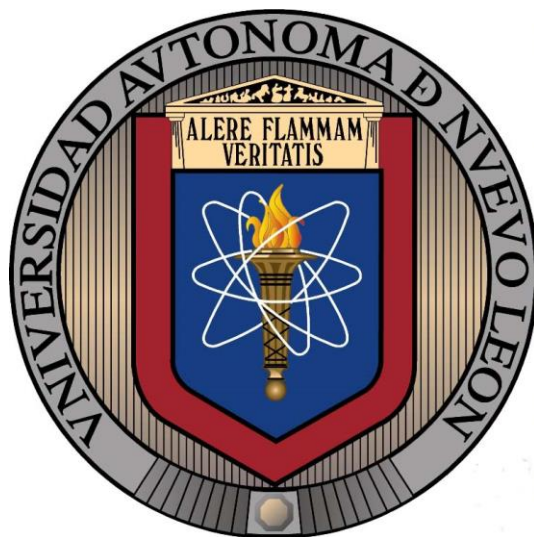


Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas



“Producción de carotenos, ácidos grasos y exopolisacárido en *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L a partir de nutrientes solubles en cáscara de plátano”.

Por

LBG Dagoberto Torres Alvarez

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN
CIENCIAS con Orientación en Procesos Sustentables

Noviembre, 2018

Producción de carotenos, ácidos grasos y exopolisacárido en *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L a partir de nutrientes solubles en cáscara de plátano

Aprobación de la tesis:

Dr. Felipe de Jesús Cerino Córdova
Presidente

Dr. José Ángel Loredo Medrano
Secretario

Dra. Mónica Alcalá Rodríguez
Vocal

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Sub-Directora de Posgrado

Producción de carotenos, ácidos grasos y exopolisacárido en *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L a partir de nutrientes solubles en cáscara de plátano

Revisión de la tesis:

Dr. José Rubén Morones Ramírez

Co asesor de Tesis

Dra. Mónica Alcalá Rodríguez

Comité Tutorial

Dr. José Ángel Loredo Medrano

Comité Tutorial

Dr. Héctor Javier Amézquita García

Comité Tutorial

Agradecimientos

Quiero agradecer todo el apoyo recibido durante el tiempo que duró mi maestría en ciencias. Sin su ayuda nada de esto hubiese sido posible, este logro también es el de ustedes.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Químicas por el uso de instalaciones y laboratorios, así como a todas las dependencias y personal de la facultad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las becas otorgadas y por confiar en mi para llevar a cabo mi maestría.

A mi asesor, co-asesor y comité tutorial, gracias por compartir su conocimiento; por todas sus correcciones, comentarios y aclaraciones.

A mis compañeros y profesores de procesos sustentables, a pesar de yo no tener los mejores conocimientos de ingeniería, gracias a su ayuda, comprensión y paciencia logré entender de mejor manera esta área.

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio durante estos 2 años y medio, por lograr que el tiempo en el laboratorio se fuera volando, entre pláticas, trabajo, tacos, pizza, café, discusiones y chistes.

A los estudiantes de verano y servicio que me ayudaron en todos mis experimentos, a Erwin, Ariel y Stephani, espero que la experiencia les haya servido en su crecimiento académico.

A todos mis amigos de carrera: Luis, Aarón, Adrián, Alan, Alex, Carlos, Cedillo, David, Gera, Iván y Waldir, por todas esas salidas y momentos que ayudaban a despejar la mente y descansar del trabajo.

A mis amigas: Ingrid, Caro, Vero, Karen y Vale, gracias por todo su apoyo, sus palabras de aliento, sus consejos y especialmente su tiempo en momentos de estrés.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, gracias por siempre creer en mí, por todo su apoyo y por ser mi principal motor de vida.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi familia

Mis padres: Ma. Socorro Alvarez Vega y Dagoberto Torres Castro

Todo lo que he logrado hasta este momento es fruto de su apoyo y cariño. Son mi inspiración en cada decisión que tomo en la vida.

A mis hermanos: Luis Eduardo Torres Alvarez y Daniel Alejandro Torres Alvarez.

Luis Eduardo, gracias por ser el mejor ejemplo de hermano, por marcar el camino y siempre preocuparte por mí. Alex, gracias por tantos momentos de risa y por compartir conmigo tu interés en las ciencias.

Con todo mi amor y cariño, su hijo y hermano Dagoberto Torres Alvarez.

RESUMEN

Dagoberto Torres Alvarez

Fecha de Graduación: Diciembre 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Procesos
Sustentables

Título del estudio: Producción de carotenos, ácidos grasos y exopolisacárido en
Rhodotorula mucilaginosa UANL-001L a partir de nutrientes solubles en cáscara de
plátano.

Área de estudio: Sustratos de bajo costo para el crecimiento de microorganismos no
convencionales

Número de páginas: 65

Actualmente la síntesis química de un gran número de compuestos carece de sustentabilidad. Diversas alternativas de síntesis han surgido con el fin de obtener procesos más sustentables, una de ellas es el uso de microorganismos capaces de metabolizar distintos sustratos en productos de alto valor agregado. Sin embargo, los altos costos de producción, debido a la fuente de carbono y purificación de compuestos, han frenado su implementación a escala industrial.

En el presente trabajo de investigación se evaluó el potencial de un extracto de cáscara de plátano como fuente de carbono para el crecimiento de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L, un microorganismo no convencional.

Se estandarizó el método de preparación del extracto de cáscara de plátano y se midió la cantidad de azúcares reductores presentes. De igual forma, se evaluó la capacidad de crecimiento de la levadura, así como la producción de ácidos grasos, carotenos y un exopolisacárido, con el fin

de conocer el efecto que tenían los componentes del extracto sobre el metabolismo de *R. mucilaginosa*. Finalmente, se caracterizó el exopolisacárido permitiendo conocer los azúcares que lo componen y su porcentaje.

El conocimiento resultante de este trabajo otorga una alternativa sustentable y de bajo costo para el crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL-001L, así como la caracterización de un nuevo exopolisacárido.

Índice

1. Introducción.....	4
2. Antecedentes.....	9
2.1. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	9
2.2. Carotenos.....	10
2.3. Ácidos Grasos.....	12
2.4. Exopolisacárido.....	13
2.5. Residuos agroindustriales y cáscara de plátano.....	14
3. Aportación Científica.....	17
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos y Metas.....	18
5.1. Objetivos específicos.....	18
5.2. Objetivos particulares.....	18
5.3. Metas.....	18
6. Material y Métodos.....	19
6.1. Materiales y equipos utilizados.....	19
6.2. Diseño experimental y análisis estadístico.....	20
6.3. Cuantificación de azúcares reductores.....	21
6.4. Crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i>	21
6.5. Preparación de extracto de cáscara de plátano.....	22
6.6. Extracción de carotenos.....	23
6.7. Extracción de ácidos grasos.....	24
6.8. Extracción del EPS.....	25
6.9. Purificación y caracterización del EPS.....	26
6.10. Manejo y disposición de residuos.....	27

7. Resultados.....	28
7.1. Síntesis de extracto de cáscara de plátano.....	28
7.2. Crecimiento <i>R. mucilaginosa</i> en medio YM.....	29
7.3. Crecimiento <i>R. mucilaginosa</i> en extracto de cáscara de plátano.....	30
7.4a. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> UANL-001L.....	34
7.4b. Efecto de los pigmentos solubles en el extracto sobre el crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> UANL-001L.....	35
7.5. Producción de carotenos, ácidos Grasos y EPS.....	36
7.6. Purificación y caracterización del EPS.....	39
8. Discusión de Resultados.....	42
8.1. Cinética de Crecimiento y consumo de azúcares de <i>R. mucilaginosa</i> UANL-001L en medio YM.....	42
8.2. Síntesis de extracto de cáscara de plátano, cinética de crecimiento y consumo de azúcares por <i>R. mucilaginosa</i>	43
8.3. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i>	44
8.4. Efecto de pigmentos de la cáscara de plátano sobre el crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i>	45
8.5. Producción de carotenos por <i>R. mucilaginosa</i> en medio YM y extracto de cáscara de plátano.....	47
8.6. Producción de ácidos grasos por <i>R. mucilaginosa</i> en medio YM y extracto de cáscara de plátano.....	49
8.7. Producción de EPS por <i>R. mucilaginosa</i> en medio YM y extracto de cáscara de plátano.....	50

8.8. Purificación y caracterización del EPS.....	52
9. Conclusión.....	53
10. Perspectivas.....	54
11. Material Suplementario.....	55
10. Bibliografía Consultada.....	58

1. Introducción

La producción industrial de un gran número de compuestos carece de sustentabilidad en el proceso total, el cual, engloba desde la obtención de la materia prima hasta los procesos finales para su entrega o venta. Dentro de este proceso la etapa que tiene un mayor efecto sobre la sustentabilidad, es la síntesis del compuesto. En la síntesis de productos deseados suelen crearse, de manera simultánea, compuestos secundarios resultado de la reacción química. Al no ser estos compuestos de importancia económica son desechados generando contaminación al ambiente.

Actualmente existen 3 tipos principales de producción de compuestos químicos o biológicos. Estos son la síntesis química, la extracción y la síntesis microbiana.

La síntesis química es el método de producción más utilizado a nivel mundial y consiste en la reacción de dos o más compuestos para la obtención de un producto. En este proceso se utilizan elementos que benefician la reacción, como catalizadores o enzimas, pero que al mismo tiempo crean un compuesto secundario. Estos compuestos en la mayoría de los casos son residuos los cuales pueden entorpecer los procesos de purificación o en el peor de los casos ser tóxicos para la salud humana o para el ambiente, siendo necesario su confinamiento y neutralización.

Otro de los problemas de la síntesis química es la producción de moléculas complejas producto de una serie de 2 o más reacciones. El control y estandarización de estos procesos se vuelve más complicado a medida que incrementan los pasos de la reacción principalmente por la acumulación de pérdidas en el rendimiento, además de la necesidad de un reactor o quimiostato para cada una de las reacciones, incrementando los costos de equipo, esterilización, reactivos y purificación de los productos.

La extracción es el proceso de obtención de un compuesto a partir de una materia prima, como es el caso de la obtención de azúcar a partir de la caña; o de un área específica del ecosistema como la obtención de sal de mar o la minería. Generalmente para la extracción de los compuestos se utilizan métodos químicos o físicos para su separación.

A pesar de que gran parte de la materia prima proviene de recursos renovables, la sobreexplotación a causado una constante disminución de recursos. Otro de los problemas a consecuencia del cambio climático, es la variación en las temperaturas y condiciones climatológicas en todo el mundo, estos cambios han ocasionado un desequilibrio en las características física y químicas de suelos y mares haciendo complicado e incluso imposible el crecimiento de plantas, utilizadas como materia prima, en zonas donde normalmente eran crecidas y cultivadas sin dificultad.

Debido a estos problemas, la obtención de productos a partir de la extracción se ha vuelto insuficiente para cubrir las demandas del mercado, por lo que es necesario encontrar alternativas que permitan reducir el uso de materia prima, reactivos, espacio y principalmente que no sean tan susceptibles a cambios climatológicos.

La síntesis microbiana consiste en la generación de un compuesto como producto del metabolismo del microorganismo el cual puede ser una bacteria, levadura, hongo o microalga. Para la obtención de un producto deseado y crecimiento del microorganismo se necesitan de condiciones específicas como lo son fuente de carbono, fuente de nitrógeno, temperatura, potencial de hidrógeno (pH), etc.; las cantidades de estos compuestos varía entre especies de microorganismos.

La búsqueda de una alternativa a la síntesis química y la extracción dio lugar al uso de microorganismos capaces de producir compuestos de interés como parte de su

metabolismo. Sin embargo, los rendimientos de producción no siempre son suficientes para cubrir la demanda, o los recursos necesarios para su crecimiento tienen un costo elevado. Un ejemplo, se presenta en la producción de carotenos a partir de levaduras cuyo elevado costo de producción ha frenado su implementación a gran escala. Esta limitante se debe al alto costo de la fuente de carbono al igual que rendimientos menores comparados a los obtenidos por síntesis química. (Cheng & Yang, 2016).

Actualmente cerca del 10% de la producción global de carotenos se lleva a cabo por síntesis microbiana mediante bacterias genéticamente modificadas del género *Sphingomonas* y a partir de microalgas (Silva, Cabral, & Keulen, 2004), un 5% de la producción se lleva a cabo mediante su extracción en algas marinas del género *Dunaliella* (Garc, Manzano, Florencio, & Guerrero, 2005) mientras que el 85% restante de la producción de carotenos se lleva a cabo mediante síntesis química por medio de la reacción de Wittig o la reacción de Grignard, reacciones cuyo producto secundario es el óxido de Trifenilfosfina, compuesto dañino para la salud humana y el medio ambiente (Banno, Hayakawa, & Umeno, 2002; Greenwald, R., Chaykovsky, M., & Corey, 1962; Palmer et al., 2010).

Los energéticos derivados de petróleo como la gasolina y el diésel son el resultado de una serie de procesos químicos contaminantes. Además de la producción de compuestos secundarios tóxicos que son expulsados al ambiente.

Una alternativa sustentable a los energéticos actuales son los compuestos de origen biológico con alto potencial calorífico, como el biodiesel y el bioetanol. Estos compuestos pertenecen al grupo de los bioenergéticos debido a que estos o sus precursores provienen del metabolismo de microorganismos como microalgas,

bacterias y levaduras (Frengova & Beshkova, 2009; Sun & Cheng, 2002). En el caso del biodiesel, el principal organismo productor son las microalgas que solo requieren de un porcentaje de agua dulce, oxígeno, luz solar y sales como fuente de nitrógeno, fósforo y azufre para su crecimiento, sin embargo, esta poca necesidad de nutrientes también causa un lento crecimiento necesitando grandes lotes para cumplir las demandas del mercado que a su vez requieren de una gran porción área (Dong et al., 2015). Como alternativa a las microalgas se ha propuesto el uso de microorganismos oleaginosos, en otras palabras, organismos capaces de producir una gran cantidad de lípidos en forma de aceite principalmente levaduras con rendimientos similares a los reportados en algunas microalgas (Li, Kent, & Bai, 2007).

A pesar de que la síntesis microbiana tiene como ventaja la poca o nula producción de contaminantes tóxicos en bajas concentraciones, existen desventajas que evitan su aplicación a escala industrial. Una de las principales desventajas es el alto costo de la fuente de carbono necesaria para el crecimiento del microorganismo. Con el fin de solucionar esta problemática se ha propuesto el uso de sustratos de bajo costo como cáscara de fruta, desechos de cultivos y de procesos industriales como las melazas, efluentes de bebidas energéticas o suero de leche (Aksu & Eren, 2007; Cheng & Yang, 2016). Se estima que anualmente se producen cerca de 1.5 mil millones de toneladas de alimento al año, de estos, 750 millones de toneladas se desechan como residuos al ambiente, es decir, el 50% de todo lo que se produce termina principalmente confinado en rellenos sanitarios (Parfitt, Barthel & Macnaughton, 2010). Esta estadística ha motivado la revalorización de los residuos, siendo uno de las principales propuestas las biorrefinerías, encargadas de producir compuestos de valor agregado utilizando como fuente de carbono desechos y actuando como mediadores una variedad de microorganismos.

El objetivo principal de este estudio es evaluar la capacidad de la cáscara de plátano como sustrato para el crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL 001L y la producción de carotenos, ácidos grasos y EPS. Obteniendo una opción sustentable y de bajo costo para la producción de estos metabolitos.

2. Antecedentes

2.1. *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L

La especie *Rhodotorula mucilaginosa* es una levadura oleaginoso y pigmentada clasificada como aerobia facultativa, por lo que puede crecer en ambientes con alta cantidad de oxígeno como en aquellos con baja disponibilidad de oxígeno, como por ejemplo ríos y lagos. El género *Rhodotorula* se caracteriza por su coloración rosa-anaranjada a consecuencia de la producción de tetraterpenoides, principalmente carotenos.

Otra de las características notorias en este microorganismo es un brillo característico que rodea a las colonias, causado principalmente por una alta producción de lípidos siendo los más abundantes los ácidos grasos.

