

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**“ESTRATEGIA PARA LA CONVERSIÓN DEL CO₂
ASIMILADO POR *Synechocystis sp.* PCC 6803 EN
CAROTENOIDES UTILIZANDO *Rhodotorula mucilaginosa*
UANL-001L”**

Por

HUMBERTO GEOVANI ROSAS MEJIA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN
CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada**

J u l i o , 2 0 2 3

“Estrategia para la conversión del CO₂, asimilado por *Synechocystis sp.*, en carotenoides utilizando *Rhodotorula mucilaginosa*”

Revisión de tesis:

Dr. José Rubén Morones Ramírez

ASESOR

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Pasiano Rivas García

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Sergio Salvador Fernández Delgadillo

COMITÉ TUTORIAL

“Estrategia para la conversión del CO₂, asimilado por *Synechocystis sp.*, en carotenoides utilizando *Rhodotorula mucilaginosa*”

Aprobación de tesis:

Dr. José Rubén Morones Ramírez

ASESOR

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Pasiano Rivas García

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Sergio Salvador Fernández Delgadillo

COMITÉ TUTORIAL

Índice general

Lista de figuras	10
Resumen	12
<u>INTRODUCCIÓN</u>	13
<u>1.1. Dióxido de carbono</u>	13
<u>1.2. Métodos de captura para el CO₂</u>	13
<u>1.3. Cianobacterias</u>	16
<u>1.4. <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803.</u>	17
<u>1.5. Pretratamiento a biomasa</u>	19
<u>1.6. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i></u>	21
<u>1.7. Carotenoides</u>	22
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	26
<u>3.1 Hipótesis</u>	26
<u>3.2 Objetivo general</u>	26
<u>3.3 Objetivos específicos</u>	26
<u>METODOLOGÍA</u>	26
<u>4.1 Materiales, reactivos y equipos.</u>	26
<u>4.2 Monitorear condiciones de crecimiento de <i>Synechocystis sp.</i></u>	27
<u>4.3 Obtención de un medio de cultivo con azúcares reductores a partir de la biomasa de <i>Synechocystis sp.</i> PCC6803, sometida a un procesamiento de hidrólisis ácida.</u>	28
<u>4.4 Producción de carotenoides utilizando <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en el medio de cultivo producido</u>	30
<u>4.5 Extracción y cuantificación de carotenoides producidos por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i></u>	30
<u>4.6 Producción de carotenoides utilizando <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> con biomasa de <i>Synechocystis sp.</i> PCC6803</u>	31
<u>4.7 Manejo y disposición de residuos</u>	32
<u>RESULTADOS Y DISCUSIONES</u>	32

<u>5.1</u>	<u>Monitorear condiciones de crecimiento de <i>Synechocystis sp</i>, como temperatura, luz, crecimiento y dióxido de carbono</u>	33
<u>5.3</u>	<u>Producción, extracción y cuantificación de carotenoides utilizando <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> en el medio de cultivo producido</u>	41
<u>4.8</u>	<u>Producción de carotenoides utilizando <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> con biomasa de <i>Synechocystis sp. PCC6803</i></u>	42
<u>4.9</u>	<u>Relación entre CO₂ asimilado por <i>Synechocystis sp. PCC6803</i> y carotenoides obtenidos.</u>	52
	<u>CONCLUSIONES</u>	53
	<u>REFERENCIAS</u>	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica del metabolismo fotosintético en *Synechocystis sp.* PCC 6803. (Tomado de: (Knoot *et al.*, 2018))

Figura 2. Estructura de a) β -caroteno, b) toruleno, c) torularodin.

Figura 3. Curva de crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis sp.* PCC 6803 en el medio de cultivo BG-11.

Figura 4. Intensidad lumínica durante el periodo de incubación, la medición se realizó con sensor cuántico Apogee modelo: MQ-200X en las siguientes coordenadas: 25°45'50.1"N 100°07'23.7"W.

Figura 5. Monitoreo de la concentración de CO₂ utilizando un medidor de dióxido de carbono Temtop modelo: M2000. Tiempo negativo indica antes del inicio de la incubación.

Figura 6. Efecto de la concentración de la biomasa sobre el porcentaje de hidrolizado. Mismas letra o número no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Figura 7. Azúcares reductores obtenidos después del proceso de hidrólisis ácida térmica. Mismas letra o número no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Figura 8. Producción de carotenoides por cada medio de cultivo y rendimiento respecto a la biomasa de la levadura. Mismas letra o número no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Figura 9. Células presentes en los medios de cultivo observadas a 100x. a) Células vivas de *Synechocystis sp.*, b) Células de *R. mucilaginosa* en BE+R, c) Células de *R. mucilaginosa* en agua, d) Células de *R. mucilaginosa* en sobrenadante y e) Células de *R. mucilaginosa* en medio YM (Como referencia).

Figura 10. Células vivas de *Synechocystis sp.*, analizadas mediante citometría de flujo. a) muestra complejidad con respecto al tamaño b) intensidad de fluorescencia, c) Dispersión del tamaño.

Figura 11. Células esterilizadas de *Synechocystis sp.*, analizadas mediante citometría de flujo. a) muestra complejidad con respecto al tamaño b) intensidad de fluorescencia, c) Dispersión del tamaño.

Figura 12. Células de *R. mucilaginosa* analizadas mediante citometría de flujo. a) muestra complejidad con respecto al tamaño b) intensidad de fluorescencia, c) Dispersión del tamaño.

Figura 13. Células de *R mucilaginoso* analizadas mediante citometría de flujo. a) muestra complejidad con respecto al tamaño b) intensidad de fluorescencia, c) Dispersión del tamaño.

Figura 14. Fotografías de la concentración y formación de pellet a partir de los tratamientos realizados: A) BE+R: biomasa de la cianobacteria estéril y *Rhodotorula mucilaginoso*, B) agua, C) BE: biomasa de la cianobacteria estéril y D) sobrenadante.

Figura 15. Biomasa en peso seco obtenida después de la incubación. BE+R: Biomasa estéril con *R. mucilaginoso*, Agua y sobrenadante. Mismas letra o número no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Figura 16. Producción de carotenoides por cada medio de cultivo y rendimiento respecto a la biomasa de la levadura. Mismas letra o número no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

LISTA DE TABLAS

Tabla. 1. Métodos de conversión, separación y captura para el CO₂

Tabla 2. Composición del medio de cultivo BG-11 (Rippka, Deruelles and Waterbury, 1979).

Tabla 3. Comparativa de medios de cultivo a partir de residuos para la producción de carotenoides

NOMENCLATURA

ORGANISMOS

Synechocystis sp. PCC 6803 (ATCC 27184)

Rhodotorula mucilaginosa UANL-001L

SIGLAS

BG-11:(*ing*).

Blue-Green Medium, Medio verde azulado.

YM:(*ing*).

Medio de cultivo de malta de Yeast Malt.

PAR:

Radiación fotosintética activa.

UNIDADES

cm:

Centímetros.

h:

Horas.

kg:

Kilogramos.

min:

Minutos.

mL:

Militros.

ng:

Nanogramos.

nm:

Nanometros.

pH:
Potencial de hidrógeno.

ppm:
Partes por millón.

rpm:
Revoluciones por minuto.

s:
Segundos.

μm :
Micrómetros.

μM :
Micromolar.

μL :
Microlitros.

μg :
Microgramos.

$^{\circ}\text{C}$:
Grados Celsius.

%:
Por ciento.

CaCO_3 :
Carbonato de Calcio.

Ca(OH)_2 :
Hidróxido de Calcio.

:
Microeinsteins por segundo por metro cuadrado.

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: Estrategia para la conversión del CO₂, asimilado por *Synechocystis* sp. PCC 6803, en carotenoides utilizando *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L

Número de páginas: 62

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de estudio: Procesos biotecnológicos

El componente principal que propicia la intensificación de los gases de efecto invernadero y ocasiona el cambio climático es el dióxido de carbono. Debido a la actividad humana, las emisiones de CO₂ han incrementado hasta en un 68% en los últimos 21 años. Tan solo en el año 2000 se reportaron emisiones de 25.45 billones de toneladas, mientras que en el año 2021 se reportaron emisiones de 37.12 billones de toneladas.

Distintas tecnologías han sido aplicadas para la captura del dióxido de carbono. Destacando el uso de microalgas o cianobacterias, que cuenta con un gran potencial para la producción de sustancias aprovechables, desde productos alimenticios hasta biocombustibles. Se ha reportado que la biomasa de *Synechocystis* sp. PCC6803 está compuesta por 51.38 % C, 6.8% H, 11.29% N, 27.51% O, y 3.3% de otros elementos. Esto indica que la mitad de la biomasa de la cianobacteria proviene del dióxido de carbono asimilado. Los carbohidratos, al ser sometidos a un pretratamiento, pueden ser convertidos en azúcares metabolizables. Una de las estrategias es un tratamiento ácido-

térmico, en el cual se utiliza ácido sulfúrico acompañado de incrementos de temperatura en autoclave para hidrolizar los carbohidratos presentes en la biomasa. Después de neutralizarlos con algún agente basificante, pueden ser utilizados como fuente de carbono.

En el presente trabajo, se comprobó la capacidad de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L para la producción de carotenoides a partir de hidrolizados de biomasa y células previamente esterilizadas de *Synechocystis sp.* PCC6803. Se destacó el hidrolizado del cultivo de la cianobacteria con 30 días de incubación para la obtención de 1 g/L de azúcares reductores, la generación de biomasa 3 veces mayor al crecimiento sin la presencia de biomasa estéril de la cianobacteria y producción de carotenoides en los medios producidos (hasta 6 µg) y en biomasa estéril de la cianobacteria (15 µg).

INTRODUCCIÓN

1.1. Dióxido de carbono

A nivel mundial, los gases que ocasionan el efecto invernadero lo componen el dióxido de carbono, el cual se encuentra en una mayor proporción (74.4 %), el metano, con una contribución del 17.3 %, el óxido de nitroso con una proporción del 6.2 % y finalmente otros gases que conforman el restante 2.1 %. A su vez, el componente principal que propicia la intensificación de los gases de efecto invernadero es el dióxido de carbono (Ritchie, Roser and Rosado, 2020). En el año 2019, México reportó emisiones de 438.5 millones de toneladas de dióxido de carbono, y de acuerdo con "*The Global Gridded Model of Carbon Footprints (GGMCF)*", en 2018 la Ciudad de México, Monterrey y Guadalajara reportaron una liberación de 55.5, 16.6 y 15.1 millones de toneladas de CO₂, respectivamente; convirtiéndolas así en las ciudades con mayor huella de este compuesto en México, ocupando el lugar 37, 146 y 158 del ranking mundial.

1.2. Métodos de captura para el CO₂

Distintas tecnologías han sido aplicadas para la captura del dióxido de carbono (Tabla 1); sin embargo, en este proyecto, nos enfocaremos en las tecnologías que utilizan la captura y aprovechamiento del dióxido de carbono mediante el uso de cianobacterias. La separación criogénica es la tecnología que presenta la mayor eficiencia de captura, pero requiere un alto consumo de energía, al igual que requiere de un pretratamiento a los gases para evitar congelamiento del agua y el mantenimiento de los intercambiadores de

calor. Estos altos costos energéticos resaltan en la implementación de los distintos métodos de captación (Singh and Dhar, 2019).

