

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Optimización de la producción de carotenoides por
haloferax sp. utilizando el método de superficie de
respuesta**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico - Farmacéutico

AUTOR

Alvaro Javier Arias Bautista

Lima – Perú

2014

Esta tesis ha sido financiada por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos según número de proyecto 120400017 y Resolución Rectoral N°03954-R-12 de fecha 23 de julio del 2012.

*A mi madre, Sara Bautista Pérez,
por todo el amor, sacrificio y perseverancia.*

*A mi familia, en especial, a mis tíos Walter y Lita,
por su apoyo incondicional.*

*A mi compañera y amiga, Jackie, por apoyarme en
cada uno de mis proyectos.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luisa Negrón Ballarte, por sus enseñanzas, confianza y apoyo incondicional brindado durante la realización de esta investigación.

A la Dra. Amparo Zavaleta Pesantes, por su apoyo incondicional y permitir la realización de esta investigación en el laboratorio a su cargo.

A los miembros del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en especial a Abad Hurtado, quienes colaboran con la presente investigación y por los gratos momentos compartidos en el laboratorio.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a cada uno de sus miembros, que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

YE:	Extracto de levadura
SW:	Agua de sales
RSM:	Método de superficie de respuesta
IPP:	Isopentil pirofosfato
DMAP:	Dimetilalil difosfato
MEP:	2-C-metil-D-eritriol-fosfato
HMG-CoA:	3-hidroxi- 3-metilglutaril coenzima A
HMGR:	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
MVP:	5-fosfomevalonato
MVPP:	5-difosfomevalonato
PMD:	5-difosfomevalonato descarboxilasa
GGDP:	Difosfato de geranilgeranil
PDS:	Fitoeno desaturasa
ZDS:	ζ-caroteno desaturasa.
NFZ:	Norflurazón
Crtl:	Fitoeno desaturasa bacteriana
LCY- β:	Enzima β-ciclasa
LCY- ε:	Enzima ε-ciclasa
S-DGD-1:	Sulfato de manosilglucosilglicerol dieter
G+C:	Guanina + citosina

RESUMEN

El objeto del presente trabajo fue la producción de carotenoides en *Haloferax sp.* (W2), que es una arquea halófila extrema aislada de las salineras de Huacho. Asimismo, se buscó optimizar la producción de estos carotenoides mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM, Response Surface Method) para determinar los factores óptimos de producción de carotenoides como son: temperatura, concentración salina, concentración de extracto de levadura (YE), pH y concentración de inóculo, los cuales se verificaron experimentalmente con el fin de mejorar la producción de carotenoides en términos de rendimiento y costo. La producción se llevó a cabo a escala de matraces en medio agua de sales (SW) suplementado con YE durante 7 días en un agitador de tipo vaivén a 100 rpm. Para la optimización y análisis estadístico se empleó el programa informático Minitab 16. El sistema experimental consistió de dos etapas, primera, un diseño factorial donde se determinó: la temperatura, la concentración de SW, la concentración de YE y pH. Luego se realizó un diseño central compuesto para determinar las condiciones óptimas de rendimiento de carotenoides. *Haloferax sp.* (W2) produjo 44,98 mg/L de carotenoides totales a las siguientes condiciones de cultivo: YE 10,08 g/L, SW 18,50%, pH 6,12 y 34,5 °C.

Palabras clave: carotenoides, *Haloferax sp.*, optimización, superficie de respuesta.

SUMMARY

The purpose of this work was the production of carotenoids from *Haloferax sp.* (W2), which is an extreme halophile archaea isolated from the salt mines of Huacho. It also sought to optimize the production of these carotenoids by the response surface method (RSM) to determine optimal production factors of carotenoids such as temperature, salt concentration, concentration of yeast extract (YE), pH and concentration of inoculum, which are experimentally verified in order to improve production of carotenoids in terms of performance and cost. Production is carried out at scale of flasks in salt water medium (SW) supplemented with YE for 7 days on a reciprocating shaker at 100 rpm rate. Minitab 16 software was used for optimization and statistical analysis. The experimental setup consisted of two stages, first, a factorial design which determined: temperature, SW concentration, YE concentration and pH. Then a central composite design was performed to determine the optimum conditions of efficiency of carotenoids. *Haloferax sp.* (W2) yields 44.98 mg/L of total carotenoids in the following culture conditions: 10.08 g/L YE, 18.50% SW, 6.12 pH, and 34.5 ° C.

Keywords: carotenoids, *Haloferax sp.*, optimization, response surface.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ANEXOS

I.	INTRODUCCIÓN	1
	Objetivos	3
II.	MARCO TEÓRICO	
	II.1 Antecedentes en la producción de carotenoides de fuente microbiana	4
	II.2 Ambientes hipersalinos	5
	II.3 Carotenoides microbianos	6
	II.4 Género Haloferax	9
	II.5 Producción de carotenoides	10
	II.6 Condiciones que determinan la producción de carotenoides	13
	II.7 Diseño factorial y Método de Superficie de Respuesta (RSM)	14
	II.8 Optimización de la producción de carotenoides usando MSR	17
	II.9 Aplicación de los carotenoides	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	
	III.1 Material biológico	21
	III.2 Preparación del material biológico	21
	III.3 Producción en matraces	21
	III.4 Extracción y Determinación	26
	III.5 Optimización	27
IV.	RESULTADOS	28
V.	DISCUSIÓN	46

VI.	CONCLUSIONES	50
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
	ANEXOS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efectos estandarizados para biomasa	31
Figura 2. Diagrama Pareto de efectos estandarizados para biomasa	31
Figura 3. Efectos estandarizados para carotenoides	34
Figura 4. Diagrama Pareto de efectos estandarizados para carotenoides	34
Figura 5. Efectos principales para carotenoides	35
Figura 6. Interacción de factores para carotenoides	36
Figura 7. Histograma de residuos para carotenoides $\mu\text{g/L}$	40
Figura 8: Distribución normal de residuos para carotenoides $\mu\text{g/L}$	41
Figura 9. Superficie de respuesta de carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus SW, YE	41
Figura 10. Superficie de respuesta de carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus pH, YE	42
Figura 11. Superficie de respuesta de carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus $^{\circ}\text{T}$, YE	42
Figura 12. Superficie de respuesta de carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus pH, SW	43
Figura 13. Superficie de respuesta de carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus $^{\circ}\text{T}$, SW	43
Figura 14. Superficie de respuesta de carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus $^{\circ}\text{T}$, pH	44
Figura 15. Contornos para carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus YE, SW, pH y $^{\circ}\text{T}$	44
Figura 16: Optimización de producción de carotenoides	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fuentes Microbianas de Carotenoides.	12
Tabla 2. Rango de variables a diferentes niveles para el diseño factorial fraccionado.	22
Tabla 3. Diseño factorial de media fracción, corridas codificadas y decodificadas.	23
Tabla 4. Rango de variables a diferentes niveles para el diseño central compuesto.	24
Tabla 5. Diseño central compuesto con corridas decodificadas.	25
Tabla 6. Concentraciones de biomasa y carotenoides totales en base al diseño factorial.	28
Tabla 7. Análisis de varianza para biomasa DO x 10.	29
Tabla 8. Efectos y coeficientes estimados para Carotenoides ($\mu\text{g/L}$).	32
Tabla 9. Análisis de varianza para carotenoides ($\mu\text{g/L}$).	33
Tabla 10. Concentraciones de biomasa y carotenoides totales del diseño central compuesto.	37
Tabla 11. Parámetros del diseño central compuesto.	38
Tabla 12. Regresión de superficie de respuesta: carotenoides $\mu\text{g/L}$ vs. YE, SW, pH, T°.	38
Tabla 13. Análisis de varianza de carotenoides $\mu\text{g/L}$.	39
Tabla 14. Parámetros para la optimización de respuesta.	45

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO 1. Estructura de los carotenoides microbianos más importantes.**

- ANEXO 2. Ruta bioquímica para la síntesis bioquímica carotenoides microbianos.**

- ANEXO 3. Medio Agua de Sales (SW)**

- ANEXO 4. Cultivo en placa de *Haloferax sp. W2*.**

- ANEXO 5. Producción de carotenoides por *Haloferax sp. W2*.**

- ANEXO 6. Cultivos en matraces de *Haloferax sp. W2* después de 7 días.**

- ANEXO 7. Criocentrifugación de cultivos de *Haloferax sp. W2*.**

- ANEXO 8. Pellets obtenidos después de extracción.**

- ANEXO 9. Extractos etanólicos de carotenoides.**

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son pigmentos liposolubles de diferentes colores desde amarillo hasta rojo-naranja, forman una familia de aproximadamente 700 pigmentos y presentan estructura química muy diversa.

Los carotenoides son usados para colorear la piel o yema de huevos de aves, la carne de pescados y el caparazón de crustáceos. Además, se usan en la formulación de alimentos y suplementos dietarios, los más comercializados son astaxantina, beta-caroteno y cantaxantina^{1, 2}.

Los carotenoides son producidos por bacterias, arqueas, algas, hongos, líquenes y plantas. Las arqueas halófilas extremas son microorganismos quimiorganótrofos que satisfacen sus requerimientos de energía con la luz y la producción de carotenoides^{3, 4}. En la familia *Halobacteriaceae* se han reconocido más de 15 géneros de los cuales *Haloferax* destaca por ser uno de los principales productores de pigmentos.

Las arqueas del género *Haloferax* pueden crecer bajo condiciones no asépticas, esto debido a la alta concentración de cloruro de sodio (NaCl) en los medios de crecimiento, por lo que procedimientos de esterilización en muchos casos no son requeridos, además, los carotenoides pueden ser extraídos directamente de células sin ninguna desintegración mecánica ya que las células se lisan espontáneamente con agua y/o solventes orgánicos. Asimismo, estos microorganismos son capaces de utilizar fuentes de carbono simples tales como azúcares, acetato, succinato y extracto de levadura para su crecimiento^{2, 5}.

Actualmente, los carotenoides para la industria alimentaria y cosmética se obtienen por síntesis química, pero su uso es limitado por sus efectos adversos. Los carotenoides obtenidos de fuentes naturales son más saludables, es así que, la producción comercial de carotenoides usando microorganismos está recibiendo mayor atención. Por tanto, el estudio de la producción de carotenoides de haloarqueas podría ser una alternativa para obtener una fuente comercial de carotenoides.

La optimización de los procesos de fermentación es una estrategia que permite incrementar la producción de los carotenoides. En la mayoría de estudios previos, las condiciones del proceso fueron optimizadas por experimentos de un “factor a la vez”, el cual implica que un factor se varía mientras los otros permanecen constantes. En estos casos, la no interacción de los factores influyentes fue asumida, y por tanto, conllevan a resultados subóptimos, debido a que las posibles interacciones entre factores pasarán desapercibidas, cuando en realidad, las interacciones entre factores son relevantes.

En consecuencia, los diseños estadísticos han demostrado ser una poderosa herramienta en la determinación de los efectos de los factores y sus interacciones, lo cual permite la optimización del proceso para su efectiva conducción. Además son más eficientes debido a que sus aproximaciones pueden considerar un amplio número de variables simultáneamente. Así también, las interacciones entre factores diferentes pueden ser determinadas. Diseños experimentales tales como los diseños factoriales completos o fraccionados y métodos de superficie de respuesta (RSM) pueden ser usados en procesos microbianos de producción para determinar los efectos principales y las interacciones de los factores que juegan roles básicos en los procesos de fermentación^{1,5}.

En los últimos años, estos dos métodos estadísticos, diseño factorial y RSM, han sido empleados en la optimización de factores esenciales para la producción de carotenoides por microorganismos carotenogénicos. Además, varios diseños experimentales estadísticos permiten una optimización de la biosíntesis de carotenoides eficiente y económica vía fermentación microbiana¹.

OBJETIVOS

El objetivo principal de la tesis es optimizar la producción de carotenoides provenientes de *Haloferax sp.* mediante el método de superficie de respuesta (RSM). Los objetivos específicos son:

- Identificar los factores influyentes en la producción de carotenoides mediante un diseño factorial.
- Optimizar la producción de carotenoides por *Haloferax sp.* utilizando el diseño central compuesto.

II. MARCO TEÓRICO

II.1 Antecedentes en la producción de carotenoides de fuente microbiana

Los carotenoides son isoprenoides, también conocidos como terpenoides, característicos por presentar colores de amarillo a rojo en el espectro visible. Son compuestos de gran interés comercial e industrial, que actualmente son materia de búsqueda de nuevas fuentes de obtención, donde la fuente microbiana ha ganado mayor interés en los últimos años. A propósito se citan algunas investigaciones relacionadas a la producción de carotenoides de fuentes microbianas:

Asker y Ohta, 2002⁴ produjeron carotenoides usando *Haloferax alexandrinus* a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y en condiciones no asépticas, encontraron que a una concentración de cloruro de sodio entre 20-25% se evita una contaminación del cultivo, por otro lado demostraron también que en cultivos de alta concentración de cloruro de sodio mediante una lisis espontánea con agua se puede extraer directamente de las células a los carotenoides.

Cifuentes y col., 2003⁶ determinaron las condiciones óptimas para biomasa y producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*, donde la más alta producción de carotenoides de 4,9 mg/L se obtuvo en cultivos pre-incubados en nitrato a luz baja.

Ni y col., 2006⁷ optimizaron el proceso de producción de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* utilizando distintos factores ácidos, solventes orgánicos, temperatura y tiempo. Hallaron que a condiciones óptimas de ácido láctico de 5,55 mol/L, índice de etanol a levadura en peso seco a 20,25 mL/g, temperatura de ruptura celular a 30°C y tiempo de extracción durante 3 minutos, que la producción de carotenoides fue de 1516 µg/g.

Choudhari y Singhal, 2008⁸ estudiaron la producción óptima de β -caroteno en distintas cepas *Blakeslea trispora*. Investigaron diferentes componentes del medio de cultivo tal como carbono, nitrógeno y sulfatos, así como el pH y el tamaño del inóculo en la producción de β -caroteno haciendo uso del método de superficie de respuesta, obteniendo una producción de β -caroteno a 139 ± 1 mg/L.

Mandelli y col., 2012⁹ obtuvieron carotenoides a partir de *Halococcus morrhuae*, *Halobacterium salinarum* y *Thermus filiformis*, donde encontraron que las capacidades antioxidantes de los halófilos *H. morrhuae* y *Hbt. salinarum* eran similares o más altas a las del termófilo *T. filiformis*, asimismo atribuyeron las diferencias de las capacidades antioxidantes a la mayor cantidad de carotenoides acíclicos de gran número de dobles enlaces conjugados y de grupos hidroxilos en los microorganismos halófilos.

II.2 Ambientes hipersalinos

Los ambientes hipersalinos comprenden a aquellos ambientes con condiciones extremas no sólo debido a la alta concentración salina, sino también a la exposición de elevadas o bajas temperaturas, condiciones anoxigénicas y algunos casos altos valores de pH. Un fenómeno común en los ambientes salinos es la presencia de gradientes salinos debido a la evaporación del agua marina, dicho proceso origina el brote de diversas especies microbianas adaptadas a diferentes rangos de salinidad¹⁰. Estos ambientes se pueden clasificar de la siguiente manera:

Talasoalinos fueron originados por la evaporación del agua de mar, poseen una concentración de aproximadamente hasta 3 a 3,5 mol/L de NaCl, un ejemplo clásico son las salinas y pozos salinos que generalmente se encuentran en el litoral¹¹.

Atalashalinos son aquellos ambientes que no poseen la misma proporción de sales que el agua de mar, producidos después de la concentración de agua de mar que conduce a la precipitación de NaCl, dejando una alta concentración de sales de potasio y magnesio.

Ejemplos representativos de estos ambientes son el Mar Muerto y el Great Salt Lake en los Estados Unidos de América¹¹.

II.3 Carotenoides microbianos

Los carotenoides son isoprenoides, también conocidos como terpenoides, las cuales son moléculas de 40 carbonos cuya principal característica es la presencia de una larga cadena polieno (en donde la presencia de dobles enlaces puede variar de 3 a 15) la misma que es responsable de la variedad de colores rojo anaranjado en una longitud de onda de 300 a 600 nm que es percibido por el ojo humano.

Estructural y funcionalmente se pueden clasificar en hidrocarbonados (carotenos) y derivados oxigenados (xantofilas). Las plantas y microorganismos son los exclusivos productores de carotenoides, éstos se encuentran entre los pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza.

