

## Tesis de Posgrado

# Estudios genéticos y fisiológicos de *Phaffia rhodozyma* : control computarizado de la producción de astaxantina

Ducrey Santopietro, Luis Marcelo

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Ducrey Santopietro, Luis Marcelo. (1995). Estudios genéticos y fisiológicos de *Phaffia rhodozyma* : control computarizado de la producción de astaxantina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2729\\_DucreySantopietro.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2729_DucreySantopietro.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Ducrey Santopietro, Luis Marcelo. "Estudios genéticos y fisiológicos de *Phaffia rhodozyma* : control computarizado de la producción de astaxantina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2729\\_DucreySantopietro.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2729_DucreySantopietro.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

Para optar al título de Doctor en Ciencias de la Universidad de  
Buenos Aires

**ESTUDIOS GENÉTICOS Y FISIOLÓGICOS DE *Phaffia  
rhodozyma*. CONTROL COMPUTARIZADO DE LA  
PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA.**

**LUIS MARCELO DUCREY SANTOPIETRO**

**-1995-**

—  
1995  
2

  
Dr. John Francis T. Spencer

**Padrino de Tesis**

**Luis Marcelo Ducrey Santopietro**

**Tesista**

**ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL FUE REALIZADO EN LA PLANTA  
PILOTO DE PROCESOS INDUSTRIALES MICROBIOLÓGICOS - PROIMI.**

**a mis padres**

**a mi esposa**

**a nuestra hija**

## **AGRADECIMIENTOS**

- A mi padrino de tesis, Dr. John Francis T. Spencer, por su confianza y aporte científicos.
- Al Dr. Faustino Siñeriz, quien con su confianza y trabajo posibilitó la realización de este trabajo y mi continuada formación científica.
- Al Ing. Danley A.S. Callieri quien me abrió las puertas del laboratorio Genética de Levaduras desinteresadamente.
- A la Dra. Lucia I.C. de Figueroa quien sin su desinteresado apoyo, comprensión y amistad, nunca hubiese logrado realizar esta tesis.
- A la Dr. Alicia Ragout, Dr. Mario Baigorí, Dra. Lucia I.C. de Figueroa y Lic. María Alicia Loray por valiosa colaboración en la corrección del manuscrito.
- A todos mis compañeros de laboratorio.
- A todos mis amigos del PROIMI.
- A la Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos por haberme acogido en su seno, y a todo el personal que de una u otra manera se solidarizaron con mi objetivo.
- A la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por haberme formado profesionalmente.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el aporte financiero.

## INTRODUCCION

I.	<i>Phaffia rhodozyma</i>	1
II.	Carotenoides	3
III.	Carotenoides en <i>Phaffia rhodozyma</i>	4
IV.	Función de los carotenoides	6
V.	Biosíntesis de carotenoides	8
VI.	Biosíntesis de astaxantina	13
VII.	Pigmentación de salmones	15
VIII.	Cultivos de microorganismos	17
	Cultivo por lote	17
IX.	Cultivo continuo	18
X.	Productividad	21
XI.	Cultivo por lote alimentado	24
XII.	Control de los procesos fermentativos	
	Sensores	25
XIII.	Control computarizado	27
XIV.	Estrategias de control	28
	Control programado	28
	Control programado con compensación	29
	Control óptimo con modelos de identificación	29
	Control adaptativo	30
	Control predictivo	30
	Control basado en conocimiento	31
	OBJETIVOS	32

## MATERIALES Y METODOS

I.	Microorganismos	33
II.	Medios de cultivo	33
	Medio para cultivos en fermentador	33
	Medio de regeneración selectivo	34
	Medio selectivo	34
III.	Métodos analíticos	
	Extracción y cuantificación de carotenoides	34
	Glucosa	35
	Crecimiento	35
IV.	Aislamiento de <i>Cryptococcus laurentii</i>	35
V.	Obtención y fusión de protoplastos	
	Metodología para optimar la protoplastización	36
	Cálculos	37
	Microscopía de Fluorescencia	37
	Solución de pretratamiento	38
	Solución de enzimas	38
	Solución de fusión	38
	Fusión de protoplastos	38
	Regeneración	38
VI.	Condiciones de cultivo	
	Cultivo por lote y continuo	39
VII.	Adquisición de datos y control	40
VIII.	Mutagénesis	
	Mutagénesis con luz U.V.	40

Mutagenesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina	40
IX. Separación de cromosomas	
Preparación de DNA cromosomal intacto	41
Electroforesis con inversión de campo (EIC)	41
Condiciones de las corridas	42
X. ADN de <i>Phaffia rhodozyma</i>	
Extracción de ADN	42
Análisis electroforético	43
Aislamiento de bandas en geles de agarosa	44
Restricción de plásmidos de <i>P. rhodozyma</i>	44
RESULTADOS Y DISCUSION	
Estudios Genéticos y Fisiológicos de <i>Phaffia rhodozyma</i>	
I. Obtención de protoplastos	45
II. Fusión de protoplastos	53
III. Separación de cromosomas de <i>Phaffia rhodozyma</i>	59
IV. Plásmidos de <i>Phaffia rhodozyma</i>	62
V. Obtención de mutantes de <i>Phaffia rhodozyma</i>	66
VI. Respuestas de <i>Phaffia rhodozyma</i> a condiciones de estres oxidativo	68
Control Computarizado de la Producción de Astaxantina	
I. Medición del crecimiento en el fermentador	80
II. Programa de computación para el control del fermentador	83
III. Cultivo de <i>Phaffia rhodozyma</i>	93
CONCLUSIONES	103
APENDICES	
Abreviaturas	105
Programa	107
BIBLIOGRAFIA	131

## INTRODUCCION

### 1. *Phaffia rhodozyma*

A principios de los años 70, durante viajes de colección por Japón e islas del noroeste de los Estados Unidos de Norteamérica, Herman Phaff y colaboradores aislaron, a partir de exudados de árboles, cepas de levaduras productoras de carotenoides.

No es raro encontrar levaduras productoras de carotenoides. Las mismas se encuentran distribuidas en prácticamente todos los ecosistemas terrestres, y pertenecen a los géneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhodospodium*, *Sporidiobolus* y *Sporobolomyces*.

Las cepas aisladas carecían de ciclo sexual definido (Miller, M.W.; 1976), característica que las diferenciaba de las especies de los géneros *Sporidiobolus* y *Rhodospodium*, los cuales pertenecen al orden *Basidiomycotina*, y se las incluyó en el orden *Deuteromycotina*. Dentro de dicho orden, estas cepas se diferencian de *Sporobolomyces*, por la no formación de balistosporas, característica de dicho género, y principalmente de *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*, por su capacidad para fermentar ciertos azúcares, como la glucosa, (Miller, M.W.; 1976) ausente en los tres géneros mencionados (Kreger-van Rij; 1984). Estas diferencias posibilitaron la definición de las cepas aisladas en un nuevo género y especie, *Rhodozyma montanae* (Phaff, H.J.; 1972). Sin embargo, según las reglas del Código Internacional de Nomenclatura Botánica es necesario una descripción en latín, con lo cual el binomio *Rhodozyma montanae* era un *nomen nudum*. En 1976, M. W. Miller y colaboradores publicaron la

descripción en latín bajo el nombre de *Phaffia rhodozyma*. Se definió así un nuevo género dentro del orden *Deuteromycotina*, representado por una única especie.

Las principales características que definen a *Phaffia rhodozyma* son:

- a) Falta de ciclo sexual conocido, reproduciéndose vegetativamente por gemación polar siempre en el mismo sitio, dando origen a una pared celular en multicapas. (Foto 1)
- b) Formación de clamidosporas luego de 5 a 7 días de cultivo en extracto de malta.
- c) Ocasionalmente las células forman pseudomicelios.
- d) Metabolismo fermentativo de ciertos azúcares, por ej. la D-glucosa.
- e) El crecimiento es posible en un rango de 0 a 27°C.
- f) La característica más importante que posee: La habilidad para sintetizar **astaxantina** como principal carotenoide. Cabe aclarar que es la única especie de levadura conocida hasta el presente, que posee esta propiedad.

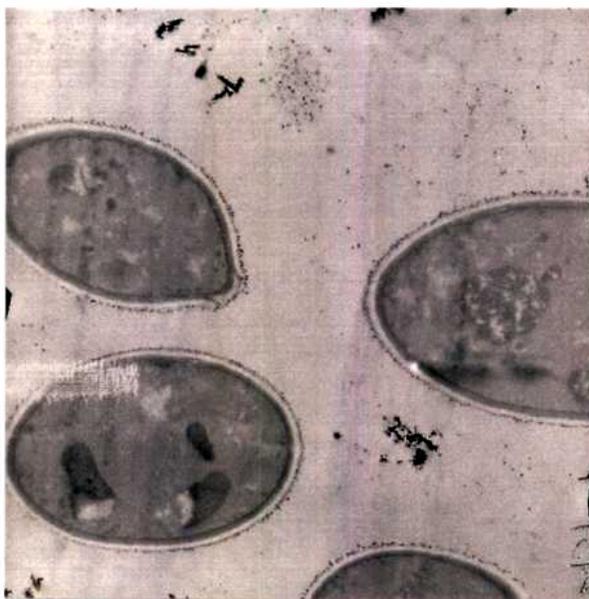


FOTO 1: Microfotografía electrónica de transmisión de *Phaffia rhodozyma* (x5.000)

## II. CAROTENOIDES

Los carotenoides representan uno de los grupos de pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza; los mismos se encuentran en plantas superiores, algas, hongos, bacterias y en prácticamente todas las formas de vida animal, aunque estos últimos no puedan sintetizarlos *de novo*.

En base a su estructura química, los carotenoides pertenecen a un grupo mayor de compuestos conocidos como terpenoides, los cuales poseen unidades repetidas de cinco carbonos, isoprenos. La unión de cuatro unidades da lugar a tetraterpenoides, conocidos como carotenoides ( $C_{40}$ ).

