

Producción de carotenoides en levaduras nativas aisladas de sistemas acuáticos en Cali, Colombia

Carotenoids production in wild yeasts isolated from aquatic systems in Cali, Colombia

Sandra Viviana Villota C. ¹, Andrés Felipe Vargas S. ^{2,3}, Carlos Andrés Martínez G. ¹, Luz Dary Caicedo B. ¹, Esteban Osorio C. ⁴, Mauricio Ramírez-Castrillón* ^{1*}

-
- ¹ Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, campus Pampalinda, Calle 5 # 62-00, Santiago de Cali, Colombia.
- ² Maestría en Ciencias Biomédicas, Grupo de investigación BIOSALUD, Facultad de Ciencias para la salud, Universidad de Caldas, Calle 65 # 26-10, Manizales, Colombia.
- ³ Grupo de investigación iCUBO, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad Icesi, Calle 18 # 122-135, Cali, Colombia.
- ⁴ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Calle 13 # 100-00, Santiago de Cali, Colombia.
-

Recibido: Agosto 25 de 2020

Aceptado: Octubre 30 de 2020

*Correspondencia del autor: Mauricio Ramírez C

E-mail: mauricio.ramirez00@usc.edu.co

<https://doi.org/10.47499/revistaaccb.v1i32.215>

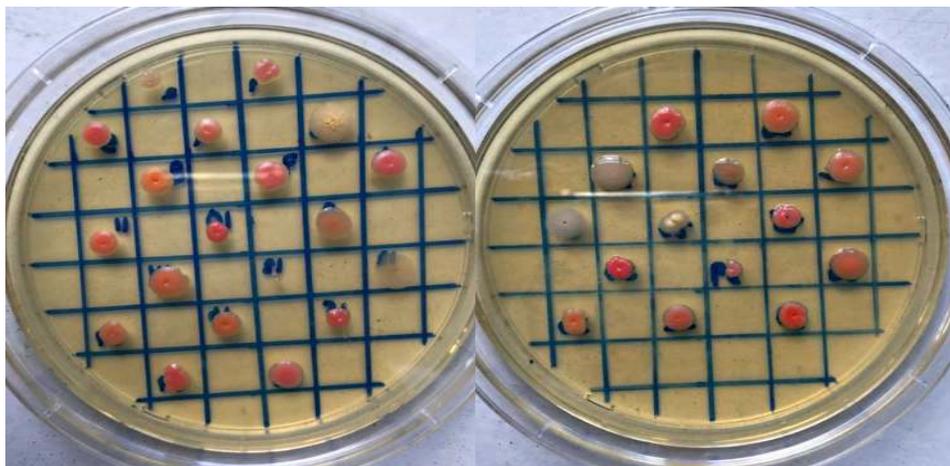
Resumen

Introducción: Los carotenoides son fuente importante de actividades biológicas funcionales, tales como antioxidantes o antimicrobianas, además de tener gran impacto a nivel industrial, ya sea en cosmética o suplementación animal en acuicultura. Se han reportado varias moléculas novedosas a partir de aislamientos en Latinoamérica, principalmente en la Patagonia, Argentina. Sin embargo, no hay reportes en Colombia que evalúen la producción de carotenoides en levaduras nativas pigmentadas. **Objetivo:** Se evaluó la capacidad de producción de carotenoides en levaduras nativas aisladas de lagos, ríos y aguas residuales de la ciudad de Cali, Colombia. **Materiales y métodos:** Se caracterizaron 30 levaduras provenientes de dos colecciones. De estas se obtuvo su biomasa, rendimiento de carotenoides totales y producción de β -caroteno. Las cepas promisorias fueron identificadas secuenciando la región ITS1-5.8S-ITS2. **Resultados:** El mayor rendimiento en la extracción de pigmentos se obtuvo para las cepas P11A ($84,36 \pm 5,24 \mu\text{g/g}$) y *Rhodotorula paludigena* CS13 ($56,26 \pm 7,08 \mu\text{g/g}$), mientras que las concentraciones más altas de β -caroteno fueron $10,2 \mu\text{g/mL}$ (*R. paludigena* CS13) y $9,7 \mu\text{g/mL}$ (*R. mucilaginoso/alborubescens* P10A). La cinética de crecimiento y producción de pigmentos durante cinco días fue óptima para la cepa P11A, ya que hubo un aumento en el rendimiento de carotenoides totales 10 veces mayor (48 h: $109,62 \mu\text{g/g}$, 120 h: $1403,10 \mu\text{g/g}$). **Conclusiones:** En este estudio se encontró que levaduras aisladas de sistemas acuáticos son promisorias para la producción de pigmentos carotenoides (incluyendo β -caroteno), siendo su extracción y caracterización viable para futuros estudios biotecnológicos.