Biosíntesis de carotenoides

La biosíntesis de carotenoides se originó de los primeros microorganismos fotosintéticos anoxigénicos, dado que estos microorganismos evolucionaron las distintas rutas biosintéticas se ramificaron, como consecuencia se dio origen a la distinta variedad carotenoides actuales. La evolución de la atmósfera de la tierra de una condición anaeróbica a una condición aeróbica fue la causa fundamental para la biosíntesis de carotenoides mediante enzimas oxígeno dependientes¹².

Particularmente, el rol principal de los carotenoides en los microorganismos que los producen es como antioxidante por medio de la neutralización de radicales libres lo cual previene el daño oxidativo de sus células.

Los carotenoides se forman por condensación frente a frente de dos difosfatos de geranylgeranyl (GGDP) que resulta en una molécula simétrica de 40 carbonos llamada fitoeno. De esta molécula madre se derivan los distintos carotenoides mediante reacciones bioquímicas en su mayoría mediadas por enzimas ya sean de plantas o microorganismos¹².

Formación del isopentenil pirofosfato (IPP)

Los carotenoides se sintetizan a partir de precursores de cinco átomos, el isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero el dimetilalil difosfato (DMAP), precursores que comparten con el resto de compuestos su naturaleza isoprenoide^{13, 14, 15}.

Actualmente se conoce dos rutas biosintéticas, la vía del mevalonato (MVA) y la vía del 2-C-metil-D-eritriol-fosfato (MEP).

La vía del MVA está presente en algunos procariotas Gram-positivos y en arqueobacterias, hongos, algas, plantas y animales.

Ruta del MVA

La ruta del MVA comienza con la conversión de tres moléculas de acetil-CoA a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) catalizado por la enzima HMG-CoA sintasa¹². El primer paso específico de la ruta es la síntesis de MVA a partir de HMG-CoA, catalizado por la HMGR-CoA reductasa (HMGR). Posteriormente el MVA, compuesto de seis carbonos, es fosforilado por la enzima MVA quinasa (MVK) a MVA-5-fosfato (MVP), para luego ser descarboxilado por la MVPP descarboxilasa (PMD) que origina al IPP.

Formación del fitoeno partir de IPP

El dimetilalil difosfato (DMADP) junto a tres moléculas de IPP producen mediante condensación una molécula de 20 carbonos llamada difosfato de geranylgeranil (GGDP) mediante la acción de la enzima pireniltransferasa. Luego, dos moléculas de GGDP condensadas frente a frente forman el fitoeno que es un carotenoide incoloro.

Formación de carotenoides a partir de fitoeno

El cromóforo característico que presentan todos los carotenoides está constituido por una serie de dobles enlaces conjugados que se van introduciendo en el fitoeno a través de diversas reacciones de desaturación consecutivas. La longitud del cromóforo determina el espectro de absorción de la molécula y por tanto el color percibido por el ojo humano. Éstos se basan en siete grupos terminales diferentes. Gracias a sucesivas reacciones de desaturación del fitoeno se acaba generando el licopeno, pasando de un pigmento incoloro a un pigmento de coloración rosada. Las enzimas responsables de la desaturación del fitoeno son la fitoeno desaturasa (PDS, que cataliza la primera reacción de desaturación del fitoeno) y la ζ -caroteno desaturasa (ZDS). La actividad de la enzima PDS puede ser inhibida por la acción del norflurazón (NFZ).

Sorprendentemente, todas las reacciones necesarias para la conversión de fitoeno en licopeno pueden ser llevadas a cabo por la fitoeno desaturasa bacteriana (Crtl), quien es capaz de realizar todas las reacciones de isomerización y desaturación antes mencionadas. Esta enzima bacteriana ha sido ampliamente utilizada en abordajes de ingeniería genética que pretendían incrementar los niveles de carotenoides en diferentes especies de plantas¹⁶. La enzima Crtl, que presenta poca similitud con las desaturasas e isomerasas de carotenoides vegetales, no es inhibida por NFZ¹⁷.

A continuación el licopeno, que es una molécula lineal, sufre una reacción de ciclación que genera un anillo de seis carbonos en cada uno de sus extremos. La formación de un anillo ϵ o un anillo β en el primer paso de ciclación depende únicamente del tipo de ciclasa que actúe sobre el licopeno, ya que la actividad de la enzima β -ciclasa (LCY- β) difiere de la actividad de la enzima ϵ -ciclasa (LCY- ϵ) únicamente en la posición donde introducen el doble enlace en anillo ciclohexano. A diferencia de LCY- β que es capaz de catalizar la conversión de licopeno en β -caroteno introduciendo dos anillos β , para la formación de α -caroteno se requiere la actuación consecutiva de ambas ciclasas.

Las xantófilas son moléculas derivadas de la oxidación de los carotenos. La hidroxilación del α y del β -caroteno produce la luteína y la zeaxantina respectivamente. La hidroxilación redundante del α y del β -caroteno puede llevarse a cabo a través de la acción de dos no-hemo hidroxilasas (CHY1 y CHY2) o bien a través de las hidroxilasas tipo citocromo P450, CYP97A y CYP97C. La hidroxilación del anillo β la llevan a cabo tanto CHY1 y CHY2 como CYP97A, y genera zeaxantina a partir de β -caroteno. Sin embargo, la hidroxilación del anillo ϵ del α -caroteno para producir luteína tiene lugar gracias a la acción de la hidroxilasa CYP97C¹⁸. El nivel de redundancia varía según el tejido¹⁹.

II.4 Género Haloferax

Los microorganismos halófilos por excelencia son conocidos como halobacterias, preferentemente crecen entre 3,5 a 4,5 molar de cloruro de sodio²⁰. Actualmente se encuentran clasificados dentro de la clase Halobacteria, orden Halobacteriales, familia Halobacteriaceae, donde las distintas especies se encuentran en 15 géneros reconocidos.

Las halobacterias son la biomasa más representativa de los ambientes talasohalinos y atalasoalinos como el Mar Muerto, salinas y/o pozos salinos. La

mayoría de estos microorganismos halófilos contienen en sus membranas carotenoides que brindan coloraciones rojizas a muchos de estos ambientes¹.

La coloración de muchos ambientes salinos es causada por poblaciones de arqueas del orden Halobacteriales, las cuales contribuyen la absorción de energía luminosa y en consecuencia mejora la evaporación¹.

En los pozos cristalinos los microorganismos prevalentes que se pueden aislar, entre otros, diferentes especies de Archea entre las cuales destacan los géneros *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula*, y *Halorubrum*¹.

El género *Haloferax* abarca especies caracterizadas por ser células pleomórficas, móviles, Gram negativos, que crecen en altas concentraciones de cloruro de sodio; las especies mejor conocidas dentro de este género son *H. alexandrinus*, *H. elongans*, *H. larsenii*, *H. lucentensis*, *H. mucosum*, *H. prahovese*, *H. sulfurifontis*, *H. volcanii*, *H. denitrificans*, *H. gibbonsii* y *H. mediterrane*²⁰. El principal glicolípido de su membrana es el S-DGD-1 y el contenido de G+C es de 59,5 -64,0 mol%²¹.

II.5 Producción de carotenoides

La producción de carotenoides se da en diversos organismos y tan diversos son éstos como los ambientes donde se producen.

Actualmente, la mayoría de los carotenoides en el mercado mundial son producidos por síntesis química o por extracción química a través de solventes de fuentes naturales no microbianas, preferentemente plantas^{22, 23, 24}. Los microorganismos más representativos conocidos como fuentes de carotenoides destacan *Dunaliella salina*^{25, 26} que es fuente de beta-caroteno y *Haematococcus pluvialis* fuente de astaxantina^{27, 28, 29}.

En los últimos años ha habido un gran interés por encontrar nuevas fuentes microbianas de carotenoides, en este sentido las bacterias halófilas son microorganismos atractivos para dicha finalidad.

A continuación se describe algunos carotenoides importantes que son obtenidos de fuentes microbianas:

La astaxantina es un carotenoide rojo responsable de la coloración característica de la carne de salmones y caparazones de los crustáceos. Se ha reportado recientemente un proceso semi-industrial para producción de astaxantina mediante la fermentación de *Xanthophyllomyces dendrorhous*³⁰. También se reportaron en condiciones fotoautotróficas en una columna de burbuja con la adición de nutrientes por *H. pluvialis*³¹.

La beta-criptoxantina posee un gran potencial debido a sus aplicaciones, sin embargo, son pocos los microorganismos que la producen, entre estos se encuentran *B. lineus*, *Flavobacterium lutescens* y *Flavobacterium multivorum*; no obstante, su producción aún no es comparable con las de fuentes cítricas y de pimientos^{32, 33, 34}.

La cantaxantina es un diceto-carotenoide extraído en primer lugar de hongos comestibles. Se han reportado pocas fuentes microbianas de este carotenoide tales como *Haloferax alexandrinus*, *Corynebacterium michiganense*, *Micrococcus roseus*, *Brevibacterium sp.*, *Gordonia jacobaea*, y *Dietzia natronolimnaea*; también se ha encontrado que algunas microalgas también la producen *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella zofingiensis*, *Chlorella emersonii*, y *Dictyococcus cinnabarinus*^{1, 4, 35}. Por otro lado, también se demostró mediante estudios *in vitro* que la cantaxantina tiene mayor actividad antioxidante que el beta-caroteno debido a la presencia de los grupos ceto en las posiciones 4 y 4' del anillo de β -ionona³⁶.

La fucoxantina es una xantófila presente en las algas marrones y algas marinas marrones comestibles. *Undaria pinnatifida* y *Lamaria sp.* son las algas marinas comestibles más sobresalientes en el mercado asiático, además se ha reportado la producción de fucoxantina de *Hijikia fusiformis*, *Ecklonia stolonifera*, y *Sargassum siliquastrum*^{37, 38, 39}.

La luteína es uno de los carotenoides que ha crecido rápidamente a nivel comercial, actualmente la fuente principal son los pétalos de claveles (*Tagetes erecta*), pero su presencia es baja, alrededor de 0,03% de peso seco^{40, 41, 42}. Los microorganismos donde se ha estudiado la presencia de este carotenoide es en las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Muriellopsis sp.*, *Chlorella protothecoides*, y *Scenedesmus almeriensis*, sin embargo no hay trabajos relacionados sobre la producción a escala de bioreactor.⁴²⁻⁴⁵

Tabla 1. Fuentes Microbianas de Carotenoides:

Carotenoides	Fuentes microbianas	Rendimiento
Astaxantina	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	1,080 µg/g; 4,7 mg/g de material celular seco
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	350 mg/L
		290 mg/L
		22,7 mg/g
β-caroteno	<i>Blakeslea trispora</i>	420 µg/g
	<i>Dunaliella salina</i>	10,35 mg/L
	<i>Streptomyces chrestomcyeticus</i> subsp. <i>Rubescens</i>	NR*
	<i>Rhodotorula glutinis mutant 32</i>	250 mg/L
β-criptoxantina	<i>Brevibacterium linens</i>	0,3 µg/mL
	<i>Flavobacterium lutescens</i>	770 mg/Kg
Fucoxantina	<i>Undaria pinnatifida</i>	30 g/Kg
	<i>Saragassum fusiforme</i>	79,5 g/Kg
	<i>Laminaria japonica</i>	122,1 µg/g
Luteína	<i>Chlorella zofingiensis</i>	21 µg/mL
	<i>Chlorella protothecoides CS-41</i>	225 µg/mL
	<i>Muriellopsis sp.</i>	35 µg/mL
	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	0,7 g/L

Zeaxantina	<i>Dunaliella salina</i>	6 mg/g
	<i>Phormidium laminosum</i>	5,9 mg/mg
	<i>Flavobacterium multivorum</i>	10,65 µg/mL
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,962 mg/g

*NR: No reportado

II.6 Condiciones que determinan la producción de carotenoides

La mayor limitación de la producción de carotenoides microbianos es la baja producción, lento crecimiento, y altos costos de producción comparados a la síntesis química, pero debido a la fácil manipulación de los microorganismos son un sistema excelente para producción a gran escala⁴⁶.

No obstante, estrategias tales como la optimización de condiciones de producción y crecimiento así como la preparación de mutantes usando ingeniería genética mejoran la productividad de carotenoides.

Los carotenoides más encontrados en las arqueas halófilas son carotenoides de 50 carbonos, principalmente bacterioruberina y sus derivados que incluyen monoanhidrobacterioruberina y bisanhidrobacterioruberina^{47, 48}.

Los carotenoides son producidos con una finalidad protectora en contra del daño causado por las altas intensidades de luz en el rango visible y ultravioleta, y para reforzar la membrana celular.

La producción de carotenoides a través de microorganismos involucra en primer lugar el cultivo del microorganismo en un medio de cultivo adecuado que cumpla los requerimientos mínimos para su crecimiento. Luego de la etapa de cultivo sigue la obtención de la masa celular que contiene los carotenoides para luego aplicar métodos extractivos que implican la liberación de los carotenoides mediante la lisis celular para luego utilizar solventes con capacidad extractiva de carotenoides.

Las condiciones en las cuales se produzcan los carotenoides dependerá muchas veces de las condiciones de crecimiento del microorganismo, en este sentido se puede señalar que la temperatura, luz, disponibilidad de nutrientes, tensión de oxígeno, pH, concentración salina, etc., serán factores relevantes que determinarán la producción de carotenoides así como sus tipos.

II.7 Diseño Factorial y Método de Superficie de Respuesta (RSM)

Diseño Factorial

El diseño factorial es un arreglo experimental en el que un número de niveles (p) son escogidos para cada factor (k), donde se establecen p^k ensayos por experimento. En este sentido, si se escogen 2 niveles para cada uno de 3 factores que se analizarán el número de ensayos será de 2^3 , es decir 8 ensayos⁴⁹.

Cuando se hace uso de todos los ensayos posibles, se está hablando de un experimento factorial completo, las respuestas se miden en todas las combinaciones de los niveles de factores experimentales. Las combinaciones de niveles de factores representan las condiciones en las cuales se medirán las respuestas. Cada condición experimental es denominada ensayo y la medición de respuesta es una observación. Por ende, la totalidad del conjunto de ensayos es el "diseño"^{50, 51}.

Asimismo, también existen diseños factoriales fraccionados cuya finalidad es minimizar el tiempo y costo del diseño. Todos aquellos diseños factoriales en los cuales se excluyen una o más combinaciones de niveles se denominan diseños factoriales fraccionados^{52, 53}.

Los diseños factoriales fraccionados son útiles en la exploración de factores porque reducen el número de ensayos a un tamaño que pueda manejarse. Los ensayos que se realizan son un subconjunto seleccionado o fracción del diseño factorial completo. Sin embargo, existe la probabilidad de al no ejecutar todas las

combinaciones de los niveles de los factores, algunos de los efectos se confundan⁵⁴.

Superficie de Respuesta

La Metodología de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas sistemáticas empleadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés (respuesta) es influenciada por otras variables, estas últimas mejor conocidas como factores. El propósito de esta metodología es optimizar la variable de interés determinando las condiciones óptimas de los factores en el sistema⁵⁵.

Los factores son los parámetros que afectan directamente la variable de interés, éstos son de carácter cuantitativo. Asimismo, la respuesta es un valor cuantitativo y el interés primordial de la superficie de respuesta es optimizar dicho valor⁵⁶.

Los métodos de superficie de respuesta se pueden utilizar para:

- encontrar valores de configuración de factores (condiciones de funcionamiento) que producen la "mejor" respuesta,
- encontrar valores de configuración de factores que satisfagan las especificaciones de funcionamiento o proceso,
- identificar nuevas condiciones de funcionamiento que produzcan una mejora demostrada en la calidad del producto frente a la calidad alcanzada por las condiciones actuales, y/o
- modelar una relación entre los factores cuantitativos y la respuesta.

El proceso de metodología de superficie de respuesta requiere más de una etapa de experimentación y análisis. Los pasos que se muestran a continuación son típicos y dependiendo del experimento se pueden realizar en un orden distinto o incluso eliminar alguno:

1. Determinar cuáles son los factores influyentes, es decir, cuáles son las condiciones del proceso que ejercen influencia en los valores de la variable de respuesta.
2. Generar un diseño estadístico que puede ser un diseño Central compuesto o Box-Behnken.
3. Realizar el experimento y recolectar los datos de respuesta de acuerdo al diseño estadístico seleccionado.
4. Analizar el diseño de superficie de respuesta en base a los datos experimentales obtenidos.
5. Realizar una gráfica de superficie o de contornos para mejor visualización de los patrones de la superficie de respuesta.
6. Optimización de la respuesta.