La presencia de estos compuestos en microorganismos o tejidos de organismos superiores dan a los mismos fenotipos de color bien característicos, como sucede, por ejemplo en salmones, crustáceos, flamencos, etc. El color de estos compuestos depende del largo del cromóforo y del número y tipo de sustituciones que posea. Los carotenoides que incluyen moléculas de oxígeno en su estructura son denominados xantófilas. Por ejemplo éstas pueden estar en forma de grupo hidroxilo, en luteína (3,3'-dihidroxi- $\alpha$ -caroteno); en forma de grupo ceto, en echinenona (4-oxo- $\beta$ -caroteno); como grupo epoxi, en violaxantina (5,6,5',6'-diepoxizeaxantina). En el caso específico de la astaxantina, las moléculas de oxígeno se encuentran como grupo ceto (3,3') y como grupo hidroxilo (4,4') fig 1) (3-3'-dihidroxi-4-4'-diceto- $\beta$ - $\beta$ -caroteno).

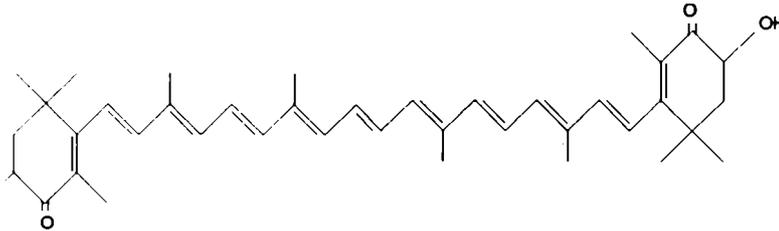


Fig 1. Estructura química de la astaxantina

### III. CAROTENOIDES EN *Phaffia rhodozyma*

El principal carotenoide aislado de células de *Phaffia rhodozyma* es la astaxantina. Este representa entre un 80 a 90% del total de los carotenoides presentes. El isómero principal es *trans* pero, y en mucha menor concentración, también se encuentra el isómero *cis*. Por lo general se considera que los isómeros *cis* de carotenoides se producen como artefactos de las técnicas de extracción y cuantificación. Sin embargo Andrewes (1976) concluyó que siempre se obtuvo *cis*-astaxantina a partir de *Phaffia rhodozyma*, y como este compuesto no se encontró en muestras de peces o crustáceos tratados en forma similar, se puede concluir que el isómero *cis* es producto biosintético genuino.

La astaxantina posee dos carbonos asimétricos en las posiciones 3 y 3', definiendo de esta forma cuatro posibles configuraciones: dos enantiómeros

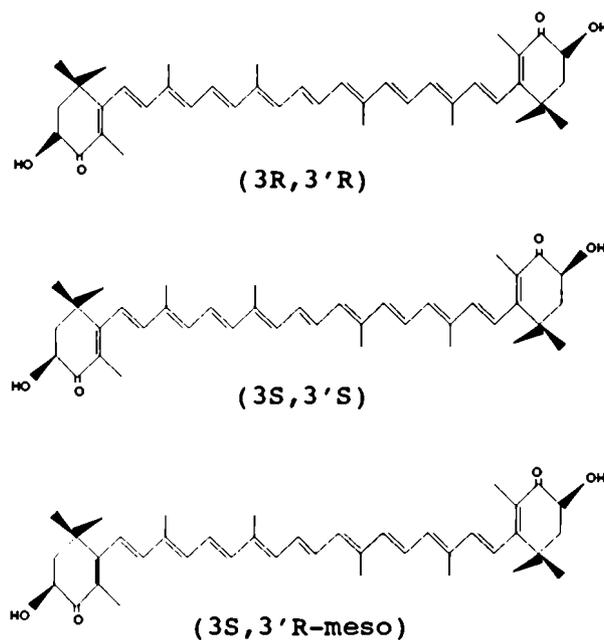


Fig 2. Estructura configuracional de isómeros de astaxantina

(3R,3'R y 3S,3'S), y dos formas meso (3R,3'S y 3S,3'R) (fig 2). En *Phaffia rhodozyma* la configuración que predomina en más del 90% es el enantiómero 3R,3'R, (Andrewes, A.G.; 1976), En un comienzo se pensó que era un caso de excepción, ya que en huevos de langostas de mar (*Homarus gammarus*) y en la microalga *Haematococcus pluvialis*, el enantiómero de astaxantina que predomina es el 3S, 3S'. Luego se encontraron las cuatro configuraciones posibles a partir de diversas fuentes naturales, como por ejemplo en camarones (*Pandalus borealis*), en salmón salvaje (*Salmo* sp) , en krill antártico (*Euphansia superba*), etc.

En condiciones normales de cultivo (pH 4,5-5,5; temperatura ~ 22°C y aerobiosis) *Phaffia rhodozyma* acumula una serie de precursores de la

astaxantina. De todos ellos cabe destacar al 3-hidroxi-3',4'-didehidro- $\beta$ - $\psi$ -caroten-4-ona (HDCO), el cual fue encontrado por primera vez en la naturaleza. (Andrewes, A.G.; 1976)

#### IV. FUNCION DE LOS CAROTENOIDES

Los carotenoides están ampliamente distribuidos en la naturaleza, y se encuentran en diferentes organismos. Por estos motivos es seguro que cumplen una gran gama de funciones. En todos los microorganismos o en tejidos donde se lleva a cabo la fotosíntesis, se encuentran carotenoides asociados a clorofilas, tanto en cromoplastos como en cromatóforos (Goodwin, T.W.; 1959). Los carotenoides actúan como pigmentos capturadores de la energía lumínica, absorbiendo en la región azul-verde del espectro lumínico (400-550 nm), y transfiriendo luego la energía a las clorofilas. (Stanier, R.Y.; 1979)

Los carotenoides tienen también una importante serie de funciones en animales. Por ejemplo, son precursores de la vitamina A, aumentan la respuesta inmune y brindan protección contra enfermedades que involucran radicales oxígeno. Como los animales no sintetizan carotenoides, los mismos deben formar parte de la dieta, siendo los vegetales y algunos protistas los organismos que sintetizan a los carotenoides *de novo*.

El  $\beta$ -caroteno parecería tener un papel principal en la prevención de algunos cánceres, debido a su capacidad de antioxidante, ya sea capturando radicales oxígeno como también bloqueando reacciones mediadas por radicales

libres. Por ejemplo, el humo del cigarrillo es una fuente exógena de radicales libres, los cuales tienen una alta función reactiva, causando daños tisulares y jugando, aparentemente, un importante papel en la carcinogénesis. Algunas xantófilas, como la astaxantina y la cantaxantina, poseen una mayor actividad antioxidante con respecto al  $\beta$ -caroteno. Por lo tanto se estima que dichas xantófilas podrían tener una mayor eficacia en la prevención de cánceres relacionados al cigarrillo. (Ito, Y.; 1991)

En el hombre, la astaxantina no es precursor de la vitamina A, como lo es el  $\beta$ -caroteno, sin embargo también se acumula tanto en suero como en tejidos, y epidemiológicamente se asocia con grupos de bajo riesgo con respecto al cáncer. (Lim, B.P.;1992)

Experimentos *in vivo*, demostraron que las xantófilas actuarían como fuertes antioxidantes de los fosfolípidos de membranas por acción de radicales peróxido. Esta acción es superior a la del  $\beta$ -caroteno, y la diferencia se explica porque debido a sus grupos oxo e hidroxilos, las xantófilas se intercalarían entre los fosfolípidos de membranas, en forma paralela a ellos, quedando así con sus extremos expuestos para atrapar radicales libres. Por el contrario los carotenoides más apolares, como el  $\beta$ -caroteno, se alinearían perpendicularmente a los fosfolípidos, quedando lejos de la superficie de las membranas. (Lim, B.P.; 1992)

M. Kobayashi (1993) demostró que cuando las células de un cultivo de *Haematococcus pluvialis* entraban en estado de cisto, la presencia de  $Fe^{2+}$  incrementaba la biosíntesis de carotenoides. Este mismo efecto se logra si se reemplaza al  $Fe^{2+}$  por compuestos productores de grupos de oxígeno activo,

indicando que los radicales hidroxilos generados por la reacción de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow \text{OH}^- + \text{HO}^\cdot + \text{Fe}^{3+}$ ) y otros grupos de oxígeno activo ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{AO}_2^\cdot$ ), jugarían un importante papel en la activación de la carotenogénesis.

Mutagenizando cepas de *Phaffia rhodozyma*, se aislaron mutantes resistentes a Antinomicina A (Schroeder, W.A.;1993), las cuales a su vez fueron sobreproductoras de carotenoides. Esto se explicó en base a un bloqueo de la cadena respiratoria principal a nivel del complejo  $\text{bc}_1$ , lo que produciría especies de oxígeno activo, que inducirían la carotenogénesis.

Al tratar de encontrar una relación directa entre la carotenogénesis y el estrés oxidativo, C. Bowler (1991), describió que en *Nicotiana tabacum*, la proporción intracelular de  $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$  es el mayor determinante de los daños tisulares. La causa de ésta sería la presencia de ambas especies activas que darían lugar a la reacción de Haber-Weiss durante la transición de metales como el hierro o el cobre ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^- \rightarrow \text{OH}^- + \text{HO}^\cdot + \text{O}_2$ ). Aparentemente, de esta forma se explicaría el mecanismo por el cual los carotenoides brindan protección antioxidante a las células de *Phaffia rhodozyma*. La presencia de  $\text{O}_2^-$  induciría la biosíntesis de carotenoides que, al reaccionar con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , alterarían la relación  $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ , minimizando así la producción de  $\text{OH}^\cdot$  (Schroeder,W.A.;1993). Sin embargo hasta la actualidad no se sabe cómo sería el mecanismo de inducción sobre la carotenogénesis.

