



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Orientación Biotecnología

Identificación y caracterización de bacterias antárticas productoras de pigmentos

María Florencia Risso Melazzi

Orientadora

Dra. Ing. Quim. Verónica Saravia

Co- Orientadora

Ing. Alim. María Eugenia Vila

Departamento de Bioingeniería
Instituto de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería – Udelar

Marzo 2021

Agradecimientos

A las orientadoras de este trabajo las Dras. Verónica Saravia y María Eugenia Vila por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, haber confiado en mí para desarrollar este trabajo y por sus enseñanzas durante todo este tiempo.

A todos los integrantes del Dpto. de Bioingeniería por la experiencia compartida durante este trabajo, y en especial a María Laura y Maxi por los consejos brindados y por su amistad.

A mi abuela Rosa y mi tía Tere por inspirarme desde el ejemplo.

Por último, quiero agradecer muy especialmente a mi madre y a mi hermana por su comprensión, paciencia y apoyo incondicional a lo largo de todo este camino.

Índice de contenidos

Índice de contenidos	2
Índice de figuras	4
Índice de tablas	5
Resumen.....	6
Lista de abreviaturas utilizadas.....	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Ambiente frío: la Antártida	10
1.2 Bioprospección.....	11
1.3 Pigmentos: Carotenoides	11
1.3.1 Zeaxantina.....	14
1.3.2 Pigmentos bacterianos y sus aplicaciones.....	17
1.4 Hipótesis	19
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Aislamiento de cepas	23
3.2 Identificación molecular	23
3.2.1 Extracción del ADN.....	24
3.2.2 Técnica de TP-RAPD fingerprinting	24
3.2.3 Amplificación del gen ARNr 16S y secuenciación	25
3.2.4 Alineamiento de secuencias e identificación	26
3.3 Estudio del crecimiento y producción de pigmentos	27
3.3.1 Condiciones generales de cultivo en matraces agitados.....	27
3.3.2 Estudio de la influencia de la temperatura sobre la producción de biomasa en TSB.....	27
3.3.3 Evaluación de requerimientos nutricionales para el crecimiento bacteriano	28
3.3.4 Estudio de los requerimientos de fosfato para el crecimiento bacteriano	29
3.3.5 Estudio de fuentes de carbono	30
3.3.6 Estudio de los pigmentos.....	30
3.3.6.1 Análisis de los extractos metanólicos por HPLC	31
3.3.7 Diseño factorial.....	32
3.4 Cálculos	33
3.4.1 Análisis estadístico	34

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1	Aislamiento de cepas	36
4.2	Identificación molecular	37
4.2.1	<i>Secuenciación del gen ARNr 16S y análisis filogenético.....</i>	<i>37</i>
4.3	Estudio de las condiciones de cultivo para producción de biomasa y carotenoides.....	39
4.3.1	<i>Estudio del efecto de la temperatura en el crecimiento bacteriano en TSB.....</i>	<i>42</i>
4.3.2	<i>Estudio de las condiciones de cultivo para producción de biomasa a partir de tres fuentes de carbono</i>	<i>43</i>
4.3.3	<i>Evaluación de fuentes nutricionales complejas y concentración inicial de glucosa</i>	<i>45</i>
4.3.4	<i>Evaluación de requerimientos de fosfatos.....</i>	<i>48</i>
4.3.5	<i>Análisis de los extractos metanólicos.....</i>	<i>49</i>
4.3.6	<i>Evaluación de la producción de biomasa y carotenoides de la cepa Chryseobacterium sp. P36</i>	<i>50</i>
5.	CONCLUSIONES	57
	Perspectivas	59
6.	Referencias bibliográficas	60
	ANEXOS.....	66
	Anexo 1. Curva de calibración de la cepa <i>Chryseobacterium</i> sp. P36	67
	Anexo 2. Aislamientos e identificación de bacterias pigmentadas	68
	Anexo 3. Análisis de varianza en la producción de biomasa en TSB a 20, 25 y 30°C	69
	Anexo 4. Análisis de varianza de la producción de biomasa en tres fuentes de carbono	69
	Anexo 5. Análisis de varianza fuentes nutricionales complejas	70
	Anexo 6. Análisis de varianza de la evaluación de requerimientos de fosfatos	71
	Anexo 7. Análisis de varianza del diseño experimental para el estudio de los efectos nutricionales en la producción de biomasa y carotenoides de la cepa <i>Chryseobacterium</i> sp. P36	71

Índice de figuras

Figura 1. Orientación de β -caroteno y la zeaxantina en la membrana celular.....	13
Figura 2. Estructura molecular de la zeaxantina.....	15
Figura 3. Vía de síntesis de zeaxantina (Britton et al., 1977).....	16
Figura 4. Análisis FODA de carotenoides bacterianos, adaptado de Ram et al., 2020.	19
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los patrones TP – RAPD fingerprinting obtenidos con los cebadores 879f/1522r. Carriles: 1. Cepa P1, 2. Cepa P4, 3. Cepa 103e, 4. Cepa 110c, 5 Cepa 115d, 6. Cepa 123d, 7. Cepa 123e, 8. Marcador molecular, 9. Cepa 135d, 10. Cepa 136e, 11. Cepa 139c, 12. Cepa 145c, 13. Cepa 143d, 14. Cepa 179d, 15. Cepa 184d.....	37
Figura 6. Árbol filogenético consenso de secuencias del gen ARNr 16S, obtenido por método de máxima verosimilitud basado en modelo Tamura-Nei, bootstrap:1000 réplicas	39
Figura 7. Cromatogramas de los extractos metanólicos de las cepas de estudio: a. 145c, b. 103e, c. 136e, d.184d, e. 135d, f. P1, g. 115d, h. 110c, i. P4, j. 123e, k. P36, l. P33. Condiciones: columna C30, fase móvil H ₂ O/MeOH/TBME (de 4:81:15 a 3:7:90 en 90 min), flujo 0.6 mL/min.....	40
Figura 8. a) <i>Chryseobacterium</i> sp. P36 bacilos Gram negativos (1000X), aerobio, psicrotolerante. b) Colonias amarillas, convexas, circulares y de márgenes enteros.	42
Figura 9. Evaluación del crecimiento de <i>Chryseobacterium</i> sp. P36 en 3 fuentes de carbono: glicerol, glucosa y xilosa. Resultados obtenidos de ensayos realizados por duplicado $\pm$ una desviación estándar.	43
Figura 10. Crecimiento de <i>Chryseobacterium</i> sp. P36 en medio compuesto con concentraciones variables de K ₂ HPO ₄ (0.04 g/L), K ₂ HPO ₄ (0.6 g/L), K ₂ HPO ₄ (2.5 g/L). Valores promedio $\pm$ una desviación estándar de ensayos realizados por duplicado	48
Figura 11. (a) Cromatograma de los extractos metanólicos y (b) Espectros de absorción de cada uno de los carotenoides presentes en los extractos metanólicos de la cepa <i>Chryseobacterium</i> sp. P36.....	49

Índice de tablas

Tabla 1. Pigmentos naturales producidos por bacterias, adaptado de Venil et al., 2013.....	18
Tabla 2. Cebadores empleados en TP-RAPD <i>fingerprinting</i> , amplificación por PCR del gen ARNr 16S y secuenciación de productos de PCR respectivamente.	24
Tabla 3. Condiciones de la amplificación por PCR del gen ARNr 16S	26
Tabla 4. Condiciones de cultivo para evaluar requerimientos de crecimiento	29
Tabla 5. Condiciones de cultivo del diseño factorial 2^2+1 para evaluar la importancia de la glucosa y la peptona en la producción de biomasa y el contenido de carotenoides	32
Tabla 6. Producción de biomasa en TSB a 20, 25 y 30°C	43
Tabla 7. Producción de biomasa, expresada en g/L	46
Tabla 8. Picos en HPLC de carotenoides producidos por <i>Chryseobacterium</i> sp. P36	50
Tabla 9. Respuestas obtenidas mediante diseño experimental factorial 2^2+1 luego de 48.5 h de cultivo incubado a 20°C.	51
Tabla 10. Efectos de los factores y valores <i>p</i> para: biomasa, contenido y concentración de zeaxantina y de carotenoides totales del diseño factorial 2^2+1 luego de 48.5 h de cultivo incubado a 20°C.	55
Tabla 11. Microorganismos reportados como productores de zeaxantina. Adaptada de Asker et al., 2018.	56

Resumen

Los carotenoides (carotenos y xantófilas), son compuestos isoprenoides, universalmente distribuidos. Estas moléculas liposolubles, son en su mayoría terpenos C₄₀ que protegen a la membrana plasmática frente al daño oxidativo.

La creciente demanda de carotenoides, tanto para alimentación como para la industria farmacéutica y cosmética, ha llevado a la búsqueda de formas de producción alternativas. La producción de carotenoides a partir de microorganismos constituye una alternativa atractiva, ya que puede llevarse a cabo controlando y optimizando condiciones de crecimiento.

En este trabajo se realizó la bioprospección de microorganismos antárticos con potencial biotecnológico para producir carotenoides, en especial xantófilas. Se partió de un grupo de 16 cepas preseleccionadas en función de su pigmentación (tonalidades amarillo-anaranjado), reduciéndose el grupo de trabajo a 12 cepas diferentes mediante el uso de técnicas de *fingerprinting* (TP-RAPD). Dichas cepas fueron identificadas y agrupadas en los géneros: *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Planococcus* y *Salinibacterium*.

Se seleccionaron, en función del perfil cromatográfico por HPLC, las cepas productoras de zeaxantina, debido a su interés comercial. En este trabajo se estudiaron los efectos de la temperatura y diferentes factores nutricionales (glucosa, peptona, extracto de levadura, fosfatos y NH₄Cl) sobre el crecimiento de la cepa *Chryseobacterium* sp. P36. Posteriormente, dada la importancia de las fuentes de carbono y nitrógeno en el crecimiento bacteriano, se llevó a cabo el estudio mediante un diseño factorial 2²+1, de estos factores sobre la producción de biomasa y carotenoides.

La evaluación conjunta de la glucosa y la peptona permitió evidenciar un efecto positivo de la peptona sobre el crecimiento al contrario de la glucosa, la cual a altas concentraciones inhibe el crecimiento bacteriano. Correspondiendo los valores máximos de crecimiento y concentración de carotenoides totales a 3.2 ± 0.1 g/L y 15.1 mg/L respectivamente luego de 48.5 h de cultivo a 20°C, pH 7.0, en un medio con 5 g/L glucosa y 11 g/L de peptona.

A partir de los resultados obtenidos resulta de gran interés profundizar en el estudio de la producción de zeaxantina por la cepa *Chryseobacterium* sp. P36, utilizando otras fuentes de carbono y nitrógeno renovables y económicas, así como también el escalado a biorreactores utilizando un medio optimizado que permita maximizar los niveles de producción.

Lista de abreviaturas utilizadas

BLASTn: *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*

FODA: Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas

h: Horas

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

MeOH: Metanol

min: minutos

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

nm: nanómetros

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

TBME: Metil ter-butil éter

TP-RAPD: *Two primers random amplified polymorphic DNA*

TSA: Agar Triptona de Soja

TSB: Caldo Triptona de Soja

1.1 Ambiente frío: la Antártida

Los ambientes fríos representan la mayoría de la biosfera en la Tierra y han sido exitosamente colonizados por microorganismos psicrófilos que son capaces de crecer a bajas temperaturas, sobrevivir y mantener actividades metabólicas a temperaturas inferiores a cero (subcero) (Margesin et al., 2011). La Antártida es considerada el hábitat más frío y seco de la Tierra. Se encuentra cubierto casi en su totalidad por nieve y hielo y recibe altos niveles de radiación solar (Carrasco et al., 2012). La región subantártica, que comprende el Archipiélago Shetland del Sur, tiene temperaturas más altas respecto a la región continental, los suelos próximos al mar están libres de hielo y nieve y reciben cantidades significativas de materia orgánica, sin embargo, están sujetos a ciclos de congelamiento- descongelamiento lo que implica restricciones y estrés para el desarrollo de la vida (Smith, 2002).

Los microorganismos que habitan el continente antártico y la región subantártica sobreviven en condiciones climáticas severas, de déficit de nutrientes y alta incidencia de la radiación ultravioleta estacional, incrementada por la disminución de la capa de ozono sobre la Antártida (Margesin et al., 2011; Uchino et al., 1999). Ésta es una de las formas más dañinas de radiación que alcanza la superficie terrestre, consecuentemente regula la supervivencia de los organismos y el equilibrio ecosistémico (Cockell et al., 1999; Dieser et al., 2010). Para enfrentar el daño provocado por la radiación UV los microorganismos han desarrollado diversas estrategias que incluyen mecanismos: de reparación del ADN, de protección frente a intermediarios tóxicos y la utilización de compuestos que absorben radiación UV, como los pigmentos (Reis-Mansur et al., 2019).

1.2 Bioprospección

Condiciones ambientales extremas, estacionalidad y aislamiento han contribuido a los ejemplos más impresionantes de selección natural y adaptación en el planeta. Algunas regiones del continente antártico muestran cambios de temperaturas y condiciones ambientales más drásticos como respuestas al cambio climático. La supervivencia en el ambiente antártico de microorganismos es consecuencia de la selección ecológica y de adaptaciones evolutivas que se expresan a niveles genéticos, metabólicos, estructurales y fisiológicos (Cowan et al., 2014).

La bioprospección de microorganismos y sus interacciones con factores bióticos y abióticos en estos ambientes extremos puede realizarse con distintos fines, pudiendo estos ser utilizados en el desarrollo de estrategias de biorremediación, evaluación de manejo de suelos y procesos biotecnológicos promisorios desde el punto de vista tecnológico. El cultivo de microorganismos antárticos constituye una herramienta fundamental para la comprensión de procesos fisiológicos, la identificación taxonómica de nuevos organismos y el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas (Vardhan Reddy et al., 2009).