Tabla. 1. Métodos de conversión, separación y captura para el CO₂

Método	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencias
Adsorción	Utiliza sólidos adsorbentes como carbón activado, zeolita, etc.	Baja generación de residuos	Energía ineficiente, pretratamiento de gases de combustión debido al contenido de humedad y presencia de contaminantes (por ejemplo, SO _x y NO _x)	(Li et al., 2008) (Hunt et al., 2010) Pires <i>et al.</i> , 2011
Absorción química	Líquido iónico para la absorción.	Ambientalmente más seguro como sustituto del uso de solventes peligrosos	Costoso y difícil de escalar	(Ziobrowski, Krupiczka and Rotkegel, 2016)
Tecnología de membrana	Separación al pasar por una membrana que actúa como filtro con permeabilidad selectiva. Normalmente se utilizan membranas poliméricas.	Alta eficiencia de separación. Pequeños requisitos de instalación.	Consume mucha energía ya que la refrigeración de los gases de combustión es esencial, el alto contenido de humedad en los gases de combustión afecta el rendimiento de la membrana debido a la absorción competitiva y la plastificación del polímero y el alto costo de la membrana, el	Scholes <i>et al.</i> , 2009 Pires <i>et al.</i> , 2011 (Lam, Lee and Mohamed, 2012)

			ensuciamiento de la membrana y la alta superficie de la membrana son requisitos.	
Separación criogénica	Refrigeración y condensación consecutivas de la mezcla de gases a diferentes temperaturas de condensación para separar el CO ₂ .	Alta eficiencia de captura (hasta 99,9%)	Alto requerimiento de energía para refrigeración, se requiere la eliminación de la humedad de los gases de combustión antes del enfriamiento para evitar taponamientos por formación de hielo, acumulación de CO ₂ continuamente en las superficies del intercambiador de calor y debe eliminarse.	(Tuinier et al., 2010) (Lam, Lee and Mohamed, 2012)
Captura y utilización de carbono a base de microalgas y cianobacterias	Bioconversión de CO ₂ en biocombustibles y otros productos.	Altamente eficiente en una amplia gama de concentraciones de CO ₂ . Tasa de crecimiento más rápida que las plantas. No se requiere tierra cultivable. Coproducción de alimentos, biocombustibles y productos de valor añadido.	Sistemas de cultivo complejo y procesamiento posterior, sensible a otros componentes de los gases de combustión (NO _x , SO _x).	Harun <i>et al.</i> , 2010 (Kao et al., 2014) (Singh, Tripathi and Thakur, 2014) Varshney <i>et al.</i> , 2014

La captura y utilización de carbono a través de microalgas y cianobacterias tiene la principal ventaja de lograr la conversión del CO₂ en biomasa, distintos metabolitos y productos biotecnológicos finales. A su vez, se ha reportado que las cianobacterias pueden lograr una eficiencia de conversión de CO₂ cercana al 92.2 % (Lam and Lee, 2013). Entre las cianobacterias y microalgas, hay diferencias notables. Las primeras son organismos procariotas, mientras que las microalgas son células eucariotas. Aunque ambas tienen la capacidad de utilizar el dióxido de carbono y luz para crecer y desarrollar sus funciones metabólicas, los tiempos de duplicación son distintos en ambos; por ejemplo, las cianobacterias tardan 4 horas en replicarse, mientras que las microalgas tardan 6 horas y las células de plantas necesitan un tiempo casi 4 veces mayor (24 horas) (Brasil et al., 2017).

1.3. Cianobacterias

Las cianobacterias fueron los primeros microorganismos en aparecer sobre la tierra y se sabe que están relacionadas filogenéticamente con las bacterias Gram-positivas (Madigan, M., and Brock, 2009). Tienen la capacidad y la importante labor de producir oxígeno y de fijar CO₂ mediante el ciclo de Calvin catalizado por ribulosa 1, 5-bisfosfato carboxilasa (RuBisCO). Esta enzima es degradada por el oxígeno, sin embargo, *Synechocystis sp.* PCC 6803 ha desarrollado un orgánulo llamado carboxisoma que tiene la capacidad de encapsular y proteger a la RuBisCO (Yu et al., 2013a). Las cianobacterias son de un subgrupo de las bacterias Gram-positivas y se pueden encontrar en la mayoría de los ambientes acuáticos, en gran variedad de ambientes y bajo innumerables condiciones. Por tal motivo, presentan una gran aplicabilidad tecnológica ya que se ha

demostrado que producen variedades de pigmentos, enzimas y vitaminas. Aunado a esto, los bajos requerimientos nutricionales de las cianobacterias han justificado la posibilidad de escalar su producción y uso a nivel industrial. (Kima et al., 2016). Entre las especies más utilizadas para expresión de proteínas, fármacos, vitaminas, biomasa, biofertilizantes, colorantes, etc. tanto a nivel de investigación como industrial son: *Spirulina*, *Nostoc*, *Synechococcus elongates* y *Synechocystis sp.* PCC 6803 (Kima et al., 2016).

1.4. *Synechocystis sp.* PCC 6803.

Synechocystis sp. PCC 6803 es una cianobacteria que tiene la capacidad de crecer foto autotróficamente y foto heterotróficamente, como fuentes de nitrógeno puede utilizar nitrato y amonio, sin embargo, no tiene la capacidad de asimilar N₂ (Yu et al., 2013a). Comúnmente la *Synechocystis sp.* PCC 6803 se cultiva a una temperatura de 30 °C, pH entre 7 y 8 en fotorreactores que contienen medio BG-11 (Tabla 2.), el cual está optimizado para el crecimiento de cianobacterias, ya que su principal característica es que está compuesto por sales (Yu et al., 2013a).

Tabla 2. Composición del medio de cultivo BG-11 (Rippka, Deruelles and Waterbury, 1979).

Componente	Concentración (g/L)	Solución de metales traza	Concentración (g/L)
NaNO ₃	1.5	H ₃ BO ₃	2.86
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.05	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.036	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.039
Ácido cítrico	6x10 ⁻³	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079
Citrato de amonio férrico	6x10 ⁻³	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	49.4x10 ⁻³
EDTA	6x10 ⁻¹		
Na ₂ CO ₃	0.02		

Solución de metales traza	1 (mL)		
---------------------------	--------	--	--

La fotosíntesis en cianobacterias (Figura 1), como *Synechocystis sp.*, se lleva a cabo gracias a la acción de dos fotosistemas principales, el fotosistema I (PSI) y el fotosistema II (PSII), ambos presentes en la membrana tilacoidal y ricos en clorofila. Estos fotosistemas funcionan como complejos recolectores de luz, capturando fotones y convirtiendo su energía en energía química utilizable. El proceso comienza en el PSII, donde la energía de la luz impulsa la oxidación del agua, liberando electrones, protones y oxígeno molecular como subproducto. Los electrones liberados son transferidos a través de una cadena de transporte de electrones, generando un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal. Este gradiente es aprovechado por la enzima ATP sintasa para producir ATP, la moneda energética de la célula. Al final de la cadena de transporte de electrones, los electrones son utilizados para reducir la molécula NADP⁺ a NADPH, otra molécula clave en la fotosíntesis. Tanto el ATP como el NADPH generados en las reacciones dependientes de la luz son posteriormente utilizados en el ciclo de Calvin para fijar el dióxido de carbono y sintetizar azúcares, que son la base de la materia orgánica de la cianobacteria. (Heinz et al., 2016).

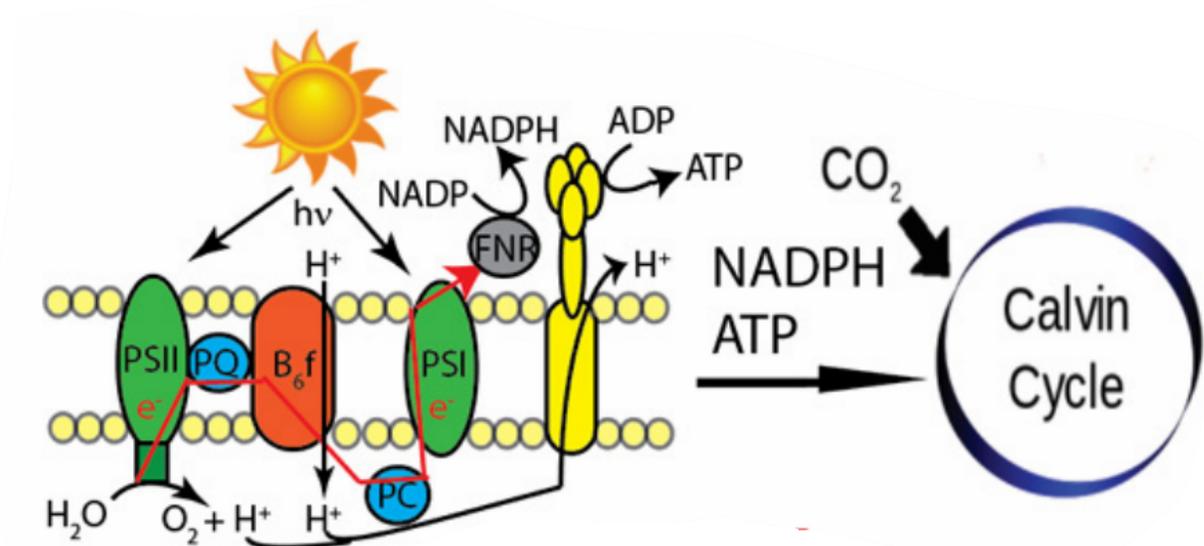


Figura 1. Representación gráfica del metabolismo fotosintético en *Synechocystis sp.* PCC 6803. (Tomado de: (Knoot et al., 2018))

1.5. Pretratamiento a biomasa

Más del 51 % en peso seco de la composición de la biomasa de las cianobacterias y microalgas es carbono, el cual se encuentra presente en forma de carbohidratos, aproximadamente entre un 30 a 50 %. Utilizando tratamientos químicos pueden ser transformados a carbohidratos aprovechables en la fermentación microbiana. A diferencia de la biomasa de las plantas, las cuales contienen materia lignocelulósica formada por sustancias que requieren condiciones extremas para ser hidrolizadas, entre ellas la lignina, la biomasa de las cianobacterias es una alternativa viable para la producción de azúcares fermentables como lo son glucosa, sacarosa, xilosa, fructosa, lactosa entre otros, para ser empleados en distintos procesos microbiológicos (Seon et al., 2020).

La hidrólisis ácida térmica se lleva a cabo sometiendo a la biomasa a distintas concentraciones de ácido nítrico o ácido sulfúrico, llevando la mezcla a distintas temperaturas y tiempos de hidrólisis. Después del proceso, se realiza una neutralización con NaOH, Ca(OH)₂ o CaCO₃ para ajustar el pH. De acuerdo con la literatura, la presencia de sales y neutralizante puede generar inhibición bacteriana, por lo cual se requiere explorar procesos para evitar una concentración excesiva de sales (Seon et al., 2020). Dependiendo de la biomasa utilizada después del proceso de hidrolizado se pueden llegar a obtener azúcares fermentables como glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa (Nguyen et al., 2009).

La biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii* ha sido tratada con ácido sulfúrico para obtener azúcares reductores, la microalga es incubada con presencia de ácido acético para propiciar la acumulación de carbohidratos, posteriormente se probaron una combinación de concentraciones de ácido sulfúrico (1 a 5 %volumen), tiempos de hidrólisis (10 a 40 min) y temperaturas (100, 110 y 120 °C), destacando la liberación máxima de 29.6 g/L de glucosa al ser tratadas con 5 % de ácido sulfúrico, temperatura de 110 °C por 30 minutos, partiendo de 50 g/L de biomasa de la microalga (Nguyen et al., 2009).