Palabras clave: agua potable, agua residual, caroteno, lagos, pigmentos, *Rhodotorula*, rodotorulina, toruleno

Abstract

Introduction: Carotenoids are an important source of biological activities, such as antioxidant or antimicrobial. Also, carotenoids impact the cosmetic or food supplement industry, mainly in aquaculture. Several reports in Latin America showed novel molecules, mainly in isolated strains in Patagonia, Argentina. However, in Colombia, there are not reports about carotenoid production from pigmented wild yeasts. **Objective:** We assessed the carotenoid production ability in wild yeasts isolated from lakes, wastewater and rivers located in Cali, Colombia. **Materials and methods:** 30 yeasts were selected from two collections, each of them was characterized by the biomass, yield of total carotenoids and β -carotene production. Promisor strains were identified with sequence analysis of ITS1-5.8S-ITS2 region. The highest yield in pigment extraction was obtained by strains P11A ($84,36 \pm 5,24 \mu\text{g/g}$) and *Rhodotorula paludigena* CS13 ($56,26 \pm 7,08 \mu\text{g/g}$), while higher concentrations of β -carotene were $10,2 \mu\text{g/mL}$ (*R. paludigena* CS13) and $9,7 \mu\text{g/mL}$ (*R. mucilaginosa/alborubescens* P10A). The kinetics of growth and pigment production for five days was optimal for the P11A strain, where we found an increasing 10-fold higher (48 h: $109,62 \mu\text{g/g}$, 120 h: $1403,10 \mu\text{g/g}$). **Conclusions:** We suggest that yeasts isolated from aquatic systems are promising for the production of carotenoid pigments (including β -carotene), making their extraction and characterization viable for future biotechnological studies.



Abstract Gráfico

Keywords: Carotenes, drinking water, lakes, pigment, *Rhodotorula*, rhodotorulin, torulene, wastewater

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son compuestos pigmentados tetraterpenoides constituidos por múltiples unidades isoprenoides. La variación en el número de enlaces dobles de polieno son los responsables de la coloración percibida por el ojo humano, que va del amarillo al rojo. Además, la presencia de enlaces dobles conjugados de la cadena poliénica conforman un cromóforo (parte de la estructura responsable de la absorción de luz visible y por lo tanto el color del compuesto), cuya capacidad de absorción de luz da lugar a los llamativos y característicos colores de estos pigmentos. Esto se debe al número de dobles enlaces conjugados y la presencia de diferentes grupos funcionales, los cuales determinarán en última instancia las características espectroscópicas propias de

cada pigmento (1). Estos carotenoides son compuestos ubicuos en la naturaleza, presentes en diversas estructuras de plantas y en gran variedad de animales, algas, hongos y bacterias.

Los pigmentos son responsables del color de las flores y frutos (favorecen la polinización y dispersión de semillas), estructuras de animales (como las plumas y picos de algunos pájaros), el exoesqueleto de crustáceos y el músculo o la piel de algunos peces para otros fines, entre otras funciones (1). Los pigmentos se clasifican en dos grupos: carotenos y xantófilas. Los primeros sólo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo el β -caroteno, el licopeno, etc.) y se conocen más de 600 compuestos. Por otro lado, las xantófilas contienen oxígeno en sus

anillos terminales, como por ejemplo la luteína (2). Los carotenoides pueden tener varios usos; el β -caroteno es precursor de la vitamina A, componente antioxidante (favorece la no aparición del cáncer) y puede prevenir las enfermedades del corazón. El α -caroteno y la criptoxantina son compuestos antioxidantes. El licopeno es un compuesto del tomate y es anticancerígeno (reduce las probabilidades de cáncer próstata, pulmón, estómago, vejiga, pulmón, entre otros) (3). En el caso de las xantofilas: la luteína y la zeaxantina son pigmentos liposolubles de color amarillento que aparecen en algas, bacterias y plantas y protege a estas contra radiación solar). La capsantina es un pigmento que se encuentra en los pimientos rojos y también posee propiedades antioxidantes (1-2, 4).

Se debe tener en cuenta que, en el mercado mundial la producción de la mayoría de los carotenoides corresponde a los obtenidos mediante síntesis química (4). Sin embargo, la creciente demanda de aditivos naturales se debe a que los isómeros naturales parecen ser más activos que los sintetizados químicamente, y la legislación es cada vez más restrictiva sobre el uso de colorantes artificiales. Además, su producción a partir de fuentes naturales es más amigable con el medio ambiente (5). Las propiedades antioxidantes beneficiosas que traen los pigmentos para la salud humana y las propiedades de los colorantes empleados a nivel industrial como pigmentos naturales, generan un crecimiento en la demanda en la producción de carotenoides (6).

Por esta razón, las levaduras pigmentadas han generado interés por las posibles aplicaciones industriales, en especial de alimentos y cosméticos. Las levaduras productoras de carotenoides pertenecientes a los géneros *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus* y la especie *Xanthophyllomyces dendrorhous* han sido estudiadas en otros trabajos (7, 8). Los géneros *Rhodospiridium* y *Sporidiobolus*, son productores de carotenoides como α -caroteno, β -caroteno, toruleno y torularodina (7, 8). Por otro lado, *Xanthophyllomyces dendrorhous* ha sido utilizada industrialmente en la producción de astaxantina.

Debido a la creciente demanda de aditivos naturales, se están desarrollando bioprocesos para la obtención de compuestos de interés industrial, en este caso pigmentos, con altos rendimientos de producción, de bajo costo y sin implicaciones toxicológicas. Por esta razón, las estrategias biotecnológicas para producir pigmentos naturales a partir de microorganismos, específicamente

de levaduras, en donde se obtienen metabolitos secundarios con tonalidades específicas, sin efectos nocivos para la salud y con múltiples ventajas económicas a nivel industrial, es deseado. Además, la importancia del potencial biotecnológico en la industria de generación de pigmentos de origen microbiano, como por ejemplo la utilización de levaduras, que se encuentran en ambientes terrestres y acuáticos, ricos en nutrientes y con una alta disponibilidad de agua, lo que les permite un mejor crecimiento (7, 8). Estos pigmentos celulares producidos por levaduras tienen un impacto menor en el medio ambiente, los cuales tienden a degradarse fácilmente (9). Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de producción de pigmentos en levaduras nativas aisladas de sistemas acuáticos en Cali, Colombia.