1.3 Pigmentos: Carotenoides

Los pigmentos naturales obtenidos a partir de plantas, insectos y animales han sido los colorantes utilizados desde la prehistoria. A partir del siglo XIX, y hasta la fecha, los pigmentos sintéticos han reemplazado a los pigmentos naturales a pesar de los riesgos y efectos adversos que implican para los animales y el ambiente. Tanto pigmentos naturales como colorantes sintéticos han sido extensamente utilizados en los más diversos campos, ejemplo de ello son la producción de alimentos, industrias textiles,

producción de papel e investigación tecnológica. Los pigmentos naturales no solamente tienen la capacidad de aumentar el valor agregado de los productos, sino que también confieren beneficios para la salud de sus consumidores ya que presentan actividades biológicas como antioxidantes y agentes anticancerígenos (Malik et al., 2012).

Los carotenoides constituyen una de las clases más diversas de productos naturales conocidos. En 2017, aproximadamente 1183 carotenoides naturales de 683 fuentes (Archaea 8, Bacteria 170 y Eukarya 505) habían sido descritos (Yabuzaki, 2017). Son pigmentos lipofílicos, en su mayoría terpenos C_{40} formados por condensación de unidades isoprenoides, que forman una serie de dobles enlaces que constituyen el sistema cromóforo. Absorben la luz en el rango 400 - 550 nm, lo que se corresponde con su coloración amarilla/anaranjada característica. Su localización en la célula se restringe a porciones integrales de membranas citoplasmáticas bacterianas y paredes celulares, como se muestra en la Figura 1. La localización y orientación de los carotenoides en la membrana celular refuerza su flexibilidad, fuerza mecánica y rigidez, además de protegerla frente al daño oxidativo de radicales O_2 y peróxidos (Ram et al., 2020). Los pigmentos carotenoides están universalmente distribuidos, presentes en sistemas fotosintéticos de plantas superiores, algas y bacterias fototróficas. Mientras que en los organismos no fotosintéticos los carotenoides son importantes en la protección frente al daño fotooxidativo. Consecuentemente, muchas bacterias no fototróficas y hongos dependen de los carotenoides para protegerse al crecer en condiciones de abundante luz y oxígeno (Britton et al., 1995).

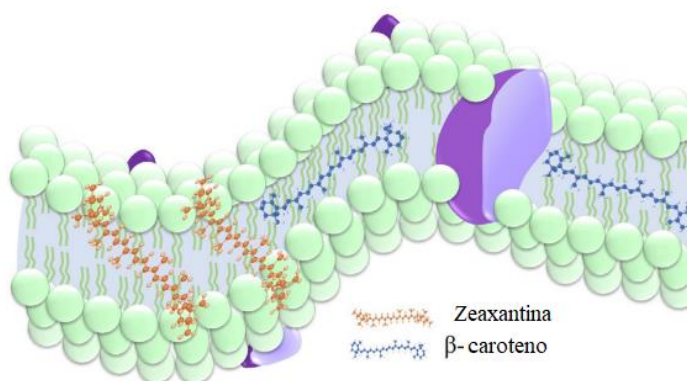


Figura 1. Orientación de β -caroteno y la zeaxantina en la membrana celular

(Adaptado de Ram et al., 2020)

Estos pueden clasificarse de acuerdo con sus características químicas y nutricionales. Químicamente los carotenoides se clasifican como: (1) carotenos o hidrocarburo carotenoides, compuestos únicamente de carbono e hidrógeno, que son lineales o ciclados en uno o ambos extremos de la molécula como por ejemplo el licopeno y el β -caroteno; y las (2) xantófilas o carotenoides oxigenados, estos pueden presentar grupos epoxi, hidroxilo, carbonilo, ácido carboxílico. Todas las xantófilas producidas por plantas superiores, como la violaxantina, neoxantina, anteraxantina, zeaxantina y luteína, también son sintetizadas por algas verdes (Jin et al. , 2003; Sajilata et al., 2008). Según sus propiedades nutricionales los carotenoides se clasifican como: provitamina A (β -caroteno, β -criptoxantina y α -caroteno), no precursores de vitamina A (licopeno, luteína y zeaxantina) y cetocarotenoides (astaxantina y cantaxantina) (Maldonade et al., 2007; Jayaraj et al., 2008).

Los carotenoides pueden extraerse a partir de plantas, algas y animales, obtenerse por síntesis química y también pueden ser biosintetizados por microorganismos (Zhang et al., 2018). Astaxantina, cantaxantina, β -caroteno, luteína, licopeno y zeaxantina son

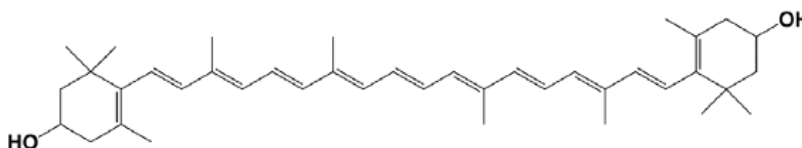
los carotenoides de mayor valor en el mercado por sus usos en suplementos alimenticios y farmacéuticos. En 2014, los carotenoides obtenidos industrialmente por síntesis química constituyeron el 76% del mercado con valores de venta comprendidos entre \$250 y \$2000/Kg, dólares americanos por Kg, en tanto que el restante 24% está constituido por carotenoides naturales obtenidos por extracción y fermentación con valores de comercialización que oscilan entre \$350 y 7500/Kg (*Carotenoids Market, DEINOVE*, <http://www.deinove.com/en/profile/strategy-and-markets/carotenoids-market>, acceso febrero 2020). El crecimiento del mercado global de carotenoides en los últimos años ha sido muy significativo, estimaciones proyectan que éste alcanzará los \$2.0 billones para el 2022, proyecciones basadas en una tasa de crecimiento anual (CAGR) de 5.7% (período 2017-2022) (*BCC Research, The Global Market for Carotenoids*, 2018. <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html> acceso abril 2020).

La creciente demanda de estos pigmentos, tanto para alimentación humana y animal, como para la industria farmacéutica y cosmética, ha llevado a la búsqueda de formas alternativas de producción. El desarrollo de cepas bacterianas que utilicen sustratos renovables y económicos contribuirá a que los precios de los pigmentos naturales sean competitivos respecto a los pigmentos sintéticos ya que reducirán los costos de producción.

1.3.1 Zeaxantina

La zeaxantina, (3,3'-dihidroxi β -caroteno), es una xantófila ampliamente distribuida en la naturaleza y fue originalmente identificada en el maíz. Está presente en organismos multicelulares fotosintéticos, como los vegetales verdes, flores, frutos y bayas de Goji.

La zeaxantina presenta nueve enlaces conjugados. Este sistema constituye el cromóforo de absorción de luz que otorga a los carotenoides su coloración característica, brindando un espectro de absorción característico que permite su identificación y cuantificación. La zeaxantina altamente purificada es un polvo anaranjado cristalino, con escaso olor o inodoro, soluble en solventes orgánicos y lípidos, pero insoluble en agua (Sajilata et al., 2008). La fórmula molecular de la zeaxantina es $C_{40}H_{56}O_2$ y su peso molecular es 568.88Da (Figura 2).



A pesar de estar presente en órganos como el ojo humano, hígado, páncreas, vaso, riñones y ovarios, y constituir el 3% de los carotenoides totales en suero, los seres humanos no presentan una vía de biosíntesis para la zeaxantina, debiendo ser obtenida a través de la dieta (Wu et al., 2015). La zeaxantina es vital en la prevención de enfermedades asociadas al envejecimiento ocular como la degeneración macular y las cataratas. Por sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas es ampliamente utilizada en las industrias alimenticia y farmacéutica.

15

amarillas/anaranjadas y c) la biosíntesis por microorganismos. Su producción por síntesis química es un proceso costoso en el cual la zeaxantina resultante solamente puede ser utilizada como pigmento por su escasa actividad biológica (Cataldo et al., 2016). La extracción de zeaxantina de fuentes vegetales ha evidenciado limitaciones por sus altos costos de producción en relación a los bajos rendimientos obtenidos, además de involucrar procesos poco amigables para el ambiente (Hsu et al., 2011). La síntesis de zeaxantina por microorganismos involucra materias primas más baratas y al ocasionar menor impacto ambiental constituye una alternativa más sustentable para su producción. Hasta el momento la producción natural de zeaxantina ha sido reportada en bacterias y microalgas, en tanto que involucrando ingeniería genética los microorganismos más reportados son *Escherichia coli* y levaduras (Zhang et al., 2018).

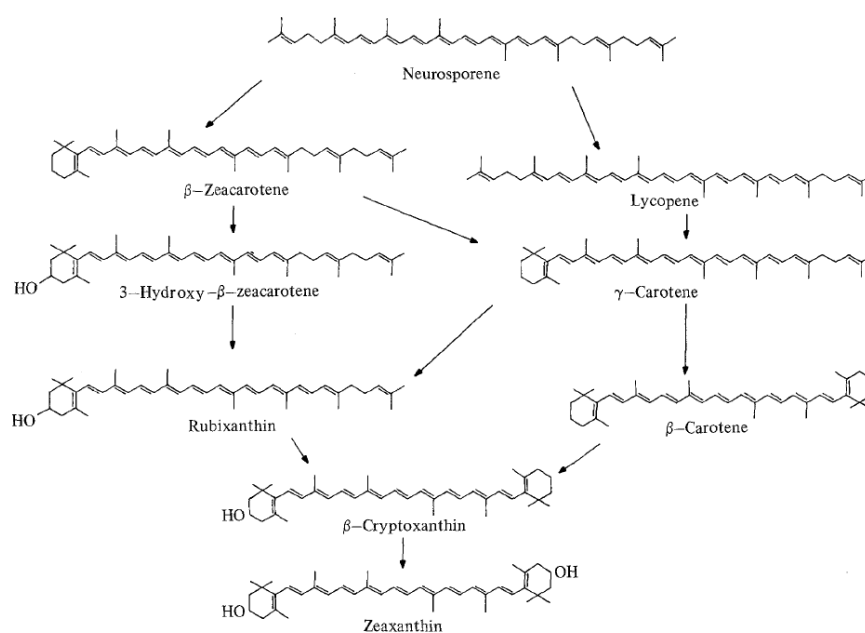


Figura 3. Vía de síntesis de zeaxantina (Britton et al., 1977)

Muchas bacterias que acumulan zeaxantina como carotenoide predominante han sido aisladas. Estas cepas pertenecen principalmente a los géneros *Flavobacterium* y

Paracoccus. La familia *Flavobacteriaceae* es una de las principales fuentes bacterianas de producción de zeaxantina (Zhang et al., 2018). En la Figura 3 se muestran los intermediarios en la vía de síntesis de zeaxantina de *Flavobacterium* R1560 (Britton et al., 1977).

1.3.2 Pigmentos bacterianos y sus aplicaciones

El cambio de paradigma mundial hacia la utilización de productos naturales, obtenidos a través de procesos amigables con el ambiente ha contribuido a aumentar la demanda global de pigmentos extraídos de fuentes naturales, con el fin de sustituir aquellos obtenidos a través de síntesis química. Consecuentemente uno de los campos emergentes de la investigación actual es la producción de pigmentos bacterianos, en la Tabla 1 se detallan los pigmentos naturales más relevantes y algunas de sus aplicaciones (Venil et al., 2013).

Tabla 1. Pigmentos naturales producidos por bacterias, adaptado de Venil et al., 2013

Bacteria	Pigmentos/ Moléculas	Color	Aplicaciones
<i>Agrobacterium aurantiacum</i> , <i>Paracoccus carotinifaciens</i> , <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Rosa	Suplemento alimenticio
<i>Rhodococcus maris</i>	β -caroteno	Rojo azulado	Reduce el riesgo de cáncer de mama
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Indigoidina	Azul	Protección contra estrés oxidativo
<i>Rugamonas rubra</i> , <i>Streptovorticillium rubrireticuli</i> , <i>Vibrio gaogenes</i> , <i>Alteromonas rubra</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia rubidaea</i>	Prodigiosina	Rojo	Anticancerígeno, inmunosupresor, antifúngico, alguicida; colorante (textil, velas, papel, tinta)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Piocianina	Azul verdoso	Metabolismo oxidativo
<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Janthinobacterium lividum</i>	Violaceína	Violeta	Farmacéutica (inmunomodulador, antitumoral, actividad antiparasitaria); tintura (textiles), cosmética
<i>Flavobacterium</i> sp., <i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Zeaxantina	Amarillo	Tratamiento de múltiples afecciones, principalmente oculares
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Xantomonadina	Amarillo	Marcadores quimiotaxonómicos y diagnóstico

En la Figura 4 se plantea el análisis FODA (Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas) adaptado de Ram et al., 2020 de la producción de carotenoides de origen bacteriano. Ésta debe enfocarse especialmente en la optimización de los procesos de fermentación, búsqueda de medios de cultivo apropiados y la extracción de pigmentos puros y concentrados. El gran desafío de la producción de pigmentos de origen bacteriano es bajar los costos de producción con el fin de incrementar su aplicabilidad en la industria (Ahmad et al., 2012).

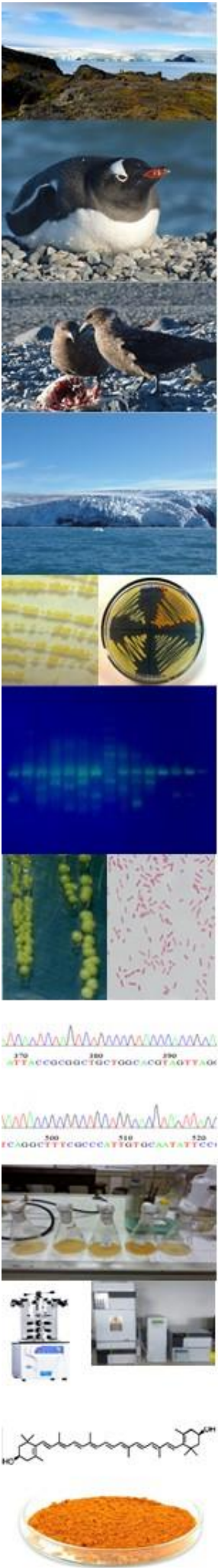


Figura 4. Análisis FODA de carotenoides bacterianos, adaptado de Ram et al., 2020.

1.4 Hipótesis

La producción de pigmentos es una estrategia bacteriana para sobrevivir en condiciones extremas, consiguientemente, en aislamientos de microorganismos antárticos es esperable encontrar cepas bacterianas productoras de carotenoides con potencial aplicación biotecnológica.