Diseños compuestos centrales

Los diseños centrales compuestos se recomiendan con frecuencia cuando el plan del diseño requiere de un experimento secuencial, debido a que estos diseños pueden incorporar información de un experimento factorial planificado apropiadamente. Los puntos factoriales y centrales pueden servir como una etapa preliminar donde usted pueda ajustar un modelo de primer orden (lineal), pero ofrecen evidencia relacionada con la importancia de una contribución o curvatura de segundo orden⁵¹.

Diseños de Box- Behken

Los diseños de Box-Behnken son utilizados cuando se ejecutan experimentos no secuenciales. Es decir, usted planifica ejecutar el experimento una sola vez. Estos

diseños permiten una estimación eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden. En virtud que los diseños de Box-Behnken tienen menos puntos de diseño, la aplicación de este tipo de diseños podría resultar menos costosa que ejecutar diseños compuestos centrales con el mismo número de factores^{51,55}.

Los diseños de Box-Behnken también pueden ser útiles si usted conoce la zona de operación segura de su proceso. Los diseños centrales compuestos generalmente tienen puntos axiales fuera de la zona de operación segura. Estos puntos pudieran no encontrarse en la región de interés, o pudiera ser imposible ejecutarlos porque se encuentren más allá de los límites de operación segura.

II.8 Optimización de la producción de carotenoides usando MSR

La optimización usando la metodología de superficie de respuesta ha sido ampliamente usada en diversos procesos del ámbito técnico toda vez que permite la adecuación de sistemas económicos, mejora la calidad de los procesos a experimentar y es una herramienta que permite realizar mayores investigaciones tomando como partida condiciones establecidas de experimentación sustentadas en modelos matemáticos y estadísticos.

Algunos ejemplos puntuales del uso de la metodología de superficie de respuesta se citan a continuación:

Vázquez y Martin, 1997⁵, usaron el método de superficie de respuesta para optimizar el crecimiento de *Phaffia rhodozyma* en fermentación continua. Usando un diseño factorial se predijo las condiciones óptimas de fermentación que son un índice de dilución de 0,022/h y un pH de 6,90. La concentración de astaxantina en las condiciones optimizadas fue de 544 mg de astaxantina por kilogramo de biomasa celular seca.

Ramírez y col., 2001⁵⁷, utilizaron un método secuencial basado en la aplicación de tres diseños experimentales en la optimización de la producción de astaxantina de una cepa mutante de *Phaffia rhodozyma*, el primer diseño fue un diseño factorial, luego emplearon el método de ascenso empinado y finalmente

emplearon un método de superficie de respuesta de segundo orden. Encontraron que la condiciones óptimas que estimulan una alta producción de astaxantina fue una temperatura de 19,7°C; concentración de carbono 11,25 g/L, pH 6,0, inóculo de 5% y concentración de nitrógeno 0,5 g/L obteniendo una producción de 8100 µg/L.

Thana y col, 2007⁵⁸, optimizaron la producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* empleando la metodología de superficie de respuesta, las condiciones óptimas alcanzadas para la producción fueron temperatura de 70°C, presión de 50 MPa y tiempo de 4 horas produciendo una cantidad de astaxantina de 23,04 mg/g.

Khodaiyan y col., 2008⁵⁹, obtuvieron 5,32 mg/L de cantaxantina mediante la optimización de la producción en matraces por *Dietzia natronolimnaea*, donde los factores relevantes para la optimización fueron pH de 7,53, concentración de glucosa de 25,90 g/L y concentración de cloruro de sodio de 3,42 g/L, para tal efecto utilizaron un diseño factorial y luego un diseño central compuesto.

Wang y col., 2008⁶⁰, optimizaron la producción de β-caroteno en una cepa mutante de *Rhodotorula glutinis* RG6 previamente tratada por presión hidrostática alta de 300 MPa por 15 min. Obtuvieron una producción máxima de β-caroteno de 13,43 mg/L a pH 6,7, 4,23 g/L de extracto de levadura, glucosa 12,11 g/L, 30mL/L de inóculo, extracto de tomate 2,5 mL/L, aceite de maní 0,5 mL/L y sulfato de amonio de 5 g/L; el medio de fermentación se optimizó haciendo uso del método de superficie de respuesta.

Nasri y Hadi, 2009¹, aplicaron un diseño de superficie de respuesta a un proceso de alimentación discontinua para la optimización de intermediarios de ciclo de ácido tricarbóxico para incrementar la producción de cantaxantina por *Dietzia natronolimnaea* HS-1. Encontraron que los intermedios alfaetoglutarato, oxalacetato y succinato se seleccionaron por tener efectos positivos en la producción de carotenoides, los óptimos fueron 9,69 mM, oxalacetato 8,68 mM, succinato 8,51 mM para una producción de 13172 µg/L.

II.9 Aplicación de los carotenoides.

Sólo algunos carotenoides poseen aplicación industrial de los aproximadamente 600 carotenoides encontrados en la naturaleza, la mayoría de estos han resaltado por sus propiedades como antioxidantes y filtros solares¹².

La mayoría de estos carotenoides provienen de sistemas químicos, sin embargo se ha visto que producen efectos peligrosos en seres humanos a intervalos de dosis elevadas, en consecuencia han sido advertidos por agencias como la FDA⁶¹.

Una dieta rica en β -caroteno disminuye el riesgo de padecer cataratas y enfermedades coronarias⁶². Diversos estudios relacionan dosis elevadas de licopeno con la prevención del cáncer de pecho⁶³, del cáncer de próstata⁶⁴ y en el caso de ingestas elevadas de luteína aún queda por determinar su efecto positivo en la disminución del riesgo de cáncer de colón⁶⁵. El mayor beneficio del β -caroteno es su papel como provitamina A.

Un ejemplo concreto del uso de carotenoides en el ámbito biotecnológico es el caso del “Golden rice”, donde la introducción en arroz de genes biosintéticos apropiados para la formación de β -caroteno permitió la obtención de un arroz enriquecido en este pigmento, cuya ingesta ayuda a prevenir la ceguera infantil⁶⁶.

Los carotenoides reducen la penetración del oxígeno singulete mediante la disminución de la fluidez de la membrana celular consecuentemente se emplean como capturadores de radicales libres en la prevención de muchas enfermedades degenerativas como por ejemplo el cáncer⁶⁷.

La astaxantina es conocida por depurar los radicales libres y evitar la acción del oxígeno singulete, asimismo se ha evidenciado que mejora el sistema inmunológico, proteger la piel de la radiación y boquear reacciones inducidas por toxinas y sustancias químicas. Por consiguiente, es usado en industria farmacéutica cosmética y nutracéutica^{68, 69, 70}. Los microorganismos más usados para producir este carotenoides son *H. pluvialis* y *Xanthophyllomyces dendrorhous*^{71, 72}.

El beta-caroteno es conocido por su acción antioxidante y precursor de vitamina A y es muy usado en alimentos y productos para alimentación animal. *Dunaliella* es uno de los principales productores de este carotenoide^{73, 74}. Además de *Dunaliella* otra de las fuentes comparables incluso a la producción de síntesis química es *Blakeslea trispora*⁷⁵.

Beta-criptoxantina es un carotenoide del grupo de las xantofilas con una potencial acción de provitamina A y se ha reportado que mejora la calcificación anabólica del hueso⁷⁶. Otros estudios también indican su acción en la prevención del cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colón y artritis reumatoide⁷⁷⁻⁸³.

La cantaxantina es ampliamente usada como colorante en alimentos, aditivos alimentarios para la yema de huevo, pescados y criaderos de crustáceos. También es usado en la industria cosmética como agente de bronceado para la piel. Asimismo, se ha reportado su uso en la prevención de la supresión inmunológica inducida por radiación UV en ratones, como agente protector en el cáncer de piel en ensayos preclínicos, y su utilidad en el tratamiento de afecciones dérmicas tal como la fotodermatitis^{84, 85}.

La fucoxantina es muy importante en las industrias nutraceuticas y alimentarias debido a sus característicos beneficios en la obesidad y diabetes. La ingesta de fucoxantina promueve el metabolismo de las grasas, preferentemente alrededor del área abdominal^{86, 87, 88}. Por otro lado, se ha demostrado que un suplemento de 0,2% de fucoxantina disminuye las concentraciones de insulina plasmática y glucosa en sangre en ratones, también se ha visto que actúa como anticoagulante, antiinflamatorio antioxidante y antimicrobiano⁸⁹⁻⁹³.

Zeaxantina que es una isómero de la luteína y es producida por microorganismos tales como *Flavobacterium sp.*, *Dunaliella sp.* y *Microcystis aeruginosa*, se ha reportado un rol importante en la prevención del cáncer, degeneración macular relacionada a la edad y mejoramiento de la inmunidad. Asimismo, también es usado como colorantes en la industria cosmética y alimentaria^{94, 95, 96}.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Material biológico

Microorganismo: *Haloferax sp.* (W2) del cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, aislado de las salinas de Huacho⁹⁷.

III.2 Preparación del material biológico

III.2.1 Reactivación de *Haloferax sp.* (W2)

Se procedió a la activación del *Haloferax sp.* (W2) en un medio líquido de agua de sales (SW⁹⁸) al 20% suplementado con extracto de levadura (YE) al 1%. El medio fue esterilizado a 123 °C y 15 lb/pulg.². El tiempo de activación fue de 5 días a 37 °C sin agitación.

III.2.2 Preparación del preinóculo

Una colonia de *Haloferax sp.* (W2) se sembró en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo SW 20% suplementado con YE 0,5% a pH 7,0. El preinóculo se incubó a 37 °C durante 3 días sin agitación.

III.3 Producción en matraces

La producción de carotenoides se realizó en dos etapas antes de proceder con la optimización, en primer lugar se empleó un diseño factorial para determinar qué factores influyen en la producción de carotenoides. Luego, se realizó un diseño central compuesto para determinar la superficie de respuesta y la gráfica de contornos, por último se determinó las condiciones óptimas de los factores influyentes y el rendimiento optimizado de carotenoides.

III.3.1 Producción mediante el diseño factorial

La producción en matraces se realizó en base a un diseño factorial fraccionado de 2^{5-1} , se tomaron 5 factores a analizar siendo éstos: concentraciones de inóculo, YE y sales, pH y temperatura; asimismo para cada factor se ensayaron 2 niveles tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Rango de variables a diferentes niveles para el diseño factorial fraccionado

Variables independientes (Xi)		Niveles	
		-1	+1
X1	Concentración de inóculo (%)	5	10
X2	Concentración de YE (g/L)	3	7
X3	Concentración de sales SW (%)	15	25
X4	pH	6	8
X5	Temperatura (°C)	35	40

Donde:

X1 a X5: Variables independientes.

-1: Nivel inferior de la variable independiente.

+1: Nivel superior de la variable independiente.

Mediante el programa estadístico Minitab 16 se estableció el diseño matriz para un estudio factorial de media fracción, donde se establecieron 16 ensayos correspondientes a la aleatorización de los dos niveles de los 5 factores (variables independientes), y 4 ensayos que reflejan los puntos centrales del diseño matriz. El total de ensayos aleatorizados codificados y decodificados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Diseño factorial de media fracción, ensayos codificados y decodificados

Diseño matriz										
Ensayo N°	X1	X2	X3	X4	X5	[inóculo]	[YE]	[SW]	pH	°C
1	-1	1	1	-1	1	5	7	25	6	40
2	1	-1	-1	1	1	10	3	15	8	40
3	-1	1	-1	-1	-1	5	7	15	6	35
4	-1	-1	1	1	1	5	3	25	8	40
5	-1	1	-1	1	1	5	7	15	8	40
6	1	1	-1	-1	1	10	7	15	6	40
7	1	1	1	-1	-1	10	7	25	6	35
8	1	-1	-1	-1	-1	10	3	15	6	35
9	-1	-1	-1	-1	1	5	3	15	6	40
10	-1	-1	1	-1	-1	5	3	25	6	35
11	-1	-1	-1	1	-1	5	3	15	8	35
12	1	-1	1	-1	1	10	3	25	6	40
13	-1	1	1	1	-1	5	7	25	8	35
14	0	0	0	0	0	7.5	5	20	7	37.5
15	1	-1	1	1	-1	10	3	25	8	35
16	0	0	0	0	0	7.5	5	20	7	37.5
17	0	0	0	0	0	7.5	5	20	7	37.5
18	0	0	0	0	0	7.5	5	20	7	37.5
19	1	1	1	1	1	10	7	25	8	40
20	1	1	-1	1	-1	10	7	15	8	35

Donde:

X1 a X5: Variables independientes.

-1: Nivel inferior de la variable independiente.

+1: Nivel superior de la variable independiente.

0: Nivel intermedio de la variable independiente.

[inóculo]: Concentración de inóculo expresado en porcentaje.

[YE]: Concentración de extracto de levadura expresado en gramos por litro.

[SW]: Concentración de agua de sales expresado en porcentaje.

pH: Potencial de hidrogeniones.

°C: Temperatura en grados centígrados.

Los 20 ensayos de la tabla 3 fueron realizados en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo e incubadas durante 7 días en un agitador de vaivén a 100 rpm.

III.3.2 Producción mediante diseño central compuesto

Después de determinar los factores influyentes en la producción de carotenoides mediante el diseño factorial, se procedió con el siguiente paso que fue establecer el diseño matriz del diseño central compuesto. El diseño central compuesto analizó los 4 factores influyentes, los niveles de dichos factores se detallan a continuación.

Tabla 4. Rango de variables a diferentes niveles para el diseño central compuesto

Variables independientes (Xi)		Niveles	
		-1	+1
X1	Concentración de YE (g/L)	5	10
X2	Concentración de SW (%)	15	25
X3	pH	5	7
X4	Temperatura (°C)	38	45

Donde:

X1 a X4: Variables independientes.

-1: Nivel inferior de la variable independiente.

+1: Nivel superior de la variable independiente.

Mediante el diseño central compuesto se analizó la influencia de los 4 factores seleccionados, mediante un diseño matriz establecido por el programa Minitab 16, en este diseño se realizaron 31 ensayos para los niveles establecidos previamente, el diseño matriz fue el siguiente:

Tabla 5. Diseño central compuesto con ensayos decodificados

DISEÑO MATRIZ						
Ensayo N°	TipoPt	Bloques	YE	SW	pH	°T
1	0	1	7.5	20	6	41.5
2	0	1	7.5	20	6	41.5
3	1	1	10	15	7	45
4	0	1	7.5	20	6	41.5
5	1	1	5	15	7	38
6	1	1	5	25	7	38
7	-1	1	7.5	20	8	41.5
8	-1	1	12.5	20	6	41.5
9	-1	1	7.5	20	6	48.5
10	1	1	10	25	7	38
11	1	1	10	25	5	45
12	1	1	5	25	7	45
13	1	1	10	25	5	38
14	1	1	5	25	5	45
15	1	1	5	15	5	38
16	1	1	10	15	7	38
17	0	1	7.5	20	6	41.5
18	1	1	10	15	5	38
19	0	1	7.5	20	6	41.5
20	-1	1	7.5	20	6	34.5
21	1	1	5	15	5	45
22	1	1	5	25	5	38
23	-1	1	7.5	30	6	41.5
24	1	1	10	25	7	45
25	-1	1	2.5	20	6	41.5
26	-1	1	7.5	10	6	41.5
27	0	1	7.5	20	6	41.5
28	-1	1	7.5	20	4	41.5
29	1	1	10	15	5	45
30	0	1	7.5	20	6	41.5
31	1	1	5	15	7	45

Donde:

X1 a X4: Variables independientes.

-1: Nivel inferior de la variable independiente.

+1: Nivel superior de la variable independiente.

0: Nivel intermedio de la variable independiente.

Tipo Pt: Tipo de punto.

[YE]: Concentración de extracto de levadura expresado en gramos por litro.

[SW]: Concentración de agua de sales expresado en porcentaje.

pH: Potencial de hidrogeniones.

°C: Temperatura en grados centígrados.

