



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

***Optimización de la producción de lípidos
de levaduras oleaginosas utilizando
subproductos agroindustriales.***

**Tesis presentada en opción al Título
Académico de Máster en Biotecnología**

(Mención Biotecnología Industrial)

Autor: Ing. Angel Daniel De la Fé Isaac

Tutor: Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Díaz



**Centro de Estudios de Biotecnología Industrial
Centro Universitario Municipal Palma Soriano
Universidad de Oriente**

Optimización de la producción de lípidos de levaduras oleaginosas utilizando subproductos agroindustriales.

**Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en
Biotecnología**

(Mención Biotecnología Industrial)

Autor: Ing. Angel Daniel De la Fé Isaac

Tutor: Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Díaz

Santiago de Cuba

2020

*“No tengas miedo de renunciar a lo bueno
para ir a por lo grandioso”
John D. Rockefeller*

Dedicatoria/Agradecimientos

Dedicatoria

A mis padres, quienes me motivaron a estudiar desde mis primeros años; y a mi hermano, quien en su sana competencia me hizo superarme diariamente.

Agradecimientos

A mi madre, por su amor incondicional y sus consejos oportunos;

A mi hermano, por su apoyo en el laboratorio y en la revisión de la tesis;

A mi tutor Manuel, quien me guio en todo este largo camino recorrido, aportando sus conocimientos y su valioso tiempo;

A todo el colectivo de trabajadores de la ETICA, en especial a Rene, Mónica, Vivian, Yaquelin, Edilberto, Maritza, Yeline, Elba e Imilsis por acogerme en el laboratorio y hacerme sentir como un trabajador más.

A toda mi familia, por su amor y su apoyo;

A mis profesores del CEBI y de la Maestría en Biotecnología en sentido general, gracias por sus enseñanzas;

En fin, a todos los que contribuyeron de una forma u otra, con la realización de este trabajo,

GRACIAS

Leyenda

Leyenda

Leyenda

ART	azúcaresreductorestotales
Cc	Concentración de carbono
Cc suero	Concentración de carbono aportada por el suero
CCD	diseñocompuesto central
CEBI	Centro de Estudios de Biotecnología Industrial
C/N	relaciónCarbono-Nitrógeno
DW	concentración de la biomasa obtenida
ETICA	Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar
FAEE	etil ésteres de ácidos grasos, del inglés: fattyacidethylesters
FAME	metil ésteres de ácidosgrasos, del inglés: fatty acid methyl esters
GLP	gases licuados de petróleo
TAG	triacilglicéridos, triglicéridos
SCO	aceiteunicelular, del inglés: single cell oils
YE	Extracto de levadura
% TAG	porciento de lípidos acumulados (en base al peso seco)

Índice

Índice

Introducción.....	1
I. Revisión Bibliográfica	3
1.1 Combustibles.....	3
1.1.1 Combustibles Fósiles	3
1.1.2 Biocombustibles	3
1.1. 3 Biodiesel.....	5
1.2 Organismos Oleaginosos	5
1. 2.1 Archaeas	6
1. 2.2 Bacterias	6
1.2.3 Mohos	7
1.2.4 Microalgas.....	7
1.2. 5 Levaduras.....	7
1.3 Utilización industrial de las levaduras oleaginosas.....	8
1.4 Subproductos Agroindustriales.....	9
1. 4.1 Lactosuero.....	9
1. 4. 2 Melaza.....	9
II. Materiales y Métodos	10
2.1 Obtención de los subproductos agroindustriales	10
2.2 Pretratamiento de los subproductos agroindustriales.....	10
2.2.1 Desproteización del lactosuero.....	10
2.2.2 Dilución y eliminación de los sólidos en la melaza	10
2.3 Determinaciones analíticas.....	10
2.4 Microorganismo y Medios de cultivo.....	11
2.5 Elección de la cepa de levadura más productora de lípidos.....	11
2.6 Optimización de la producción de lípidos	12
2.6.1 Selección de los factores que influyen sobre la producción de lípidos.....	12
2.6.2 Optimización del medio de cultivo para la obtención de lípidos	12
III. Resultados y Discusión	13
3.1 Caracterización de los subproductos agroindustriales	13
3.2 Elección de la cepa de levadura más productora de lípidos.....	13
3.3 Optimización de la producción de lípidos	17
3.3.1 Selección de los factores que influyen sobre la producción de lípidos.....	17

Índice

3.3.2 Optimización del medio de cultivo para la obtención de lípidos	19
Conclusiones	23
Recomendaciones	24
Recomendaciones	24
Referencias Bibliográficas	26

Resumen

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo optimizar la producción de lípidos de levaduras oleaginosas utilizando como fuente de carbono subproductos agroindustriales obtenidos de las industrias láctea y azucarera. Se estudió la acumulación de lípidos intracelulares en dos cepas de levaduras oleaginosas. Se seleccionó la cepa número 75 para ser utilizada en la optimización del proceso de producción de lípidos microbianos, debido a que esta cepa acumuló una mayor cantidad de lípidos luego de 72 horas de cultivo. Se utilizó un diseño Plackett-Burman para determinar la influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el porcentaje de lípidos acumulados y la concentración de biomasa obtenida (mg/mL). Después del cribado, se utilizó un diseño de superficies de respuesta Box-Behnken para optimizar la composición de los componentes del medio de cultivo. La concentración de triglicéridos se determinó por el método de la sulfo-fosfo-vainillina. El medio de cultivo optimizado presentó la siguiente composición (en g/L): Concentración de la fuente de carbono (80); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1); CaCl_2 (0,1); Extracto de levadura (1); Tween 20 (0,6); con una relación Carbono-Nitrógeno de 180 y un pH de 6,5. Las ecuaciones de regresión obtenidas durante la optimización predicen valores máximos de acumulación de lípidos de 65 % y concentración de biomasa de 13 mg/mL, resultados comparables a los obtenidos por otros investigadores y que apuntan hacia la aplicabilidad industrial de esta cepa en sistemas tecnológicos encaminados a la producción de biodiesel.

Palabras clave: Biodiesel; Lípidos; Melaza; Subproductos agroindustriales; Suero.

Abstract

Abstract

The aim of this work was the optimization of lipid production by oleaginous yeasts using as carbon sources agroindustrial by-products obtained of the dairy and sugar industries. The accumulation of intracellular lipids was studied in two oleaginous yeasts strains. Strain number 75 was selected to be used in the optimization of microbial lipids production process because this strain accumulated a bigger quantity of lipids after 72 hours of cultivation. A Plackett-Burman design was used to determine the influence of medium components on the percentage of accumulated lipids and the biomass concentration obtained (mg/mL). After screening, a response surface methodology Box-Behnken design was used to optimize the composition of the culture medium components. The triglycerides concentration was determined by the sulfo-phospho-vanillin method. Optimized culture medium presented the following composition (in g/L): Concentration of the carbon source (80); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1); CaCl_2 (0,1); yeast extract (1); Tween 20 (0,6); with a Carbon-Nitrogen ratio of 180 and a pH of 6,5. Regression equations obtained during optimization predicted maximum values of lipid accumulation of 65 % and biomass concentration of 13 mg/mL, comparable results to those obtained by other investigators and point toward the industrial applicability of this strain in technological systems guided to the biodiesel production.

Keywords: Biodiesel; Molasses; Lipids; Agroindustrial by-products; Whey.

Introducción

Introducción

En la actualidad los combustibles fósiles representan el 80 % de la demanda global de energía, con el petróleo crudo como el principal componente, el cual alcanza el 40 % de la demanda, seguido por el carbón y el gas natural con un 20 % cada uno (Mohr y col., 2015; WBA, 2019). Debido al constante aumento de los precios de los combustibles fósiles, su papel como principal fuente de emisión de dióxido de carbono y el futuro agotamiento de las reservas naturales, los recursos renovables han ganado importancia en las décadas pasadas (Schneider, 2013a).

Los biocombustibles líquidos han sido desarrollados como sustitutos renovables de los combustibles derivados del petróleo como la gasolina y el diésel. Los más producidos son el bioetanol a partir del maíz (Estados Unidos) y la caña de azúcar (Brasil), y el biodiesel fabricado con aceite de plantas como la colza (Europa) y la soya (Estados Unidos)(Solomon, 2010).

El biodiesel es un combustible renovable que es producido a través de la transesterificación de aceites para generar metil/etil ésteres de ácidos grasos (FAME/FAEE, por sus siglas en inglés) (Schneider y col., 2012a). En dependencia del origen de la fuente de aceite a utilizar, el biocombustible es referido como de primera, segunda o tercera generación. Mientras que los biocombustibles de primera generación utilizan los aceites vegetales de cultivos como la colza y la soya para la transesterificación, los de segunda generación utilizan biomasa lignocelulósica. Los primeros tienen como principal inconveniente que los cultivos utilizados para su producción son utilizados también como alimentos, mientras que en los últimos la biomasa debe someterse primeramente a un tratamiento biológico o termoquímico (Schneider y col., 2012a).

Los combustibles de tercera generación tratan de reducir el conflicto generado por la utilización de cultivos destinados a la alimentación humana para la producción de biocombustibles, estos emplean ácidos grasos producidos por microorganismos oleaginosos para la transesterificación en FAME/FAEE. En general, los microorganismos que acumulan más del 20 % de su peso seco en forma de lípidos son reconocidos como especies oleaginosas (Schneider y col., 2013b; Kot y col., 2016), lo cual incluye diferentes tipos de levaduras, bacterias, mohos y algas. El uso de levaduras oleaginosas tiene ciertas ventajas sobre otros microorganismos heterotróficos debido a su relativamente rápido crecimiento y su alto contenido lipídico (Ageitos y col., 2011), además estos lípidos están compuestos principalmente de triacilglicéridos (TAG), lo cual hace de sus características y posibles aplicaciones comparables a los aceites vegetales (Saenge y col., 2011).

Algunas levaduras, como *Rhodospiridium* sp., *Lipomyces* sp. y *Rhodotorula* sp. pueden acumular lípidos intracelulares hasta valores tan altos como el 70 % de su peso seco (Kitcha y Cheirsilp, 2011).

Introducción

Para la producción de lípidos microbianos la fuente de carbono ha sido identificada como uno de los principales factores que encarecen el proceso (Schneider y col., 2013b), es por esto que la utilización de fuentes de carbono baratas y disponibles podrían aumentar su producción significativamente, ya que estas ayudarían a reducir los costos de producción, haciéndolos más competitivos ante el biodiesel derivado de aceites vegetales (Schneider y col., 2012b).

Varios autores han utilizado una gran variedad de sustratos en el cultivo de levaduras oleaginosas, principalmente subproductos o residuales agroindustriales. Algunos de los sustratos empleados son el glicerol (Cheirsilp y col., 2012; Yen y col., 2012; Gientka y col., 2017), melazas (Boviatsi y col., 2019; Kongruang y col., 2020; Singh y col., 2020), hidrolizados de residuos agrícolas (Sreeharsha y col., 2020; Sagia y col., 2020), aguas residuales municipales (Chi y col., 2011), vinazas (Gonzalez-Garcia y col., 2011), ácidos grasos volátiles (Miao y col., 2020; Llamas y col., 2020), agua residual de cervecerías (Schneider y col., 2012b; Schneider y col., 2013c), lactosuero (Kanzky y col., 2015; Ribeiro y col., 2017) entre otros.

Las levaduras oleaginosas, no sólo son utilizadas para la obtención de lípidos, ya que algunos de estos microorganismos también son capaces de producir pigmentos de interés como carotenoides entre otros (Banzatto y col., 2013).

En el presente trabajo se busca maximizar la producción de lípidos microbianos por levaduras oleaginosas con la utilización de lactosuero y melaza como fuente de carbono, por lo cual se propone como:

Problema científico:

¿Qué condiciones permitirán obtener mayor cantidad de lípidos de levaduras oleaginosas si se utilizan lactosuero y melaza como sustratos?

Para resolver este problema se plantea la siguiente hipótesis y los siguientes objetivos:

Hipótesis:

Con la optimización del proceso de obtención de lípidos de levaduras oleaginosas se determinarán cuáles son las condiciones que permitan obtener mayor cantidad de lípidos cuando se utilizan lactosuero y melaza como sustratos.

Objetivo general:

Optimizar el proceso de obtención de lípidos de levaduras oleaginosas.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar los subproductos agroindustriales
2. Optimizar el medio de cultivo
3. Caracterizar los lípidos obtenidos

Revisión Bibliográfica

I. Revisión Bibliográfica

1.1 Combustibles

Combustible es cualquier material capaz de liberar energía cuando se oxida de forma violenta con desprendimiento de calor. Supone la liberación de una energía de su forma potencial (energía de enlace) a una forma utilizable (energía térmica o mecánica), lo cual deja como residuo calor (energía térmica), dióxido de carbono o algún otro compuesto químico. Los combustibles se pueden clasificar de acuerdo a su estado. Entre los combustibles sólidos se incluyen el carbón, la madera y la turba natural. El carbón se quema en calderas para calentar agua que puede vaporizarse para mover máquinas a vapor o directamente para producir calor utilizable en usos térmicos (calefacción). La turba y la madera se utilizan principalmente para la calefacción doméstica e industrial.