2. OBJETIVOS



2.1 Objetivo general

Estudiar el potencial de cepas bacterianas antárticas como productoras de carotenoides.

2.2 Objetivos específicos

- Aislar bacterias productoras de pigmentos. Identificar filogenéticamente los aislamientos bacterianos.
- Caracterizar los extractos metanólicos producidos.
- Estudiar la influencia de la composición de los medios de cultivo en la producción de biomasa y de carotenoides de una cepa seleccionada.



22

3.1 Aislamiento de cepas

A partir de cultivos mixtos de muestras de origen antártico recolectadas en distintos puntos de la Isla Rey Jorge, Archipiélago Shetland del Sur (Base Científica Antártica Artigas), se confirmó la pureza de las cepas, cultivándolas en medio Agar Triptona de Soja (TSA). Para ello, se realizaron repiques sucesivos de las colonias pigmentadas aisladas para obtener cultivos puros y se guardó un stock de trabajo, el cual se conservó sobre perlas de vidrio en Caldo Triptona de Soja (TSB) con glicerol al 20% y a -80°C en el cepario del Dpto. de Bioingeniería.

Para diferenciar los grupos bacterianos y confirmar la pureza de los aislamientos se realizó observación macroscópica de las colonias y examen microscópico de los cultivos, determinándose la morfología y el tamaño, mediante observación de células fijadas y teñidas. Así mismo, se evaluó el crecimiento de las cepas de interés en placas Petri con medio de cultivo TSA incubadas a cuatro temperaturas (4, 10, 24 y 37°C) por 72 h. El seguimiento de los cultivos se realizó por observación en lupa y microscopio. Los ensayos se realizaron por duplicado.

3.2 Identificación molecular

Fueron seleccionados para su identificación aquellos aislamientos en los que se detectó producción de pigmentos amarillos y anaranjados. La técnica de TP-RAPD (*Two primers random amplified polymorphic DNA*) *fingerprinting* permitió clasificar los aislamientos de estudio. Con el objetivo de determinar la identidad de los aislamientos obtenidos, se secuenciaron y analizaron los productos del gen ARNr 16S amplificados mediante PCR.

3.2.1 Extracción del ADN

La extracción del ADN genómico de las cepas se realizó a través de un kit comercial, *Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Fisher), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.2 Técnica de TP-RAPD fingerprinting

La técnica de TP-RAPD *fingerprinting*, es rápida, sensible y confiable para experimentos con un gran número de microorganismos. Ésta implica una reacción de amplificación que se llevó a cabo según Rivas et al., 2001, con los cebadores universales 879f y 1522r. Sus secuencias se presentan en Tabla 2. Los perfiles fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (2%) a 90 V. Los patrones de bandas de cada especie bacteriana son específicos, es decir que cepas pertenecientes a la misma especie comparten patrones idénticos. Las cepas que presentaron distinto perfil de bandas fueron seleccionadas para su identificación.

Tabla 2. Cebadores empleados en TP-RAPD *fingerprinting*, amplificación por PCR del gen ARNr 16S y secuenciación de productos de PCR respectivamente.

Cebador ^a	Secuencia	Referencia
879f	GCCTGGGGAGTACGGCCGCA	(Rivas et al., 2001)
1522r	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	(Rivas et al., 2001)
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(Weisburg et al., 1991)
1492r	GGTACCTTGTACGACTT	(Weisburg et al., 1991)
785f	GGATTAGATACCCTGGTA	(Weisburg et al., 1991)
907r	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	(Weisburg et al., 1991)

^a Abreviaturas de cebadores: f, *forward*; r, *reverse*. Todas las secuencias se presentan en orientación 5' a 3'.

3.2.3 Amplificación del gen ARNr 16S y secuenciación

Para estudiar la filogenia molecular de procariotas se emplean una serie de genes, siendo los más utilizados los que codifican para el ARNr 16S. Estos genes de la subunidad menor del ARN ribosomal se han utilizado ampliamente porque están universalmente distribuidos, siendo su función estable y homóloga en todos los organismos, sabiéndose además ausencia de transferencia horizontal. La presencia del gen ARNr 16S en todas las bacterias, así como la conservación universal de algunas regiones hace posible el diseño de pares de cebadores capaces de amplificar regiones específicas de prácticamente todos los genes ARNr 16S bacterianos. Al estar dichos genes suficientemente conservados, tamaño aproximado de 1500 pb, y a la vez contar con la especificidad de regiones variables es posible alinear sus secuencias y realizar la identificación de las bacterias a un nivel taxonómico suficientemente informativo (Yarza et al., 2014).

A partir de un cultivo puro de bacterias, se realiza la amplificación del fragmento del gen ARNr 16S mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR, utilizando los cebadores universales para bacterias 27f y 1492r (Weisburg et al., 1991), cuyas secuencias se detallan en Tabla 2. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Palm-1870 Cyclor TM (Corbett Research UK Ltd.) con las condiciones detalladas en la Tabla 3. Los productos de amplificación por PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (1%) a 70 V estimándose su tamaño molecular por comparación con un marcador de peso molecular (*GeneRuler Plus DNA Ladder*, ThermoScientific).

Tabla 3. Condiciones de la amplificación por PCR del gen ARNr 16S

Etapas	Duración	Temperatura (°C)	Repeticiones
Desnaturalización inicial	3 min	95	1
Desnaturalización	45 s	94	
Hibridación	45 s	58	35
Extensión	1.5min	72	
Extensión final	7 min	72	1

La secuenciación de los productos de PCR se realizó a través de la técnica de secuenciación de Sanger, por un servicio externo contratado (Macrogen Inc., Seúl, Korea), utilizando los cebadores universales 785f y 907r (ver Tabla 2).

3.2.4 Alineamiento de secuencias e identificación

Las secuencias fueron editadas utilizando el programa CHROMAS (González, 2014). Las secuencias consenso fueron obtenidas mediante el programa DNASTAR subprograma SEQMAN y posteriormente se alinearon mediante Clustal W (Thompson et al., 1994) utilizando el *software* Mega 7 (Kumar et al., 2016). Las secuencias resultantes fueron analizadas con BLASTn (Altschul et al., 1990) que permite comparar secuencias de interés con secuencias nucleotídicas almacenadas en 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>). La comparación de las secuencias de los genes ARNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas (Rodicio et al., 2004).

Para la construcción del árbol filogenético consenso de secuencias del gen ARNr 16S, se utilizó el método de máxima verosimilitud basado en modelo Tamura-Nei,

bootstrap: 1000 réplicas, además, fue determinado el apoyo estadístico de cada uno de los nodos del árbol obtenido.

3.3 Estudio del crecimiento y producción de pigmentos

El estudio del crecimiento consistió en evaluar principalmente el efecto en la producción de biomasa de distintas condiciones de cultivo (ej.: temperatura, fuentes de carbono y nitrógeno). La identificación y cuantificación de los pigmentos en los extractos se pudo realizar en los últimos ensayos.

3.3.1 Condiciones generales de cultivo en matraces agitados

A partir de cultivos stock conservados a -80°C en glicerol al 20%, las cepas fueron cultivadas en placas Petri con medio TSA e incubadas a la temperatura correspondiente por 48 h, condiciones en las cuales se obtienen las colonias del tamaño adecuado para continuar el trabajo. Posteriormente se colectaron varias colonias e inocularon matraces Erlenmeyer de 500 mL con 150 mL de medio correspondiente incubados en agitador orbital a 200 rpm, a la temperatura de estudio por 48 h. Se realizó el seguimiento del cultivo a través de medidas de absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro Genesys 10S UV-vis (Thermo Scientific). Los ensayos se realizaron por duplicado.

3.3.2 Estudio de la influencia de la temperatura sobre la producción de biomasa en TSB

Para cada desarrollo de inóculo se siguió el procedimiento descrito en 3.3.1. En este caso las placas Petri y los matraces inoculados fueron incubados a 20, 25 y 30°C respectivamente.

3.3.3 Evaluación de requerimientos nutricionales para el crecimiento bacteriano

El nitrógeno es un elemento esencial para múltiples procesos biológicos como la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas. Para evaluar la peptona y el cloruro de amonio como fuentes de nitrógeno, la glucosa como fuente de carbono y la contribución del extracto de levadura en la producción de biomasa, se cultivó *Chryseobacterium* sp. P36 en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 75 mL de medio, incubándose en agitador orbital a 20°C y 200 rpm.

Los factores evaluados fueron peptona, glucosa, extracto de levadura y cloruro de amonio y se estudió un factor a la vez. Para la variable peptona se evaluó nivel alto, medio, bajo y ausencia. El aporte del cloruro de amonio se estudió mediante presencia o ausencia. La contribución del extracto de levadura se evaluó mediante presencia, utilizándose dos concentraciones, o ausencia. En tanto que para la glucosa se evaluó nivel alto, medio y bajo. Se detallan en la Tabla 4 los valores de cada corrida.

Además, el medio de cultivo incluyó como componentes fijos: NaCl 5.0 g/L y K₂HPO₄ 2.5 g/L. Se realizaron muestreos cada 24 h realizándose el seguimiento del cultivo a través de medidas de absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro Genesys 10S UV-vis (Thermo Scientific). Los ensayos se realizaron por duplicado.

Tabla 4. Condiciones de cultivo para evaluar requerimientos de crecimiento

Glucosa (g/L)	Peptona (g/L)	Cloruro de amonio (g/L)	Extracto de levadura (g/L)
2.5	0	5	0
2.5	0	5	1
5	0	5	1
12	0	5	1
5	11	0	0
5	6	0	0
5	2	0	0
5	11	0	2
5	6	0	2
5	2	0	2

3.3.4 Estudio de los requerimientos de fosfato para el crecimiento

bacteriano

Para evaluar requerimientos de fosfato en la producción de biomasa se cultivó la cepa de *Chryseobacterium* sp. P36 según procedimiento 3.3.1. A las 24 h del desarrollo de inóculo se realizó una toma de 5 mL, volumen necesario para obtener una concentración inicial en el matraz de fermentación de 0.3 g/L. Dicho volumen se centrifugó a 6500 rpm y 4°C durante 10 min. Se descartó el sobrenadante, lavándose el pellet con suero fisiológico estéril y suspendiéndose en agitador de tubos tipo vórtex. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, descartándose el sobrenadante. Por último, se adicionaron 5 mL de medio de cultivo, utilizando la suspensión como inóculo. Para ello se cultivó *Chryseobacterium* sp. P36 en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 75 mL de medio incubándose en agitador orbital a 20°C y 200 rpm. Se reprodujo la

composición del medio TSB a partir de sus componentes evaluándose tres niveles de K_2HPO_4 .

El medio de cultivo incluyó como componentes fijos: NaCl 5.0 g/L, digerido de caseína 17 g/L, digerido de soja 3 g/L, glucosa 2.5 g/L en tanto que las concentraciones de K_2HPO_4 fueron de 0.04 g/L, 0.6 g/L o 2.5 g/L. Los ensayos se realizaron por duplicado. Se hicieron tomas de 3 mL de muestra, el seguimiento del cultivo se realizó a través de medidas de absorbancia a 600 nm (Genesys 10S UV-vis (Thermo Scientific)) por 48.5 h.

3.3.5 Estudio de fuentes de carbono

Se evaluaron las siguientes fuentes de carbono: glicerol, xilosa y glucosa. La cepa de estudio fue cultivada según procedimiento 3.3.1. El medio de cultivo utilizado fue un medio marino modificado, incluyó como componentes fijos: extracto de levadura 1 g/L, cloruro férrico 0.1 g/L, K_2HPO_4 2.5 g/L, sales marinas 10 g/L, en tanto que incluyó 5 g/L de la fuente de carbono correspondiente (glicerol/xilosa/glucosa). Se eliminó la peptona para evitar el crecimiento a partir de ella.

3.3.6 Estudio de los pigmentos

Para obtener los extractos de los pigmentos, se pesó aproximadamente 0,05 g de la biomasa previamente liofilizada. Para realizar la extracción se utilizaron 4 mL de metanol. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 13300 rpm por 5 min lo que permitió separar el extracto de la biomasa, extrayéndose el sobrenadante. El procedimiento fue reiterado hasta decoloración total de la biomasa. Los sobrenadantes resultantes fueron unificados y el solvente evaporado bajo corriente de N_2 . Los extractos se conservaron a $-20^{\circ}C$ hasta su análisis.

3.3.6.1 Análisis de los extractos metanólicos por HPLC

Con el fin de caracterizar los pigmentos producidos, las muestras extraídas se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El extracto crudo seco se disolvió en acetona y se centrifugó a 13300 rpm por 5 min. Se separó 250 μ L del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó nuevamente a 13300 rpm por 5 min. El sobrenadante de la segunda centrifugación se analizó por HPLC (HPLC Shimadzu CLASS-VP 5.04). El análisis primario en HPLC se realizó utilizando una columna C30 específica para carotenoides, fase móvil H₂O/MeOH/TBME (de 4:81:15 a 3:7:90 en 90 min), flujo 0.6 mL/min. La columna C30 es ampliamente utilizada para identificar y separar carotenoides por su eficiencia para resolver isómeros geométricos (Nunes et al., 2006) sin embargo al requerir corridas más largas (Gupta et al., 2015), se optó por profundizar el estudio de identificación y la cuantificación de los carotenoides con la columna C18. Se usó un método cromatográfico previamente descrito (Delgado-Pelayo et al., 2012) empleándose un gradiente binario de elución con una composición inicial de 75% acetona y 25% de agua desionizada, aumentando linealmente hasta 95% de acetona en 10 min, se mantuvo así por 7 min, completando el 100% en 3 min, manteniéndose posteriormente constante por 10 min. La columna fue mantenida a 25°C. El volumen de inyección fue de 10 μ L y el flujo de 0.6 mL/min. La detección y cuantificación de los carotenoides se realizó a 450 nm. La identificación de los carotenoides se realizó teniendo en cuenta los espectros UV-vis y tiempos de retención, realizándose la confirmación por coelución con estándares.