MATERIALES Y METODOS

Reactivación de levaduras y caracterización morfológica

Se seleccionaron 27 levaduras en esta investigación a partir de dos colecciones de levaduras, cuyas fuentes de aislamiento fueron ríos, aguas residuales de la ciudad de Cali (10) y lagos de la Universidad del Valle (11). Se realizó el aislamiento de cada cepa de levadura en medio sólido GYP (extracto de levadura 0,5% (p/v) (Scharlau, Barcelona, España) peptona 1% (p/v) (Merck, Darmstadt, Alemania), glucosa 2% (p/v) (Panreac, Barcelona, España), y agar bacteriológico 2% (p/v) (Panreac, Barcelona, España), siembra por agotamiento en cajas Petri, para la recuperación de cada cepa sin ninguna contaminación. Estas se incubaron durante 2 a 3 días entre 20 a 25°C. Finalmente, cada aislado fue crioconservado usando caldo GYP y glicerol 30% v/v a -20°C y en agar GYP inclinado con aceite mineral estéril.

Cada levadura fue agrupada de acuerdo con sus características morfológicas teniendo en cuenta su crecimiento en medio GYP. Se realizó una cuadrícula de 1 cm por cada lado en la base de la caja Petri. Luego de ello, se tomó cada cepa de levadura con palillos estériles, colocándolos en el medio sólido, dejando un espacio para el crecimiento. Se incubaron entre dos a tres días a temperatura ambiente. Se realizaron las descripciones macroscópicas con el estereoscopio (Carl Zeiss), tomando en cuenta el color, borde, superficie, forma, aspecto, elevación y consistencia. En el caso de las descripciones microscópicas se realizaron con el microscopio tomando en cuenta la forma de la célula y su tipo de reproducción.

Extracción de carotenoides

Se seleccionó un representante de cada morfotipo y se cultivó por duplicado durante cinco días a temperatura ambiente en medio sólido MMS (Glucosa 1% (p/v), extracto de levadura 0,1% (p/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2% (p/v) (Panreac, Barcelona, España), KH_2PO_4 (Panreac, Barcelona, España), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05% (p/v) (Panreac, Barcelona, España), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0075% (p/v) (Scharlau, Barcelona, España) y Agar Bacteriológico 2% p/v (Panreac, Barcelona, España)). Para la extracción de pigmentos se usaron dos tubos de microcentrifuga para cada levadura. A cada tubo se le adicionó 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Panreac, Barcelona, España) y se le añadió la biomasa de las cajas de Petri. Luego, se colocó en el vortex a máxima velocidad por 5 min. Posteriormente, se colocaron los tubos en baño maría a 55°C 10 minutos y luego 10 min en vortex, repitiendo este proceso durante una hora. Al cabo del tiempo se centrifugaron a 8000 r.p.m durante 5 min para después trasvasar el sobrenadante a un tubo cónico refrigerado y cubierto con papel aluminio a 0°C (protegido de la luz). Al precipitado, se le adicionó 1 mL de acetona (Chemi, Medellín, Colombia) a 5 °C y se agitó durante 5 minutos en el vortex, al terminar el tiempo se centrifugó a 8000 r.p.m durante 2 minutos (este procedimiento se repitió hasta que no se observaron más pigmentos en el pellet) y el sobrenadante se transfirió a un tubo cónico refrigerado. Al tubo cónico refrigerado con los pigmentos se agregó 1,5 mL de solución saturada de NaCl y 1 mL de hexano (Merck, Darmstadt, Alemania), se agitó en el vortex durante 1 minuto y se centrifugó a 4500 r.p.m. por 5 minutos (con hexano y los pigmentos). Se transfirió la fase que contiene hexano a un frasco color ámbar/caramelo. La cuantificación de los pigmentos extraídos se desarrolló por la técnica de espectrofotometría en donde el blanco fue el hexano grado cromatográfico. El rendimiento de carotenoides totales, en $\mu\text{g/g}$, se determinó empleando la ecuación 1 (12).

$$\text{Carotenoides} = \frac{(\text{Abs} * \text{Volumen} * 10^4 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})}{(\text{CE} * \text{Biomasa} \frac{\text{g}}{\text{mL}})}$$

(ecuación 1)

- ABS = absorbancia a 485 nm
- Volumen = volumen de cultivo en mL
- CE = coeficiente de extinción del carotenoide en hexano = 2592
- Biomasa = peso seco de la biomasa

Cuantificación de β -caroteno por HPLC

Por medio de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) se realizó la cuantificación del contenido de β -caroteno presente en las representantes de cada morfotipo. Para la determinación cuantitativa de los carotenoides se utilizó el área del pico cromatográfico para correlacionarlo con la concentración del analito en la muestra. Como las áreas de los picos cromatográficos de las muestras quedaron comprendidas entre las áreas de los picos cromatográficos de los estándares, se usó para determinar la ecuación de la recta y su concentración. Se cuantificó el β -caroteno por comparación del tiempo de retención y la absorbancia espectral del pico detectado a 450 nm fue interpolada con la curva de calibración, utilizando β -caroteno (Sigma, St. Louis, MO) como estándar.