Entre los combustibles líquidos se encuentran el gasóleo, el queroseno o la gasolina (o nafta) y entre los gaseosos, el gas natural o los gases licuados de petróleo (GLP), representados por el propano y el butano. Las gasolinas y gasóleos se utilizan para motores de combustión interna o en calderas (Venemedia Comunicaciones, 2019a). Es importante resaltar que tanto el carbón como el petróleo y el gas, se encuentran dentro de los llamados combustibles fósiles.

1.1.1 Combustibles Fósiles

Los combustibles fósiles son mezclas de compuestos orgánicos mineralizados que se extraen del subsuelo con el objeto de producir energía por combustión. El origen de esos compuestos es materia orgánica que, tras millones de años, se ha mineralizado. Se consideran combustibles fósiles al carbón, procedente de la madera de bosques del periodo carbonífero, y al petróleo y el gas natural, procedentes de otros organismos. Entre los combustibles fósiles más utilizados se encuentran los derivados del petróleo: gasolinas, naftas, gasóleo, fuelóleo; los gases procedentes del petróleo (GLP), el gas natural, y las diversas variedades del carbón: turba, hullas, lignitos, etc. En las últimas décadas se han iniciado diversos movimientos que promueven la creación de nuevas fuentes energéticas, que extingan el uso de los combustibles fósiles, ya que estas sustancias, por no ser renovables, en algún punto se acabarán (Venemedia Comunicaciones, 2019b).

1.1.2 Biocombustibles

Los biocombustibles se pueden clasificar en dos categorías: primaria y secundaria. La primera categoría es definida como la materia orgánica que es directamente combustionada en su forma natural, no modificada químicamente (ejemplo: leña, astillas de madera o bagazo), usadas principalmente para la calefacción, cocina y generación de electricidad. La segunda categoría viene dada por la biomasa procesada que existe en forma sólida, gaseosa o líquida y que puede ser usada para transportación y en varios procesos industriales (Nigam y Singh, 2011). La segunda categoría de biocombustibles es además categorizada en de primera, segunda y tercera generación (Nigam y Singh, 2011).

La primera y segunda generación de biocombustibles comparten los mismos antecedentes biotecnológicos: la conversión de carbohidratos en alcohol y/o gas metano y producción de biodiesel a través de la hidrólisis de ácidos grasos con metanol en presencia de un catalizador hasta glicerol y largas cadenas de alquil ésteres (diésel) en una reacción de transesterificación (Saenge y col., 2011).

Los combustibles de primera generación son derivados de cultivos utilizados para el consumo humano (maíz, arroz, trigo, cebada, caña de azúcar, etc.) y aceites vegetales (de soya, girasol, palma, coco, colza, etc.) (Lee y Lavoide, 2013; Ribeiro, 2014). El biocombustible más conocido es el bioetanol. La mayor parte de la producción mundial se obtiene del procesamiento de materia de origen renovable, principalmente la caña de azúcar. Brasil es el principal país productor y consumidor del mismo (Nigam y Singh, 2011). No obstante, los combustibles de primera generación levantan algunas preocupaciones en lo que respecta a su sostenibilidad ya que, con el aumento de la población mundial, para el año 2050 se requerirá el aumento del 70% de la producción actual de alimentos, más alimentos serán requeridos para satisfacer sus necesidades (Maltos, 2012).

A medida que aumenta la capacidad de producción de los combustibles de primera generación, aumenta el conflicto generado con el suministro de alimentos debido a la presión en las tierras dedicadas al cultivo (ejemplo: el uso intensivo de la tierra con elevado uso de fertilizantes y pesticidas y agua) lo que trae como consecuencia problemas medioambientales y el aumento de los costos de los alimentos (Nigam y Singh, 2011; Cremonez y col., 2014; Rashid y col., 2014). Consecuentemente muchas agencias, en particular organizaciones alimentarias y económicas consideran el uso de estos biocombustibles inviables (Galadima y Muraza, 2014).

La segunda generación de biocombustibles emerge como una solución a la controversia alimento-combustible porque, a diferencia de los combustibles de primera generación, no compiten con la producción de alimentos ya que la materia prima utilizada para su producción es materia lignocelulósica generalmente, lo cual elimina la competencia con los cultivos utilizados para el consumo humano (Nigam y Singh, 2011; Lee y Lavoide, 2013; Arifin y col., 2014). Son diversas las fuentes utilizadas como materia lignocelulósica, algunos ejemplos son: semillas de algodón, aceites de lesquerella y linaza, *Jatropha curcas*, *Pongamia glabra*, *Salvadora oleoides*, además de otros residuos agroindustriales (Azad y col., 2015).

Los combustibles de segunda generación ofrecen diversas ventajas. Algunas de estas especies pueden crecer en áreas poco productivas, como zonas costeras, áridas y semiáridas (Azad y col., 2015; Chiralde, 2018); estas son biodegradables y son entre un 15–20% más eficientes cuando son mezclados con diésel mineral en diferentes proporciones sin necesidad de modificar los motores y emiten menos gases contaminantes (Azad y col., 2015).

Los combustibles de tercera generación se enfocan en los microorganismos (Nigam y Singh, 2011) como una alternativa a las fuentes de grasas vegetales y animales (Meng y col., 2009), particularmente microorganismos capaces de acumular lípidos tales como

microalgas, bacterias, levaduras y otros hongos (Sitepu y col., 2014) cuyos lípidos pueden ser extraídos y convertidos en biodiesel. Los biocombustibles obtenidos de fuentes microbianas carecen de las desventajas relacionados con aquellos derivados de cultivos vegetales ya que su cultivo no depende de las estaciones o el clima, y presentan propiedades similares a los obtenidos de aceites vegetales (Saenge y col., 2011).

1.1.3 Biodiesel

El biodiesel consiste en metil/etil ésteres de ácidos grasos, los cuales se encuentran preferentemente en las grasas animales o aceites de los vegetales. El biodiesel presenta un elevado número de cetano, buenas propiedades de lubricación, un contenido energético comparable con el diésel mineral convencional y se puede mezclar fácilmente con este. El peso molecular de los metil/ésteres es similar a los combustibles diésel, por lo que sus propiedades de transporte y puntos de fusión son superiores a las grasas o aceites de los cuales son derivados. Técnicamente el biodiesel puede ser considerado un buen componente de calidad para ser mezclado con el diésel, usualmente a concentraciones de hasta el 20 % (Duncan, 2003).

El proceso más común para fabricar biodiesel es el proceso de transesterificación, mediante el cual los ácidos grasos presentes en las grasas animales o aceites de los vegetales reaccionan con metanol en presencia de un catalizador para formar los metil/etil ésteres de ácidos grasos (Figura 1). Como subproducto de la reacción también se obtiene glicerol, conocido alternativamente como glicerina, en cantidades significativas.

En esta reacción se establece un equilibrio y por lo tanto la reacción no se realiza de forma completa, por lo que permanecen trazas de triglicéridos y metanol en el producto. Sin embargo, la conversión de los triglicéridos en metil/etil ésteres puede incrementarse si se aumenta la concentración de metanol y se disminuye la de glicerol en la mezcla. También pueden ser producidos mono y diglicéridos, debido a la reacción parcial de los TAG y el metanol. Estos factores son significativos en el diseño del proceso de producción y en la calidad de la purificación de los productos finales (Duncan, 2003).

1.2 Organismos Oleaginosos

Muchos microorganismos son capaces de acumular lípidos bajo diversas condiciones de cultivo. Los lípidos se encuentran normalmente en el rango del 6 al 8 % del peso seco, encontrándose principalmente en las membranas celulares, sin embargo, algunos microorganismos son capaces de acumular más del 20% de su peso como lípidos, los mismos son denominados microorganismos oleaginosos y dentro de este grupo se pueden encontrar diferentes tipos de levaduras, bacterias, mohos y algas (Schneider y col., 2013b; Kot y col., 2016). Los lípidos producidos por estos organismos son conocidos como aceite unicelular (SCO, del inglés: single celloils). Los mismos tienen la misma estructura que los triacilglicéridos (TAG) de los aceites vegetales (Saenge y col., 2011).

La hidrólisis ácida no es una vía que se emplee frecuentemente en su preparación, puesto que los medios ácidos fuertes pueden conllevar a la ruptura de los enlaces glicosídicos y por consiguiente a una degradación no deseada del polisacárido.

La hidrólisis enzimática es el método de obtención más utilizado, puesto que los oligogalacturónidos obtenidos no son expuestos a las condiciones drásticas de la hidrólisis ácida, que pueden alterar su estructura (Coté y col., 1994). Existen diferentes reportes en la literatura referidos al método de obtención de los oligogalacturónidos mediante hidrólisis enzimática donde se aprecia un gran empleo de las pectinasas (Gullón y col., 2013), con las cuales se obtienen oligogalacturónidos con un grado de polimerización muy variable.

La acumulación de lípidos en estos microorganismos depende de la disponibilidad del nitrógeno (Meng y col., 2009). Una vez que este nutriente se agota, el exceso de carbón presente en el medio es asimilado por la célula y convertido en TAG durante la fase estacionaria, cuando la división y crecimiento celular se detiene los lípidos son acumulados en las células existentes (Meng y col., 2009). En la tabla 1 se pueden encontrar las cantidades de lípidos que pueden acumular algunos de los organismos oleaginosos, referido a su peso seco.

1.2.1 Archaeas

Con respecto a las archeas, cerca de mil lípidos polares han sido identificados. La principal característica de los lípidos de estos microorganismos es la presencia de isoprenoides con carbonos regularmente metilados unidos a las moléculas de glicerol a través de enlaces tipo éter, mientras en el caso de las bacterias y eucariotas, el glicerol está unido a los ácidos grasos mediante enlaces tipo éster (Da Silva y Roseiro, 2012). Esta configuración al ser distinta hace que el uso directo de estos lípidos extraídos de ambientes anaerobios poco práctico para la producción de biodiesel, pero abre una nueva posibilidad para la producción de combustibles derivados de isoprenoides (Saenge y col., 2011).

1.2.2 Bacterias

Las bacterias no son generalmente microorganismos que acumulan lípidos, estas usualmente producen lípidos complejos como vía de almacenar energía y estos son depositados como inclusiones insolubles en el citoplasma cuando la fuente de carbono está disponible en exceso, pero el crecimiento está limitado por la ausencia de otro nutriente (Rashid y col., 2014).

Sin embargo, la biosíntesis de TAG parece ser un rasgo común en bacterias del género *actinomicetos*, los cuales pueden acumular hasta el 70% de su biomasa como lípidos. La acumulación ocurre en su mayoría durante la fase estacionaria del crecimiento, al no realizarse la síntesis de proteínas, y al igual que ocurre con las levaduras y mohos, este proceso es afectado por la fuente de carbono utilizada y las condiciones del cultivo.

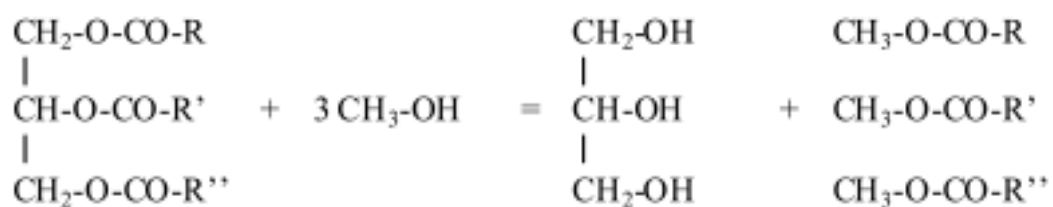


Figura 1. Reacción de transesterificación.

Tabla 1. Contenido lipídico de algunos microorganismos.

Microorganismos	Contenido lipídico (%)
Microalgas	
<i>Botryococcusbraunii</i>	25-75
<i>Cylindrothcasp.</i>	16-37
<i>Nitzschiasp.</i>	45-47
<i>Schizochytriumsp.</i>	50-77
Bacterias	
<i>Arthrobactersp.</i>	>40
<i>Acinetobactercalcoaceticus</i>	27-38
<i>Rhodococcusopacus</i>	24-25
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24
Levaduras	
<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Lipomycesstarkeyi</i>	64
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Hongos	
<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Mortierellaisabellina</i>	86
<i>Humicolalanuginosa</i>	75
<i>Mortierellavinacea</i>	66

Adaptado de: Mengy col. (2009)

A pesar que las bacterias tienen mayor velocidad de crecimiento y menor tiempos de crecimiento que las microalgas, la mayoría de las especies tienen bajos contenidos lipídicos, entre un 20-40% de su masa seca. Sin embargo, solo se conocen algunas cepas productoras de lípidos, y como estos son almacenados en la membrana exterior se dificulta su extracción de forma eficiente (Schneider, 2013a).