## V. BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES

Los carotenoides, como terpenoides, están relacionados biosintéticamente

con otros isoprenoides, como los esteroides, las giberelinas, los cauchos, etc; compartiendo con los mismos los caminos biosintéticos. La diversidad de estructuras relacionadas da la pauta que deben existir sistemas eficientes de regulación no sólo en la biosíntesis y metabolismo de los mismos, sino también en su deposición, según sea la función.

En la figura 3, se detalla el camino biosintético para la formación de Geranilgeranil pirofosfato, precursor de los carotenoides.

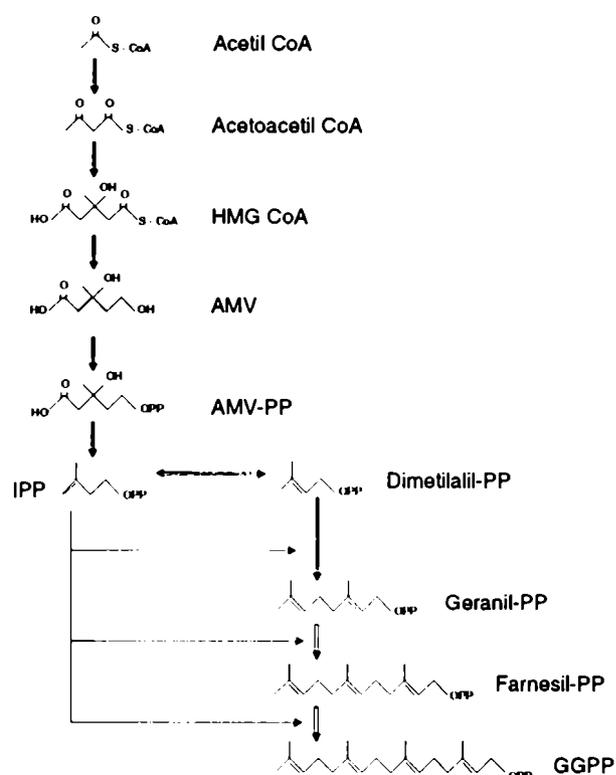


FIG 3. Biosíntesis de Geranilgeranil-PP

El Acido Mevalónico (MVA) es el primer precursor de todos los terpenoides, formado a partir de tres moléculas de acetil-CoA. El MVA es convertido a Isopentenil pirofosfato (IPP) a través de tres pasos catalizados por las enzimas solubles MVA quinasa, MVAP quinasa y la MVAPP descarboxilasa. Por una serie de condensaciones de moléculas de IPP, catalizadas por preniltransferasas, se sintetiza Geranilgeranil pirofosfato. El número y actividad catalítica de las preniltransferasas varía según el organismo.

Finalmente, mediante una dimerización cola a cola se forma el primer caroteno de 40 carbonos, Fitoeno ( $\psi,\psi$ -caroteno) (fig 4). En el ají, *Capsicum* sp, fue aislada una única enzima que cataliza dicha conversión, con lo cual se deduce

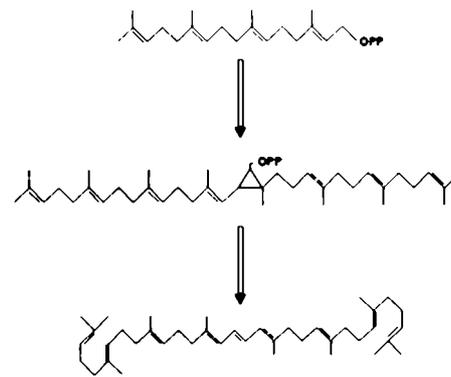


Fig 4. biosíntesis de Fitoeno

que es una enzima bifuncional (Dogbo, O.;1988). En microorganismos como *Mycobacterium*, *Halobacterium* y *Flavobacterium* se aisló, aunque no se purificó, la enzima Fitoeno sintetasa, la cual cataliza la reacción desde Prefitoeno pirofosfato a Fitoeno. En *Mixococcus xanthus* se clonó un operón que incluye el gen para Prefitoeno pirofosfato sintetasa y el gen carB que codifica para la Fitoeno sintetasa (Ruiz-Vázquez, R.M.;1992). A partir de esto se deduce que en dichos microorganismos serían al menos dos las enzimas responsables de la reacción global.

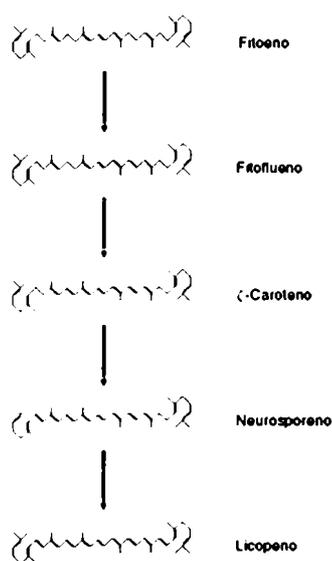


Fig 5. Biosíntesis de Licopeno

Las vías biosintéticas propuestas para la formación de  $\beta$ -caroteno y xantófilas desde fitoeno, se caracterizan por la siguiente secuencia: desaturación  $\rightarrow$  ciclación  $\rightarrow$  oxigenación. La desaturación implica la transformación de fitoeno a licopeno a través de cuatro dideshidrogenaciones, que ocurren alternativamente a cada lado del

cromóforo (figura 5). La secuencia de desaturaciones ocurre en membranas, ya sea de granas o membranas internas de cromoplastos en plantas superiores y algas, en hongos ocurre en membranas de retículo endoplasmático. La excepción la representa la bacteria no fotosintética *Halobacterium cutirubrum*, donde toda la conversión desde fitoeno a carotenoides ocurre en el citoplasma (Bramley, P.M.;1988).

Todavía no se han logrado purificar las enzimas responsables de las desaturaciones, pero el uso de mutantes en hongos y bacterias ha permitido determinar que en algunos casos 2 genes codifican para las cuatro deshidrogenaciones y en otros casos sólo un gen sería necesario.

En *Neurospora crassa*, se clonó a al-1, un único gen necesario para transformar al fitoeno en licopeno. La correspondiente región C-terminal de la enzima codificada por al-1 sería altamente hidrofóbica, lo que indica que la misma podría estar asociada a membranas (Schmidhauser, T.J.;1990). En *Erwinia uredovora* también un único gen, crtI, codifica para dicha transformación (Misawa, N.;1990). Por el contrario en *Rhodobacter capsulatus* el gen crtI codificaría sólo para el primer paso, los genes para los dos pasos siguientes no han sido clonados; y el último paso difiere de lo ya definido, donde los genes responsables, crtC y K, están asociados a la transformación de Neurosporeno a Hidroxineurosporeno (Armstrong, G.A.; 1989). Lo mismo ocurre en *Mixococcus xanthus* donde se ha clonado el gen carC, que codifica para la fitoeno deshidrogenasa, y dentro del operón de carB se identificaron los genes correspondientes a neurosporeno hidroxilasa e hidroxineurosporeno deshidrogenasa (Ruiz-Vázquez, R.M.;1992).

Las reacciones de ciclado varían según los carotenoides que cada organismo sintetiza. En la figura 6 se muestran los diferentes caminos biosintéticos que rinden carotenos monociclados como así también biciclados. La mayoría de estas conversiones han sido demostradas *in vitro*, pero poco se sabe acerca de las propiedades de las ciclasas involucradas, aunque mediante el uso de mutantes se han clonado genes que permiten predecir el número de ciclasas intervinientes. En *Erwinia uredovora* se han clonado dos marcos abiertos de lectura correspondientes a los genes crtY y crtZ, los cuales codificarían para las ciclasas correspondientes a las reacciones de Licopeno →  $\beta$ -caroteno → Zeaxantina respectivamente. Esta última reacción corresponde a la secuencia de oxigenación, que da origen a las xantófilas.