En este estudio la cepa a utilizar es UANL-001L aislada de la región norte de México previamente caracterizado, con una temperatura óptima de 30°C, pH de 5 y un crecimiento máximo alcanzado después de 96 horas de ser inoculada en medio YM. (Garza, Perez, & Rodriguez, 2016).

Estudios extensivos han demostrado que en un medio óptimo la especie *R. mucilaginosa* alcanza su crecimiento máximo después de 72 horas, sin embargo, en medios donde no todos los compuestos se encuentran disponible el crecimiento máximo puede alcanzarse hasta 144 horas después de ser inoculada.

Compuestos secundarios como los carotenos incrementan su producción una vez que se ha alcanzado este crecimiento máximo o bien, una vez que la levadura ha entrado en fase estacionaria, por lo que es recomendable que la extracción de estos

compuestos se lleve a cabo 24 o 48 horas después de alcanzada la fase estacionaria (Tkáčová, Furdíková, Klemková, Ďurčanská, & Čertík, 2015).

A pesar de que el crecimiento óptimo de la levadura ocurre a 30°C y a un pH de 5, las condiciones para la producción de metabolitos no siempre concuerdan con la del crecimiento debido a que en condiciones de estrés, las levaduras producen ciertos compuestos en mayor cantidad como pigmentos, aceites o polímeros adquiriendo resistencia a ambientes (Aksu, Z. Tugba Eren, 2005; Teresa et al., 2016; Xue, Miao, Zhang, Luo, & Tan, 2008).

2.2. Carotenos

Los carotenoides (carotenos) son tetraterpenoides que se encuentran de manera natural en el ambiente, existen más de 600 moléculas con distintas funciones entre las cuales se encuentran la absorción de luz ultravioleta, potencial reductor, precursores de vitamina A e incluso para la atracción de animales, como es el caso de las plantas con el fin de promover su polinización (Schroeder, 1995).

Estos metabolitos pigmentados se dividen en dos conjuntos principales, carotenos y xantofilas (Libkind & Van Broock, 2006). Su morfología se caracteriza por tener una cadena de carbono unidos por doble enlace y uno o dos anillos aromáticos en sus extremos, estructuras que otorgan su potencial antioxidante y su coloración respectivamente (Packer, Hiramatsu, and Yoshiwaka 1999). La variabilidad de moléculas de este tipo está dada por el número de anillos y el tamaño de la cadena de carbono, además de los grupos funcionales presentes (Figura 1).

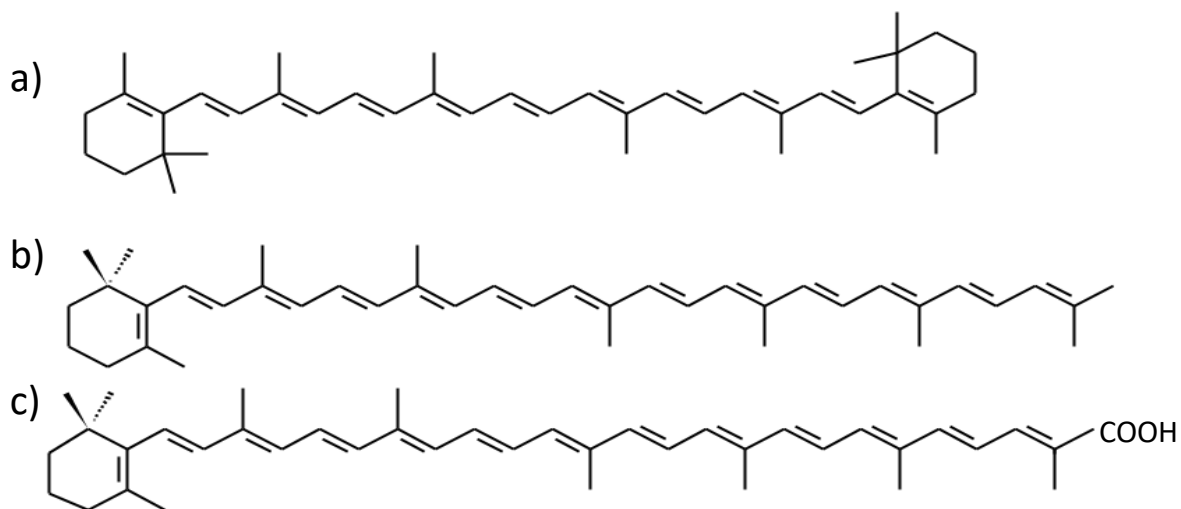


Fig. 1: Estructura de a) beta-caroteno, b) toruleno, c) torularodin.

La obtención natural de estos pigmentos se lleva a cabo de la extracción de plantas como zafrán y paprika, sin embargo, la disminución de materia prima debido a cambios estacionales y el alto costo de la síntesis de compuestos similares ha ocasionado una creciente demanda por carotenoides obtenidos ya sea de manera natural o sintética (Maldonado, Rodríguez-Amaya, & Scamparini, 2008).

Los carotenos de mayor importancia comercial son β -Caroteno, debido a su uso como aditivos alimenticios para consumo humano o animal, pigmentos en la creación de cosméticos, aditivo de fármacos, antioxidante entre otros usos. Mientras que el toruleno y torularodin, carotenoides también producidos por *R. mucilaginoso*, contienen una alta capacidad antioxidante aún no explotada en el mercado (Tkáčová et al., 2015).

La síntesis de estos compuestos mediante biotecnología consiste en su extracción de microorganismos altamente productores, como es el caso de los géneros *Rhodotorula* y *Sporobolomyces* (Vachali, Bhosale & Bernstein, 2012).

Actualmente existe un gran número de estudios dirigidos a optimización de producción de carotenos en *Rhodotorula* mediante la búsqueda de condiciones óptimas en ensayos separados (Cheng & Yang, 2016; Libkind & Van Broock, 2006; Maldonade et al., 2008; Tkáčová et al., 2015). Son varios las especies de *Rhodotorula* utilizados, entre las que se encuentran *R. glutinis*, *R. toruloides*, *R. mucilaginosa* entre otras con rendimientos y tipos de carotenos similares. En comparación a otros géneros de levaduras como *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* es capaz de producir 30% más beta-caroteno, el cual es el caroteno con mayor importancia en el mercado de los pigmentos.

2.3. Ácidos Grasos

Los ácidos grasos son una clase de lípidos que se caracterizan por una estructura anfipática compuesta de una parte hidrofóbica y una hidrofílica. La parte hidrofóbica consiste en una o varias cadenas de carbono. La clasificación de los ácidos grasos depende en el tamaño de su cadena de carbono y del número de dobles enlaces en su estructura, esta característica se denomina grado de saturación.

Los ácidos grasos se componen de un grupo carboxilo (-COOH) y una cadena de carbono de distinto tamaño. Su importancia comercial reside en su uso potencial como precursor de biodiesel mediante la esterificación de sus grupos carboxilo por medio de un alcohol para la formación de un álcali éster, la molécula principal en el biodiesel (Dehkhoda & Ellis, 2013).

Los lípidos como los ácidos grasos se acumulan en diferentes lugares dentro de las células dependiendo de la función específica que llevan a cabo. Debido a su característica anfipática los ácidos grasos conforman la membrana celular de la bacteria, esta peculiaridad le permite formar una bicapa, unida por sus partes hidrofóbicas, que protege al microorganismo de agentes externos dañinos y al mismo tiempo permite controlar el flujo de entrada y salida de una variedad de moléculas y iones (McMahon & Gallop, 2005).

Los ácidos grasos promueven la síntesis de biodiesel y producen una menor cantidad de residuos que pueden complicar la fase de recuperación y purificación, caso contrario ocurre con los lípidos que contienen azúcares, proteínas o moléculas fosforiladas que inhiben los procesos catalíticos necesarios para la obtención de biodiesel (Kubi & Horá, 2011).

Entre los microorganismos capaces de producir una gran cantidad de ácidos grasos se encuentra *Rhodotorula mucilaginosa* que puede llegar a tener un peso seco conformado hasta por 70% de lípidos, del cual 85% son ácidos grasos (Dönmez, 2010).

2.4. Exopolisacáridos.

Los exopolisacáridos (EPS's) son carbohidratos formados principalmente por cadenas largas de glucosa, manosa, lactosa o fructosa (Neu, Flemming & Wingender, 1999). Una gran parte de los microorganismos son capaces de producir estos compuestos con el fin de resistir condiciones de estrés como lo son: alta salinidad, antibióticos, bajas o altas temperaturas, metales pesados, otros microorganismos, etc. (Poli, Anzelmo & Nicolaus, 2010).

A finales del último siglo el estudio de los exopolisacáridos se extendió ampliamente e incluso algunos ya son aplicados en la industria alimenticia como aditivos alimenticios o en la industria minera y petroquímica como agentes viscosos en la perforación de pozos (Flores, 1998; Shah & Ashtaputre, 1999). En los últimos años se han encontrado un mayor número de aplicaciones a los exopolisacáridos como agentes antimicrobianos, antifúngicos, antitumorales, potencial reductor, biosurfactantes, entre otras (Wang, Li, Rui & Chen, 2014; Liang, Wu, Cheng, Chen, Wang, Wang & Wang, 2014; Patel, Patel & Gupte, 2014).

Estudios previos del grupo de estudio han logrado identificar, purificar y caracterizar un exopolisacárido (EPS) producido por *R. mucilaginosa* UANL-001L el cual presenta actividad antimicrobiana, sin embargo y por lo mencionado antes, la purificación y cuantificación del exopolisacárido producido en un medio diferente al YM es de sumo interés con el fin de estudiar sus propiedades y conocer si presenta una actividad similar a su contraparte producida en YM.

Mecanismos de producción de EPS

2.5. Residuos agroindustriales y cáscara de plátano.

Los residuos agroindustriales son los desechos producidos por la síntesis de otros compuestos de mayor valor comercial. Estos sobrantes de procesos agroindustriales son en su mayoría del tipo lignocelulósico como el bagazo de caña, cáscara de frutas, tallos secos, etc. (Olofsson, Bertilsson, & Lidén, 2008). Los compuestos lignocelulósicos están formados principalmente por 3 biopolímeros: celulosa, glucosa y lignina. La celulosa consta de cadenas de d-glucosa unidas por enlace beta 1 → 4 fácilmente hidrolizable; la hemicelulosa es un heteropolímero formado por distintos

azúcares como xilosa, manosa, galactosa y arabinosa el cual es resistente a los procesos de hidrólisis; finalmente la lignina es el más complejo de los 3 componentes, conformado por una red de fenoles que protegen la celulosa y la hemicelulosa (Sun & Cheng, 2002).

Además de la lignocelulosa los residuos agroindustriales contienen compuestos solubles como residuos de azúcar, proteína y aceites. Mediante tratamientos físicos de calor estos compuestos solubles pueden desprenderse del residuo y disolverse en un medio polar como el agua.

Esta reportado ampliamente en la literatura el uso de medios basados en desechos agroindustriales para el crecimiento de *Rhodotorula*; Cheng y Yang (2016) reportaron el uso de melazas, producto de la industria azucarera, para el crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* obteniendo resultados favorables. De igual forma Galafassi et al. (2012) reportaron el crecimiento de *Rhodotorula graminis* y la producción de lípidos con azúcares presentes en hemicelulosa como xilosa y arabinosa.

Estudios realizados en el laboratorio con medio de crecimiento a partir de cáscara de plátano demostraron que *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L es capaz de crecer y dividirse aprovechando las moléculas solubles presentes en la cáscara de plátano, principalmente proteínas, azúcares y iones que le permiten producir energía, una fuente de aminoácidos y transportar moléculas a través de la membrana, respectivamente. Sin embargo, su capacidad de crecimiento, así como la producción de metabolitos no ha sido evaluada.

Una de las principales razones para el uso de cáscara de plátano como fuente de nutrientes para elaborar el medio es la gran cantidad de micro y macronutrientes presentes en la misma, análisis previos de caracterización de compuestos en cáscara

de plátano han demostrado que esta contiene alrededor de 5 veces más potasio en la cáscara que en la pulpa, mientras que la cantidad de calcio es 10 veces mayor en la cáscara (Davey, Stals, Tomekpe, Lusty, Markham & Keulemans, 2007).

Se ha identificado la presencia de aminoácidos en cantidades menores a 100 miligramos por gramo de cáscara, así como grandes cantidades de carbohidratos, siendo el almidón la molécula principal correspondiente al 40% del peso seco en el primer día de maduración, sin embargo, después de 7 días el almidón es degradado convirtiéndose en glucosa y fructosa (Emaga, Herinavalona, Wathelet, Tchango & Paquot, 2006).

El objetivo de este trabajo es utilizar la cáscara de plátano como materia prima en la elaboración de un extracto en el cual sea posible el crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L, además se evaluará la producción de metabolitos de interés comercial como lo son los carotenos y los ácidos grasos junto con un exopolisacárido que presenta un alto potencial comercial. Los resultados obtenidos permitirán obtener una alternativa a la revalorización de desechos, al hacer posible la obtención de metabolitos de alto interés comercial mediante la síntesis microbiológica partiendo de desechos del tipo lignocelulósico.

3. Aportación Científica

Los resultados obtenidos permitirán conocer el comportamiento de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L en un extracto sintetizado a partir de cáscara de plátano, así como la producción de carotenos, ácidos grasos y un exopolisacárido. De la misma manera, al ser comparados con los metabolitos producidos en un medio sintético, se conocerá la viabilidad del uso de la cáscara de plátano como sustituto del medio sintético.

4. Hipótesis

Rhodotorula mucilaginosa es capaz de producir carotenos, ácidos grasos, biomasa y un exopolisacárido utilizando como fuente de nutrientes un extracto de cáscara de plátano y obteniendo rendimientos similares o mayores a los obtenidos utilizando un medio sintético.

5. Objetivos y Metas

5.1. Objetivo general

Producir y evaluar los carotenos, ácidos grasos y exopolisacáridos en *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L utilizando un extracto sintetizado a partir de cáscara de plátano obteniendo rendimientos similares o mayores a los reportados en medios sintéticos.

5.2. Objetivos particulares

- Cuantificar los carotenos, ácidos grasos producidos por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L en medio YM.
- Encontrar las condiciones necesarias para el crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio de extracto de cáscara de plátano.
- Cuantificar carotenos, ácidos grasos y EPS producidos por *R. mucilaginosa* en medio de extracto de cáscara de plátano.
- Comparar la producción de carotenos, ácidos grasos y EPS en medio YM como en el extracto de cáscara de plátano.
- Caracterizar el exopolisacárido, así como comparar sus propiedades con el producido en medio YM.

5.3. Metas

- Entregar la tesis en los tiempos establecidos.
- Presentar los avances obtenidos en un congreso mediante un poster y publicar un artículo sobre el trabajo de investigación.

6. Material y Métodos

6.1. Materiales y equipo utilizado

Material

- Micropipetas con la siguiente capacidad 2-20, 20-200 y 100-1000 μL .
- Puntillas para micropipeta marca Eppendorf.
- Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL marca Neptune.
- Matraces Erlenmeyer 125, 250 y 500 mL marca Pyrex.
- Tubos para centrífuga 15 y 50 mL marca Corning.
- Placas de 96 pocillos marca Corning.
- Celdillas para espectrofotómetro marca Brand.
- Celdas de electroporación marca Eppendorf.

Equipo

- Incubadora SHEL-LAB modelo 1575.
- Incubadora SHEL-LAB modelo SI-6.
- Centrífuga ThermoElectron modelo Centrac-034.
- Vortex Lab-Line modelo 1195.
- Liofilizadora Labconco modelo Freezone-6.
- Espectrofotómetro Optizen 2120 UV Plus.
- Lector de placas Multiskan GO (Thermo Scientific).
- Cámara de electroforesis y fuente de poder Labnet.
- TermoMixer C Eppendor.
- Concentrador modelo Integrated SpeedVac (ThermoFischer).