1.2.3 Mohos

Los mohos oleaginosos han sido extensivamente estudiados para la producción de ácidos grasos poliinsaturados debido a que los lípidos acumulados por estos organismos son caracterizados por un alto nivel de insaturación. Ácidos grasos como el ácido araquidónico, ácido docosaheptaenoico, ácido gamma-linolénico y el ácido eicosapentaenoico son de gran relevancia debido a sus efectos benéficos en el desarrollo del cerebro en infantes y en el sistema cardiovascular, entre otros (Campbell y Laherrere, 1998).

1.2.4 Microalgas

Las microalgas pueden ser autotróficas o heterotróficas (Sitepu y col., 2014). Las autotróficas usan fuentes de carbono inorgánicas (dióxido de carbono), y pueden ser además clasificadas de acuerdo a la fuente de energía ya sea en fotoautótrofo (si utiliza la luz solar) o quimioautótrofo (si la energía proviene de la oxidación de compuestos inorgánicos). Las microalgas heterotróficas requieren de una fuente de carbono orgánica para su crecimiento. Como las autotróficas, pueden ser categorizadas de acuerdo a la fuente de energía en fotoheterótrofas o quimioheterótrofas. Algunas cepas pueden combinar la fotosíntesis autotrófica y la asimilación heterotrófica de compuestos orgánicos, estas son llamadas mixotróficas (Nigam y Singh, 2011; Rashid y col., 2014).

Los cultivos autotróficos tienen bajos rendimientos en cuanto a biomasa y producción de lípidos, debido a las limitaciones de la iluminación y acumulación de oxígeno (Da Silva y col., 2010), además dependen del clima, son fácilmente contaminados por otros microorganismos y requieren grandes cantidades de agua (Sitepu y col., 2014). Los sistemas de cultivo heterotrófico se llevan a cabo en ausencia de luz, por lo tanto, es fácil cultivarlos a gran escala sin depender de una fuente de iluminación (Rashid y col., 2014). A pesar del costo adicional de proveer al cultivo de una fuente de carbono, este es fácilmente compensado debido al incremento en el contenido lipídico y la densidad celular en un corto tiempo (Sitepu y col., 2014).

Generalmente estas tienen altas productividades (producción de biomasa y acumulación de lípidos) y crecen más rápido, al comparar con los cultivos de plantas oleaginosas (Ribeiro, 2014). Especies como *Chlorella* contienen alrededor de 60-70% de contenido lipídico y una alta productividad (7,4 g/L.d para *Chlorella protothecoides*) (Lee y Lavoide, 2013), estas necesitan mucho menos área de cultivo y obtienen hasta 100 veces más lípidos que los cultivos anteriormente mencionados (Ribeiro, 2014).

1.2.5 Levaduras

Las levaduras oleaginosas han sido estudiadas por décadas como fuente de lípidos microbianos (Sitepu y col., 2014). Se conocen cerca de 600 especies de levaduras (Beopoulos y col., 2011), más de 70 son consideradas como oleaginosas y los cribados

de oleaginosidad permiten descubrir nuevas especies productoras de aceites (Sitepu y col., 2014). Estas especies son generalmente del género *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Trichosporon*, *Lipomyces* y *Yarrowia*, y pueden acumular lípidos de un 40-70% de su biomasa, lo cual depende de las condiciones en las que se desarrollan (Beopoulos y col., 2011).

Las levaduras oleaginosas tienen un crecimiento más rápido que otros microorganismos oleaginosos, lo cual, unido a su alto contenido lipídico (hasta un 70 % de su peso seco), constituyen algunas de las ventajas de su utilización para la obtención de aceite unicelular (Ageitos y col., 2011), otra característica importante es que dicho aceite está compuesto principalmente por TAG parecidos a los encontrados en las plantas, por lo tanto, sus posibles aplicaciones pueden ser similares (Saenge y col., 2011).

1.3 Utilización industrial de las levaduras oleaginosas.

Existen numerosas aplicaciones para los lípidos en la industria, sobre todo en la alimentaria, pero estos no solo son utilizados con el fin de elaborar alimentos. Los lípidos producidos por las levaduras oleaginosas pueden ser utilizados como sustitutos de aceites vegetales o de grasas valiosas, aditivos en alimentos o suplementos dietéticos (Papanikolaou y Aggelis, 2011) ya que su perfil lipídico es similar (Vasconcelos y col., 2019).

Otra aplicación de las levaduras oleaginosas es en la obtención de biopolímeros. La calidad en la producción de los biopolímeros puede afectarse al variar la composición de los lípidos si se utilizan aceites vegetales, ya que su composición varía significativamente, y este no es el caso de los lípidos obtenidos de levaduras oleaginosas (Vasconcelos y col., 2019).

También se pueden utilizar estas levaduras para la producción de ácidos grasos libres, los cuáles al presentar una cadena de mediano tamaño (10-14 carbonos) presentan buenas propiedades físicas para ser utilizados en la elaboración de detergentes, lubricantes y cosméticos. Además, son precursores de otros compuestos de interés como alcanos, aldehídos y alcoholes grasos, estos últimos ampliamente utilizados en la producción de surfactantes que son usados en las formulaciones de detergentes, lubricantes, cosméticos, farmacéuticos y plásticos (Adrio, 2017).

Algunas especies oleaginosas además de producir grandes cantidades de lípidos también producen carotenoides (Banzatto y col., 2013), que son utilizados como colorantes en alimentos y productos animales como la yema de los huevos, mantequilla, trucha, salmón y crustáceos (Fernández y col., 2017; Zaghdoudi y col., 2017; López y col., 2018). Algunos pigmentos rojos son utilizados en colorantes alimentarios para vinos, quesos, carnes y existen fórmulas infantiles enriquecidas con pigmentos naturales como la luteína para mejorar la salud de los niños, también han sido utilizados en la elaboración de pasta y en panadería (Cardoso y col., 2014).

Debido a la composición de los ácidos grasos de los TAG acumulados por algunas levaduras oleaginosas, numerosos autores han indicado la posibilidad de utilizar estas

levaduras como sustrato para la producción de biodiesel (Schneider y col., 2013c; Mast y col., 2014; Liu y col., 2015). El biodiesel obtenido por esta vía es un biocombustible de tercera generación, completamente renovable y biodegradable, y su uso influye positivamente en el medio ambiente debido a que su empleo disminuye la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera (Adamczak y col., 2009).

1.4 Subproductos Agroindustriales

1.4.1 Lactosuero

En el Codex-Alimentarius (Codex-Alimentarius, 1995) se define al suero como el fluido que se separa de la cuajada tras la coagulación de la leche, nata, leche desnatada o suero de mantequilla en la fabricación del queso, la caseína o productos similares. El suero de la leche es uno de los residuos más representativos de la industria lechera, por cada kilogramo de queso, se producen aproximadamente nueve litros de efluente (85-90% del volumen de la leche) (Yeisson y col., 2015; Chanfrau y col., 2017), este subproducto es uno de los contaminantes más severos que existen a nivel ambiental (Cury y col., 2014). Anualmente se producen entre 110 y 115 millones de toneladas métricas de lactosuero (Cury y col., 2014). De este valor el 47% se desecha en los ríos, lagos, acuíferos o en el subsuelo lo que genera problemas de eutrofización acuática (Cury y col., 2014).

El lactosuero posee un contenido elevado de vitaminas y macronutrientes que algunos microorganismos pueden utilizar como fuente de carbono y energía para producir biomasa (Kanzys y col., 2015).

1.4.2 Melaza

La melaza es un producto líquido y espeso derivado de la caña de azúcar, y en menor medida de la remolacha azucarera, esta denominación se aplica al efluente final de la extracción de la sacarosa a partir de los jugos de caña o remolacha. Su aspecto es muy similar al de la miel, aunque de color parduzco muy oscuro, prácticamente negro. El sabor es dulce, ligeramente similar al del regaliz, con un pequeño regusto amargo. Nutricionalmente presenta un altísimo contenido en hidratos de carbono además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que destacan el hierro, cobre y magnesio. La proporción de melazas o mieles finales y su composición brindan información importante acerca de las condiciones locales de producción de la fuente agrícola (condiciones climatológicas, naturaleza de los suelos, variedad etc.) y a la vez del tratamiento recibido dentro de la fábrica de azúcar (clarificación, cristalización entre otros) y en especial su historia térmica. Las mieles rinden aproximadamente el 2,5-3 % de la caña molida y se acerca al 25% de la sacarosa producida (Otero, 1997).

Materiales y Métodos

II. Materiales y Métodos

Esta investigación se realizó en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente y en la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) “Oriente - Sur”, en el período comprendido desde octubre del 2019 hasta julio del 2020.

2.1 Obtención de los subproductos agroindustriales

El lactosuero fue obtenido en el Combinado Lácteo “Palma Soriano”, perteneciente al municipio Palma Soriano de la provincia Santiago de Cuba. El residual se produce como resultado de la elaboración de queso y se colectó en el mes de mayo del 2019, el mismo se envasó en un recipiente plástico con cierre hermético, el cual se llenó completamente (aproximadamente 5 litros) con el fin de que no quedara aire libre en su interior. La muestra se conservó en congelación hasta su uso.

La melaza se obtuvo del central “Dos Ríos”, localizado en el mismo municipio. La melaza, o miel como también es conocido es producida como subproducto de la producción de azúcar de caña, en este estudio la melaza utilizada fue la llamada miel B, o sea, no es la miel final que constituye el verdadero subproducto final en la producción azucarera. El “residual” se colectó en el mes de mayo del 2019, el mismo se envasó en un recipiente plástico con cierre hermético, el cual se llenó completamente (aproximadamente 5 litros) con el fin de que no quedara aire libre en su interior. La muestra se conservó en cámara fría hasta su uso.

2.2 Pretratamiento de los subproductos agroindustriales

Antes de realizar la caracterización de los subproductos agroindustriales los mismos se sometieron a un pretratamiento con el objetivo de eliminar sustancias presentes en los mismos que pudieran interferir en su utilización como futuros componentes del medio de cultivo.

2.2.1 Desproteínización del lactosuero

Se realizó según El-Salam y col. (2014) con algunas modificaciones. El lactosuero se llevó a un pH de 4,6 con ácido láctico (Scharlau, España) y luego se calentó por 10 minutos a 100 °C, se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó (HealForce, China) para eliminar las proteínas y el sobrenadante se filtró a través de algodón para eliminar la grasa que contenía. Por último, el pH se llevó a 6 con NaOH (Scharlau, España) 1 mol/L. El lactosuero se mantuvo en congelación hasta su uso.

2.2.2 Dilución y eliminación de los sólidos en la melaza

La melaza se diluyó en proporción 1:5 con agua destilada, luego se calentó por 10 minutos a 100 °C, se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó (HealForce, China) para eliminar los sólidos insolubles presentes. La melaza se mantuvo en congelación hasta su uso.

2.3 Determinaciones analíticas

Los azúcares reductores totales (ART) se determinaron según el método de Somogyi-Nelson (1952). La concentración de proteínas totales se determinó mediante el método

de Lowry y col. (1951), las lecturas de absorbancia se realizaron a 650 nm y se utilizó como patrón seroalbúmina bovina (BDH, Inglaterra) en el rango de 20 – 500 µg/mL. La concentración de Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K) se determinaron mediante el método de Kjeldahl según el Manual de procedimientos para los laboratorios de suelo, agua y tejido vegetal del INICA (INICA, 1990). La concentración de Amonio (NH_4^+) se determinó mediante el método del fenato (APHA, 1998). La determinación del contenido de lípidos se realizó mediante el método de la Sulfo-fosfo-vainillina (Frings, C. S. y Dunn, R. T., 1970).

2.4 Microorganismo y Medios de cultivo

Se trabajó con dos cepas de levaduras oleaginosas, las cepas número 36 y 75 de la Colección de Cultivos del CEBI, la cual se encontraban conservada en cuñas con medio Extracto de levadura-peptona-glucosa- Agar bacteriológico (YPDA) [composición, en g/L]: Extracto de levadura (UNI-Chem, China) [10], Glucosa (UNI-Chem, China) [20], Peptona (UNI-Chem, China) [20], Agar bacteriológico (UNI-Chem, China) [20] a 4° C en el Laboratorio de Tecnología Enzimática y Microbiana del CEBI.