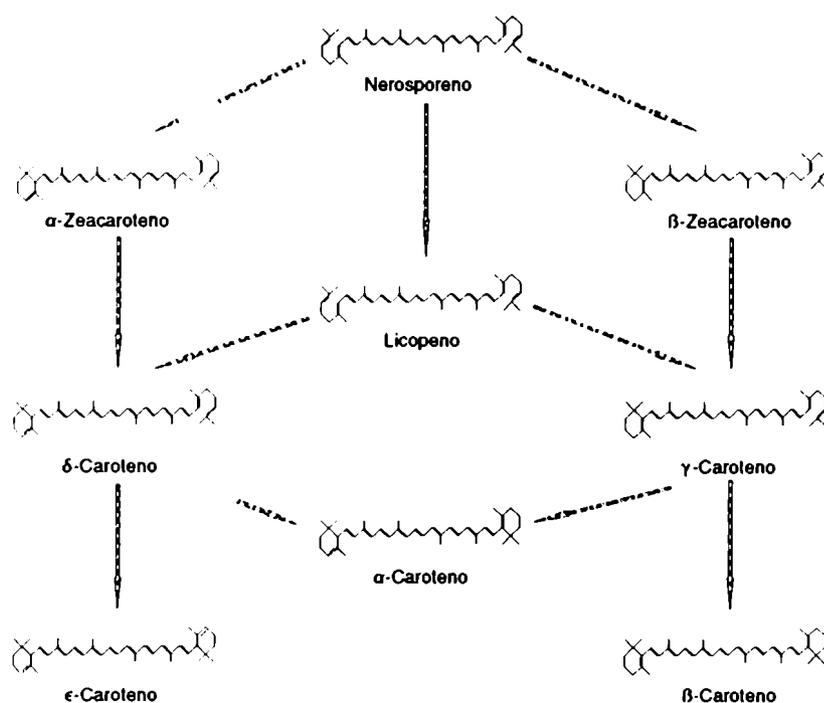


Fig 6. Caminos de ciclado de carotenoides

## VI. BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA

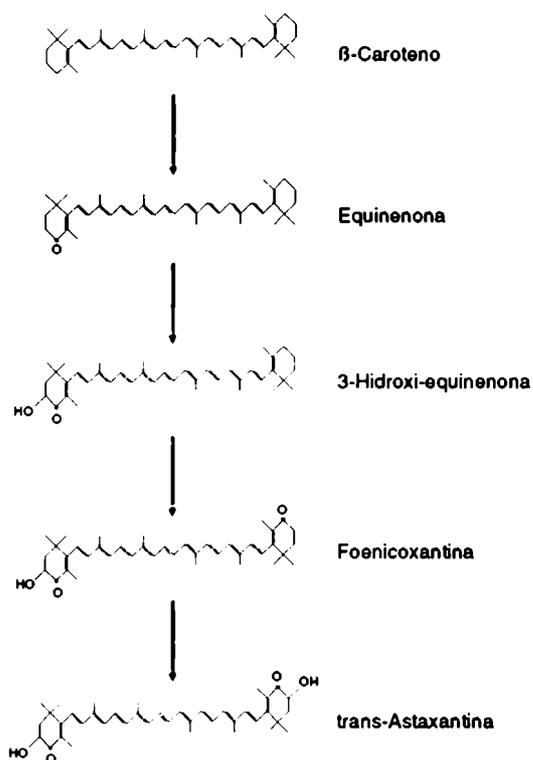


fig 7. Camino original para Astaxantina

El camino para la biosíntesis de astaxantina fue propuesto primero por Andrewes (1976) para la cepa de *Phaffia rhodozyma* 67-210. El mismo describía la formación de β-caroteno, según los caminos clásicos ya descritos, y luego, en base a intermediarios encontrados en dicha cepa (Echinenona, 3-Hidroxi-Echinenona y Foenicaxantina), se postuló una serie de oxigenaciones que dan origen a la astaxantina (fig 7), sin

considerar al HDCO como un intermediario, sino como una posible ramificación a partir de γ-Caroteno. En 1979, E.A. Johnson encontró que en cultivos crecidos a bajo pH (3,5) se acumulaba β-Zeacaroteno además de astaxantina, y concluyó que en *Phaffia rhodozyma* existiría la vía alternativa en la síntesis de β-Caroteno propuesta por Bonaly y Malenge (Simpson, K.L.; 1970) para *Rhodotorula aurantiaca*. En esta tanto β-Zeacaroteno como licopeno son intermediarios alternativos de γ-Caroteno (fig 8). P. Girard (1994) encontró que al adicionar nicotina al cultivo (inhibidor de las ciclasas) sólo se acumulaba

licopeno y  $\gamma$ -caroteno, con lo cual la ciclación vía  $\beta$ -Zeacaroteno no sería posible. Sin embargo este autor no hace alusión alguna sobre el pH del cultivo, variable fundamental en el estudio de E.A. Johnson. Finalmente P. Girard (1994), al estudiar mutantes que acumulaban  $\beta$ -caroteno, aisló algunos que además acumulaban pequeñas cantidades de neurosporeno y  $\beta$ -Zeacaroteno. De este modo concluyó que el  $\beta$ -Caroteno acumulado regularía positivamente el camino alternativo de ciclación, y lo haría negativamente sobre el camino vía licopeno.

En 1989, G.H. An caracterizando mutantes sobreproductores de astaxantina, encontró dos carotenoides que tentativamente fueron identificados como 3,3'-dihidroxi- $\beta$ - $\psi$ -caroten-4,4'-diona (DCD) y 4-hidroxi-3',4'-

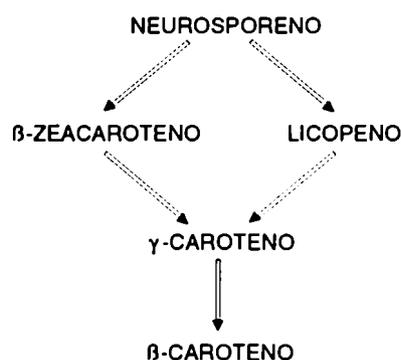


Fig 8. Camino alternativo para  $\beta$ -Caroteno

didehidroxi- $\beta$ - $\psi$ -caroteno (HDC). Posteriormente mediante análisis de espectroscopía de masa se confirmó la estructura del DCD y se identificó al segundo compuesto como toruleno. Esto permitió inferir una segunda vía para la síntesis de astaxantina, considerando ahora al HDCO no como un subproducto sino como intermediario directo (fig.9). Por lo tanto quedaron definidos dos posibles y concomitantes caminos biosintéticos, siendo el  $\beta$ -caroteno precursor biciclado en uno de ellos y el Toruleno precursor monociclado en el otro camino. Este segundo camino no cumple con la secuencia: desaturación  $\rightarrow$  ciclación  $\rightarrow$  oxigenación, ya que la segunda ciclación, a partir del toruleno, se realizaría

luego de finalizada toda la oxigenación correspondiente a astaxantina.

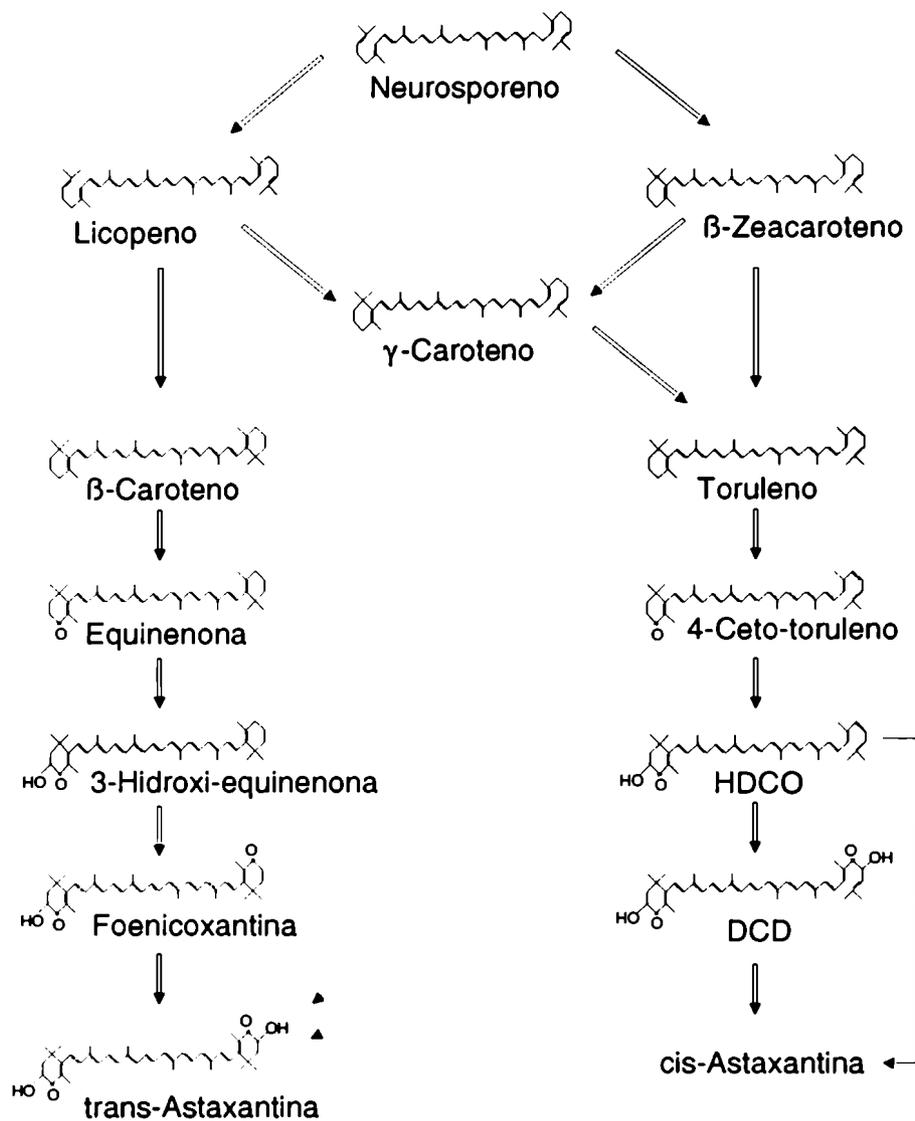


Fig 9. Camino biosintético de la astaxantina

## VII. PIGMENTACIÓN DE SALMONES

La aceptación por el consumidor, en el comercio, de salmones, está principalmente afectada por el color de su carne (Ostrander, J.C.; 1976). El color rosado de la carne de salmones es debido a la absorción y deposición de

xantófilas, principalmente la astaxantina.

Ya dijimos que los animales no sintetizan carotenoides *de novo*, con lo cual la obtención de los mismos depende de la dieta alimenticia. En la naturaleza los salmones obtienen la astaxantina y sus ésteres a partir de la ingestión de zooplancton o de peces que, a su vez ingirieron zooplancton (Torrissen, O.J.;1989). Cuando la producción de estos peces es mediante cría intensiva en piletas, la falta del ecosistema alimenticio natural, da como resultado salmones con carne pálida.

Las levaduras son consideradas una fuente de proteína unicelular de gran aceptación en la dieta de animales. Cuentan con la ventaja de ser fácilmente cultivadas y de reproducirse rápidamente en sus formas vegetativas, además son relativamente fáciles de modificar genéticamente.

El potencial de *Phaffia rhodozyma* reside en su habilidad única, entre las levaduras, de sintetizar astaxantina, pudiendo así aportar no sólo el factor nutricional, sino también proporcionar el deseado color de los salmones en criaderos, como así también en pollos y en yemas de huevos.

## VIII. CULTIVOS DE MICROORGANISMOS

Cuando un microorganismo dispone de los nutrientes esenciales para su crecimiento, comienza su desarrollo y división celular originándose un cultivo del mismo. Existen distintos sistemas para cultivar microorganismos, la principal diferencia entre ellos radica en la forma en que se suministran los nutrientes.