Cada ensayo del diseño matriz fue realizado en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo e incubadas durante 7 días en un agitador de vaivén a 100 rpm.

III.4 Extracción y determinación

III.4.1 Medición de biomasa⁴

La biomasa se midió por densitometría óptica en un espectrofotómetro de luz UV. Se tomó 1 mL del cultivo al cabo de 7 días y se procedió a su dilución con 9 mL de SW, proporción 1:10. Luego se procedió a medir las absorbancias de las diluciones obtenidas a una longitud de onda de 660 nm. Los resultados obtenidos se expresaron como Absorbancia x 10.

III.4.2 Extracción de carotenoides¹

Se tomaron 10 mL de cultivo en tubos Falcón de 15 mL, luego se centrifugó a 5000 rpm por 15 min a 4 °C. Después, se lavó el pellet con SW, se añadió 1 mL de etanol frío y mezcló en un vórtex para liberar los carotenoides, después se procedió a trasvasar el contenido de la mezcla a un microtubo de 1,5 mL. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min, el sobrenadante contenía la solución etanólica con carotenoides; el pellet fue resuspendido en 1 mL de etanol frío para luego volver a centrifugar a las mismas condiciones, esta

última etapa se repitió hasta obtener un pellet de color blanco. La solución etanólica fue usada para las siguientes determinaciones.

III.4.3 Determinación de carotenoides

Las soluciones etanólicas con carotenoides fueron analizadas mediante espectrofotometría UV a una longitud de onda de 474 nm para determinar carotenoides totales presentes. La concentración de carotenoides totales fue obtenida aplicando la fórmula de Schiedt y Liaaen-Jensen⁹⁹:

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g} / \text{L}) = \frac{(A_{474}) \times (V_s) \times (10^9)}{(A_{1\text{cm}}^{1\%}) \times (100)}$$

Donde A_{474} es la máxima absorbancia de carotenoides totales en etanol, V_s es el volumen de la muestra y $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ es el coeficiente de absorción específica de carotenoides totales para una solución al 1% en 1cm de celda, para el presente caso se consideró el valor de 2200 para $A_{1\text{cm}}^{1\%}$.

III.5 Optimización

La optimización se realizó por una análisis de varianza (ANOVA) para lo cual se empleó el programa de software estadístico Minitab 16, donde se analizó los resultados estadísticos, así cómo se elaboraron las gráficas de Pareto, Normal, Superficie de respuesta y contornos para poder obtener las condiciones óptimas de producción de carotenoides.

IV. RESULTADOS

IV.1 Diseño Factorial

Los resultados de biomasa y concentración de carotenoides obtenidos para el diseño factorial de media fracción (2^{5-1}) se presentan en la Tabla 6, los resultados de biomasa fueron expresados en Absorbancia x 10 y la concentración de carotenoides en $\mu\text{g/L}$.

Tabla 6. Concentraciones de biomasa y carotenoides totales en base al diseño factorial

Diseño matriz						Resultados experimentales	
Ensayo N°	[inóculo]	[YE]	[SW]	pH	°C	Biomasa DO x 10	Carotenoides ($\mu\text{g/L}$)
1	5	7	25	6	40	1.9900	37886.3636
2	10	3	15	8	40	0.7000	12090.9091
3	5	7	15	6	35	1.2000	14295.4545
4	5	3	25	8	40	0.6100	15704.5455
5	5	7	15	8	40	1.2700	22181.8182
6	10	7	15	6	40	1.5100	31181.8182
7	10	7	25	6	35	1.3300	20848.4848
8	10	3	15	6	35	0.5400	7545.4545
9	5	3	15	6	40	0.8100	15522.7273
10	5	3	25	6	35	0.7100	12454.5455
11	5	3	15	8	35	0.4750	5863.6364
12	10	3	25	6	40	1.0000	24795.4545
13	5	7	25	8	35	0.8550	6931.8182
14	7.5	5	20	7	37.5	1.0567	21772.7273
15	10	3	25	8	35	0.4200	7295.4545
16	7.5	5	20	7	37.5	1.0433	19681.8182
17	7.5	5	20	7	37.5	1.1050	20386.3636
18	7.5	5	20	7	37.5	1.0300	16727.2727

19	10	7	25	8	40	1.4800	20000.0000
20	10	7	15	8	35	0.9900	9454.5455

Donde:

[inóculo]: Concentración de inóculo expresado en porcentaje.

[YE]: Concentración de extracto de levadura expresado en gramos por litro.

[SW]: Concentración de agua de sales expresado en porcentaje.

pH: Potencial de hidrogeniones.

°C: Temperatura en grados centígrados.

DO: Densidad óptica expresada en absorbancia.

Se obtuvo un mayor crecimiento de *Haloferax sp.* (W2) a una concentración de inóculo de 5%, concentración de extracto de levadura de 7 g/L, SW 25%, pH 6 y 40 °C (ensayo N°: 1); asimismo, el mayor rendimiento de carotenoides se obtuvo a las mismas condiciones.

Por el contrario, las concentraciones de inóculo 10%, extracto de levadura 3 g/L, SW 25 %, pH 8 y 35 °C (ensayo N°: 15) obtuvo la menor biomasa; y el menor rendimiento de carotenoides se obtuvo a las concentraciones de inóculo de 5 %, extracto de levadura 3 g/L, SW 15 %, pH 8 y 35 °C (ensayo N° 11).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA BIOMASA

Tabla 7. Análisis de varianza para biomasa DO x 10

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Efectos principales	5	2.68179	2.68179	0.53636	501.64	0.000
[inóculo]	1	0.00016	0.00016	0.00016	0.15	0.728
[YE]	1	1.79560	1.79560	1.79560	1679.37	0.000
[SW]	1	0.05062	0.05063	0.05063	47.35	0.006
pH	1	0.32776	0.32776	0.32776	306.54	0.000
°C	1	0.50766	0.50766	0.50766	474.79	0.000
2° orden (interacciones)	10	0.21690	0.21690	0.02169	20.29	0.015
[inóculo]*[YE]	1	0.00023	0.00023	0.00023	0.21	0.678
[inóculo]*[SW]	1	0.00040	0.00040	0.00040	0.37	0.584
[inóculo]*pH	1	0.03151	0.03151	0.03151	29.47	0.012
[inóculo]*°C	1	0.00006	0.00006	0.00006	0.05	0.833
[YE]*[SW]	1	0.01381	0.01381	0.01381	12.91	0.037

[YE] *pH	1	0.02103	0.02103	0.02103	19.66	0.021
[YE] *°C	1	0.05063	0.05063	0.05063	47.35	0.006
[SW] *pH	1	0.06760	0.06760	0.06760	63.22	0.004
[SW] *°C	1	0.02890	0.02890	0.02890	27.03	0.014
pH*°C	1	0.00276	0.00276	0.00276	2.58	0.207
Curvatura	1	0.01378	0.01378	0.01378	12.89	0.037
Error residual	3	0.00321	0.00321	0.00107		
Error puro	3	0.00321	0.00321	0.00107		
Total	19	2.91568				

Del análisis ANOVA realizado se nota que los factores más influyentes en la producción de biomasa son las concentraciones de YE (p -value=0) y sales (SW) (p -value=0,006), pH (p -value=0) y temperatura (p -value=0), en cambio se evidencia que la concentración de inóculo no posee influencia significativa en la producción de biomasa. Por otro lado, las interacciones entre factores más resaltantes que afectan la biomasa son “concentración de YE x temperatura” (p -value=0,006); “concentración de SW x pH” (p -value de 0,004); “concentración de inóculo x pH” (p -value de 0,012); “concentración de YE x concentración de SW” (p -value de 0,037); “concentración de YE x pH” (p -value de 0,021) y “concentración de SW x temperatura” (p -value de 0,014).

Las gráficas de distribución normal y de Pareto muestran los factores significativos que influyen de forma determinante en la producción de biomasa, dichos resultados son congruentes con el análisis ANOVA:

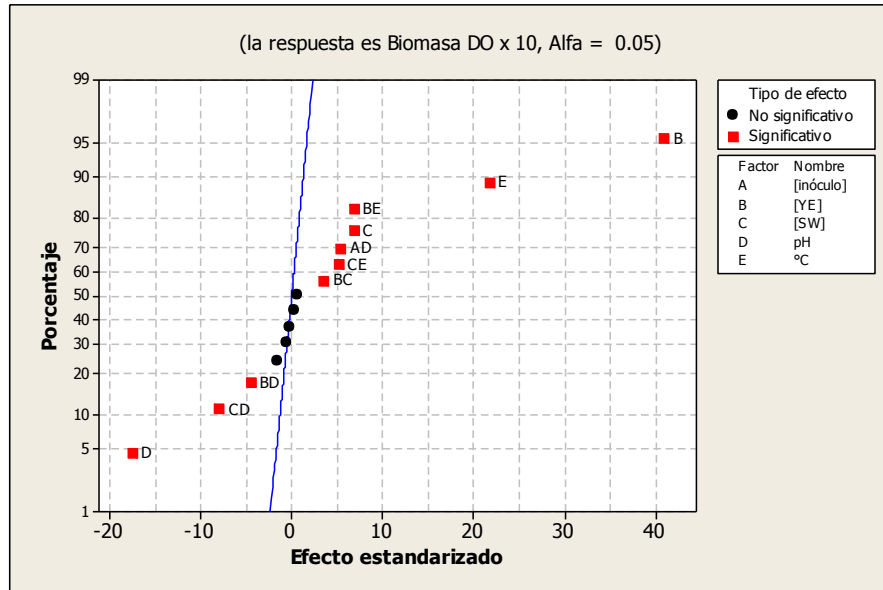


Figura 1. Efectos estandarizados para biomasa

En la Figura 1 se observa que los factores más significativos que afectan la producción de biomasa son las concentraciones de YE y SW, temperatura y pH (puntos rojos de la figura).

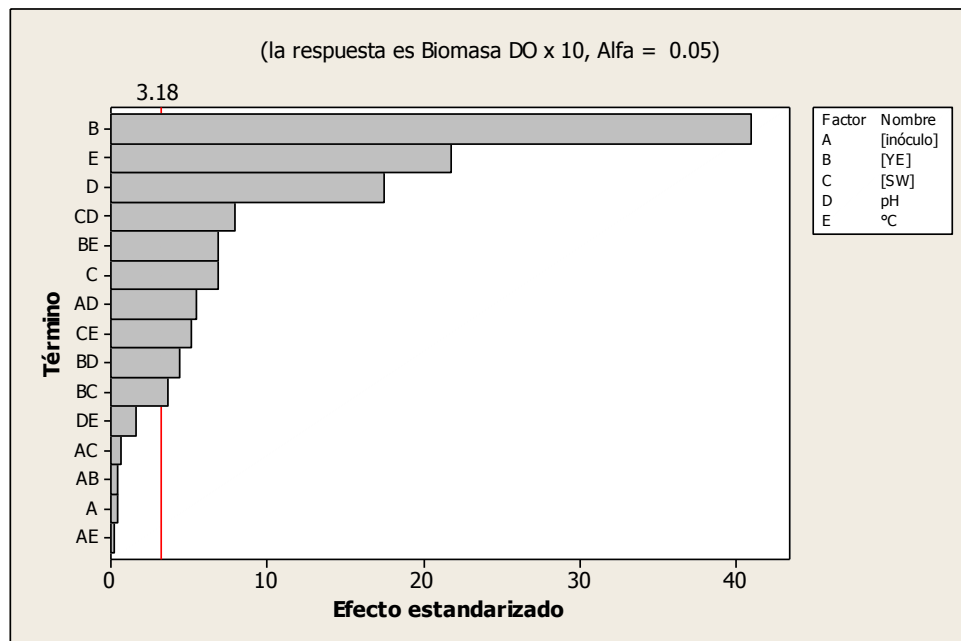


Figura 2. Diagrama Pareto de efectos estandarizados para biomasa

El diagrama de Pareto muestra la longitud de cada barra que es proporcional al valor absoluto de su coeficiente de regresión asociado. La Figura 2 incluye una línea vertical (3.18) que corresponde al 99% de límite de confianza que indica significancia estadística. Los factores cuyas barras cruzan esta línea son significativos respecto a la respuesta deseada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO CAROTENOIDES

Tabla 8. Efectos y coeficientes estimados para Carotenoides (µg/L)

Término	Efecto	Coef	SE Coef	T	P
Constante		16503	532.1	31.01	0.000
[inóculo]	296	148	532.1	0.28	0.799
[YE]	7688	3844	532.1	7.22	0.005
[SW]	3473	1736	532.1	3.26	0.047
pH	-8126	-4063	532.1	-7.64	0.005
°C	11834	5917	532.1	11.12	0.002
[inóculo]*[YE]	-249	-125	532.1	-0.23	0.830
[inóculo]*[SW]	-306	-153	532.1	-0.29	0.793
[inóculo]*pH	-757	-378	532.1	-0.71	0.528
[inóculo]*°C	-1103	-552	532.1	-1.04	0.376
[YE]*[SW]	-1334	-667	532.1	-1.25	0.299
[YE]*pH	-3285	-1643	532.1	-3.09	0.054
[YE]*°C	3096	1548	532.1	2.91	0.062
[SW]*pH	-3387	-1694	532.1	-3.18	0.050
[SW]*°C	880	440	532.1	0.83	0.469
pH*°C	-1726	-863	532.1	-1.62	0.203
Pt Ctral		3139	1189.9	2.64	0.078
S = 2128.48		PRESS = *			
R-cuad. = 98.96%		R-cuad. (pred.) = *%		R-cuad. (ajustado) = 93.44%	

La regresión lineal nos indica que una ecuación de primer orden es la que mejor simula el diseño factorial.

Ecuación 1:

$$Y = 16503 + 148X_1 + 3844X_2 + 1736X_3 - 4063X_4 + 5917X_5$$

El coeficiente de determinación R^2 nos indicó que el 98,96% de variabilidad en la respuesta puede ser explicado por el diseño factorial, por lo que solo 1,04% de la variación no fue explicada por el diseño.

Tabla 9. Análisis de varianza para carotenoides ($\mu\text{g/L}$)

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Efectos principales	5	1109359178	1109359178	221871836	48.97	0.004
[inóculo]	1	351415	351415	351415	0.08	0.799
[YE]	1	236448867	236448867	236448867	52.19	0.005
[SW]	1	48234077	48234077	48234077	10.65	0.047
pH	1	264124057	264124057	264124057	58.30	0.005
°C	1	560200761	560200761	560200761	123.65	0.002
2° orden (interacciones)	10	157311847	157311847	15731185	3.47	0.167
[inóculo]*[YE]	1	248110	248110	248110	0.05	0.830
[inóculo]*[SW]	1	374229	374229	374229	0.08	0.793
[inóculo]*pH	1	2289948	2289948	2289948	0.51	0.528
[inóculo]*°C	1	4868375	4868375	4868375	1.07	0.376
[YE]*[SW]	1	7121216	7121216	7121216	1.57	0.299
[YE]*pH	1	43165895	43165895	43165895	9.53	0.054
[YE]*°C	1	38332046	38332046	38332046	8.46	0.062
[SW]*pH	1	45895493	45895493	45895493	10.13	0.050
[SW]*°C	1	3095734	3095734	3095734	0.68	0.469
pH*°C	1	11920802	11920802	11920802	2.63	0.203
Curvatura	1	31525225	31525225	31525225	6.96	0.078
Error residual	3	13591296	13591296	4530432		
Error puro	3	13591296	13591296	4530432		
Total	19	1311787546				

El análisis ANOVA mostró que los factores más influyentes en la producción de carotenoides son concentraciones de YE y SW, pH y temperatura. Asimismo, las interacciones entre los factores que tuvieron mayor influencia en la producción de carotenoides son “concentración de SW x temperatura” y “pH x temperatura”.