6.2. Diseño experimental y análisis estadístico

Con el fin de conocer las condiciones que permitan la mayor obtención de azúcares reductores a partir de la cáscara de plátano se realizó un diseño en el que se evaluaban distintos niveles tanto de temperatura como tiempo de calentamiento de la cáscara de plátano para la obtención del extracto. (Tabla 1)

Tabla 1. Diseño experimental para la obtención de azúcares reductores.

Temperatura: -1 (70°C), 0 (80°C), 1 (90°C).

Tiempo de Calentamiento: -1 (5 min), 0 (10 min), 1 (15 min).

Número de Ensayo	Temperatura	Tiempo de Calentamiento
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	1	-1
5	-1	1
6	-1	-1
7	1	1

Las cinéticas de crecimiento y la extracción de metabolitos se realizaron por triplicado.

Para los rendimientos de carotenos, lípidos y exopolisacárido se realizó una prueba ANOVA de un factor entre los distintos medios, seguido por un análisis post hoc de Dunnet con un intervalo de confianza del 95 %.

6.3. Cuantificación de azúcares reductores

Para la cuantificación de azúcares reductores se utilizó el método colorimétrico DNS (Miller, 1959) el cual se fundamenta en la interacción de los grupos aldehído y cetona en los extremos de los azúcares reductores con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (coloración amarilla) para formar el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico que tiene una coloración rojiza. La curva de calibración se obtuvo utilizando de 0.1 a 1 mg/L de dextrosa. La cuantificación de azúcares de la muestra se realizó en tubos eppendorf de 1.5 mL utilizando 200 μ L de muestra pura o diluida y 200 μ L de DNS. Posteriormente se calentó a 90°C por 5 minutos y se dejó reposar otros 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregó 1 mL de agua fría y se leyó absorbancia a 540 nm utilizando como blanco agua con DNS.

6.4. Crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL-001L.

La cepa *R. mucilaginosa* se creció primero en medio YM (Extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, peptona 5 g/L y dextrosa 10 g/L) por un tiempo de 12 horas y luego se inocularon 500 μ L del primer cultivo en 150 mL de medio YM nuevo o en extracto de cáscara de plátano. Posteriormente se tomó una muestra al menos cada 24 horas y se obtuvo la biomasa o densidad óptica del cultivo, así como la cuantificación de los azúcares reductores. Una vez que el cultivo entró en fase estacionaria se tomaron 3 muestras de cultivo, se centrifugó y se separó el sobrenadante y la biomasa con el fin de cuantificar biomasa final, carotenos, ácidos grasos y exopolisacárido (Figura 2).

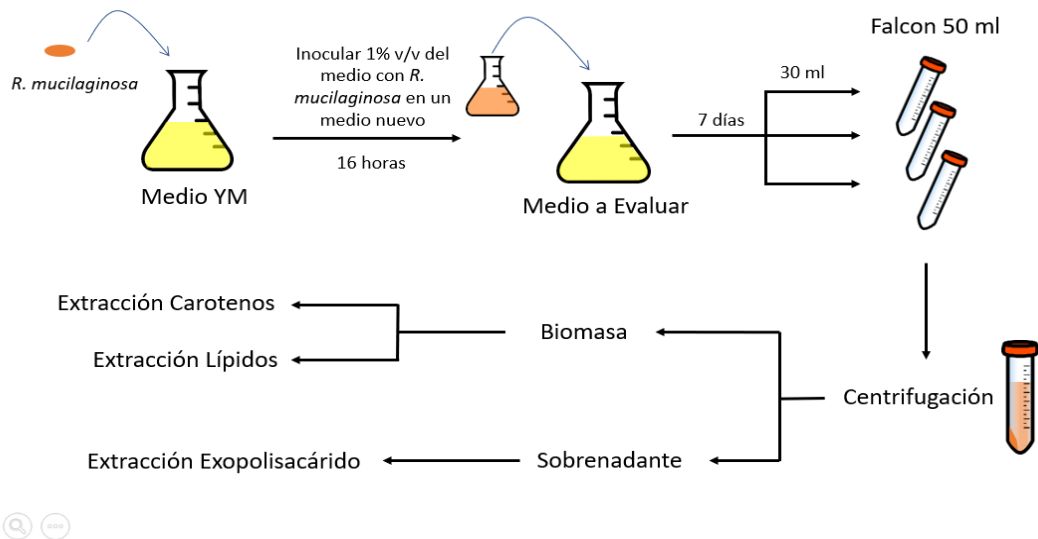
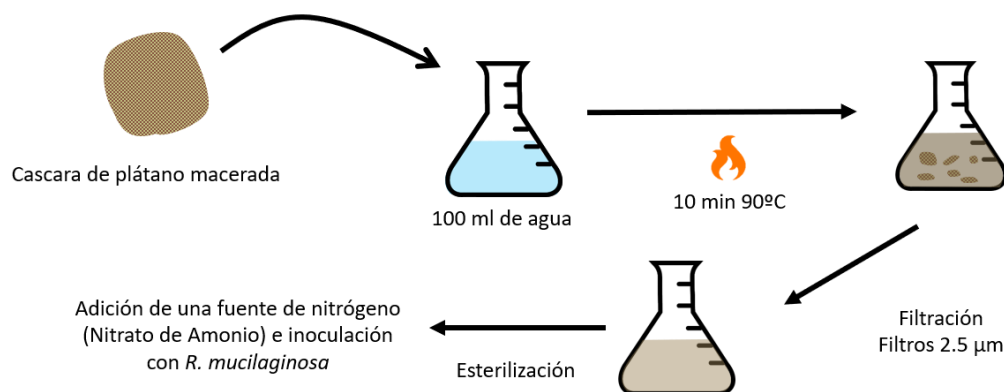


Fig. 2. Metodología seguida para la inoculación de *R. mucilaginosa* y tratamientos previos a la extracción de metabolitos.

6.5. Preparación de extracto de cáscara de plátano.

Para el medio de extracto de plátano se pesó la cáscara macerada húmeda, a continuación, se agregaron 100 mL de agua al matraz junto con la cáscara macerada para luego ser calentada a la temperatura e intervalo de tiempo con los mayores rendimientos obtenidos a partir del diseño experimental. El extracto fue filtrado con embudo a través de filtros de 2.5 μm grado 60, 2 veces para posteriormente ser esterilizado en autoclave. Finalmente se agregó nitrato de amonio como fuente de nitrógeno (Figura 3).



6.6. Extracción de carotenos en la cepa de *R. mucilaginosa* UANL-001L.

A partir de una muestra de 20 mL de *R. mucilaginosa* en tubo falcon se realizó la separación de la biomasa y el sobrenadante mediante centrifugación. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y la biomasa fue lavada tres veces con agua desionizada.

Fig. 3: Metodología a seguir para la obtención de medio de crecimiento a partir de cáscara de plátano. Se

resuspendió el pellet celular en acetona y se rompieron las células por método mecánico con el fin de obtener los carotenos intracelulares. Se realizó una segunda centrifugación para coleccionar el sobrenadante. El proceso de lavado con acetona y la centrifugación fue repetido hasta que el pellet perdió su color. Finalmente se obtuvo la concentración de carotenos recolectados mediante la lectura de absorbancia a 455 nm (Cheng & Yang, 2016) (Figura 4).

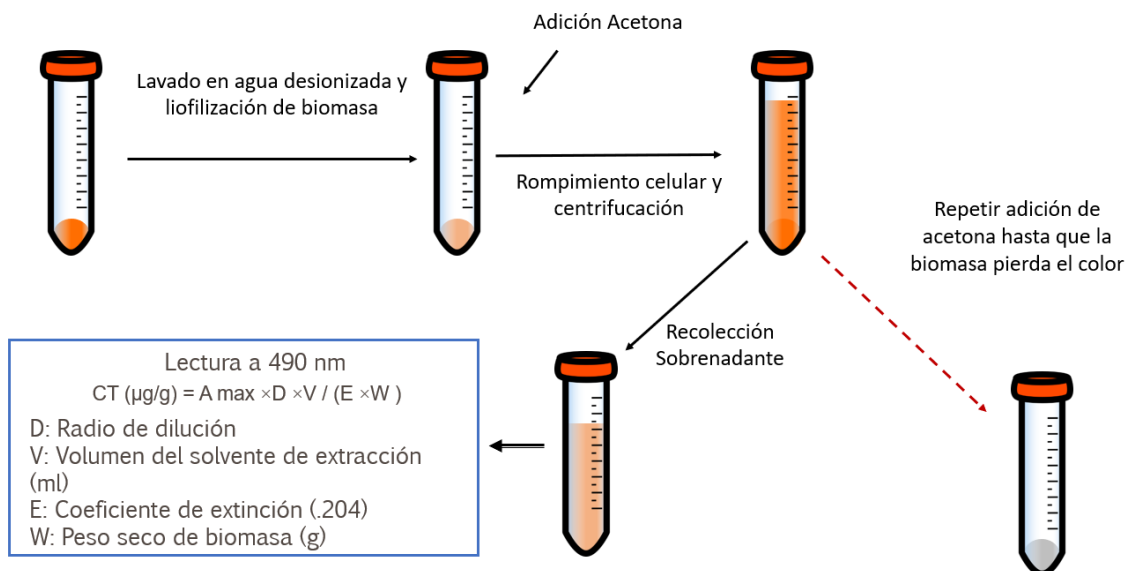


Fig. 4. Metodología para la extracción y cuantificación de carotenos totales.

6.7. Extracción de lípidos en la cepa *R. mucilaginosa*.

La extracción de lípidos se llevó a cabo a partir del método descrito por Folch (1957) el cual consiste en la centrifugación de una muestra de cultivo de 15 mL, posteriormente el sobrenadante fue eliminado y la biomasa secada. A la biomasa se le agregaron 12 mL de metanol-cloroformo 1:2. Se realizó el rompimiento del paquete celular por agitación mecánica y **enseguida** se agregaron 4 mL de solución NaCl al 10%. Veinte minutos después se formó una bifase líquida y se pasó la fase pesada a un rotovapor para purificar los lípidos. Finalmente se pesaron los lípidos una vez que fueron purificados (Figura 5).

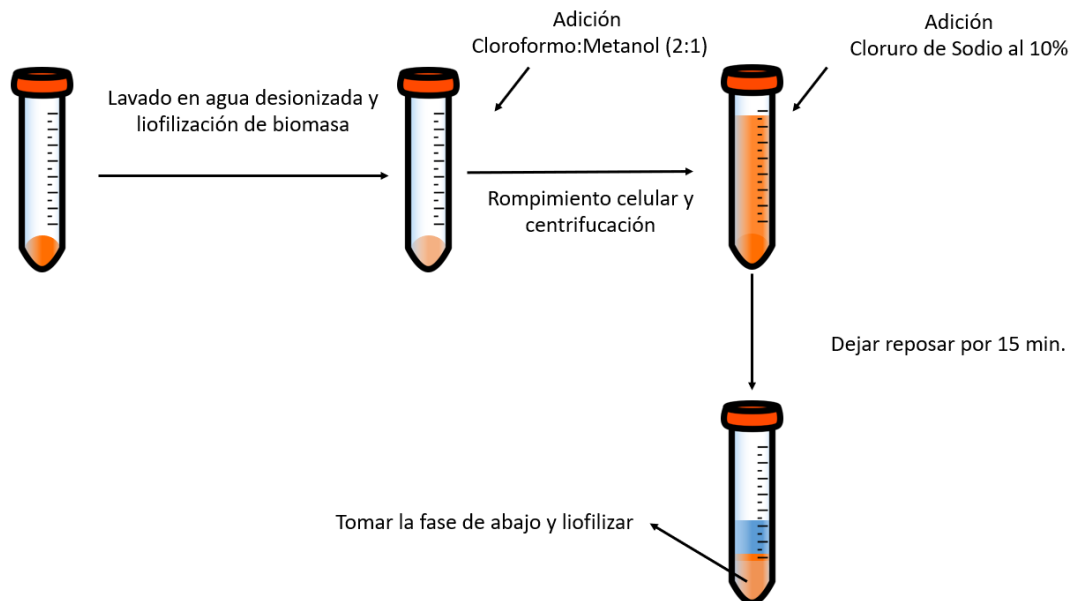


Fig.5. Metodología para la extracción y cuantificación de lípidos precursores de biodiesel.

6.8. Extracción del EPS.

Para la extracción del exopolisacárido se utilizó el sobrenadante después de que la muestra fue centrifugada. La metodología por seguir fue la utilizada por Vazquez-Rodriguez, et al. (2017) que consiste en la filtración del sobrenadante con filtros primero de 2 micras y después de 0.2 micras. Una vez que la mezcla fue filtrada se pasó a un tubo falcon de 50 mL y se agregó el doble del volumen de etanol y se dejó 12 horas a -20 grados. Después de las 12 horas la muestra fue centrifugada a 12,000 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante quedándose con el pellet, este fue lavado 2 veces con etanol al 70% y centrifugado a 12,000 rpm por 10 minutos, para finalmente desechar el sobrenadante con el fin de eliminar compuesto adheridos al EPS como proteínas, péptidos o desechos celulares. Por último, el exopolisacárido fue liofilizado y pesado (Figura 6).

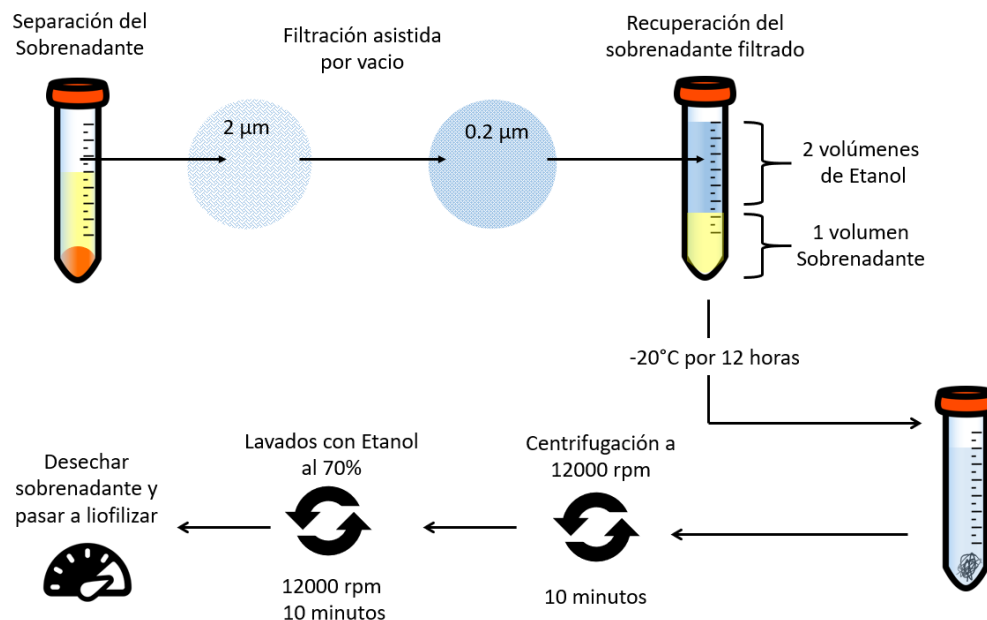


Fig.6. Metodología para la extracción y liofilización del exopolisacárido.

6.9. Purificación y caracterización del EPS.

La purificación del exopolisacárido se llevó a cabo mediante dos procesos, filtración y cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200 Increase 10/30). La filtración se llevó a cabo pasando el EPS previamente resuspendido en agua miliQ a través de un filtro de 0.2 micras. Durante el proceso de filtración todas las trazas y compuestos insolubles como lignina, compuestos fenólicos y pigmentos derivados de fenoles quedan atrapados en el filtro, debido a esto, la muestra filtrada se vuelve transparente y pierde su coloración oscura.

Con el fin de conocer la masa molecular del EPS se realizaron 4 curvas estándares, la primera de ellas se llevó a cabo con el fin de conocer el volumen de vacío, es decir, la fracción de volumen a la cual no aparecía ninguna molécula. Para esta curva se utilizó azul dextrano con un peso molecular de 2,000 kDa.