3.3.7 Diseño factorial

El diseño experimental factorial $2^2 + 1$ permitió evaluar la importancia relativa de la glucosa y la peptona en la producción de biomasa y el contenido de carotenoides. Para ello se cultivó la cepa de *Chryseobacterium* sp. P36 en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 150 mL de medio incubándose en agitador orbital a 20°C y 200 rpm. Para cada variable de estudio, los factores nutricionales fueron evaluados en un nivel de concentración alto (+), bajo (-) y tres puntos centrales. Luego de 48 h de cultivo las células fueron recolectadas por centrifugación. Los pellets fueron almacenados a -80°C y liofilizados (VirTis BenchTop 2 K Freeze Dryer, SP Industries Inc.).

En la Tabla 5 se detallan las concentraciones de glucosa (5, 10 o 15 g/L) y peptona (2, 6.5 o 11 g/L) en cada una de las corridas. Además, el medio de cultivo incluyó: extracto de levadura 2.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, K₂HPO₄ 2.5 g/L.

Tabla 5. Condiciones de cultivo del diseño factorial $2^2 + 1$ para evaluar la importancia de la glucosa y la peptona en la producción de biomasa y el contenido de carotenoides

Corrida	Glucosa (g/L)	Peptona (g/L)
1	15	11
2	5	2
3	15	2
4	5	11
5	10	6.5
6	10	6.5
7	10	6.5

La determinación del azúcar se realizó con un equipo HPLC Shimadzu CLASS-VP 5.04 utilizándose el detector de índice de refracción (RID). La concentración de glucosa

se determinó con una columna Aminex 87H a 45°C y 0.6 mL/min de flujo, utilizándose como fase móvil agua MilliQ.

3.4 Cálculos

Determinación de biomasa

Para determinar las concentraciones de biomasa se construyó la curva de calibración (ver Anexo 1)

$$[\text{Biomasa}] = \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = (0.9941 \times \text{DO}_{600\text{nm}} + 0.052) \times \text{factor dilución}$$

Determinación de glucosa

La curva de calibración para determinar la concentración de glucosa por HPLC se construyó comprendiendo un rango de concentración de 0.1 a 6 g/L.

$$y = 0.0532 + 1e^{-6} * x \quad (r = 0.9999)$$

Determinación de concentración de carotenoides en los extractos metanólicos

Para determinar las concentraciones de los carotenoides de estudio (zeaxantina, β -caroteno y β -criptoxantina) por HPLC se construyeron las curvas de calibración en un rango de concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ a 3 $\mu\text{g/mL}$

$$[\text{Carotenoides}]_{\text{extractos}} = \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) = \left(\frac{\text{Abs}_{450}}{\epsilon \times 100}\right) \times 10^6$$

(ϵ) = coeficiencite de absortividad correpondiente

Contenido de carotenoides

$$\text{Contenido de carotenoides} = \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \left(\frac{[\text{Carotenoides}]_{\text{ext}} \times \text{volumen extracción}}{\text{g}_{\text{biomasa seca}}} \right)$$

Concentración de carotenoides en medio de cultivo

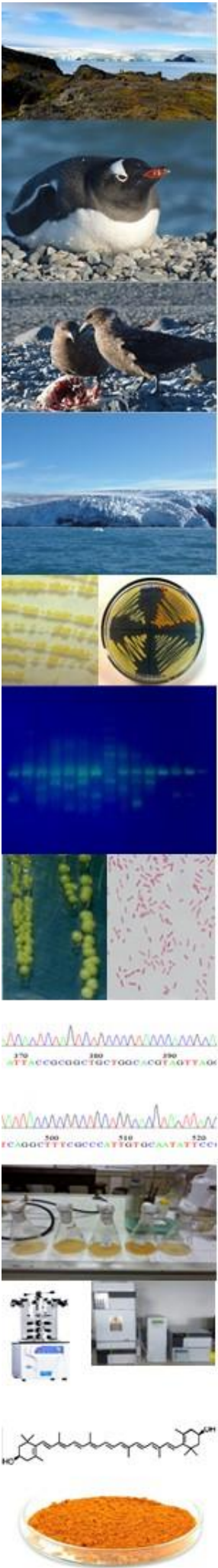
$$[\text{Carotenoides}]_{\text{medio de cultivo}} = \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (\text{Contenido} * \text{Biomasa})$$

3.4.1 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza ANOVA, de los datos experimentales para comprobar si las diferencias encontradas entre ellos eran estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) utilizando el programa InfoStat/Estudiantil versión (Di Rienzo et al., 2010).

Para el diseño factorial se utilizó el *software Statistica versión 12* (Statsoft Inc., USA).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1 Aislamiento de cepas

Se aislaron 20 cepas. Se seleccionaron para su identificación los 16 aislamientos en los que se detectó producción de pigmentos amarillos y anaranjados.

En la evaluación de crecimiento en placas a distintas temperaturas se observó crecimiento en todas las cepas a: 4, 10 y 24°C, pero no a 37°C. Por lo que son clasificadas como psicrotolerantes (Helmke et al., 2004), ya que a pesar del origen antártico estas bacterias son capaces de crecer en un rango de temperaturas superiores a 0 hasta 25°C. Si bien se observó crecimiento a 4, 10 y 24°C la velocidad de crecimiento no fue la misma a las tres temperaturas, creciendo más rápidamente a 24°C en las primeras 48h de cultivo. Estudios en regiones polares, donde la temperatura está constantemente por debajo de cero, muestran que la temperatura óptima para la actividad metabólica bacteriana es por lo menos 10 veces superior a la temperatura *in situ* (Isaksen et al., 1996). Los microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes producen enzimas con elevada actividad específica a bajas temperaturas, que pueden ser hasta 10 veces más activas a temperaturas bajas y moderadas, respecto a sus homólogas mesófilas (Margesin et al., 2011). Análisis de propiedades catalíticas, estabilidad térmica y estructurales de enzimas adaptadas al frío han demostrado que pequeños cambios en la secuencia aminoacídica confieren elevada eficiencia catalítica a temperaturas bajas y moderadas (Gerday, 2013).

4.2 Identificación molecular

4.2.1 Secuenciación del gen ARNr 16S y análisis filogenético

Se aplicó la técnica de TP-RAPD *fingerprinting* para identificar aquellos aislamientos con alta probabilidad de ser de la misma especie. Los perfiles de bandas de cada especie bacteriana son diferentes, en tanto que cepas pertenecientes a la misma especie comparten perfiles idénticos. Las cepas que presentaron distinto perfil de bandas fueron seleccionadas para su identificación. En la Figura 5 se observan los resultados del análisis de *fingerprinting* usando TP-RAPD de las cepas seleccionadas. Los perfiles de bandas de los carriles 4, 6 y 11 y 7,13 y 14, parecen presentar entre sí el mismo perfil, por lo tanto, corresponderían a la misma especie. Los perfiles restantes, considerando aquellos de las cepas P33 y P36 no mostrados en la Figura 5, son diferentes y por lo tanto corresponden a 12 especies distintas.

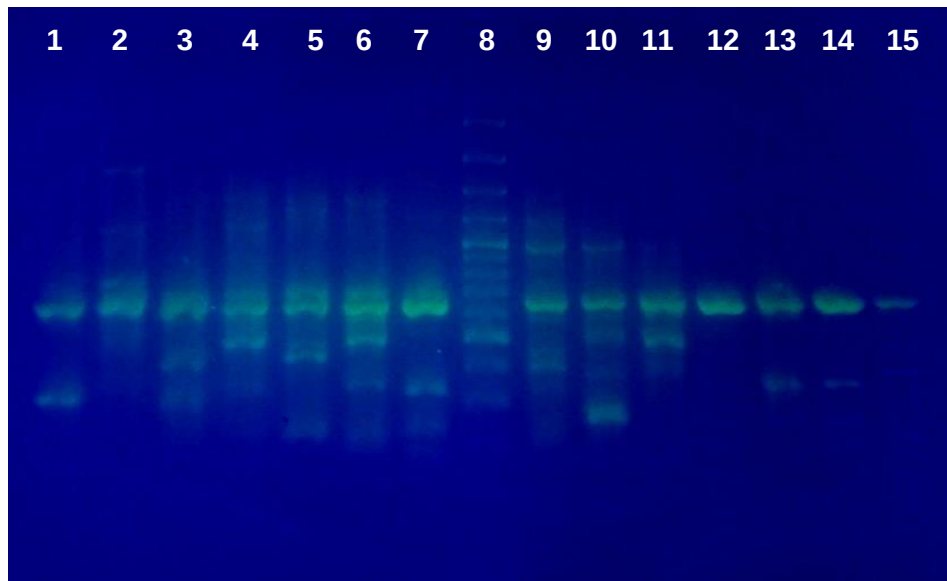


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los patrones TP – RAPD *fingerprinting* obtenidos con los cebadores 879f/1522r. Carriles: 1. Cepa P1, 2. Cepa P4, 3. Cepa 103e, 4. Cepa 110c, 5. Cepa 115d, 6. Cepa 123d, 7. Cepa 123e, 8. Marcador molecular, 9. Cepa 135d, 10. Cepa 136e, 11. Cepa 139c, 12. Cepa 145c, 13. Cepa 143d, 14. Cepa 179d, 15. Cepa 184d.

La identificación de las cepas se complementó con secuenciación del gen ARNr 16S. En la Figura 6, el análisis filogenético evidenció la presencia de los filos Actinobacteria, Bacteroidete y Firmicutes. Actinobacteria fue el filo más representado con 11 aislamientos, un aislamiento del género *Salinibacterium* y los 10 restantes del género *Arthrobacter*, mostrando un claro predominio de este género entre las cepas de estudio. Los 2 aislamientos pertenecientes al filo Bacteroidetes corresponden a los géneros *Flavobacterium* y *Chryseobacterium*. Los 3 aislamientos del filo Firmicutes pertenecen al género *Planococcus*. Todos los géneros encontrados, detallados en Anexo 2, ya habían sido descritos en la región antártica (Kim et al., 2015; Margesin et al., 2011; Yi et al., 2005) y como productores de pigmentos (Vila et al., 2019).

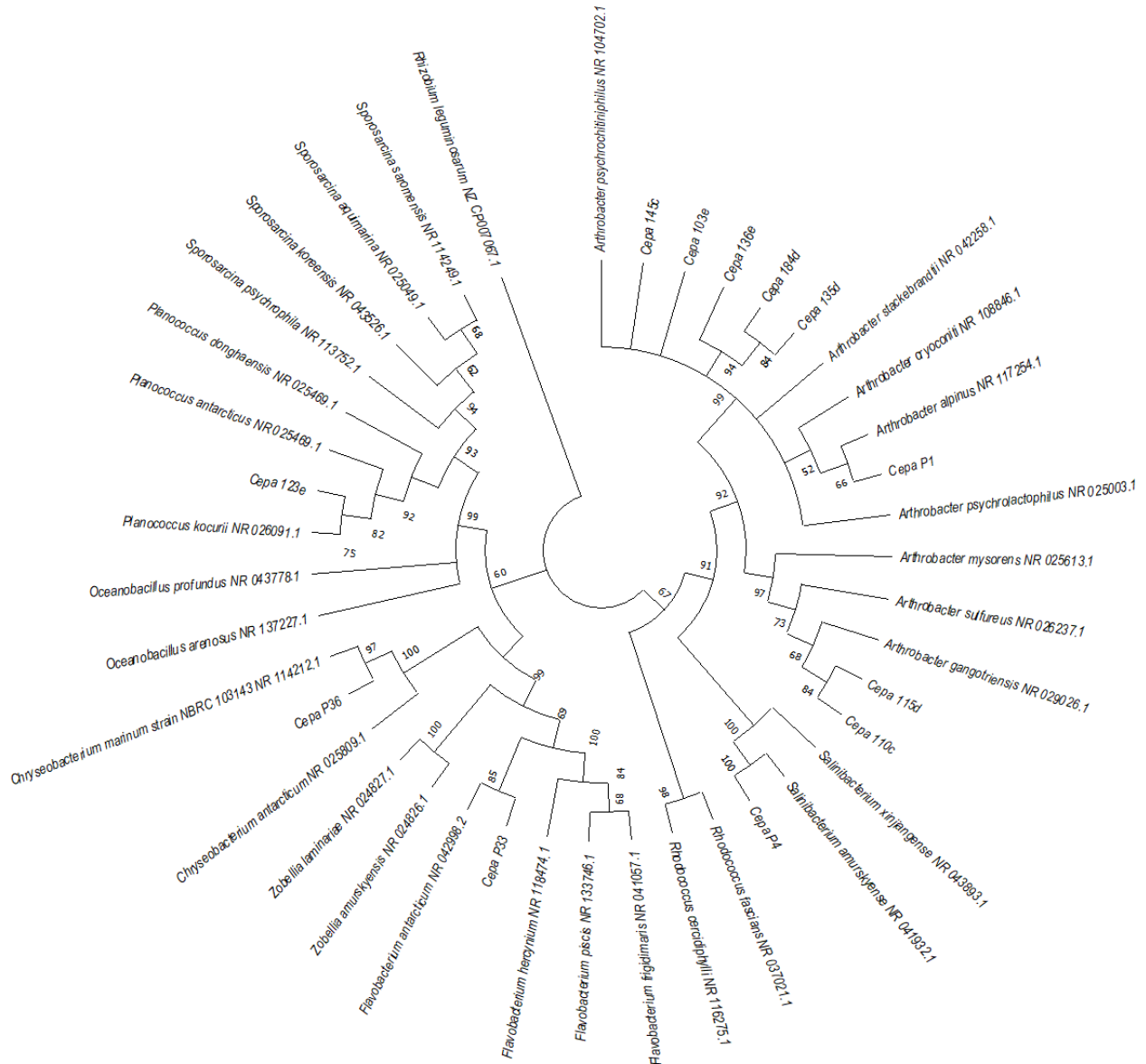


Figura 6. Árbol filogenético consenso de secuencias del gen ARNr 16S, obtenido por método de máxima verosimilitud basado en modelo Tamura-Nei, *bootstrap*:1000 réplicas

4.3 Estudio de las condiciones de cultivo para producción de biomasa y carotenoides

Para realizar la selección de la cepa de trabajo se extrajeron los pigmentos y se analizaron en HPLC. En la Figura 7 se presentan los cromatogramas obtenidos de los

12 aislamientos identificados, observándose similitudes en los tiempos de retención de los compuestos y espectros de cada pico, principalmente cuando corresponden a aislamientos del mismo género. El espectro de cada uno de los picos correspondería a carotenoides, considerando la longitud de onda de los máximos y estructura fina. No fue posible avanzar en su identificación en el presente trabajo, ya que no se contaba con estándares de todos los carotenoides o disponibilidad de realizar espectrometría de masa.