Las figuras de distribución normal y Pareto de los efectos estandarizados ratifican los resultados obtenidos por el análisis del ANOVA:

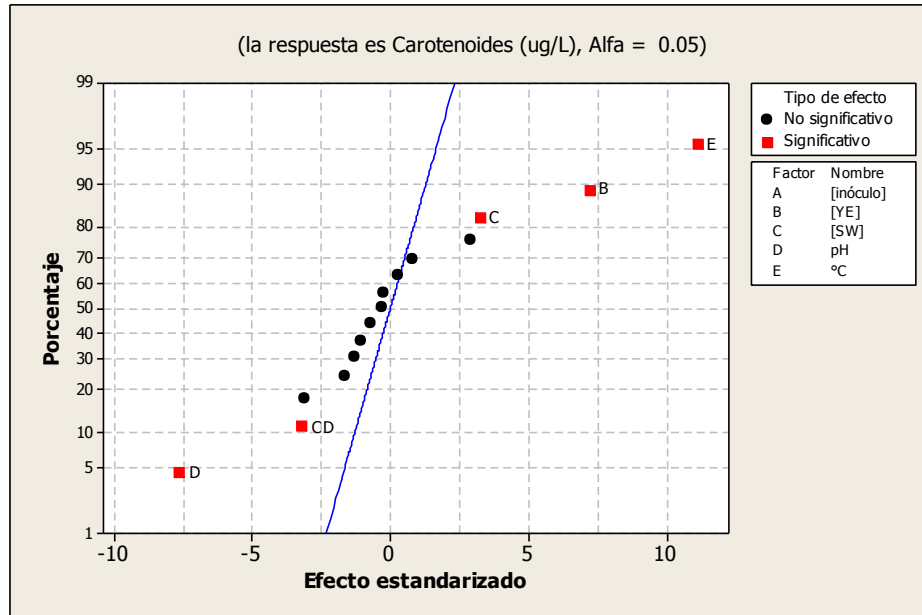


Figura 3. Efectos estandarizados para carotenoides

La Figura 3 indica que los factores que tienen una importancia significativa para producción de carotenoides son las concentraciones de YE y SW, pH y temperatura; por el contrario se observa que la concentración de inóculo no es determinante en la producción de carotenoides.

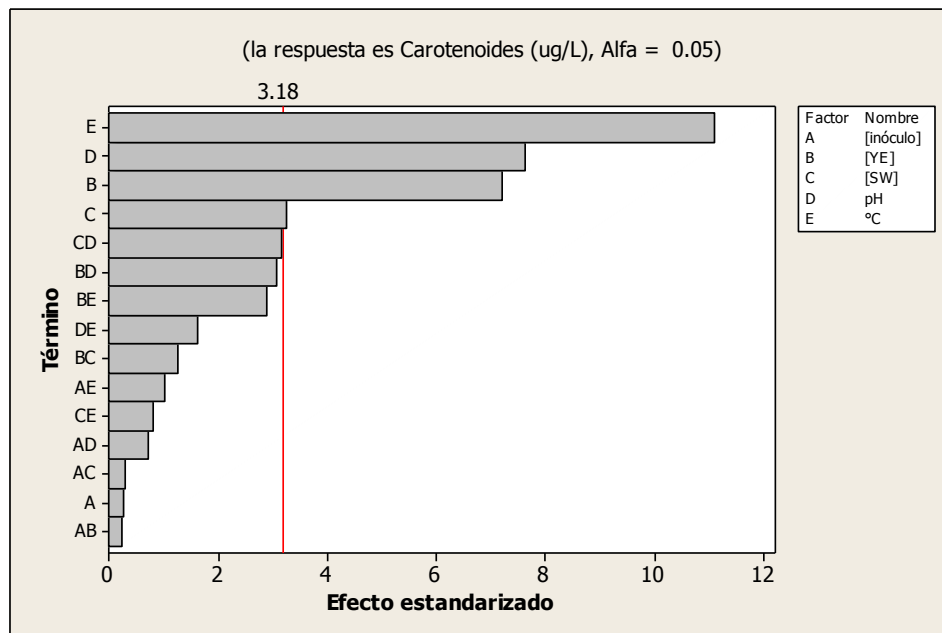


Figura 4. Diagrama Pareto de efectos estandarizados para carotenoides

La Figura 4 corrobora que sólo 4 factores son relevantes en la producción de carotenoides, siendo el orden de influencia de mayor a menor como sigue: temperatura, pH, concentraciones de YE y SW. El límite vertical (3.18) indica el límite de confianza que determina la significancia estadística.

Asimismo, se observó que a concentraciones de YE altas (7g/L), nivel medio de SW (20%), pH bajo (6,0) y temperaturas altas (40°C) hay una mayor producción de carotenoides (Figura 5).

Puesto que se evidenció que sólo para un nivel medio de concentración de SW se origina mayor producción, los niveles de este factor para el diseño central compuesto se mantendrán iguales; por el contrario para concentración de YE y temperatura se explorará un nivel más alto, y en el caso de pH se explorará un nivel inferior.

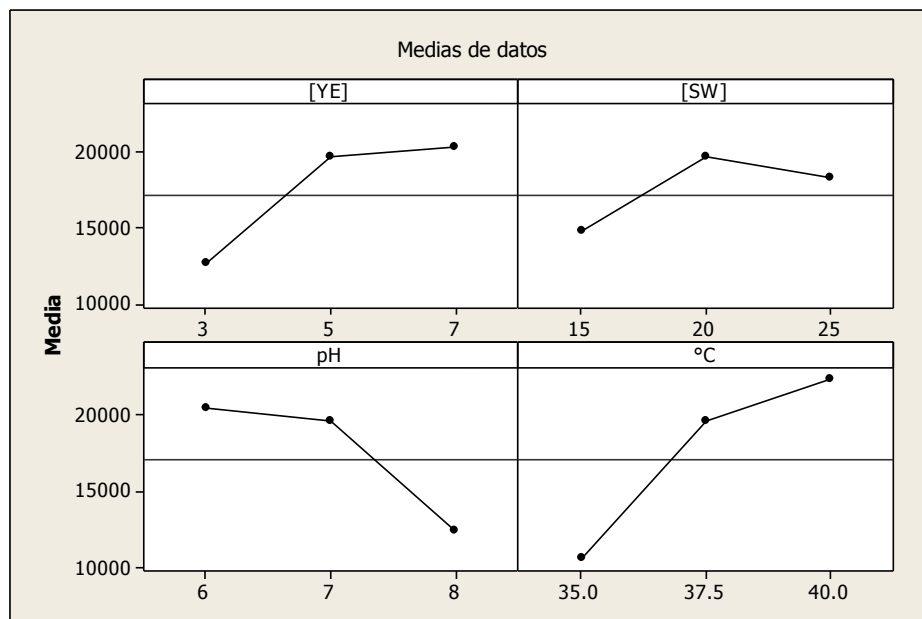


Figura 5. Efectos principales para carotenoides

Lo resaltante de los diseños factoriales es que permiten evaluar las interacciones de los factores y su influencia en la variable respuesta. En la Figura 6 las interacciones entre “[YE] x [SW]”, “[YE] x temperatura”, “[SW] x temperatura” y “pH x temperatura” indican cuales son los niveles altos de estos factores en cada

interacción donde hubo mayor producción de carotenoides. Sin embargo, las interacciones “[YE] x pH” y “[SW] x pH” muestran que a niveles más bajos hay una mayor producción de carotenoides.

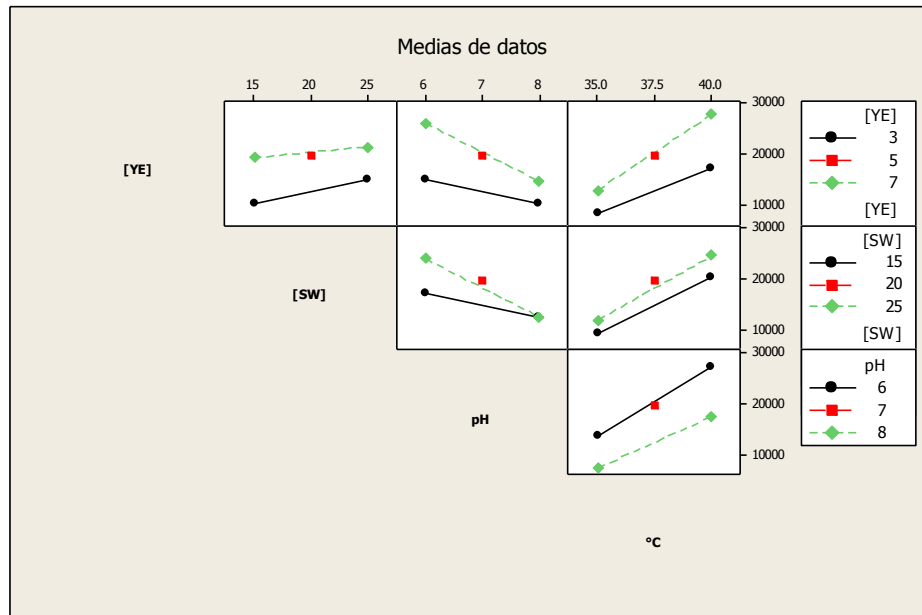


Figura 6. Interacción de factores para carotenoides

IV.2 Diseño central compuesto

La siguiente etapa consistió en ensayos experimentales de acuerdo al diseño matriz de la Tabla 5, los resultados para biomasa y concentración de carotenoides se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Concentraciones de biomasa y carotenoides totales del diseño central compuesto

Diseño matriz					Resultados experimentales	
Ensayo N°	[YE]	[SW]	pH	°C	Biomasa DO x 10	Carotenoides µg/L
1	7.5	20	6	41.5	2.19	33336.3636
2	7.5	20	6	41.5	2.3	30700.0000
3	10	15	7	45	1.53	14013.6364
4	7.5	20	6	41.5	2.487	28363.6364
5	5	15	7	38	1.23	9636.3636
6	5	25	7	38	1.2	22681.8182
7	7.5	20	8	41.5	2.02	20090.9091
8	12.5	20	6	41.5	2.947	20740.9091
9	7.5	20	6	48.5	1.92	36363.6364
10	10	25	7	38	2.11	21818.1818
11	10	25	5	45	0.11	1031.8182
12	5	25	7	45	0.94	15077.2727
13	10	25	5	38	2.82	13500.0000
14	5	25	5	45	1.41	16895.4545
15	5	15	5	38	1.54	7454.5455
16	10	15	7	38	2.42	29545.4545
17	7.5	20	6	41.5	2.63	32390.9091
18	10	15	5	38	2.98	31909.0909
19	7.5	20	6	41.5	2.24	30636.3636
20	7.5	20	6	34.5	2.35	34181.8182
21	5	15	5	45	1.27	6577.2727
22	5	25	5	38	1.21	29272.7273
23	7.5	30	6	41.5	0.11	909.0909
24	10	25	7	45	1.69	11195.4545
25	2.5	20	6	41.5	0.363	15559.0909
26	7.5	10	6	41.5	0.917	1804.5455
27	7.5	20	6	41.5	2.183	40909.0909
28	7.5	20	4	41.5	0	0
29	10	15	5	45	1.74	1181.8182
30	7.5	20	6	41.5	2.18	40936.3636
31	5	15	7	45	0.66	6013.6364

Donde:

[YE]: Concentración de extracto de levadura expresado en gramos por litro.

[SW]: Concentración de agua de sales expresado en porcentaje.

pH: Potencial de hidrogeniones.

°C: Temperatura en grados centígrados.

DO: Densidad óptica expresada en absorbancia.

Se encontró experimentalmente que a YE 10 g/L, SW 15%, pH 5,0 y 38°C hubo una mayor producción de biomasa (ensayo 18). Por otro lado, la mayor producción de carotenoides se realizó a YE 7,5 g/L, SW 20%, pH 6,0 y 41,5°C (ensayo 30).

Tabla 11. Parámetros del diseño central compuesto

Factores:	4	Réplicas:	1
Ensayos base:	31	Total de ensayos:	31
Bloques base:	1	Total de bloques:	1
Factorial de dos niveles: Factorial completo			
Puntos del cubo:	16		
Puntos centrales en el cubo:	7		
Puntos axiales:	8		
Puntos centrales en axial:	0		
Alfa: 2			

Tabla 12. Regresión de superficie de respuesta: carotenoides µg/L vs. YE, SW, pH, °T

Término	EE del		T	P
	Coef	coef.		
Constante	-338499	235801	-1.436	0.170
YE	26608	9156	2.906	0.010
SW	15706	4670	3.363	0.004
pH	56508	24618	2.295	0.036
°T	-2068	8685	-0.238	0.815
YE*YE	-666	188	-3.550	0.003
SW*SW	-334	47	-7.131	0.000
pH*pH	-6187	1172	-5.278	0.000
°T*°T	10	96	0.103	0.920

Optimización de la producción de carotenoides por *Haloferax sp.* utilizando el método de superficie de respuesta

YE*SW	-417	125	-3.324	0.004
YE*pH	894	627	1.426	0.173
YE*°T	-320	179	-1.790	0.092
SW*pH	-25	313	-0.080	0.937
SW*°T	27	90	0.307	0.763
pH*°T	341	448	0.761	0.458
S = 6267.87 PRESS = 2948578118				
R-cuad. = 87.31% R-cuad. (pred.) = 40.49% R-cuad. (ajustado) = 76.21%				

La ecuación de segundo orden simula correctamente la producción carotenoides de acuerdo al diseño central compuesto.

$$Y = -338499 + 26608X_1 + 15706X_2 + 56508X_3 - 2068X_4 - 666X_1^2 - 334X_2^2 - 6187X_3^2 + 10X_4^2 - 417X_1X_2 + 894X_1X_3 - 320X_1X_4 - 25X_2X_3 + 27X_2X_4 + 341X_3X_4$$

Donde:

Y , concentración de carotenoides,

X₁, concentración de YE,

X₂, concentración de SW,

X₃ , pH, y

X₄ ,temperatura

El valor expresado por el coeficiente de determinación R^2 nos indicó que el 87,31% de variabilidad en la respuesta puede ser explicado por el diseño propuesto; es decir, sólo 12,69% de la variación no fue explicada por el diseño.

Tabla 13. Análisis de varianza de carotenoides µg/L

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	14	4326490680	4326490680	309035049	7.87	0.000
Lineal	4	536461229	967152957	241788239	6.15	0.003
YE	1	18287604	331769721	331769721	8.44	0.010
SW	1	22717604	444328025	444328025	11.31	0.004
pH	1	161932873	206983001	206983001	5.27	0.036
°T	1	333523148	2227835	2227835	0.06	0.815
Cuadrado	4	3123496995	3123496995	780874249	19.88	0.000
YE*YE	1	246578102	494970484	494970484	12.60	0.003

SW*SW	1	1764929966	1997939144	1997939144	50.86	0.000
pH*pH	1	1111575466	1094464652	1094464652	27.86	0.000
°T*°T	1	413461	413461	413461	0.01	0.920
interacción	6	666532456	666532456	111088743	2.83	0.045
YE*SW	1	434201406	434201406	434201406	11.05	0.004
YE*pH	1	79838286	79838286	79838286	2.03	0.173
YE*°T	1	125822109	125822109	125822109	3.20	0.092
SW*pH	1	253421	253421	253421	0.01	0.937
SW*°T	1	3692512	3692512	3692512	0.09	0.763
pH*°T	1	22724722	22724722	22724722	0.58	0.458
Error residual	16	628579844	628579844	39286240		
Falta de ajuste	10	475804496	475804496	47580450	1.87	0.229
Error puro	6	152775348	152775348	25462558		
Total	30	4955070524				

Del análisis de varianza (ANOVA) se corrobora que la ecuación de segundo orden (p -value= 0) es la que simula mejor la producción de carotenoides.

