen ARNr 16S que está basado en la relación entre la homología de los genes de ARNr 16S y la hibridación ADN-ADN para distintas parejas de bacterias. Sobre la base de una comparación de 380 pares de cepas, Stackebrandt y Ebers (2006) sugirieron una similitud en la secuencia del gen ARNr 16S de 98,7-99,0% como criterio tentativo para realizar la asignación a nivel de especie. Sin embargo, en muchos casos, no es posible diferenciar dos especies utilizando solo el gen ARNr 16S, ya que algunas especies comparten un alto nivel de similitud entre las secuencias (99%), que no se corresponde con el porcentaje de hibridación ADN-ADN (Ash et al., 1991, Rosselló'-Mora y Amann, 2001). En consecuencia, los métodos

moleculares sencillos no siempre son suficientes para la diferenciación y detectar la variabilidad intraespecífica y pueden complementarse con técnicas de tipificación.

Pese a esta cuestión, el ARNr 16S se sigue utilizando como marcador molecular, aprovechando las capacidades de las nuevas técnicas genómicas. El rápido crecimiento de la información genómica y de secuencias del ARNr 16S ha generado cambios significativos en los métodos para la identificación de especies bacterianas y la aceleración en la asignación de especies (Valenzuela-Gonzalez et al., 2015).

Las técnicas de *fingerpriting* que utilizan PCR para la clasificación se basan en la amplificación y secuenciación, o amplificación y digestión de los fragmentos con enzimas de restricción, y electroforesis de los fragmentos amplificados. Los patrones de bandas obtenidos son específicos para la mayoría de las especies, estando presentes en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético y raramente están presentes en otros grupos. Por ello, pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo y hacer posible su identificación.

La amplificación y análisis de secuencias repetitivas dirigidos a todo el genoma bacteriano (BOX-PCR, REP-PCR, RAPD) generan información suficiente para la diferenciación de cepas altamente relacionadas. Tienen la ventaja de ser técnicas rápidas, sencillas, de bajo costo y fáciles de analizar.

La técnica de *fingerprinting* utilizada en este trabajo se denomina *Two Primers Random Amplified Polymorphic DNA* (TP-RAPD). Esta técnica se basa en la amplificación de secuencias repetitivas utilizando dos cebadores universales. Al estar en exceso en la mezcla de reacción, los cebadores pueden aparear con secuencias complementarias en el resto del genoma, generando patrones característicos. La temperatura de *annealing* es relativamente más baja que para amplificar solamente el ARNr 16S, pero lo suficientemente alta, como para que el método sea reproducible. Con este método, cepas de la misma especie presentarán el mismo patrón de bandas, mientras que cepas de diferente especie presentarán distintos patrones de bandas (Rivas et al., 2001).

En este capítulo se describe el proceso de aislamiento de bacterias productoras de pigmentos de diferentes zonas de la Isla Rey Jorge (Antártida). Los aislamientos se caracterizaron y clasificaron según sus características morfológicas a nivel macroscópico y celular, y se estudió

de forma preliminar sus temperaturas de crecimiento. Se identificaron a nivel de género a través de la secuenciación del gen ARNr 16S.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Recolección de muestras

La toma de muestras se realizó en la Península Fildes, Isla Rey Jorge (Antártida) durante la expedición organizada por el Instituto Antártico Uruguayo (I.A.U.) en diciembre de 2014. Las muestras fueron recolectadas de forma aséptica en tubos de centrífuga estériles de 50 mL y almacenadas a 4°C hasta su procesamiento. En la Figura 3.1 se detallan los puntos de recolección.

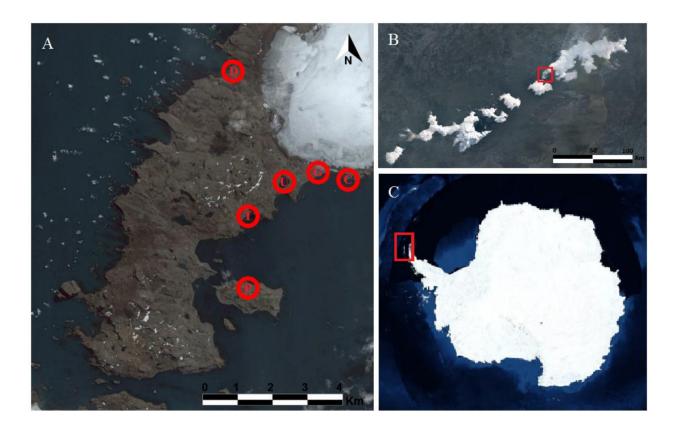


Figura 3.1. Puntos de recolección de muestras de la campaña Antártica de diciembre de 2014. (A) Puntos de muestreo en la Península Fildes: (D) Bahía Drake, (T) Tanques Rusos, (P) Isla Arley, (U) Lago Uruguay, (C) Catedral, (G) Glaciar Bellinhausen; (B) Islas Shetland del Sur (el cuadrante rojo indica la localización de la Península Fildes en la Isla Rey Jorge); (C) Antártida (el cuadrante rojo indica las Islas Shetland del Sur en el continente antártico). Imágenes tomadas de Google Earth®

3.2.2 Procesamiento de muestras, aislamiento de bacterias productoras de pigmentos y conservación

Aproximadamente 100 mg de muestra se suspendieron en 900 μL de suero fisiológico estéril (NaCl 0.9% m/v). Se cultivaron en placa diluciones seriadas de la suspensión. Las muestras de materia orgánica, sedimentos y agua de hielo se cultivaron sobre Tryptic Soy Agar (TSA, Sigma Aldrich). Para muestras de agua salada, se complementó el medio TSA con 20 g/L de un preparado comercial de sales marinas (Sigma Aldrich). La composición de los medios de cultivo se encuentra en el Anexo ii. Las placas fueron incubadas a 10°C por 7-10 días. Las colonias que desarrollaron coloración fueron seleccionadas. Para realizar el aislamiento de las cepas de interés se utilizó el estriado en placa sobre el mismo medio de aislamiento (TSA o TSA con sales). En cada estriado se verificó la pureza del cultivo por observación al microscopio. Los aislamientos puros se caracterizaron según la morfología de las colonias y la morfología celular a través de tinción de Gram.

Luego de que la pureza del cultivo fue confirmada, los aislamientos se acondicionaron en crioviales en Tryptic Soy Broth (TSB, Sigma) o TSB con sales marinas y 20% de glicerol (Sigma) para ser almacenados a -80°C.

3.2.3 Temperaturas de crecimiento de las cepas aisladas

Se realizaron cultivos en placas en medios TSA o TSA con sales marinas, según los requerimientos de las cepas. Las placas sembradas fueron incubadas a 4, 10, 15, 20, 25 y 37°C por 14 días. El crecimiento de las colonias se monitoreó cada dos días.

3.2.4 Identificación de aislamientos productores de pigmentos por técnicas moleculares

3.2.4.1 Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico de las cepas se realizó a través de un kit comercial, Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher), según las indicaciones del fabricante. El ADN se almacenó a -20°C hasta su utilización.

3.2.4.2 Clasificación de los aislamientos bacterianos

Se utilizó la técnica TP-RAPD de amplificación aleatoria de polimorfismo de ADN descripta por Rivas et al. (2001) para la clasificación de los aislamientos.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Palm-1870 Cycler TM (Corbett Research UK Ltd.) bajo el siguiente ciclo: desnaturalización inicial 3 min a 95 °C, luego 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 50 °C, 90 s a 72 °C, y un paso de extensión final 7 min a 72 °C. La mezcla de reacción se compuso de: 2U de MangoTaq Polimerasa (Bioline), 5 μL de solución buffer, MgCl₂ (2,5 mM), dNTPs (0,2 mM), cebadores universales (3 μΜ) 879F (5′-GCCTGGGGAGTACGGCCGCA-3′) y 1522R (5′-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3′), 4 μL de una dilución 1/50 de ADN genómico y agua en cantidad necesaria para completar un volumen total de 25 μL. Los perfiles de amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (2%) a 90V.

3.2.4.3 Amplificación del gen ARNr 16S y secuenciación

La amplificación del fragmento del gen ARNr 16S se realizó en un termociclador Palm-1870 Cycler TM (Corbett Research UK Ltd.) bajo el siguiente ciclo: desnaturalización inicial 3 min, 95 °C, luego 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 58 °C, 60 s a 72 °C, y un paso de extensión final 9 min at 72 °C. La mezcla de reacción conteniendo: 2,5 U de MangoTaq Polimerasa (Bioline), 10 μL de solución buffer, MgCl₂ (2 mM), cebadores universales (0.5 μM) 27F (5΄-AGAGTTTGATC MTGGCTCAG-3΄) y 1492R (5΄-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3΄), 8 μL de una dilución 1/50 de ADN genómico y agua en cantidad necesaria para completar un volumen final de 50 μL. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1%) a 70 V. La amplificación del gen se verificó por comparación del tamaño del amplicón con un marcador de peso molecular (GeneRuler Plus DNA Ladder, ThermoScientific). La secuenciación de los fragmentos amplificados fue llevada a cabo por un servicio contratado (Macrogen Inc. - Corea). La secuenciación se realizó utilizando los cebadores universales 27 F (5΄-AGAGTTTGATC MTGGCTCAG-3΄), 785F (5΄-GGATTAGATACCCTGGTA-3΄), 907R (5΄-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3΄) y 1492R (5΄-TACGGYTACC TTGTTACGACTT-3΄).

3.2.4.4 Alineamiento de secuencias e identificación

Las secuencias obtenidas se alinearon con CLUSTALW (Thomspon et al., 1994) utilizando el programa Mega 7 (Kumar et al., 2016). La secuencia resultante se analizó con

BLASTn (Altschul et al., 1990) utilizando la base de datos de secuencias de ARNr 16S para bacterias y archeas del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://blast.ncbi.nlm.nih. gov/Blast.cgi). Las secuencias resultantes fueron depositadas en la base de datos del GeneBank.

3.2.4.5 Análisis filogenético

El alineamiento múltiple de las secuencias de todos los aislamientos se realizó en MEGA 7 (Kumar et al., 2016) utilizando CLUSTALW (Thomspon et al., 1994). Las distancias filogenéticas fueron inferidas por el método de Máxima Parsimonia. El nivel de confianza en las topologías se evaluó mediante bootstraping (1000 réplicas).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Identificación de cepas productoras de pigmentos

Se aislaron 30 cepas de bacterias pigmentadas. En el Anexo se especifica para cada zona de muestreo, la naturaleza de la muestra, medio de aislamiento y número de colonias aisladas con sus características morfológicas. Muchas de estas cepas presentaron morfologías de colonia y celular similares, por lo que, para intentar clasificarlas, se sometieron a la técnica TP-RAPD.

Las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas para las 30 cepas estudiadas fueron analizadas mediante BLAST. En base al criterio de homología de secuencias mayor al 95%, las cepas fueron clasificadas en 7 géneros. En la Tabla 3.1 se presentan las características de las cepas, origen de la muestra, microorganismo con mayor homología del gen ARNr 16S con su porcentaje respectivo y el número de acceso con el cual fueron depositados en el Genbank.

Tabla 3.1. Características de las cepas aisladas y los resultados de la amplificación del gen ARNr 16S.

Cádias	N.ć	Origen	Colon	Microorganismos con mayor similitud en base de	Homología	
Código	Número de acceso		Color	datos (número de acceso)	(%)	
P7	MF288829	Agua de mar	Anaranjado	Zobellia amurskyensis KMM 3526 (NR_024826)	99,03	
P8	MF288830	Agua de mar	Anaranjado	Flavobacterium frigidarium A2i (NR_025020)	99,51	
P14	MF288831	Tierra	Anaranjado	Flavobacterium weaverense AT1042 (NR_042999)	99,32	
P15	MF288808	Algas	7	Salinibacterium amurskyense KMM	99,71	
			Amarillo	3673(NR_041932)		