Como medio general para la conservación y propagación de las levaduras se utilizó el medio de cultivo MGY [composición, en g/L]: Glucosa (Panreac, España) [20], $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Scharlau, España) [5], $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Scharlau, España) [0,5], CaCl_2 (Scharlau, España) [0,1], KH_2PO_4 (Scharlau, España) [1], Extracto de levadura (Scharlau, España) [2,5]. La variante sólida del medio (MGYA) se obtiene por adición de agar bacteriológico (Scharlau, España) [20]. Estos cultivos se utilizaron como inóculo (4 % v/v) para los medios utilizados para evaluar la producción de lípidos.

2.5 Elección de la cepa de levadura más productora de lípidos

Para evaluar la producción de lípidos por las cepas de levadura al utilizar como fuentes de carbono los dos subproductos agroindustriales, se emplearon cuatro medios de cultivo, los cuales presentaron la misma composición del medio MGY, sin adicionar glucosa como fuente de carbono, y en dos de los medios no se adicionó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno, con el objetivo de observar la influencia de la adición de nitrógeno adicional, en el lactosuero y la melaza, sobre la acumulación de lípidos y el crecimiento microbiano de ambas cepas. Los medios son los siguientes:

Medio 1: Empleo de melaza como fuente de carbono, sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Medio 2: Empleo de melaza como fuente de carbono

Medio 3: Empleo de lactosuero como fuente de carbono, sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Medio 4: Empleo de lactosuero como fuente de carbono

Las dos cepas de levadura se cultivaron en Erlenmeyers de 250 mL que contenían 50 mL de cada medio de cultivo. El pH del medio se llevó a 6 con NaOH (Scharlau, España) 1 mol/L, los medios se mantuvieron en agitación durante 72 horas.

La determinación del contenido de lípidos luego de las 72 horas se realizó por duplicado. La mejor cepa se eligió al comparar los resultados mediante un análisis de

varianza, y se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey. Se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XV (Stat Point, Inc.; USA).

2.6 Optimización de la producción de lípidos

Para la creación y posterior análisis del diseño experimental que permitió realizar la optimización de la producción de lípidos por la cepa seleccionada, se utilizó el programa estadístico StatgraphicsCenturion XV.

2.6.1 Selección de los factores que influyen sobre la producción de lípidos

Con el objetivo de conocer cuáles son los componentes del medio de cultivo que influyen realmente sobre la producción de lípidos y de biomasa por la cepa seleccionada se utilizó un diseño de cribado consistente en un diseño Plackett-Burman con nueve factores en dos niveles y tres puntos centrales, para un total de 15 medios de cultivo propuestos. Los factores y niveles evaluados fueron: Concentración de carbono (Cc) (80-100 g/L), Concentración de carbono aportada por el suero (Cc suero) (0-3 %), relación carbono-nitrógeno (C/N) (100-200), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0-0,5 g/L), KH_2PO_4 (0-1 g/L), CaCl_2 (0-0,1 g/L), Extracto de levadura (0-1 g/L), Tween 20 (0,5-1,5 g/L) (Scharlau, España), pH (5-6).

2.6.2 Optimización del medio de cultivo para la obtención de lípidos

Una vez conocidos cuales son los factores con mayor influencia sobre la producción de lípidos y de biomasa por la cepa seleccionada, se utilizó un diseño de superficies de respuesta consistente en un diseño Box-Behnken con tres factores en dos niveles y tres puntos centrales, para un total de 15 medios de cultivo propuestos. Al analizar los resultados se obtuvieron las ecuaciones de regresión (modelos) que predicen los valores máximos de acumulación de lípidos (%) y concentración de biomasa (mg/mL).

Resultados y Discusión

III. Resultados y Discusión

3.1 Caracterización de los subproductos agroindustriales

En la tabla 2 se pueden observar los resultados obtenidos en la caracterización de los dos subproductos agroindustriales utilizados en el presente estudio. El parámetro de mayor interés, de acuerdo a su influencia en el crecimiento microbiano y en la acumulación de lípidos intracelulares es la concentración de azúcares reductores totales. Precisamente la utilización de estos subproductos agroindustriales tuvo como base la sustitución de la fuente de carbono por una más barata y disponible, que en un futuro permitiría reducir los costos de la producción de los lípidos microbianos, lo cual los haría más competitivos ante los aceites vegetales (Schneider y col., 2012b).

La melaza presentó una concentración de azúcares reductores totales (689 g/L) comparable a la reportada en la literatura (Otero, 1997) de 656 g/L para mieles finales. Este valor de concentración de azúcares reductores totales fue muy superior al obtenido por el lactosuero (18 g/L), por lo que las concentraciones de biomasa y de TAG obtenidas por ambas cepas de levaduras al cultivarse en los medios de cultivo que emplean melaza como fuente de carbono pueden resultar superiores a las alcanzadas cuando el lactosuero sea utilizado, esta hipótesis fue posteriormente comprobada.

El pH de la melaza (5,72) estuvo dentro del rango de pH de 5,5 a 5,9 obtenido por Otero (1997) al determinar la composición de melazas durante 12 campañas azucareras. El lactosuero presentó un pH (5,56) dentro del rango del denominado suero dulce (4,5-6,7) reportado por Mouliny Galzy (1984)

La concentración de Nitrógeno presente en la melaza (4,49 g/L) fue ligeramente menor a la reportada por Otero (1997) (5,39 g/L) y la cantidad de fósforo (0,53 g/L) se asemeja a la reportada por Perez (1996) de 0,32 g/L.

Las concentraciones de Nitrógeno (1,79 g/L), Fósforo (0,26 g/L) y Potasio (1,94 g/L) obtenidos para el lactosuero fueron comparables a los reportados por Mouliny Galzy (1984), estos fueron de 1,45 g/L, 0,41 g/L y 1,45 g/L respectivamente.

3.2 Elección de la cepa de levadura más productora de lípidos

Después de las 72 horas de cultivo, se realizó la determinación de la concentración de TAG, y con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (tabla 3).

Como se puede observar en la tabla 3, existen diferencias significativas entre los medios de cultivo utilizados y entre las cepas de levadura para un nivel de confianza del 95 %, sin embargo, entre réplicas no existen diferencias significativas (P -valor > 0.05).

Tabla 2. Caracterización de los subproductos agroindustriales

Subproductos	ART ¹ (g/L)	Proteínas (mg/mL)	N (g/L)	P (g/L)	K (g/L)	NH ₄ ⁺ (mg/mL)	pH
Melaza	689	73,3	4,49	0,53	14,8	0,013	5,72
Lactosuero	18	4,16	1,79	0,26	1,94	0,021	5,56

¹Azúcares Reductores Totales

Tabla 3. Análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	P-Valor
Efectos Principales					
A:Cepas	3741,13	1	3741,13	10,48	0,0318
B:Medios	130305	1	130305,	364,98	0,0000
C:Réplicas	107,898	1	107,898	0,30	0,6117
Residuos	1428,07	4	357,016		
TOTAL (Corregido)	135582	7			

Resultados y Discusión

La representación gráfica de la prueba de comparación de medias utilizada (figura 2), demostró que la cepa número 75 logró acumular una mayor cantidad de lípidos intracelulares luego de 72 horas de cultivo en las condiciones de trabajo, por lo tanto, se eligió como la cepa de levadura más productora de lípidos, y la misma fue utilizada en los siguientes pasos de optimización del proceso de obtención de lípidos microbianos.

Los valores de concentración de TAG (mg/mL) mostrados en la figura 2 contemplan los resultados obtenidos en ambos subproductos agroindustriales. Para realizar una evaluación más exhaustiva sobre la influencia de cada fuente de carbono utilizada en la acumulación de lípidos por la cepa seleccionada, se graficaron los resultados de los valores de concentración de TAG (mg/mL) obtenidos para la cepa 75 en cada uno de los 4 medios de cultivo empleados (figura 3).

La concentración de lípidos que esta cepa fue capaz de producir cuando se utilizó melaza como medio de cultivo fue superior a la obtenida cuando el lactosuero fue utilizado, lo cual pudiera deberse a que la levadura utilizó la sacarosa (principal azúcar presente en la melaza) de una forma más eficiente que la lactosa (principal azúcar presente en el lactosuero) en la conversión de la fuente de carbono en lípidos de reserva.

Lo anteriormente expuesto se tuvo en cuenta al realizar el diseño de cribado (Plackett-Burman), donde se utilizó como fuente de carbono principal la melaza, y se evaluó entonces la influencia del lactosuero como suplemento en los medios de cultivo, el aporte de este representó una pequeña parte de la concentración de carbono (3%).

Como se puede observar en la figura 3, la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el medio que utiliza la melaza como fuente de carbono produce una disminución de la acumulación de lípidos en la levadura, lo cual indica que la cantidad añadida es excesiva, ya que como se ha demostrado por varios autores (Manowattana y col., 2017; Boviatsi y col., 2019), la producción de lípidos en las levaduras oleaginosas aumenta con la disminución de la concentración de nitrógeno en el medio, o sea, cuando existe un aumento en la relación C/N.

Los valores de concentración de lípidos obtenidos por esta cepa en los medios donde el lactosuero se utilizó como fuente de carbono (medios 3 y 4) no presentaron una diferencia significativa, aunque al igual que en el caso anterior se puede observar una ligera disminución de la concentración de los TAG en el medio que contenía $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ adicional, igualmente debido a la disminución de la relación C/N.

La relación C/N es uno de los principales factores a tener en cuenta cuando se busca incrementar la producción de TAG en las levaduras oleaginosas, razón por la cual varios investigadores estudian su influencia en la acumulación de lípidos intracelulares.

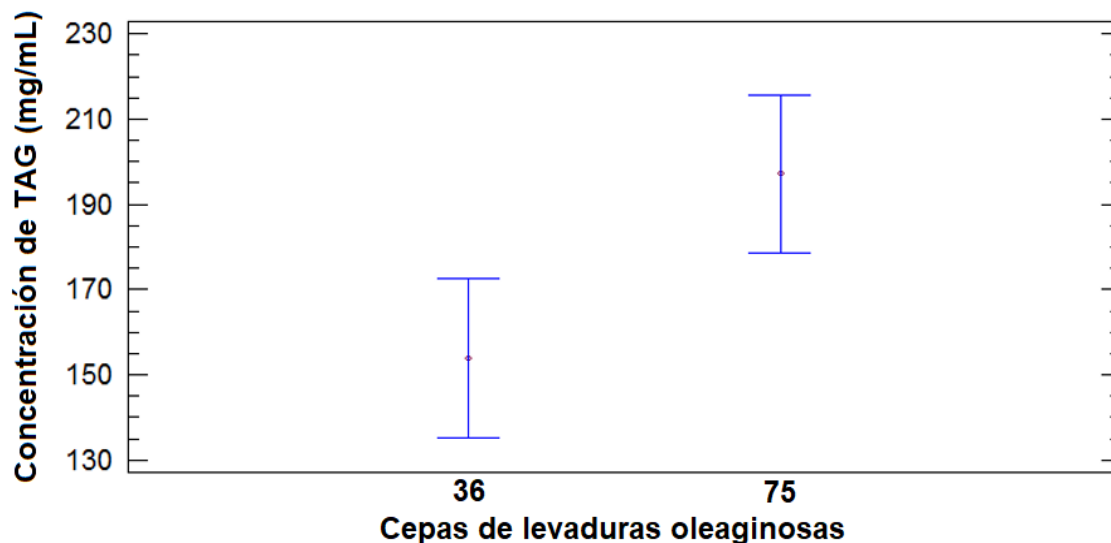


Figura 2. Producción de lípidos por ambas cepas de levadura al utilizar como fuentes de carbono ambos subproductos agroindustriales.