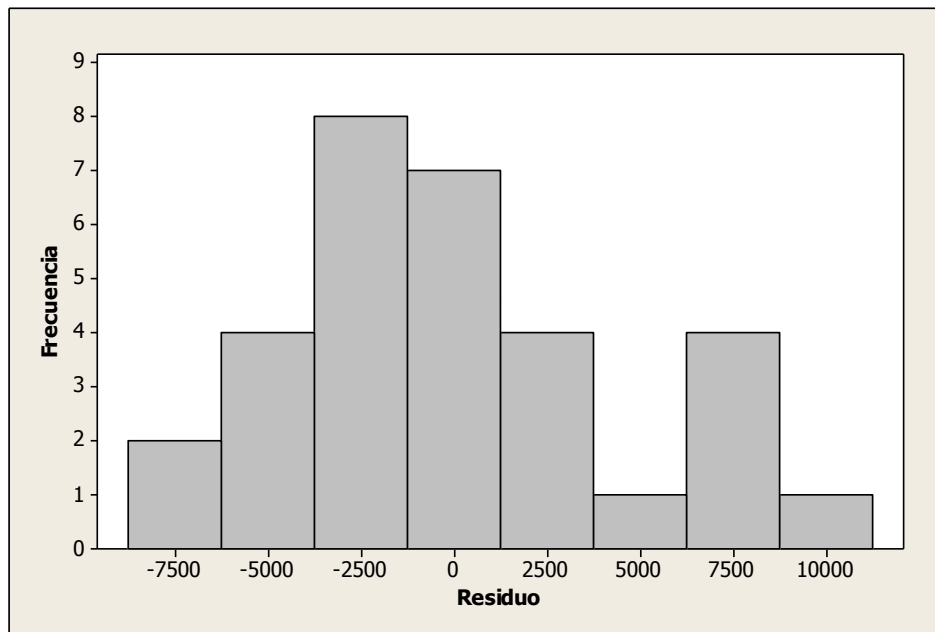


Figura 7. Histograma de residuos para carotenoides µg/L

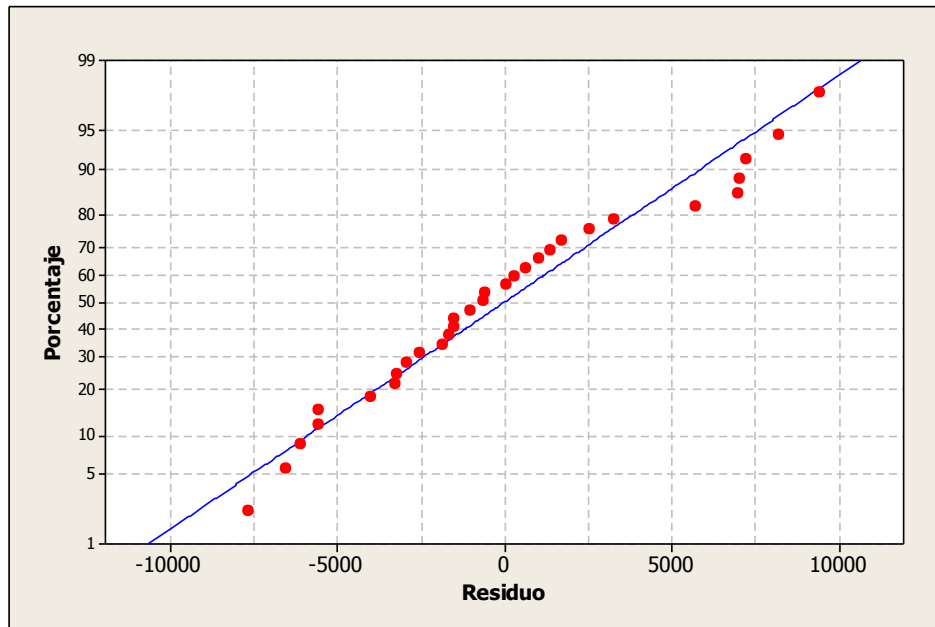


Figura 8: Distribución normal de residuos para carotenoides $\mu\text{g/L}$

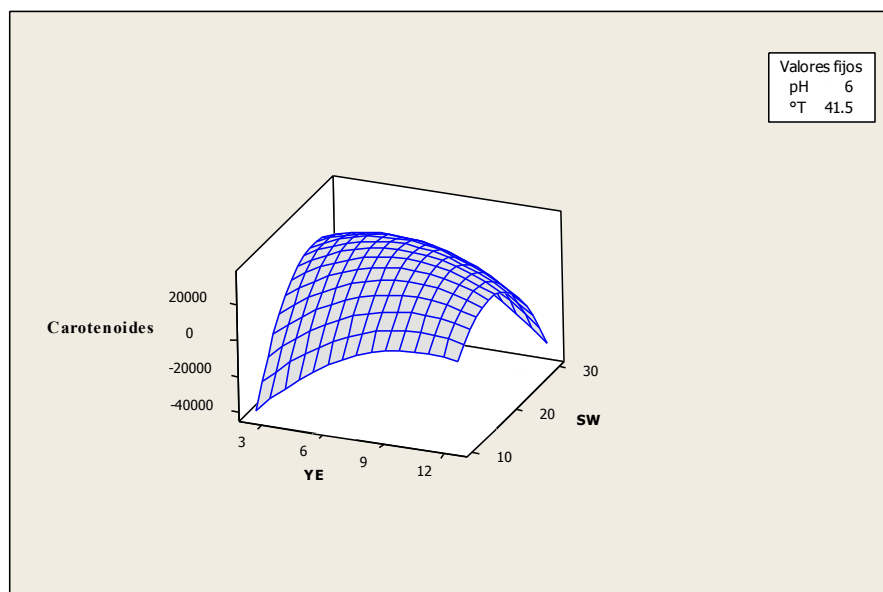


Figura 9. Superficie de respuesta de carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus SW, YE

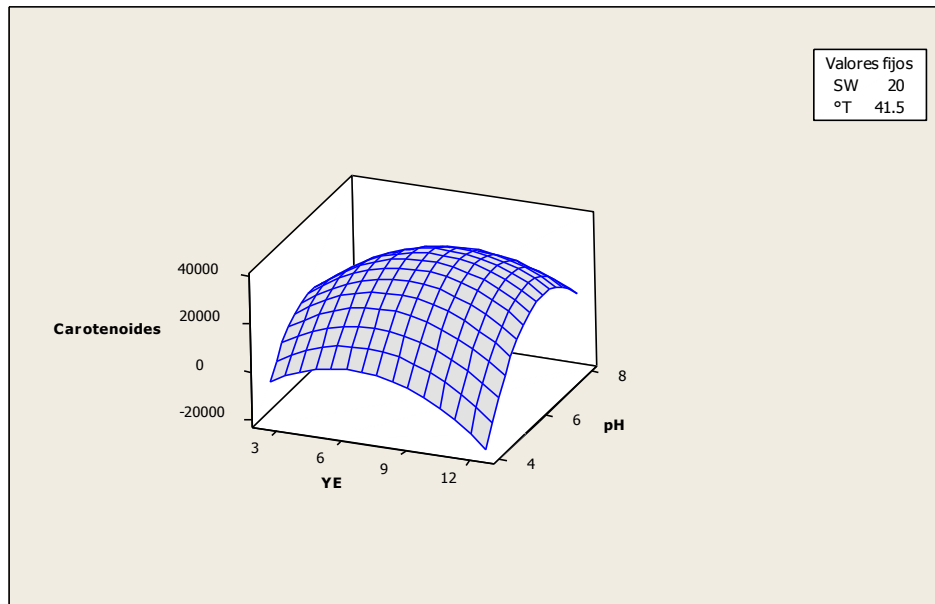


Figura 10. Superficie de respuesta de carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus pH, YE

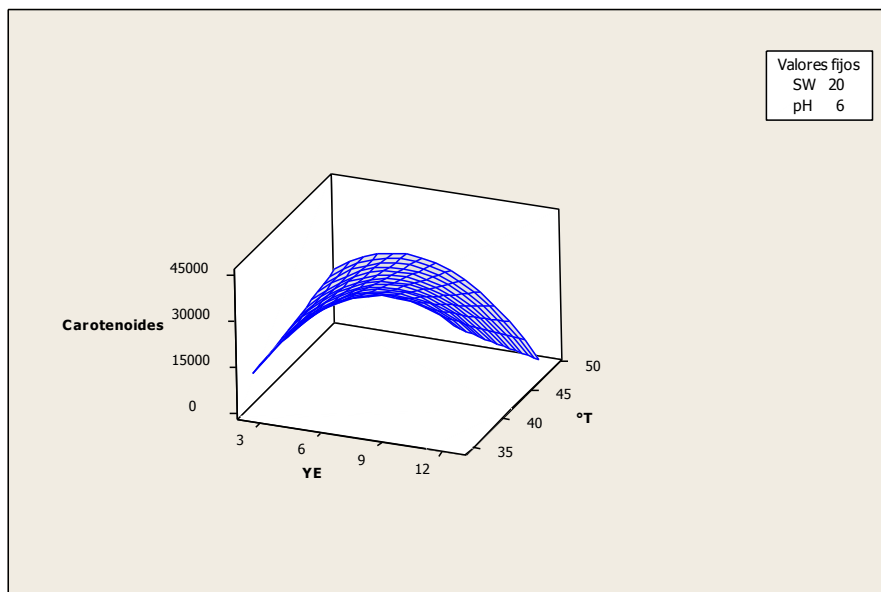


Figura 11. Superficie de respuesta de carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus $^{\circ}\text{T}$, YE

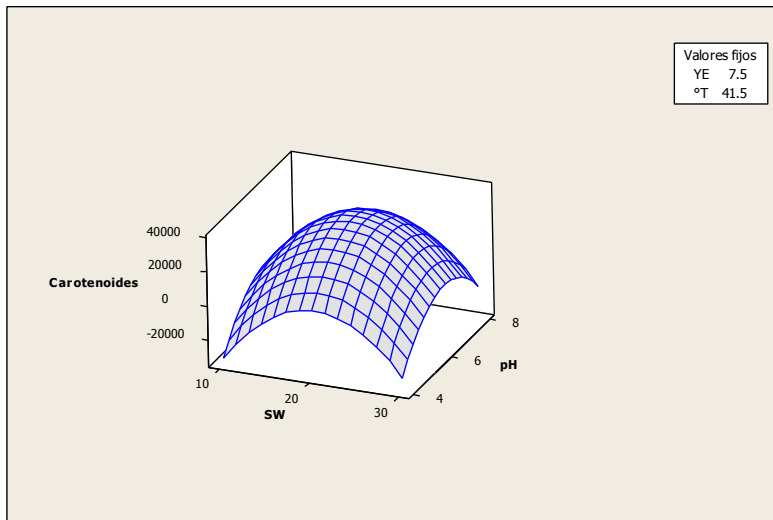


Figura 12. Superficie de respuesta de carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus pH, SW

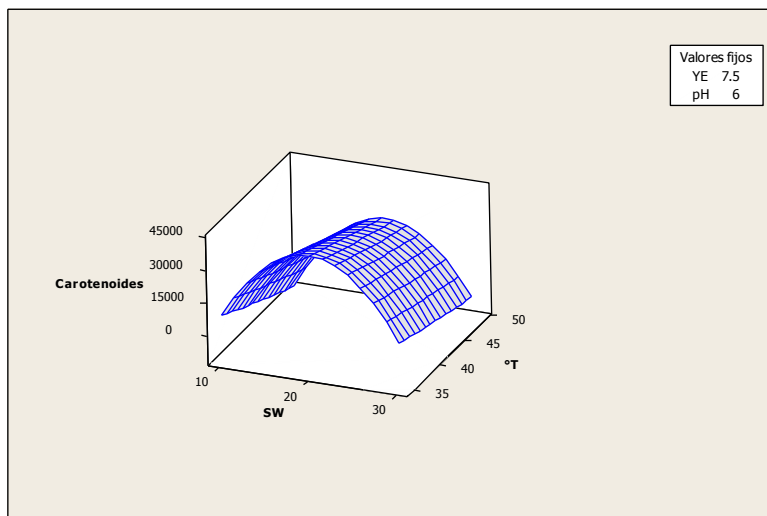


Figura 13. Superficie de respuesta de carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus $^{\circ}\text{T}$, SW

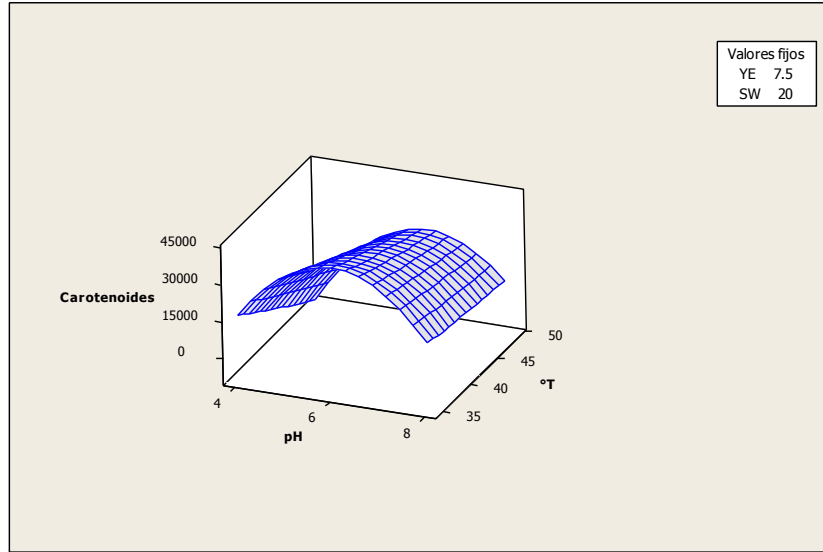


Figura 14. Superficie de respuesta de carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus $^{\circ}\text{T}$, pH

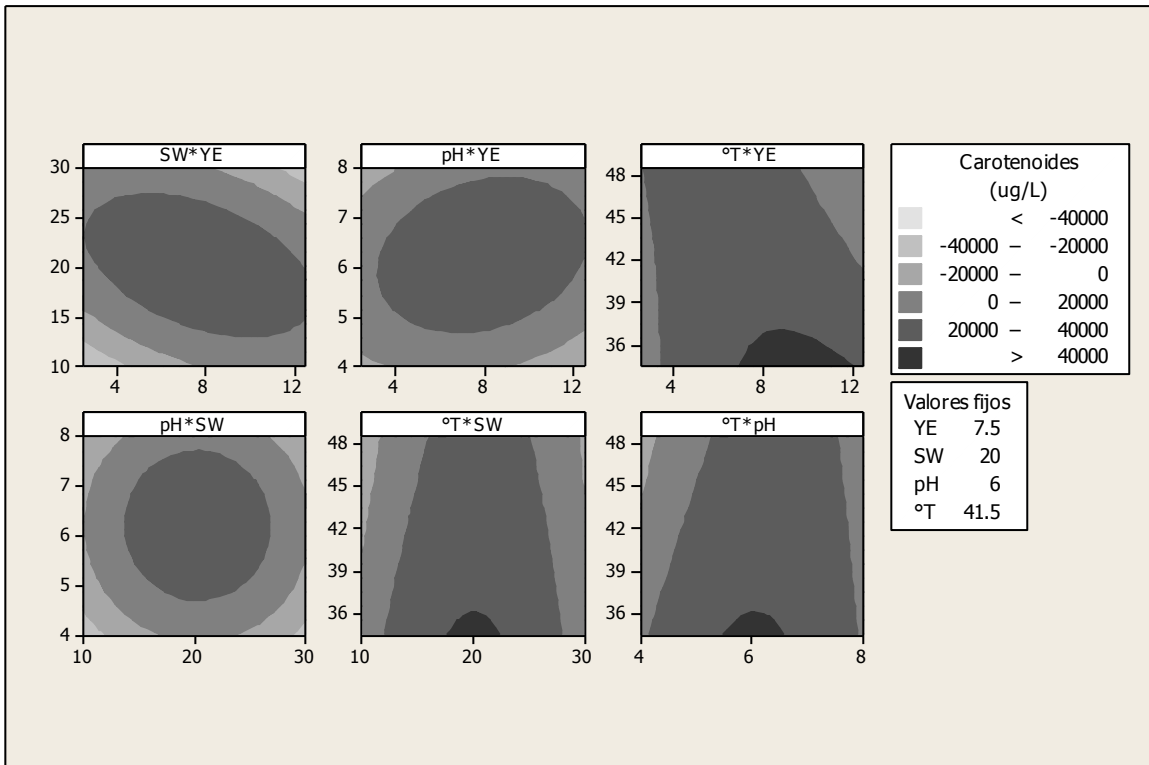


Figura 15. Contornos para carotenoides $\mu\text{g/L}$ versus YE, SW, pH y $^{\circ}\text{T}$

IV.3 Optimización de respuesta

Tabla 14. Parámetros para la optimización de respuesta

Parámetros						
	Meta	Inferior	Objetivo	Superior	Ponderación	Importar
Carotenoides	Máximo	0	41000	41000	1	1
Solución global						
YE	=	10.0758				
SW	=	18.4848				
pH	=	6.22222				
°T	=	34.5				
Respuestas pronosticadas						
Carotenoides	=	45211.4	, deseabilidad =	1.000000		
Deseabilidad compuesta = 1.000000						