### CULTIVO POR LOTE

El cultivo por lote se puede definir como aquél en el cual no existe intercambio de materia con el medio circundante a excepción de gases. En esta modalidad de cultivo se suministran inicialmente los nutrientes y luego se inocula con una determinada cantidad de células. El cultivo así iniciado se desarrolla hasta que algún evento, tal como el agotamiento de un nutriente, lo detiene.

El crecimiento de una población microbiana, cultivada por lote, que se divide por fisión binaria o brotación, puede ser representada por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

siendo  $\mu$  la velocidad específica de crecimiento y  $X$  la concentración celular.

De la figura 10 se puede deducir que el valor de  $\mu$  no es constante excepto durante la fase

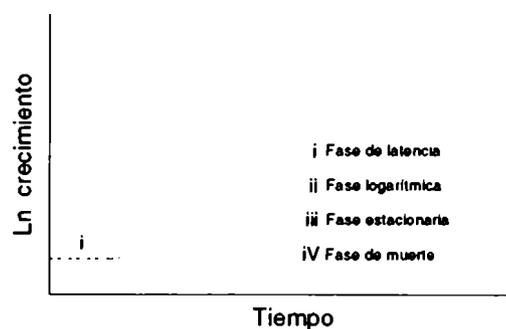


Fig. 10

exponencial, donde las células se encuentran en plena reproducción a una velocidad que es la máxima para el conjunto de condiciones presentes, si no existe limitación de nutrientes. Integrando la ecuación (1) entre los límites correspondientes a la fase exponencial resulta

$$\text{Ln } \frac{X}{X_0} = \mu t \quad (2)$$

o bien

$$X = X_0 e^{(\mu t)} \quad (3)$$

Los cultivos por lote así definidos se caracterizan por su simplicidad y por lo tanto la facilidad de llevarlos a cabo; si se pretende controlar las distintas variables que componen el sistema el modelo se va complicando, desde el uso de un simple baño termostatzado a equipos en los cuales se pueden medir y controlar variables tales como temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto, etc. Pero para realizar estudios fisiológicos, la mayor limitación que presentan los cultivos por lote es que las células se desarrollan en un medio cambiante, por lo tanto no definido en el tiempo.

## IX. CULTIVO CONTINUO

Las deficiencias del cultivo por lote pueden ser salvadas mediante la modalidad de cultivo continuo. El sistema más sencillo para realizar este método es el quimiostato, el cual consiste en un fermentador con una constante entrada

de medio fresco estéril y una salida del medio con células, de tal forma que el volumen de trabajo del reactor se mantiene constante (fig 11). La principal suposición es que el fermentador sea perfectamente agitado, de modo que la composición en el efluente sea igual a la del reactor y además sea completamente homogéneo.

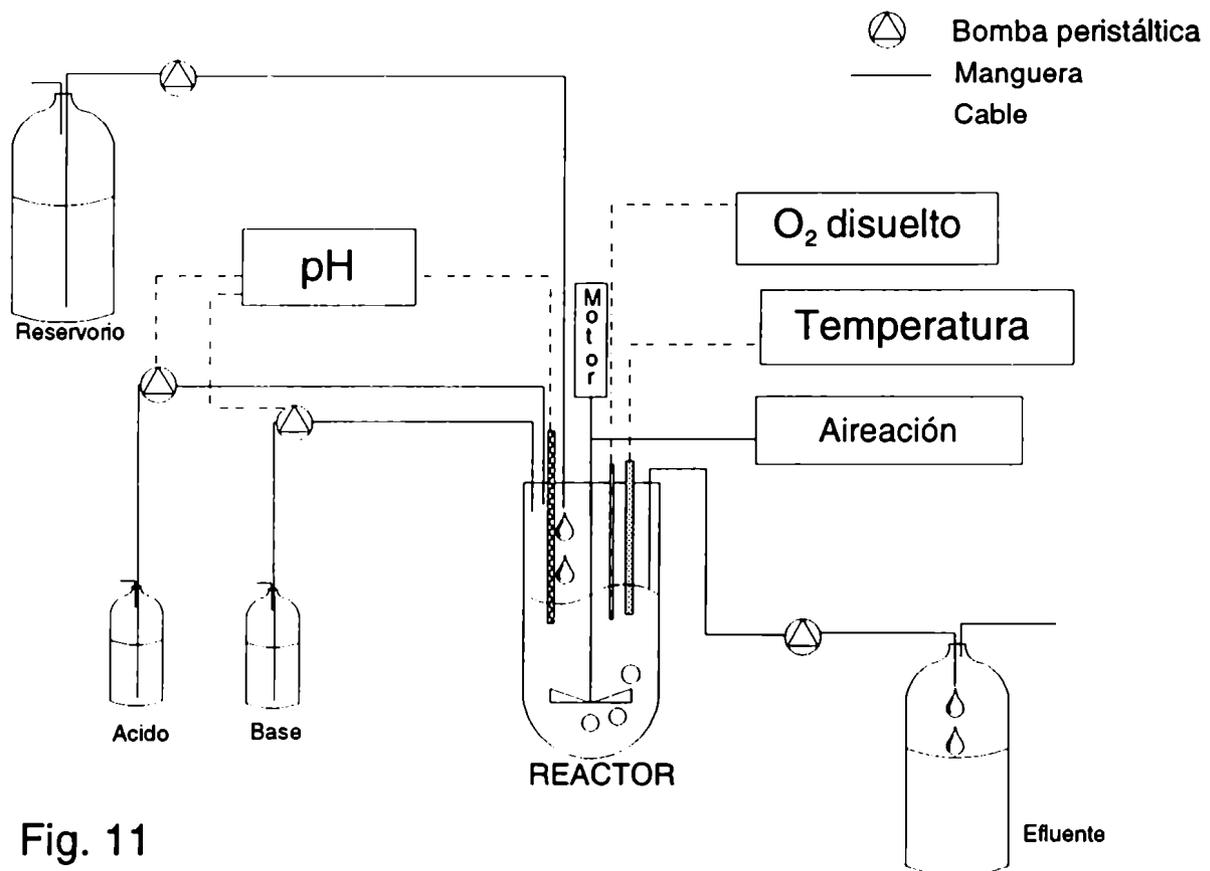


Fig. 11

Para comparar este sistema con respecto al cultivo por lote cabe plantear el balance de biomasa a partir de la siguiente ecuación general:

$$\textit{Variación} = \textit{entrada} - \textit{salida} + \textit{producción} - \textit{consumo} \quad (4)$$

Con lo cual sería,

$$\frac{d(XV)}{dt} = FX_0 - FX + \mu XV - \beta XV \quad (5)$$

dado que el volumen (V) se mantiene constante y además consideramos que el reservorio es estéril,  $X_0=0$ , entonces:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{F}{V}X + \mu X - \beta X \quad (6)$$

si definimos D, velocidad de dilución, como

$$D = \frac{F}{V} \quad (7)$$

reemplazando por (7) en (6) y considerando que la muerte celular es despreciable (consumo en la ecuación general),

$$\frac{dX}{dt} = DX + \mu X \quad (8)$$

Al menos uno de los componentes del medio es limitante del crecimiento, con lo cual la velocidad en que se lo suministra determina la velocidad de crecimiento, a mayor disponibilidad del mismo el microorganismo en cuestión crece más rápido, hasta una velocidad de alimentación que sobrepasa la velocidad máxima de crecimiento inherente al microorganismo y se pierde así el equilibrio entre la salida de células y la recuperación de las mismas por división celular. La velocidad a partir de la cual ocurre este fenómeno se denomina

velocidad de dilución máxima. Por el contrario cuando la disponibilidad de nutrientes no compensa las necesidades mínimas de las células debido a que el suministro es muy lento, se define la velocidad de dilución mínima.

La mayor ventaja del cultivo continuo es que trabajando a velocidades de dilución por debajo de la máxima y por sobre la mínima, se logra mantener al cultivo a la velocidad de crecimiento deseada. Esta característica es la gran ventaja con respecto al cultivo por lote, en el cual, al tener un medio ambiente cambiante, la velocidad de crecimiento no es constante.

La posibilidad de mantener constante una variable fundamental como lo es la velocidad específica de crecimiento creó un sistema casi único para realizar estudios fisiológicos de microorganismos, especialmente cuando el metabolito en estudio o la respuesta celular a determinadas condiciones están íntimamente relacionados al crecimiento.

## X. PRODUCTIVIDAD

La efectividad de un proceso puede ser medida en base a la productividad volumétrica. La misma se expresa en gramos de producto por litro por hora. En el caso de cultivos por lote es necesario considerar en los cálculos todo el tiempo que requiere el proceso, incluyendo los tiempos de preparación del fermentador, medios de cultivo, esterilización e inóculo; así el tiempo total sería

$$T = t_M + t_L + t_P \quad (9)$$

siendo  $t_M$  = tiempo muerto, o sea la sumatoria de los tiempos de vaciado del lote anterior, tiempo de limpieza, tiempo de llenado con medio de cultivo y tiempo de esterilización.

$t_L$  = tiempo de latencia del cultivo.

$t_p$  = tiempo de crecimiento del cultivo.

Reemplazando a  $t_p$  por la ecuación 2 queda

$$T = t_M + t_L + \frac{1}{\mu} \ln \frac{X}{X_0} \quad (10)$$

Con lo cual se puede definir a la productividad volumétrica de un cultivo en lote, en relación a biomasa, como

$$Q_x = \frac{dX}{dT} \quad (11)$$

siendo válida la aproximación

$$Q_x = \frac{X - X_0}{t_M + t_L + \frac{1}{\mu} \ln \frac{X}{X_0}} \quad (12)$$

Si se desea considerar la productividad respecto a un metabolito, es exactamente lo mismo pero planteando  $\delta P$  en lugar de  $\delta X$ .