P16	MF288807	Feca de pingüino	Amarillo	Salinibacterium amurskyense KMM 3673(NR_041932)	99,71
P19	MF288809	Feca de pingüino	Amarillo	Cryobacterium arcticum SK1 (NR_108605)	100
P20	MF288820	Arena	Amarillo	Arthrobacter psychrochitiniphilus GP3 (NR_104702)	99,13
P21	MF288795	Plumas	Anaranjado	Planococcus halocryophilus Or1 (JF742665)	99,81
P22	MF288819	Agua estancada	Amarillo	Arthrobacter alpinus S6-3 (NR_117254)	98,84
P23	MF288821	Algas	Amarillo	Arthrobacter cryoconiti Cr6-08 (NR_108846)	98,74
P24	MF288815	Agua deshielo	Amarillo	Arthrobacter antarcticus SPC 26 (AM931709)	99,90
P25	MF288818	Arena	Amarillo	Arthrobacter psychrochitiniphilus GP3(NR_104702)	97,38
P26	MF288817	Feca de pingüino	Amarillo	Arthrobacter antarcticus SPC 26 (AM931709)	100,00
P27	MF288816	Feca de pingüino	Amarillo	Arthrobacter antarcticus SPC 26 (AM931709)	99,90
P28	MF288810	Sedimento	Amarillo	Arthrobacter antarcticus SPC 26 (AM931709)	99,80
P29	MF288797	Sedimento	Anaranjado	Planococcus faecalis AJ003 (NR_137406.1)	99,90
P30	MF288811	Sedimento	Amarillo	Arthrobacter antarcticus SPC 26 (AM931709)	100
P31	MF288813	Sedimento	Amarillo	Arthrobacter antarcticus SPC 26 (AM931709)	99,90
P32	MF288812	Plumas	Amarillo	Arthrobacter antarcticus SPC 26 (AM931709)	99,80
P33	MF288834	Agua deshielo	Anaranjado	Flavobacterium antarcticum DSM 19726 (AY581113)	96,00
P34	MF288793	Sedimento	Anaranjado	Planococcus halocryophilus Or1 (JF742665)	99,32
P36	MF288828	Sedimento	Anaranjado	Chryseobacterium marinum NBRC 103143 (NR_114212)	98,34
P39	MF288824	Sedimento	Amarillo	Arthrobacter psychrochitiniphilus GP3 (NR_104702)	99,61
P40	MF288814	Sedimento	Amarillo	Arthrobacter antarcticus SPC 26 (AM931709)	99,90
P43	MF288822	Agua deshielo	Amarillo	Arthrobacter psychrochitiniphilus GP3 (NR_104702)	99,32
P44	MF288826	Sedimento	Amarillo	Arthrobacter alpinus S6-3 (NR_117254)	99,32
P45	MF288825	Sedimento	Amarillo	Arthrobacter psychrochitiniphilus GP3 (NR_104702)	98,93
P46	MF288792	Sedimento	Anaranjado	Planococcus halocryophilus Or1 (JF742665)	99,32
P47	MF288823	Algas secas	Anaranjado	Arthrobacter psychrochitiniphilus GP3 (NR_104702)	99,90
P48	MF288794	Alas	Anaranjado	Planococcus halocryophilus Or1 (JF742665)	99,81
P49	MF288796	Sedimento	Anaranjado	Planococcus faecalis AJ003 (NR_137406.1)	100
P50	MF288833	Sedimento	Anaranjado	Flavobacterium antarcticum DSM 19726	96,05
				(AY581113)	70,03

Las cepas pertenecientes al género *Arthrobacter* P27, P28, P31 y P40, presentaron idéntico patrón de bandas, por lo que se podría indicar que pertenecen a la misma especie. Los demás aislamientos del género presentaron diferentes patrones de bandas. Los aislamientos del género *Salinibacterium* presentaron el mismo patrón de bandas (P15 y P16). Dentro del género *Planococcus*, se pueden agrupar a los aislamientos en tres grupos. Los aislamientos P29 y P49 pertenecen a la misma especie, siendo esta distinta a los aislamientos P21 y P34 y a los

aislamientos P46 y P48. Para las cepas del género *Flavobacterium*, solamente las cepas P33 y P50 presentaron el mismo patrón de amplicones. Las cepas P8 y P14 pertenecen a otras especies dentro del género. En la Figura 3.2 se muestra a modo de ejemplo, los correspondientes patrones de bandas obtenidos para las cepas del género *Arthrobacter*. Los geles correspondientes a los otros géneros se adjuntan en el Anexo.

En la Figura 3.3 se muestran las relaciones filogenéticas de todas las cepas estudiadas basadas en las secuencias del ARNr 16S y las secuencias de referencia que presentan mayor similitud de la base de datos del NCBI. Las secuencias de ARNr 16S de las cepas y las secuencias de referencia del Genebank son concordantes con las relaciones inferidas en el árbol filogenético

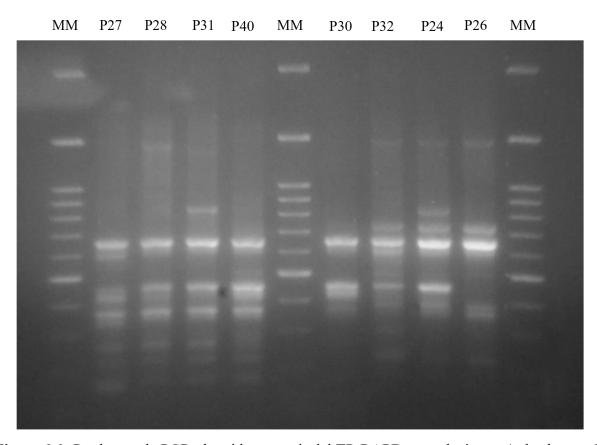


Figura 3.2. Productos de PCR obtenidos a partir del TP-RAPD para el género *Arthrobacter*. En los carriles 1, 6 y 11 se utilizó un marcador de peso molecular (MM).

Los aislamientos fueron asignados a tres phyla: Actinobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes. Los géneros afiliados a las Actinobacterias son Arthrobacter, Salinibacterium y

Cryobacterium. En la bibliografía se han reportado cepas aisladas en la Antártida pertenecientes a estos géneros. El género Arthorbacter ha sido ampliamente reportado como mesófilo, aunque varias especies fueron reportadas en ambientes fríos como glaciares, el Ártico y la Antártida (Busse et al, 2015). Particularmente, las especies aisladas en este trabajo A. antacticus y A. psychorchitiniphilus fueron previamente aisladas en sedimentos antárticos y en heces de pingüino. La especie A. alpinus ha sido reportada en suelo alpino y presentando colonias con coloración amarilla (Zhang et al., 2010). Los géneros Salinibacterium y Cryobacterium también han sido previamente reportados en la Antártida e identificados como pigmentados (Shin et al., 2012; Leiva et al., 2015; Lee et al., 2016). Sin embrago, no hay estudios previos acerca de la naturaleza de estos pigmentos.

El phylum *Bactereroidetes* está representado por los géneros *Flavobacterium* y *Zobellia y* el phylum *Firmicutes* cuenta con la presencia del género *Planococcus*. La presencia de estos géneros ya ha sido estudiada en la Antártida y han sido reportados previamente como pigmentados (Kim et. al, 2015; Yi y Chun, 2006).

Según los porcentajes de homología en las secuencias del gen ARNr 16S, presentados por los aislamientos P25, P33, P36 y P50, con respecto a las secuencias del Genebank, estas podrían ser nuevas especie que asignar al género *Arthrobacter* y *Flavobacterium*.

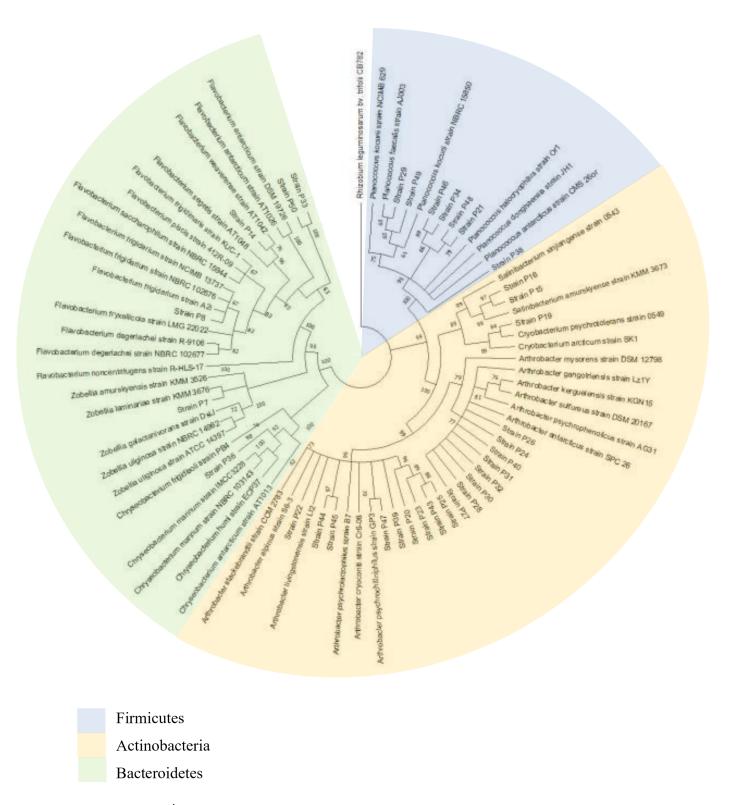


Figura 3.3. Árbol filogenético construido en base a las secuencias del ARNr 16S de los aislamientos de estudio. El árbol fue construido empleando el método de Máxima Parsimonia. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) se indican en los nodos, exceptuando los valores menores a 50.

3.3.2 Estudio de las temperaturas de crecimiento

Todas las cepas aisladas crecieron entre 4 y 25°C. No se detectó crecimiento a 37°C. Por esta razón, todas las cepas aisladas en este trabajo pueden clasificarse como psicotrofas o psicrotolerantes, ya que crecieron a bajas temperaturas, su temperatura óptima de crecimiento fue mayor a 15°C y su temperatura máxima de crecimiento mayor a 20°C. Se diferencian así de los microorganismos psicrófilos, que son aquellos que presentan una temperatura óptima de crecimiento de 15°C o inferior, una temperatura máxima de crecimiento de 20°C, y una mínima de 0°C o menor (Moyer y Morita, 2007).

3.4 Conclusiones

Se clasificaron 30 cepas bacterianas aisladas de diferentes puntos de la Península Fildes.

Las cepas se clasificaron en tres phylum. La mayoría de los aislamientos pertenecieron al phylum *Actinobacteria*, de los cuales 17 correspondieron al género *Arthrobacter*, dos a *Salinibacterium* y uno a *Cryobacterium*. Seis de los aislamientos se clasificaron dentro de los géneros *Zobellia*, *Chryseobacterium* y *Flavobacterium*, correspondientes al phylum *Bacteroidetes*. Los restantes cuatro aislamientos pertenecieron al género *Planococcus* correspondiente al phylim *Firmicutes*. Todos estos géneros ya han sido previamente reportados en la Antártida. Todas las cepas aisladas se clasificaron como psicrotolerantes.

4 Identificación de pigmentos bacterianos

4.1 Marco teórico

La identificación de los pigmentos producidos por los aislamientos bacterianos se apoyó en técnicas que incluyeron la espectrofotometría, reacciones químicas de reconocimiento de grupos funcionales, cromatografía líquida y espectrometría de masas.

Las características espectroscópicas proporcionan una primera aproximación para la caracterización e identificación de los pigmentos. El espectro UV-visible brinda información sobre el cromóforo de la molécula, pero no nos dice nada acerca de los grupos funcionales (a excepción de los grupos carbonilos conjugados que forman parte del cromóforo). El término "cromóforo" se refiere a la parte de la molécula formada por los dobles enlaces conjugados que contienen la deslocalización de electrones (pi) y que genera la absorción de luz en la región visible (Britton et al., 1994).

En base a los espectros UV-visible de los extractos crudos, se determinó primariamente que todos los extractos estaban compuestos por pigmentos del tipo carotenoide. Debido a esto, se detalla a continuación una breve descripción de sus características químicas y de las técnicas utilizadas para identificar este tipo particular de pigmentos.

4.1.1 Métodos para la identificación de carotenoides

Los carotenoides son compuestos clasificados como isoprenoides. Están formados por unidades de isopreno, de tal forma que la unión de cada unidad se invierte en el centro de la molécula.

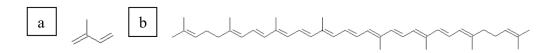


Figura 4.1. a) Molécula de isopreno b) molécula de licopeno, formada por la condensación de 8 unidades de isopreno.

En cuanto al número de átomos de carbono que componen la molécula y de doble enlaces conjugados, los carotenoides típicos contienen 40 carbonos (C40), y son formados por la condensación de 8 unidades de isoprenoides, como se muestra en la Figura 4.1. Sin embargo, también pueden encontrarse en la naturaleza, carotenoides de 30, 45 o 50 carbonos (C30, C45, C50) (Rodríguez - Concepción et al., 2018).

Los carotenoides se clasifican en dos grupos, según los elementos químicos que los componen. Los carotenos son aquellos carotenoides que están compuestos por carbono e hidrógeno, y las xantofilas contienen además oxígeno. Las xantofilas más comunes contienen grupos hidroxilos, carbonilos y epóxido. Los carotenoides también pueden ser clasificados como cíclicos o acíclicos dependiendo de si poseen o no en su estructura anillos terminales. Los grupos terminales más comunes que se encuentran se presentan en la Figura 4.2.

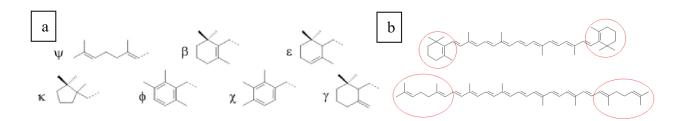


Figura 4.2. a) Grupos terminales presentes en los carotenoides (Rodríguez - Concepción et al., 2018), b) moléculas de β -caroteno (arriba) y licopeno (abajo) con sus grupos terminales indicados por círculos rojos, grupos β y Ψ respectivamente.

Debido a la presencia de dobles enlaces en las moléculas de carotenoides, existen múltiples configuraciones que derivan en la existencia de isómeros geométricos (*cis - trans* o Z - E). La mayoría de los isómeros naturales son de la forma all – *trans*, la cual es la más estable (a excepción de los carotenoides acíclicos licopeno, fitoeno o fitoflueno). Por otro lado, la presencia de centros quirales en algunas moléculas da lugar a la ocurrencia de isómeros ópticos, por ejemplo, la zeaxantina, de la cual se conocen los isómeros (3R-3'R)-zeaxantina, (3R-3'S)-zeaxantina (mesozeaxantina) y (3S-3'S)-zeaxantina.