Las 3 curvas restantes se llevaron a cabo utilizando 5 moléculas de peso molecular conocido las cuales fueron, beta-amilasa (200 kDa), citocromo C (12.4 kDa), Albúmina de suero bovino (66 kDa), alcohol deshidrogenasa de levadura (150 kDa) y anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (29 kDa)

La fracción volumétrica con la muestra purificada se mandó a analizar mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplado a detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) y espectrometría de masas (MS) con el fin de conocer las moléculas que lo componen (Figura 7).

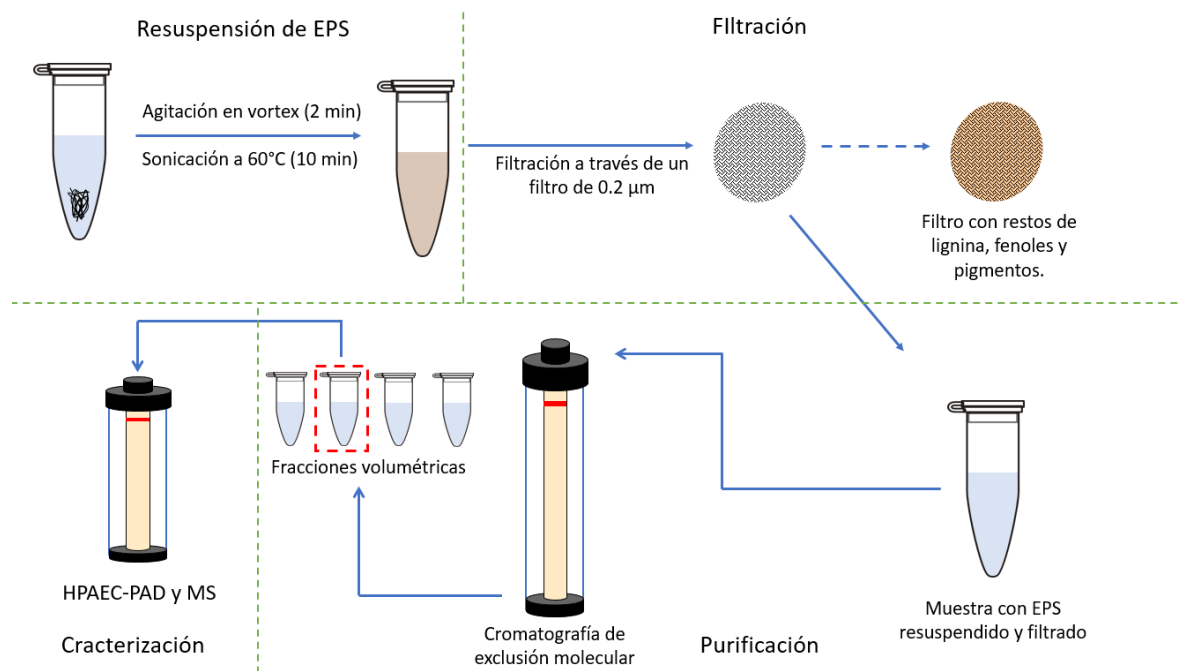


Fig.6. Metodología para la filtración y purificación del exopolisacárido.

6.10. Manejo y disposición de residuos

Los residuos generados durante la realización de este proyecto de investigación fueron gestionados de acuerdo a las características de los mismos, siguiendo los lineamientos establecidos por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas utilizando los recipientes proporcionados por este departamento, en base a la Norma PR-CLB-SRR-000.

7. Resultados

7.1. Síntesis de extracto de cáscara de plátano

Se realizó un diseño experimental variando las condiciones de temperatura de calentamiento y tiempo de calentamiento en el proceso de preparación del extracto de cáscara de plátano, siendo la variable respuesta la concentración de azúcares reductores. Se utilizó un triplicado en el punto central a 80°C por 10 minutos obteniendo una concentración promedio de 4.48 g/L con una desviación estándar de ± 1.16 .

No se observó diferencia significativa entre las variables dependientes por lo que para los demás ensayos se utilizaron los puntos centrales (10 min a 80°C) al preparar el extracto de cáscara de plátano (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño experimental y resultados para obtención de azúcares reductores a partir de cáscara de plátano.

Tiempo de Calentamiento (min)	Temperatura de Calentamiento (°C)	Azúcares Reductores (g/L)
10	80	4.82
10	80	3.19
10	80	5.43
15	90	4.18
15	70	5.17
5	90	3.52
5	70	3.8

7.2 Crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL-001L en medio YM.

Se evaluó el crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL 001L en un medio comercial (YM) el cual contiene todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. Se midió la densidad óptica a diferentes horas durante un periodo de 6 días, al final del ensayo se graficaron los logaritmos de los puntos obtenidos obteniendo una cinética de crecimiento (Figura 8) otorgando los siguientes datos:

- Tiempo en alcanzar fase estacionaria (3 días)
- Crecimiento máximo (Log DO 1.05 → DO 11.47 → 5.3 g/L).
- Velocidad de crecimiento en fase exponencial (0.069 g/h).
- Tiempo de duplicación en fase exponencial (10.05 h⁻¹).
- Consumo de azúcares reductores (6.75 g).

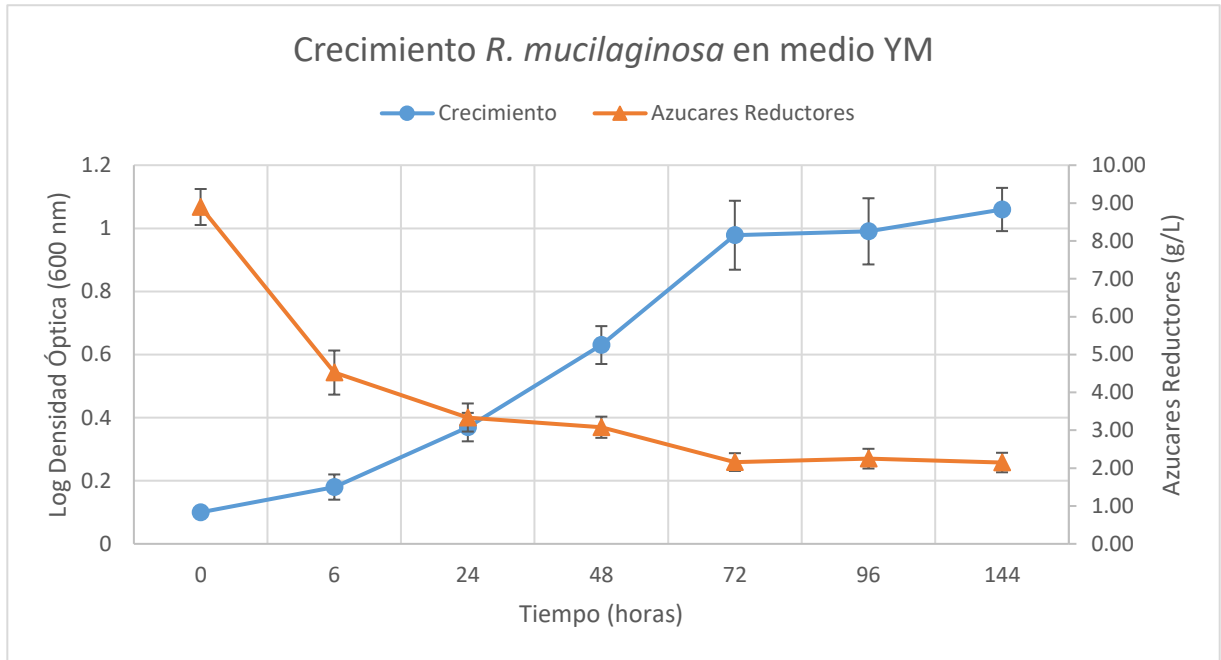


Fig. 8. Cinética de crecimiento y consumo de azúcares reductores de *R. mucilaginosa* en medio YM.

7.3. Crecimiento de *R. mucilaginosa* en extracto de cáscara de plátano.

Para la síntesis del extracto de cáscara de plátano se utilizaron las variables previamente indicadas, sin embargo, a pesar de la presencia de azúcares no se presentó crecimiento de biomasa después de 3 días por lo que se adicionó nitrato de amonio al medio en relación (1:5 Nitrógeno:Azúcares Reductores).

Se realizó el mismo procedimiento que con la cinética de YM durante 6 días obteniendo la siguiente cinética de crecimiento (Figura 9):

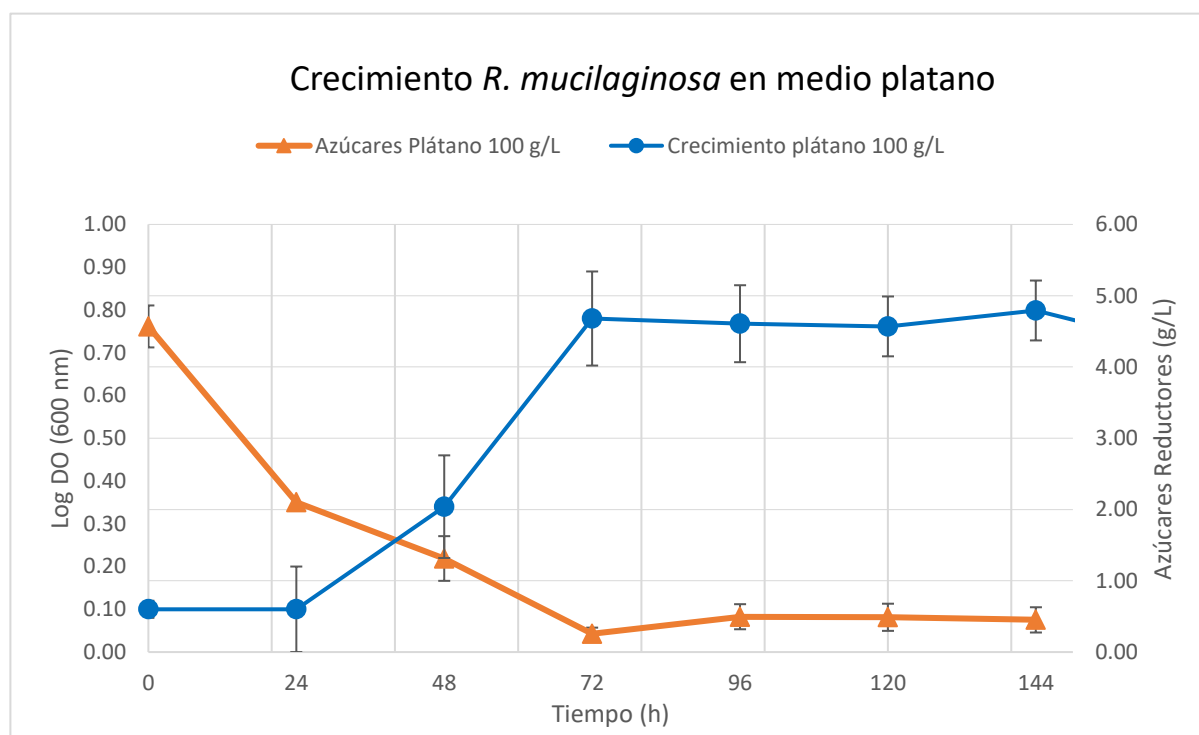


Fig. 9. Cinética de crecimiento y consumo de azúcares reductores de *R. mucilaginosa* en extracto cáscara de plátano.

También se evaluaron distintas cantidades de cáscara de plátano (Figura 10) para la realización del extracto con el fin de observar el efecto de esta en el crecimiento máximo, velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y rendimientos (Tabla 2).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

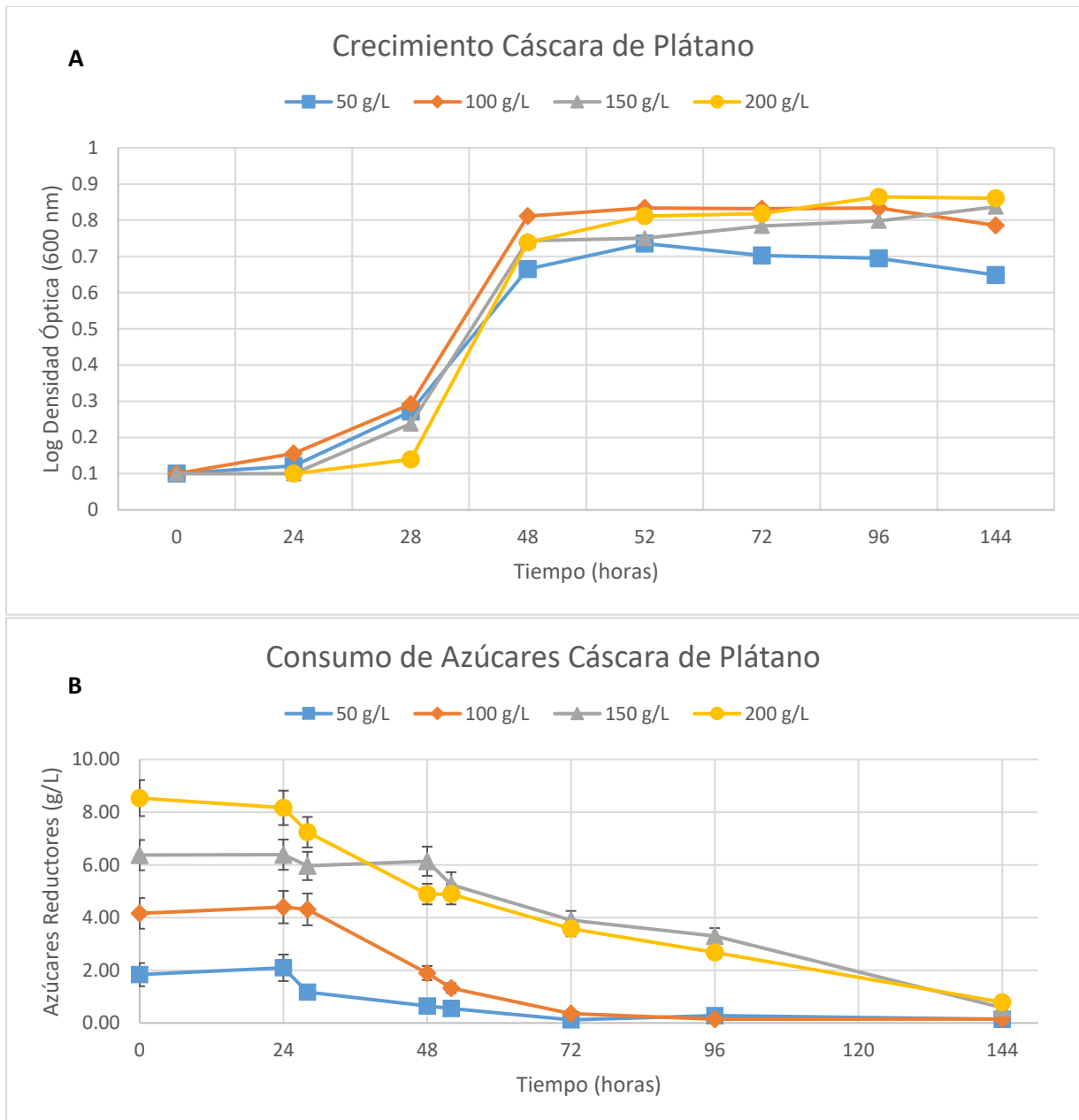


Fig. 10. A) Cinética de crecimiento y B) consumo de azúcares reductores de *R. mucilaginosa* UANL-001L utilizando diferentes cantidades de cáscara de plátano para realizar el extracto.

Tabla 3. Valores de la cinética de YM y el extracto a diferentes cantidades de cáscara de plátano.

Ensayo	Crecimiento Máximo		Velocidad de Crecimiento (g/h)	Tiempo de Duplicación (h ⁻¹)	Consumo Azúcares Reductores (g)
	Log OD	g/L			
YM	11.47	5.3	0.069	10.05	5.31
Plátano 50 g	5.44	2.7	0.0515	13.43	1.69
Plátano 100 g	6.82	3.6	0.059	11.74	4.01
Plátano 150 g	6.87	3.3	0.0664	10.44	5.79
Plátano 200 g	7.32	3.9	0.0686	10.11	7.75

7.4a. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de *R.*

mucilaginosa UANL 001L.