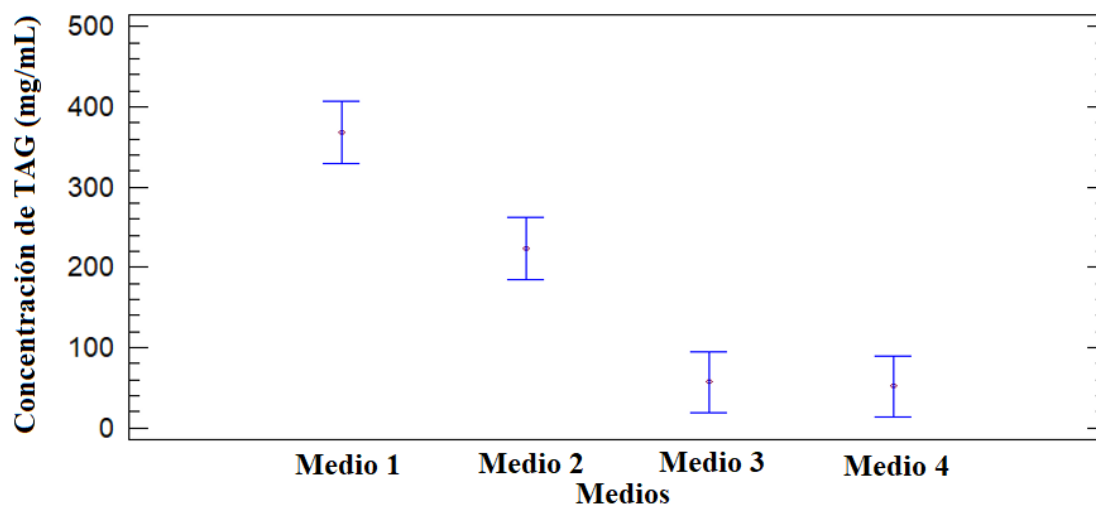


Figura 3. Producción de lípidos por la cepa 75 en los 4 medios de cultivo empleados. Medio 1: Empleo de melaza como fuente de carbono, sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Medio 2: Empleo de melaza como fuente de carbono; Medio 3: Empleo de lactosuero como fuente de carbono, sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Medio 4: Empleo de lactosuero como fuente de carbono.

En la investigación realizada por Bardhany col. (2020) se aislaron 14 cepas de levaduras potencialmente oleaginosas, las cuales resultaron ser del género *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candida*, *Saturnispora*, *Wickerhamomyces*, *Zygoascus*, y *Saccharomyces*. Los aislados de levadura más prometedores se sometieron a una evaluación para determinar la influencia de la relación C/N sobre la acumulación de lípidos intracelulares. La levadura que logró acumular una mayor cantidad de lípidos fue una cepa de *Rhodotorula* (*Rhodotorula mucilaginosa* R2) con un 22,21 %. En el caso de esta levadura el contenido lipídico aumento significativamente de 7,08 a 20,67%, cuando la relación C/N se incrementó de 20 a 40.

Wang y Ren(2014) cultivaron una cepa de levadura *Rhodotorula* (*Rhodotorula glutinis* CICC 31643) en un medio que contenía melazas de caña de azúcar como fuente de carbono. Los autores estudiaron la influencia de la relación C/N en la acumulación de lípidos, demostrando que cuando se utiliza una relación C/N alta (100) se favorece la acumulación de lípidos, bajo estas condiciones se logró obtener un 44,5 %. La concentración de biomasa fue de 7,93 mg/mL cuando se utilizó un cultivo discontinuo alimentado, y de 6,31 mg/mL cuando se utilizó un cultivo discontinuo.

Braunwaldy col. (2013) estudiaron el efecto de diferentes relaciones C/N en la producción de carotenoides y lípidos por una cepa de levadura *Rhodotorula glutinis* (*Rhodotorula glutinis* ATCC 15125). Cuando se incrementó la relación C/N a través del aumento de la concentración de glucosa se evidenció su influencia en la acumulación de lípidos, el rendimiento aumentó más del doble cuando la concentración de glucosa aumentó de 16,2 g/L (C/N 20) hasta 57 g/L (C/N 70).

Debido a la demostrada influencia de este factor sobre la producción de lípidos, en los próximos pasos de optimización se estudió la relación C/N como uno de los factores a tener en cuenta para la optimización del medio de cultivo con el fin de maximizar la obtención de lípidos por esta levadura.

Algunos agentes, tales como aceites, detergentes y surfactantes, estimulan la producción de lípidos en levaduras oleaginosas (Saenge y Cheirsilp, 2011), por lo tanto, con el objetivo de incrementar la producción de lípidos por la cepa de levadura seleccionada, como uno de los factores del medio de cultivo se decidió utilizar el Tween 20, el cual es un tensoactivo tipo polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea usado como detergente y emulsionante en numerosas aplicaciones.

El empleo de tensoactivos ha sido estudiado por varios autores para incrementar la producción de lípidos, y algunos de los estudios se centran en la elección de estos compuestos para seleccionar los que mayor influencia tienen en este proceso.

Saengey col. (2011) utilizaron una cepa de levadura *Rhodotorula glutinis* (*R. glutinis* TISTR5159) para obtener carotenoides y lípidos. En este trabajo se realizó un cribado con el objetivo de seleccionar el surfactante que más influyera en la acumulación de lípidos, los surfactantes estudiados fueron la goma arábica, el Tween 20 y el Tween 80.

Resultados y Discusión

Las mayores concentraciones de biomasa (7,07 g/L) y valores de acumulación de lípidos (38,15%) se obtuvieron cuando se utilizó el Tween 20.

Para optimizar la producción de carotenoides y lípidos utilizaron un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken, con tres variables y tres niveles. Se evaluaron como variables independientes la demanda química de oxígeno, la concentración de Tween 20 y la relación C/N. También se demostró que la producción de lípidos se incrementa al aumentar la relación C/N.

Saenge y Cheirsilp (2011) emplearon un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken, con tres variables y tres niveles para optimizar las condiciones de obtención de lípidos y carotenoides por la levadura *R. glutinis* TISTR5159 utilizando glicerol crudo como fuente de carbono. Las variables estudiadas fueron la concentración de glicerol, la concentración de Tween 20 y la relación C/N. En las condiciones óptimas para la producción de lípidos se alcanzó una acumulación de 60,7%.

Hasta ahora se analizaron los valores de concentración de TAG obtenidos por las cepas de levaduras, lo cual fue de gran importancia ya que esta es la principal respuesta que se estudió a la hora de elegir la mejor cepa de levadura. Sin embargo, también se analizan los resultados obtenidos para la concentración de biomasa (mg/mL), teniendo en cuenta los valores reportados para la cepa 75 en cada uno de los 4 medios de cultivo empleados (figura 4).

La concentración de biomasa que esta cepa fue capaz de producir cuando se utilizó melaza como medio de cultivo fue superior a la obtenida cuando el lactosuero fue utilizado, lo cual reafirma la hipótesis de la mayor asimilación de la sacarosa con respecto a la lactosa enunciada anteriormente.

Como se puede observar en la figura 4, la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el medio que utiliza la melaza como fuente de carbono no produce una mayor producción de biomasa por parte de la levadura, lo cual pudiera deberse a que la melaza por sí misma presenta suficiente cantidad de nitrógeno asimilable para el crecimiento de esta cepa.

Los valores de concentración de lípidos obtenidos por esta cepa en los medios donde el lactosuero se utilizó como fuente de carbono (medios 3 y 4) presentaron una diferencia significativa. En este caso la adición del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ incrementó la concentración de biomasa de 8,5 a 17,3 mg/mL, esto se debió a que, con el empleo de una mayor cantidad de nitrógeno, la relación C/N disminuyó considerablemente, resultando en unas mejores condiciones para la multiplicación de la cepa.

A pesar que el suero contiene lactosa como principal fuente carbono (El-Salam y col., 2014; Ribeiro y col., 2017) y según varios autores algunas levaduras oleaginosas presentan un bajo crecimiento en medios ricos en lactosa debido a la baja asimilación de la lactosa presente en el suero (El-Salam y col., 2014; Chanfrau y col., 2017), algunos autores han utilizado el suero como medio de cultivo (El-Salam y col., 2014; Kanzy y col., 2015; Ribeiro y col., 2017).

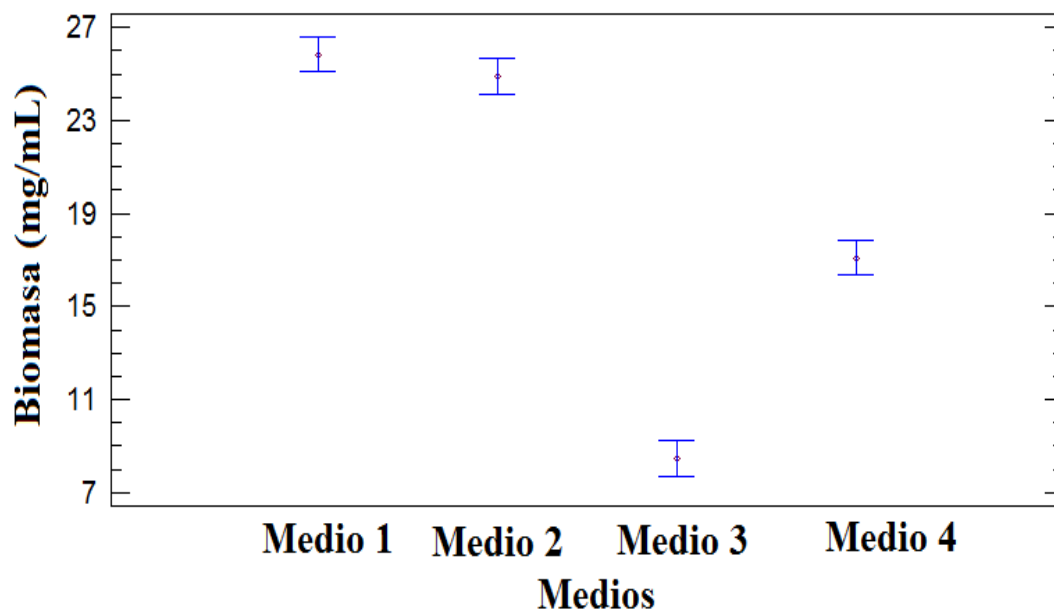


Figura 4. Concentración de biomasa por la cepa 75 en los 4 medios de cultivo empleados. Medio 1: Empleo de melaza como fuente de carbono, sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Medio 2: Empleo de melaza como fuente de carbono; Medio 3: Empleo de lactosuero como fuente de carbono, sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Medio 4: Empleo de lactosuero como fuente de carbono.

Ribeiro y col.(2017) opinan que las levaduras capaces de asimilar lactosa son difíciles de encontrar en condiciones naturales, y se ha demostrado que algunas levaduras han perdido la habilidad de asimilar la lactosa y muestran baja tendencia a crecer en medios que contienen este disacárido como principal fuente de carbono. Esta situación se podría resolver mediante un pretratamiento para hidrolizar la lactosa del suero, ya que la glucosa y la galactosa son más fáciles de asimilar por las levaduras.

Según El-Salam y col. (2014), otras alternativas utilizadas son las de realizar un cultivo mixto con bacterias ácido lácticas que transformen la lactosa en compuestos más asimilables y/o suplementar el suero con otras fuentes de carbono más asimilables. Estos investigadores tuvieron como objetivo la optimización de las condiciones de fermentación para la obtención de biomasa y carotenoides por una cepa de levadura *Rhodotorula*.

En dicho trabajo la levadura *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 fue co-cultivada con la bacteria *Lactobacillus casei* subsp. *casei* NRRL B- 441 con la utilización de lactosuero como medio de cultivo. También se evaluó la influencia de otras fuentes de carbono adicionales(almidón, glucosa o sacarosa) en concentraciones de (0, 1, 2, 3 o 5% w/v) sobre el crecimiento microbiano y la producción de carotenoides. Bajo las condiciones óptimas de cultivo se alcanzó una concentración de biomasa de 7,1 g/L.

La estrategia seguida por Kanzy y col. (2015) fue la de estudiar el efecto del stress osmótico provocado por la adición de NaCl al lactosuero sobre la concentración de biomasa y la producción de carotenoides. También se estudió la influencia del pH, la temperatura y el período de incubación. La producción de biomasa en las condiciones óptimas (13,95 g/L) fue superior a la alcanzada en el estudio anterior, por lo cual el empleo de esta estrategia podría utilizarse en futuros estudios para maximizar la producción de biomasa en medios ricos en lactosa.

3.3 Optimización de la producción de lípidos

3.3.1 Selección de los factores que influyen sobre la producción de lípidos

Como un primer paso en la optimización del medio de cultivo utilizado en la obtención de lípidos microbianos se utilizó un diseño de cribado consistente en un diseño Plackett-Burman. El diseño utilizado propuso 12 medios de cultivo en los que variaron los nueve factores a estudiar en dos niveles, alto (+1) y bajo (-1), además de contar con tres puntos centrales en los cuales los valores de los factores tomaron un valor medio (0) (tabla 4). El objetivo de este diseño fue determinar cuáles de los componentes del medio de cultivo ejercen una influencia significativa sobre las variables de respuesta estudiadas en este trabajo, la concentración de la biomasa obtenida (DW) y el porcentaje de lípidos acumulados (% TAG en base al peso seco).

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos a las 72 horas de cultivo. Con los resultados obtenidos se determinaron los factores que tenían una influencia significativa sobre el crecimiento microbiano (figura 5a) y la acumulación de lípidos (figura 5b), se utilizó para esto los diagramas de Pareto estandarizados.