La principal característica de los carotenoides es su sistema de dobles enlaces conjugados, que son los responsables de que presenten bandas de absorción en el espectro electromagnético correspondiente a la región visible y en algunos casos en ultravioleta. La mayoría de los carotenoides absorben entre los 400 y 500 nm, siendo esta la causa de su

coloración que abarca desde los amarillos a los rojos, aunque la coloración también se puede ver influida por la concentración en la que estén presentes y de la interacción que pueden presentar con otros compuestos (Mínguez-Mosquera et al., 1997).

Los carotenoides pueden identificarse primariamente debido a sus característicos máximos en la región UV-visible. La información más relevante que puede obtenerse del espectro es la siguiente:

- 1- La posición de los máximos de absorción ($\lambda_{máx}$) brinda información estructural, ya que son determinados por el cromóforo de la molécula, siendo función del número de dobles enlaces conjugados. En líneas generales, un incremento en este número provoca un desplazamiento a longitudes de onda mayores, del entorno de 20-22 nm por cada nuevo doble enlace conjugado, aunque modificaciones en la molécula como las ciclaciones modifican esta tendencia.
- 2- La intensidad de la absorción, expresada como absorbancia (A), está relacionada con la estructura y concentración de los carotenoides, siendo el criterio base para la cuantificación.
- 3- Para la mayoría de los carotenoides el espectro posee tres máximos de absorción. Este efecto, denominado estructura fina (% III/II), difiere entre las moléculas y brinda información para la identificación. La estructura fina representa la altura de la banda de absorción de la longitud de onda mayor (III) como porcentaje de la altura de la banda intermedia (II), considerando como base el mínimo entre estos picos, como se muestra en Figura 4.3.

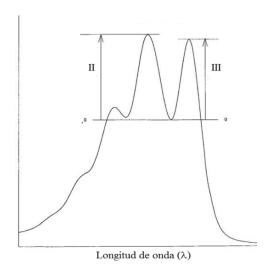


Figura 4.3. Estructura fina del espectro de absorción de un carotenoide. Adaptado de Lu et al. (2001).

La caracterización de los extractos continúa con la realización de reacciones de identificación de los grupos funcionales. Estas reacciones se pueden efectuar a partir del extracto crudo o pretratado, para el caso de que existan interferencias (moléculas como lípidos, otros pigmentos, etc.). Además, los carotenoides pueden estar asociados a lípidos, azúcares, proteínas, entre otros, que pueden cambiar sus propiedades físicas (Rodríguez-Concepción et al., 2018). A continuación, se mencionan las pruebas realizadas en este trabajo.

Saponificación

La saponificación constituye una herramienta que permite obtener un extracto concentrado de pigmentos libre de interferencias como lípidos, flexirrubinas, etc. Se lleva a cabo en medio básico, mediante la reacción de un grupo éster y un hidróxido, obteniéndose un alcohol y la sal del ácido orgánico correspondiente. Con este método se logra, además, liberar carotenoides esterificados con ácidos grasos y por lo tanto facilitar el análisis de los perfiles (Mínguez Mosquera et al., 1997).

Hidrólisis ácida

Los glicósidos de carotenoides pueden ser hidrolizados químicamente con una solución de HCl en metanol. De esta manera, se logra la separación del azúcar del carotenoide, resultando en un cambio estructural que puede reflejarse en los perfiles cromatográficos (Mínguez Mosquera et al., 1997).

Reducción

Para deducir la presencia de grupos carbonilo, se emplea una reacción de reducción a alcoholes con hidruros metálicos (NaBH₄ que actúa como agente reductor el ion hidruro). La reducción se manifiesta en el espectro de absorción por un descenso en la absorbancia y un desplazamiento hipsocrómico de los máximos de absorción (Mínguez Mosquera et al., 1997).

Espectrometría de masas (MS)

La aplicación de MS para el análisis de carotenoides permite distinguir entre carotenoides co-eluyentes, determinar sus pesos moleculares y detectar grupos funcionales en la molécula.

Los patrones de fragmentación resultantes del análisis dependen de las propiedades físicas y químicas de los analitos y de la técnica de ionización que se aplica en el análisis (Gao et al., 2005). Para el análisis de carotenoides se utilizan generalmente métodos de ionización suaves, como la ionización a presión atmosférica (APCI). En este caso, la fase móvil utilizada, los modificadores agregados (ácidos, bases, sales), las condiciones de análisis (temperatura, flujo de aire, energía de colisión, etc.) (Würtinger y Oberacher, 2012) y la matriz donde se encuentra el analito (Chiu et al, 2010) afectan el patrón de fragmentación. Por lo tanto, el espectro de masas obtenido para un cierto compuesto puede no coincidir exactamente con espectros de referencia publicados, observándose diferencias en la presencia de ciertos fragmentos o en sus intensidades. Para estos casos, los análisis químicos complementarios son fundamentales en la identificación.

El método de ionización más utilizado para el análisis de carotenoides es APCI, debido a su mayor sensibilidad (Rivera et al., 2014). En este caso, todos los carotenoides analizados presentarán el ion [M+H]⁺, el cual indica el peso molecular.

En este capítulo se describe la metodología para la identificación química de los pigmentos producidos por las cepas aisladas. El estudio se apoyó en pruebas químicas, análisis cromatográficos y espectrometría de masas. Los pigmentos producidos fueron carotenoides y flexirrubinas. Se identificó por primera vez la naturaleza química del pigmento producido por una cepa del género *Cryobacterium*. En base a estos resultados, se realizó una selección primaria de las cepas a estudiar, teniendo en cuenta el potencial interés biotecnológico de los pigmentos producidos. Se estudió la producción de zeaxantina en las cepas de los géneros *Flavobacterium* y *Chryseobacterium*, seleccionado a *Flavobacterium* sp. P8 para continuar los estudios.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Cultivo de cepas para identificación de carotenoides

Las cepas seleccionadas se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 1 L con 250 mL de medio de cultivo en un agitador orbital (New Brunswich Scienitfic, E.U.) a 15°C y 200 rpm. Los medios de cultivo utilizados fueron TSB o TSB suplementado con 20 g/L de sales marinas (Sigma) según el origen del aislamiento (sección 3.1.2). Luego de 48 h de cultivo, se separó la biomasa del medio en una centrífuga (Thermo Scientific, IEC CL30R), a 6500 rpm, 4°C por 15

min. Se descartó el sobrenadante y la biomasa se lavó con agua destilada. Las muestras se congelaron a -80°C, y se liofilizaron (Liofilizador VirTis BenchTop 2K Freeze Dryer, SP Industries Inc.).

4.2.2 Extracción de los pigmentos

El extracto crudo de pigmentos fue obtenido a partir de la extracción de la biomasa con un solvente orgánico. Para ello, se agregó 1 mL de metanol a aproximadamente 0,1 g de biomasa liofilizada. Se separó el extracto metanólico por centrifugación (centrífuga Eppendorf, Centrifuge 5804R), a 4°C, 5000 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se repitió el procedimiento hasta decoloración total de la biomasa (aproximadamente 3 extracciones). Se combinaron los sobrenadantes de las extracciones y se evaporó el solvente bajo corriente de N₂. El extracto crudo seco se guardó a - 20°C, bajo atmósfera de N₂ hasta su utilización.

4.2.3 Análisis de los extractos por cromatografía líquida (HPLC-DAD)

El extracto crudo seco se disolvió en acetona y se analizó utilizando un cromatógrafo eWaters 2695 Alliance con un detector de arreglo de diodos (DAD) Waters 2998 y controlador Empower2 (Waters Cromatografía, SA, Barcelona, España). Para la separación de los componentes del extracto se utilizó una columna de fase reversa C18 (200 mm x 4,6 mm, diámetro de partícula 3 μm, Mediterránea SEA18, Teknokroma, Barcelona, España) acoplada a una precolumna del mismo material. La detección se realizó a 450 nm, con la adquisición en línea de los espectros de absorción entre 330 y 700 nm con resolución de 1,2 nm.

4.2.4 Espectrometría de masas (LC-MS (APCI+))

Los análisis de espectrometría de masas fueron realizados en un sistema HPLC-DAD-APCI-MS Dionex Ultmate 3000RS U-HPLC (Thermo Fisher Scientific) con un detector DAD acoplado a un espectrómetro de masas TOF de alta resolución micrOTOF-QII (UHR-TOF) con cuadrupolo (qQ)-TOF (Bruker Daltonics), equipado con una fuente de ionización a presión atmosférica (APCI). Las condiciones cromatográficas fueron las mismas a las descritas en 4.2.3. El espectro de masas se adquirió en modo de disociación inducida por colisión, obteniendo los espectros MS y MS/MS simultáneamente. El control del

equipo se realizó a través del software Bruker Daltonics Hystar 3.2, y el procesamiento de datos, a través del Bruker Daltonics DataAnalysis 4.0.

4.2.5 Pruebas químicas

Presencia de flexirrubinas

Se adicionó unas gotas de KOH metanólico al 20% a los extractos de pigmentos (Fautz y Reichenbach, 1980). Un cambio de coloración reversible (con agregado de ácido, HCl 0,1 M) del extracto a tonalidad roja-amarronada indica un resultado positivo presuntivo a la presencia de flexirrubinas, como se muestra en la Figura 4.4.

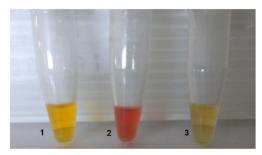


Figura 4.4. Desarrollo de color en prueba con KOH 20% en metanol (1) extracto crudo, (2) extracto con el agregado de solución potásica, (3) extracto neutralizado.

Saponificación

El extracto crudo seco se disolvió en 2 mL de éter etílico y 0,5 mL de KOH 20% en metanol. Se dejó reposar 1 h a temperatura ambiente, agitando cada 10 min y se realizó una partición de fases por el agregado de agua destilada. Se centrifugó a 4°C, 5000 rpm por 5 min. Luego de retirar la fase acuosa se realizaron enjuagues con agua destilada hasta neutralidad de la fase orgánica y se evaporó el solvente en corriente de N₂. El extracto seco se disolvió en acetona (entre 50 - 100 μL) y se analizó según 4.2.3.

Hidrólisis de glicósidos

El extracto crudo seco se disolvió en 1 mL de HCl 5% en metanol y se calentó a 60°C por 30 min. Luego, se agregó 3 mL de éter y 5 mL de una solución de NaCl saturada para separar la mezcla en 2 fases. Se centrifugó a 4°C, 5000 rpm por 5 min. Luego de retirar la fase acuosa se realizaron enjuagues con agua destilada hasta neutralidad de la fase orgánica y se evaporó el

solvente en corriente de N_2 . El extracto seco se disolvió en acetona (entre 50 - 100 μL) y se analizó según 4.2.3.

Reducción de grupos carbonilo

El extracto seco se disolvió en 1 mL de etanol absoluto. Se agregaron cristales de NaBH₄ y se dejó reaccionar por 15 min. Se centrifugó a 4°C, 5000 rpm por 5 min. Luego de retirar la fase acuosa se realizaron enjuagues con agua destilada hasta neutralidad de la fase orgánica y se evaporó el solvente en corriente de N₂. El extracto seco se disolvió en acetona (entre 50 - 100 μL) y se analizó según 4.2.3.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Identificación de pigmentos bacterianos

La caracterización primaria de los extractos de pigmentos se realizó en base a los espectros UV-visible de los extractos metanólicos crudos, los cuales se muestran en la Figura 4.5. En todos los casos, se presentaron tres máximos de absorción en el entorno a los 450 nm, lo cual es característico de compuestos carotenoides (Britton et al., 1995). Con esta primera información, se continuó con las pruebas químicas para determinar grupos funcionales, cromatografía líquida de alta eficiencia y espectrometría de masas.

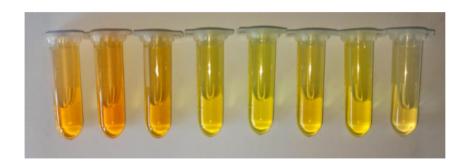


Figura 4.5. Extractos metánólicos de las cepas estudiadas. De izquierda a derecha: *Planococcus* sp. P48, *Flavobacterium* sp. P8, *Flavobacterium* sp. P33, *Chryseobacterium* sp. P36, *Arthrobacter* sp. P40, *Flavobacterium* sp. P14, *Cryobacterium* sp. P19, y *Salinibacterium* sp. P15.

En la Figura 4.6 y Figura 4.7 se muestran los cromatogramas obtenidos a 450 nm, con los respectivos espectros UV-visible para cada compuesto. En la Tabla 4.1 se presentan, de forma resumida, los resultados obtenidos en los perfiles cromatográficos y espectrometría de masas. Los resultados de la identificación se detallan a continuación, discriminados por género bacteriano.