El efecto de la fuente de nitrógeno fue evaluado mediante el uso de dos compuestos diferentes al nitrato de amonio, las fuentes a evaluar fueron el sulfato de amonio y el extracto de levadura. El sulfato de amonio como una fuente similar al nitrato de amonio, mientras que el extracto de levadura contiene moléculas nitrogenadas más complejas como péptidos y proteínas cuya unidad funcional son los aminoácidos (Figura 11).

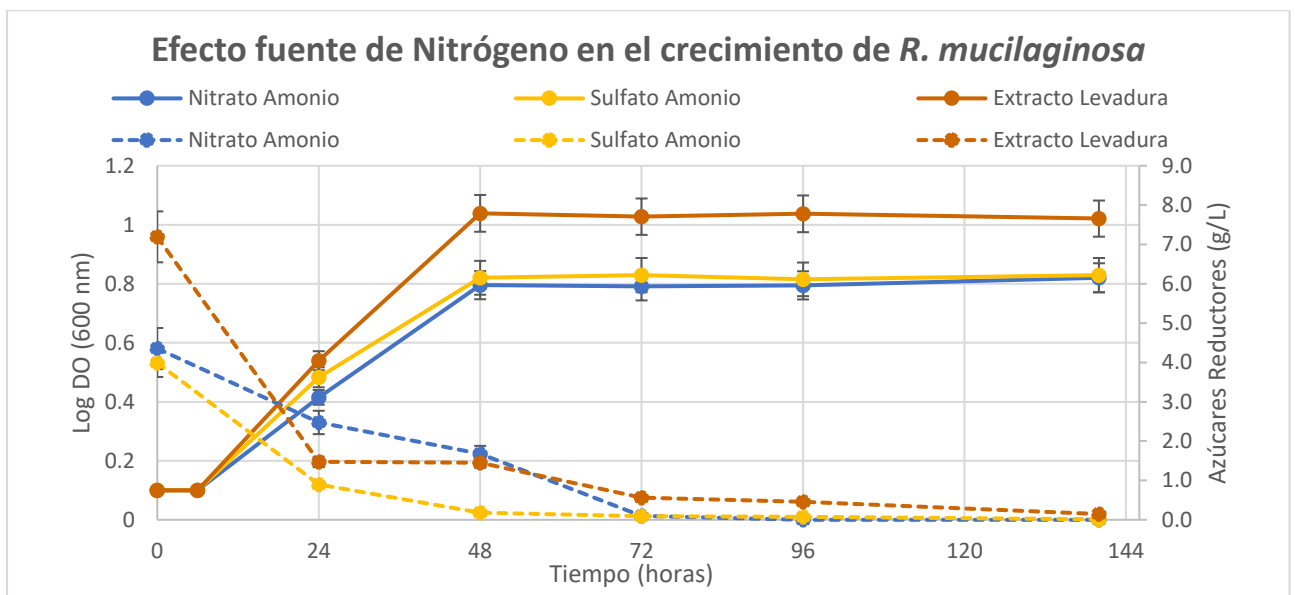


Fig. 11. Efecto de la fuente de nitrógeno en el crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL 001L. Densidad óptica 600 nm (—), azúcares reductores (---).

7.4b. Efecto de pigmentos solubles en el extracto sobre el crecimiento de *R. mucilaginosa*.

Con el fin de analizar el efecto de los pigmentos en la cáscara de plátano sobre el crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL-001L se evaluaron 2 tipos de medio cuya única diferencia era la cantidad de pigmentos presentes. Un medio fue filtrado utilizando una membrana de 2 micras, mientras que para el otro medio se realizaron dos filtraciones con membranas de 0.2 micras (ultrafiltrado). El medio filtrado presentó una coloración oscura a diferencia del medio ultrafiltrado completamente transparente.

Posteriormente, los medios fueron inoculados con *R. mucilaginosa* UANL-001L a una densidad óptica de 0.1 y se evaluó el crecimiento y consumo de azúcares durante las siguientes 94 horas (Figura 12).

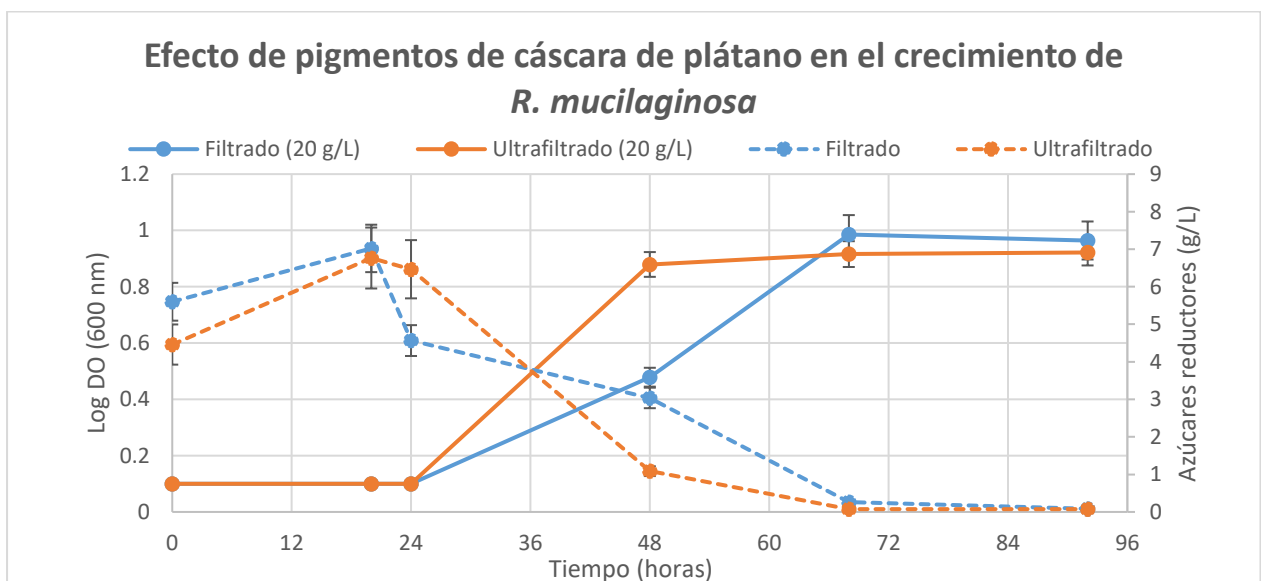


Fig. 12. Efecto de pigmentos en la cáscara de plátano sobre el crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL 001L. Densidad óptica 600 nm (—•—), azúcares reductores (---•---).

7.5. Producción de Carotenos, ácidos grasos y EPS.

Se realizó la producción y extracción de carotenos, ácidos grasos y exopolisacárido en los distintos medios (Figura 13). Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente gráfica:

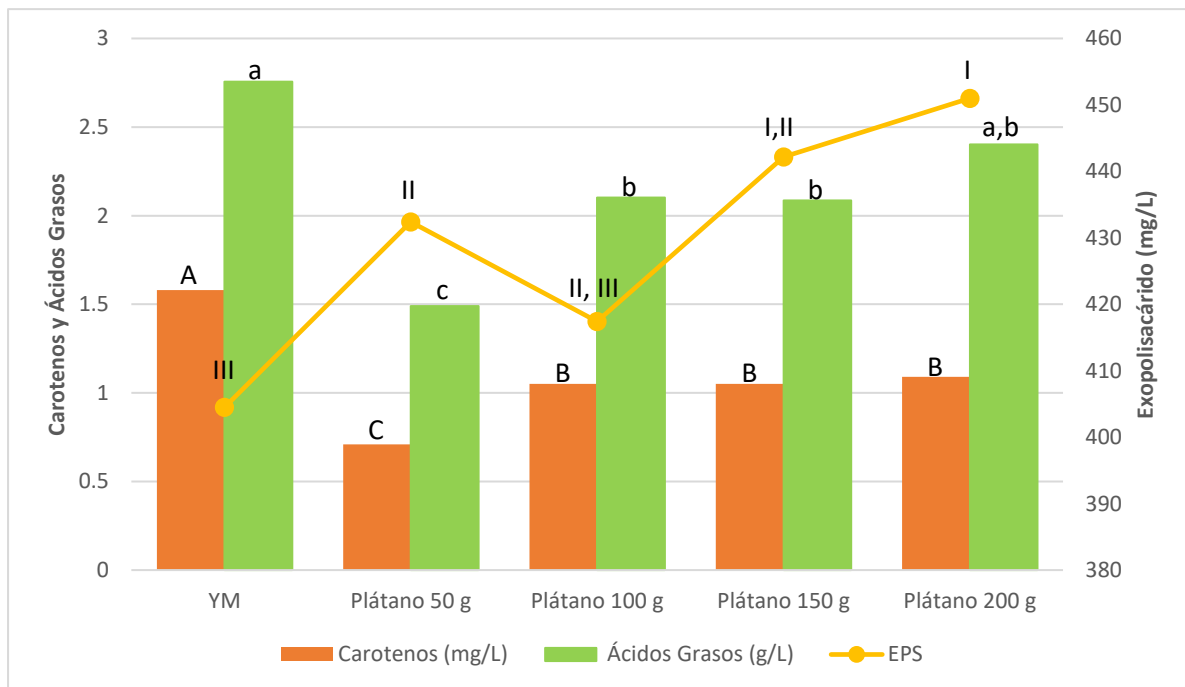


Figura 13. Producción de carotenos, ácidos grasos y exopolisacárido por *R. mucilaginosa* UANL-001L en distintos medios de crecimiento. Mismas letra o número no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Se realizó una segunda cinética priorizando la producción del exopolisacárido, así como la cantidad neto de exopolisacárido sin restos del extracto de la cáscara de plátano junto con los rendimientos de producción (Figura 14). Se realizó la separación del sobrenadante y la extracción de los componentes antes y 72 horas después de que el medio fuera inoculado.

Para el peso neto del exopolisacárido, se calculó la diferencia de los compuestos presentes en el extracto antes y después de ser inoculado. Finalmente, los rendimientos se obtuvieron dividiendo la cantidad de EPS neto en mg/L entre la cantidad de biomasa seca producida.

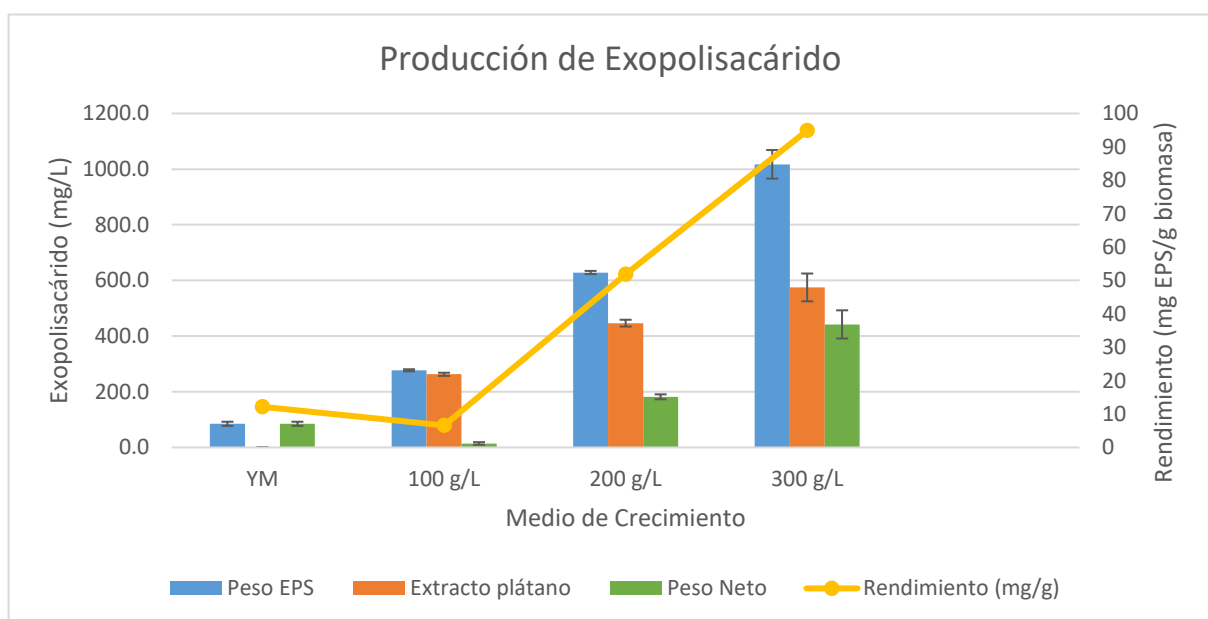


Figura 14. Producción de exopolisacárido producido por *R. mucilaginosa*, compuestos de la cáscara de plátano en el extracto y peso neto del exopolisacárido (EPS – compuestos del extracto). Los puntos representan los rendimientos en miligramo de EPS por gramo de biomasa (peso seco).

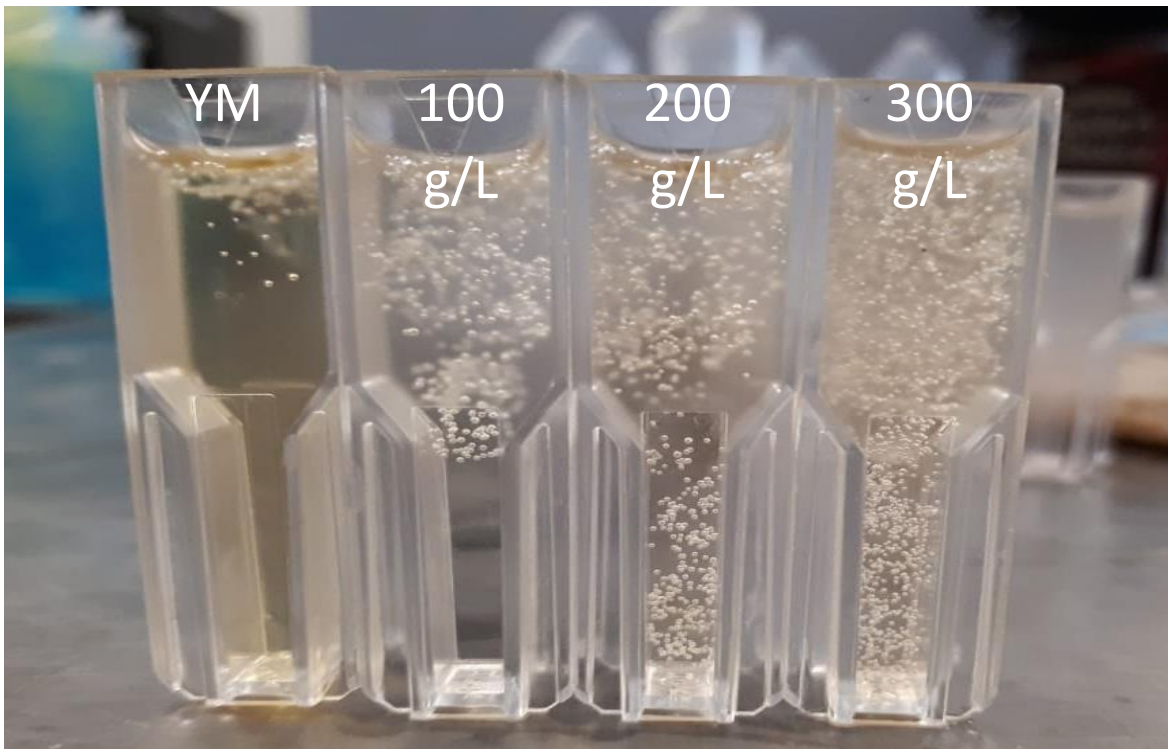


Figura 15. Mezcla de sobrenadante y alcohol de diferentes medios de crecimiento. Las burbujas que se observan en el interior se deben a la precipitación de restos en el sobrenadante, entre los que se encuentran proteínas, restos celulares y principalmente EPS.

7.6. Purificación y caracterización del EPS.

El volumen de vacío se estableció en la fracción de los 8 mL, justo donde se observa en la gráfica el inicio del pico correspondiente al azul dextrano. La muestra con el exopolisacárido mostró una serie de picos, siendo la fracción de 14 mL la que contenía la mayor cantidad de EPS (Figura 16).