En el caso de cultivos continuos la productividad volumétrica se define como

$$Q_x = D X \quad (13)$$

de esta forma se puede ver que a mayor velocidad de dilución, manteniéndose la concentración celular constante, la productividad volumétrica, referida a biomasa, aumenta hasta una cierta velocidad  $D_M$ , por sobre la cual la concentración celular comienza a caer, disminuyendo la productividad.

Es posible demostrar que la máxima productividad alcanzada en un cultivo continuo es siempre mayor que la alcanzada en un cultivo por lote (Syktya, B; 1964); y además a mayor  $\mu_M$ , mayor es la productividad.

En el campo industrial, las principales ventajas de las fermentaciones continuas no son solo su alta productividad, sino además su facilidad de instrumentación y automatización, la calidad pareja de su efluente y su versatilidad para eludir los mecanismos de control metabólico que impiden la sobreproducción.

Pese a estas ventajas, es indudable que el cultivo continuo no ha ganado la preferencia de las industrias como se prevía al tiempo de su desarrollo. Ello podría deberse a temores relacionados con problemas de contaminación y mutación; otra razón podría ser que en algunos casos, a pesar de la alta productividad, las concentraciones en la corriente de salida de las especies que interesen sean tan bajas que la etapa de recuperación afecte más allá de toda conveniencia sobre el costo de producción; y además existe un cierto perfil conservador al cambio en el sector productivo.

## XI. CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO

El reactor por lote y el quimiostato representan los extremos de los sistemas de cultivo, ya que el primero es completamente discontinuo y el segundo completamente continuo. Un sistema de cultivo que en parte soluciona las desventajas de los otros sistemas y es un compromiso entre ambos es el cultivo por lote alimentado.

Básicamente es una operación discontinua en la cual luego de una etapa previa de cultivo por lote, se comienza a alimentar al sistema con la totalidad de los nutrientes o parte de ellos, sin una corriente de descarga, provocando una variación del volumen del cultivo.

Partiendo de la base que en un proceso fermentativo lo que interesa son las condiciones que permiten el desarrollo del microorganismo de acuerdo a un comportamiento fisiológico deseado, se puede fácilmente ver que controlando la velocidad de entrada del nutriente limitante, se logra en los cultivos por lote alimentado influir sobre la velocidad específica de crecimiento del microorganismo y eventualmente favorecer el predominio de un determinado estado fisiológico. (Málek, I.; 1958)

La velocidad de alimentación u oferta de nutrientes se representa mediante la siguiente expresión:

$$V = F S_0 \quad (14)$$

Si consideramos que la demanda de nutrientes por el sistema puede variar durante el proceso, es indispensable conocerla con anterioridad o ir

determinándola a través del tiempo para saber cómo programar la velocidad de alimentación en base a los objetivos planteados.

Según como se programe la velocidad de alimentación podemos definir diversas funciones: a.- Una velocidad constante en el tiempo; b.- Una función lineal, en la cual la velocidad aumenta proporcionalmente en el tiempo; c.- Una función exponencial,

$$F = F_0 e^{\mu t} \quad (15)$$

en la cual se logra que la masa celular crezca a una velocidad específica constante.

Con este sistema es posible evitar fenómenos de inhibición por sustrato como también evitar la formación de metabolitos no deseados que podrían ocurrir a altas concentraciones de sustrato, eliminar o atenuar la represión catabólica.

La modalidad de cultivos por lote alimentado ha sido largamente desarrollada por la industria, satisfaciendo procesos específicos, a punto de haber ejemplos de su uso desde principios de siglo (Whitaker, A; 1980).

## **XII. CONTROL DE LOS PROCESOS FERMENTATIVOS**

### **SENSORES**

A lo largo de esta introducción se plantearon ventajas y desventajas de los distintos y clásicos sistemas de cultivo, y todas las ventajas se resumen a

poder mantener condiciones de cultivo que optimen el proceso. Ahora bien, cómo se logra?.

Cuando las condiciones necesarias son constantes en el tiempo la solución pasa por sistemas electrónicos que puedan cuantificar las variable en cuestión y mantener sus valores dentro de límites impuestos. De este modo un simple sensor puede determinar el pH del medio y mediante la activación de bombas agregar ácido a álkali de forma de mantener el valor deseado. Así existen diversos sensores ya sea para pH, temperatura, % de O<sub>2</sub> disuelto, concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el aire, flujo de aire, etc. Además ya existen sensores muy específicos como ser los biosensores, en los cuales se inmovilizan materiales biológicos en la cercanía de transductores, los cuales miden cambios fisicoquímicos producidos por las reacciones específicas de los componentes biológicos del sensor. Los mismos usan enzimas inmovilizadas, para medir glucosa a través de glucosa oxidasa (Atanasov, P.; 1994) o para medir etanol mediante alcohol deshidrogenasa coinmovilizada con peroxidasa (Buttler, T.; 1994); células enteras inmovilizadas, para medir péptidos (Riedel, K.;1988a) y demanda bioquímica de oxígeno (Riedel, K.;1988b); otra alternativa es inmovilizando anticuerpos (Hall, E.A.H.; 1986). Otras alternativas para la medición de metabolitos específicos es la de acoplar sistemas de cromatografía líquida en columna (Buttler, T.; 1994), de cromatografía líquida de alta presión (Turner, C.;1994), de espectroscopía de infrarrojo (Vaccari, G; 1994), etc.

A pesar de la amplia gama de sensores o sistemas de medición, la falta de sensores para varias variables de interés, y principalmente a nivel industrial, es uno de los cuellos de botella que dificultan los métodos de control de procesos

fermentativos (Wiseman, A; 1991). Una alternativa viable para solucionar dicho problema es la estimación de variables a través de la medición de otras variables, como por ejemplo la determinación de concentración de lactosa, galactosa y ácido láctico a partir de funciones que tienen como variable la cantidad de NaOH agregado al cultivo para mantener el pH en cierto valor (Acuña, G.; 1994). Dado a que el uso de funciones definidas no son válidas cuando los cultivos se desvían en su comportamiento, en la actualidad tiene una gran aceptación el uso de redes neurales para la estimación de diversas variables, las cuales "aprenden" a partir de la acumulación de datos en diversas corridas no dependiendo de funciones establecidas, lo cual las transforman en alternativas más versátiles. (Zhang, Q.; 1994. Glassey, J.; 1994)

### **XIII. CONTROL COMPUTARIZADO**

Aunque el uso de computadoras ha estado presente en diversos procesos desde hace mucho tiempo, la principal utilidad se estableció en la industria química y petroquímica; en la industria de fermentaciones la mayor limitación se centra como ya establecimos tanto en la falta de sensores como en la falta de conocimiento necesario para interpretar, en el contexto del sistema biológico, los datos adquiridos de los procesos.

En la actualidad, el desarrollo de nuevas y más veloces computadoras, así como de sistemas de adquisición y almacenamiento de datos está posibilitando evaluaciones continuas y más precisas de los procesos fermentativos, las cuales junto a algoritmos y modelos adecuados permiten la implementación de exitosas

estrategias de control, no sólo a nivel de laboratorio (Takamatsu, T.; 1985) sino también a nivel industrial (Heinrich, M.; 1991).

Cabe destacar que la solución de los cuellos de botella no sólo pasa por el desarrollo de nuevos sensores y computadoras más versátiles, sino también por el desarrollo de correctas y acertadas estrategias de control.

#### **XIV. ESTRATEGIAS DE CONTROL**

Hasta hace poco las computadoras sólo se usaban como sofisticados sistemas de interruptores y acumulación de datos. La mayor versatilidad de las mismas y el desarrollo de idiomas de programación específicos han abierto un gran campo para el desarrollo de distintas estrategias de control. A continuación se resumen algunas de las estrategias más comúnmente aplicadas a diversos bioprocesos. A pesar de que se clasifican como distintos métodos, en realidad la mayoría comparten conceptos y bases similares, pero han ido evolucionando en ciertos aspectos individuales, pudiéndose así clasificarlos de alguna manera.

##### **CONTROL PROGRAMADO**

Los controladores actúan según una cierta función de acción, en base a la cual establecen la velocidad y forma de reacción de los sistemas en base al grado de desviación de las variables que se pretenden controlar. El problema se suscita cuando el grado de desviación no es constante a lo largo del proceso y esto puede llevar a que la función de acción deje de ser la adecuada, con lo cual en esta clase de estrategia se programa con anterioridad la variación de los

parámetros en las funciones de acción, de modo de lograr respuestas satisfactorias durante todo el proceso.

Este tipo de estrategia es muy rígido y ante cualquier desvío del proceso se puede perder la capacidad de control sobre el mismo.

### **CONTROL PROGRAMADO CON COMPENSACION**

Esta estrategia es similar a la anterior, pero para evitar la rigidez del sistema, los cambios en las funciones de acción se realizan en base a información adquirida del mismo proceso en marcha. Así por ejemplo se han simulado cultivos de levaduras de panadería por lote alimentado, controlados según la concentración celular y la tasa específica de crecimiento (Takamatsu, T.; 1985).

### **CONTROL OPTIMO CON MODELOS DE IDENTIFICACION**

Como se definió en la estrategia anterior la idea es tratar de seguir la evolución del cultivo para así poder ir controlándolo según las circunstancias. En esta clase de estrategias también se miden o estiman variables, pero no son utilizadas para controlar directamente las funciones de acción, sino para determinar las condiciones óptimas a mantener en base a un modelo predeterminado que describa el proceso en cuestión.

Así se realizaron cultivos por lote alimentado de levaduras de pan lográndose evitar el efecto Cabtree, (Wu, W-T.; 1985).

## CONTROL ADAPTATIVO

El desarrollo de las estrategias no sólo siguió considerando la evolución del cultivo, sino que además involucró a los modelos en sí, determinando que estos no sean muy rígidos. De este modo surgieron sistemas en los cuales no sólo controlan la función de acción sino que también determinan en base al valor de las variables en cuestión cuáles son las condiciones óptimas a mantener; a diferencia del control óptimo aquí los modelos son lineales y se ajustan de forma de mantener al máximo la condición deseada (Rolf, M.J.; 1985). Estas estrategias requieren poca información previa ya que si el modelo es correcto se adaptan rápidamente a los cambios del proceso.