Género Arthrobacter

Los extractos de las cepas de Arthrobacter sp. presentaron un cromatograma con cuatro picos. Los tres primeros (en orden de elución), presentaron espectros UV-visibles idénticos, con máximos en 417, 442 y 471 nm. Esta característica se corresponde con la presencia de un cromóforo de nueve dobles enlaces conjugados. Los fragmentos moleculares obtenidos a través de MS-APCI (+) indican que los picos 1 y 2 corresponden a derivados glicosilados de decaprenoxantina. Para el caso del diglucósido, el espectro de masas presentó un fragmento a m/z de 1029,6 correspondiente al ion molecular [M+H-180]⁺ y a la fórmula C₆₂H₉₂O₁₂. Para el monoglucósido de decaprenoxantina, el fragmento correspondiente al ion molecular se encuentra a un m/z de 867,6 correspondiente a la fórmula C₅₆H₈₂O₇. Ambos compuestos presentan, además, los fragmentos [M+H-18]⁺ y [M+H+18]⁺ lo que indican la presencia de grupos hidroxilo y moléculas de glucosa. El pico 3 presentó el ion molecular en m/z 705,6 correspondiendo a la fórmula C₅₆H₈₂O₇, la cual se asigna a la decaprenoxantina. En este caso, también están presentes los fragmentos correspondientes a la pérdida de agua en m/z 687,5 ([M+H-18]⁺), indicando la presencia de un grupo hidroxilo, y el fragmento en m/z 595,5 ([M+H-18-92]⁺), que indica la pérdida de agua y de tolueno. El patrón de fragmentos obtenido por MS-APCI (+) para decaprenoxantina concuerda con el reportado por (Giufrida et al., 2016). El cuarto pico presente en el cromatograma fue identificado como licopeno, debido a que presentó el ion molecular [M+H]⁺ a m/z 537,4 que corresponde con la fórmula C₄₀H₅₆, el espectro UV-visible presenta tres máximos en 447, 474 y 506 nm y presentó coelución con el patrón de licopeno de referencia. La presencia de licopeno en este extracto es esperable, ya que la biosíntesis de los carotenoides C50 se realiza a partir de la elongación del licopeno, por la adición de dos unidades de DMAPP (C5) en los carbonos 2 y 2', y la hidroxilación de sus extremos y ciclación (Heider et al., 2014).

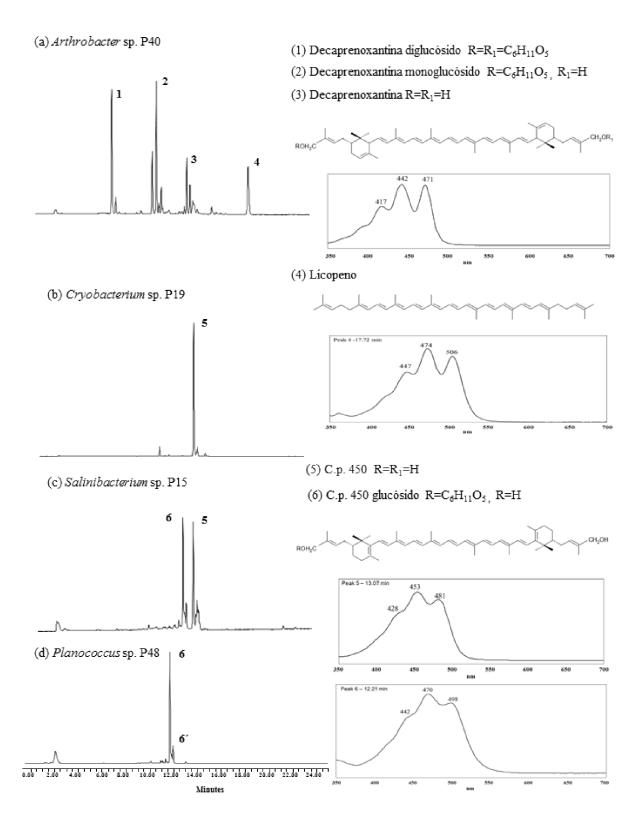


Figura 4.6. Cromatogramas obtenidos en HPLC-DAD a 450 nm y espectros UV-visible de los carotenoides para las cepas de *Arthrobacter, Salinibacterium, Cryobacterium* y *Planococcus*.

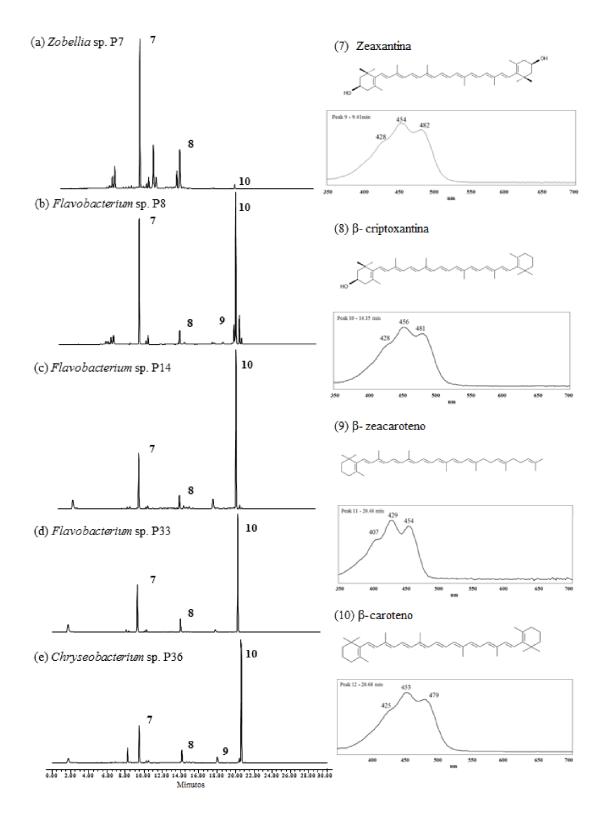


Figura 4.7. Cromatogramas obtenidos en HPLC-DAD a 450 nm y espectros UV-visible de los carotenoides para las cepas de *Flavobacterium* y *Chryseobacterium*.

Tabla 4.1. Carotenoides identificados en los extractos bacterianos, perfiles cromatográficos y patrón de espectrometría de masas.

Cepa	t _R (min)	Carotenoide	λ _{max} (nm)	Patrón APCI(+) MS
Arthrobacter sp. P40	6,36	Decaprenoxantina diglucósido	417, 442, 471	1029,6 [M+H] ⁺ , 1011,6 [M+H-18] ⁺ , 849,6 [M+H-180] ⁺
	10,07	Decaprenoxantina monoglucósido	417, 442, 471	867,6 [M+H] ⁺ , 849,6 [M+H-18] ⁺ , 687,5 [M+H-180] ⁺
	12,61	Decaprenoxantina	417, 442, 471	705,6 [M+H] ⁺ , 687,5 [M+H-18] ⁺ , 595,5[M+H-18-92] ⁺
	17,72	Licopeno	447, 474, 506	537,4 [M+H] ⁺
Cryobacterium sp. P19, Salinibacterium sp. P15, Planococcus sp. P48	13,07	C.p. 450	428, 453, 481	705,6 [M+H] ⁺ , 687,5 [M+H-18] ⁺ , 669,5 [M+H-18-18] ⁺ , 613,5 [M+H-92] ⁺
	12,21	C.p. 450 glucósido	442, 470, 498	849,6 [M+H-18] ⁺ , 831,6 [M+H-18-18] ⁺
Flavobacterium sp. P33, Clnyseobacterium sp. P36 y Zobellia sp. P7	9,41	Zeaxantina	428, 454, 482	569,4 [M+H] ⁺ , 551,4 [M+H-18] ⁺ , 477,4 [M+H-92] ⁺
	14,15	β-Criptoxantina	428, 456, 481	553,4 [M+H] ⁺ , 535,4 [M+H-18] ⁺ , 461,4 [M+H-92] ⁺
	20,68	β-Caroteno	425, 453, 479	537,4 [M+H] ⁺
	20,48	β-Zeacaroteno	407, 429, 454	

Género Cryobacterium

El perfil cromatográfico del extracto metanólico de *Cryobacterium* sp. presentado en la Figura 4.6, muestra un solo componente, cuyo espectro UV-visible tiene tres máximos a 428, 453 y 481 nm.

La prueba de reducción de grupos carbonilo arrojó resultado negativo. El espectro de masas presentó para este componente, el ion molecular [M+H]⁺ en m/z 705,6 que se corresponde con la fórmula C₅₀H₇₂O₂. También presentó otros fragmentos: m/z 687,5 (correspondiente con [M+H-18]⁺), m/z 669, 5 (correspondiente con [M+H-18-18]⁺), y m/z 613,5 (correspondiente con [M+H-92]⁺). Estos fragmentos indican la presencia de dos grupos hidroxilo y la pérdida de tolueno se corresponde con la presencia de una extensa conjugación en la molécula (Rivera et al., 2014). Las características del espectro UV-visible y del espectro de masas corresponden con los patrones reportados para el carotenoide C.p. 450 (Britton et al., 1994). Este carotenoide ha sido previamente reportado en cepas de *Cornybacterium poinsettiae* (Britton et al., 1985), *Cornybacterium glutamicum* (Heider et al., 2014) y *Dietza* sp. CQ4 (Tao et al., 2007), siendo para esta última propuesta una ruta de síntesis de C.p. 450 y C.p. 450 glicosilado. Sin embargo, no existe en la bibliografía científica reportes sobre la naturaleza de los carotenoides producidos por cepas del género *Cryobacterium*.

Género Salinibacterium.

El cromatograma de *Salinibacterium* sp. presenta dos picos. El primero fue identificado como C.p. 450 glicosilado. El espectro UV-visible presenta tres máximos a 442, 470 y 498 nm. El extracto resultante de la prueba de reducción de grupos carbonilo fue analizado por HPLC. Luego de la reducción, se observó la aparición de un compuesto a los 5,31 min. Su espectro UV-visible presentó un hombro en 439 nm y dos máximos en 470 y 499 nm. A tiempo 5,88 min apareció el isómero *cis* de este compuesto, presentando su espectro UV-visible un máximo característico en 358 nm, un hombro a 436 nm y dos máximos a 463 y 490 nm (presentaron un corrimiento hipsocrómico de 7 - 9 nm, comparado con los máximos del isómero *trans*). Este resultado indicó la presencia de grupos carbonilo en la molécula.

El patrón de fragmentación en el espectrómetro de masas presentó dos fragmentos, a m/z 849,6 y 831, los cuales pueden ser asignados a [M+H-18]⁺ y [M+H-18-18]⁺ respectivamente. Estos fragmentos indicaron la presencia de dos grupos hidroxilo en la molécula. En este caso, no

se detectó el ion molecular que correspondería a m/z 867,5 lo cual está de acuerdo con lo reportado por Britton et al. (1995). El segundo pico del cromatograma correspondió a C.p. 450, presentando las mismas características que las mencionadas anteriormente para el género *Cryobacterium*. Para el caso de *Salinibacterium*, las cepas de este género han sido anteriormente reportadas como pigmentadas (Leiva et al., 2015). Sin embargo, no existen reportes de la identificación química de sus pigmentos.

Género Planococcus.

El extracto de *Planococcus* sp. presentó dos pigmentos principales, como se muestra en la Figura 4.6. El primer compuesto presentó las mismas características que las anteriormente mencionadas para el glicósido de C.p. 450, exhibiendo el mismo espectro UV-visible, tiempo de retención y patrón de fragmentación, así como el mismo resultado en la prueba de reducción de grupos carbonilo. El segundo pico, se identificó como el isómero *cis* de C.p. 450, ya que los máximos de absorción presentan un corrimiento hipsocrómico de 6 nm, comparado con los máximos del isómero *trans* y la presencia de un pico *cis* a 357 nm. Varias cepas del género *Planococcus* han sido reportadas como pigmentadas, aunque la naturaleza química de los pigmentos producidos es escasa. Se ha reportado para cepas como *P. maritimus* la producción de metil-glucosil-3,4-dehidro-apo-8'-licopenato (Shindo et al., 2008) y para *P. faecalis* el carotenoide ácido glicosil-4,4'-diaponeurosporeno-4'-ol-4-oico, como carotenoide mayoritario (Kim et al., 2015). Ambos compuestos corresponden a los carotenoides de 30 carbonos (C30). En este trabajo, sin embargo, se han identificado dos compuestos de 50 carbonos (C50), evidenciando la diversidad de carotenoides presentes en este género.

Géneros Flavobacterium, Chryseobacterium y Zobellia.

Para estos tres géneros, los perfiles cromatográficos fueron similares. Se detectó la presencia de flexirrubinas en el extracto de *Zobellia* sp. P7 y en el de *Flavobacterium* sp. P8. Para estos casos, se saponificaron los extractos para su remoción. Las flexirrubinas son pigmentos que han sido reportados previamente en estos géneros (Bernadet y Bowman, 2006). Son pigmentos que han sido considerados como marcadores quimio-taxonómicos, ya que están raramente distribuidos entre las especies bacterianas y cada género produce, en la molécula, una modificación característica (Reichenbach et al., 1974).

Todos los extractos estudiados para estos géneros presentaron zeaxantina, β-criptoxantina y β-caroteno. Los espectros de masas para estos tres compuestos presentaron como fragmentos mayoritarios el ion molecular a m/z 569,4 (C₄₀H₅₆O₂), 553,4 (C₄₀H₅₆O) y 537,4 (C₄₀H₅₆) respectivamente. Los espectros de masa de zeaxantina y β-criptoxantina, presentaron además los fragmentos característicos [M+H-18]⁺ y [M+H-92]⁺, los cuales corresponden a la pérdida de un grupo hidroxilo y tolueno, respectivamente. La identificación se complementó además con comparación de espectros UV-visible y coelución con estándares. Las cepas *Flavobacterium* sp. P8, *Flavobacterium* sp. P14 y *Chryseobacterium* sp. P36 presentaron además un compuesto identificado como β-zeacaroteno, identificado tentativamente por comparación con estándares y datos en literatura. Los carotenoides identificados en los extractos de estos géneros son parte del metabolismo bioquímico de producción de zeaxantina, en donde la hidroxilación de β-caroteno y β-criptoxantina resulta en la formación de zeaxantina. El β-zeacaroteno resulta de la ciclación del neurosporeno, produciendo γ-caroteno previo a la síntesis de β-caroteno (Britton et al., 1977).