Con el fin de conocer el peso molecular del EPS, se realizó una curva de calibración utilizando la fracción volumétrica a la que aparecieron los estándares (Tabla 4 y Anexo 1). El peso molecular calculado del EPS fue de 76.14 kDa.

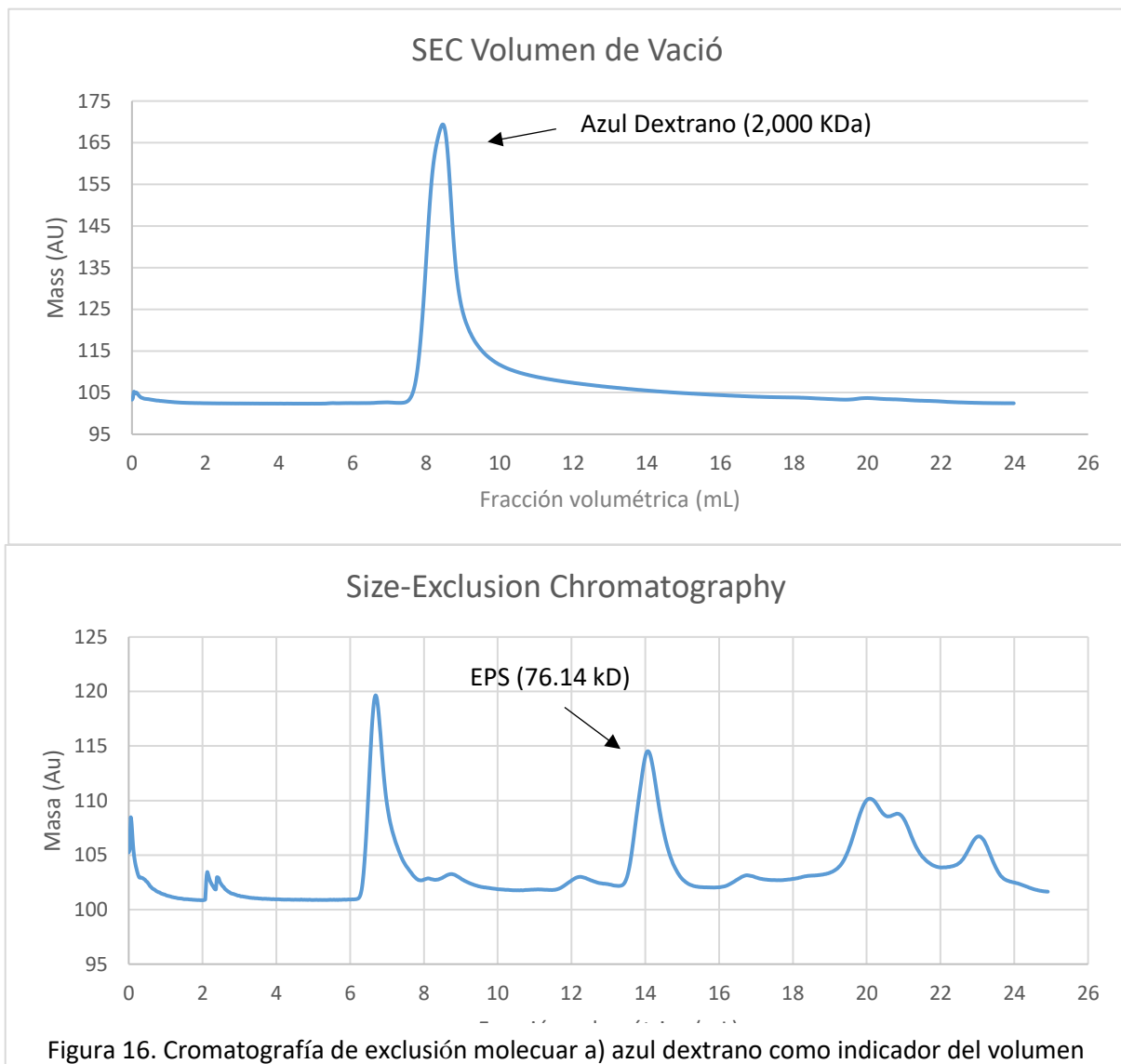


Figura 16. Cromatografía de exclusión molecular a) azul dextrano como indicador del volumen de vacío b) muestra de EPS extraído de *R. mucilaginoso* UANL-001L inoculada en extracto de cáscara de plátano.

Una vez que el EPS fue purificado, se prosiguió a su caracterización mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplada a detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), la cromatografía de intercambio aniónico permitió conocer que el EPS se encuentra constituido por glucosa, galactosa, fucosa, manosa y ácido galacturónico (Figura 17).

La detección amperométrica pulsada fue utilizada con el fin de cuantificar los azúcares presentes, con el fin de conocer el porcentaje que corresponde a cada uno de estos en el EPS. La tabla 3 contiene los porcentajes de cada azúcar, así como una comparación con los de un EPS proveniente de la misma especie, pero crecida en un medio sintético.

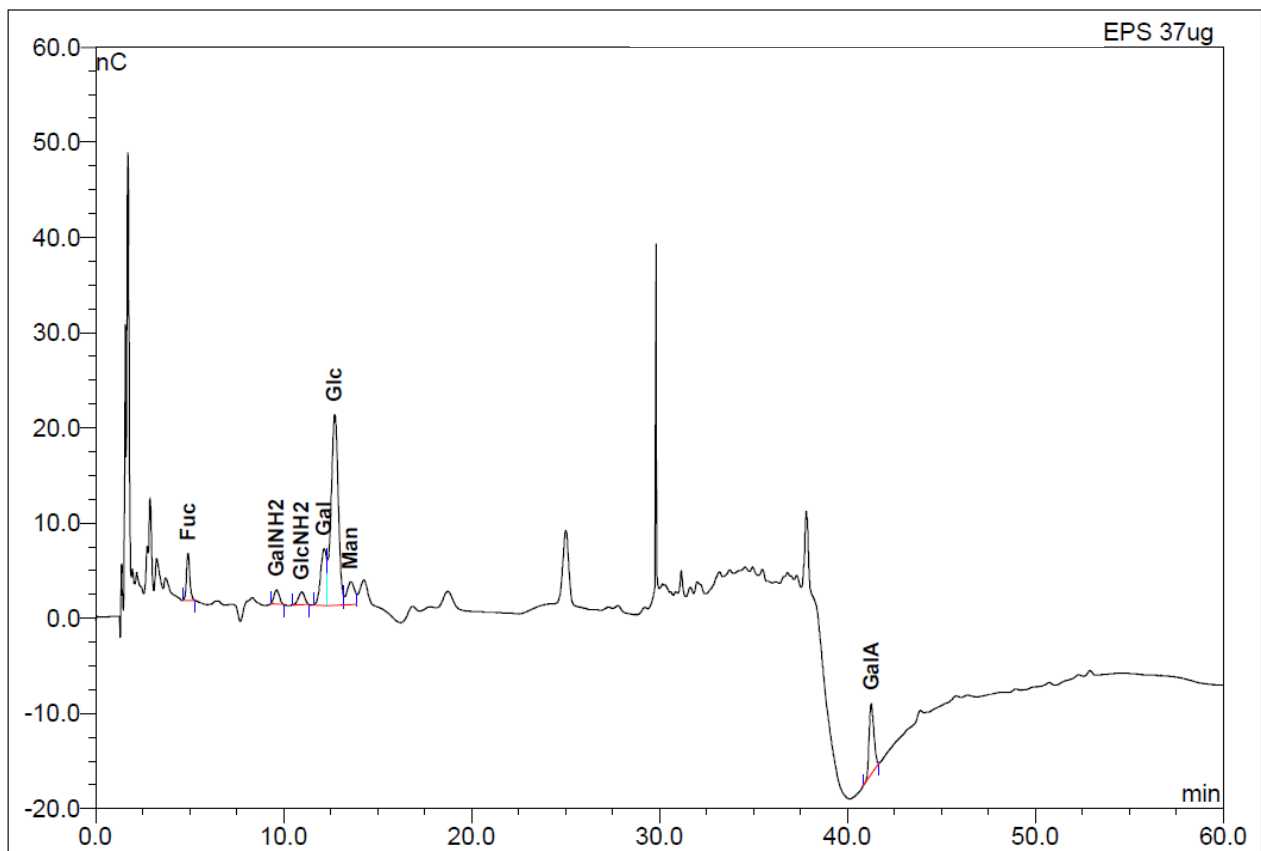


Figura 17. Cromatografía de intercambio aniónica de alta resolución. La muestra utilizada fue 37 µg EPS de *R. mucilaginosa* UANL-001L en extracto de cáscara de plátano.

Tabla 3. Porcentaje de azúcares presentes en dos tipos de EPS de *R. mucilaginosa* UANL-001L extraídos de medios de crecimiento distintos cuantificados mediante detección amperométrica pulsada (PAD).

HPAEC-PAD EPS		
Azúcares	Medio YM (%)	Medio cáscara de plátano (%)
Fucosa	3	8
Galactosa	5	12
Glucosa	82	42
Manosa	10	9
Ácido Galacturónico	0	30

8. Discusión

8.1. Cinética de crecimiento y consumo de azúcares reductores de *R.*

mucilaginosa UANL-001L en medio YM.

La levadura *R. mucilaginosa* UANL-001L en medio YM presentó un comportamiento típico de crecimiento microbiano con una fase lag de una duración menor a 6 horas, una fase exponencial de 60-70 horas y una fase estacionaria que se prolongó hasta el final del último día de toma de muestra.

Entre los valores de importancia en los bioprocesos tenemos el crecimiento máximo de 5.3 g/L y una tasa de crecimiento de 0.069 cantidades similares encontrada por Libkind y van Broock (2006) en un mapeo de 8 cepas de *R. mucilaginosa* con un rango de 4.9-5.7 g de biomasa seca a las 72 horas de crecimiento, mientras que las tasas de crecimiento del género *Rhodotorula* varían entre 0.01 y 0.1. Estudios previos sobre la tasa de crecimiento en levaduras han establecido que una rápida tasa de crecimiento promueve la producción de proteínas, mientras que una tasa de crecimiento menor beneficia la producción de lípidos y compuestos secundarios (Zhang, Zhang & Tan, 2014; Van Hoek, Van Dijken & Pronk, 1998; Choy, Ryu & Rhee 1982).

Con respecto a los azúcares reductores la eficiencia de consumo alcanzó el 76%, valor menor a los reportados por en la literatura los cuales alcanzan un 97% (Cheng & Yang, 2016). Debido a que se trata de un medio comercial, es muy poco probable que este sobrante de glucosa se deba a la falta de otros nutrientes, esta cantidad de azúcares en el medio se debe a la presencia de un exopolisacárido con actividad reductora rico en glucosa (Vázquez-Rodríguez, et al, 2018).

8.2. Síntesis de extracto cáscara de plátano, cinética de crecimiento y consumo de azúcares reductores por *R. mucilaginosa* UANL-001L.

El medio sintetizado a partir de la cáscara de plátano contiene todos los micro y macronutrientes necesarios que permiten el crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L, sin embargo y como es el caso de la mayoría de los medios a partir de desechos agroindustriales, la presencia de compuestos nitrogenados es escasa por lo que es necesaria la adición de una fuente de nitrógeno, en este caso nitrato de amonio. Un estudio realizado por Cheng y Yang (2015) reportó la adición de extracto de levadura a medios compuestos de efluentes industriales con melaza, mientras que Buzzini y Martini (1999) adicionaron 3 g/L de extracto de levadura a medios sintetizados a partir de desechos vinícolas, en ambos estudios se reportó la necesidad de extracto de levadura para crecimiento microbiano.

Una de las características del extracto de cáscara de plátano es la coloración oscura que presenta una vez que ha sido esterilizado, la razón de este evento es la presencia de pigmentos derivados de la tirosina como la melanina, causante también de la presencia de manchas en los plátanos maduros (Emaga, *et al*, 2006).

La cinética de crecimiento utilizando 100 g/L de cáscara de plátano mostró un comportamiento similar al crecimiento en YM, pero hubo variación en la tasa de crecimiento, tiempo de duplicación y crecimiento máximo. Con respecto a la tasa de crecimiento, la variación observada no fue tan marcada cuyo valor se observa mejor en el tiempo de duplicación el cual es 3 horas mayor en el extracto de cáscara de plátano.

8.3. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de *R. mucilaginosa*

UANL-001L.

No se observó una diferencia significativa entre el uso de nitrato de amonio y sulfato de amonio, descartando que el azufre sea un factor limitante en el crecimiento de la levadura. En cambio, en el medio donde fue adicionado extracto de levadura como fuente de carbono se observó un aumento del 25% con respecto a las otras dos fuentes de nitrógeno. Sin embargo, debido a que el extracto es una mezcla compleja de nutrientes, es difícil identificar el o los componentes que promueven este mayor crecimiento.

Se establecieron dos posibles razones sobre el crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL-001L al utilizar extracto de levadura. La primera de ellas es la presencia de componentes que aceleran el metabolismo de glucosa e inhiben la producción de lípidos, Edens, *et al* (2002) observaron tal comportamiento en células de rata, por lo que es posible que los componentes en el extracto de levadura estén dirigiendo al metabolismo a una mayor obtención de biomasa y un decremento en la producción de lípidos.

La segunda opción se centra en la presencia de micronutrientes presentes en el extracto, los cuales, a pesar de algunos estar presentes en la cáscara de plátano, no se asegura su biodisponibilidad en el medio, por lo que pueden ser nutrientes limitantes en los medios adicionados solo con una fuente de nitrógeno. Los principales micronutrientes presentes en el extracto de levadura son manganeso, magnesio, hierro, cobre y zinc (Grant & Pramer, 1962).

8.4. Efecto de pigmentos de la cáscara de plátano sobre el crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL-001L.

Se observó un efecto de los compuestos de la cáscara de plátano sobre la velocidad de crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL-001L retrasando el tiempo necesario, para alcanzar el crecimiento máximo, en 24 horas.

Es sabido que las plantas son uno de los mayores productores de metabolitos secundarios, por lo que sus extractos se encuentran llenos de polifenoles, flavonoides y terpenoides. Sin embargo, al ser grupos extensos de biomoléculas su estructura, naturaleza y actividad varía de gran manera entre especies, por lo que es difícil asociar solo una molécula a un efecto específico (Van Sumere & Lea, 1985; Harborne, 1989).

El efecto de los polifenoles en levaduras ha sido previamente estudiado, sin embargo, los resultados obtenidos difieren dependiendo del microorganismo evaluado y la fuente del extracto. Hirasawa y Takada (2004) registraron actividad antifúngica de un flavonol (pirogalol) extraído de té verde sobre el hongo *Candida albicans*, además de potenciar la actividad de un antimicótico (Anfotericina B). De igual forma, Maeta, *et al* (2007) registraron el efecto de estrés oxidativo de polifenoles de té verde sobre *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, induciendo factores de transcripción de respuesta a estrés oxidativo, por lo que, a pesar de no verse un efecto instantáneo en el crecimiento, después de cierto tiempo las células presentan daño celular debido a una sobreproducción H_2O_2 a pH alcalino (>7). Finalmente, Sithequee, *et al* (2009) demostró la actividad antifúngica de los polifenoles (Teflavonoides y catequinas) en el té negro contra especies del género *Candida*.

Con respecto a efectos de extractos ya directamente sobre el género *Rhodotorula*, Hainal, Ignat, Volf y Popa (2011), evaluaron el crecimiento de 2 cepas de *R. glutinis* sobre extractos provenientes de corteza de *Picea abies*, semillas de *Vitis vinífera* y hojas de *Asclepias syriaca*, cuyas concentraciones de polifenoles fueron 517.95, 506.25 y 287.85 mg de estandar de ácido gálico/ 100 g (mgGAE/100 g), 24 horas después de ser inoculados con *R. glutinis* se observó una reducción en la cantidad de polifenoles debido a su consumo por la levadura. De manera contraria Ahmed, Djebli, Aissat, Khiati, Meslem y Bacha (2013) encontraron un efecto inhibitorio de miel natural sobre una especie de *Rhodotorula mucilaginosa* a concentraciones menores a 100 mgGAE. En comparación con los extractos de plantas, la miel tiene una mayor variedad de compuestos fenólicos y flavonoides (da Silva, Gauche, Gonzaga, Costa & Fett, 2016).