Se ha reportado el uso de la biomasa de *Chlorella sp.* ABC-001 para producción de etanol por la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* KL17, dicha biomasa se trató con ácido sulfúrico y ácido nítrico, para ser neutralizados con dos bases distintas (NaOH y $\text{Ca}(\text{OH})_2$), además de emplear un proceso de electrodiálisis para retirar las sales formadas. Las mayores concentraciones de etanol se obtuvieron al utilizar ácido sulfúrico, destacando la neutralización con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ obteniendo 5.5 g/L de etanol y la concentración obtenida de etanol por el medio comercial fue de 6 g/L, dicho experimento comenzó con una concentración de azúcares de 13.5 g/L (Seon et al., 2020).

En el caso de cianobacterias, la cepa *Synechococcus sp.* PCC 7002 fue sometida a un proceso de hidrólisis enzimática utilizando lisozima, por encima de los 40 mg/L de enzima, se obtiene una liberación de glucosa del 65 %. El proceso de hidrólisis conlleva ciclos de calentamiento y enfriamiento (Möllers et al., 2014).

Se ha estudiado el uso de las cianobacterias *Lyngbya limnetica* y *Oscillatoria obscura* para la producción de butanol, partiendo de 4 % de biomasa, 1.63 M de ácido sulfúrico,

100 °C, 60 minutos y siendo neutralizadas con NaOH, la producción de butanol alcanza hasta 8.87 g/L (Kushwaha et al., 2020).

1.6. Rhodotorula mucilaginosa

Rhodotorula mucilaginosa, una de las levaduras rojas, es una levadura prometedora para aplicación industrial en los últimos años, es una levadura oleaginoso y pigmentada clasificada como aerobia facultativa. Puede crecer en ambientes con alta concentración de oxígeno disuelto, así como en aquellos con baja disponibilidad de oxígeno, como por ejemplo ríos, lagos y aguas residuales(Li et al., 2022).

Además, *R. mucilaginosa* se considera un productor natural de tetraterpenoides y presenta distintas ventajas sobre bacterias y plantas en la producción de carotenoides, debido a su forma unicelular, rápidos períodos de duplicación, capacidad para crecer en una amplia gama de sustratos y conveniencia de cultivo en grandes fermentadores(Gualberto et al., 2022)

La cepa de *R. mucilaginosa* a utilizar en este proyecto es la UANL-001L, dicha cepa fue aislada de la región norte de México del río Pesquería en Nuevo León, México, una zona con altas concentraciones de metales pesados y condiciones estresantes de crecimiento. Previamente, se obtuvieron las condiciones óptimas de crecimiento; temperatura de 30 °C, pH de 5 y alcanzando la máxima concentración celular a las 96 horas de cultivo en el

medio Yeast Mold (YM), sin embargo, la cepa ha demostrado capacidades de crecimiento en distintos medios de cultivo (Gonzalez Garza et al., 2016; Torres-Alvarez et al., 2022). La mayor producción de carotenoides, al deberse de un metabolito secundario, es alcanzada en la fase estacionaria, es decir, al alcanzar su máxima densidad celular, por lo cual se recomienda realizar la extracción de estas moléculas entre 24 y 48 horas después de entrar a la fase estacionaria (Tkáčová et al., 2015)

1.7. Carotenoides

Los carotenoides son importantes pigmentos que se encuentran de manera natural en el ambiente, pueden ser de color rojo, naranja y amarillo, tradicionalmente son ampliamente utilizados en el sector comercial. Los carotenoides son considerados pigmentos terpenoides C40 sintetizados a partir de dos moléculas de un pirofosfato de geranylgeranilo. Según su estructura, se dividen en carotenos y xantofilas. La cadena de caroteno consta de carbono e hidrógeno (β -caroteno, toruleno), mientras que las xantofilas unen el oxígeno en el grupo funcional como carboxi, oxi o hidroxilo (Tkáčová et al., 2015). Existen más de 600 moléculas con distintas funciones como la absorción de luz ultravioleta, proporcionan grandes beneficios para la salud humana debido a su actividad antioxidante, son precursores de vitamina A, e incluso para la atracción de animales e insectos, como es el caso de promover la polinización en las plantas (Tkáčová et al., 2015)

Los carotenos de mayor importancia comercial son β -caroteno, empleado como aditivos alimenticios para consumo en general, pigmentos y aditivos en la formulación de cosméticos, aditivo de fármacos, antioxidante en distintos productos naturistas y entre otros usos (Packer, Hiramatsu and Yoshikawa, 1999).

La estructura química se caracteriza por tener una cadena de carbonos unidos por doble enlace (Figura 2), estructuras que otorgan su potencial antioxidante y su coloración (Packer, Hiramatsu and Yoshikawa, 1999).

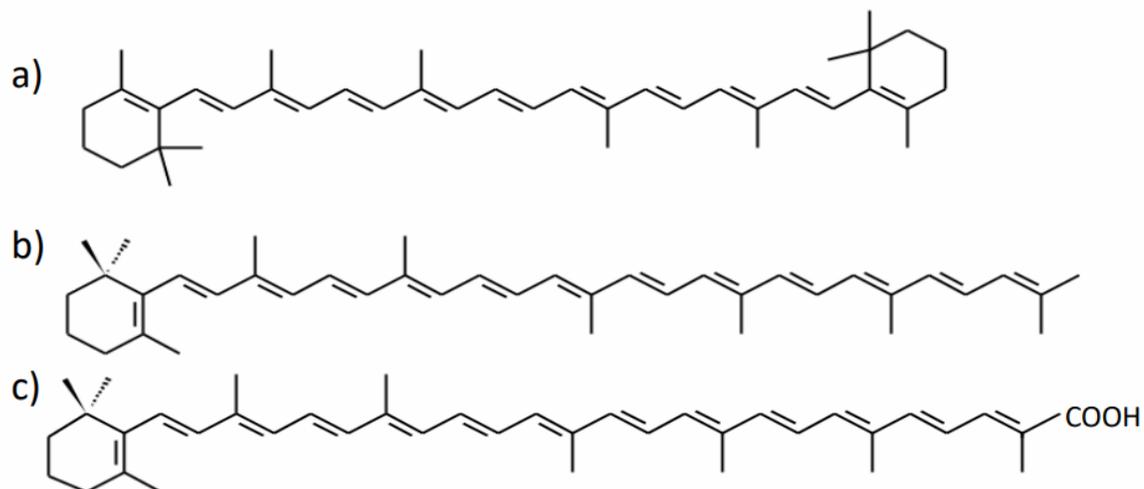


Figura 2. Estructura de a) β -caroteno, b) toruleno, c) torularodin.

El proceso industrial de obtención de estos carotenoides se puede dividir en dos tipos o enfoques; el primero mediante procesos biotecnológicos utilizando microorganismos que son capaces de acumular pigmentos, el segundo se da a partir de materiales vegetales, representando solamente el 2 % de producción (Voutilainen et al., 2006). De las plantas más utilizadas para la extracción se encuentran la azafrán y paprika, sin embargo, depende de las condiciones climatológicas, los ciclos de agricultura y cosecha (Maldonade, Rodriguez-Amaya and Scamparini, 2008). El enfoque biotecnológico cubre varios productores microbianos como levaduras, hongos, bacterias y algas. La producción de carotenoides en levaduras está principalmente generada por cepas pertenecientes al género *Rhodotorula sp.*, *Rhodospiridium sp.* y *Sporobolomyces sp.*

para la síntesis de β -caroteno, γ -caroteno, torulene y torularhodin, y *Xanthophylomyces sp.* para la formación de astaxantina (Kot et al., 2016).

Se han utilizado distintos medios de cultivo a partir de residuos para la producción de carotenoides, en la siguiente tabla se muestra un resumen de los medios de cultivo empleados, así como el rendimiento de carotenoides.

Tabla 3. Comparativa de medios de cultivo a partir de residuos para la producción de carotenoides

Cepa	Medio de cultivo	Rendimiento de carotenoides $\mu\text{g/g}$	Consideración	Referencia
<i>R. glutinis</i>	Suero de queso salado	512	NaCl al 1 %	(Kanzky <i>et al.</i> , 2015)
<i>R. mucilagenosa</i>	Suero de queso salado	378	NaCl al 8 %	(Kanzky <i>et al.</i> , 2015)
<i>R. mucilagenosa UANL001</i>	Extracto de cáscara de plátano	317	200 g/L de cáscara de plátano	(Torres-Alvarez <i>et al.</i> , 2022)
<i>R. mucilagenosa</i>	Extracto de alperujo	700	30 g/L de alperujo	(Ghilardi <i>et al.</i> , 2020)

En los distintos medios de cultivo se han suministrado nutrientes adicionales para mejorar el crecimiento de levadura o bien propiciar la acumulación de carotenoides, se han probado extractos de residuos de fruta y efluentes de desecho, sin embargo, no hay antecedentes del uso de biomasa de una cianobacteria o el hidrolizado de biomasa para la obtención de carotenoides.

Por tal motivo el presente trabajo de investigación se propone explorar una nueva vía para la producción sostenible de carotenoides, aprovechando la capacidad de las cianobacterias para fijar CO_2 y la capacidad de las levaduras para transformar sustratos en metabolitos de valor. Específicamente, se evaluará la factibilidad de utilizar la biomasa de la cianobacteria *Synechocystis sp.* PCC 6803, ya sea directamente o tras un proceso de hidrólisis, como sustrato para el crecimiento y la producción de carotenoides

por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L. Esta estrategia innovadora busca no solo ofrecer una alternativa sostenible para la obtención de carotenoides, sino también contribuir a la mitigación del cambio climático mediante la valorización del CO₂.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La biomasa de *Synechocystis sp.* PCC608 puede ser convertida a carotenoides utilizando *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L

3.2 Objetivo general

Convertir el dióxido de carbono asimilado por *Synechocystis sp.* en carotenoides utilizando *Rhodotorula mucilaginosa*.

3.3 Objetivos específicos

- 3.3.1 Monitorear condiciones de crecimiento de *Synechocystis sp.*, como temperatura, luz, crecimiento y dióxido de carbono.
- 3.3.2 Obtener un medio de cultivo con azúcares reductores a partir de la biomasa de *Synechocystis sp.*, sometida a un procesamiento de hidrólisis ácida.
- 3.3.3 Obtener carotenoides utilizando *Rhodotorula mucilaginosa* en el medio de cultivo producido por hidrólisis ácida.
- 3.3.4 Evaluar la síntesis de carotenoides utilizando *Rhodotorula mucilaginosa* a partir de biomasa estéril de *Synechocystis sp.*
- 3.3.5 Extraer y cuantificar carotenoides producidos por *Rhodotorula mucilaginosa*
- 3.3.6 Relacionar el CO₂ asimilado por *Synechocystis sp.* PCC6803 con los carotenoides obtenidos.

METODOLOGÍA

4.1 Materiales, reactivos y equipos.

Para las diversas pruebas a realizar en el presente proyecto se utilizó el siguiente material: Cajas Petri de plástico marca VWR, matraces Erlenmeyer de 125, 250 y 500 mL marca PYREX, tubos de ensayo de 15 y 50 mL marca Corning, placas de 96 pocillos marca Corning, celdas para espectrofotómetro de 10mm marca Brand, micropipetas de 0.1-2.5, 0.5-10, 2-20, 10-100, 20-200, 100-1000 µL y 0.5-5 mL con sus

respectivas puntillas marca Eppendorf, frascos de vidrio con rosca de 250 y 1000 mL marca DURAN, tubos para microcentrífuga de 0.2, 0.6 y 1.5 mL, membrana de filtración Supor-450 47mm 0.45 μ m marca PALL, filtros para jeringa estéril de PES 0.22 μ m 30mm de diámetro marca CELLTREAT, tubería de precisión Masterflex L/S 16 de silicón curado en platino.