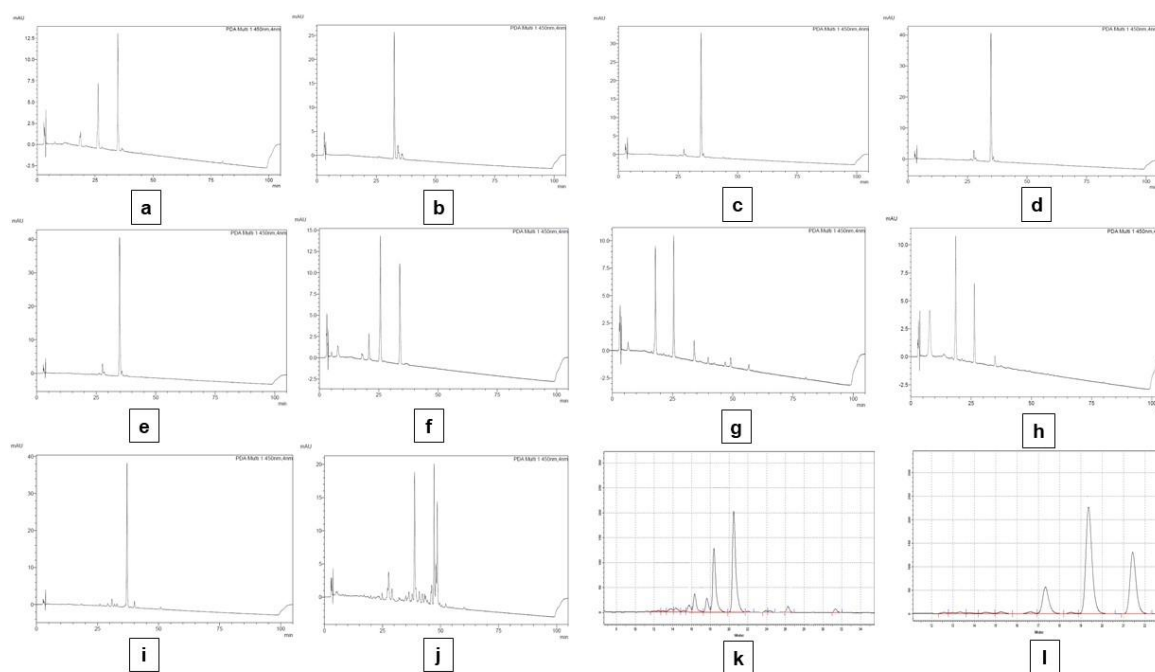


Figura 7. Cromatogramas de los extractos metanólicos de las cepas de estudio: a. 145c, b. 103e, c. 136e, d. 184d, e. 135d, f. P1, g. 115d, h. 110c, i. P4, j. 123e, k. P36, l. P33. Condiciones: columna C30, fase móvil H₂O/MeOH/TBME (de 4:81:15 a 3:7:90 en 90 min), flujo 0.6 mL/min

De acuerdo con la identificación de las cepas realizadas a nivel de género, información bibliográfica y resultados recientes del grupo del Dpto. de Bioingeniería, los carotenoides que producen son diversos. Se han reportado carotenoides del tipo C50, como sarcinaxantina, decaprenoxantina, bacterioruberina y sus derivados en el género

Arthrobacter (Marizcurrena et al., 2019). En los géneros *Flavobacterium* y *Chryseobacterium*, ha sido identificada la producción de zeaxantina, β -caroteno y β -criptoxantina. En bibliografía los géneros *Salinibacterium* y *Planococcus* han sido reportados como productores de carotenoides del tipo C30 y C50 aunque la información respecto a la identificación de dichos carotenoides aún es escasa (Vila et al., 2019).

A partir del trabajo realizado por Vila et al. 2019 fue posible identificar los carotenoides producidos por las cepas *Flavobacterium* sp. P33 y *Chryseobacterium* sp. P36. Considerando el interés en la producción de zeaxantina se continuó trabajando con las cepas que la producen.

Las cepas preseleccionadas para continuar el estudio fueron *Flavobacterium* sp. P33 y *Chryseobacterium* sp. P36, bacilos Gram negativos, aerobios y psicrotolerantes. Para ambas cepas se observaron colonias: amarillas, convexas, circulares y de márgenes enteros. En las Figura 8a y 8b es posible visualizar los bacilos Gram negativos y las colonias de *Chryseobacterium* sp. P36.

El análisis filogenético mostró que la cepa P33 presentó una homología del 96% con *Flavobacterium antarcticum* DSM 19726 en tanto que la cepa P36 presentó una homología del 98% con *Chryseobacterium marinum* NBRC 103143.

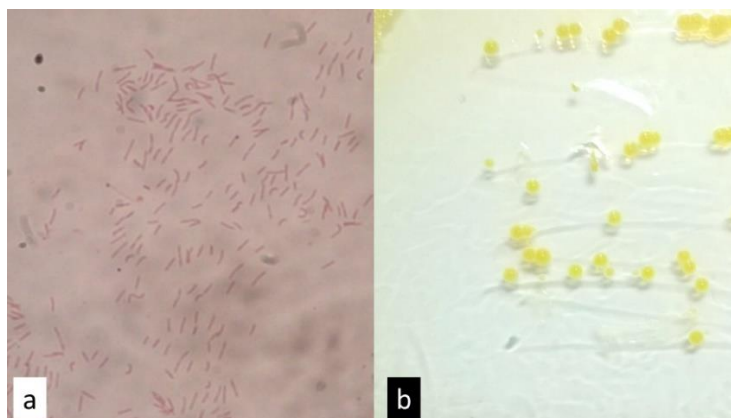


Figura 8. a) *Chryseobacterium* sp. P36 bacilos Gram negativos (1000X), aerobios, psicrotolerantes. b) Colonias amarillas, convexas, circulares y de márgenes enteros.

Se evaluó el crecimiento en medio marino de las cepas *Flavobacterium* sp. P33 y *Chryseobacterium* sp. P36. La cepa *Flavobacterium* sp. P33 no logró centrifugarse, no siendo posible obtener la biomasa por formación de exopolímero, por lo cual se continuó el estudio del crecimiento en matraces con la cepa *Chryseobacterium* sp. P36.

4.3.1 Estudio del efecto de la temperatura en el crecimiento bacteriano en TSB

Se evaluó el crecimiento en TSB, un medio rico compuesto por: digerido pancreático de caseína 17.0 g/L, digerido péptico de harina de soja 3.0 g/L, glucosa 2.5 g/L, cloruro sódico 5.0 g/L, fosfato dipotásico de hidrógeno 2.5 g/L. En la Tabla 6 se muestra la producción de biomasa en medio TSB.

De acuerdo con los resultados previamente obtenidos en placa, se evaluaron tres temperaturas, 20, 25 y 30°C, comprendidas en un rango que incluyó la máxima temperatura de crecimiento en placa (24°C), un nivel levemente inferior (20°C) y otro superior (30°C). En la condición 20°C se obtuvieron las mayores concentraciones de

biomasa, 5.3 ± 0.2 g/L. Según los resultados obtenidos en el análisis estadístico, detallados en el Anexo 3, en las corridas 1 y 2, temperaturas 20 y 25°C respectivamente, no se observó un cambio significativo en la producción de biomasa. A 30°C la concentración de biomasa fue 2.8 ± 0.9 g/L. Las bacterias psicrotolerantes tienen su óptimo crecimiento próximo a 20°C, en tanto que 25°C está próximo a la máxima temperatura de crecimiento. Por lo tanto, se define 20°C como la temperatura de trabajo y todos los ensayos siguientes fueron realizados a esta temperatura.

Tabla 6. Producción de biomasa en TSB a 20, 25 y 30°C

Temperatura (°C)	Biomasa (g/L) *
20	5.3 ± 0.2
25	4.0 ± 0.1
30	2.8 ± 0.9

*Valores promedio $\pm$ una desviación estándar de ensayos realizados por duplicado.

4.3.2 Estudio de las condiciones de cultivo para producción de biomasa a partir de tres fuentes de carbono

En la Figura 9 se muestra la producción de biomasa empleando tres fuentes de carbono: xilosa, glucosa y glicerol. En el medio con xilosa se detectó una concentración de biomasa similar a la del inóculo, evidenciando que este carbohidrato como única fuente de carbono no promueve el crecimiento de *Chryseobacterium* sp. P36.

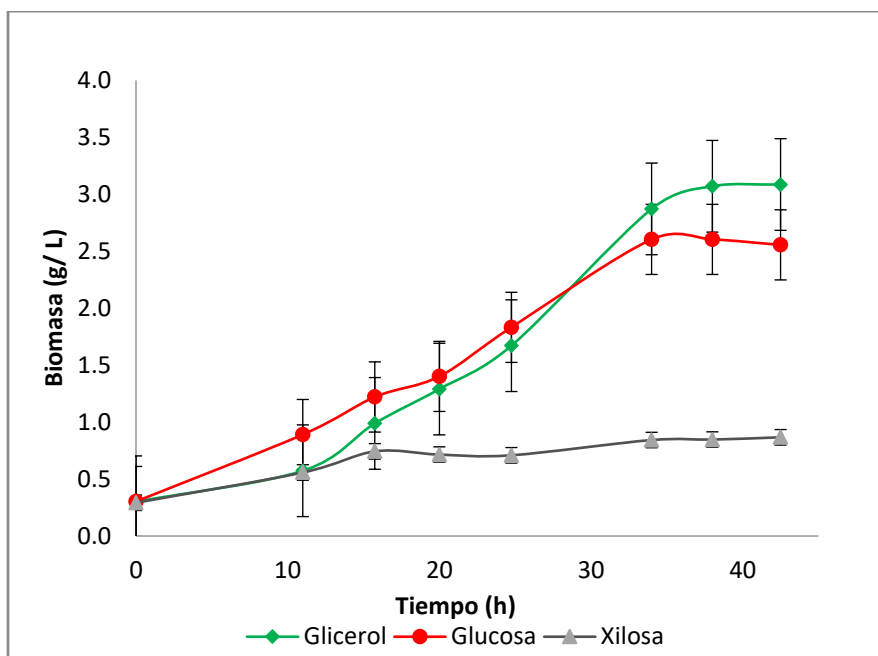


Figura 9. Evaluación del crecimiento de *Chryseobacterium* sp. P36 en 3 fuentes de carbono: glicerol, glucosa y xilosa. Resultados obtenidos de ensayos realizados por duplicado $\pm$ una desviación estándar.

En el medio con glucosa la concentración de biomasa fue de 2.6 g/L y luego de las 34 h de cultivo ya no hubo más crecimiento, por tanto, alcanzando la fase estacionaria. En el medio conteniendo glicerol la producción de biomasa fue de 3.1 g/L y la fase estacionaria fue alcanzada luego de 38 h de cultivo.

Según los resultados obtenidos en el análisis estadístico, detallados en el Anexo 4, la producción de biomasa no cambia significativamente por el uso de glicerol o glucosa como fuente de carbono. Las fuentes de carbono son necesarias para el metabolismo general de las bacterias. Considerando que la utilización de éstas es especie-específica es necesario considerar otros parámetros fisicoquímicos para la eficiente producción del producto de interés. *Chryseobacterium* sp. P36 es capaz de usar tanto glicerol como glucosa como fuentes de carbono. A pesar de que tanto glucosa como glicerol han sido estudiadas como fuentes de carbono en producción de pigmentos, se elige continuar el

estudio con la glucosa por estar reportada en bibliografía como componente de medio que favorece simultáneamente el crecimiento bacteriano y la producción de zeaxantina (Ram et al., 2020).

4.3.3 Evaluación de fuentes nutricionales complejas y concentración inicial de glucosa

A través del estudio de combinaciones de factores, se evaluaron los aportes del cloruro de amonio (NH_4Cl) y la peptona como fuentes de nitrógeno, así como la contribución del extracto de levadura y la concentración inicial de glucosa en la producción de biomasa. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos luego de 48 h de cultivo de *Chryseobacterium* sp. P36.

Según los resultados obtenidos en el análisis estadístico detallado en el Anexo 5, la producción de biomasa en las distintas condiciones experimentales muestra diferencias significativas entre sí, según el nivel de significancia propuesto. En el caso particular de las condiciones 3 y 4, y 2 y 6, entre sí, los resultados obtenidos en el análisis estadístico no generan un cambio significativo en la producción de biomasa.

Tabla 7. Producción de biomasa, expresada en g/L

Corrida	Glucosa (g/L)	Peptona (g/L)	Cloruro de amonio (g/L)	Extracto de levadura (g/L)	Biomasa (g/L)*
1	2.5	0	5	0	0.3 ± 0.0
2	2.5	0	5	1	1.2 ± 0.4
3	5	0	5	1	1.0 ± 0.0
4	12	0	5	1	1.0 ± 0.0
5	5	11	0	0	1.4 ± 0.1
6	5	6	0	0	1.1 ± 0.1
7	5	2	0	0	0.6 ± 0.1
8	5	11	0	2	3.3 ± 0.0
9	5	6	0	2	2.6 ± 0.0
10	5	2	0	2	1.8 ± 0.0

*Valores promedio ± una desviación estándar de ensayos realizados por duplicado

Los datos de la corrida 1 indican que en presencia de cloruro de amonio como única fuente de nitrógeno y glucosa (2.5 g/L), se detectó una concentración de biomasa similar a la del inóculo, evidenciando que no hubo crecimiento.

Las corridas 5 y 8, ambas con 11 g/L de peptona y 5 g/L de glucosa, pero diferenciadas únicamente por la ausencia/presencia de extracto de levadura (2 g/L), presentan una diferencia significativa de concentración de biomasa, 1.4 y 3.3 g/L respectivamente. Así mismo, las corridas 7 y 10 presentan un comportamiento similar en el crecimiento respecto a la presencia de extracto de levadura en el medio, obteniéndose 0.6 y 1.8 g/L respectivamente. Por tanto, se confirma el requerimiento de extracto de levadura como uno de los factores que afecta la concentración de biomasa.