Podemos concluir que la inhibición de *R. mucilaginosa* por polifenoles depende del tipo de compuesto más que de la cantidad de estos. Al no observarse una disminución en el crecimiento máximo de la levadura, se establece que los polifenoles presentes en la cáscara de plátano no son tóxicos para la levadura.

La disminución en la velocidad de crecimiento puede deberse a otros factores como la disponibilidad de azúcares, debido a que la cáscara utilizada tenía poco tiempo de maduración siendo necesaria la previa conversión de almidón en monosacáridos, comportamiento que se observa en las primeras 24 horas de la cinética de crecimiento.

8.5. Producción de carotenos por *R. mucilaginosa* UANL-001L en medio YM y extracto de cáscara de plátano.

La mayor producción de carotenos de la cepa *R. mucilaginosa* UANL-001L fue de 1.58 mg/L, a pesar de ser un valor relativamente bajo, los metabolitos secundarios, como es el caso de los carotenos, son los compuestos que mayor variabilidad presentan con respecto a su producción. Esta ampliamente registrado en la literatura el efecto que tienen los factores como tiempo de luz, metales, macronutrientes e incluso antimicóticos, como el ketoconazol, sobre la producción de estos en varias especies de bacterias, microalgas y levaduras incluyendo *R. mucilaginosa* (Hejazi & Wijffels, 2003; Bhosale & Gadre, 2001; Wang, Liu & Wang, 2017). Además del efecto de factores ambientales en la producción de carotenos se encuentran los factores genéticos causados por mutantes de una misma cepa, Bhosale y Gadre (2001) produjeron por mutagénesis una cepa capaz de producir 33 mg/L de carotenos, mientras que la cepa nativa producía 2.2 mg/L, es decir, la producción de carotenos se aumentó en un 1500%.

Actualmente la mayor producción de carotenos por una cepa de *R. mucilaginosa* es de 125 mg/L utilizando 20 g/L de melazas (Aksu & Eren, 2005). Mientras que para una cepa de *Rhodotorula glutinis* la mayor producción es de 135.2 mg/L utilizando glicerol como fuente de carbono (Saenge, Cheirsilp, Suksaroge & Bourtoom 2011). Esto sugiere que cepas del género *Rhodotorula* tiene el potencial de aumentar su producción de carotenos a niveles similares a los 130 mg/L en las condiciones correctas.

Al comparar la producción de carotenos en YM contra los producidos en extracto de cáscara de plátano, la concentración de cáscara de plátano que dio una mayor

cantidad fueron los 200 mg/L de cáscara de plátano, sin embargo, esta cantidad es casi 30% menor a la producida en medio YM. Esta caída en la producción de carotenos puede deberse a distintos factores siendo el principal la obscuridad del medio, causada por los polifenoles, que evitaba el estrés por luz a las células, el cual se sabe aumenta la producción de carotenos (Hejazi & Wijffels, 2003).

8.6. Producción de ácidos grasos por *R. mucilaginosa* UANL-001L en medio YM y extracto de cáscara de plátano.

La producción de ácidos grasos en la cepa *R. mucilaginosa* UANL-001L fue de 2.75 g/L. En especies del género *Rhodotorula* las cantidades de ácidos grasos pueden llegar hasta los 20 g/L en reactores de 20 L y a concentraciones muy bajas de fuente de nitrógeno (Galafassi, *et al*, 2012). La mayor producción de lípidos por una levadura oleaginosa fue de 55 g/L utilizando una cepa genéticamente modificada de *Yarrowia lipolítica* con una conversión del 85% de fuente de carbono a lípidos (Rakicka, Lazar, Dulermo, Fickers & Nicaud, 2015).

Al igual que la producción de carotenos, la síntesis máxima de ácidos grasos en extracto de cáscara de plátano no fue mayores a los obtenidos en medio YM, pero al comparar los rendimientos obtenidos y la acumulación de estos se puede observar un incremento en el extracto de cáscara de plátano con respecto al medio YM. Las razones de esta mayor acumulación no se tienen bien establecidas, a pesar de esto, este incremento puede explicar la reducción de carotenos en el extracto ya que comparten un mismo precursor. En otras palabras, tanto la disminución de los carotenos como el incremento de ácidos grasos puede ser causada por un mismo factor, siendo la concentración de polifenoles o la menor cantidad de fuente de nitrógeno los principales factores a considerar.

8.7. Producción de EPS por *R. mucilaginosa* UANL-001L en medio YM y extracto de cáscara de plátano.

El exopolisacárido fue el metabolito que mostró mayor diferencia en cantidad de producción entre los distintos medios, sin embargo y a diferencia de los carotenos y los ácidos grasos, el exopolisacárido no se trata de una molécula en específico, por lo tanto, la comparación es más compleja debido a que se desconoce el tamaño que tiene en cada uno de los medios. Diversos estudios han encontrado que incluso variaciones en la temperatura pueden resultar en alteraciones del exopolisacárido de un organismo en específico y estos cambios alteran las funciones que presentan (Poli, Anzelmo & Nicolaus, 2010).

Los rendimientos obtenidos indican que el extracto favorece la producción de exopolisacárido, siendo 10-11 veces mayor en el extracto de cáscara de plátano al utilizar 200 g/L y 300 g/L con respecto al medio YM. La mayor cantidad registrada de producción de EPS para la cepa *R. mucilaginosa* UANL-001L es de 57 mg/g en medio YM (Garza, *et al*, 2016). Utilizando un extracto de cáscara de plátano a una concentración de 300 g/L, el rendimiento de EPS fue de 94.8 mg/g, casi el doble con respecto al medio YM.

Actualmente se sabe que el EPS producido por *R. mucilaginosa* presenta actividad antimicrobiana contra diversos tipos de bacterias gram positivas y negativas por lo que es de importancia comprobar si el EPS obtenido en extracto de plátano presenta esta actividad y en que concentración ya que su mayor producción presentaría una ventaja contra el medio YM en caso de tener una actividad similar (Vázquez-Rodríguez, *et al*, 2018).

Diversos estudios han reportado la capacidad reductora de distintos exopolisacáridos de origen microbiano sobre la síntesis de nanopartículas metálicas (Kanmani & Lim, 2013; Ahmed, Kalla, Uppuluri & Anbazhagan, 2014). Asimismo, el extracto de cáscara de plátano ha presentado esta capacidad reductora también en la síntesis de nanopartículas de plata (Bankar, Joshi, Kumar & Zinjarde, 2010). Debido a esto, se podría esperar que el exopolisacárido de *R. mucilaginosa* producido a partir del extracto de cáscara de plátano, presente una mayor actividad reductora con respecto al EPS producido en medio YM.

8.8. Purificación y caracterización del EPS.

El exopolisacárido de *R. mucilaginosa* UANL-001L a partir del extracto de cáscara de plátano (EPS_{Scp}) tiene un tamaño de 76.14 kDa, siendo 4 veces mayor al EPS de la misma cepa en medio YM (EPS_{Sym}). (Vázquez-Rodríguez, et al, 2018). Con respecto al EPS_{Sym}, el EPS_{Scp} presentó diferentes concentraciones en los monosacáridos que lo componen, así como la presencia de ácido galacturónico.

El cambio sobre las concentraciones de monosacáridos en los exopolisacáridos debido a alteraciones en las características físicoquímicas del medio está ampliamente reportado en la literatura. Cambios como el pH, la temperatura y conformación del medio pueden promover la presencia de un monosacárido en el exopolisacárido, principalmente glucosa y manosa (Degeest, Mozzi & De Vuyst, 2002; Nichols, Bowman & Guezennec, 2005). Sin embargo, no hay reportes sobre cambios tan significativos como lo es la adición de un monosacárido a la estructura, o un incremento mayor al 200% en el peso molecular. Por lo tanto, la presencia de ácido galacturónico en la composición del EPS_{Scp} y el incremento en el peso deben estar relacionados.

9. Conclusión

Se logró evaluar la producción de carotenos y ácidos grasos en la cepa *R. mucilaginosa* UANL-001L comprobando una producción similar, con respecto a la literatura, de estos compuestos. De igual forma fue posible la extracción de nutrientes de la cáscara de plátano, así como el crecimiento de *R. mucilaginosa* en este medio.

Se evaluó la producción de metabolitos en la cáscara de plátano siendo los ácidos grasos y el exopolisacárido los más relevantes debido a los rendimientos de producción. A pesar de tener una menor cantidad de producción de metabolitos en medio cáscara de plátano, los rendimientos por gramo de biomasa obtenidos en el extracto, similares a los de YM, sugieren que un aumento en la producción de biomasa permitirá tener rendimientos por lote similares a los obtenidos en medio YM.

Los rendimientos del exopolisacárido fueron mayores al usar 200 y 300 g/L de cáscara de plátano, con respecto al medio YM. Así mismo, sus características físicoquímicas proponen una aplicación diferente a las del exopolisacárido extraído de medio YM.

10.- Perspectivas

El extracto de cáscara de plátano contiene fuente de carbón y micronutrientes necesarios para el crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL-001L. La cantidad de biomasa obtenida fue menor en comparación a un medio sintético, así como la producción de carotenos y ácidos grasos, por otro lado, la adición de fuentes de nitrógeno y carbono como el extracto de levadura podrían aumentar el crecimiento y producción de estos metabolitos.

No se observó un efector inhibitor del extracto sobre la velocidad de crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL-001L a concentraciones menores a 300 g/L de cáscara de plátano. Estudios posteriores aumentado la concentración y en fase sólida podrían corroborar la resistencia de *R. mucilaginsa* UANL-001L al extracto de cáscara de plátano.

A pesar de que las cantidades de carotenos y ácidos grasos fueron menores, el aumento en la producción de biomasa podría otorgar rendimientos similares a los del medio sintético. Asimismo, se debe llevar a cabo la caracterización de carotenos y ácidos grasos para conocer su composición, calidad.

El EPS_{Scp} presentó una composición y tamaño que lo hacen muy diferente al EPS_{Sym}. Debido a sus características de tamaño y conformación sería interesante evaluar la actividad antimicrobiana del EPS_{Scp}, así como su capacidad reductora y viscosidad,

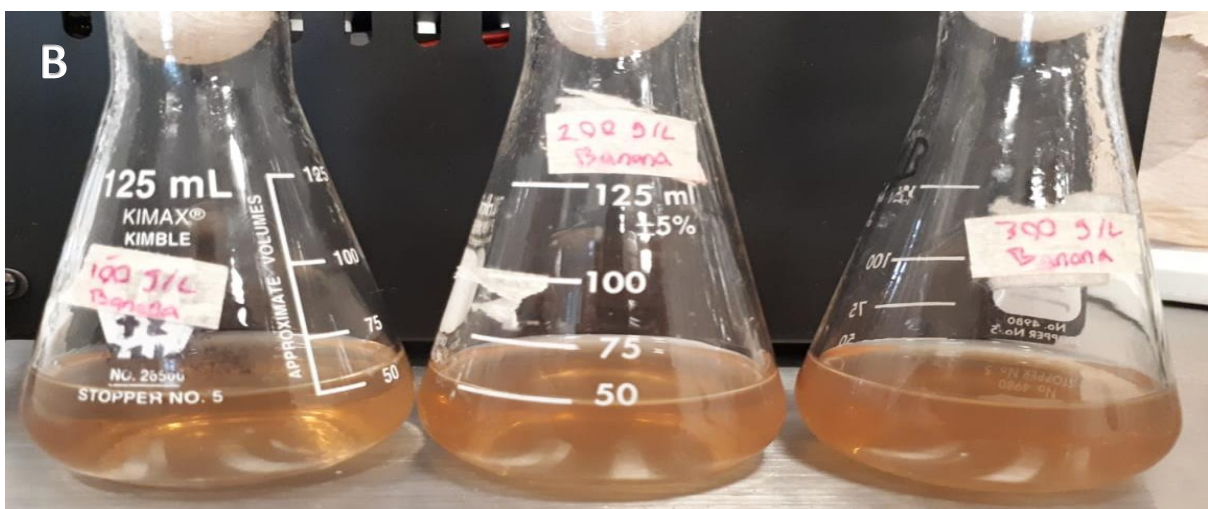
11.- Material Suplementario

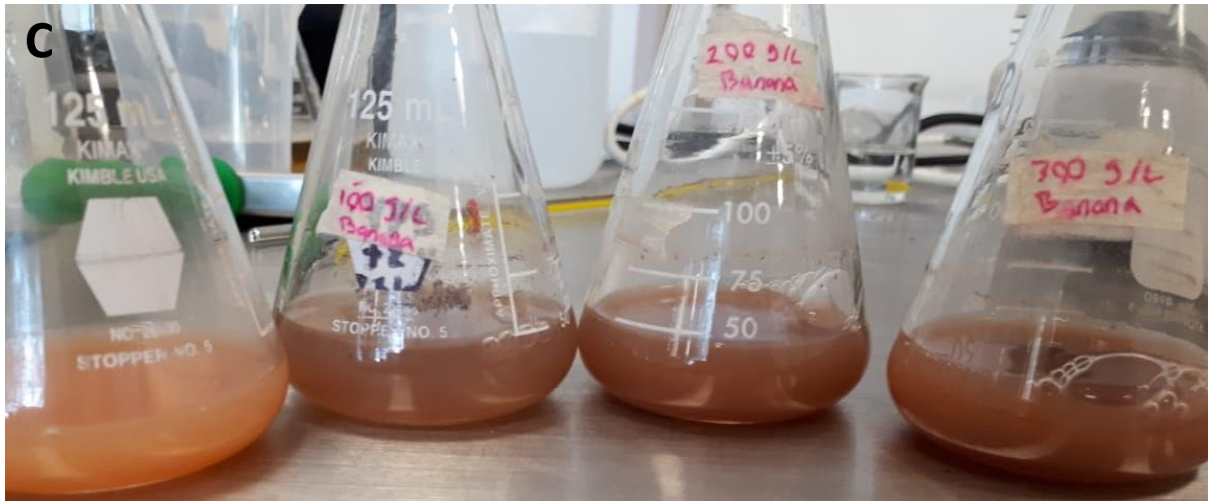
1.- Medios de Crecimiento

a).- Cambios en la turbidez del medio a diferentes concentraciones de cáscara de plátano (100, 200 y 300 g/L).

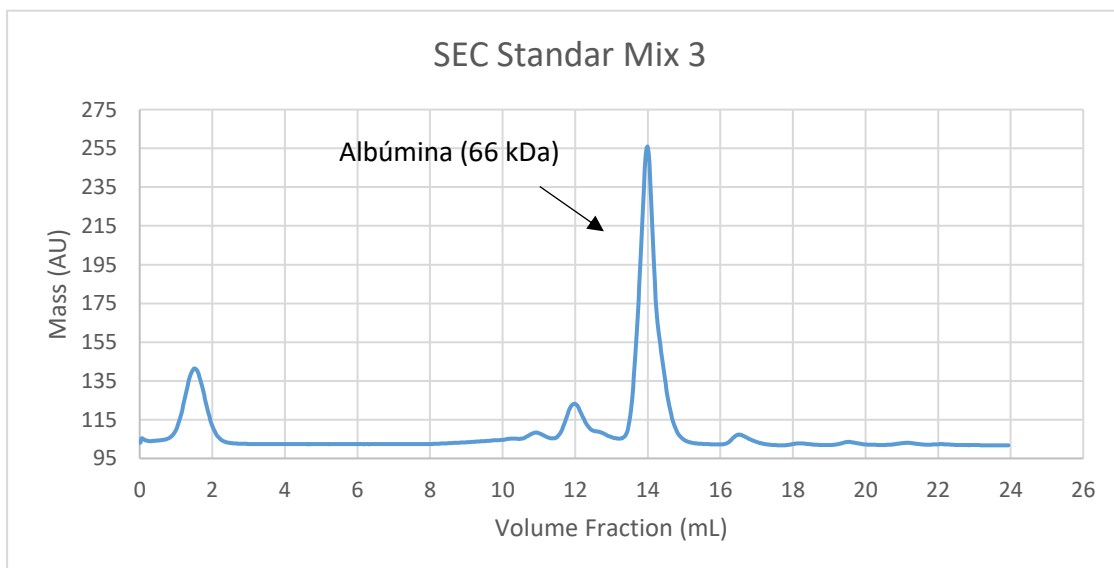
b).- Cambio en la coloración del medio después de ser esterilizado.