De los reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto se utilizaron: medio de cultivo YM (Difco), agar bacteriológico (BD Bioxon) y medio BG-11 50x (Sigma-Aldrich). Reactivos como sulfato de calcio, NaCl, ácido 3,5 dinitrosalicílico, hidróxido de sodio, glucosa y tartrato de sodio/potasio.

Los equipos utilizados se encuentran en el laboratorio de Biología Sintética y de Sistemas (LBSS) en el Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIByN) dentro del Parque de Investigación e Innovación Tecnológica (PIIT): Incubadora estática y con agitación marca LAB TECH modelo LSI-3016R, autoclave automática marca JEIO TECH modelo AAHL1035K, refrigerador y congelador marca Norlake, espectrofotómetro Optizen 2120 UV Plus, lector de placas Multiskan GO marca Thermo Scientific, centrifuga con refrigeración LEGEND XFR de Thermo Scientific, balanza analítica AND modelo GR-200, campana de flujo laminar nivel II de LABCONCO, ThermoMixer C de eppendorf, microscopio MICROMASTER de Fisher Scientific y Vortex Genie de Scientific Industries.

4.2 Monitorear condiciones de crecimiento de *Synechocystis sp.*

Se realizaron 2 cultivos de *Synechocystis sp.* en frascos de 3.78 L con 2 L de medio BG-11 (Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution, C3061 de Sigma-Aldrick), partiendo de

una densidad óptica medida a 730 nm de 0.15 y una temperatura ambiente de 28 ± 2 °C, se inyectó aire proveniente del ambiente previamente esterilizado por filtración a razón de 450 ccm, además, se monitoreó la concentración de dióxido de carbono en partes por millón (ppm) utilizando un medidor Temtop modelo: M2000, se midió la intensidad de luz en $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizando un Quantum Separate Sensor de la marca Apogee modelo: MQ-200X, la medición de intensidad lumínica correspondiente a las siguientes coordenadas: 25°45'50.1"N 100°07'23.7"W. Se tomaron muestras diariamente de 1 mL del cultivo para medir la densidad óptica a 730 nm y se detuvo la incubación al iniciar la fase estacionaria 10 días y el otro cultivo en fase estacionaria tardía después de 30 días.

Una vez concluido el proceso de incubación se realizó una concentración de la biomasa mediante centrifugación, esta consistió en dos procesos; el primero utilizando frascos con volumen de 200 mL para recolectar el volumen total del cultivo, el segundo utilizando tubos Falcón de 50 mL para determinar la concentración de biomasa en el medio de cultivo, ambos procesos fueron sometidos a 10,000 rpm durante 15 minutos, la biomasa recolectada se lavó 3 veces con agua destilada para retirar sales, la biomasa de los tubos Falcón se transfirió a microtubos de 1.5 mL previamente pesados y se llevaron a liofilizar durante 48 h con las condiciones de 0.31 mBar y -50 °C.

4.3 Obtención de un medio de cultivo con azúcares reductores a partir de la biomasa de *Synechocystis sp.* PCC6803, sometida a un procesamiento de hidrólisis ácida.

Se caracterizó la biomasa *Synechocystis sp.* PCC6803 dicha determinación analítica se realizó mediante un Analizador Perkin Elmer PE2400, el cual proporciona información del contenido porcentual de Carbono, Hidrógeno, Nitrógeno y Azufre presente en la muestra. Para ello se pesaron 3 mg de biomasa previamente liofilizada bajo los

siguientes parámetros analíticos: Helio como gas portador, 82,2 °C en la columna cromatográfica, detector de conductividad térmica, temperatura del reactor de combustión 975 °C, 501 °C en el reactor de reducción y un tiempo de análisis de 430 s.

Se mezclaron 0.4 g de biomasa previamente liofilizada en 40 mL de agua con 5 % volumen-volumen de ácido sulfúrico concentrado, además, como control negativo se tomaron 40 mL agua y se adicionó con la misma proporción de ácido sulfúrico, los procesos se realizaron por triplicado y fueron llevados a la autoclave para ser sometidos a 110 °C durante 30 minutos. Una vez finalizado el proceso se realizó una centrifugación a 8,000 rpm durante 10 minutos para precipitar la biomasa residual y recuperar sobrenadante para ser neutralizado con carbonato de calcio hasta un rango de pH entre 5.5 y 6.5. Se realizó otra centrifugación para retirar el precipitado (Sulfato de calcio), al sobrenadante se le registró una vez más el pH y se esterilizó mediante filtración a 0.22 μ m, los filtrados se analizaron con la técnica DNS de Miller en 1959, adaptada para el uso en microplaca por Bener en 2018, se tomaron 25 μ L de muestra junto a 25 μ L del reactivo DNS para ser calentados a 95 °C en un Thermomixer durante 5 minutos, inmediatamente se agregaron 250 μ L de agua destilada fría, el volumen total de 300 μ L se analizó en el lector de placas a una longitud de onda de 540 nm. La curva patrón se realizó siguiendo el mismo procedimiento, analizando concentraciones de glucosa de 0 hasta 5 g/L para contar con un estándar y así correlacionar los valores experimentales.

El perfil de carbohidratos se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la composición de azúcares presentes en los medios de cultivo Syn10 y Syn30. Se investigó la presencia de monosacáridos (glucosa, xilosa, arabinosa y fructosa), disacáridos (maltosa) y alcoholes de azúcar (manitol y sorbitol). Las muestras

de ambos cultivos se filtraron a través de membranas de 0.45 μm y 0.22 μm antes del análisis. El sistema de HPLC utilizado fue un Shimadzu Prominence-i LC-2030C plus, equipado con un detector de índice de refracción Shimadzu RID-20° y una columna de separación de iones Pb Rezex RPM-Monosaccharide. La fase móvil consistió en agua al 100 % a un caudal de 0.6 mL/min. La elección de esta técnica analítica permitió la identificación y cuantificación precisa de los diferentes tipos de carbohidratos presentes en los medios de cultivo, proporcionando información sobre la composición de estos y su potencial como sustratos para el crecimiento de microorganismos.

4.4 Producción de carotenoides utilizando *Rhodotorula mucilaginosa* en el medio de cultivo producido

En tubos Falcón de 50 mL se vertieron 20 mL del medio de cultivo producido y del control negativo (Agua + Ácido) y medio Yeast Malt (YM) como control positivo, los 3 tratamientos por triplicado se inocularon con 1 % de un cultivo *overnight* de *Rhodotorula mucilaginosa* y se llevaron a incubar a 28 °C, 600 rpm durante 7 días.

Una vez concluida la incubación se analizaron los cultivos mediante citometría de flujo para verificar el fenotipo y distribución celular.

Pasado el tiempo de incubación se recuperó la biomasa mediante centrifugación a 10,000 rpm@10 min y se realizaron 3 lavados con agua desionizada y se llevaron a liofilizar durante 48 h con las condiciones de 0.31 mBar y -50 °C para determinar el peso seco de la biomasa.

4.5 Extracción y cuantificación de carotenoides producidos por *Rhodotorula mucilaginosa*

La biomasa liofilizada de *Rhodotorula mucilaginosa* fue resuspendida con 1 mL dimetilsulfóxido (DMSO) a 60 °C, se mezcló en vortex durante 60 segundos y se realizó una centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos para reservar el sobrenadante el cual contiene los carotenoides, dicho proceso se repitió hasta que desaparezca la coloración rosada del pellet celular (Kanzky *et al.*, 2015).

Para la cuantificación de carotenoides se utiliza el coeficiente específico de absorbancia y considera similar al coeficiente de extinción específico, esto indica la absorbancia a 1 % peso/volumen de solución (0.01 g/mL) con 1 cm de *pathway* medido a la longitud de onda respectiva (Britton, 1985). Para calcular la concentración de carotenoides en un volumen determinado se puede hacer uso de la siguiente ecuación [1]:

$$\dots\dots\dots [1]$$

Donde: absorbancia de la muestra medida a 501 nm, volumen total del solvente utilizado (mL) y coeficiente de extinción específico (2040 g⁻¹)

Para obtener la relación masa de carotenoides y biomasa, se multiplicó por el volumen total extraído y divide entre la biomasa en peso seco previamente obtenida (Kanzky *et al.*, 2015).

4.6 Producción de carotenoides utilizando *Rhodotorula mucilaginosa* con biomasa de *Synechocystis sp.* PCC6803

Partiendo de los datos previamente presentados, se utilizó un cultivo de *Synechocystis sp.* en matraz de 1 L con 0.5 L de medio BG-11 (Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution, C3061 de Sigma-Aldrick), partiendo de una densidad óptica medida a 730 nm

de 0.15, a 28 °C, 150 rpm, 80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 50 días de incubación. Se realizó el proceso de liofilización de biomasa previamente descrito para obtener la concentración de ésta.

Se realizaron tres tratamientos, cada uno por triplicado: 1. biomasa de la cianobacteria viva (BV), 2. biomasa sometida a un proceso de esterilización (BE+R) por calor húmedo a 121 °C por 15 min, 3. agua destilada estéril (Agua) y 4. el sobrenadante (Sobrenadante) del medio de cultivo de la cianobacteria, en todos los tratamientos se utilizaron 50 mL, se incubaron por 20 días a 28 °C, 150 rpm, 80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y se inocularon un 1 % de un cultivo de *R. mucilaginosa* UANL001, además de un tratamiento 5 control de biomasa estéril sin inocular (BE).

Una vez concluida la incubación se determinó la biomasa en peso seco, se extrajeron los carotenoides con el procedimiento antes mencionado y se analizaron los cultivos mediante citometría de flujo para verificar la distribución celular.

4.7 Manejo y disposición de residuos

Los residuos generados durante la realización del proyecto de investigación (tales como soluciones alcohólicas, reacciones de síntesis y residuos biológico-infecciosos) fueron gestionados de acuerdo con las características de estos, 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, basándonos en la Norma PR-CLB-SRR-000

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Monitorear condiciones de crecimiento de *Synechocystis sp.*, como temperatura, luz, crecimiento y dióxido de carbono

Se obtuvo una gráfica de crecimiento a partir del monitoreo de *Synechocystis sp.*, bajo condiciones no controladas en el laboratorio (Figura 3), la fase estacionaria en nuestro cultivo se alcanzó al día 10 de incubación, mostrando la típica tendencia del crecimiento bacteriano, la temperatura del medio de cultivo se mantuvo a 28 ± 2 °C, la intensidad lumínica medida como actividad fotosintética (PAR) en promedio fue de 43 ± 18.5 con fotoperiodos naturales de 11:13 luz-oscuridad (Figura 4), la concentración promedio de CO₂ en el laboratorio fue de 1088.5 ± 302.7 ppm (Figura 5).

OD

Figura 3. Curva de crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis sp.* PCC 6803 en el medio de cultivo BG-11.

Actividad fotosintética (PAR), m²s

Figura 4. Intensidad lumínica durante el periodo de incubación, la medición se realizó con sensor cuántico Apogee modelo: MQ-200X en las siguientes coordenadas: 25°45'50.1"N 100°07'23.7"W.