4.3.2 Selección de la cepa de trabajo

El principal aspecto que se tuvo en cuenta para la selección de la cepa de trabajo fue el tipo de carotenoide producido y su potencial aplicación e interés comercial. En la sección 4.3.1 se determinó que los carotenoides producidos por las cepas estudiadas fueron de 40 carbonos (C40) y de 50 carbonos (C50).

Se seleccionó una cepa productora de carotenoides C40, en particular de zeaxantina, para continuar los estudios. La zeaxantina es una xantofila, que a diferencia del β-caroteno y el licopeno, es sintetizada naturalmente solo por algunas variedades de bacterias, cianobacterias y microalgas (Zhang et al., 2018). Además, existen múltiples estudios de producción de β-caroteno y licopeno reportados en la bibliografía (Goksungur, et al., 2002; Mantzouridou, et al., 2004; Sevgili y Erkmen, 2019; Wang et al., 2012a; Wang et al., 2012b). Sin embargo, existen pocos reportes de producción de zeaxantina a partir de bacterias (Bhosale et al., 2004; Masetto et al., 2001; Alcantra y Sanchez, 1999), lo que lo hace atractivo para su estudio. Por lo tanto, se estudió el crecimiento y producción de zeaxantina de las cepas pertenecientes al género *Flavobacterium* sp. (P8, P14, P33) y la cepa *Chryseobacterium* sp. (P36), con el fin de seleccionar una cepa. Los ensayos se realizaron según 4.2.1, en medio TSB para todas las cepas, a excepción de

Flavobacterium sp. P8 que se cultivó en TSB con sales marinas, debido al origen de las cepas. Los resultados de obtenidos se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Resultados de las fermentaciones para las cepas preseleccionadas a 15°C y 200 rpm.

Como	Biomasa	Tiempo	Zeaxantina	Q zeaxantina	Qzeaxantina
Сера	(g/L)	(h)	(mg/g)	(mg/gh)	(mg/Lh)
Flavobacterium sp. P8	$2,1 \pm 0,2$	20	$0,31 \pm 0,02$	0,016	0,033
Flavobacterium sp. P14	$2,5\pm0,8$	40	$0,\!36\pm0,\!04$	0,009	0,023
Flavobacterium sp. P33	$3,0 \pm 0,1$	40	$0,\!37 \pm 0,\!05$	0,009	0,028
Chryseobacterium sp. P36	$3,3 \pm 0,4$	40	$0,\!33\pm0,\!01$	0,008	0,027

q_{zeaxantina}: Velocidad específica de producción de zeaxantina, Q_{Zeaxantina}: Productividad volumétrica de zeaxantina

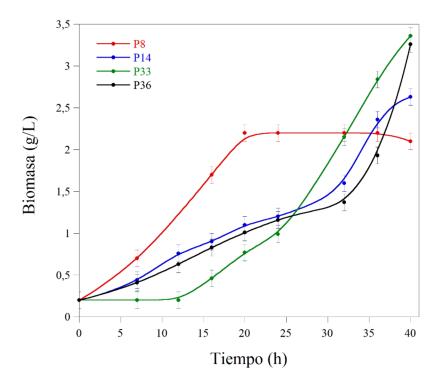


Figura 4.8. Perfiles de biomasa en función del tiempo, para las cepas preseleccionadas cultivadas a 15°C y 200 rpm.

La concentración máxima de biomasa alcanzada fue del mismo orden en todos los casos. Los perfiles de biomasa en función del tiempo se presentan en la Figura 4.8. Sin embargo, la cepa *Flavobacterium* sp. P8 presentó una velocidad de crecimiento mayor, alcanzando la fase

estacionaria a las 20 h de fermentación, mientras que las otras cepas la alcanzaron a las 40 h. El contenido de zeaxantina por gramo de biomasa fue similar para las cuatro cepas seleccionadas.

Los valores obtenidos (0,31 – 0,37 mg/g) son atractivos, si se los compara con valores reportados para bacterias productoras de carotenoides en matraces, con algunas excepciones. Se han publicado contenidos de zeaxantina entre 0,0007 y 0,0012 mg/g en medios optimizados con cultivos de *Flavobacterium multivorum* (Bhosale et al., 2004). Sowmya y Sachindra (2015) han alcanzado una concentración de biomasa de 4,4 g/L con un contenido de zeaxantina de 0,166 ± 0.013 mg/g en cultivos de *Formosa* sp. KMW en medio marino a las 120 h de cultivo. Para el caso de *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens* TD-ZX30^T se ha reportado un rendimiento de zeaxantina de 0,910 mg/g (Asker et al., 2007). El mayor rendimiento de zeaxantina, reportado hasta el momento, para una cepa salvaje fue de 12 mg/g alcanzado por *Mesoflavibacter aestuarii* KYW614^T (Lee et al., 2014).

En cuanto a los aspectos operativos, se descartó la elección de los aislamientos *Flavobacterium* sp. P33 y *Flavobacterium* sp. P14, debido a la gran dificultad para separar la biomasa del medio de cultivo.

Debido a lo anteriormente presentado, se seleccionó la cepa *Flavobacterium* sp. P8 para continuar el estudio debido a su mayor velocidad específica de producción de zeaxantina, productividad volumétrica de zeaxantina y por su facilidad de manipulación en las actividades experimentales.

4.4 Conclusiones

La identificación de los carotenoides producidos contribuye a la evaluación del potencial biotecnológico de las bacterias aisladas como nuevas fuentes de pigmentos. Teniendo en cuenta el tipo de carotenoide producido y su potencial interés, así como también los resultados de los ensayos preliminares de crecimiento y contenido y productividad de zeaxantina, se decidió continuar el trabajo con la cepa *Flavobacterium* sp. P8 y el estudio de la producción del carotenoide zeaxantina.

5 Producción de zeaxantina por Flavobacterium sp. P8

5.1 Marco teórico

5.1.1 El género Flavobacterium

El género *Flavobacterium* está ampliamente distribuido en la naturaleza, habiéndose reportado aislamientos en diversos hábitats, como marinos y suelos. Varias cepas pertenecientes a este grupo han sido aisladas de ambientes Antárticos (Mc Cammon y Bowman, 2000). La forma y el aspecto de las colonias suele variar dependiendo de la composición del medio de cultivo (Bernardet y Bowman, 2015).

En la Figura 5.1 se presenta la morfología de las colonias de la cepa seleccionada, *Flavobacterium* sp. P8, cultivada en medio TSA suplementado con sales marinas. Las colonias presentaron brillo y color amarillo o anaranjado debido a la producción de carotenoides y flexirrubinas. Presentó una morfología tipo bacilo Gram negativo (Figura 5.1) con bordes redondeados, de 0,3 a 0,5 μm de de diámetro y longitud variable (generalmente de 2 a 5 μm).

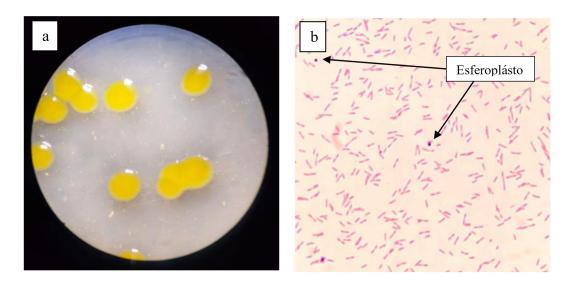


Figura 5.1. a) Morfología de colonia en placa en medio TSA suplementado con sales marinas y b) morfología celular de *Flavobacterium* sp. P8.

Se observó la formación de esferoplastos en algunos casos tal como se muestra en la Figura 5.1 (b). Estos son pequeñas formas esféricas degenerativas que forman algunas especies de *Flavobacterium* en fase estacionaria (Bernardet y Bowman, 2015).

Las especies pertenecientes al género *Flavobacterium* son quimiorganotróficas y aerobias estrictas, presentando un tipo de metabolismo estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones (Bernardet y Bowman, 2015). Cepas de este género han sido ampliamente reportadas como productoras de zeaxantina, llegando a alcanzar entre el 95% al 99% de los carotenoides totales producidos (Gierhart, 1995). Debido a este perfil simple de carotenoides, resulta un género bacteriano de interés como potencial fuente de zeaxantina.

5.1.2 Zeaxantina

La zeaxantina (3,3'-dihidroxi-β-caroteno) es una xantofila, que tiene importantes roles fisiológicos (Britton, 1995). Su estructura molecular se presenta en la Figura 5.2.

Figura 5.2. Estructura de la molécula de zeaxantina

El isómero 3R - 3'R zeaxantina ha sido estudiado por su rola preventivo de la degeneración macular relacionada con la edad, la cual causa ceguera en humanos (en inglés: *Age macular degeneration*, AMD). Existe evidencia epidemiológica de que la cantidad de pigmento macular (zeaxantina y luteína) se asocia inversamente con la incidencia de la AMD (Moeller et al., 2000). El aumento en la expectativa de vida a nivel mundial lleva a una mayor preocupación por este tipo de afecciones, y por lo tanto al interés en la utilización de zeaxantina como complementación alimentaria en humanos, ya que los humanos no somos capaces de sintetizarla *de novo* (Delgado-Pelayo y Hornero Méndez, 2012). Otros estudios epidemiológicos han establecido una relación inversa entre el consumo de zeaxantina y el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer como próstata y pulmón (Cohen et al., 2000; Nishino et al., 2009).

Por otro lado, la zeaxantina es un pigmento ampliamente utilizado en la industria de la alimentación animal para aumentar la coloración de carnes y huevos (Shin et al., 2016). En

cuanto a su actual producción industrial, la zeaxantina es obtenido por síntesis química o por extracción de plantas (Navarrete-Bolaños et al., 2005).

La síntesis química de zeaxantina se realiza a través de la reacción química de Wittig. El proceso requiere múltiples etapas, lo que afecta el rendimiento de la reacción global. Además, también se forman los isómeros de zeaxantina 3S-3'S y 3R-3S y productos de oxidación y degradación de la zeaxantina (Sajilata et al., 2008). Estos productos secundarios no tienen actividad biológica, por lo que reducen la calidad del producto final.

Las fuentes vegetales más ampliamente conocidas son las flores de Marigold (*Tagetes erecta*). Se comercializa en forma de oleorresina, compuesta por zeaxantina, luteína y zeaxantina dipalmitato. El proceso de producción consta de varias etapas: cosecha, prensado, secado, extracción con hexano, saponificación con tetrahidrofurano e hidróxido de potasio ya que la zeaxantina se encuentra esterificada en la matriz. Luego de la purificación la mezcla es apta para consumo humano (Navarrete-Bolaños et al., 2005).

La producción de zeaxantina de fuentes microbianas es un campo de creciente interés debido al cambio de preferencias de los consumidores hacia productos naturales y amigables con el medio ambiente. La producción de zeaxantina por fermentación presenta algunas ventajas sobre los métodos tradicionales, como una mayor velocidad de producción, no presenta dependencias climáticas y no compite por tierras para la producción de alimentos. El perfil de carotenoides de las cepas de *Flavobacterium* sp. para la producción de zeaxantina es simple, ya que sintetiza solamente el isómero con actividad biológica de forma libre. Sin embargo, para que la producción bacteriana de zeaxantina sea económicamente viable se necesita contar con medios de cultivo de bajo costo.

5.1.3 Efecto de la temperatura sobre la producción de carotenoides

La temperatura es uno de los factores más importantes en el crecimiento y el desarrollo de los microrganismos en un bioproceso, influenciando la mayoría de las rutas biosintéticas. Se ha reportado que la temperatura afecta la concentración de enzimas involucradas en la producción de carotenoides (Hayman et al., 1974).

Por otro lado, la adaptación de la fluidez de la membrana celular con los cambios de temperatura está relacionada con la proporción de carotenoides polares y no polares producidos por las bacterias, siendo uno de los mecanismos más comunes de regulación (Shivaji y Prakash,

2010). Los carotenoides son moléculas hidrofóbicas, por lo que su localización en la membrana fosfolipídica dependerá de la polaridad de los sustituyentes, como se mencionó en la sección 1.2. Se ha reportado que los carotenoides con grupos polares dan mayor estabilidad a las membranas a menores temperaturas (Jagannadham et al., 1991; Chattopadhyay et al., 1997).

5.1.4 Síntesis de zeaxantina en *Flavobacterium* sp.

La ruta, intermediarios y enzimas que intervienen en la síntesis de zeaxantina dependen del microorganismo que la sintetiza.

En primer lugar, se sintetizan los isoprenoides isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetil-alil-difosfato (DMAPP). La isomerización se produce a través de la acción de la enzima IPP isomerasa (IDI). Estos precursores pueden formarse a través de dos rutas biosintéticas: la vía MEP (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato) y la vía MVA (mevalonato) (Figura 5.3).