## CONTROL PREDICTIVO

Hasta ahora las estrategias discutidas imponen condiciones según los estados actual y pasado del cultivo, pero ninguna considera el posible estado al cual el cultivo evolucionará en base a los cambios impuestos.

En cultivos continuos mixtos competitivos, que involucran la coexistencia de dos especies de microorganismos, cualquier perturbación que aleje al sistema del estado de equilibrio, implica el lavado de una de las especies; con lo cual las estrategias de control deben considerar qué efecto tendrán sobre el cultivo las acciones de control. Mediante el uso de matrices dinámicas, que implica un control predictivo, se ha logrado el control y mantenimiento de cultivos continuos mixtos competitivos entre *Escherichia coli* y *Candida utilis* (Goochee, C.F.; 1989).

## **CONTROL BASADO EN CONOCIMIENTO**

La última tendencia en estrategias de control es tratar de conjugar los conocimientos propios de la intuición de los operadores con la experiencia en el control de biorreactores. De esta forma surgieron los sistemas expertos, los cuales no sólo ejecutan una estrategia de control sobre el cultivo, sino que además consideran en base al conocimiento del proceso, si las señales generadas por los sensores se encuentran dentro de un rango correcto, si no existen fallas en el equipo y hasta si las desviaciones del sistema se deben a por ejemplo contaminaciones del cultivo. (Konstantinov, K.B.; 1992)

## OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo de tesis se dividen en dos partes. Cabe destacar que los temas a investigar en la levadura *Phaffia rhodozyma* son muchos y diversos. Por este motivo, en este trabajo se intentó aportar conocimientos en variados aspectos, a fin de abrir caminos para futuras investigaciones en el tema.

### A. Estudios genéticos y fisiológicos,

Los objetivos en estas áreas, consistieron en determinar las condiciones óptimas para la obtención de esferoplastos y protoplastos de *P. rhodozyma*, a fin de poder buscar plásmidos indígenas y posibilitar así la creación de vectores de clonado.

Por otro lado, se intentó determinar la/s función/es de los carotenoides en *P. rhodozyma*. Esto permitirá, junto a estudios moleculares, establecer los mecanismos de control en la carotenogénesis, en caso de que existieran.

### B. Control computarizado de la producción de astaxantina,

Los objetivos de esta segunda parte se centraron fundamentalmente, en estudiar la fisiología de crecimiento y producción de carotenoides en *P. rhodozyma*, y en base a ello poder determinar estrategias de cultivo convenientes para optimar la producción, y además diseñar un sistema computarizado que controle el desarrollo de dichas estrategias.

## MATERIALES Y METODOS

### I. Microorganismos:

Las cepas utilizadas fueron *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17269, *Saccharomyces cerevisiae*: K382-382; K382-382 "petite"; p155 "petite"; p522 "petite"; p164  $\underline{a}$ , leu<sub>3</sub>; p352 killer, arg; p165  $\underline{a}$ , his y p173  $\underline{a}$ , ade<sub>2</sub>; *Rhodotorula* sp. y *Cryptococcus laurentii*.

Las cepas se mantuvieron en glicerol 30% a -18°C. Con excepción de *C. laurentii* las cepas utilizadas son del cepario de PROIMI.

### II. Medios de cultivo:

El medio para *P. rhodozyma* fue YM de Difco ([p/v] extracto de levadura 0,3%, extracto de malta 0,5%, peptona 1%, glucosa 1%, pH 4,5-5,5) incubándose a 22°C por aproximadamente 14-16 horas.

*S. cerevisiae*, *Rhodotorula* sp y *C. laurentii* fueron crecidas en medio YPD ([p/v] extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%, pH 4,5-5,5) incubándose a 30°C por aproximadamente 12-14 horas.

Para cultivos en medio sólido se adicionó a los correspondientes medios agar 1,5-1,8%. Los cultivos en medios líquidos se hicieron en Erlenmeyers con un volumen del 10% y agitados a 200 rpm.

**Medio para cultivos en fermentador:** La composición del mismo fue la siguiente [p/v]: (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 0,2%; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,06%; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,01%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1%; extracto de levadura 0,5% y glucosa 0,3 o 1%. La fuente

de carbono (glucosa) se esterilizó por separado y se combinó con el resto del medio a temperatura ambiente.

**Medio de regeneración selectivo:** YPX e YPG ([p/v]: extracto de levadura 1%, peptona 2%, xilosa 2% (YPX) o glicerol 2% (YPG) pH 4,5-5,5) adicionadas con KCl 0,6M como estabilizador osmótico.

**Medio de selección:** YNB (yeast nitrogen base, DIFCO) con o sin aminoácidos suplementado con xilosa 2%.

La esterilización de los medios de cultivos se realizó en autoclave a 1 atm durante el tiempo necesario, según el volumen de los mismos;

hasta 1 litro	15 minutos
de 1 a 10 litros	30 minutos
de 10 a 20 litros	60 minutos.

### III. Métodos analíticos:

**Extracción y cuantificación de carotenoides:** Se realizó mediante la técnica del dimetilsulfóxido (DMSO) (Sedmak, J.J. 1990) modificada en este trabajo. Se lavaron y centrifugaron las células dos veces (5 min. 3500 rpm) con 2,0 ml de agua destilada, se secaron en desecador durante 1 minuto y se adicionó 1-1,5 ml de DMSO precalentado a 55°C. Luego de agitar vigorosamente 40-50 seg. se adicionaron 0,5 ml de NaCl 30% en agua y 1,5 ml de acetona. Después de mezclar se extrajeron los carotenoides en 1,5 ml de éter de petróleo. El contenido de carotenoides

se determinó en la fase orgánica por absorción a 474 nm y la concentración de carotenoides totales fue calculada usando el coeficiente de extinción del 1% de 2.100 (An et. al., 1989).

Los carotenoides individuales se analizaron por cromatografía de capa delgada en Silica gel (kieselgel 60, espesor 0,2mm, Merck) usando éter de petróleo:acetona (2:1) como solvente de corrida.

Los espectros de absorción se realizaron en un espectrofotómetro Gilford 250 con un barredor de longitud de onda Gilford 2530.

**Glucosa:** se determinó su concentración enzimáticamente mediante el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (Wiener).

**Crecimiento:** En los cultivos realizados en Erlenmeyers fue seguido por medida de densidad óptica a 660 nm. Cuando fue necesario se diluyó con solución fisiológica. La biomasa se determinó centrifugando 3-5 ml de cultivo a 3.000 g, lavando dos veces con agua destilada y secando a 105°C hasta peso constante.

En el fermentador se siguió el crecimiento utilizando el sensor de biomasa PROIMI II, que fue modificado según se detalla en los resultados de esta tesis.

#### **IV. Aislamiento de *Cryptococcus laurentii*:**

Diversas muestras de desagües pluviales fueron precipitadas por

centrifugación (12.000 rpm 5 min., en microcentrífuga) y sembradas en medio sólido YM-ácido (pH 3,5; HCl).

De las colonias de levaduras aisladas, se identificaron primariamente 7 cepas de *Cryptococcus* sp. por su habilidad de producir compuestos amiloideos (revelados sobre las colonias con I<sub>2</sub>/IK), por ser coloreadas (rosa pálido), y por su crecimiento a 30°C.

Una de las cepas, C7, fue caracterizada como perteneciente a la especie *laurentii* por su morfología y asimilación de carbohidratos.

(Rodrigues de Miranda, L.; 1984)

#### V. Obtención y fusión de protoplastos:

**Metodología para optimar la obtención de protoplastos:** Los cultivos en fase exponencial fueron cosechados, (9.980 g) lavados y resuspendidos en solución de pretratamiento. Luego de incubar 30 min. a 22 o a 30°C se cosecharon (9.980 g) las células y se resuspendieron en solución de enzima en una concentración aproximada de  $5 \times 10^7$  células/ml y se incubaron a 22 o a 35°C. Las diferentes temperaturas corresponden a distintos ensayos que se especifican posteriormente.

Para optimar la concentración del estabilizador osmótico se ensayaron soluciones con 0,6; 0,8; 1,0 and 1,2 M de KCl, con 8,0 mg de enzima/ml y para la concentración de enzima, soluciones con 6,0; 8,0 y 10,0 mg enzima/ml con KCl 1,0 M.

Periódicamente se tomaron muestras (50µl) de la mezcla de

incubación (células-enzima). Estas se diluyeron por separado en 2,0 ml de la correspondiente solución de estabilizador y en 2,0 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Luego de agitar vigorosamente se midió absorbancia a 800 nm. En el agua destilada estallan los protoplastos y esferoplastos y por el contrario en la solución de KCL quedan tanto las células intactas como las osmóticamente frágiles.

**Cálculos:**

trans H<sub>2</sub>O t<sub>n</sub>: transmitancia de la dilución en agua del tiempo n.

trans KCl t<sub>n</sub>: transmitancia de la dilución en la correspondiente solución de KCl del tiempo n.

trans KCl t<sub>n</sub> - trans H<sub>2</sub>O t<sub>n</sub> / trans H<sub>2</sub>O t<sub>0</sub> \* 100 : % de células

osmóticamente frágiles producidas al tiempo n con respecto a las células iniciales.

trans KCl t<sub>n</sub> / trans KCl t<sub>0</sub> \* 100 : % de células totales restantes en la incubación al tiempo n.

**Microscopía de Fluorescencia:** Las células se resuspendieron en 2 g/l de Fluorescent Brightener (SIGMA) en amortiguador (0,01M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,05M Tris-HCl y 0,005 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH:5,0 y estabilizado con 1,0M KCl) durante 5 min. en oscuridad. Posteriormente se lavaron las células con amortiguador y guardaron en oscuridad hasta su examinación en microscopio de fluorescencia (Zeiss, estándar).