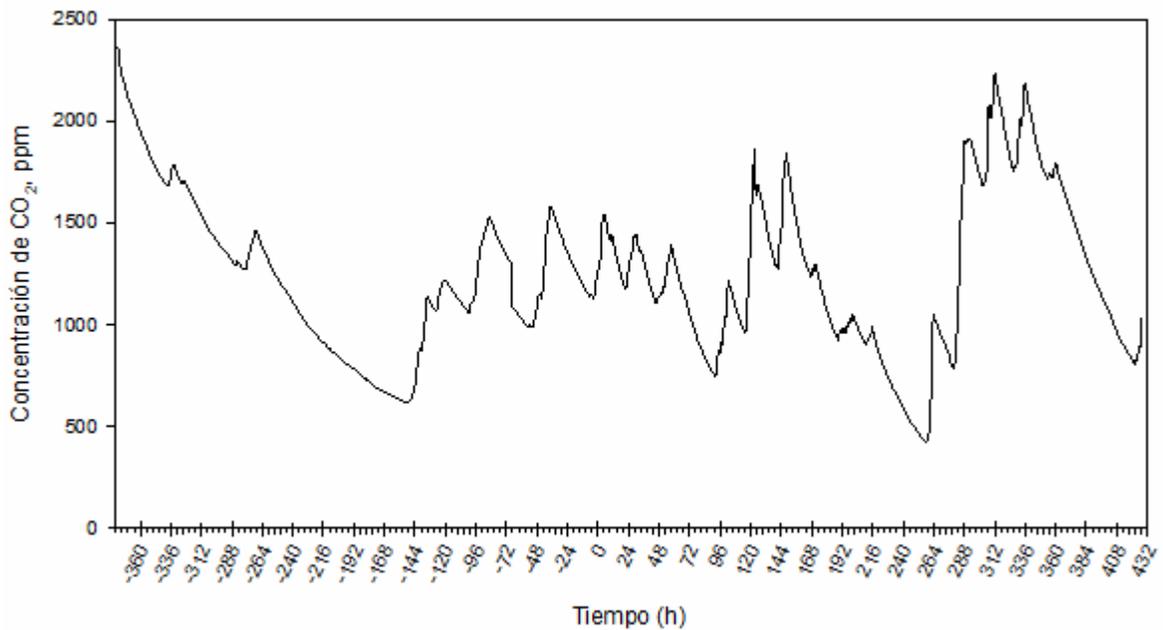


Figura 5. Monitoreo de la concentración de CO₂ utilizando un medidor de dióxido de carbono Temtop

modelo: M2000. Tiempo negativo indica antes del inicio de la incubación.

El tiempo en llegar a la fase estacionaria se asemeja a lo reportado en la literatura, se ha reportado de 8 días con una densidad óptica aproximada de 0.95 utilizando el mismo medio de cultivo (BG-11) y condiciones controladas de 5 %(v/v) de CO₂/aire, 30 °C e intensidad lumínica de 100 (Du *et al.*, 2013), sin embargo, también se ha reportado que la cianobacteria puede alcanzar esta fase a los 13 días de incubación en el medio BG-11 adicionado con buffer HEPES y ajustado a un pH de 7.9, incubado a 25±1 °C, 92.5 y fotoperiodos de 14:10 luz-oscuridad (Patel *et al.*, 2018).

Nuestras condiciones de cultivo para *Synechocystis sp.* son apropiadas para su crecimiento, aunque la temperatura no se mantenga estable, se encuentra dentro de un rango considerado como apropiado (25-30 °C), así mismo, la cianobacteria puede crecer desde temperaturas desde 20 hasta 44 °C (Inoue *et al.*, 2001).

Después de 10 y 30 días se recolectó biomasa, dando como resultado 0.4493±0.011 g/L y 1.0387±0.020 g/L respectivamente, nuestros rendimientos de biomasa se encuentran alejados a lo reportado de 1.186±0.040 g/L en 20 días de incubación (Patel *et al.*, 2018), considerando que la incubación se realizó mediante condiciones controladas, nuestro experimento se utilizó la intensidad lumínica solar con fotoperiodos naturales y carece de la inyección de dióxido de carbono comercial.

5.2 Obtención de un medio de cultivo con azúcares reductores a partir de la biomasa de *Synechocystis sp.*, sometida a un procesamiento de hidrólisis ácida.

La composición química en términos de porcentaje de Carbono (C), Hidrógeno (H), Nitrógeno (N) y Azufre (S) de la biomasa seca de *Synechocystis* sp. PCC 6803 de cultivos Syn10 y Syn30 se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis elemental de biomasa seca de cultivos de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Muestra	%Carbon (C)	%Hidrógeno (H)	%Nitrógeno (N)	%Azufre (S)
Syn10	45.73 ± 0.028	6.650 ± 0.014	10.57 ± 0.042	0.510 ± 0.127
Syn30	47.48 ± 0.071*	6.845 ± 0.021*	10.56 ± 0.099	0.455 ± 0.021

La biomasa seca de Syn10 y Syn30 se obtuvo después de 10 y 30 días, respectivamente, de cultivo.

% peso

Los datos son la media de tres experimentos independientes ± desviación estándar, n = 3.

* Los valores son significativamente diferentes de Syn10 a $p < 0.05$.

La composición elemental de la biomasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 obtenida en este estudio, con un contenido de carbono de alrededor del 45-47%, es ligeramente inferior a los valores reportados en la literatura. Por ejemplo, (Patel et al., 2018) reportaron un contenido de carbono del 51.38% para la misma cepa. Esta discrepancia podría atribuirse a varios factores, incluyendo las condiciones de cultivo específicas utilizadas en cada estudio, como la intensidad de la luz, la disponibilidad de nutrientes y la duración del cultivo.

Nuestros estudios sobre la composición elemental de la biomasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 revelaron niveles similares de C, H, N y S para cultivos cosechados a los 10 días (Syn10) y a los 30 días (Syn30), lo que indica una consistencia en la asimilación y utilización de estos elementos a lo largo del tiempo de cultivo. La estabilidad en los

porcentajes de N y S sugiere una regulación en la incorporación de estos elementos esenciales, independientemente de la duración del cultivo. El aumento en el contenido de carbono en Syn30 en comparación con Syn10 coincide con la fase estacionaria de crecimiento, donde la división celular se ralentiza y los recursos se destinan a la acumulación de reservas energéticas, como la acumulación de carbohidratos, reflejada en el mayor rendimiento de azúcares reductores, podría ser una estrategia de supervivencia de *Synechocystis sp.* en condiciones de limitación de nutrientes, preparándose para eventuales períodos de escasez (Yu et al., 2013b).

Posteriormente para medir el efecto de la concentración de biomasa sobre la cantidad de azúcares reductores después del proceso de hidrólisis térmica (Figura 6), se utilizaron 0.14 %, 0.25 %, 0.56% y 2.25 % de biomasa cultivada a 10 días (Figura 6).

Porcentaje de hidrolizado, %

Figura 6. Efecto de la concentración de la biomasa sobre el porcentaje de hidrolizado. Misma letra indica que no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

El porcentaje de hidrolizado, obtenido al dividir la concentración de azúcares reductores entre la concentración de biomasa, se mantuvo constante en un 15% sin importar la cantidad de biomasa utilizada. Esta observación sugiere que la eficiencia de la hidrólisis ácida no se ve afectada por la concentración inicial de biomasa dentro del rango estudiado. Es importante destacar que este resultado contrasta con el 58 % reportado en el proceso para la biomasa de la cepa *C. reinhardtii* UTEX 90 (Nguyen et al., 2009). Esta discrepancia podría atribuirse a diferencias en la composición de la pared celular de ambas especies, así como a las condiciones de cultivo previas a la hidrólisis, por ejemplo, dicho cultivo fue sometido a distintos factores que ocasionaron acumulación de

carbohidratos tales como el uso de ácido acético glacial en el medio de cultivo y una elevada intensidad lumínica de 450 .

Posteriormente, se utilizó la biomasa obtenida después de la incubación de 10 y 30 días para crear el medio de cultivo Syn10 y Syn30 respectivamente, se analizó la concentración de azúcares reductores mediante el método DNS. La concentración de azúcares reductores liberados fue significativamente mayor en Syn30 (1 g/L) que en Syn10 (0.3 g/L). Esta diferencia podría atribuirse al mayor tiempo de incubación de *Synechocystis sp.* en Syn30 (30 días vs. 10 días en Syn10). Un período de cultivo más prolongado podría haber permitido una mayor acumulación de carbohidratos en la biomasa, resultando en una mayor liberación de azúcares reductores durante la hidrólisis ácida. Esto sugiere que el tiempo de incubación de *Synechocystis sp.* es un factor determinante en la producción de azúcares reductores a partir de su biomasa, los resultados se muestran en la Figura 7, en el tratamiento control negativo (agua) no se decentaron azúcares reductores.

Medio de cultivo

Figura 7. Azúcares reductores obtenidos después del proceso de hidrólisis ácida térmica. Mismas letra o número no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Después de obtener composición elemental y el contenido de azúcares reductores, se procedió a evaluar el perfil de azúcares dentro del medio de cultivo de *Synechocystis* sp. PCC 6803, luego de un período de crecimiento de 10 y 30 días (Syn10 y Syn30, respectivamente). Como se delinea en la Tabla 5, los sacáridos predominantes producidos en el medio Syn10 fueron maltosa, constituyendo 67.63 %, y glucosa, formando 32.37 % de los azúcares totales. En contraste, el medio Syn30 exhibió una distribución de maltosa en 62.12 %, glucosa en 34.39 % y la emergencia de fructosa en 3.5%. En particular, la maltosa fue identificada como el disacárido más prevalente, y la presencia de fructosa se observó exclusivamente en las muestras Syn30.

Tabla 5. Contenido relativo de azúcares en medio de cultivo a partir de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

	Mal	Glc	Xyl	Ara	Fru	Man	Sor
Syn 10	67.63%	32.37%	ND	ND	ND	ND	ND
Syn 30	62.12%	34.39%	ND	ND	3.5%	ND	ND

ND, no detectado; Mal, Maltosa; Glc, Glucosa; Xyl, Xilosa; Ara, Arabinosa; Fru, Fructosa; Man, Manitol; Sor, Sorbitol.

La composición de azúcares en los medios de cultivo Syn10 y Syn30, derivados de *Synechocystis* sp., difiere de la reportada para *Chlamydomonas reinhardtii* en la literatura, en el caso de *Chlamydomonas*, el azúcar predominante obtenido tras la hidrólisis ácida fue la glucosa, alcanzando hasta 29.6 g/L bajo condiciones optimizadas (Nguyen *et al.*, 2009).

Estas diferencias en la composición de azúcares pueden atribuirse a diferencias en la estructura y metabolismo de ambas especies. *Chlamydomonas reinhardtii* es un alga verde eucariota, mientras que *Synechocystis* sp. es una cianobacteria procariota. La composición de sus paredes celulares y sus rutas metabólicas de síntesis y almacenamiento de carbohidratos son distintas (Seon *et al.*, 2020).

Además, las condiciones de cultivo previas a la hidrólisis también pueden influir en la composición de azúcares. En el estudio de (Nguyen *et al.*, 2009), *Chlamydomonas* fue sometida a condiciones específicas para promover la acumulación de almidón, un polímero de glucosa, lo que explica el alto rendimiento de este azúcar tras la hidrólisis. En contraste, en este estudio, *Synechocystis* sp. fue cultivada en condiciones estándar, lo que podría haber favorecido la producción de maltosa y otros azúcares.

La ausencia de otros azúcares como xilosa y arabinosa, que son comunes en hidrolizados de biomasa lignocelulósica, resalta la diferencia en la composición de la pared celular de *Synechocystis sp.* en comparación con las plantas. La pared celular de esta cianobacteria está compuesta principalmente de peptidoglicano y no contiene lignina, lo que explica la ausencia de estos azúcares (Seon *et al.*, 2020).