La condensación de IPP con DMAPP para formar geranil-difosfato (GPP) es catalizada por la enzima geranil pirofosfato sintetasa (GPS). Luego, GPP reacciona con una molécula de IPP para formar farnesil-di-fosfato (FPP) a través de la acción de la enzima FPP sintasa (FPS). Una molécula de FPP se condensa con una molécula de IPP para formar el terpeno de 20 carbonos, geranil-geranil pirofosfato (GGPP), catalizado por la GGPP sintasa (CrtE). Luego se produce fitoeno a partir de dos moléculas de GGPP por la acción de la enzima fitoeno sintetasa (CrtB). La formación de fitoeno (40 carbonos) es el primer paso de la síntesis de carotenoides (Pasamontes et al., 1997).

En la mayoría de las bacterias, los isoprenoides C5 son sintetizadas a través de la vía MEP y el género *Flavobacterium* ha sido reportado como uno de ellos (Rodriguez-Concepación et al., 2018). Sin embargo, Hayakawa et al. (2017) y Lee et al. (2018) reportaron la formación de zeaxantina a través de una vía MVA modificada en cepas *Flavobacterium johnsoniae* y *Flavobacterium kingsejongi*. Esta vía ha sido ampliamente estudiada en eucariotas y archea, aunque se conoce de su existencia en algunas pocas bacterias (Rodriguez-Concepación et al., 2018).

VIA MVA

VIA MEP

Figura 5.3. Primeros pasos de la vía biosintética para la formación de zeaxantina (Adaptado de Zhang et al. (2018)).

Simbología: HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, MVA: mevalonato, DXP: 1-deoxyxilulosa-5-fosfato, MEP: 2-C-metil-D-eitritol-4-fosfato, IPP: isopentil-pirofosfato, DMAPP: dimetil-alil-difosfato, IDI: isopentil-difosfato isomerasa, GPS: geranil-pirofosfato sintasa, GPP: geranil-pirofosfato, FPS: farnesil-pirofosfato sintasa, FPP: farnesil-pirofosfato, CrtE: GGPP sintasa, GGPP: geranil-pirofosfato, CrtB: fiteono sintasa.

La zeaxantina es, probablemente, el pigmento más común producido por muchas especies del género *Flavobacterium* (Britton et al., 1977). Algunos reportes de biosíntesis de zeaxantina en *Flavobacterium* encontrados en la literatura toman como modelo de estudio la cepa R 1560 (Leuenberger et al., 1973; McDermott et al., 1974; Britton et al., 1977). En este caso, Britton et al. (1977) reportaron que la zeaxantina representó el 95% de los carotenoides totales producidos por la cepa de *Flavobacterium* R 1560, siendo el isómero 3R, 3'R el isómero encontrado. A partir de los otros compuestos identificados (2% de carotenos y 3% de xantofilas), se propuso una ruta de formación de zeaxantina. En la Figura 5.4 se representa la vía desde la formación de fitoeno

β-caroteno vía ciclación de neurosporeno o licopeno, el cual es la ruta generalmente aceptada. Las posibles reacciones de formación desde neurosporeno a zeaxantina se muestran en la Figura 5.5.

Se ha sugerido que las enzimas ciclasas y las hidroxilasas implicadas en la síntesis de carotenoides no son específicas para un sustrato en particular, sino que utilizan como sustrato cualquier carotenoide cuya mitad de molécula tenga las características estructurales adecuadas. Por ejemplo, las ciclasas pueden ciclar licopeno a γ -caroteno o neurosporeno a β -zeacaroteno, y la enzima hidroxilasa es capaz de hidroxilar cualquier carotenoide con un anillo β terminal. Por lo tanto, se puede encontrar una amplia variedad de intermediarios debido a que las desaturasas, ciclasas e hidroxilasas actúan a distintas velocidades sobre los extremos de las moléculas (Britton et al., 1977).

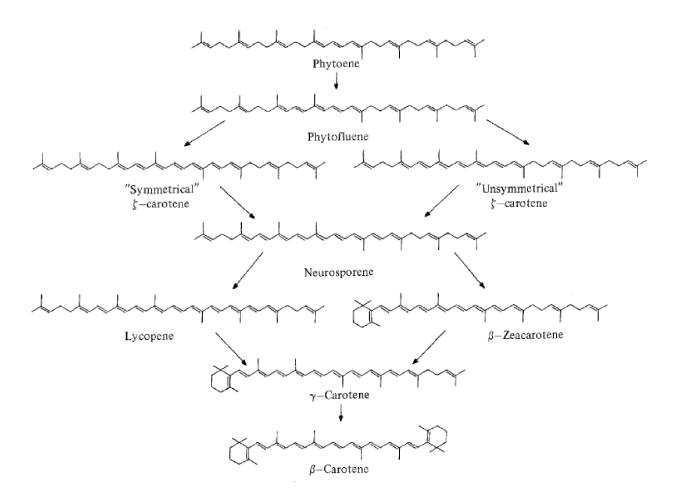


Figura 5.4. Vías de formación de β -caroteno propuestas para *Flavobacterium* R 1560 (Britton et al., 1977).

Figura 5.5. Vías de formación de zeaxantina en *Flavobacterium* R 1560 (Britton et al., 1977).

En este capítulo, se estudió la producción de zeaxantina por la cepa de *Flavobacterium* sp. P8. En primer lugar, se realizó un screening primario de condiciones para su cultivo en matraces agitados, evaluándose el efecto de la temperatura de trabajo, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y concentración de sales marinas sobre la producción de biomasa, zeaxantina y carotenoides totales. Se estudiaron tres fuentes de carbono que se encuentran en algunos de los sub-productos de la industria a nivel regional. La glucosa y la xilosa forman parte de las estructuras de celulosa y hemicelulosa de la madera y los residuos forestales. El glicerol es el principal subproducto de la producción del biodiésel. Evaluar su utilización como materia prima permitirá reducir de los costos de proceso de producción de zeaxantina, así como dar valor

agregado a residuos agroindustriales. Teniendo en cuenta los resultados primarios obtenidos, se realizó la formulación del medio de cultivo a través de un screening estadístico para determinar los factores nutricionales que afectan la producción de biomasa. Los factores más importantes fueron optimizados a través de la metodología de diseño de experimentos para maximizar la producción de zeaxantina. Se estudió como respuesta el contenido de zeaxantina en la célula, así como también la concentración de biomasa, para maximizar la concentración de zeaxantina por volumen de medio de cultivo. Se realizó el escalado del proceso a biorreactor, estudiando la influencia de la concentración de oxígeno disuelto en el contenido y concentración de carotenoides y en la concentración de biomasa. Por último, se evaluó el cultivo en modo fedbatch de manera de incrementar la producción de biomasa y carotenoides.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Estudio de las condiciones de cultivo para la cepa seleccionada

5.2.1.1 Desarrollo de inóculo y cultivos en matraces agitados

El desarrollo de inóculo se realizó a partir de los stocks a -80°C de la cepa *Flavobacterium* sp. P8, los cuales fueron descongelados y cultivados en placas con medio TSA o TSA con sales por 48 horas a 20°C. Cada inóculo se preparó traspasando biomasa de cada placa, a matraces Erlenmeyer de 1000 mL con 250 mL del medio de cultivo correspondiente, TSB o TSB suplementado con sales. Los inóculos se cultivaron por 24 h a 20°C y 200 rpm en un agitador orbital (New Brunswich Scienitfic, E.U.).

Los cultivos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 1 L con 300 mL del medio de cultivo, con una concentración inicial de biomasa de 0,2 g/L. Los ensayos se realizaron por duplicado. El crecimiento microbiano se siguió por densidad óptica a 600 nm. Luego de transcurridas 48 h, se separó la biomasa por centrifugación a 6500 rpm, 4°C y 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó la biomasa con agua destilada. Las muestras se congelaron a -80°C y se liofilizaron.

5.2.1.2 Estudio de la temperatura de crecimiento

Se estudió el crecimiento microbiano de la cepa seleccionada a 15°C, 20°C, 25°C y 30°C en matraces agitados. La composición del medio de cultivo fue: 6 g/L peptona, 2 g/L de extracto

de levadura y 20 g/L de sales marinas (Sigma). El pH inicial se ajustó en 7. El desarrollo de inóculo y los ensayos de fermentación se realizaron según descripción en 5.2.1.1. Los ensayos se realizaron por duplicado.

5.2.1.3 Evaluación del consumo de fuentes de carbono

Se estudió el crecimiento microbiano sobre tres fuentes de carbono: glucosa, glicerol y xilosa. El inóculo y el medio de cultivo correspondiente para cada fuente de carbono se compuso de: fuente de carbono 6 g/L, extracto de levadura 2 g/L y sales marinas 20 g/L y pH 7. El desarrollo de inóculo y los ensayos de fermentación fueron realizados según 5.2.1.1. Los ensayos se realizaron por duplicado.

5.2.1.4 Efecto de la concentración de sales

Se estudió el efecto de la concentración de sales marinas en el crecimiento microbiano. Se evaluaron tres concentraciones: 0 g/L, 10 g/L y 20 g/L. Los medios de cultivo correspondientes se compusieron según: glucosa 6 g/L, extracto de levadura 2 g/L y sales marinas, pH 7. El medio para el inóculo se compuso con 20 g/L de sales marinas. En el medio sin sales se adicionaron 10 g/L de NaCl. El desarrollo de inóculo y los ensayos fermentación fueron realizados según 5.2.1.1. Los ensayos se realizaron por duplicado.

5.2.1.5 Estudio de crecimiento sobre diferentes fuentes de nitrógeno

Se estudió el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el crecimiento microbiano. Las mismas fueron: extracto de levadura (2 g/L), urea (0,5 g/L), NH₄Cl (0,8 g/L) y NaNO₃ (1,3 g/L). Las concentraciones de cada fuente de nitrógeno fueron seleccionadas de forma de mantener la concentración de nitrógeno elemental igual para todas las fuentes (aproximadamente 0,22 g/L). El inóculo y los medios de cultivo correspondientes se compusieron según: glucosa 6 g/L, fuente de nitrógeno y sales marinas (10 g/L), pH 7. El desarrollo de inóculo y los ensayos de fermentación se realizaron según descripción en 5.2.1.1. Los ensayos se realizaron por duplicado.

5.2.2 Selección de componentes del medio de cultivo a través de un diseño experimental Plackett – Burman.

Se evaluó el efecto de 11 componentes nutricionales sobre la producción de biomasa a través de un diseño experimental fraccionado (Plackett - Burman, 2⁽¹⁵⁻¹¹⁾). Estos factores nutricionales fueron seleccionados en base a los resultados de los ensayos preliminares descriptos anteriormente. Cada variable se adicionó en un nivel alto (+) y un nivel bajo (-), cuyas concentraciones se muestran en la Tabla 5.1. En todas las corridas, se adicionó al medio de cultivo 6 g/L de glucosa.

Tabla 5.1. Niveles de concentración de nutrientes estudiados en el diseño factorial fraccionado (Placket-Burman).

Código	Factores (g/L)	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
X ₁	Peptona	0,2	2,0
X_2	Extracto de levadura	0,2	2,0
X ₃	Urea	0,05	0,5
X_4	NH ₄ Cl	0,08	0,8
X_5	NaCl	0	6,3
X_6	KC1	0	0,2
X_7	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0	3,4
X_8	$CaCl_2$	0	0,3
X 9	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0	0,03
X_{10}	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	0	0,04
X ₁₁	Micronutrientes	0	400 μL

Solución de micronutrientes: H_3BO_3 (12.8 g/L), $LiSO_4$ (1.0 g/L), $MnSO_4$ (3.2 g/L), $CoCl_2$ (2.0 g/L), $CuSO_4 \cdot H_2O$ (4.0 g/L), $NiSO_4$ (2.5 g/L), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (2.8 g/L), $ZnSO_4$ (4.8 g/L).

Las corridas fueron realizadas por triplicado. Se incluyeron 4 variables *dummies*, generando un total de 48 corridas, que se detallan en la Tabla 5.2. El nivel de significancia fue 0,05. El desarrollo de inóculo y los cultivos en matraces se realizaron según descripción en 5.2.1.1.

Tabla 5.2. Diseño de Plackett-Burman para las 11 variables estudiadas $(X_1 - X_{11})$ y 4 variables "dummy" $(X_{12} - X_{15})$.

Corrida	X ₁	X ₂	X3	X4	X5	X6	X 7	X8	X9	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X13	X14	X ₁₅
1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
2	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
3	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
4	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1
5	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1
6	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1
8	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
9	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1
10	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
11	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
12	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
13	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1
14	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1
15	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

5.2.3 Optimización de la composición del medio de cultivo en matraces

Las tres variables con mayor impacto sobre el crecimiento microbiano fueron elegidas para desarrollar un medio de cultivo que maximice la producción de pigmentos. Se realizó un diseño factorial completo, 2³ con 5 puntos centrales. Las 12 corridas codificadas del experimento se detallan en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Corridas del diseño factorial completo 2^3

Corrida	Factor 1	Factor 2	Factor 3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1

7	1	1	-1
8	1	1	1
9-13	0	0	0

Todos los medios se suplementaron con 6 g/L de glucosa y los factores nutricionales menos relevantes que tuvieron efecto positivo se agregaron en su nivel alto. El desarrollo de inóculo y los ensayos de fermentación se realizaron según descripción en 5.2.1.1. Las respuestas estudiadas fueron: concentración de biomasa (g/L), contenido de pigmentos en la biomasa seca (μg/g) y concentración de pigmentos (μg/L).