En las corridas 8, 9 y 10, diferenciadas únicamente por los niveles de peptona en el medio, se observa que el crecimiento de *Chryseobacterium* sp. P36 es mayor al aumentar la concentración de peptona. La peptona es un complejo componente de

medios, es rica en glutamato y otros aminoácidos y es difícil de evaluar su aporte únicamente como fuente de nitrógeno al crecimiento de *Chryseobacterium* sp. P36, entendiéndose que todos sus componentes contribuyen a enriquecer el medio para la concentración de biomasa.

Si se observa la corrida 10 la concentración de biomasa resultante fue 1.8 g/L, mientras que en la corrida 5 fue 1.4 g/L a pesar de no tener extracto de levadura. Como se mencionó anteriormente, la presencia de extracto de levadura favorece la concentración de biomasa, sin embargo, en la corrida 5, la alta concentración de peptona proporcionó los nutrientes necesarios para generar una cantidad de biomasa levemente inferior. Por tanto, se desprende la existencia de un el efecto compensatorio de la peptona en ausencia de extracto de levadura.

Las corridas 2, 3 y 4, evidencian que el solo incremento de la concentración de fuente de carbono y 1 g/L de extracto de levadura como fuente de nitrógeno y micronutrientes, no se refleja en un aumento de producción de biomasa.

En las condiciones de estudio, la mayor producción de biomasa de *Chryseobacterium* sp. P36 fue 3.3 g/L en la condición glucosa 5 g/L, peptona 11g/L y extracto de levadura 2 g/L. Este estudio confirma el requerimiento de extracto de levadura para el crecimiento de *Chryseobacterium* sp. P36 y evidencia la necesidad de profundizar el estudio de la glucosa y de la peptona como parámetros de interés para la producción de carotenoides.

4.3.4 Evaluación de requerimientos de fosfatos

En la Figura 10 se muestra la producción de biomasa de *Chryseobacterium* sp. P36 evaluándose tres niveles de K_2HPO_4 . *Chryseobacterium* sp. P36 creció en las tres concentraciones de fosfatos evaluadas. En el medio con 0.04 g/L de K_2HPO_4 la producción de biomasa fue de 3.6 ± 0.2 g/L y la fase estacionaria fue alcanzada luego de 24 h de cultivo. En la concentración 0.6 g/L de K_2HPO_4 , la producción de biomasa fue de 4.3 ± 0.2 g/L en tanto que en 2.5 g/L de K_2HPO_4 la biomasa alcanzó 4.2 ± 0.5 g/L. Según los resultados obtenidos en el análisis estadístico detallado en el Anexo 6, la producción de biomasa no cambia significativamente según la concentración de fosfatos utilizadas entre los tres medios compuestos.

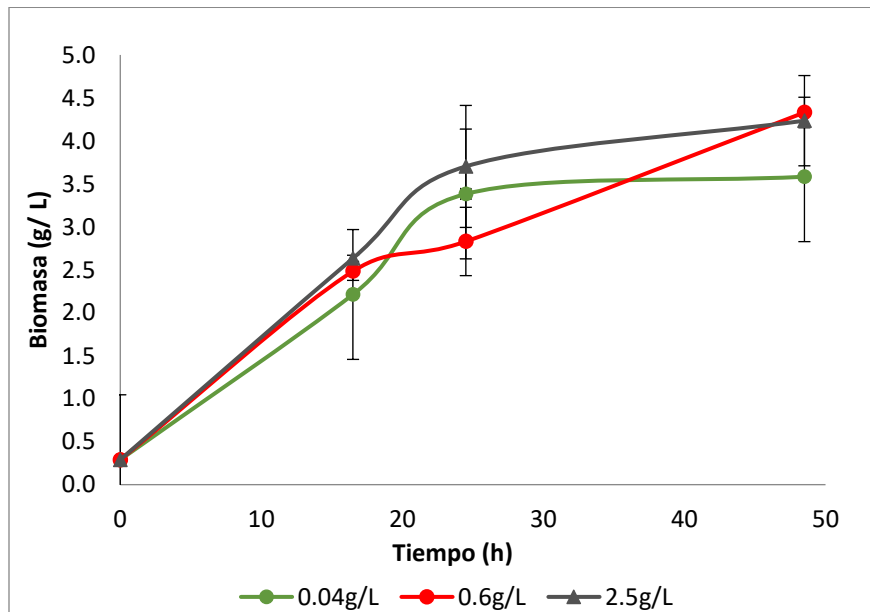


Figura 10. Crecimiento de *Chryseobacterium* sp. P36 en medio compuesto con concentraciones variables de K_2HPO_4 (0.04 g/L), K_2HPO_4 (0.6 g/L), K_2HPO_4 (2.5 g/L). Valores promedio $\pm$ una desviación estándar de ensayos realizados por duplicado

Los requerimientos de fosfatos están cubiertos con el aporte del fosfato del medio con 0.04 g/L. Sin embargo, se continuará trabajando con 2.5 g/L de K_2HPO_4 por las

propiedades amortiguadoras del buffer fosfato, lo que permite controlar posibles modificaciones del pH durante el cultivo de los microorganismos.

4.3.5 Análisis de los extractos metanólicos

Del análisis en HPLC, se pudo identificar por coelución con estándares, la presencia de β -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina en los extractos de la cepa de *Chryseobacterium* sp. P36 (ver Figura 11). Los espectros de absorción de los principales carotenoides presentes en el extracto metanólico presentan 3 máximos de absorción entre 400 y 500 nm y una estructura fina característica de compuestos carotenoides.

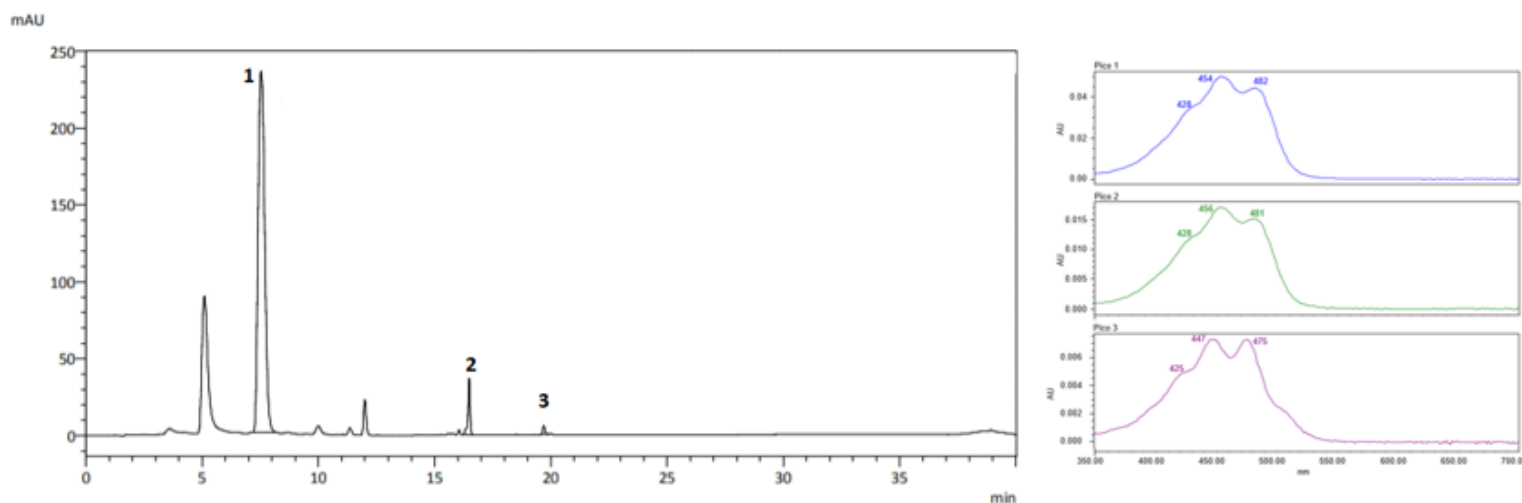


Figura 11. (a) Cromatograma de los extractos metanólicos y (b) Espectros de absorción de cada uno de los carotenoides presentes en los extractos metanólicos de la cepa *Chryseobacterium* sp. P36

En la Tabla 8 se detallan los tiempos de retención (TR) en la columna C18 HPLC y los espectros UV- visible de los carotenoides detectados. El pico 1, TR 7.53 minutos, corresponde a zeaxantina, con máximos de absorción en espectro UV-visible a 428, 454

y 482 nm. La β -criptoxantina, pico 2, TR 16.48 minutos, y con máximos de absorción en espectro UV-visible a 428, 456 y 481 nm. El pico identificado como 3, TR 19.70 minutos, corresponde a β -caroteno con máximos de absorción en espectro UV-visible a 425, 447 y 479 nm. A los 5 minutos se observó un pico que no pudo ser identificado por no disponerse de estándares para ello. Posiblemente se trate de un intermediario de la vía biosintética. Sería necesario un ensayo de MS para confirmar su naturaleza química.

Tabla 8. Picos en HPLC de carotenoides producidos por *Chryseobacterium* sp. P36

Pico HPLC	Carotenoides	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Tiempo retención HPLC (min)
1	Zeaxantina	428,454,482	7.53
2	β -criptoxantina	428,456,481	16.48
3	β -caroteno	425,447,479	19.70

4.3.6 Evaluación de la producción de biomasa y carotenoides de la cepa *Chryseobacterium* sp. P36

Los resultados obtenidos en previos ensayos mostraron la importancia de la peptona y la glucosa en el crecimiento de *Chryseobacterium* sp. P36 por eso se realizó el diseño factorial $2^2 + 1$. Esto permitió evaluar conjuntamente la importancia relativa de la fuente de carbono seleccionada, glucosa, así como la de una fuente nutricional compleja como la peptona, en la producción de biomasa y carotenoides.

Los medios de cultivo evaluados contenían además de los diferentes niveles de glucosa y peptona, otros componentes fijos: extracto de levadura, NaCl, K_2HPO_4 en las

concentraciones previamente evaluadas como apropiadas para el crecimiento de *Chryseobacterium* sp. P36.

En la Tabla 9 se detallan las respuestas del diseño experimental factorial 2^2+1 , concentración de biomasa (g/L), contenido de zeaxantina (mg/g), contenido de carotenoides totales (mg/g), concentración de zeaxantina (mg/L), concentración de carotenoides totales (mg/L) así como el consumo de glucosa (%), para los niveles de glucosa y peptona evaluados en cada una de las corridas. Tanto para el contenido como para la concentración de carotenoides totales, se consideraron los tres carotenoides previamente identificados: β -criptoxantina, β -caroteno y zeaxantina.

Tabla 9. Respuestas obtenidas mediante diseño experimental factorial 2^2+1 luego de 48.5 h de cultivo incubado a 20°C.

Corrida	Factores		Biomasa (g/L)	Consumo de glucosa (%)	Contenido (mg/g biomasa)		Concentración (mg/L)	
	Glucosa (g/L)	Peptona (g/L)			Zeaxantina	Carotenoides totales	Zeaxantina	Carotenoides totales
1	15	11	2.4 ± 0.1	24.8 ± 1.8	2.7 ± 0.1	4.1 ± 0.2	6.5 ± 0.3	9.8 ± 0.4
2	5	2	1.9 ± 0.1	51.9 ± 1.0	4.2 ± 0.0	5.3 ± 0.0	7.9 ± 0.0	10.0 ± 0.0
3	15	2	0.9 ± 0.1	8.3 ± 0.5	3.1 ± 0.2	4.4 ± 0.1	2.7 ± 0.1	3.8 ± 0.1
4	5	11	3.2 ± 0.1	81.4 ± 2.2	3.4 ± 0.1	4.7 ± 0.1	10.1 ± 0.3	15.1 ± 0.4
5	10	6.5	2.5 ± 0.1	34.4 ± 1.5	4.1 ± 0.4	5.0 ± 0.5	10.1 ± 0.9	12 ± 1
6	10	6.5	2.3 ± 0.1	34.2 ± 1.6	4.1 ± 0.0	5.1 ± 0.0	9.5 ± 0.0	11.8 ± 0.0
7	10	6.5	2.3 ± 0.1	34.7 ± 1.5	4.3 ± 0.0	5.3 ± 0.0	9.9 ± 0.0	12.1 ± 0.0

*Valores promedio $\pm$ una desviación estándar de ensayos realizados por duplicado

En la corrida 1, que incluyó nivel alto de glucosa (15 g/L) y peptona (11 g/L) la producción de biomasa fue 2.4 ± 0.1 g/L, del orden de la producida en los puntos centrales. Se detectó bajo consumo de glucosa. En la corrida 3, se detectó la menor producción de biomasa (0.9 ± 0.1 g/L) y el menor consumo de glucosa.

Al comparar los datos obtenidos en las corridas 1 y 4, y 2 y 3, en las cuales la concentración de peptona permaneció constante, ya sea en nivel alto para 1 y 4, y bajo para 2 y 3, y la concentración de glucosa se modificó, se observó cómo el incremento en la fuente de carbono afectó negativamente la concentración de biomasa. Estos resultados sugieren una inhibición por el sustrato en exceso, la glucosa.

La mayor producción de biomasa fue 3.2 ± 0.1 g/L, detectándose en la corrida 4, con nivel bajo de glucosa y nivel alto de peptona. En esta corrida se evidenció el mayor consumo de glucosa.

Considerando los resultados de producción de carotenoides, en la corrida 1 se detectaron los niveles más bajos de contenido de zeaxantina respecto al contenido de carotenoides totales. En esta corrida, el 34% de los carotenoides totales corresponden a los carotenoides identificados β -criptoxantina y β -caroteno. La presencia de cantidades significativas de β -criptoxantina y β -caroteno es congruente con lo propuesto por McDermott et al. (1973) que postularon que son intermediarios metabólicos en la vía de síntesis de la zeaxantina. Si se analizara la producción de carotenoides en instancias más tempranas del crecimiento de *Chryseobacterium* sp. P36 se esperaría que esas concentraciones fueran mayores. El alto porcentaje de zeaxantina en la composición final de los carotenoides totales respecto a la β -criptoxantina y el β -caroteno es esperable ya que estos últimos son hidroxilados a zeaxantina en las etapas terminales de crecimiento (McDermott et al. 1973). El máximo contenido de zeaxantina se detectó en los puntos centrales. Además, estos mostraron el mayor porcentaje de zeaxantina, respecto al contenido de carotenoides totales, niveles superiores al 80%, luego de 48.5 h.