5.3 Producción, extracción y cuantificación de carotenoides utilizando *Rhodotorula mucilaginosa* en el medio de cultivo producido

Una vez finalizado el proceso de producción y extracción se cuantificaron los carotenoides con la metodología descrita anteriormente, de acuerdo con lo reportado y esperado, en el medio YM se dio la mayor producción de carotenoides, en el caso de los medios Syn10 y Syn30 no se observa diferencia significativa en la producción de carotenoides. El rendimiento en el medio YM es similar a lo reportado previamente tanto por (Kanzky *et al.*, 2015) y (Torres-Alvarez *et al.*, 2022) que van desde los 350 a 450 $\mu\text{g/g}$, en el caso de los medios producidos (Syn 10 y 30) contamos con 200 $\mu\text{g/g}$ de rendimiento, siendo aproximadamente un 50 % menor con lo previamente reportado por (Torres-Alvarez *et al.*, 2022) y el medio YM.

Figura 8. Producción de carotenoides por cada medio de cultivo y rendimiento respecto a la biomasa de la levadura. Mismas letra o número no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

4.8 Producción de carotenoides utilizando *Rhodotorula mucilaginosa* con biomasa de *Synechocystis sp.* PCC6803

Una vez finalizada la incubación, las células en suspensión se visualizaron en microscopio, la figura 9a son células de *Synechocystis sp.* PCC6803 vivas, presentan su característico color verde, además de estar unidas en dos células, en la figura 10a se compara la complejidad celular (SSC) con respecto a su tamaño (FSC), las células vivas varían tanto en su tamaño y en su complejidad, estando concentradas en la parte central inferior del gráfico, al someterse al proceso de esterilización (Figura 11a) la complejidad es menor y se mantiene estable, pero el tamaño se mantiene sin cambios, ya que no

sufrieron daños estructurales esto se confirma en la figura 10c y 11c, porque muestra la variación de tamaño (FSC).

Synechocystis sp. PCC6803 emite autofluorescencia cuya emisión se aprecia entre 630 y 670 nm debió a la clorofila (Chukhutsina *et al.*, 2015) (figura 9f), en la figura 10b se compara la cantidad de eventos (en este caso células) con respecto a la intensidad de fluorescencia PC5.5 (filtro que capta entre 600 y 700 nm) situándose con una intensidad entre 10^3 y 10^4 , en la figura 11b la intensidad aparece por debajo de 10^3 siendo un indicativo de la degradación de las proteínas como la clorofila y por ende una muerte celular debido a que la clorofila es sensible a factores fisiológicos como el calor la cual provoca la inactivación de la misma (Takahashi, 2018).

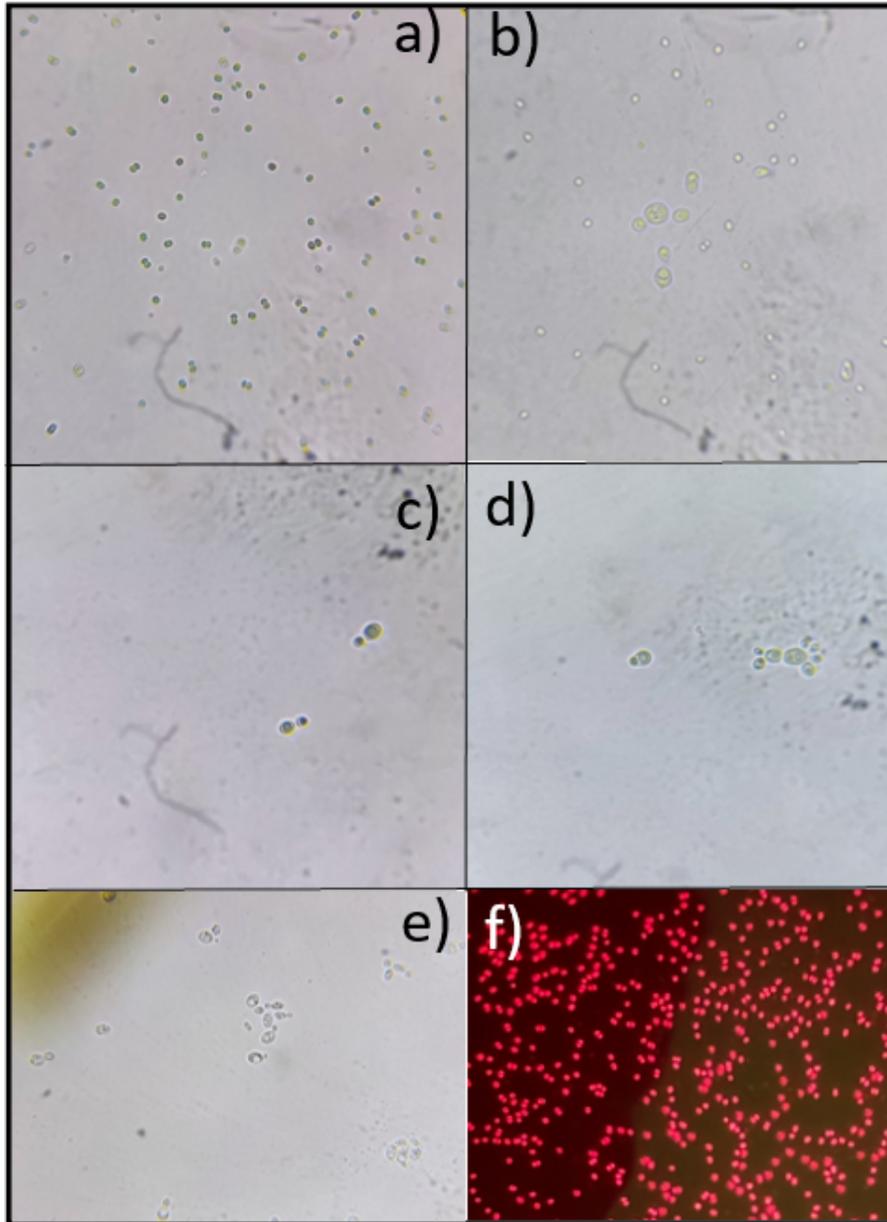


Figura 9. Células de presentes en los medios de cultivo observadas a 100x. a) Células vivas de *Synechocystis sp.*, b) Células de *R. mucilaginosa* en BE+R, c) Células de *R. mucilaginosa* en agua, d) Células de *R. mucilaginosa* en sobrenadante y d) Células de *R. mucilaginosa* en medio YM (Como referencia).

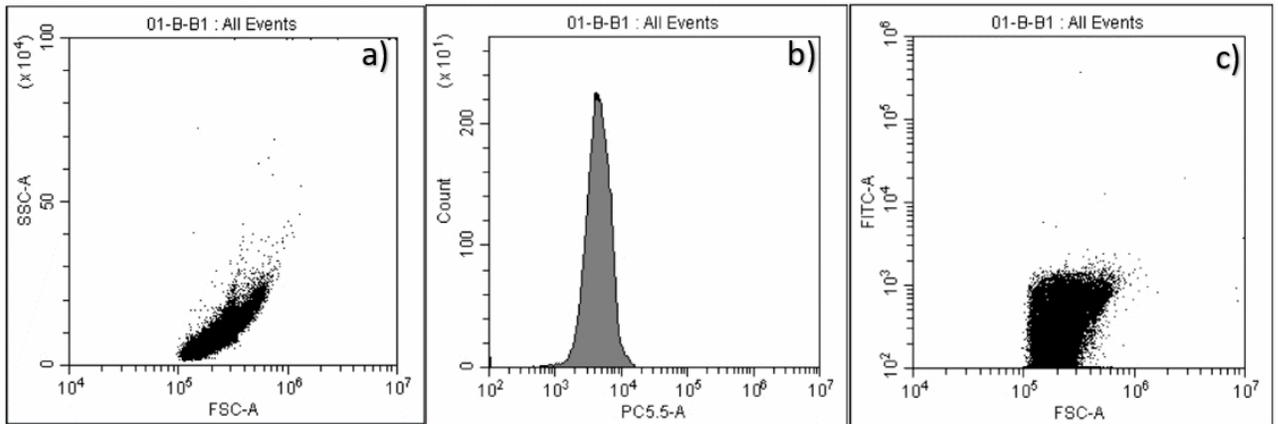


Figura 10. Células vivas de *Synechocystis sp.*, analizadas mediante citometría de flujo. a) muestra complejidad con respecto al tamaño b) intensidad de fluorescencia, c) Dispersión del tamaño.

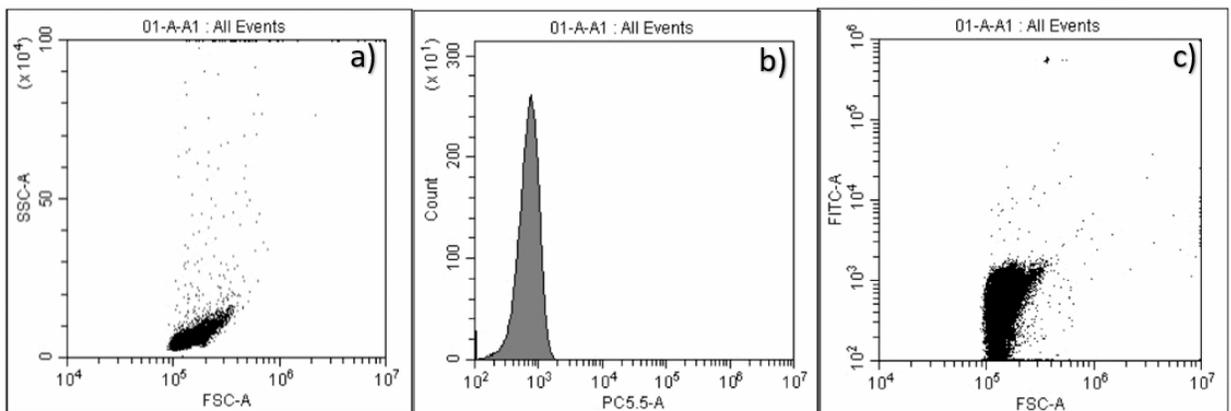


Figura 11. Células esterilizadas de *Synechocystis sp.*, analizadas mediante citometría de flujo. a) muestra complejidad con respecto al tamaño b) intensidad de fluorescencia, c) Dispersión del tamaño.

En el caso de *Rhodotorula mucilaginosa* (Figura 9e) la dispersión celular es mayor en comparación con la cianobacteria, presentando una mayor complejidad y mayor tamaño (figura 12a), nuestra levadura no presenta fluorescencia por lo cual la población aparece por debajo de 10^3 (Figura 12b) y gráficamente presenta un mayor tamaño (Figura 12c)

en comparación de las células de *Synechocystis sp* esterilizadas, ya que dichas células aparecen cercanas a 10^5 y en el caso de la levadura están centradas entre 10^5 y 10^6 .