5.2.4 Producción de pigmentos en biorreactor

5.2.4.1 Ensayo con el medio de cultivo optimizado en biorreactor

El medio de cultivo que maximizó la producción de el/los pigmento/s de interés en 5.2.3 fue seleccionado para estudios en biorreactor en modo *batch*. El desempeño de la cepa seleccionada fue evaluado en un biorreactor Biostat A Plus (Sartorius) de 5 L de capacidad nominal, con 3 L de medio de cultivo a 20°C, pH 7 y 1 vvm, el cual se muestra en la Figura 5.6. La velocidad de agitación se reguló automáticamente, de manera de asegurar durante toda la corrida una concentración de oxígeno disuelto del 20% de la concentración de saturación.



Figura 5.6. Imagen de un cultivo de *Flavobacterium* sp. P8 del biorreactor Biostat A Plus (Sartorius).

La concentración de biomasa y de pigmentos se monitoreó cada 12 h. Transcurridas 72 h, se separó la biomasa del medio de cultivo en una centrífuga (Thermo Scientific, IEC CL30R), a 6500 rpm, 4°C por 15 min. Se descartó el sobrenadante y la biomasa se lavó con agua destilada. Las muestras se congelaron a -80°C, y se liofilizaron. La extracción de pigmentos y su cuantificación se realizó según 4.2.2 y 5.2.5.1.

5.2.4.2 Estudio de la influencia de la concentración de oxígeno disuelto en fermentación en modo *batch*

Se evaluó la influencia del oxígeno disuelto en la producción de pigmentos en un biorreactor Biostat A Plus (Sartorius) de 5 L de capacidad nominal, con 3 L de medio de cultivo (6 g/L glucosa, 7 g/L peptona, 7 g/L extracto de levadura y 15 g/L NaCl) a 20 °C, pH 7 y 1 vvm. La velocidad de agitación se reguló automáticamente, de manera de asegurar durante toda la corrida una concentración de oxígeno disuelto de 5, 10, 20 y 40% de la concentración de saturación. Se ensayó una condición sin control de oxígeno disuelto, utilizando una velocidad de agitación constante de 300 rpm. Los ensayos fueron realizados por duplicado. La biomasa se separó del medio de cultivo por centrifugación a 4100 rpm, 15 min, 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó con agua destilada. Las muestras se congelaron a -80°C, y se liofilizaron. La extracción de pigmentos y su cuantificación se realizó según 4.2.2 y 5.2.5.1.

5.2.4.3 Fermentación en modo fed-batch

Se estudió la producción de pigmentos en modo *fed-batch*, en el biorreactor y condiciones experimentales detallados en 5.2.4.1. Se utilizó el mismo medio de cultivo detallado en 5.2.4.2 con 30 g/L de concentración inicial de glucosa. La velocidad de agitación se reguló automáticamente, de manera de asegurar durante toda la corrida una concentración de oxígeno disuelto de 10% de la concentración de saturación. Se realizó el agregado de un pulso de composición: glucosa (400 g/L), peptona (140 g/L) y extracto de levadura (140 g/L), cuando la concentración de glucosa disuelta alcanzó aproximadamente los 10 g/L. La extracción de pigmentos y su cuantificación se realizó según 4.2.2 y 5.2.5.1.

5.2.5 Determinaciones analíticas

5.2.5.1 Cuantificación de pigmentos

La cuantificación de los pigmentos se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en un cromatógrafo Shimadzu con un detector de arreglo de diodos (DAD) y controlador Labsolutions (Shimadzu), equipado con una columna de fase reversa Hypersil BDS C18 (150 mm x 3 mm, diámetro interno 3μm, Thermo Fisher Scienitfic) acoplada a una precolumna del mismo material.

El método utilizado consistió en un gradiente binario de acetona y agua desionizada, que inició con una composición inicial de 75% acetona y 25% agua, incrementando el contenido de acetona a 95% en 10 min. Se mantuvo la mezcla por 7 min, se aumentó el contenido a 100% en 3 min y se mantuvo por 10 min más. La separación se llevó a cabo a 25°C. El volumen de inyección fue 10 μL y el flujo 1 mL/min (Delgado-Pelayo y Hornero-Méndez, 2012).

La cuantificación se realizó a través de estándares comerciales (Extrasynthese, Francia) según curvas de calibración presentadas en el Anexo.

5.2.5.2 Determinación la concentración de azúcares

La concentración de azúcares y glicerol se determinó por cromatografía líquida de alta eficiencia en un cromatógrafo Shimadzu Lab Solution acoplado a un detector RID - 10A y columna Aminex HPX-87H. El método utilizado consistió en un flujo isocrático de 0,6 mL/min a 45°C y 15 min. La fase móvil utilizada fue H₂SO₄, 0,005 M. La cuantificación se realizó a través de estándares comerciales según curvas de calibración presentadas en el Anexo. Las muestras fueron previamente filtradas a través de Millex®Syringe Filters, PTFE, 0,2 μm.

5.2.5.3 Tratamiento estadístico de datos

El análisis de varianza de los datos experimentales (ANOVA) se realizó con el software Infostat® (versión estudiantil, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, http://www.infostat.com.ar). Diferencias entre medias fueron analizadas según test de Tukey. Se consideraron diferencias significativas entre medias cuando $p \le 0.05$.

Los diseños experimentales se analizaron con el programa Statistica (Statsoft Inc, USA).

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Estudio de la temperatura de crecimiento y producción de carotenoides para *Flavobacterium* sp. P8

En la Figura 5.7 se presentan las curvas de crecimiento de *Flavobacterium* sp. P8 a diferentes temperaturas. La Tabla 5.4 muestra los valores de concentración de biomasa, contenido de zeaxantina, β-criptoxantina, β-caroteno y carotenoides totales obtenidos a 15, 20, 25 y 30°C.

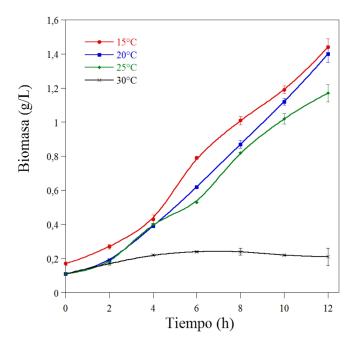


Figura 5.7. Curvas de crecimiento de *Flavobacterium* sp. P8 a diferentes temperaturas.

Tabla 5.4. Concentración de biomasa, velocidades específicas de crecimiento, y contenido de carotenoides por gramo de biomasa seca a diferentes temperaturas, 200 rpm y 12 h de fermentación.

T (°C)	Biomasa (g/L)	μ (h ⁻¹)	β- caroteno (μg/g)	β- criptoxantina (μg/g)	Zeaxantina (μg/g)	Carotenoides totales (µg/g)
15	$1,4 \pm 0,1^{a}$	$0.18 \pm 0.00^{\mathrm{d}}$	nd	$5\pm2^{\rm e}$	$217 \pm 12^{\rm h}$	223 ± 8^{i}
20	$1,4 \pm 0,1^{a}$	$0,21 \pm 0,00^{c}$	nd	$33 \pm 6^{\mathrm{f}}$	173 ± 24^{h}	206 ± 34^i
25	$1, 1 \pm 0, 1^{b}$	$0,20 \pm 0,00^{c}$	79 ± 14	81 ± 2^g	223 ± 18^{h}	383 ± 32^{j}

nd: no detectado

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

La concentración de biomasa alcanzada a 15 y 20°C fue la misma, disminuyendo a 25°C. Para el caso de 30°C no hubo un crecimiento apreciable. La velocidad específica de crecimiento fue similar para 15, 20 y 25°C. El contenido de zeaxantina fue similar a las tres temperaturas de trabajo (173 – 223 μg/g). Sin embargo, el contenido de β-caroteno, β-criptoxantina y carotenoides totales fue mayor a 25°C. Por lo tanto, la menor proporción de zeaxantina a mayor temperatura fue esperable. Para el caso de *Flavobacterium* sp. P8, la proporción de zeaxantina disminuye desde 97% a 15°C, 84% a 20°C y 58% a 25°C. Contrariamente, la proporción de β-caroteno aumenta, siendo no detectada a 15 y 20°C, y alcanzando un 20% a 25°C. Esta mayor cantidad de intermediarios y carotenoides totales puede deberse a un aumento en la actividad enzimática por la temperatura (Britton et al., 1977).

En base a los resultados de crecimiento y de contenido de zeaxantina obtenidos, se seleccionó la temperatura de 20°C para continuar los estudios.

5.3.2 Estudio de asimilación de fuentes de carbono

Se estudió el crecimiento y producción de carotenoides de *Flavobacterium* sp. P8 en medios con glucosa, glicerol o xilosa como fuentes de carbono y energía. Los perfiles de crecimiento y consumo de sustrato se muestran en la Figura 5.8.

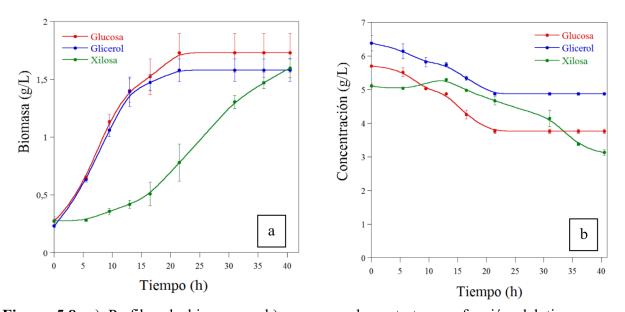


Figura 5.8. a) Perfiles de biomasa y b) consumo de sustratos en función del tiempo para *Flavobacterium* sp. P8 a 20°C y 200 rpm.

En la Tabla 5.5 se presentan los resultados obtenidos para el crecimiento y producción de carotenoides sobre los tres sustratos. No se observaron diferencias significativas para la concentración de biomasa máxima alcanzada cuando se cultivó *Flavobacterium* sp. P8 con las fuentes de carbono estudiadas. Sin embargo, el crecimiento sobre xilosa presentó una fase lag de aproximadamente 10 h, y una velocidad de crecimiento menor que los cultivos en glucosa y glicerol.

En cuanto a la asimilación de las fuentes de carbono (Tabla 5.8), el consumo de glucosa y xilosa fue similar $(2,0 \pm 0,1 \text{ g/L})$. Para el caso del glicerol, el consumo fue de $1,5 \pm 0,1 \text{ g/L}$. Sin embargo, el rendimiento de biomasa basado en el consumo de sustrato fue estadísticamente similar para todos los azúcares (en el rango de 0,67 - 0,89; Tabla 5.5).

No se encontraron diferencias significativas en el contenido de zeaxantina por gramo de biomasa seca para los cultivos en las tres fuentes de carbono estudiadas. Para el caso del medio formulado a base de xilosa, se encontró además de zeaxantina, un bajo contenido de los intermediarios β -criptoxantina y β -caroteno (aproximadamente un 5% de los carotenoides totales), siendo casi nulo para glucosa y glicerol.

Tabla 5.5. Resultados de la fermentación de *Flavobacterium* sp. P8 en diferentes fuentes de carbono, a 20°C y 200 rpm.

Danámatuas		Sustrato	
Parámetros	Glucosa	Glicerol	Xilosa
Biomasa (g/L)	$1,7 \pm 0,2^{a}$	$1,6 \pm 0,1^{a}$	$1,6 \pm 0,1^{a}$
$t_{f}(h)$	21	21	40
μ (h ⁻¹)	$0,15^{b}$	$0,16^{b}$	$0,06^{c}$
$\Delta S (g/L)$	$1,9 \pm 0,1^{d}$	$1,5 \pm 0,2^{d}$	$1,6 \pm 0,1^{d}$
$Y_{X/S}(g/g)$	0,75 ^f	0,89 ^f	0,67 ^f
$Q_x (g/Lh)$	0.07^{g}	$0,06^{g}$	$0,03^{h}$
β-caroteno ($μg/g$)	nd	4 ± 1^{i}	19 ± 1^{j}
β-criptoxantina (µg/g)	$10 \pm 3^{\text{h}}$	nd	$17 \pm 1^{\text{h}}$
Zeaxantina (µg/g)	287 ± 12^{i}	301 ± 15^{i}	323 ± 13^i
Carotenoides totales (µg/g)	297 ± 15^{j}	305 ± 12^{j}	359 ± 15^k
Qz (µg/Lh)	14^{1}	14^{1}	8 ^m
Q _{CT} (µg/Lh)	14 ¹	15 ¹	9 ^m

nd: no detectado

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

 t_F : tiempo final de fermentación, μ : velocidad máxima de crecimmiento, ΔS : consumo de sustrato, Q_X : productividad volumétrica de biomasa, Q_C : productividad volumétrica de zeaxantina, Q_C : productividad volumétrica de carotenoides totales.

Las productividades de biomasa, zeaxantina y carotenoides totales fueron menores para el medio formulado a base de xilosa, ya que el tiempo de fermentación fue aproximadamente el doble.

Diversos autores han evaluado la influencia de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de biomasa y carotenoides. Los resultados son diversos, dependiendo de la especie bacteriana estudiada (Sowmya y Sachindra, 2015). Para la producción de cantaxantina a partir de *Dietzia natronolimnaea* HS-1, se ha encontrado que, entre diversas fuentes de carbono ensayadas, la más efectiva para el crecimiento celular y producción de carotenoides fue glucosa (Khodaiyan et al., 2007). Por otro lado, Alcantra y Sanchez (1999) encontraron diferencias entre sacarosa y glucosa, para una cepa de *Flavobacterium* sp., siendo la primera promotora de la producción de biomasa, mientras que la segunda promovió en una mayor medida la producción de carotenoides.