Resultados y Discusión

Según los diagramas de Pareto Estandarizados los factores que influyeron de manera significativa en la acumulación de lípidos fueron: la concentración de la fuente de carbono (Cc), de Extracto de levadura (YE), de KH_2PO_4 , y la Concentración de carbono aportada por el suero (CcSuero); y en la formación de biomasa: no influye ninguno de manera significativa, pero tienen una mayor influencia el pH y la concentración de KH_2PO_4 .

De acuerdo a estos resultados el análisis se enfocó en elegir los que mayor influencia tienen en el incremento de acumulación de TAG, sin descuidar la obtención de biomasa. Como factores a evaluar en el próximo paso de optimización se eligieron solamente los tres factores que presentaron una mayor influencia sobre las variables de respuesta estudiadas.

Los factores se eligieron según las siguientes observaciones:

Cc: Influyó de forma negativa, o sea su incremento es perjudicial, sin embargo, el mismo fue positivo en el crecimiento, por lo que resulta el primer parámetro a estudiar en el próximo paso de optimización.

YE: Influyó de forma positiva, también fue positivo en el crecimiento, por lo que en el próximo paso de optimización este parámetro se fijó en el valor máximo (1 g/L).

KH_2PO_4 : Influyó de forma negativa, o sea su incremento fue perjudicial, sin embargo, el mismo es positivo en el crecimiento (casi influye), por lo que resultó el segundo parámetro a estudiar en el próximo paso de optimización.

Cc Suero: Influyó de forma negativa, o sea su incremento fue perjudicial, sin embargo, el mismo fue positivo en el crecimiento, pero no influyó significativamente, por lo que en el próximo paso de optimización este parámetro se fijó en el valor mínimo (no se utilizó).

pH: Aunque no influyó en la obtención de TAG, es casi significativo en el crecimiento, por lo que resultó el tercer parámetro a estudiar en el próximo paso de optimización.

Después de realizado el análisis anterior se concluye que los factores seleccionados para ser posteriormente optimizados fueron la concentración de carbono (Cc), la concentración de KH_2PO_4 y el pH.

Los demás componentes del medio de cultivo al no influir de manera significativa, fueron fijados de acuerdo al valor óptimo propuesto para la obtención de TAG en el diseño Plackett-Burman. La composición de estos factores resultó ser la siguiente: Relación carbono-nitrógeno (C/N) (180), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/L), CaCl_2 (0,1 g/L), Extracto de levadura (1 g/L), Tween 20 (0,6 g/L). La Concentración de carbono aportada por el suero (Cc suero) no se utilizó.

El diseño de cribado Plackett-Burman es útil cuando se realiza un experimento en el cual, se desea conocer la influencia de un gran número de factores sobre la, o las variables de respuesta. Con su uso se disminuyen la cantidad de experimentos a

Resultados y Discusión

realizar y, por consiguiente, el gasto de reactivos y tiempo utilizados en la realización del experimento, razón por la que otros autores han utilizado este tipo de diseño.

Tabla 4. Diseño Plackett-Burman y resultados obtenidos para las respuestas Concentración de la biomasa obtenida (DW) y Porcentaje de lípidos acumulados (% TAG).

Medios	Factores ^a									Respuestas	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	DW (mg/mL)	% TAG
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	9,40	52,09
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	11,45	33,16
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	11,05	50,05
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	12,85	44,07
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	13,95	35,22
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	11,60	37,90
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	10,40	53,49
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	13,35	54,91
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	11,15	44,66
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	10,55	55,42
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	12,55	55,75
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8,85	51,56
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10,90	45,69
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,40	46,52
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,20	44,76

^a (A) Concentración de carbono, (B) Concentración de carbono aportada por el suero, (C) relación carbono-nitrógeno, (D) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (F) KH_2PO_4 , (E) CaCl_2 , (G) Extracto de levadura, (H) Tween 20, (I) pH.

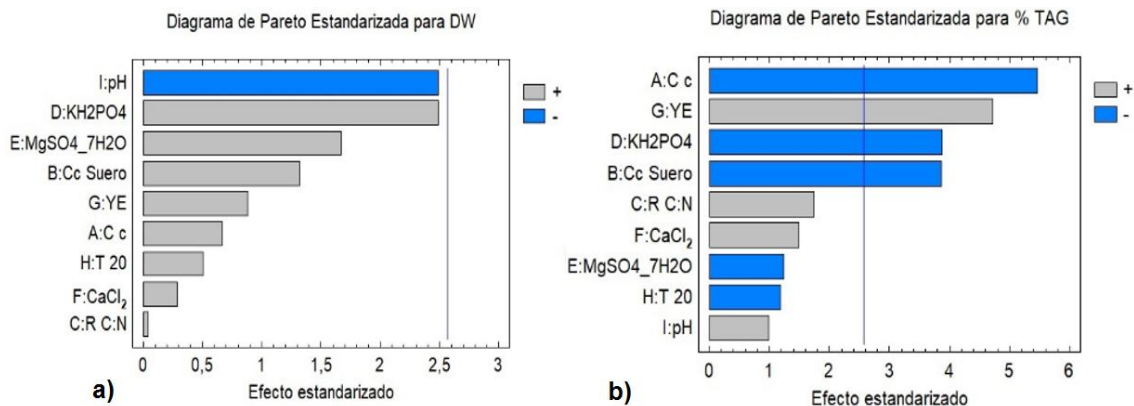


Figura 5. Diagramas de Pareto Estandarizados a) para la biomasa obtenida, b) para el % de Triglicéridos obtenidos.

En la investigación realizada por Kumary col.(2020) se utilizó el diseño Plackett-Burman con el objetivo de seleccionar los factores que más influyeron en la acumulación de lípidos por una cepa de levadura *Meyerozymacaribbica*. De los 11 factores estudiados se determinó que los que tenían una influencia significativa fueron el glicerol y las sales cloruro de amonio, sulfato de magnesio y dihidrógeno fosfato de potasio, los cuales fueron posteriormente optimizados mediante el uso de un diseño de superficies de respuesta consistente en un diseño compuesto central (CCD).

3.3.2 Optimización del medio de cultivo para la obtención de lípidos

Como último paso en la optimización del medio de cultivo se utilizó un diseño de superficies de respuesta consistente en un diseño Box-Behnken. El diseño utilizado propuso 15 medios de cultivo variando los tres parámetros elegidos según el análisis anterior en tres niveles: concentración de la fuente de carbono (Cc) (60-70-80 g/L); concentración de KH_2PO_4 (0-0,3-0,6g/L) y pH (5,5-6-6,5)(tabla 5). El objetivo de este diseño fue determinar los valores óptimos para los factores estudiados y obtener la composición del medio de cultivo optimizado, que permita incrementar la concentración de la biomasa obtenida (DW) y el porcentaje de lípidos acumulados (% TAG en base al peso seco)

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos a las 72 horas de cultivo, con los resultados obtenidos se determinaron los valores óptimos de los factores estudiados.

Según los diagramas de Pareto Estandarizados (figura 6) el único factor que, individualmente, tuvo una influencia significativa fue la concentración de carbono, por lo tanto, se tomó como valor óptimo el mayor valor evaluado, ya que el aumento de la concentración de carbono permitió la acumulación de mayor cantidad de lípidos de reserva.

La adición de KH_2PO_4 tuvo una influencia negativa tanto en la acumulación de lípidos como en el crecimiento microbiano, lo cual indica que la cantidad de potasio aportada por la melaza es suficiente y por consiguiente no es necesario la suplementación de esta sal.

El pH tuvo una influencia positiva en la acumulación de lípidos, pero negativa en el crecimiento microbiano, aunque no influyó significativamente en ninguno de los dos casos. Los valores óptimos de los factores estudiados fueron los siguientes: Cc (80 g/L); KH_2PO_4 (0 g/L) y pH de 6,5.

El medio de cultivo optimizado presentó la siguiente composición (en g/L): Cc (80); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1); CaCl_2 (0,1); Extracto de levadura (1); Tween 20 (0,6). Con una relación Carbono-Nitrógeno de 180 y un pH de 6,5.

Tabla 5. Diseño Box-Behnken y resultados obtenidos para las respuestas Concentración de la biomasa obtenida (DW) y Porcentaje de lípidos acumulados (% TAG).

Medios	C c(g/L)	pH	KH ₂ PO ₄ (g/L)	DW (mg/mL)	% TAG
1	60	5,5	0,3	11,15	29,87
2	80	5,5	0,3	14,05	33,67
3	60	6,5	0,3	10,40	35,38
4	80	6,5	0,3	9,55	53,89
5	60	6	0	9,50	40,32
6	80	6	0	11,35	64,14
7	60	6	0,6	8,80	46,93
8	80	6	0,6	10,60	41,32
9	70	5,5	0	8,75	43,58
10	70	6,5	0	10,25	38,18
11	70	5,5	0,6	8,70	39,81
12	70	6,5	0,6	7,85	46,03
13	70	6	0,3	10,95	33,46
14	70	6	0,3	11,00	34,21
15	70	6	0,3	11,05	33,45

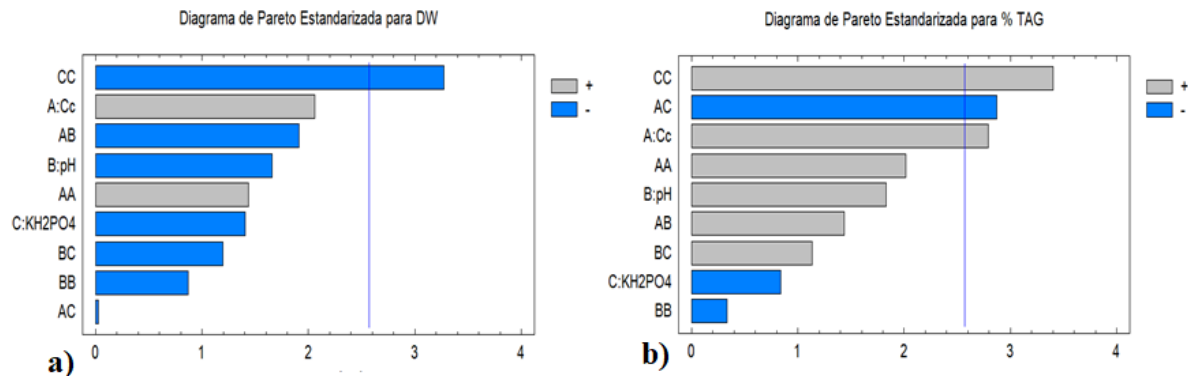


Figura 6. Diagramas de Pareto Estandarizados a) para la biomasa obtenida, b) para el % de Triglicéridos obtenidos.

El diseño de superficies de respuesta Box-Behnken es útil cuando se realiza un experimento en el cual, se desean determinar las condiciones de operación óptima de para un sistema, o determinar la región del espacio de los factores en las que se satisfacen las condiciones de operación. Para esto no son necesarios demasiados niveles de las variables independientes ni un gran número de ensayos, razón por la que otros autores han utilizado este tipo de diseño.

En la investigación realizada por Sagia y col. (2020) se utilizó el diseño Box–Behnken con el objetivo de optimizar las concentraciones de extracto de levadura, peptona y MgSO_4 para maximizar la producción de lípidos por la cepa de levadura *Trichosporon mycotoxinivorans* S2 cultivada en un medio que contenía hidrolizados de paja de arroz como fuente de carbono. La levadura logró acumular un 41,59% de lípidos bajo las condiciones óptimas.

Al analizar los resultados en el programa Statgraphics, se obtuvieron las ecuaciones de regresión (modelos) que predicen los valores máximos de acumulación de lípidos (% TAG) expresado en tanto por ciento (%) y concentración de biomasa (DW) expresado en mg/mL.

Ecuación de regresión para la acumulación de lípidos (% TAG)

$$\% \text{ TAG} = 396,961 - 10,7121 \cdot \text{Cc} - 7,8975 \cdot \text{pH} - 10,1403 \cdot \text{KH}_2\text{PO}_4 + 0,0538667 \cdot (\text{Cc})^2 + 0,7355 \cdot \text{Cc} \cdot \text{pH} - 2,4525 \cdot \text{Cc} \cdot \text{KH}_2\text{PO}_4 - 3,56333 \cdot (\text{pH})^2 + 19,3667 \cdot \text{pH} \cdot \text{KH}_2\text{PO}_4 + 100,935 \cdot (\text{KH}_2\text{PO}_4)^2$$

Ecuación de regresión para la concentración de biomasa (DW)

$$\text{DW} = -102,225 + 0,17375 \cdot \text{Cc} + 34,45 \cdot \text{pH} + 33,2917 \cdot \text{KH}_2\text{PO}_4 + 0,0073125 \cdot (\text{Cc})^2 - 0,1875 \cdot \text{Cc} \cdot \text{pH} - 0,00416667 \cdot \text{Cc} \cdot \text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,775 \cdot (\text{pH})^2 - 3,91667 \cdot \text{pH} \cdot \text{KH}_2\text{PO}_4 - 18,5417 \cdot (\text{KH}_2\text{PO}_4)^2$$

Los modelos obtenidos predicen valores máximos de acumulación de lípidos de 65 % y concentración de biomasa de 13 mg/mL. Estos valores son similares a los obtenidos cuando se evaluó la levadura en el medio número 6 (tabla 5), donde se alcanzó una acumulación de lípidos de un 64,14 % y una concentración de biomasa de 11,35 mg/mL.