Cinética de crecimiento y selección cualitativa

Se tomó un aislado del morfotipo seleccionado que produjo mayor concentración de β -caroteno y rendimiento de la extracción de pigmentos, el cual se agregó en un tubo con 3 mL de medio GYP, y se dejó crecer durante 2 a 3 días incubado a temperatura ambiente (por triplicado). Se estandarizó un inóculo a 1×10^6 cel/mL, en 100 mL de medio mínimo sintético MMS líquido. La cinética se realizó durante cinco días a temperatura ambiente y se tomaron muestras a las 0, 3, 6, 9, 24, 48, 72, 96 y 120 horas tomando una alícuota de 1 mL en tubos de microcentrifuga previamente pesados por duplicado. Se evaluaron las siguientes variables: turbidez (absorbancia a 600 nm), contenido de sustrato a través del método DNS (13), biomasa seca (g/L) y producción de carotenos totales ($\mu\text{g/mL}$).

Identificación mediante técnicas moleculares

El ADN genómico de las levaduras fue extraído utilizando el Kit GeneJet (Thermo Fisher Scientific). La concentración y calidad del ADN obtenido se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v), teñidos con *GelRed* y visualizados en luz UV con el fotodocumentador *SmartDoc 2.0 (Accure)*. Se amplificó la región ribosómica ITS1-5.8S-ITS2 utilizando PCR, con los cebadores ITS1 e ITS4. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial a 94°C durante 5 min, 35 ciclos a 94°C durante 15 s, 55°C durante 45 s, 72°C durante 90 s y un ciclo de extensión final a 72°C por 6 min. Seguidamente, los productos de PCR se examinaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) a 50 V durante 45 min y se verificó visualizándolo bajo luz UV usando el fotodocumentador *SmartDoc 2.0 (Accure)*. Los productos

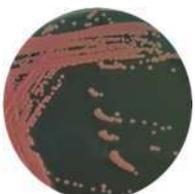
de PCR fueron purificados usando el Kit *Exo-SapIT* (*Gene Rabbit*) y fueron enviados a secuenciación por el método de Sanger (Universidad Nacional, Bogotá). Posteriormente, las secuencias fueron editadas manualmente y comparadas con las secuencias de cepas tipo publicadas en la base de datos *GenBank* y *Mycobank* usando el algoritmo BLAST. Identities iguales o superiores a 98,41% confirmaron la identificación a nivel taxonómico de especie (14).

RESULTADOS

En este estudio se realizó un *screening* de 27 levaduras con pigmento de su colonia (Tabla 1), de las cua-

les se seleccionó un representante de cada morfotipo, teniendo en cuenta sus características macroscópicas y microscópicas. Las levaduras seleccionadas fueron las cepas CS7A, CS11, CS12A, CS13, CS20B, CS17A, CS9A, P10A, P11A, M23B, B2, LC094B y LC071A. También se identificaron las cepas a través de la secuencia ITS1-5.8S-ITS2. Las identities de las secuencias analizadas estuvieron entre 97,99% a 100%. Sin embargo, se presentó una ambigüedad con las cepas P10A y CS9A contra dos especies: *R. mucilaginosa* y *R. alborubescens*.

Tabla 1. Agrupación de levaduras por morfología de sus colonias, descripción microscópica de cada representante (negrita) e identificación molecular. Crecimiento en medio Agar GYP durante 48h. N.I.: no identificada.

Cepas	Descripciones macroscópicas de la colonia	Descripciones microscópicas	Fuente de aislamiento	Identificación	Código acceso Genbank
CS7A, CS15, CS10, CS1, CS6	Circular, Salmon, entero, lisa, húmedo, 	Célula ovalada, Gemación (monopolar)	Canal Sur, Río Cauca	N.I.	
M6			Río Meléndez		
P93			Planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR)		
CS12A, CS14	Circular, naranja melón, lobulada, rugosa, butirosa, convexa, brillante, 	Célula cilíndrica, Gemación (bipolar)	Canal Sur, Río Cauca	N.I.	
P10A, P8, P10B, P10B1	Circular, roja, entero, rugosa, cremosa, plana, brillante, blanda. 	Célula cilíndrica, Gemación (monopolar)	PTAR.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> - <i>Rhodotorula alborubescens</i>	MT161376

M10, M23B	Circular, naranja, entero, lisa, húmedo, convexa, brillante, blanda.		Célula redonda, Ge- mación (monopolar)	Río Meléndez	<i>Rhodotorula paludigena</i>	MT161375
LE074, LC071A	Circular, naranja, ente- ro, lisa, butirosa, plana, brillante, cremosa.		Célula ovalada, Ge- mación (monopolar)	Lagos de la Uni- versidad del Valle	<i>Rhodotorula paludigena</i>	MT161373
LCO94B	Circular, naranja oscuro, entero, rugosa, húme- do, convexa, brillante, mucoside.		Célula redonda, Ge- mación (monopolar)	Lagos de la Uni- versidad del Valle	<i>Rhodotorula paludigena</i>	MT161374
CS11	Circular, naranja, entero, lisa, butirosa, convexa, brillante, blanda.		Célula ovalada, Ge- mación (bipolar)	Canal Sur, Río Cauca	<i>Rhodotorula paludigena</i>	MT161369
CS20B	Circular, rosa coral, entero, lisa, cremosa, convexa, brillante, mucosa.		Célula ovalada, Ge- mación (monopolar)	Canal Sur, Río Cauca	<i>Rhodotorula paludigena</i>	MT161371

CS13	Circular, naranja, entero, rugosa, húmedo, hundido, opaca, mucoide.		Célula ovalada, Gemación (monopolar)	Canal Sur, Río Cauca	<i>Rhodotorula paludigena</i>	MT161370
P11A	Irregular, roja oscura, entero, lisa, arenosa, convexa, brillante, cremosa.		Célula redonda, Gemación (bipolar)	Planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) Canal Sur, Río Cauca	N.I.	
CS9A, CS9B, CS9	Circular, naranja ámbar, entero rugosa, cremosa, convexa, brillante, mucoide.		Célula ovalada, Gemación (monopolar)	Canal Sur, Río Cauca	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> - <i>Rhodotorula alborubescens</i>	MT161372
CS17A	Irregular, naranja, lobulada, lisa, húmedo, convexa, brillante, blanda.		Célula cilíndrica, Gemación (monopolar)	Canal Sur, Río Cauca	N.I.	