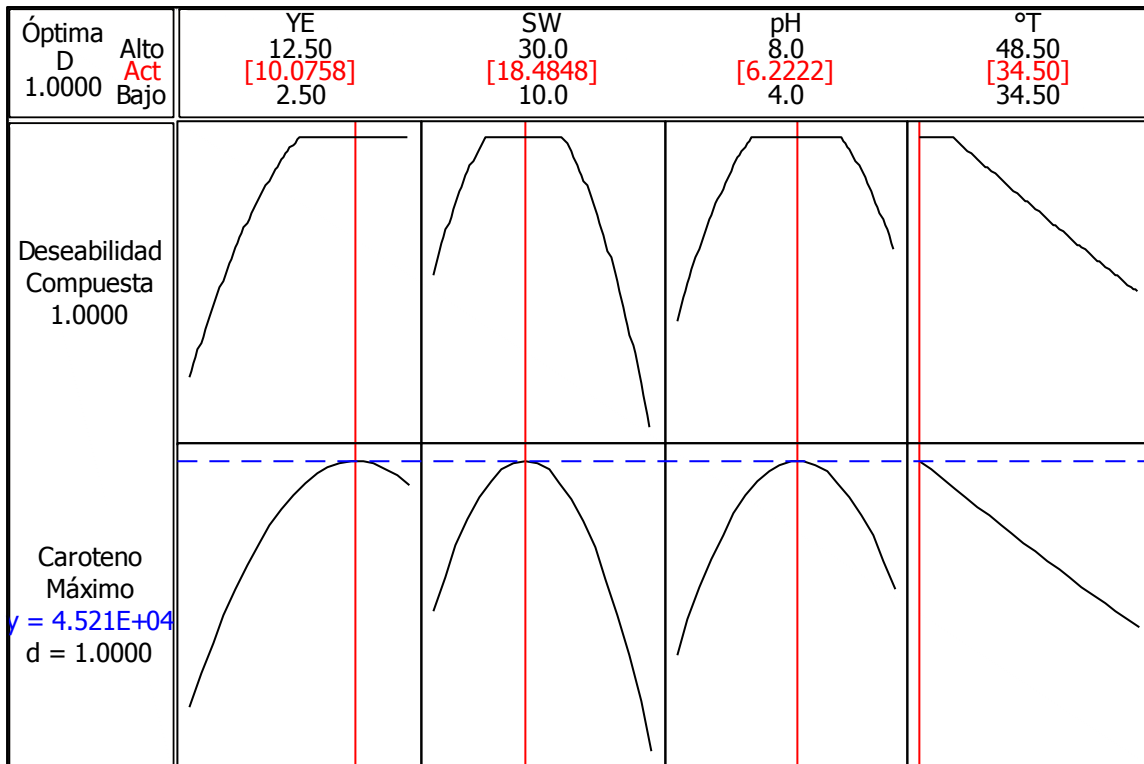


Figura 16: Optimización de producción de carotenoides

De acuerdo a los análisis y ajustes realizados se obtuvo que las condiciones óptimas de producción carotenoides son YE 10,08 g/L, SW 18,50%, pH 6,22 y una temperatura de 34,5°C para un rendimiento teórico de 45211,4 µg/L; siendo el valor experimental obtenido de 44980,0 µg/L.

V. DISCUSIÓN

En los últimos años, la producción de carotenoides de fuentes microbianas se ha incrementado debido a los problemas inherentes a la síntesis química de estos compuestos y a la búsqueda de nuevas fuentes naturales diferentes a las plantas. La producción de carotenoides y en especial la de metabolitos microbianos está ligada a la influencia de dos factores importantes que son las condiciones ambientales y el medio de cultivo para obtener el o los metabolitos requeridos⁵⁹.

En la producción de carotenoides por *Haloferax* sp. (W2) se consideró la concentración salina, expresada como porcentaje de SW, como un factor relevante en la producción de carotenoides. Hanhu, 2002,¹⁰⁰ describió que la concentración salina juega un rol importante en la síntesis de metabolitos, toda vez que el Na⁺ juega un rol importante en el mantenimiento de una presión celular osmótica adecuada¹⁰¹. Así mismo, Ramírez y col., 2001⁵⁷, encontraron que el pH, la temperatura, las concentraciones de carbono e inóculo tienen gran influencia en la producción de carotenoides.

La producción de carotenoides a partir de haloarqueas es rápida y menos costosa toda vez que se emplean una menor cantidad de procesos unitarios. Además, la ruptura celular es más fácil que el de plantas, algas, hongos, levaduras o bacterias.⁴

En el presente trabajo se utilizó el diseño factorial como prueba tamiz para determinar qué factores influyen en la producción de carotenoides. Así, se determinó que la temperatura, el pH, las concentraciones de YE y SW influyen en la producción; pero la concentración de inóculo no es significativa en la producción de carotenoides (Figura 2). En este sentido, Ramírez y col., 2001⁵⁷, encontraron que una concentración de inóculo entre 5% a 10% no fue significativa en la producción de carotenoides por *Phaffia rhodozyma*.

En la primera etapa del estudio se aplicó un diseño factorial donde se obtuvo una mayor producción de carotenoides totales de 37,886 mg/L a las concentraciones de inóculo 5%, YE 7g/L y SW 25 %, pH 6,0 y 40 °C. Se analizó la concentración

de inóculo a los distintos niveles preestablecidos de 5%, 7,5% y 10% y se observó que independientemente del porcentaje de inóculo utilizado se obtuvo alta concentración de biomasa y de carotenoides.

El extracto de levadura (YE), que es la única fuente de carbono y nitrógeno empleado como nutriente en el presente trabajo, tuvo un comportamiento positivo a la concentración de YE de 7 g/L en la que se obtuvo mayor cantidad de biomasa y carotenoides totales, lo cual evidencia una relación directamente proporcional con las variables respuesta.

Asimismo, en la concentración de SW 25%, donde el ion Na⁺ está en mayor porcentaje, aumentó ligeramente la producción de biomasa; sin embargo, a SW 20% se produce mayor cantidad de carotenoides (Figura 5). Por tanto, *Haloferax sp.* (W2) produce mayores concentraciones de carotenoides a SW 20% que a concentraciones salinas más elevadas, similares resultados obtuvieron Fang y col., 2010¹⁰², quienes reportan que al disminuir la concentración de NaCl se incrementa la producción de carotenoides por *Haloferax mediterranei* ATCC 33500.

Respecto al pH, el diseño factorial indicó que a pH 6,0 se obtiene mayor biomasa y carotenoides, lo cual es indicativo que *Haloferax sp.* (W2) crece en ambientes ligeramente ácidos, que favorecen la producción de carotenoides. Asimismo, se determinó que la temperatura es el factor más significativo en la producción de carotenoides dado que a 40°C se obtuvo 37,89 mg/L de carotenoides totales que se corrobora con el análisis de efectos estandarizados de las Figuras 3 y 4.

El diseño factorial facilitó una mejor toma de decisiones de los factores utilizados en el modelo central compuesto conocido como Box Wilson⁷, del análisis se dedujo que la concentración de inóculo no afecta significativamente la producción de carotenoides, por lo que no se exploró en la segunda etapa del estudio, en consecuencia los ensayos de la segunda etapa fueron ejecutados a una concentración de inóculo de 5%.

En el diseño central compuesto se estableció las superficies de respuesta teniendo como variable de respuesta la producción de carotenoides totales, los niveles para el establecimiento del diseño se establecieron en la Tabla 4.

La concentración salina mantuvo el comportamiento del diseño factorial siendo el nivel intermedio SW 20%, del mismo modo, el nivel intermedio de YE fue de 8 g/L , donde ambos, concentraciones de SW y YE produjeron mayor cantidad de carotenoides.

En cuanto se refiere al pH, la producción de carotenoides disminuyó a pH menor que 6,0; lo cual se relaciona con las condiciones de cultivo de *Haloferax sp.* (W2), a pH ácidos disminuye. Sin embargo, se ha descrito que a pH 6,0, *Phaffya rhodozyma* produce 8,100 µg/L de astaxantina⁵⁷.

Contrariamente a la tendencia del diseño factorial para la temperatura a 40 °C, el diseño central compuesto estableció que la mayor producción de carotenoides se observó alrededor de los 35 °C, esta diferencia se debe en gran medida a la interacción de los otros factores con la temperatura. Sin embargo, esta temperatura se encuentra en el rango de 20 a 55°C en el que *Haloferax alexandrinus* crece y produce carotenoides⁴.

Los gráficos de superficie de respuesta (Figura 9-14) fueron establecidos entre 2 factores, mientras que los otros 2 factores se mantuvieron en su nivel intermedio¹⁰³. Las condiciones óptimas de extracción fueron determinadas por el análisis de máxima respuesta mediante Minitab 16¹⁰³, siendo las condiciones óptimas YE 10,08 g/L, SW 18,50%, pH 6,22 y 34,5°C para un rendimiento experimental de 44,98 mg/L de carotenoides totales, siendo éste mayor al obtenido por *Dietzia natronolimnaea*, *Phaffia rhodozyma* y *Haloferax alexandrinus* de 13,94 mg/L¹, 1,29 mg/g⁷ y 6,34 mg/L⁴ de carotenoides totales respectivamente.

Las condiciones obtenidas en el presente estudio constituyen el primer eslabón en la optimización de la producción de carotenoides en biorreactores. Todo ello, permitirá obtener mayor producción de carotenoides. Del mismo modo se puede transferir el proceso tecnológico a nivel industrial, por lo que otras variables que requieren estudio son: la velocidad de agitación, el flujo de aire y la proporción de la dilución en un sistema continuo.

VI. CONCLUSIONES

- Las concentraciones de YE y SW, el pH y la temperatura son factores determinantes en la producción de carotenoides por *Haloferax sp.* (W2). Por el contrario, la concentración de inóculo no influye en la producción.
- La metodología de superficie de respuesta permitió establecer las condiciones óptimas de producción de carotenoides por *Haloferax sp.* (W2) a las concentraciones de YE 10,08 g/L y SW 18,50 %, pH 6,22 y 34,5 °C para un rendimiento experimental de 44,98 mg/L.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nasri MR, Razavi SH. Use of response surface methodology in a fed-batch process for optimization of tricarboxylic acid cycle intermediates to achieve high levels of canthaxanthin from *Dietzia natronolimnaea* HS-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010; 109(4):361–368.
2. Yachai M. Carotenoid production by Halophilic Archaea and its applications. Prince of Songkla University. 2009.
3. Asker D, Ohta Y. *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002; 52: 729-738.
4. Asker D, Ohta Y. Production of canthaxanthin by *Haloferax alexandrinus* under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002; 58:743–750.
5. Vásquez M, Martín AM. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. *Biotechnology and Bioengineering*. 1998; 57(3):314-320.
6. Cifuentes AS, González MA, Vargas S, Hoeneisen M, González N. Optimization of biomass, total carotenoids and asthaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol. Res*. 2003; 36:343-357.
7. Ni H, Chen Q, He G, Wu G, Yang Y. Optimization of acidic extraction of asthaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Zhejiang University*. 2008; 9(1): 51-59.
8. Choudhari S, Singhal R. Media Optimization for the production of β -carotene by *Blakeslea trispora*: A statistical approach. *Bioresource Technology*. 2008; 99: 722-730.
9. Mandelli F y col. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012; 28(4):1781-1790.

10. Moreno M, Sánchez-Porro C, García M, Mellado E. Carotenoids' production from Halophilic Bacteria. Ed. José Luis Barredo, Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.2012; 892: 207-217.
11. DasSarma S, Arora P. Halophiles. Encyclopedia of Life Sciences. 2001.
12. Vachali P, Bhosale P, Bernstein PS. Microbial carotenoids. Ed. José Luis Barredo, Microbial carotenoids from Bacteria and Microalgae: Methods and protocols, Methods in Molecular Biology. 2012; 898: 41-59.
13. Simpson KL et al. Biosynthesis of yeast carotenoids. J Bacteriol. 1964; 88: 1688–1694.
14. Goodwin TW. Biosynthesis of carotenoids. Ed. Goodwin TW. The biochemistry of the carotenoids. Chapman and Hall, Londres. 1980; 33–76.
15. Goodwin TW. Biosynthesis of carotenoids: an overview. Ed. Packer L. Methods in enzymology. Carotenoids, part B: metabolism, genetics and biosynthesis. Academic, San Diego. 1993; 330–340.
16. Fraser PD, Bramley PM. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. Prog Lipid Res. 2004; 43: 228-265.
17. Misawa y col. Functional expression of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthesis gene *crtl* in transgenic plants showing an increase beta-carotene biosynthesis activity and resistance to the bleaching herbicide norflurazon. Plant J. 1993; 4:833-840.
18. DellaPenna D, y col. Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. Plant J. 2006; 45: 982-993.
19. Galpaz y col. A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. Plant cell. 2006; 18: 1947-1960.
20. Ventosa y col. Taxonomic characterization of *Haloferax* sp. ("*H. alicantei*") strain Aa 2.2: description of *Haloferax lucentencis* sp. nov. Extremophiles. 2002; 6: 479-483.

21. Kamekura M. Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles*. 1998; 2: 289-295.
22. Haigh GW. High purity beta-carotene. Patente de Estados Unidos 5,310,554. 1994.
23. Khachik F. Process for isolation, purification, and recrystallization of lutein from saponified marigold oleoresin and uses thereof. Patente de Estados Unidos RE409,31. 2009
24. Ausich RL, Sanders DJ. Process for the formation, isolation and purification of comestible xanthophyll crystals from plants. Patente de Estados Unidos 5,648,564. 1997.
25. Venkatesh NS y col. Medium for the production of betacarotene and other carotenoids from *Dunaliella salina* (ARL 5) and a strain of *Dunaliella salina* for production of carotenes using the novel media. Patente de Estados Unidos. 693,645,9. 2005.
26. Orset S, Young AJ. Low-temperature induced synthesis of a -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (chlorophyta). *J Phycol*. 1999; 35:520–527.
27. Boussiba S, Vonshak A. Procedure for large-scale production of astaxanthin from *Haematococcus*. Patente de Estados Unidos 602,270,1. 2000.
28. Park EK y col. Effects of medium compositions for the growth and the astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Sanop Misaengmul Hakhoechi*. 2001; 29:227–233.
29. Orosa M y col. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnol Lett*. 2001; 23:1079–1085.
30. De la Fuente JL y col. High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Biotechnol*. 2010; 148:144–146.
31. Ranjbar R y col. High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. *Biochem Eng J*. 2008; 39:575–580.

32. Guyomarc'h F y col. Production of carotenoids by *Brevibacterium linens*: variation among strains, kinetic aspects and HPLC profiles. J Ind Microbiol Biotechnol. 2000; 24:64–70.
33. Bhosale P, Bernstein PS. Beta-carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea. J Ind Microbiol Biotechnol. 2004; 31:565–571.
34. Khachik F y col. Partial synthesis of (3R,6'R)-alpha-cryptoxanthin and (3R)-betacryptoxanthin from (3R,3'R,6'R)-lutein. J Nat Prod. 2007; 70:220–226.
35. Khodaiyan F y col. Optimization of canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 from cheese whey using statistical experimental methods. Biochem Eng J. 2008; 40:415–422.
36. Palozza P, Krinsky NI. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. Arch Biochem Biophys. 1992; 297:291–295.
37. Cahyana AH y col. Pyropheophytin A as an antioxidative substance from the marine alga, Arame (*Eicenia bicyclis*). Biosci Biotechnol Agrochem. 1992; 18:1533–1535.
38. Yan X y col. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. Biosci Biotechnol Biochem. 1999; 63:605–607.
39. Kang HS y col. A new phlorotannins from the brown alga *Ecklonia stolonifera*. Chem Pharm Bull. 2003; 51:1012–1014.
40. Ausich RL. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. Pure Appl Chem. 1997; 69:2169–2173.
41. Khachik F. Process for extraction and purification of lutein, zeaxanthin and rare carotenoids from marigold flowers and plants. Patente de Estados Unidos 6,262,284. 2005.
42. Sánchez JF y col. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. Process Biochem. 2008; 43: 398–405.
43. Francis GW y col. Variations in the carotenoid content of *Chlamydomonas reinhardtii* throughout the cell cycle. Arch Microbiol. 1975; 104:249–254.