En esta tesis, los resultados obtenidos fueron similares para el crecimiento y producción de zeaxantina en medios con glucosa y glicerol. Para el caso del medio formulado a base de xilosa, el tiempo de fermentación fue aproximadamente el doble, disminuyendo los valores de productividad, aunque los rendimientos de biomasa y producto en base al contenido de sustrato fueron los mismo.

Flavobacterium sp. P8 consumió las tres fuentes de carbono ensayadas haciendo posible la elección de forma indistinta de glucosa o glicerol. Se seleccionó glucosa como fuente de carbono para continuar el trabajo.

5.3.3 Estudio de la concentración de sales marinas

Flavobacterium sp. P8 fue aislada de una muestra de agua de mar, por lo que es probable que esté adaptada para crecer en ambientes salinos. Para determinar los requerimientos de sales de esta cepa se utilizó una mezcla comercial de sales marinas a diferentes concentraciones. Los perfiles de crecimiento se presentan en la Figura 5.9 y la concentración de biomasa final y velocidad de crecimiento en la Tabla 5.6.

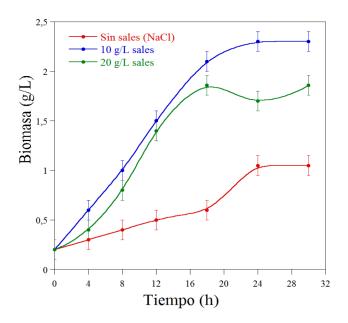


Figura 5.9. Perfiles de concentración biomasa en función del tiempo para *Flavobacterium* sp. P8 cultivada a 20°C y 200 rpm, con diferentes concentraciones de sales marinas.

Tabla 5.6. Concentraciones de biomasa y velocidades específicas máximas de crecimiento para *Flavobacterium* sp. P8 cultivada a 20°C y 200 rpm, con diferentes concentraciones de sales marinas.

Concentración de sales	Biomasaa	μ (h ⁻¹)
marinas	(g/L)	μ(n)
0 g/L (10 g/L NaCl)	$1,1 \pm 0,1$	0,06 ^a
10 g/L	$2,3 \pm 0,1$	$0,12^{b}$
20 g/L	$1,9 \pm 0,1$	0,16 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Los resultados obtenidos indicaron que la presencia de sales marinas tiene influencia sobre el crecimiento microbiano de *Flavobacterium* sp. P8. Cuando se sustituyeron las sales marinas por 10 g/L NaCl, la concentración de biomasa alcanzada y la velocidad específica máxima de crecimiento fueron menores que en presencia de sales marinas. Por lo tanto, las sales marinas le proveen al medio de otras sales necesarias para el crecimiento celular, o complementan los niveles de aquellos iones ya presentes en la peptona y el extracto de levadura. MacLeod et al. (1957), estudiaron la influencia de las sales marinas en el crecimiento de una cepa de *Flavobacterium* sp., aislada de una muestra de mar, obteniendo resultados similares.

a Concentración de biomasa determinada a las 30 h de cultivo

Para los ensayos con 10 g/L y 20 g/L de sales marinas, no se encontraron diferencias significativas en la velocidad específica de crecimiento. Sin embargo, la concentración de biomasa alcanzada fue levemente superior cuando el medio contenía 10 g/L de sales marinas.

Por lo tanto, se seleccionó una concentración de sales marinas de 10 g/L para continuar los estudios.

5.3.4 Estudio de la asimilación de fuentes de nitrógeno

Las diferentes especies bacterianas difieren en cuanto a las fuentes de nitrógeno que pueden asimilar. Estas pueden ser orgánicas o inorgánicas. La elección de una correcta fuente de nitrógeno puede jugar un rol fundamental en la producción de metabolitos. Los resultados obtenidos de concentración de biomasa para la cepa *Flavobacterium* sp. P8 con las diferentes fuentes de nitrógeno ensayadas se muestran en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Concentración de biomasa para *Flavobacterium* sp. P8 obtenida utilizando diferentes fuentes de nitrógeno, en cultivos realizados a 200 rpm y 20°C.

Fuente de nitrógeno	Biomasa (g/L)
Extracto de levadura	$1,5 \pm 0,1$
Urea	0.7 ± 0.2
NH ₄ Cl	0.3 ± 0.0
NaNO ₃	0.2 ± 0.1

Flavobacterium sp. P8 no creció en las fuentes inorgánicas ensayadas (NH₄Cl y NaNO₃). El mayor crecimiento se obtuvo con extracto de levadura, alcanzando una mayor concentración de biomasa, con respecto a la urea, pero presentando crecimiento en todos los casos. Por lo tanto, se seleccionarán estas dos fuentes de nitrógeno para incluir en el diseño del medio de cultivo. No fue posible determinar el contenido de carotenoides para los cultivos en urea, NH₄Cl y NaNO₃ debido a la baja cantidad de biomasa obtenida.

La utilización de diferentes fuentes de nitrógeno en cepas de *Flavobacterium* sp. y su influencia en el crecimiento microbiano y la producción de carotenoides ha sido previamente reportada para algunas especies. Alcantra et al. (1999) estudiaron la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno (aminoácidos) sobre el crecimiento y la producción de zeaxantina en cepas

de *Flavobacterium* sp. ATCC 25582. Estos autores encontraron que L-asparagina y L-glutamina resultaron en una mayor concentración de biomasa y de zeaxantina. Para *Flavobacterium miltivorum* ATCC 55238 la velocidad de crecimiento microbiano, pero la concentración de biomasa final fue la misma que con el medio sin urea. En cuanto a la producción de carotenoides, los autores reportaron que la urea actuó como inhibidor de la actividad hidroxilasa, resultando en una acumulación de β-caroteno, siendo el principal carotenoide encontrado (mayor al 70% de los carotenoides totales) (Bhosale et al., 2004).

Por lo tanto, los efectos de los factores nutricionales suelen ser específicos para cada especie, solo pudiéndose tomar como referencia orientativa. Para cada caso se debe formular un medio de cultivo específico, teniendo en cuenta al microorganismo y producto en particular.

5.3.5 Diseño del medio de cultivo

5.3.5.1 Ensayos en matraces

Con la información recabada en 5.3.2, 5.3.3 y 5.3.4, se realizó un screening de los factores nutricionales de manera de determinar cuáles de ellos tienen efecto sobre la concentración de biomasa. Dentro de los factores seleccionados se encuentran: extracto de levadura, peptona, urea, y algunos componentes de las sales minerales estudiadas en 5.3.2. Los ensayos se realizaron con glucosa como fuente de carbono y energía. Las concentraciones de biomasa obtenidas se presentan en la Tabla 5.8. Los estadísticos obtenidos se muestran la Tabla 5.9 y los efectos significativos de los factores estudiados se muestran en la Figura 5.10.

Tabla 5.8. Diseño experimental de Plackett – Burman para los 11 factores nutricionales estudiados y las respuestas concentración de biomasa y consumo de glucosa.

		Extracto									;		
Corrida	Peptona (g/L)		Urea (g/L)	NH4Cl (g/L)	Na ₂ HPO ₄ (g/L)	NaCl (g/L)	CaCl ₂ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	KCI (g/L)	FeCl ₃ (g/L)	Micro- nutrientes (µL)	Biomasa (g/L)	AS (g/L)
1	0,2	0,2	0,05	80,0	0,2	6,3	0,3	3,4	0,2	0,03	0	5,0	0,7
7	0,2	0,2	0,05	8,0	0,2	6,3	0	3,4	0	0	0	0,2	6,3
3	0,2	0,2	6,0	0,08	0,2	0	0,3	0	0,2	0	400	6,3	0,3
4	0,2	0,2	6,0	8,0	0,2	0	0	0	0	0,03	400	0,2	0,2
v	0,2	2,0	0,05	0,08	0	6,3	0,3	0	0	0,03	400	1,3	2,8
9	0,2	2,0	0,05	8,0	0	6,3	0	0	0,2	0	400	1,0	2,2
7	0,2	2,0	6,0	0,08	0	0	0,3	3,4	0	0	0	1,1	1,9
∞	0,2	2,0	6,0	8,0	0	0	0	3,4	0,2	0,03	0	8,0	1,3
6	2,0	0,2	0,05	80,0	0	0	0	3,4	0,2	0,03	400	9,0	1,0
10	2,0	0,2	0,05	8,0	0	0	0,3	3,4	0	0	400	5,0	1,1
11	2,0	0,2	0,5	0,08	0	6,3	0	0	0,2	0	0	5,0	1,1
12	2,0	0,2	0,5	8,0	0	6,3	0,3	0	0	0,03	0	5,0	6,0
13	2,0	2,0	0,05	80,0	0,2	0	0	0	0	0,03	0	1,2	1,8
14	2,0	2,0	0,05	8,0	0,2	0	0,3	0	0,2	0	0	1,3	1,9
15	2,0	2,0	0,5	0,08	0,2	6,3	0	3,4	0	0	400	1,8	3,6
16	2,0	2,0	5,0	8,0	0,2	6,3	0,3	3,4	0,2	0,03	400	2,1	4,4

 $\Delta S = consumo de glucosa (concentración de glucosa inicial – concentración de glucosa final)$

Tabla 5.9. Efecto de los factores, intervalos de confianza (-% IC, +% IC), *p*-valor y porcentaje de suma de cuadrados (SS) para la concentración de biomasa en el diseño de Plackett-Burman.

Variable	Efecto	-% IC	+% IC	<i>p</i> -valor	SS%
Peptona	0.417	0.343	0.491	0.000	14.6
Extracto de levadura	0.883	0.809	0.957	0.000	65.5
Urea	0.075	0.001	0.149	0.047	0.5
NH ₄ Cl	-0.067	-0.141	0.007	0.076	0.4
NaH_2PO_4	0.125	0.051	0.199	0.002	1.3
NaCl	0.250	0.176	0.324	0.000	5.2
$CaCl_2$	0.175	0.101	0.249	0.000	2.6
$MgSO_4$	0.167	0.093	0.241	0.000	2.3
KCl	0.008	-0.066	0.082	0.820	0.0
FeCl ₃	0.067	-0.007	0.141	0.076	0.4
Micronutrientes	0.192	0.118	0.266	0.000	3.1
Dummy 1	0.067	-0.007	0.141	0.076	0.4
Dummy 2	-0.008	-0.082	0.066	0.820	0.0
Dummy 3	0.008	-0.066	0.082	0.820	0.0
Dummy 4	0.050	-0.024	0.124	0.178	0.2

 $R^2 = 0.9646$, (95% nivel de significancia). Los p-valores menores a 0.05 indican significancia del factor

Los factores que tuvieron efecto positivo sobre la concentración de biomasa fueron: extracto de levadura, peptona, NaCl, micronutrientes, CaCl₂, MgSO₄, NaHPO₄ y urea. Los factores NH₄Cl, KCl y FeCl₃ no presentaron efecto sobre el crecimiento microbiano, por lo que no fueron incluidos en las posteriores formulaciones del medio de cultivo. Por otro lado, las 4 variables "dummy" agregadas al diseño no presentaron efecto sobre el crecimiento microbiano, verificando que factores no controlados del tipo experimental no son significativos sobre la respuesta

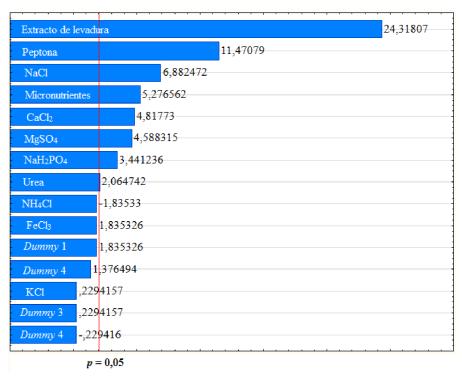


Figura 5.10. Gráfico de Pareto para los efectos estandarizados (valores absolutos). Efecto sobre respuesta Biomasa (g/L). MS Residual = 0,01583.

Los principales factores que tuvieron efecto positivo sobre la respuesta fueron: peptona, extracto de levadura y NaCl, siendo responsables de aproximadamente el 85% del incremento en la concentración de biomasa. La importancia de la peptona y el extracto de levadura era de esperar debido a que son fuentes complejas, con numerosos factores de crecimiento (vitaminas, aminoácidos, entre otras) y, por otro lado, el NaCl ha sido ampliamente reportado como necesario para el crecimiento de bacterias de ambientes marinos (MacLeod et al., 1957). Debido a esto, se estudió la influencia de estos factores sobre la producción de zeaxantina y carotenoides totales en un diseño factorial completo 2³⁺¹. Para definir el valor de los niveles de los factores, se consideraron como niveles inferiores, los niveles máximos utilizados en el diseño de Plackett-Burman. En la Tabla 5.10 se muestran las corridas resultantes de este diseño y los resultados obtenidos para las respuestas estudiadas: contenido de zeaxantina por gramo de biomasa seca (μg/g), contenido de carotenoides totales por gramo de biomasa seca (μg/g), concentración de zeaxantina (μg/L) y concentración de carotenoides totales (μg/L).