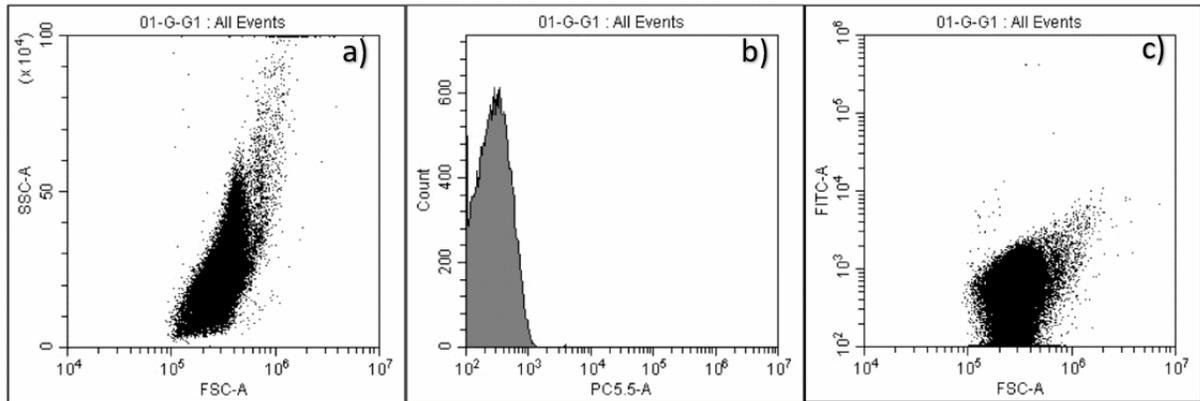


Figura 12. Células de *R mucilaginosa* analizadas mediante citometría de flujo. a) muestra complejidad con respecto al tamaño b) intensidad de fluorescencia, c) Dispersión del tamaño.

En la figura 13a se pueden apreciar las 2 poblaciones, tanto de la cianobacteria y levadura, en la parte inferior se siguen concentrando las células de *Synechocystis sp*, mientras que las células de *R mucilaginosa* se muestran con un mayor tamaño y complejidad, dicho fenómeno lo podemos corroborar en la figura 13c al apreciarse las dos poblaciones de manera explícita, estando a la izquierda con un menor tamaño las células de la cianobacteria y a la derecha con mayor tamaño las células de las levaduras, así como lo muestran la figura 9b.

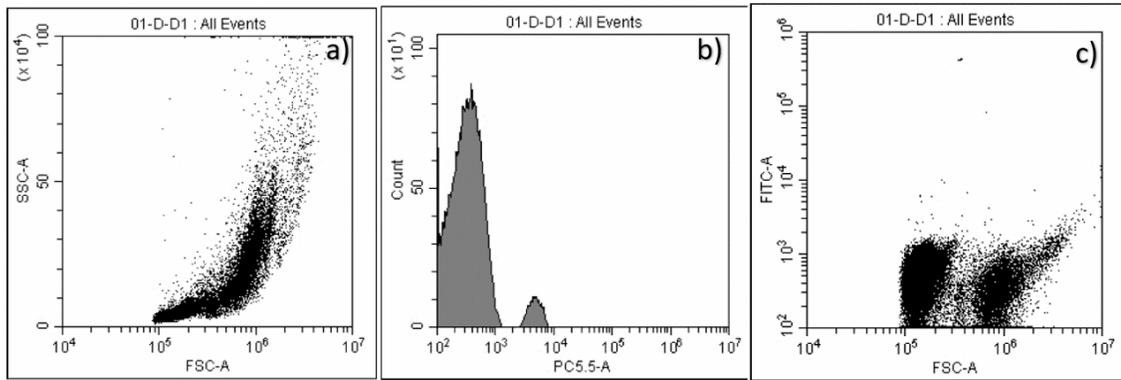


Figura 13. Células presentes en el medio BE+R analizadas mediante citometría de flujo. a) muestra complejidad con respecto al tamaño b) intensidad de fluorescencia, c) Dispersión del tamaño.

Después de incubar los distintos tratamientos se concentró la biomasa a 1 mL de agua destilada, en la Figura 14 se muestran las imágenes de la concentración; la biomasa de *Synechocystis sp.* PCC6803 estéril aparece bajo un color blanco junto a la biomasa de *Rhodotorula mucilaginosa* con un color rosado (BE+R), en el caso de la incubación en el sobrenadante (D) y el agua (B) se observa una coloración rosada con mayor intensidad, y la biomasa estéril de la cianobacteria no presenta coloración (C)

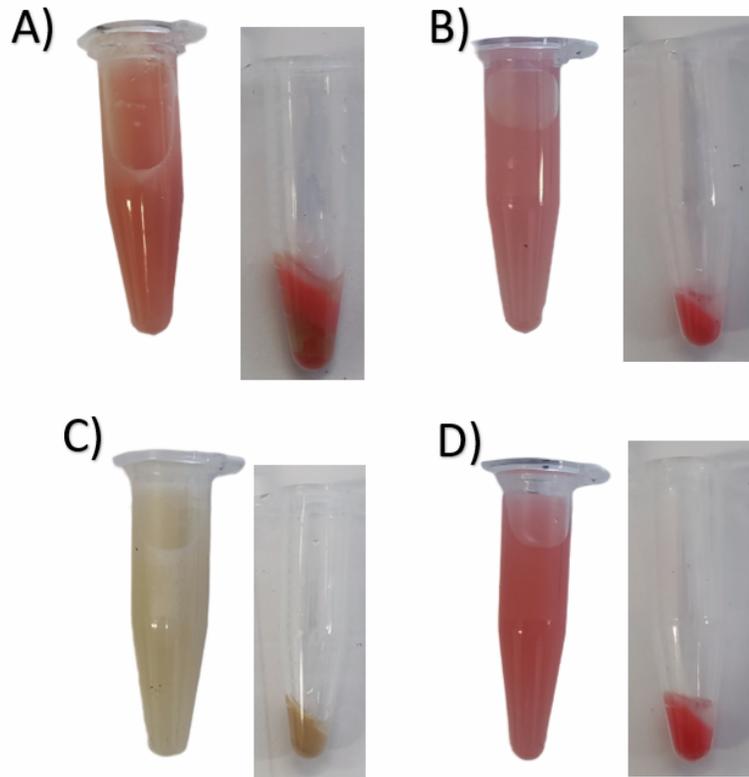


Figura 14. Fotografías de la concentración y formación de pellet a partir de los tratamientos realizados: A) BE+R: biomasa de la cianobacteria estéril y *Rhodotorula mucilaginosa*, B) agua, C) BE: biomasa de la cianobacteria estéril y D) sobrenadante del cultivo de *Synechocystis sp.*

Los resultados obtenidos de la biomasa en peso seco se aprecian en la figura 15, destacando que la cantidad de biomasa utilizada al inicio de la esterilización de *Synechocystis sp.* fue de 31.13 ± 2.63 mg, después del proceso de incubación la biomasa esterilizada y sin inóculo (BE) disminuyó a 16.45 ± 1.34 mg, *Rhodotorula mucilaginosa* logró crecer en el medio de cultivo que contiene células de la cianobacteria esterilizada llegando a 30 mg (se restó 16 mg referente de la biomasa de la cianobacteria) esto indica que la levadura utiliza la biomasa como fuente de alimento, seguido por el sobrenadante del cultivo de la cianobacteria, el crecimiento se puede deber a la presencia de sales del

medio BG-11, muerte celular de la cianobacteria, además, se ha reportado que la cianobacteria tiene la capacidad de liberar polisacáridos al medio de cultivo en condiciones de estrés (Mallick *et al.*, 2020) para ser aprovechados por la levadura. Se presentó biomasa creciendo en agua, debido al medio de cultivo residual del inóculo y bien el aprovechamiento de nutrientes liberado por células de la levadura.

Biomasa en peso seco de *R. mucilaginoso*, mg

Figura 15. Biomasa en peso seco obtenida después de la incubación. BE+R: Biomasa estéril con *R. mucilaginoso*, Agua y sobrenadante. Mismas letra o número no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Una vez finalizado el proceso de extracción de carotenos previamente descrito, se obtuvo una mayor cantidad de carotenoides en el medio que contenía biomasa de *Synechocystis sp.* estéril indicando que *R. mucilaginosa* propicia la degradación celular de la cianobacteria, se reporta ampliamente que *R. mucilaginosa* tiene la capacidad de expresar proteasas (Lario *et al.*, 2015) las cuales pueden degradar a las células de *Synechocystis sp.*

Se cuantificaron los carotenoides presentes en el sobrenadante y agua (Figura 16), estando por debajo de un 50 % de BE+R, en cuanto al rendimiento de carotenoides por biomasa de levadura fue todo lo contrario, en el caso del agua tiene un mejor rendimiento de carotenoides, al no tener nutrientes no es posible realizar la duplicación celular, sin embargo, se da la producción de carotenoides, previamente se ha reportado que fotoperiodos ocasionan estrés en la levadura e incrementando el rendimiento de carotenoides hasta en 254 µg/g (Garcia-Cortes *et al.*, 2021), además hay reportes de que los carotenoides son producidos para evitar daños por especies reactivas de oxígeno y proteger contra la fotooxidación (Moore, Breedveld and Autor, 1989), por tal motivo el agua estaría ocasionando estrés oxidativo en las células manteniéndolas en un estado inerte sin reproducción celular pero acumulando pigmentación, resaltado el prolongado tiempo de incubación de 21 días.

Carotenoides, g

Figura 16. Producción de carotenoides por cada medio de cultivo y rendimiento respecto a la biomasa de la levadura. Mismas letra o número no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

4.9 Relación entre CO₂ asimilado por *Synechocystis sp.* PCC6803 y carotenoides obtenidos.

Para obtener la relación de gramos carotenoides producidos a partir de gramos de dióxido de carbono asimilado se tomó como referencia lo reportado por (Shastri and Morgan, 2005), indican que para condiciones autotróficas sé que por cada gramo de dióxido de carbono asimilado se producen 0.552 g de biomasa, en los experimentos se partieron de 0.4 gramos de biomasa de *Synechocystis sp.* representando 0.7242 gramos de dióxido de carbono. La relación de asimilación de CO₂ de los medios utilizados se presenta en la Tabla 6. Destacando el crecimiento y producción de carotenoides en BE+R de generación de hasta 42 mg/g de dióxido de carbono.

Tabla 6. Relación de biomasa y carotenoides producidos por cada gramo de CO₂.

Medio de cultivo	Biomasa de <i>R. mucilaginosa</i> (mg) ¹	Producción de carotenoides (µg)	Relación de biomasa con CO ₂ ²	Relación de carotenoides con CO ₂ ³
Syn10	16.67±1.52	3.33±0.42	23.01±2.1 1	4.60±0.57
Syn30	15.97±0.51	3.68±0.15	22.02±0.7 1	5.08±0.21
BE+R	30.9±0.07	15.91±0.4	42.66±0.1 0	21.97±0.55

¹ Biomasa en peso seco

² mg de carotenos/g de CO₂

³ µg de carotenos/ g de CO₂

± indican la desviación estándar (n=3)

En el presente trabajo se plantea una estrategia para la conversión de CO₂ en carotenoides, un producto de alto valor, utilizando un enfoque que combina la

cianobacteria *Synechocystis sp.* y la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*. Los resultados obtenidos son alentadores, demostrando la capacidad de *R. mucilaginosa* para crecer y producir carotenoides utilizando la biomasa de *Synechocystis sp.* como sustrato, ya sea directamente o tras un proceso de hidrólisis. Esto sugiere que la estrategia propuesta es viable y tiene potencial para ser escalada a nivel industrial.

Aunque los resultados a nivel de laboratorio son prometedores, es importante evaluar la escalabilidad del proceso a nivel industrial. Se deben realizar estudios en biorreactores a mayor escala para determinar la eficiencia y la productividad del sistema en condiciones más cercanas a las de una aplicación industrial.