La utilización de melazas como fuente de carbono para la obtención de lípidos microbianos ha sido ampliamente evaluado por varios autores, los cuales no sólo utilizan melazas de caña de azúcar, ya que las melazas también son obtenidas en el proceso de producción de azúcar a partir de la remolacha azucarera.

El estudio realizado por Taskiny col. (2016) tuvo como objetivo aislar levaduras oleaginosas que fueran capaces de tolerar bajos niveles de pH y altas concentraciones de melazas a partir de muestras de suelo contaminado con melazas. Se lograron aislar 35 cepas de levaduras, pero sólo 10 lograron acumular lípidos por encima del 20 %. Se

Resultados y Discusión

identificó la cepa de levadura que produjo una mayor cantidad de lípidos, resultando ser una cepa de *Rhodotorula* (*Rhodotorula glutinis* TR29), la cual fue cultivada en un medio donde se utilizó la melaza de remolacha azucarera bajo condiciones de cultivo no estériles, evitando la contaminación con altos valores de concentración de melaza y un pH bajo, sus resultados fueron comparables a los obtenidos en el presente trabajo, con un 64,8 % de acumulación de lípidos y una concentración de biomasa de 16,2 mg/mL.

Rakickay col.(2015) emplearon la cepa de levadura *Yarrowialipolytica* JMY4086. Esta levadura fue modificada genéticamente por delección de los genes (POX1–POX6) que codifican la enzima acil-CoA oxidasa y el gen TGL4, el cual codifica una lipasa intracelular con el objetivo de bloquear la β -oxidación e inhibir la reutilización de TAG. En este estudio se evaluó la habilidad de producir lípidos por esta cepa de levadura usando glicerol crudo y melaza de remolacha azucarera bajo diferentes condiciones de oxigenación y diferentes densidades de inóculo en cultivos discontinuos alimentados. La mayor acumulación de lípidos fue de 31%, lo que representa aproximadamente la mitad de la acumulación de lípidos de la levadura evaluada en el presente trabajo.

Otros autores utilizaron melaza de caña de azúcar como fuente de carbono en el proceso de obtención de lípidos por varias cepas de levaduras oleaginosas, con resultados comparables a los obtenidos en el presente trabajo.

La investigación realizada por Mukhtary col.(2018) tuvo como objetivo la identificación de especies oleaginosas a partir de 50 cepas de levaduras aisladas del suelo. Además de la melaza de caña de azúcar se evaluaron otras fuentes de carbono (glucosa, xilosa, fructosa, maltosa, sacarosa y lactosa), sin embargo, la máxima producción de biomasa (29,4 g/L) se obtuvo cuando esta se empleó ya que las levaduras fueron capaces de utilizar la glucosa, fructosa y sacarosa, principales azúcares fermentables presentes en la melaza para el crecimiento microbiano y la acumulación de lípidos intracelulares. La concentración de biomasa obtenida fue superior a la obtenida en el presente trabajo, la cual es de menos de la mitad del valor reportado por estos autores.

Sólo 5 cepas de levaduras resultaron ser especies oleaginosas, y se identificó como máxima productora de lípidos a una cepa de *Yarrowialipolytica* (*Yarrowialipolytica* IIB-10), la cual logró acumular lípidos hasta un 22,8%, valor inferior al obtenido en el presente trabajo.

Boviatsiy col. (2019) cultivaron las cepas de levadura *Rhodospiridiumtoruloides* NRRL Y-27012 y *R. kratochvilovae* Y-43 utilizando melaza de caña como fuente de carbono. Los autores estudiaron varias estrategias de suplementación de nutrientes, las cuales incluyeron la adición de elementos traza y sales de fosfato a la melaza. Los resultados obtenidos indican que las adiciones de dichos suplementos disminuyen la velocidad de consumo de azúcar en el medio, lo cual se debió a que la melaza contiene estas fuentes de nutrientes.

La levadura *Rhodospiridiumtoruloides* NRRL Y-27012 logró acumular un 61 % de lípidos cuando se utilizó un cultivo discontinuo alimentado por 92 horas en un medio sin adición de elementos traza y sales de fosfato, resultado similar al propuesto por la ecuación de

regresión en el presente trabajo. Los lípidos producidos por ambas levaduras tuvieron una composición de más del 60 % de ácido oleico.

Kongruangy col.(2020) utilizaron melaza en el cultivo de varias cepas de levaduras oleaginosas (*Rhodospordiumtoruloides*, *Yarrowialipolytica*, *Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorulagraminis*). La cepa de levadura *R. toruloides* TISTR 5154 fue la que acumuló una mayor cantidad de lípidos (32,35 %), y se encontró que, de los ácidos grasos producidos por esta levadura, el ácido palmítico resultó ser predominante, con más del 40 %.

Aunque el valor de los lípidos acumulados es inferior al obtenido en este trabajo, es similar al obtenido por Jiruy col.(2018), los cuales también utilizaron melaza de caña en un medio con limitación de nitrógeno, para cultivar otra cepa de levadura *Rhodotorula* (*Rhodospordiumkratochvilovae* SY89), la levadura acumuló un 38,25 % de lípidos con una concentración de biomasa similar (13,25 mg/mL) a la obtenida en el presente trabajo.

Maza y col. (2020) compararon la habilidad de sintetizar lípidos por la cepa de levadura *Rhodotorula glutinis* R4 con ocho cepas que pertenecen a los géneros *Rhodotorula* y *Yarrowia* con el objetivo de proponer una nueva fuente de aceites para la síntesis de biodiesel. Todas las cepas se cultivaron en medios de cultivo con condiciones de limitación de nitrógeno y exceso de carbono.

La levadura *Rhodotorula glutinis* R4 mostró la mayor acumulación de lípidos intracelulares (47%), y se demostró que la composición de los ácidos grasos producidos por esta cepa era similar a los producidos por las plantas, con un 61 % de ácido oleico, lo cual indica que el mismo es adecuado para la síntesis de biodiesel.

Las tres últimas investigaciones citadas no solo tuvieron como objetivo proveer información sobre la obtención de lípidos microbianos por parte de estas cepas de levaduras, en estas se obtuvo además el biodiesel obtenido a partir de dichos lípidos, con un rendimiento del 85,3 % en el caso de Jiruy col. (2018), y luego de caracterizados, en estos trabajos se comprobó que sus propiedades y calidad eran comparables con los estándares internacionales ASTM D6751 y EN 14214 para estos combustibles.

Estos estudios demuestran la factibilidad de utilizar las melazas como fuente de carbono en el cultivo de levaduras oleaginosas para obtener lípidos microbianos con el objetivo de ser empleados en la fabricación de biodiesel. La cepa de levadura que se utilizó en este trabajo presenta un gran potencial para dichas aplicaciones, ya que logra acumular lípidos en valores comparables a otras levaduras ya estudiadas, por lo tanto, se hace necesario realizar futuras investigaciones donde se estudie el proceso de obtención de biodiesel a partir de los lípidos obtenidos por esta levadura.

Conclusiones

Conclusiones

- ✓ Se caracterizaron los subproductos agroindustriales demostrando la factibilidad del empleo de la melaza como fuente de carbono barata y disponible para la producción de lípidos por una cepa de levadura oleaginosa.
- ✓ Se seleccionó la cepa de levadura oleaginosa número 75, ya que la misma logró acumular una mayor cantidad de lípidos cuando se cultivó en los subproductos agroindustriales estudiados.
- ✓ Se determinó que la composición óptima del medio de cultivo (en g/L) es: Concentración de la fuente de carbono (80); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1); CaCl_2 (0,1); Extracto de levadura (1); Tween 20 (0,6); con una Relación Carbono-Nitrógeno de 180 y pH de 6,5.
- Las ecuaciones de regresión obtenidas durante la optimización predicen valores máximos de acumulación de lípidos de 65 % y concentración de biomasa de 13 mg/mL, por lo cual se demuestra el potencial de esta cepa de levadura en futuros trabajos encaminados a la producción de biodiesel.

Recomendaciones

Recomendaciones

- Identificar el género de la cepa de levadura oleaginosa utilizada en el presente trabajo.
- Obtener y caracterizar los lípidos de la cepa de levadura oleaginosa cultivada en las condiciones óptimas.

Referencias Bibliográficas

Referencias Bibliográficas

1. Adamczak M, Bornscheuer UT, Bednarski W. The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2009; 111: 808–813. DOI:10.1002/ejlt.200900078.
 2. Adrio JL. Oleaginous Yeasts: Promising Platforms for the Production of Oleochemicals and Biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017; 114 (9).
 3. Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011; 90 (4):1219–1227.
 4. APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20a ed. Washington, D.C.: APHA (American Public Health Association), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). 1998.
 5. Arifin Y, Tanudjaja E, Dimyati A, Pinontoan, R. A Second Generation Biofuel from Cellulosic Agricultural By-product Fermentation Using *Clostridium* Species for Electricity Generation. *Energy Procedia*. 2014; 47: 310–315. DOI:10.1016/j.egypro.2014.01.230
 6. Azad AK, Rasul MG, Khan MMK, Sharma SC, Hazrat MA. Prospect of biofuels as an alternative transport fuel in Australia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015; 43: 331–351. DOI:10.1016/j.rser.2014.11.047
 7. Banzatto D, Freitas L A, Mutton MJR. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2013; 33 (1): 14-18.
 8. Bardhan P, Gupta K, Kishor S, Chattopadhyay P, Chaliha C, Kalita E, et al. Oleaginous yeasts isolated from traditional fermented foods and beverages of Manipur and Mizoram, India, as a potent source of microbial lipids for biodiesel production. *Annals of Microbiology*. 2020; 70:27. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01562-z>
 9. Beopoulos A, Nicaud JM, Gaillardin C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011; 90 (4): 1193–206. DOI:10.1007/s00253-011-3212-8.
 10. Boviatsi E, Papadaki A, Efthymiou M, George-John EN, Papanikolaou S, da Silva JAC et al. Valorisation of sugarcane molasses for the production of microbial lipids via fermentation of two *Rhodospiridium* strains for enzymatic synthesis of polyol esters. *J Chem Technol Biotechnol*. 2019; DOI 10.1002/jctb.5985
 11. Braunwald T, Schwemmlin L, Graeff-Hönninger S, French WT, Hernandez R, et al. Effect of different C/N-ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013. DOI 10.1007/s00253-013-5005-8
 12. Campbell C, Laherrère J. The end of cheap oil. *Scientific American*. 1998.
 13. Cardoso LAC, Karp SG, Vendruscolo F, Kanno K, Zoz L, Carvalho JC. Biotechnological Production of Carotenoids and Their Applications in Food and Pharmaceutical Products. In: Cvetkovic DJ, Nikolic GS, editors. *Carotenoids*. London: Intech; 2017. p. 125-141. DOI: 10.5772/67725
-