En la Tabla 2 se muestra la extracción de pigmentos iniciando con la biomasa inicial de cada muestra seguida del rendimiento de cada levadura y concentración de β -caroteno cuantificado por HPLC. La curva de calibración y cromatogramas obtenidos se encuentran en

el Anexo 1. Las tres cepas con mayor concentración de β -caroteno fueron *R. paludigena* CS13 (10,2 $\mu\text{g/mL}$), *R. mucilaginosa/R. alborubescens* P10A (9,7 $\mu\text{g/mL}$) y P11A (7,5 $\mu\text{g/mL}$), por lo que fueron seleccionadas para el estudio de la cinética de crecimiento

Tabla 2. Extracción de pigmentos carotenoides de cepas de levadura preseleccionadas y caracterización de pigmentos por HPLC de los representantes de cada morfotipo.

Cepa	Biomasa usada en extracción (mg)	Rendimiento de carotenoides totales (µg/g)	Concentración de β-caroteno (µg/mL)
P11A	88,90	84,36 ± 5,24	7,5
LC71A	88,90	62,99 ± 3,94	5,6
CS13	181,30	56,26 ± 7,08	10,2
P10A	177,90	54,53 ± 6,73	9,7
M23B	152,03	54,61 ± 5,76	8,3
LC094B	217,03	42,40 ± 6,35	9,2
CS12A	100,00	37,00 ± 2,54	3,7
CS20B	237,36	34,12 ± 5,56	8,1
CS7A	273,36	25,96 ± 4,82	7,1
CS9A	186,86	18,73 ± 2,34	3,5
CS11	188,06	10,10 ± 1,21	1,9
CS17A	130,23	6,14 ± 0,47	0,8

La Figura 1 muestra las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de pigmentos durante 120h para las cepas *R. paludigena* CS13, *R. mucilaginosa/alborubescens* P10A y P11A. La concentración celular de la cepa *R. paludigena* CS13 (Figura 1A) en las primeras 9 h fue estable, sugiriendo que durante ese periodo de tiempo ocurrió la adaptación al medio de cultivo. Por otro lado, no se observó la fase estacionaria. Finalizadas las 120 h de cinética, en el medio de cultivo aún se detectaba glucosa, indicando que aproximadamente el 50% fue consumida. Finalmente, no se observó un aumento en el rendimiento de pigmentos entre 48 y 120h (913,65 µg/g). La cepa P11A (Figura 1B), por el contrario, mostró en su cinética fases lag, exponencial y estacionaria. Sin embargo, el consumo de glucosa finalizadas las 120 h no fue completo. El

rendimiento de pigmentos carotenoides aumentó entre 48 y 120 h, pasando de 35,83 µg/g hasta 98,92 µg/g. La cepa *R. mucilaginosa/alborubescens* P10A (Figura 1C) tampoco consumió toda la glucosa, ya que se determinó la presencia de esta al finalizar la cinética (120 h). La fase lag ocurrió durante las primeras 9 h, mientras que alcanzó su fase estacionaria en 48 h. Al contrario que las otras cepas, el rendimiento de pigmentos carotenoides aumentó de 109,62 µg/g a las 48 h a 1403,10 µg/g a las 120 h, mostrando una acumulación 10 veces mayor entre las 48 y 72 h. Comparando las gráficas, en el caso de la concentración celular durante las 120 h, para la cepa CS13 su concentración máxima fue a las 72 h con $6,6 \times 10^6$ cel/mL, para la cepa P11A fue a las 120 h con $9,9 \times 10^6$ cel/mL y para la cepa P10A a las 120 h produjo $5,7 \times 10^6$ cel/mL.

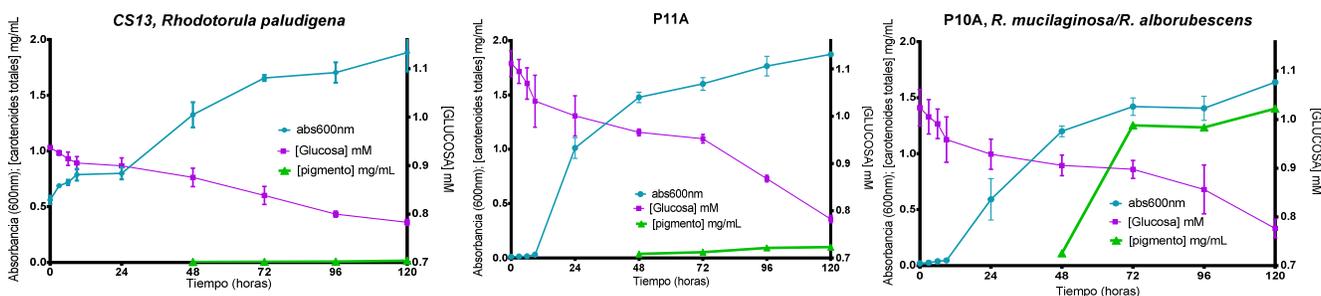


Figura 1. Cinética de crecimiento y producción de pigmentos de las cepas *R. paludigena* CS13 (A), P11A (B) y *R. mucilaginosa/alborubescens* P10A (C).