Al analizar los resultados de las concentraciones de los carotenoides en el medio de cultivo, hay que considerar que su cálculo involucra multiplicar el contenido de cada carotenoide (o suma de ellos para carotenoides totales) por la concentración de biomasa. Por lo tanto, el análisis refleja el efecto global de cada factor en la producción de los carotenoides. En la corrida 3, se detectaron las concentraciones de zeaxantina y carotenoides totales más bajas. En tanto que en la corrida 4 se detectó la mayor concentración de carotenoides totales, favorecida por la concentración de biomasa producida a pesar de no ser la corrida con mayor contenido de carotenoides totales. En el rango estudiando, la mayor concentración de carotenoides totales luego de 48.5 h de cultivo para *Chryseobacterium* sp. fue 15.1 ± 0.4 mg/L, en una proporción 73: 23: 4 de zeaxantina, β -criptoxantina y β -caroteno respectivamente.

Para evaluar si las diferencias mencionadas anteriormente son estadísticamente significativas se presenta en la Tabla 10 el análisis estadístico de los factores estudiados: glucosa y peptona, y los niveles de significancia p para: biomasa, contenido y concentración de zeaxantina y de carotenoides totales.

El incremento en la concentración de peptona generó un incremento en la concentración de biomasa, en tanto que la concentración de glucosa tuvo efecto negativo sobre dicha concentración. Para la producción de biomasa ni la curvatura, ni la interacción de los factores glucosa y peptona es significativa.

Para un $p < 0.05$, el factor glucosa tiene efecto negativo, en tanto que ni la peptona, ni la interacción entre los factores de estudio tienen efecto en el contenido de zeaxantina. Para la respuesta contenido de zeaxantina la curvatura es significativa, lo que evidencia

que la región del máximo se encuentra comprendida en el entorno del punto central, condición glucosa (10 g/L) y peptona (6.5 g/L).

Para la respuesta contenido de carotenoides totales los factores de estudio, como su interacción no tienen efecto. La curvatura no es significativa para el contenido de carotenoides totales.

Para la respuesta concentración de zeaxantina ($p < 0.05$) la peptona tiene un efecto positivo, la glucosa tiene un efecto negativo, en tanto que la interacción de estos factores no tiene efecto. La curvatura es significativa para la concentración de zeaxantina.

Para la respuesta concentración de carotenoides totales ($p < 0.05$) el factor peptona tiene efecto positivo, la glucosa tiene un efecto negativo, en tanto que la interacción entre los factores de estudio no tiene efecto. La curvatura es significativa para la concentración de carotenoides totales.

Tabla 10. Efectos de los factores y valores p para: biomasa, contenido y concentración de zeaxantina y de carotenoides totales del diseño factorial $2^2 + 1$ luego de 48.5 h de cultivo incubado a 20°C.

Respuesta	Biomasa (g/L)		Contenido de zeaxantina ($\mu\text{g/g}$)		Contenido de carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$)		Concentración de zeaxantina ($\mu\text{g/L}$)		Concentración de carotenoides totales ($\mu\text{g/L}$)	
Factor	Efecto	p	Efecto	p	Efecto	p	Efecto	p	Efecto	p
Media/ Interacción	2.080	0.0005	3358.123	0.0004	4640.748	0.0005	7000.84	0.0005	9668.25	0.0001
Curvatura	0.5467	0.0632	1651.803	0.014	1039.63	0.08	5681.22	0.007	4793.90	0.006
(1) Glucosa	-0.9200	0.0104	-890.42	0.02	-752.203	0.07	-4853.02	0.004	-5788.90	0.002
(2) Peptona	1.4100	0.0045	-548.89	0.05	-4.54.7	0.2	3466.82	0.008	5510.50	0.002
1 por 2	0.1100	0.3646	168.4	0.3	99.6	0.7	344.42	0.4	396.50	0.2

* Los valores $p < 0.05$ mostraron significancia

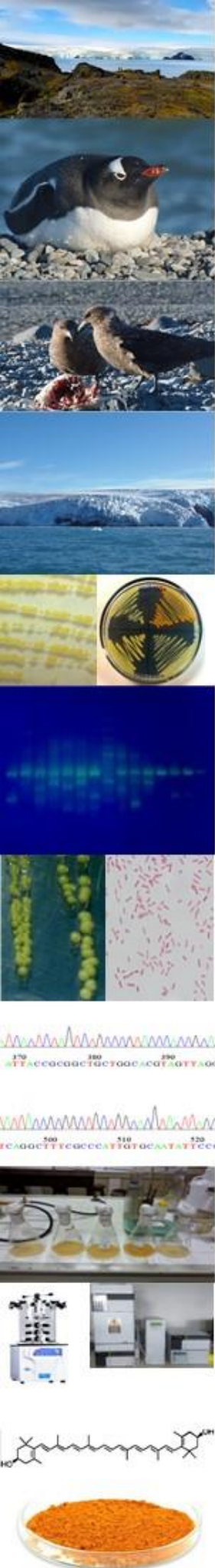
En la Tabla 11 se muestran distintas cepas reportadas en bibliografía como productoras de zeaxantina y su producción optimizada en distintos medios de cultivo. Los niveles de zeaxantina reportados en este trabajo experimental evidencian que *Chryseobacterium* sp. P36 presenta potencial como fuente microbiológica de carotenoides. Estudios de escalado en biorreactores utilizando un medio optimizado permitirán mejorar la producción de zeaxantina a partir de *Chryseobacterium* sp. P36.

Tabla 11. Microorganismos reportados como productores de zeaxantina.

Adaptada de Asker et al., 2018.

Microorganismo	Producción de zeaxantina	Referencia
<i>Flavobacterium</i> sp.	16 mg/g	(Shepherd et al., 1976)
<i>Nubsella zeaxanthinifaciens</i>	0.8 mg/g	(Asker et al., 2008)
<i>Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens</i>	0.910 mg/g	(Asker et al., 2007)
<i>Chryseobacterium</i> sp. P36	4.2 mg/g	Este trabajo

Microorganismo	Producción de zeaxantina	Referencia
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	10.6 µg/mL	(Bhosale et al., 2004)
<i>Synechocystis</i> sp.PCC 6803	0.98 µg/mL	(Lagarde et al., 2000)
<i>Chryseobacterium</i> sp. P36	10.1 µg/mL	Este trabajo



5. CONCLUSIONES

Se obtuvieron 20 aislamientos, fueron seleccionados para su identificación los 16 aislamientos en los que se detectó producción de pigmentos amarillos y anaranjados. De acuerdo con los perfiles obtenidos corresponden a 12 especies distintas. La mayoría de los aislamientos obtenidos pertenecen al género *Arthrobacter*.

Por su espectro UV-visible los pigmentos producidos fueron carotenoides. Las cepas *Chryseobacterium* sp. P36 y *Flavobacterium* sp. P33 y producen zeaxantina. Además, en la cepa *Chryseobacterium* sp. P36 fueron detectados β -caroteno y β -criptoxantina.

La evaluación conjunta de la glucosa y la peptona como componentes de medio de cultivo evidenció el efecto positivo de la peptona en la concentración de biomasa, en tanto que la concentración de glucosa tuvo efecto negativo.

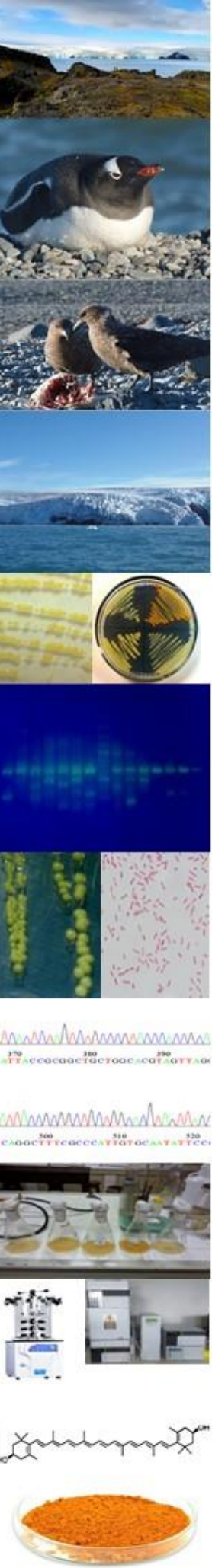
Para el contenido de zeaxantina sólo la glucosa tiene efecto, siendo éste negativo. Los factores de estudio no tuvieron efecto en el contenido de carotenoides totales. La concentración de zeaxantina como la de carotenoides totales fueron afectadas positivamente por la concentración de peptona y negativamente por la de glucosa. Los valores máximos de crecimiento y concentración de carotenoides totales correspondieron a 3.2 ± 0.1 g/L y 15.1 mg/L respectivamente luego de 48.5 h de cultivo a 20°C, pH 7.0, en un medio con 5 g/L glucosa y 11 g/L de peptona.

Chryseobacterium sp. P36 presenta potencial como fuente microbiológica de carotenoides. Los carotenoides identificados de bacterias antárticas constituyen una alternativa para aplicaciones biotecnológicas que buscan una producción más sustentable de pigmentos.

Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos resulta de gran interés profundizar en el estudio de la producción de zeaxantina por la cepa *Chryseobacterium* sp. P36, utilizando otras fuentes de carbono y nitrógeno renovables y económicas, así como también el escalado a biorreactores utilizando un medio optimizado que permita maximizar los niveles de producción.

6. Referencias bibliográficas



- Ahmad, W. A., Ahmad, W. Y. W., Zakaria, Z. A., & Yusof, N. Z. (2012). Chapter 1 Introduction. *Application of Bacterial Pigments as Colorants The Malaysian Perspective*, Ullmann 1985, 1–23. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-24520-6>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Asker, D., Awad, T. S., Beppu, T., & Ueda, K. (2018). Rapid and Selective Screening Method for Isolation and Identification of Carotenoid-Producing Bacteria. In *Microbial Carotenoids* (Vol. 1852, pp. 143–170). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_9
- Asker, D, Beppu, T, Ueda, K (2008) *Nubsella zeaxanthinifaciens* gen. nov., sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium of the family *Sphingobacteriaceae* isolated from freshwater. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:601–606
- Asker, D, Beppu, T, Ueda, K (2007) *Zeaxanthinibacter enoshimensis* gen. nov., sp. nov., a novel zeaxanthin-producing marine bacterium of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from seawater off Enoshima Island, Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:837–843
- BCC Research, The Global Market for Carotenoids, 2018. <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html>, (acceso abril 2020)
- Bhosale, P., Larson, A. J., & Bernstein, P. S. (2004). Factorial analysis of tricarboxylic acid cycle intermediates for optimization of zeaxanthin production from *Flavobacterium multivorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 623–629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02197.x>
- Britton, G. (1995) Structure and Properties of Carotenoids in Relation to Function. *FASEB Journal*, 9, 1551-1558.
- Britton, G., Brown, D. J., Goodwin, T. W., Leuenberger, F. J., & Schocher, A. J. (1977). *The Carotenoids of Flavobacterium Strain R 1560*. 7.
- Carrasco, M., Rozas, J. M., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2012). *Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island , the sub-Antarctic region*.
- Cataldo, V. F., López, J., Cárcamo, M., & Agosin, E. (2016). Chemical vs. biotechnological synthesis of C13-apocarotenoids: current methods, applications and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(13), 5703–5718. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7583-8>
- Cockell, C. S., & Knowland, J. (1999). Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 74(3), 311–345. <https://doi.org/10.1017/s0006323199005356>
- Cowan, D. A., Makhalanyane, T. P., Dennis, P. G., & Hopkins, D. W. (2014). Microbial ecology and biogeochemistry of continental antarctic soils. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00154>

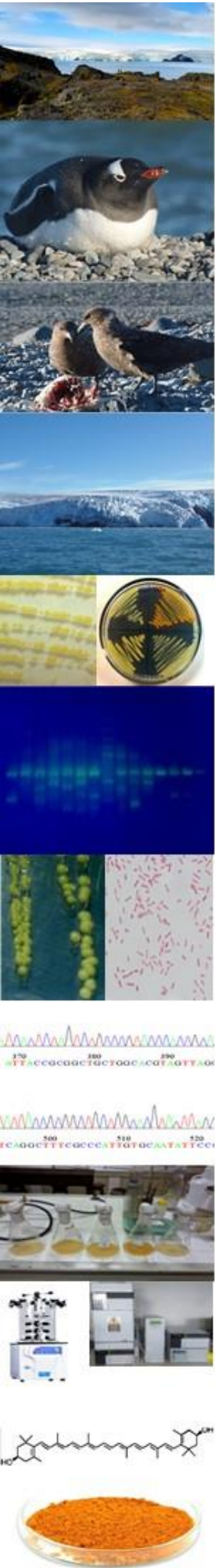
- Deinove (2020) *Carotenoids Market*, <http://www.deinove.com/en/profile/strategy-and-markets/carotenoids-market>, (acceso febrero 2020).
- Delgado-Pelayo, R., & Hornero-Méndez, D. (2012). Identification and quantitative analysis of carotenoids and their esters from sarsaparilla (*Smilax aspera* L.) berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(33), 8225–8232. <https://doi.org/10.1021/jf302719g>
- Dieser, M., Greenwood, M., & Foreman, C. M. (2010). Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 42(4), 396–405. <https://doi.org/10.1657/1938-4246-42.4.396>
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., Robledo, C.W. InfoStat versión 2010. GrupoInfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Gerday, C. (2013). *Catalysis and Protein Folding in Extreme Temperature Environments*. 2, 89–110. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27349-0>
- González, F. (2014) Guía rápida del proceso de identificación y análisis filogenético de recursos genéticos basado en la comparación de secuencias de ADN. Curso Intensivo de Postgrado. UACH, México.
- Gupta, P., Sreelakshmi, Y., Sharma, R. (2015). A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods*;11:5. doi: 10.1186/s13007-015-0051-0.
- Helmke, E., & Weyland, H. (2004). Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria--occurrence and significance in polar and temperate marine habitats. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 50(5), 553–561. <https://doi.org/10.1170/T545>
- Hsu, Y. W., Tsai, C. F., Chen, W. K., Ho, Y. C., & Lu, F. J. (2011). Determination of lutein and zeaxanthin and antioxidant capacity of supercritical carbon dioxide extract from daylily (*Heimerocallis disticha*). *Food Chemistry*, 129(4), 1813–1818. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.116>
- Isaksen, M. F., & Jørgensen, B. O. B. (1996). Adaptation of psychrophilic and psychrotrophic sulfate-reducing bacteria to permanently cold marine environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 408–414. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.408-414.1996>
- Jayaraj, J., Devlin, R., & Punja, Z. (2008). Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic Research*, 17(4), 489–501. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9120-0>
- Jin, E. S., Feth, B., & Melis, A. (2003). A Mutant of the Green Alga *Dunaliella salina* Constitutively Accumulates Zeaxanthin under All Growth Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(1), 115–124. <https://doi.org/10.1002/bit.10459>
- Kim, J. H., Kang, H. J., Yu, B. J., Kim, S. C., & Lee, P. C. (2015). *Planococcus faecalis* sp. Nov., a carotenoidproducing species isolated from stools of antarctic penguins. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(10), 3373–3378. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000423>

- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets,. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.2166/nh.2003.0008>
- Lagarde, D., Beuf, L., & Vermaas, W. (2000). Increeased Production of Zeaxanthin and Other Pigments by Application of Genetic Engineering Techniques to Synechocystis sp. Strain PCC 6803. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 64–72. <https://doi.org/10.1128/aem.66.1.64-72.2000>
- Maldonade, I. R., Scamparini, A. R. P., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2007). Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 65–70. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000100014>
- Malik, K., Tokkas, J., & Goyal, S. (2012). *Microbial Pigments : A review*. May, 361–365.
- Margesin, R., & Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 162(3), 346–361. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.12.004>
- Marizcurrena, J. J., Cerdá, M. F., & Alem, D. (2019). The Ecological Role of Micro-organisms in the Antarctic Environment. *Ecological Role of Micro-Organisms in the Antarctic Environment*, January. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-02786-5>
- McDermott, J. C. B., Britton, G., & Goodwin, T. W. (1973). Effect of inhibitors on zeaxanthin synthesis in a Flavobacterium. *Journal of General Microbiology*, 77(1), 161–171. <https://doi.org/10.1099/00221287-77-1-161>
- Nunes, I. L., & Mercadante, A. Z. (2006). Vantagens e desvantagens das colunas C18 e C30 para a separação de carotenóides por CLAE. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(4), 539–546. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000400009>
- Ram, S., Mitra, M., Shah, F., Tirkey, S. R., & Mishra, S. (2020). Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges. *Journal of Functional Foods*, 67. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103867>
- Ram, S., Tirkey, S.R., Kumar, M.A. et al. Ameliorating process parameters for zeaxanthin yield in *Arthrobacter gandavensis* MTCC 25325. *AMB Expr* 10, 69 (2020). [https://doi.org/10.1186/s13568-020-01008-4](https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1186/s13568-020-01008-4)
- Reis-Mansur, M. C. P. P., Cardoso-Rurr, J. S., Silva, J. V. M. A., de Souza, G. R., Cardoso, V. da S., Mansoldo, F. R. P., Pinheiro, Y., Schultz, J., Lopez Balottin, L. B., da Silva, A. J. R., Lage, C., dos Santos, E. P., Rosado, A. S., & Vermelho, A. B. (2019). Carotenoids from UV-resistant Antarctic *Microbacterium* sp. LEMMJ01. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45840-6>
- Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P. F., & Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, 22, 1086–1089.

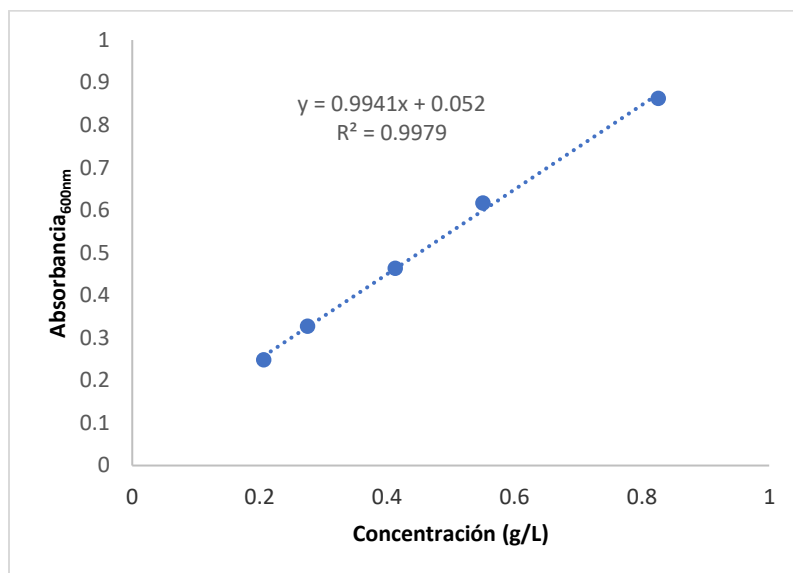
- Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 22, Issue 4, pp. 238–245). Elsevier. <https://doi.org/10.1157/13059055>
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kamat, M. Y. (2008). The carotenoid pigment zeaxanthin - A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 29–49. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00028.x>
- Shepherd, D., Dasek, J., Suzanne, M., & Carels, M. S.C. (1976) Production of zeaxanthin. US patent 3, 951, 743. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office
- Smith, V.R. Climate change in the sub-Antarctic: an illustration from Marion Island. *Clim Chang* 2002, 52:345–357.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*, 22(22), 4673–4680. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_3188
- Uchino, O., Bojkov, R. D., Balis, D. S., Akagi, K., Hayashi, M., & Kajihara, R. (1999). Essential characteristics of the Antarctic-spring ozone decline: Update to 1998. *Geophys Res Lett*, 26(10), 1377–1380. <https://doi.org/10.1029/1999GL900277>
- Vardhan Reddy, P.V., Shiva Nageswara Rao, S.S., Pratibha, M.S., Sailaja, B., Kavya, B., Manorama, R.R., Singh, S.M., Radha Srinivas, T.N., Shivaji, S.. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active enzymes from culturable bacteria associated with sediment from a melt water stream of Midtre Lovenbreen glacier, an Arctic glacier. *Research in Microbiology*. 2009 Oct;160(8):538-546. DOI: 10.1016/j.resmic.2009.08.008.
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065–1079. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.006>
- 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(2018), e00306. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00306>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Weisburg, WG*, 173(2), 697–703.
- Wu, J., Cho, E., Willett, W. C., Sastry, S. M., & Schaumberg, D. A. (2015). Intakes of lutein, zeaxanthin, and other carotenoids and age-related macular degeneration during 2 decades of prospective follow-up. *JAMA Ophthalmology*, 133(12), 1415–1424. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.3590>
- Yabuzaki, J. (2017). *Original article Carotenoids Database : structures , chemical fingerprints and distribution among organisms*. 1–11. <https://doi.org/10.1093/database/bax004>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635–645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>

- Yi, H., Oh, H. M., Lee, J. H., Kim, S. J., & Chun, J. (2005). *Flavobacterium antarcticum* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from the Antarctic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 637–641. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63423-0>
- Zhang, Y., Liu, Z., Sun, J., Xue, C., & Mao, X. (2018). Biotechnological production of zeaxanthin by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*, 71(November 2017), 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.006>

ANEXOS



Anexo 1. Curva de calibración de la cepa *Chryseobacterium* sp. P36



Anexo 2. Aislamientos e identificación de bacterias pigmentadas

La secuenciación del gen ARNr 16S permitió clasificar los aislamientos en los siguientes filos: Actinobacteria, Bacteroidete y Firmicutes. Actinobacteria fue el filo más representado con 11 aislamientos. El género *Arthrobacter*, fue predominante entre las cepas de estudio.

Aislamiento	Perfil TP-RAPD	Coloración de colonias	Género	Filo
P1		amarilla	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria
P4		amarilla	<i>Salinibacterium</i>	Actinobacteria
P33		amarilla	<i>Flavobacterium</i>	Bacteroidetes
P36		amarilla	<i>Chryseobacterium</i>	Bacteroidetes
103e		amarilla	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria
110c*	*	amarilla	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria
115d		amarilla	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria
123d	*	amarilla	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria
123e	**	anaranjada	<i>Planococcus</i>	Firmicutes
135d		amarilla	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria
136e		amarilla	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria
139c	*	amarilla	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria
143d	**	anaranjada	<i>Planococcus</i>	Firmicutes
145c		amarilla	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria
179d	**	anaranjada	<i>Planococcus</i>	Firmicutes
184d		amarilla	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria

Los aislamientos con * y ** se asumen como la misma especie por perfiles de TP- RAPD, secuenciándose uno de los aislamientos de cada grupo.

Anexo 3. Análisis de varianza en la producción de biomasa en TSB a 20, 25 y 30°C

Biomasa

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Biomasa	6	0.95	0.86	12.49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	8.20	3	2.73	11.68	0.0799
Repetición	7.47	2	3.74	15.6	0.0590
Temperatura	0.73	1	0.73	3.10	0.2201
Error	0.47	2	0.23		
Total	8.67	5			

Anexo 4. Análisis de varianza de la producción de biomasa en tres fuentes de carbono

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Biomasa	6	0.99	0.99	5.65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	5.40	3	1.80	120.07	0.0083
Fuente de carbono	5.40	2	2.70	180.11	0.0055
Repetición	0.00	1	0.00	0.00	>0.9999
Error	0.03	2	0.01		
Total	5.43	5			

Test: LSD Fisher Alfa= 0.05 DMS= 4.91914

Error: 1.3071 gl: 2

Fuente de carbono	Medias	N	E.E	
Xilosa	0.85	2	0.12	A
Glucosa	2.60	2	0.12	B
Glicerol	3.05	2	0.12	B

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

Anexo 5. Análisis de varianza fuentes nutricionales complejas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Biomasa	20	1.00	1.00	2.96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	15.17	10	1.52	839.34	<0.0001
Repetición	0.01	1	0.01	3.93	0.0787
Condición	15.17	9	1.69	932.16	<0.0001
Error	0.02	9	1.8E-03		
Total	15.19	19			

Test: LSD Fisher Alfa= 0.05 DMS= 4.91914

Error: 0.0018 gl: 9

Condición	Medias	n	E.E	
1	0.27	2	0.03	A
7	0.57	2	0.03	B
3	1.04	2	0.03	C
4	1.05	2	0.03	C
6	1.14	2	0.03	D
2	1.17	2	0.03	D
5	1.43	2	0.03	E
10	1.78	2	0.03	F
9	2.60	2	0.03	G
8	3.31	2	0.03	H

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

Anexo 6. Análisis de varianza de la evaluación de requerimientos de fosfatos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Biomasa	6	0.68	0.47	9.94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	1.02	2	0.51	3.26	0.1772
Concentración de fosfato	1.02	2	0.51	3.26	0.1772
Error	0.47	3	0.16		
Total	1.50	5			

Anexo 7. Análisis de varianza del diseño experimental para el estudio de los efectos nutricionales en la producción de biomasa y carotenoides de la cepa *Chryseobacterium* sp. P36

ANOVA

Variable: Biomasa

R² 0.99403, Adj. 0.98209

2**(2-0) diseño, MS Residual 0.0089333

DV Biomasa

Factor	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Curvatura	0.128076	1	0.128076	14.3369	0.063209
(1) Glucosa	0.846400	1	0.846400	94.7463	0.010390
(2) Peptona	1.988100	1	1.988100	222.5485	0.004463
1 por 2	0.012100	1	0.012100	1.3545	0.364562
Error	0.017867	2	0.008933		
SS Total	2.992543	6			

ANOVA

Variable: Contenido Zeaxantina (µg/g)

R² 0.98584, Adj. 0.95753

2**(2-0) diseño, MS Residual 16457.16

DV contenido Zeaxantina

Factor	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Curvatura	1169338	1	1169338	71.05343	0.013784
(1) Glucosa	792849	1	792848	48.17647	0.020132
(2) Peptona	301281	1	301280	18.30694	0.050520
1 por 2	28359	1	28359	1.72322	0.319688
Error	32914	2	16457		
SS Total	2324755	6			

ANOVA

Variable: Contenido carotenoides totales (µg/g)

R² 0.93401, Adj. 0.80202

2**(2-0) diseño, MS Residual 44007.28

DV: contenido carotenoides totales (µg/g)

Factor	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Curvatura	463216	1	463215.9	10.52589	0.083304
(1) Glucosa	565810	1	565809.6	12.85718	0.069739
(2) Peptona	206749	1	206749.2	4.69807	0.162500
1 por 2	9921	1	9920.8	0.22544	0.681724
Error	88015	2	44007.3		
SS Total	1333710	6			

ANOVA

Variable: Concentración zeaxantina (µg/L)

R² 0.99608, Adj.: 0.98824

2**(2-0) diseño, MS Residual 97464.76

DV: Concentración zeaxantina (µg/L)

Factor	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Curvatura	13832675	1	13832675	141.9249	0.006972
(1) Glucosa	23551755	1	23551755	241.6438	0.004113
(2) Peptona	12018876	1	12018876	123.3151	0.008012
1 por 2	118622	1	118622	1.2171	0.384925
Error	194930	2	97465		
SS Total	49716856	6			

ANOVA

Variable: Concentración carotenoides totales (µg/L)

R² 0.9985, Adj.: 0.99549

2**(2-0) diseño, MS Residual 55627.27

DV: Concentración carotenoides totales (µg/L)

Factor	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Curvatura	9849205	1	9849205	177.0571	0.005600
(1) Glucosa	33511363	1	33511363	602.4269	0.001656
(2) Peptona	30365610	1	30365610	545.8763	0.001827
1 por 2	157212	1	157212	2.8262	0.234760
Error	111255	2	55627		
SS Total	73994645	6			