Referencias Bibliográficas

14. Chanfrau JMP, Pérez JN, Fiallos MVL, Intriago LMR, Toledo LET, Guerrero MJT. Valorización del suero de leche: Una visión desde la biotecnología. *Bionatura*. 2017; 2 (4):16. doi:10.21931/RB/2017.02.04.11
 15. Cheirsilp B, Kittha S, Torpee S. Co-culture of an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for biomass and lipid production using pure and crude glycerol as a sole carbon source. *AnnMicrobiol*. 2012; 62:987–993. DOI:10.1007/s13213-011-0338-y
 16. Chi Z, Zheng Y, Jiang A, Chen Z. Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process. *ApplBiochemBiotechnol*. 2011; 165:442-453. DOI:10.007/s12010-011-9263-6
 17. Chiralde MI. cubahora. 2018. [Internet]. [Consultado 22/4/2019]. Disponible en: <http://www.cubahora.cu/ciencia-y-tecnologia>
 18. Codex-Alimentarius. “General Standard for Food Additives”. Codex Stan. 1995, 192.
 19. Cremonese PA, Feroldi M, Nadaleti WC, De Rossi E, De Camargo MP et al. Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. *Renewable and SustainableEnergyReviews*. 2015; 42: 415–428. DOI:10.1016/j.rser.2014.10.004
 20. Cury K, Arteaga M, Martínez G, Luján D, Durango A. Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteinado) utilizando *Lactobacillus casei*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2014; 26 (1): 137-145.
 21. Da Silva TL, Feijão D, Reis A. Using multi-parameter flow cytometry to monitor the yeast *Rhodotorula glutinis* CCMI 145 batch growth and oil production towards biodiesel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010; 162 (8): 2166–76. DOI:10.1007/s12010-010-8991-3.
 22. Da Silva TL, Roseiro JC, Reis A. Applications and perspectives of multi-parameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. *Trends in Biotechnology*. 2012; 30 (4): 225–32. DOI:10.1016/j.tibtech.2011.11.005
 23. Duncan J. Costs of biodiesel production. 2003. [Internet]. [Consultado 17/5/2019]. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/COSTS-OF-BIODIESEL-PRODUCTION-Prepared-for-%3A-Energy-Duncan/b1d0e8fa9e5300ff787a9445ae95fd11d0fdcb71>
 24. El-Salam BA, Amer AE, Amer ME. Using whey for Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis*. *Middle East Journal of Applied Sciences*. 2014; 4(2): 385-391. ISSN 2077-4613
 25. Fernández DR, Flórez NAB, Buitrago LAF, Baquero CJ. Aspectos teóricos de la extracción de carotenoides a partir de microalgas. *Fundación Universidad de América Semilleros Formación Investigativa*. 2017; 3 (1): 35-48. ISSN 2463-0454
 26. Frings CS, Dunn RT. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-vanillin reaction”. *Amer. J. Clin. Pathol*. 1970; 53, 89.
 27. Galadima A, Muraza O. Biodiesel production from algae by using heterogeneous catalysts: A critical review. *Energy*. 2014; 0–11. DOI:10.1016/j.energy.2014.06.018
 28. Gientka I, Gadaszewska M, Kieliszek, SBM, Bzducha-Wrobel A, Kot AM. Evaluation of lipid biosynthesis ability by *Rhodotorula* and *Sporobolomyces* strains in medium with glycerol. *Eur Food Res Technol*. 2017; 243, 243:275–286. DOI: 10.1007/s00217-016-2742-9
 29. Gonzalez-Garcia Y, Hernandez R, Zhang G, Escalante FME, Holmes W, French WT. Lipids accumulation in *Rhodotorula glutinis* and *Cryptococcus curvatus* growing on
-

Referencias Bibliográficas

- distillery wastewater as culture medium. *Environ Prog Sustain Energy*. 2013; 32: 69–74. DOI:10.1002/ep.10604
30. INICA. Manual de procedimientos para los laboratorios de suelo y agua. La Habana. 1990.176.
31. Jiru TM, Steyn L, Pohl C, Abate D. Production of single cell oil from cane molasses by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodospiridiumkratochvilovae*) SY89 as a biodiesel feedstock. *Chemistry Central Journal*. 2018; 12, (91) DOI:<https://doi.org/10.1186/s13065-018-0457-7>.
32. Kanzy HM, Nasr NF, El-Shazly HA, Barakat OS. Optimization of Carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2015; 4(1): 456-469. ISSN: 2319-7706
33. Kitcha S. and Cheirsilp B. Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. *Energy Procedia*. 2011; 9: 274 – 282.
34. Kongruang S, Roytrakul S, Sriariyanun M. Renewable Biodiesel Production from Oleaginous Yeast Biomass Using Industrial Wastes. *Web of Conferences*. 2020; 141. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014103010>
35. Kot AM, Błażej S, Kurcz A, Gientka I, Kieliszek M. *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100:6103–6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8
36. Kumar R, Dhanarajan G, Sarkar D, Sen R. Multi-fold enhancement in sustainable production of biomass, lipids and biodiesel from oleaginous yeast: an artificial neural network-genetic algorithm approach. *Sustainable Energy Fuels*. 2020. DOI:10.1039/d0se00922a
37. Lee RA, Lavoie JM. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*. 2013; 3 (2):6–11. DOI:10.2527/af.2013-0010
38. Liu Y, Wang Y, Liu H, Zhang J. Enhanced lipid production with undetoxified corncob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. *Bioresour Technol*. 2015; 180:32–39. DOI:10.1016/j.biortech.2014.12.093.
39. Llamas M, Dourou M, González-Fernández C, Aggelis G, Tomás-Pejó E. Screening of oleaginous yeasts for lipid production using volatile fatty acids as substrate. *Biomass and Bioenergy*. 2020; 138. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105553>
40. López AQ, Oliva MAH, Hernández C, Mechetnov EP. Carotenoides. ¿Qué son y para qué se usan?. *ciencia*. 2018; 69 (4).
41. Lowry OH, Rosebrough NJ, et al. Protein measurement with folin-phenol reagent, *J. Biol. Chem*. 1951; 193:265-275.
42. Maltos M. Biotecnología alimentaria riesgos o beneficios. *Ciencia UNAM*. 2012. [Internet]. [Consultado 14/5/2019]. Disponible en: http://ciencia.unam.mx/leer/133/Biotecnologia_alimentaria_riesgos_o_beneficios
43. Manowattana A, Techapun C, Watanabe M, Chaiyaso T. Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol into lipids and carotenoids by an oleaginous red yeast *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 in an airlift biorreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2017; 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.07.014>
-

Referencias Bibliográficas

44. Mast B, Zöhrens N, Schmidl F, Hernandez R, French WT, et al. Lipid production for microbial biodiesel by the oleagenous yeast *Rhodotorula glutinis* using hydrolysates of wheat straw and miscanthus as carbón sources. *Waste Biomass Valoriz.* 2014; 5: 955–962. DOI:10.1007/s12649-014-9312-9.
 45. Maza D, Vinarta SC, Su Y, Guillamon JM, Aybara MJ. Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts. *Journal of Biotechnology.* 2020; 310:21–31.
 46. Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy.* 2009; 34 (1): 1–5. DOI:10.1016/j.renene.2008.04.014
 47. Miao Z, Tian X, Liang W, He Y, Wang G. Bioconversion of corncob hydrolysate into microbial lipid by an oleaginous yeast *Rhodotorula taiwanensis* AM2352 for biodiesel production. *Renewable Energy.* 2020. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.007>
 48. Mohr SH, Wang J, Ellem G, Ward J, Giurco D, et al. Projection of world fossil fuels by country. *Fuel.* 2015; 141: 120–135. DOI: 10.1016/j.fuel.2014.10.030
 49. Moulin G, Galzy P. Whey, a Potential Substrate for Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 1984; 1 (1):347-374, DOI:10.1080/02648725.1984.10647790.
 50. Mukhtar H, Suliman SM, Shabbir A, Mumtaz MW, Rashid U, Rahimuddin SA. Evaluating the Potential of Oleaginous Yeasts as Feedstock for Biodiesel Production. *Protein & Peptide Letters.* 2018; 25, 1-7.
 51. Nigam PS, Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science.* 2011; 37(1): 52–68. DOI:10.1016/j.peccs.2010.01.003
 52. Otero RMA. Las Mieles Finales de Caña. Composición, propiedades y usos. 1ra Edición. La Habana: ICIDCA; 1997.
 53. Papanikolaou S, Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2011; 113: 1052–1073. DOI:10.1002/ejlt.201100015.
 54. Perez R. Molasses. *Tropical Feeds and Feeding Systems.* 1996; 233-239.
 55. Rakicka M, Lazar Z, Dulermo T, Fickers P, Nicaud J. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowialipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnol Biofuels.* 2015; 8:104 DOI 10.1186/s13068-015-0286-z
 56. Rashid N, Rehman URMS, Sadiq M, Mahmood T, Han JI. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2014; 40: 760–778. DOI:10.1016/j.rser.2014.07.104
 57. Ribeiro JE, Martini M, Andreucci A, Altomonte I, D'ascenzi C, Marzoni M, et al. Preliminary investigation of reuse of ricotta-cheese whey (scotta) as substrate for the growth of *Rhodotorula glutinis* intended for the production of carotenoids. *Journal of Agricultural and Biological Science.* 2017; 12(10), ISSN 1990-6145
 58. Ribeiro LA, Da Silva PP, Mata TM, Martins AA. Prospects of using microalgae for biofuels production: Results of a Delphi study. *Renewable Energy.* 2015; 75: 799–804. DOI:10.1016/j.renene.2014.10.065
-

Referencias Bibliográficas

59. Saenge C and Cheirsilp B. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*. 2011; 46: 210–218. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.08.009
 60. Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge TT, Bourtoom T. Efficient Concomitant Production of Lipids and Carotenoids by Oleaginous Red Yeast *Rhodotorula glutinis* Cultured in Palm Oil Mill Effluent and Application of Lipids for Biodiesel Production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2011; 16: 23-33. DOI: 10.1007/s12257-010-0083-2
 61. Sagia S, Sharma A, Singh S, Chaturvedi S, et al. Single cell oil production by a novel yeast *Trichosporon mycotoxinivorans* for complete and ecofriendly valorization of paddy straw. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2020; 44:60–68
 62. Schneider T, Graeff-Hönniger S, et al. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy*. 2013. DOI: 10.1016/j.energy.2012.12.02
 63. Schneider T, Graeff-Hönniger S, et al. Microbial lipids for biodiesel production and carotenoids as value added by-products – Screening of industrial wastewaters as suitable feedstock for oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis*. *Proceedings of the 20th European Biomass Conference and Exhibition, Milan*. 2012; 329-335.
 64. Schneider T, Graeff-Hönniger S, et al. Screening of Industrial Wastewaters as Feedstock for the Microbial Production of Oils for Biodiesel Production and High-Quality Pigments. *Journal of Combustion*. 2012; 9. DOI: 10.1155/2012/153410
 65. Schneider T, Rempp T, Graeff-Hönniger S, French WT, Hernandez R, et al. Utilization of soluble starch by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*. 2013; 3, 57-63.
 66. Schneider T. “Feasibility of microbial biodiesel and carotenoid production considering the potential of food processing wastewaters as low cost carbon sources using the example of red yeast *Rhodotorula glutinis*”. *Tesis Doctoral, Universidad de Hohenheim, Baden-Wurtemberg, Alemania*, 2013.
 67. Singh G, Sinha S, Kumar KK, Gaur NA, Bandyopadhyay KK, Paul D. High density cultivation of oleaginous yeast isolates in ‘mandi’ waste for enhanced lipid production using sugarcane molasses as feed. *Fuel*. 2020; 276 <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118073>
 68. Sitepu IR, Garay LA, Sestric R, Levin D, Block, D. E.; German JB, et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*. 2014; 32 (7):1336–60. DOI:10.1016/j.biotechadv.2014.08.003
 69. Solomon B. Biofuels and sustainability. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010; 1185: 119-134.
 70. Somogy M. Notes on sugar determination. *J Biol. Chem*. 1952; 159: 19-23.
 71. Sreeharsha RV, Mohan SV. Obscure yet Promising Oleaginous Yeasts for Fuel and Chemical Production. *Trends in Biotechnology*. 2020; <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.02.004>
 72. Taskin M, Ortucu S, Aydogan MN, Arslan NP. Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*. *Renewable Energy*. 2016; 99:198-204.
-

Referencias Bibliográficas

73. Vasconcelos B, Teixeira JC, Dragone G, Teixeira JA. Oleaginous yeasts for sustainable lipid production—from biodiesel to surf boards, a wide range of green applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019; 103:3651–3667
 74. Venemedia Comunicaciones. Definición de Combustible [Internet] [Consultado 10/5/2019] Disponible en: <https://conceptodefinicion.de/combustible/>
 75. Venemedia Comunicaciones. Definición de Combustibles Fósiles [Internet] [Consultado 10/5/2019] Disponible en: <https://conceptodefinicion.de/combustible-fósil/>
 76. Wang X, Ren H. Microbial oil production by *Rhodotorula glutinis* CICC 31643 using sugar cane molasses. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*. 2014; 6.
 77. WBA. Global Bioenergy Statistics. World Bioenergy Association. 2019; 5.
 78. Yeisson OM, Mosquera M, Welner J. Aprovechamiento del lactosuero y sus componentes como materia prima en la industria de alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2015; 13 (1): 81-91. ISSN 1692-7125.
 79. Yen HW, Yang YC, Yu YH. Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *J Biosci Bioeng*. 2012; 114: 453–456. DOI:10.1016/j.jbiosc.2012.04.022
 80. Zaghdoudi K, Ngomo O, Vanderesse R, Arnoux P. Extraction, Identification and Photo-Physical Characterization of Persimmon (*Diospyros kaki* L.) Carotenoids. *Foods*. 2017; 6 (4). DOI:10.3390/foods6010004 www.mdpi.com/journal/foods
-