DISCUSIÓN

Al realizar la búsqueda de las cepas, se observaron y clasificaron de acuerdo a su morfotipo y a su pigmentación. Esta última característica puede variar dependiendo de las condiciones del medio de cultivo (15). En el

caso del medio GYP, este tiene más cantidad de glucosa y extracto de levadura, que el medio MMS, que es inductor de pigmentos. Además, el MMS contiene sales como el sulfato de amonio que actúa como fuente de nitrógeno inorgánico (necesario para la multiplicación

de las levaduras y su conservación en actividad durante toda la duración de la fermentación). El sulfato de amonio es de rápida asimilación para las levaduras y es necesario en este medio para la síntesis de aminoácidos y proteínas. Otra sal del medio MMS es el fosfato dipotásico, que sirve como fuente de fósforo y potasio, controla la acidez del medio y es un estabilizante durante la fermentación. El sulfato de magnesio heptahidratado sirve como fuente de magnesio, el cual es cofactor de muchas enzimas, funciona también como estabilizante durante la producción de carotenos (15). Finalmente, el cloruro de calcio dihidratado es un componente integral de la pared celular de las levaduras, además de controlar la acidez y mejorar el proceso de la fermentación.

En cuanto a la identificación a nivel de especie de las cepas de levaduras seleccionadas, se determinó la especie *R. paludigena* para seis de las cepas seleccionadas como morfotipos. En el caso de dos cepas, P10A y CS9A, el análisis mostró una ambigüedad entre *R. mucilaginoso* y *R. alborubescens*. Respecto a estas especies, la primera vez que se describió *Sporobolomyces alborubescens* fue en 1930 (16). En el 2011 fue renombrada como un sinónimo de *R. mucilaginoso* (17). Sin embargo, en 2015 nuevamente fue separada y renombrada como *R. alborubescens* (18), a pesar que en los diferentes árboles filogenéticos reconstruidos aparecen en el mismo clado (18). Por lo tanto, la región ITS secuenciada no consigue resolver la identificación a nivel taxonómico de especie (19) y se debe buscar una nueva estrategia que permita identificarlas sin ambigüedades.

En cuanto a la producción de carotenoides, en todas las cepas evaluadas se logró extraer y cuantificar el β -caroteno, siendo tres cepas, *R. paludigena* CS13, *R. mucilaginoso/R. alborubescens* P10A y P11A mostraron tener las mayores concentraciones de β -caroteno. Los carotenoides de acuerdo con su estructura se extraen con solventes polares o apolares. El cloruro de sodio no extrae el pigmento, si no que contribuye a mejorar la extracción al deshidratar las células por efecto de la ósmosis (20). El DMSO es uno de los solventes más utilizados en la última década para la extracción de pigmentos fotosintéticos en diferentes tejidos vegetales, debido a la estabilidad de los extractos y su gran poder de extracción (21). La acetona y el hexano se usaron para evitar la formación de emulsión, la cual es difícil de deshacer y ocasiona pérdidas de carotenoides que se quedan en la fase acuosa (21). Cada uno de estos solventes ayudó a obtener un buen rendimiento en la extracción notándose que durante el experimento el pro-

citado quedó sin pigmentación visible.

Relacionado con la extracción de pigmentos se han utilizado diferentes solventes. Por ejemplo, etanol absoluto para extraer 1,29 mg de carotenoides totales de *R. mucilaginoso* (22), 44,98 mg/L de carotenos de *Haloferax* sp. (23) y 240 μ g/g en *R. glutinis* (24). Por otro lado, éter dietílico y DMSO en la extracción de pigmentos en *R. mucilaginoso*, *R. glutinis* y *R. minuta* (25). acetona para extraer 64,51 mg/L de carotenoides totales en *Rhodospordiobolus poonsokiae*, *Rh. ruineniae* y *R. paludigena* (26). De acuerdo con lo anterior, la estrategia utilizada en este trabajo, utilizando DMSO y acetona concuerda con varias de las estrategias empleadas en este campo.

Para caracterizar mejor las cepas con las concentraciones más elevadas de β -caroteno, se realizaron unas cinéticas de crecimiento, evaluando la concentración celular, la producción del caroteno y el consumo de glucosa durante 120 h. Trabajos anteriores han reportado curvas de crecimiento que varían de 72 a 120 h. Por ejemplo, fue utilizada la cepa *R. mucilaginoso* UNALL-001L en medio YM, la cual presentó un comportamiento típico de crecimiento microbiano con una fase de latencia menor a 6 h, una fase exponencial de 60-70 h y una fase estacionaria que se prolongó hasta el final del experimento (144 h). Con relación a los azúcares reductores, se alcanzó una eficiencia de consumo de 76% y el máximo crecimiento de la levadura se obtuvo con 5,3g/L. En un estudio de mapeo de 8 cepas de *R. mucilaginoso*, obtuvieron 4.9-5.7 g de biomasa seca a las 72 h de crecimiento, mientras que las tasas de crecimiento del género *Rhodotorula* variaron entre 0,01 y 0,1 (27). En un estudio donde se comparó una cepa silvestre de levadura con una modificada por medio de mutagenesis (radiación UV), se observó que, mientras la cepa nativa produjo 2,2 mg/L en 72 h, la levadura mutagenizada aumentó la producción a 33 mg/L en el mismo periodo de tiempo, más de 15 veces la concentración de la cepa silvestre (28). Actualmente la mayor producción de carotenos por una cepa de *R. mucilaginoso* es de 12,5 mg/L (β -caroteno) y al utilizar glicerol como fuente de carbono, *R. glutinis* es capaz de producir 35,2 mg/g de β -caroteno (29). Esto sugiere que las cepas del género *Rhodotorula* tienen el potencial de aumentar su producción de carotenos a niveles similares a los 130 mg/L en las condiciones apropiadas (30).