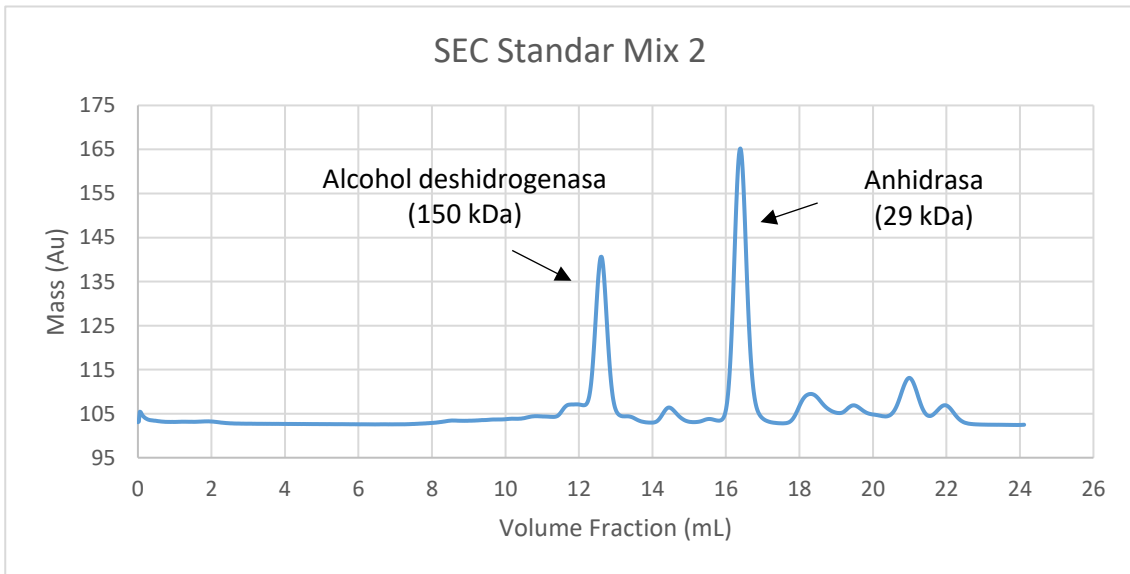
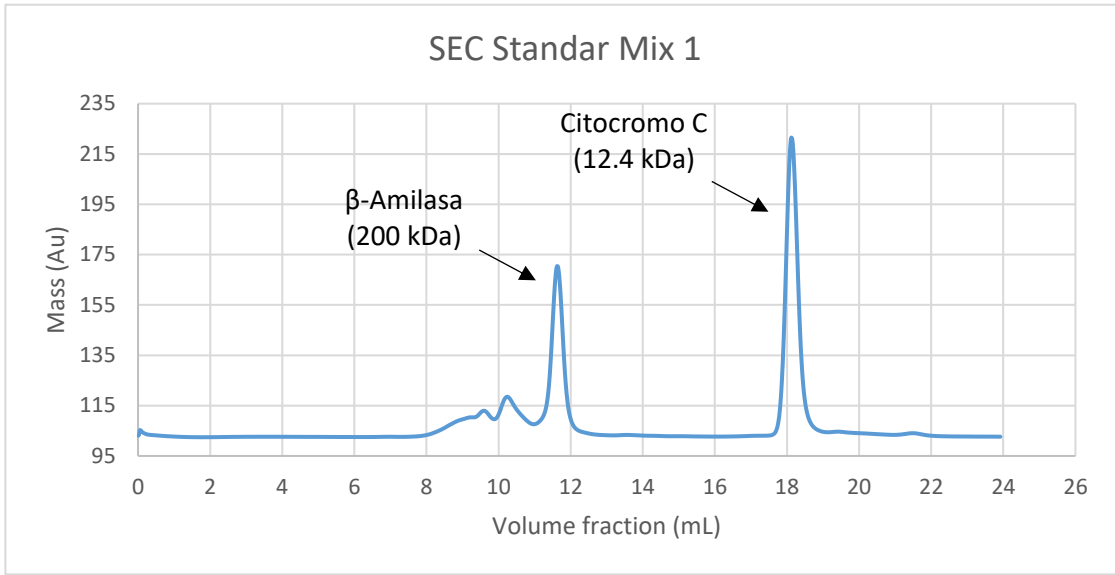
c).- Coloración y Turbidez de los medios después de 72 horas de crecimiento (YM, 100, 200 y 300 g/L de cáscara de plátano).





2.- Estándares de tamaño para la cromatografía de exclusión molecular.





12.- Bibliografía

1. Ahmed, K. B. A., Kalla, D., Uppuluri, K. B., & Anbazhagan, V. (2014). Green synthesis of silver and gold nanoparticles employing levan, a biopolymer from *Acetobacter xylinum* NCIM 2526, as a reducing agent and capping agent. *Carbohydrate polymers*, 112, 539-545.
2. Ahmed, M., Djebli, N., Aissat, S., Khiati, B., Meslem, A., & Bacha, S. (2013). In vitro activity of natural honey alone and in combination with curcuma starch against *Rhodotorula mucilaginosa* in correlation with bioactive compounds and diastase activity. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(10), 816.
3. Aksu, Z. Tugba Eren, A. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*.
4. Aksu, Z., & Eren, A. T. (2007). Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, 35(2), 107–113.
<http://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.004>
5. Bankar, A., Joshi, B., Kumar, A. R., & Zinjarde, S. (2010). Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 368(1-3), 58-63.
6. Banno, T., Hayakawa, Y., & Umeno, M. (2002). Some applications of the Grignard cross-coupling reaction in the industrial field, 653, 288–291.
7. Bhosale, P., & Gadre, R. (2001). Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(4), 423-427.
8. Chen, Y. (2011). Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose : a systematic review, 581–597.
<http://doi.org/10.1007/s10295-010-0894-3>
9. Cheng, Y.-T., & Yang, C.-F. (2016). Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 61, 270–275. <http://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.12.027>
10. Choi, S. Y., Ryu, D. D., & Rhee, J. S. (1982). Production of microbial lipid: effects of growth rate

- and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnology and bioengineering*, 24(5), 1165-1172.
11. da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323.
 12. Davey, M. W., Stals, E., Ngoh-Newilah, G., Tomekpe, K., Lusty, C., Markham, R., ... & Keulemans, J. (2007). Sampling strategies and variability in fruit pulp micronutrient contents of West and Central African bananas and plantains (*Musa* species). *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(7), 2633-2644.
 13. Degeest, B., Mozzi, F., & De Vuyst, L. (2002). Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 fermentations. *International journal of food microbiology*, 79(3), 161-174.
 14. Dehkhoda, A. M., & Ellis, N. (2013). Biochar-based catalyst for simultaneous reactions of esterification and transesterification. *Catalysis today*, 207, 86-92.
 15. Dong, T., Yu, L., Gao, D., Yu, X., Miao, C., & Zheng, Y. (2015). Direct quantification of fatty acids in wet microalgal and yeast biomass via a rapid in situ fatty acid methyl ester derivatization approach. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6909-2>
 16. Dönmez, G. (2010). Bioresource Technology Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses, 101, 7988–7990.
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.054>
 17. Ducat, D. C., Way, J. C., & Silver, P. A. (2011). Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends in Biotechnology*, 29(2), 95–103.
<http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.003>
 18. Edens, N. K., Reaves, L. A., Bergana, M. S., Reyzer, I. L., O'Mara, P., Baxter, J. H., & Snowden, M. K. (2002). Yeast extract stimulates glucose metabolism and inhibits lipolysis in rat adipocytes in vitro. *The Journal of nutrition*, 132(6), 1141-1148.
 19. Emaga, T. H., Andrianaivo, R. H., Wathélet, B., Tchango, J. T., & Paquot, M. (2007). Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food chemistry*, 103(2), 590-600.

20. Englund, E., Andersen-Ranberg, J., Miao, R., Hamberger, B., & Lindberg, P. (2015). Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for production of the plant diterpenoid manoyl oxide. *ACS synthetic biology*, 4(12), 1270-1278.
21. Flores Candia, J. L. (1998). *Metabolic flux distribution, modelling and process optimization of xanthan production* (Doctoral dissertation, Ph. D. thesis, Technical University of Braunschweig).
22. Frengova, G. I., & Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 163–180. <http://doi.org/10.1007/s10295-008-0492-9>
23. Galafassi, S., Cucchetti, D., Pizza, F., Franzosi, G., Bianchi, D., & Compagno, C. (2012). Bioresource Technology Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology*, 111, 398–403. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.004>
24. Garc, M., Manzano, J. C., Florencio, F. J., & Guerrero, M. G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9- cis - β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor, 115, 81–90. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.07.010>
25. Garza, M. T. G., Perez, D. B., Rodriguez, A. V., Garcia-Gutierrez, D. I., Zarate, X., Cardenas, M. E. C., ... & Medina-Ruiz, P. (2016). Metal-Induced Production of a Novel Bioadsorbent Exopolysaccharide in a Native *Rhodotorula mucilaginosa* from the Mexican Northeastern Region. *PloS one*, 11(2), e0148430.
26. Grant, C. L., & Pramer, D. (1962). Minor element composition of yeast extract. *Journal of bacteriology*, 84(4), 869.
27. Greenwald, R., Chaykovsky, M., & Corey, E. J. (1962). The Wittig Reaction Using Methylsulfinyl Carbanion-Dimethyl Sulfoxide 1. *The Journal of Organic Chemistry*, 28(1), 1962–1963.
28. Hainal, A. R., Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). Transformation of polyphenols from biomass by some yeast species. *Cellulose Chemistry and Technology*, 45(3), 211.
29. Harborne, J. B. (1989). Flavonoids. In *Natural products of woody plants* (pp. 533-570). Springer, Berlin, Heidelberg.

30. Hejazi, M. A., & Wijffels, R. H. (2003). Effect of light intensity on β -carotene production and extraction by *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 171-175.
31. Hirasawa, M., & Takada, K. (2004). Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 225-229.
32. Kanmani, P., & Lim, S. T. (2013). Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens. *Process Biochemistry*, 48(7), 1099-1106.
33. Kreitlow, S., Mundt, S., & Lindequist, U. (1999). Cyanobacteria — a potential source of new biologically active substances, 70, 61–63.
34. Kubi, D., & Horá, J. (2011). Applied Catalysis A : General Deactivation of HDS catalysts in deoxygenation of vegetable oils, 394, 9–17. <http://doi.org/10.1016/j.apcata.2010.10.034>
35. Li, Y., Kent, Z., & Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture, 41, 312–317. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.008>
36. Liang, T. W., Wu, C. C., Cheng, W. T., Chen, Y. C., Wang, C. L., Wang, I. L., & Wang, S. L. (2014). Exopolysaccharides and antimicrobial biosurfactants produced by *Paenibacillus macerans* TKU029. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(2), 933-950.
37. Libkind, D., & Van Broock, M. (2006). Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(7), 687–692. <http://doi.org/10.1007/s11274-005-9091-3>
38. Maeta, K., Nomura, W., Takatsume, Y., Izawa, S., & Inoue, Y. (2007). Green tea polyphenols function as prooxidants to activate oxidative-stress-responsive transcription factors in yeasts. *Applied and environmental microbiology*, 73(2), 572-580.
39. Maldonado, I. R., Rodriguez-Amaya, D. B., & Scamparini, A. R. P. (2008). Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*, 107(1), 145–150. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.075>
40. McMahon, H. T., & Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell

- membrane remodelling. *Nature*, 438(7068), 590.
41. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
 42. Neu, T. R., Flemming, H. C., & Wingender, J. (Eds.). (1999). *Microbial extracellular polymeric substances: Characterization, structure and function*. Springer.
 43. Nichols, C. M., Bowman, J. P., & Guezennec, J. (2005). Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an Antarctic sea ice bacterium grown in batch culture. *Applied and environmental microbiology*, 71(7), 3519-3523.
 44. Niederholtmeyer, H., Wolfsta, B. T., Savage, D. F., Silver, P. A., & Way, J. C. (2010). Engineering Cyanobacteria To Synthesize and Export, 76(11), 3462–3466.
<http://doi.org/10.1128/AEM.00202-10>
 45. Olofsson, K., Bertilsson, M., & Lidén, G. (2008). Biotechnology for Biofuels A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks, 14, 1–14. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-1-7>
 46. Palmer, R. K., Atwal, K., Bakaj, I., Carlucci-derbyshire, S., Buber, M. T., Cerne, R., ... Al, P. E. T. (2010). Triphenylphosphine Oxide Is a Potent and Selective Inhibitor of the Transient Receptor Potential Melastatin-5 Ion Channel, (6). <http://doi.org/10.1089/adt.2010.0334>
 47. Parfitt, J., Barthel, M., & Macnaughton, S. (2010). Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365(1554), 3065-3081.
 48. Patel, M., Patel, U., & Gupte, S. (2014). Production of exopolysaccharide (EPS) and its application by new fungal isolates SGMP1 and SGMP2. *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology*, 7(Special issue), 511.
 49. Poli, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine drugs*, 8(6), 1779-1802.
 50. Rakicka, M., Lazar, Z., Dulermo, T., Fickers, P., & Nicaud, J. M. (2015). Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 104.

51. Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., & Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, 46(1), 210-218.
52. Shah, A. K., & Ashtaputre, A. A. (1999). Evaluation of rheological properties of the exopolysaccharide of *Sphingomonas paucimobilis* GS-1 for application in oil exploration. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(4-5), 442-445.
53. Silva, C., Cabral, J. M. S., & Keulen, F. Van. (2004). Isolation of a β -carotene over-producing soil bacterium, *Sphingomonas* sp., 257–262.
54. Sitheequ, M. A. M., Panagoda, G. J., Yau, J., Amarakoon, A. M. T., Udagama, U. R. N., & Samaranyake, L. P. (2009). Antifungal activity of black tea polyphenols (catechins and theaflavins) against *Candida* species. *Chemotherapy*, 55(3), 189-196.
55. Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q, 83, 1–11.
56. Tkáčová, J., Furdíková, K., Klemková, T., Ďurčanská, K., & Čertík, M. (2015). Screening of carotenoid-producing *Rhodotorula* strains isolated from natural sources. *Acta Chimica Slovaca*, 8(1), 34–38. <http://doi.org/10.1515/acs-2015-0007>
57. Van Hoek, P. I. M., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (1998). Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. *Applied and environmental microbiology*, 64(11), 4226-4233.
58. Van Sumere, C. F., & Lea, P. J. (1985). The biochemistry of plant phenolics.
59. Vazquez-Rodriguez, A., Vasto-Anzaldo, X. G., Perez, D. B., Vázquez-Garza, E., Chapoy-Villanueva, H., García-Rivas, G., ... & Zarate, X. (2018). Microbial Competition of *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L and *E. coli* increase biosynthesis of Non-Toxic Exopolysaccharide with Applications as a Wide-Spectrum Antimicrobial. *Scientific reports*, 8(1), 798.
60. Volk, R., & Furkert, F. H. (2006). Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth, 161, 180–186. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2005.08.005>
61. Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Luo, H., & Tan, T. (2008). Studies on lipid production by

Rhodotorula glutinis fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium, 99, 5923–5927. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.046>

62. Wang, Q., Liu, D., Yang, Q., & Wang, P. (2017). Enhancing carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa* KC8 by combining mutation and metabolic engineering. *Annals of Microbiology*, 67(6), 425-431.
63. Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International journal of biological macromolecules*, 63, 133-139.
64. Zhang, Z., Zhang, X., & Tan, T. (2014). Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. *Bioresource technology*, 157, 149-153.