El rendimiento de carotenoides obtenido es bajo en comparación con otros estudios. Es necesario optimizar las condiciones de cultivo de ambas especies, así como las estrategias de co-cultivo o de utilización de la biomasa de *Synechocystis sp.*, para maximizar la producción de carotenoides. Sin embargo, es necesario optimizar el rendimiento de carotenoides para aprovechar el potencial de los resultados. Varias perspectivas incluyen modificar el medio de cultivo de *Synechocystis* con NaCl para promover la acumulación de carbohidratos (Du *et al.*, 2013), optimizar el procedimiento de hidrólisis variando las temperaturas y diferentes ácidos (Nguyen *et al.*, 2009) y cambiar la temperatura de producción de carotenoides (Kot *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

Las condiciones de crecimiento en el laboratorio fueron apropiadas para el crecimiento de *Synechocystis sp.*, manteniendo una temperatura de 28 ± 2 °C. La intensidad lumínica medida como actividad fotosintética (PAR) en promedio fue de 43 ± 18.5 con fotoperiodos naturales de 11:13 luz-oscuridad. La concentración promedio de CO₂ en el laboratorio fue de 1088.5 ± 302.7 ppm.

Synechocystis sp. alcanzó la fase estacionaria al día 9 de incubación, con una densidad óptica medida a 730 nm de 0.9.

El análisis elemental de la biomasa de *Synechocystis sp.* reveló una composición constante de N y S, pero un aumento en el contenido de C y H en cultivos más antiguos, lo que sugiere una acumulación de carbohidratos y/o lípidos en la fase estacionaria. El perfil de azúcares también mostró cambios, con la aparición de fructosa exclusivamente en cultivos de 30 días, lo que podría indicar una adaptación metabólica a la limitación de nutrientes.

Se obtiene un porcentaje de hidrolizado del 15 % sin importar de la concentración de biomasa de *Synechocystis sp.* sometida al tratamiento.

El porcentaje de hidrolizado depende del tiempo de incubación de *Synechocystis sp.*, 30 días de incubación alcanza una concentración de 1 g/L de azúcares reductores.

Se logró la producción de carotenoides en los medios producidos (Syn10 y Syn30) alcanzando hasta 3.6 μg y un rendimiento de 220 $\mu\text{g/g}$ de biomasa de la levadura

La producción de carotenoides es similar sin importar el medio de cultivo utilizado Syn10 y Syn30, obteniendo un 50 % menos a lo producido por el medio YM.

R. mucilaginosa logra producir hasta 30 mg de biomasa al degradar la biomasa estéril de *Synechocystis sp.*

R. mucilaginosa produce carotenoides hasta 16 μg a partir de la biomasa estéril de *Synechocystis sp.*

En el medio Syn10 se obtuvieron 4.6 μg a partir de 1 g de CO_2 , el medio Syn30 5.08 μg a partir de 1 g de CO_2 y en biomasa estéril de *Synechocystis sp.* 21.97 μg a partir de 1 g de CO_2 .

REFERENCIAS

Bener, M. et al. (2018) 'A simple automated microplate method for determining reducing sugars in food extracts and synthetic serum using cupric-neocuproine as reductant', *Turkish Journal of Chemistry*, 42(3), pp. 794–807. Available at: <https://doi.org/10.3906/kim-1707-30>.

Brasil, B. dos S.A.F. et al. (2017) 'Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories', *Algal Research*, 25, pp. 76–89. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.035>.

Britton, G. (1985) '[5] General carotenoid methods', in *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 113–149. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)11007-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)11007-4).

Chukhutsina, V. et al. (2015) 'Cyanobacterial Light-Harvesting Phycobilisomes Uncouple From Photosystem I During Dark-To-Light Transitions', *Scientific Reports*, 5(1), p. 14193. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep14193>.

Du, W. et al. (2013) 'Exploring the photosynthetic production capacity of sucrose by cyanobacteria', *Metabolic Engineering*, 19, pp. 17–25. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.05.001>.

Garcia-Cortes, A. et al. (2021) 'Pigment production improvement in *rhodotorula mucilaginosa* ajb01 using design of experiments', *Microorganisms*, 9(2), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020387>.

Ghilardi, C. et al. (2020) 'Evaluation of olive mill waste as substrate for carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*', *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), p. 52. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00341-7>.

Gonzalez Garza, M.T. et al. (2016) 'Metal-Induced Production of a Novel Bioadsorbent Exopolysaccharide in a Native *Rhodotorula mucilaginosa* from the Mexican Northeastern Region', *PLOS ONE*, 11(2), pp. e0148430-. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148430>.

Gualberto, N.C. et al. (2022) 'Optimization of the biotechnological process using *Rhodotorula mucilaginosa* and acerola (*Malpighia emarginata* L.) seeds for the production of bioactive

compounds', LWT, 160, p. 113190. Available at:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113190>.

Heinz, S. et al. (2016) 'Analysis of photosystem II biogenesis in cyanobacteria', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(3), pp. 274–287. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.007>.

Hunt, A.J. et al. (2010) 'Generation, Capture, and Utilization of Industrial Carbon Dioxide', *ChemSusChem*, 3(3), pp. 306–322. Available at:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cssc.200900169>.

Inoue, N. et al. (2001) Acclimation to the Growth Temperature and the High-Temperature Effects on Photosystem II and Plasma Membranes in a Mesophilic Cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC6803, *Plant Cell Physiol.*

Kanzy, H.M. et al. (2015) Optimization of Carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* Available at:
<http://www.ijemas.com>.

Kao, C.-Y. et al. (2014) 'Utilization of carbon dioxide in industrial flue gases for the cultivation of microalga *Chlorella* sp.', *Bioresource Technology*, 166, pp. 485–493. Available at:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.094>.

Kima, M.H. et al. (2016) 'A novel bioreactor to study the dynamics of co-culture systems', *Biochemical Engineering Journal*, 107, pp. 52–60. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.11.019>.

Knoot, C.J. et al. (2018) 'Cyanobacteria: Promising biocatalysts for sustainable chemical production', *Journal of Biological Chemistry*, 293(14), pp. 5044–5052. Available at:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.R117.815886>.

Kot, A.M. et al. (2016) 'Rhodotorula glutinis—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14), pp. 6103–6117. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8>.

Kushwaha, D. et al. (2020) 'Biobutanol production from hydrolysates of cyanobacteria *Lyngbya limnetica* and *Oscillatoria obscura*', *Fuel*, 271, p. 117583. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117583>.

Lam, M.K. and Lee, K.T. (2013) 'Effect of carbon source towards the growth of *Chlorella vulgaris* for CO₂ bio-mitigation and biodiesel production', *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 14, pp. 169–176. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2013.01.016>.

Lam, M.K., Lee, K.T. and Mohamed, A.R. (2012) 'Current status and challenges on microalgae-based carbon capture', *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 10, pp. 456–469. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2012.07.010>.

Lario, L.D. et al. (2015) 'Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7', *Fungal Biology*, 119(11), pp. 1129–1136. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.012>.

Li, G. et al. (2008) 'Capture of CO₂ from high humidity flue gas by vacuum swing adsorption with zeolite 13X', *Adsorption*, 14(2), pp. 415–422. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10450-007-9100-y>.

Li, Z. et al. (2022) 'Rhodotorula mucilaginosa—alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use', *Heliyon*. Elsevier Ltd. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11505>.

Madigan, M., & Brock, T. (2009) 'No Title', in Brock *biología de los microorganismos.*, pp. 46, 422, 511, 536.

Maldonado, I.R., Rodriguez-Amaya, D.B. and Scamparini, A.R.P. (2008) 'Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem', *Food Chemistry*, 107(1), pp. 145–150. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.075>.

Mallick, I. et al. (2020) 'A simple method to produce *Synechocystis* PCC6803 biofilm under laboratory conditions for electron microscopic and functional studies', *PLOS ONE*, 15(7), pp. e0236842-. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236842>.

- Miller, G.L. (1959) 'Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar', *Analytical Chemistry*, 31(3), pp. 426–428. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Möllers, K.B. et al. (2014) 'Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for bioethanol production by yeast fermentation', *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), p. 64. Available at: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-64>.
- Moore, M.M., Breedveld, M.W. and Autor, A.P. (1989) 'The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the pigmented yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 270(2), pp. 419–431. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90524-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90524-9).
- Nguyen, M.T. et al. (2009) 'Hydrothermal Acid Pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* Biomass for Ethanol Production', *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009/02/28, 19(2), pp. 161–166. Available at: <https://doi.org/10.4014/jmb.0810.578>.
- Packer, Lester., Hiramatsu, Midori. and Yoshikawa, Toshikazu. (1999) *Antioxidant food supplements in human health*. San Diego: Academic Press.
- Patel, V.K. et al. (2018) 'Characterization of Seven Species of Cyanobacteria for High-Quality Biomass Production', *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(1), pp. 109–121. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13369-017-2666-0>.
- Rippka, E., Deruelles, J. and Waterbury, N.B. (1979) *Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria*, *Journal of General Microbiology*.
- Ritchie, H., Roser, M. and Rosado, P. (2020) 'CO₂ and Greenhouse Gas Emissions', *Our World in Data* [Preprint]. Available at: <https://ourworldindata.org/co2-and-other-greenhouse-gas-emissions> (Accessed: 15 December 2022).
- Seon, G. et al. (2020) 'Effect of post-treatment process of microalgal hydrolysate on bioethanol production', *Scientific Reports*, 10(1), p. 16698. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73816-4>.

Shastri, A.A. and Morgan, J.A. (2005) 'Flux Balance Analysis of Photoautotrophic Metabolism', *Biotechnology Progress*, 21(6), pp. 1617–1626. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bp050246d>.

Singh, J. and Dhar, D.W. (2019) 'Overview of Carbon Capture Technology: Microalgal Biorefinery Concept and State-of-the-Art', *Frontiers in Marine Science*, 6. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00029>.

Singh, J., Tripathi, R. and Thakur, I.S. (2014) 'Characterization of endolithic cyanobacterial strain, *Leptolyngbya* sp. ISTCY101, for prospective recycling of CO₂ and biodiesel production', *Bioresource Technology*, 166, pp. 345–352. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.055>.

Takahashi, T. (2018) 'Applicability of Automated Cell Counter with a Chlorophyll Detector in Routine Management of Microalgae', *Scientific Reports*, 8(1), p. 4967. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23311-8>.

Tkáčová, J. et al. (2015) 'Screening of carotenoid-producing strains isolated from natural sources', *Acta Chimica Slovaca*, 8(1), pp. 34–38. Available at: <https://doi.org/doi:10.1515/acs-2015-0007>.

Torres-Alvarez, D. et al. (2022) 'Conversion of banana peel into diverse valuable metabolites using an autochthonous *Rhodotorula mucilaginosa* strain', *Microbial Cell Factories*, 21(1), p. 96. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01834-0>.

Tuinier, M.J. et al. (2010) 'Cryogenic CO₂ capture using dynamically operated packed beds', *Chemical Engineering Science*, 65(1), pp. 114–119. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ces.2009.01.055>.

Voutilainen, S. et al. (2006) 'Carotenoids and cardiovascular health', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6), pp. 1265–1271. Available at: <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1265>.

Yu, Y. et al. (2013a) 'Development of *synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory', *Marine Drugs*, 11(8), pp. 2894–2916. Available at: <https://doi.org/10.3390/md11082894>.

Yu, Y. et al. (2013b) 'Development of *synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory', *Marine Drugs*. MDPI AG, pp. 2894–2916. Available at: <https://doi.org/10.3390/md11082894>.

Ziobrowski, Z., Krupiczka, R. and Rotkegel, A. (2016) 'Carbon dioxide absorption in a packed column using imidazolium based ionic liquids and MEA solution', *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 47, pp. 8–16. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2016.01.018>.