En este estudio, la cepa P10A presentó un mayor rendimiento que las otras dos cepas (CS13, P11A; Figura 1).

También, la producción máxima de carotenoides totales fue de 1403,10 $\mu\text{g/g}$, y 76% de consumo de glucosa al finalizar la cinética. En el caso de la producción de carotenos fue de 7.2 mg/L (β -caroteno). La cepa usada en este estudio no solo produjo una cantidad de caroteno totales mayor, sino que también su producción de β -caroteno fue mejor frente a otros estudios (24-28). Cabe resaltar que las diferentes investigaciones mencionadas se han realizado en condiciones diferentes, tales como el uso de cepas mutagenizadas, y la utilización de glicerol o desechos industriales como fuentes de carbono, etc., mientras que en el presente trabajo, los niveles de producción de β -caroteno se consiguieron en condiciones normales en medio de cultivo MMS.

En conclusión, se determinó que la metodología utilizada para la extracción fue exitosa ya que todos los aislados evaluados presentaron carotenos totales, dejando el pellet totalmente blanco. Además, el empleo de la técnica de cuantificación por HPLC no solo facilitó la caracterización del β -caroteno sino también la cantidad que puede tener una muestra. Los resultados obtenidos mediante el protocolo de extracción de carotenos totales

con solventes apolares y polares, que se obtuvo con las tres cepas seleccionadas (CS13, P10A y P11A) mostró que el mejor rendimiento de carotenos totales fue de la cepa P10A con 1403,1 $\mu\text{g/g}$ y concentraciones de β -caroteno de 7,5 $\mu\text{g/mL}$. Fueron identificados dos especies de 13 morfotipos, perteneciendo todos al género *Rhodotorula*. Estudios posteriores podrán determinar la eficiencia de producción de estas cepas en sustratos de bajo costo, tales como residuos agroindustriales.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de ingeniería bioquímica de la Universidad ICESI por el apoyo logístico para la realización de análisis de HPLC en sus instalaciones.

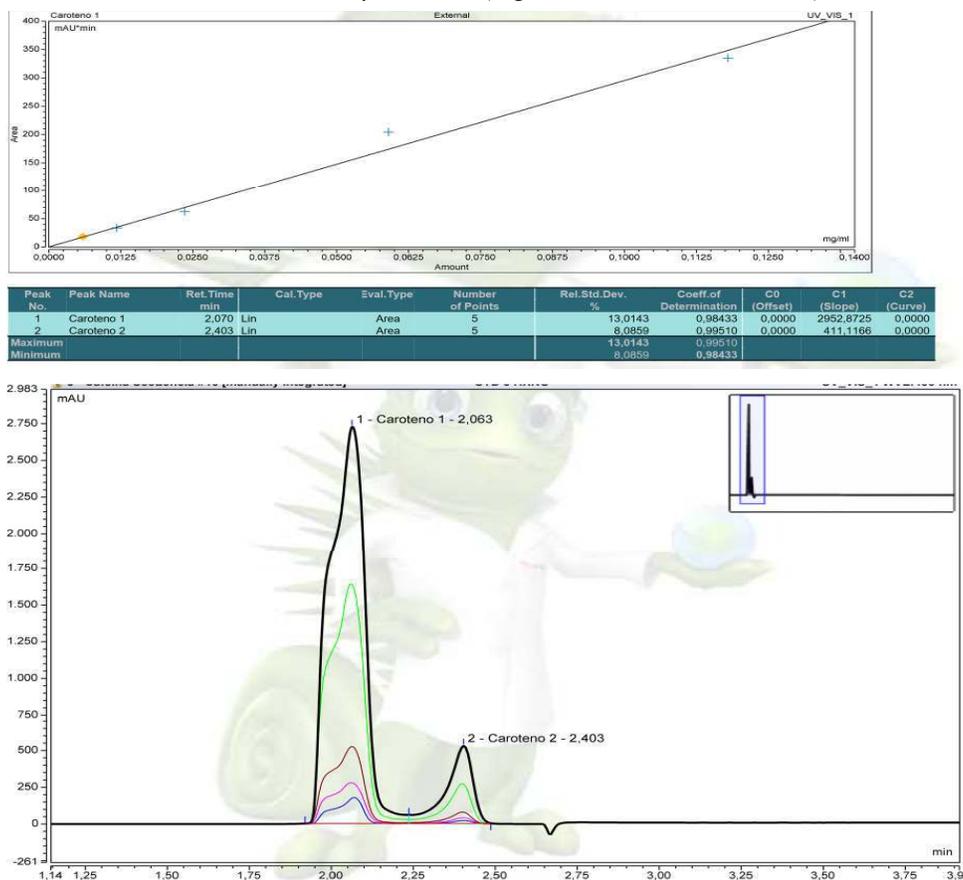
CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés en el presente estudio

Este proyecto fue financiado por la Universidad Santiago de Cali (Códigos 934-621119-561 y 934-621119).

Material suplementario

anexo1: Curva de calibración del β -caroteno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).