44. Del Campo JA y col. Lutein production by *Muriellopsis sp.* in an outdoor tubular photobioreactor. *J Biotechnol.* 2001; 85: 289–295.
45. Shi XM y col. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme Microb Technol.* 2000; 27:312–318.
46. Veiga-Crespo y col. Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxantin production. *International Microbiology.* 2005; 8:55-58.
47. Kelly M, Norgard S, Liaaen-Jensen S. Bacterial carotenoids. XXXI. C50 carotenoids. Carotenoids of *Halobacterium Salinarum*, specially bacterioruberin. *Acta Chem. Scand.* 1970; 24: 2169-2182.
48. Kushwaha SC, Kramer JKG, Kates M. Isolation and characterization of carotenoid pigments and other polar isoprenoids from *Halobacterium cutirubrum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1975; 398: 303-313.
49. Box GEP y Behken DW. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics.* 1960; 4: 455-475.
50. Lenth RV. "Quick and easy analysis of unreplicated factorials" *Technometrics.* 1989; 31: 469-473.
51. Montgomery DC. Design and analysis of experiments. Sixth Edition. John Wiley & Sons. New York. 2004.
52. Bisgaard S. The Design and analysis of $2^{k-p} \times 2^{q-r}$ split-plot experiments. *Journal of Quality Technology.* 2000; 32: 39-56.
53. Kowalski S. 24-Run split-plot experiments for robust parameter design. *Journal of Quality Technology.* 2002; 34: 399-410.
54. Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika.* 1946; 34: 255-272.
55. Box GEP y Draper NR. Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons. New York. 1987; 249.
56. Khuri AI y Cornell JA. Response surfaces: designs and analyses. Marcel Dekker, Inc. New York. 1987.

57. Ramírez J, Gutierrez H, Gschaedler A. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. *J. Biotech.* 2001; 88: 259-266.
58. Thana P y col. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology.* 2008; 99: 3110-3115.
59. Khodaiyan F y col. Optimization of canthaxanthin production by *Dietzia natronolimmaea* HS-1 using response surface methodology. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2007; 10(15): 2544-2552.
60. Wang y col. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology. *Journal of Food Science.* 2007; 72(8): 325-329.
61. Klaui H, Bauerfeind CJ. Carotenoids as food colors. Ed. Bauerfeind JC. Carotenoids as colorants. Academic, New York, 1981; 48–292.
62. Christen y col. A randomized trial of beta carotene and age-related cataract in US physicians. *Arch Ophthalmol.* 2003; 121:372-378.
63. Dorgan MO y col. Relationships of serum carotenoids, retinol, alpha-tocopherol, and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri (United States). *Cancer Causes Control.* 1998; 9:89-97.
64. Giovannucci E y col. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med.* 1995; 122: 327-334.
65. Slattery ML y col. Associations between dietary intake and Ki-ras mutations in colon tumors: a population-based study. *Cancer Res.* 2000; 60:6935-6941.
66. Ye X y col. Engineering the provitamin A (beta carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science.* 2000; 287:303-305.
67. Subczynski WK y col. Effect of polarcarotenoids on the oxygen diffusion concentration product in lipid bilayers. An EPR spin label study. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1068:68–72.
68. Mayne ST. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J.* 1996; 10:690–701.

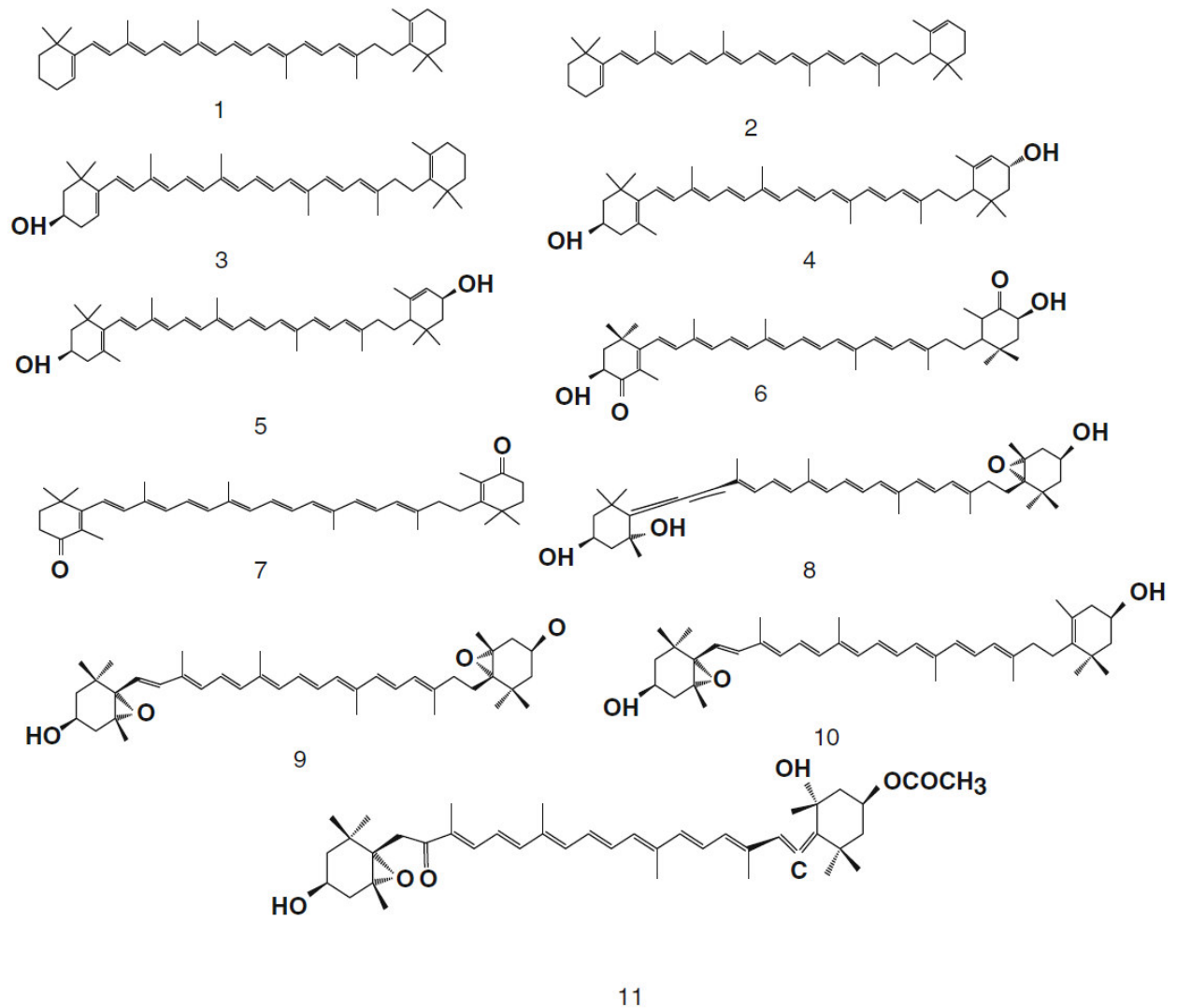
69. Chew BP y col. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Res.* 1999; 19:1849–1853.
70. Guerin M y col. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 2003; 21:210–216.
71. Bubrick P. Production of astaxanthin from *Haematococcus*. *Bioresour Technol.* 1991; 38:237–239.
72. Zheng YG y col. Large-scale production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Food Bioproducts Process.* 2006; 84:164–166.
73. Ye Z y col. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. *Biotechnol Adv.* 2008; 26:352–360.
74. Raja R y col. Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 74:517–523.
75. Ciegler A. Microbial carotenogenesis. Ed. Wayne WU. *Advances in applied microbiology.* Academic, New York. 1965; 1–34.
76. Uchiyama S y col. Anabolic effect of beta-cryptoxanthin on bone components in the femoral tissues of aged rats in vivo and in vitro. *J Health Sci.* 2004; 50:491–496.
77. Binns CW y col. The relationship between dietary carotenoids and prostate cancer risk in Southeast Chinese men. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2004; 13:Suppl.117.
78. Giovannucci E y col. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87:1767–1776.
79. Yuan JM y col. Prediagnostic levels of serum β -cryptoxanthin and retinol predict smoking-related lung cancer risk in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10:767–773.
80. Yuan JM y col. Dietary cryptoxanthin and reduced risk of lung cancer: the Singapore Chinese Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers prev.* 2003; 12:890–898.

81. Kohno H y col. Inhibitory effect of mandarin juice rich in beta-cryptoxanthin and hesperidin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary tumorigenesis in mice. *Cancer Lett.* 2001; 174:141–150.
82. Tanaka T y col. Suppression of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by mandarin juices rich in betacryptoxanthin and hesperidin. *Int J Cancer.* 2000; 88:146–150.
83. Pattison DJ y col. The role of diet in susceptibility to rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol.* 2004; 31:1310–1319.
84. Bhosale P, Bernstein PS. Microbial xanthophylls. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 68:445–455.
85. Baker TM. Canthaxanthin in aquafeed applications: is there any risk? *Trends Food Sci Technol.* 2001; 12:240–243.
86. Nakazawa Y y col. Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer celllines. *J Funct Foods.* 2009; 1:88–97.
87. Maeda H y col. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 332:392–397.
88. Maeda H y col. Effect of medium-chain triacylglycerols on anti-obesity effect of fucoxanthin. *J Oleo Sci.* 2007; 56:615–621.
89. Maeda H y col. Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice. *J Agric Food Chem.* 2007; 55:7701–7706.
90. Athukorala Y y col. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju island in Korea. *Bioresour Technol.* 2007; 98:1711–1716.
91. Je JY y col. Antioxidant activity of enzymatic extracts from the brown seaweed *Undaria pinnatifida* by electron spin resonance spectroscopy. *LWT-Food Sci Technol.* 2009; 42:874–878.
92. Heo SJ et al (2010) Evaluation of antiinflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48:2045–2051.

93. Yun SM y col. Isolation and identification of an antibacterial substance from sea mustard, *Undaria pinnatifida*, for *Streptococcus mutans*. Korean Soc Food Sci Nutr. 2007; 36:149–154.
94. Ziegler RG y col. Importance of α -carotene, β -carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. J Natl Cancer Inst. 1996; 88:612–615.
95. Beatty S y col. Macular pigment optical density and its relationship with serum and dietary levels of lutein and zeaxanthin. Arch Biochem Biophys. 2004; 430:70–76.
96. Hadden WL y col. Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. J Agric Food Chem. 1999; 47:4189–4194.
97. Esquerre GC. Caracterización de una arquea halófila productora de carotenoides aislada de las Salinas de Huacho Lima-Perú. Tesis Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. 2006.
98. Dyall-Smith M y col. The halohandbook: Protocols for haloarcheal genetics. Haloarcheal Genetic Laboratory. Melbourne. 2008; 12-13.
99. Schiedt K, Liaaen-Jensen S. Isolation and analysis. Ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. Carotenoids. Vol. 1. Birkhäuser Verlag, Basilea. 1995; 81–108.
100. Hanhu J. The nutrition of microorganisms. Food Microbiology. Chinese Agriculture Publishing Press, Beijing. 2002.
101. Gejian Z, y Huazhong L. The nutrition and growth of microorganisms. Microbiology. Chinese Science Publishing Press, Beijing. 2004.
102. Fang C y col. Influence of nutritive factors on C50 carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation. Bioresource Technology. 2010; 101: 6487-6493.
103. Lu y col. Optimization of lycopene extraction from tomato cell suspension culture by repose surface methodology. J Agric Food Chem. 2008; 56(17): 7710-7714.

ANEXO 1

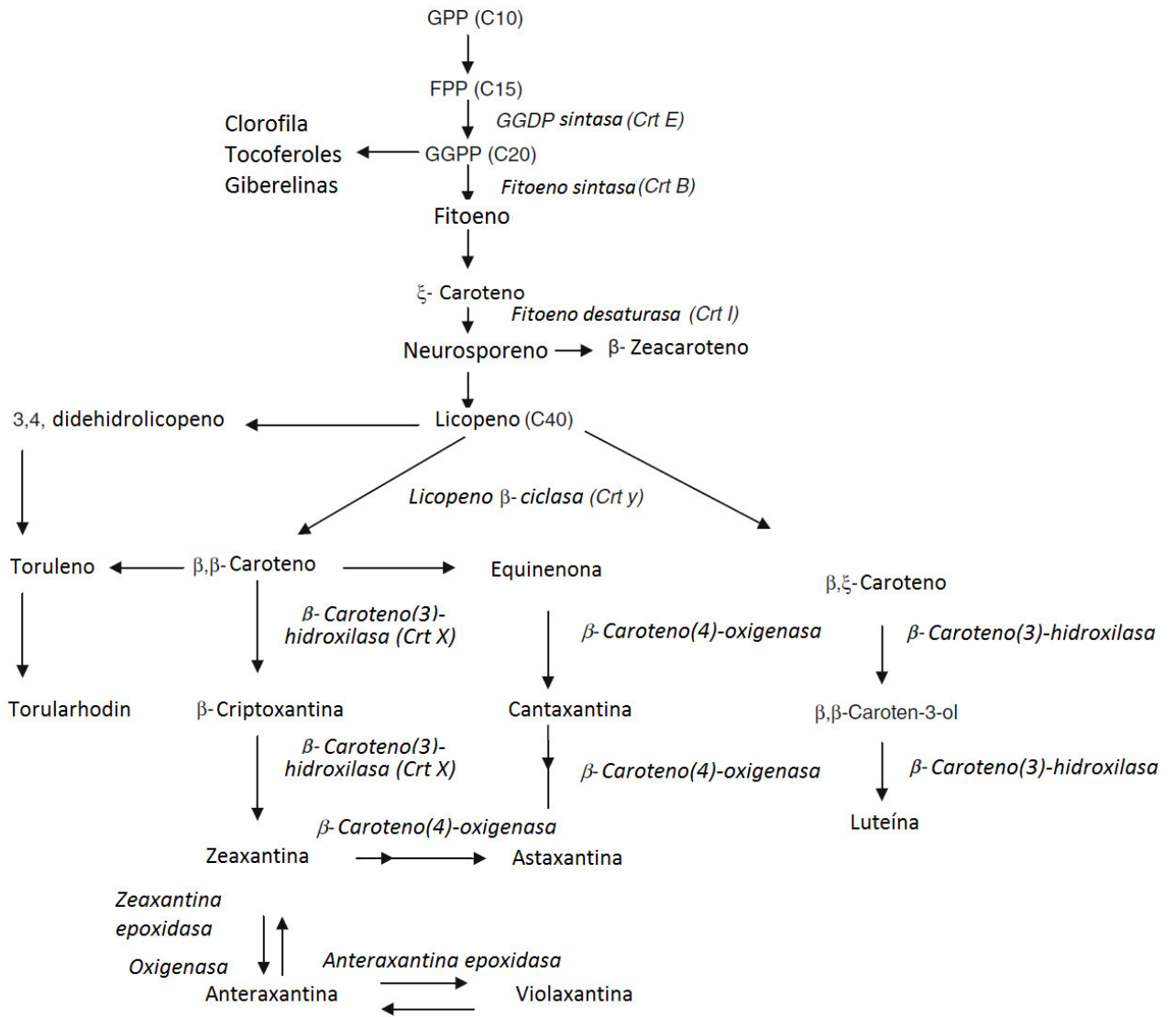
Estructura de los carotenoides microbianos más importantes.



- (1) β -caroteno, (2) α -caroteno, (3) β -criptoxantina, (4) luteína, (5) zeaxantina, (6) astaxantina, (7) cantaxantina, (8) neoxantina, (9) violaxantina, (10) anteraxantina, y (11) fucoxantina.

ANEXO 2

Ruta bioquímica para la síntesis bioquímica carotenoides microbianos.



ANEXO 3

Medio Agua de Sales (SW)

Composición para Solución Stock al 30% (p/v) de sales:

NaCl	234.0 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	39.0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	61.0 g
KCl	6.0 g
NaBr	0.7 g
NaHCO ₃	0.2 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	1.0 g
Agua destilada csp	1000.0 mL

ANEXO 4

Cultivo en placa de *Haloferax sp. W2*.



ANEXO 5

Producción de carotenoides por *Haloferax* sp. W2.



ANEXO 6

Cultivos en matraces de *Haloferax sp.* W2 después de 7 días.



ANEXO 7

Criocentrifugación de cultivos de *Haloferax sp.* W2.



ANEXO 8

Pellets obtenidos después de extracción.



ANEXO 9

Extractos etanólicos de carotenoides.