Referencias

1. Carranco Jáuregui, M. E., Calvo Carrillo, M. de la C., Pérez-Gil Romo, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Arch Latinoam Nutr*, 61 (3), 233-241.
2. Meléndez-Martínez, A.J., Mapelli-Brahm, P. Hornero-Méndez, D., Vicario, I.M. (2019); Chapter 1. Structures, nomenclature and general chemistry of carotenoids and their esters. En *Carotenoid Esters in Foods: Physical, Chemical and Biological Properties*. Pp 1-50.
3. Chen, P., Zhang, W., Wang, X., Zhao, K., Negi, D. S., Zhuo, L., Qi, M., Wang, X., & Zhang, X. (2015). Lycopene and Risk of Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine*, 94 (33), e1260.
4. Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M. Heredia, F.J. (2007). Relationship between the color and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chem*, 101 (3), 1145-1150.
5. Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M. (2003). *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol*, 21 (5), 210-216.
6. Gutiérrez, M.S., Campusano, S., González, A.M., Gómez, M., Barahona, S., Sepúlveda, D., *et al* (2019). Sterol regulatory element-binding protein (Sre1) promotes the synthesis of carotenoids and sterols in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Front Microbiol*, 10, 586.
7. Morata, A., Loira, I., Heras, J.M., Callejo, M.J., Tesfaye, W., González, C., *et al* (2016). Yeast influence on the formation of stable pigments in red winemaking. *Food Chem*, 197, 686-691.
8. Vachali, P., Bhosale, P., Bernstein, P. S. (2012). Microbial carotenoids. *Methods Mol Biol*, 898, 41-59.
9. Álvarez-Gómez, F., Korbee, N., Casas-Arrojo, V., Abdala-Díaz, R. T., Figueroa, F. L. (2019). UV photoprotection, cytotoxicity and immunology capacity of red algae extracts. *Molecules*, 24(2), 341.
10. Chavez-Vivas, M., Caicedo, L.D., Castillo, J.E. (2019). Occurrence of β -lactamase-producing Gram-negative bacterial isolates in water sources in Cali City, Colombia. *Int J Microbiol*, 1375060, 1-8.
11. Silva-Bedoya, L. M., Ramírez-Castrillón, M., Osorio-Cadavid, E. (2014). Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. *Braz J Microbiol*, 45 (1), 135-142.
12. Morillo, Y., Sánchez, T., Morante, N., Chávez, A. L., Morillo, A. C., Bolaños, A., *et al* (2012). Estudio preliminar de herencia del contenido de carotenoides en raíces de poblaciones segregantes de yuca (*Manihot esculenta Crantz*). *Acta Agron*, 61 (3), 253-264.
13. Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal Chem*, 31(3), 4
14. Vu, D., Groenewald, M., Szöke, S., Cardinali, G., Eberhardt, U., Stielow, B., *et al* (2016). DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. *Stud Mycol*, 85, 91-105.
15. Kot, A. M., Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., Bryś, J. (2018). Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? *Microb Cell Fact*, 17, 49.
16. Derx, H.G. (1930). Etude sur les Sporobolomycetes. *Ann Mycol*, 28, 1-23.
17. Kurtzman, C., Fell, J. W., Boekhout, T., (2011). The yeasts: a taxonomic study. Ed. Elsevier. Pp 2354.
18. Wang, Q. M., Yurkov, A. M., Goker, M., Lumbsch, H. T., Leavitt, S. D., *et al* (2015). Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within *Pucciniomycotina*. *Stud Mycol*, 81, 149-189.
19. Manimala, M. R. A., Murugesan, R. (2017). Studies on carotenoid pigment production by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* using cheap materials of agro-industrial origin. *Pharma Innovation*, 6(1), 80-82.
20. Hong, Gyu, S., Chun, J., Nam, J. S., Park, Y. D., Bae, K. S. (2000). Phylogenetic analysis of genus *Sporobolomyces* based on partial sequences of 26S rDNA. *J Microbiol Biotechnol*, 10 (3), 363-366.
21. Rodríguez Iza, E. L. (2016). Cultivo de la microalga *Coenochloris* sp. con fracción soluble de papa (*Solanum phureja* L) para la obtención de pigmentos (Carotenoides). Pregrado Universidad Politecnica Salesiana, Quito.
22. Elsanhoty, R. M., Abd El-Razink, M. M., Al-Turki, A. I. (2017). Production of carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa* and their applications as colorant agent in sweet candy. *J Food Agric Environ*, 15 (2) 21-26
23. Montero-Lobato, Z., Ramos-Merchante, A., Fuentes, J. L., Sayago, A., Fernández-Recamales, Á., Martínez-Espinosa, R. M., *et al* (2018). Optimization of growth and carotenoid production by *Haloferrax mediterranei* using response surface methodology. *Mar Drugs*, 16 (10), 372.

24. Martínez, J. M., Delso, C., Angulo, J., Álvarez, I., Raso, J. (2018). Pulsed electric field-assisted extraction of carotenoids from fresh biomass of *Rhodotorula glutinis*. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 47, 421-427.
25. Issa, S., Alhajali, A., Almir, L. (2016). Improving carotenoid pigments production in *Rhodotorula mucilaginosa* using UV irradiation. *Int Food Res J*, 23 (2), 873-878.
26. Sumerta, I. N., Yuliani, Y., Kanti, A. (2019). Determining the potential indigenous red-yeasts producing β -carotene and their phylogenetic relationship. *J Microbia lSyst Biotech* , 1 (2), 27-33.
27. Libkind, D., van Broock, M. (2006). Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. *World J Microb Biot*, 22 (7), 687-692.
28. Bhosale, P., Gadre, R. (2001). Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55 (4), 423-427.
29. Aksu, Z., Eren, A. T. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochem*, 40 (9), 2985-2991.
30. Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochem*, 46(1), 210-218.