**Solución de pretratamiento:** amortiguador Tris-HCl 0,1M (pH 7,4), más EDTA 0,01M, KCl 0,6; 0,8; 1,0 o 1,2 M y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1M.

**Solución de enzimas:** Novozym 234: 6,0; 8,0 o 10,0 mg/ml en amortiguador ácido cítrico-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5,6), con KCl 0,6M.

Todos los lavados y diluciones fueron hechos con KCl 0,6; 0,8; 1,0 o 1,2 M como estabilizador osmótico.

**Solución de fusión:** polietilenglicol (PEG) 4.000 30% en amortiguador Tris-HCl (pH 8,1), adicionado con Cl<sub>2</sub>Ca 10 mM.

**Fusión de protoplastos:** Cantidades iguales de protoplastos de las cepas a fusionar, resuspendidas en KCl 1,0M, se mezclaron y centrifugaron (9.980 g, 15 seg). El sedimento fue suavemente resuspendido en 1,5 ml de solución de fusión e incubado por 25 minutos a 30°C. Luego se diluyó la mezcla en KCl 1,0M y se sembró en los medios correspondientes. En el caso de sembrarse en medios de regeneración selectivos se sembraron a modo de control, las mismas cepas igualmente tratadas pero sin mezclarlas.

**Regeneración:** Para el recuento de colonias se sembraron en placas de YM, muestras diluidas y resuspendidas en agar 1,5%. Para la lectura se incubaron las placas durante 5 días a 22°C. Cada muestra fue sembrada por triplicado.

La frecuencia de regeneración fue calculada como el porcentaje de células osmóticamente frágiles capaces de formar colonias.

Todos los lavados y diluciones fueron hechas con KCl (0,6; 0,8; 1,0 o 1,2 M) como estabilizador osmótico.

## VI. Condiciones de cultivo

**Cultivo por lote y continuo:** Estos ensayos se realizaron a 22°C en un fermentador LH 502D (LH fermentation). El vaso de vidrio de 2 litros fue equipado con un refrigerador con bomba recirculante para mantener la temperatura. El volumen de trabajo fue de 800 ml y la velocidad de aireación 0,8 l/m. La tensión de O<sub>2</sub> disuelto fue determinada con un electrodo polarográfico (Ingold, Urdorf, Switzerland). La agitación fue automáticamente regulada a fin de mantener la tensión de O<sub>2</sub> disuelto por sobre el 40% de saturación. El pH fue controlado automáticamente en 4,5 unidades con HCl 1,0 M y KOH 1,0M.

Los cultivos utilizados como inóculos se realizaron con cepas guardadas en glicerol. Las células se sembraron en 25 ml de medio YM (Erlenmeyers de 250 ml), a 22°C y agitados a 200 rpm. El fermentador fue inoculado al 10% a partir de estos cultivos con una concentración celular de  $1 \times 10^9$  células/ml.

Para el recuento de colonias se sembraron las muestras diluidas en placas de YM agar y se incubaron 5 días a 22°C.

## VII. Adquisición de datos y control:

La adquisición de datos se realizó conectando las salidas analógicas (0-5 volts) de los módulos del fermentador a una computadora AT-386 mediante una tarjeta conversora analógica-digital/digital-analógica de 8 canales y 8 bits de resolución (ADDA8, NELTI); el programa utilizado, BIOFER, forma parte del desarrollo de la presente tesis y se detalla en los resultados. El control se realizó conectando salidas analógicas y digitales de la tarjeta conversora a los distintos módulos y bombas peristálticas (Watson-Marlow), programando las señales a partir de BIOFER.

## VIII. Mutagénesis

**Mutagénesis con luz U.V.:** 5 ml de cultivos crecidos en fase exponencial y diluidos ( $5,0 \times 10^4$  cél/ml) en agua destilada estéril, fueron expuestos en placas de petri a luz U.V. durante períodos de tiempo que variaron desde 0,5 a 5 minutos de forma de alcanzar un índice de mortalidad mayor al 90%, con constante agitación. Luego, las células se plaquearon en YPD (*C. laurentii*) o YM (*P. rhodozyma*) por aproximadamente 10 días en oscuridad, a 30 o 22°C, respectivamente.

**Mutagenesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina:** Se resuspendieron cultivos de *P. rhodozyma* desarrollados a modo de césped en placas con YM-agar a 22°C, aproximadamente 24 horas, en 5 ml de tampón fosfato 50 mM pH 7,0. Se adicionó 4  $\mu$ l de MNNG 10 mg/ml en acetona por cada

$5 \times 10^7$  células y se incubó a 23°C, 45 min., según curva de calibración. La reacción se detuvo adicionando igual volumen de Tiosulfato de Sodio 10% (preparado en el momento y esterilizado por filtración). Luego las células se lavaron con H<sub>2</sub>O destilada estéril, y se sembraron en placas con YM-agar, que fueron incubadas 7-10 días a 22°C.

#### **IX. Separación de cromosomas**

**Preparación de DNA cromosomal intacto:** Se prepararon protoplastos como se indicó en la sección V de Materiales y Métodos y se mezclaron (1:1) con agarosa LMPT (bajo punto de fusión) al 1% en KCl 1,0 M. Se dejó solidificar la mezcla en moldes, para luego cortar los bloques en finas rodajas. Se incubaron las rodajas con proteinasa K (2 mg/ml) en amortiguador NDS (EDTA 0,5 M; Tris-HCl 0,1 M; Sodium lauryl sarcosinate 1%; pH 9,5) a 50°C durante 20 a 24 hs y luego se conservaron a 4°C en amortiguador NDS hasta realizar las electroforesis.

**Electroforesis con inversión de campo (EIC):** El sistema EIC consta de una cuba electroforética convencional y una fuente de poder programable. Esta fuente de poder alterna el campo eléctrico según los requerimientos deseados. Como se trabaja con sólo dos electrodos la variación del campo es de 180° con respecto a la dirección de la corrida. Los bloques se sembraron en geles de agarosa tipo I (baja electroendoosmosis) 1% en amortiguador TBE 0,5x (TBE 10x: EDTA 0,02 M, Tris-Borato 0,89 M, Ac.

bórico 0,89 M, pH 8,0). Los pocillos se cargaron con los bloques previamente fundidos a 65°C.

**Condiciones de la corrida:** Se probaron diferentes condiciones que variaron entre los siguientes valores:

Diferencia de potencial: 11 volts/cm de gel.

Tiempo de corrida: 12 - 48 horas

Número de ciclos: 1 - 4

Duración del pulso al comienzo: 1 seg

Duración del pulso al final: 60 - 120 seg

Incremento del pulso: exponencial

% del tiempo del ciclo en alcanzar el 50% del pulso: 40

Relación pulso hacia adelante/pulso inverso: 3:1

Pausa como % del pulso hacia adelante: 2

Concentración de agarosa: 0,8 - 1,2 %

Temperatura: 4 - 10°C

El equipo utilizado (Gene-Tic, BIOCENT) posee un microprocesador con el cual se programaron las distintas condiciones.

#### **X. ADN de *Phaffia rhodozyma***

**Extracción de ADN:** Se obtuvieron protoplastos (sección V de Mat. y Mét.) de un cultivo de *P. rhodozyma* en fase estacionaria. Los protoplastos se resuspendieron en 5 ml de TE 50 mM (Tris-HCl 50 mM

pH = 7,4 y EDTA 20 mM) más 0,5 ml de SDS 10% y se incubaron a 65°C, 30 min.. Luego se adicionó a esta suspensión, 1,5 ml de acetato de potasio 5M y se incubó en hielo 60 min.. Se centrifugó a 12000 g 10 min. y se transfirió el sobrenadante a otro tubo, al cual se adicionó 1 volumen de isopropanol (-20°C), y se centrifugó a 6000 g 15 min.. El sedimento seco fue resuspendido en 3,0 ml de TE 10mM (Tris-HCl 10 mM pH = 7,4 y EDTA 1mM). Se centrifugó a 12000 g 15 min. a 4°C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo al que se le adicionó 15  $\mu$ l de RNAsa A 10mg/ml. Esta mezcla se incubó a 37°C 30 min., se agregó 250  $\mu$ l de proteinasa K 10 mg/ml y se siguió incubando durante 2 horas más. Se adicionó 1 volumen de fenol, luego de 10 min. se centrifugó 3 min. y se transfirió la fase acuosa a la que se le agregó cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Luego de 5 min. se centrifugó 3 min. y se transfirió la fase acuosa adicionándole un volumen de isopropanol. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se secó al vacío. Finalmente se resuspendió el sedimento en 200  $\mu$ l de TE 10mM (Tris-HCL 10 mM pH = 7,4 y EDTA 1 mM) y se guardó a 4°C, hasta su uso.

**Análisis electroforético:** La movilidad electroforética de las muestras de ADN fue analizada en gel de agarosa 0,8-1% en amortiguador TBE 1x(TBE 10x: EDTA 0,02 M, Tris-Borato 0,89 M, Ac. bórico 0,89 M, pH 8,0) más 2  $\mu$ l de bromuro de etidio 10 mg/ml cada 100 ml de gel. Las muestras se sembraron mezcladas con 1/4 de volumen de amortiguador de siembra (Azul de Bromofenol 0,25 %, Sacarosa 40%) y fueron

corridas a 10 volts/cm del gel.

**Aislamiento de bandas en geles de agarosa:** Se cortaron los bloques del gel donde estaban las bandas de interés y se transfirieron a tubos Eppendorf previamente tarados. Se agregó INa (solución saturada en  $\text{SO}_3\text{Na}_2$  5%) 3 veces en volumen el peso de los bloques y 15  $\mu\text{l}$  de glassmilk (Geneclean II, BIO 101). Se dejó reposar durante 15 min. agitando cada 1 min., se centrifugó (9.980 g, 8 seg.) y se lavó 3 veces el sedimento con New (225 ml de 20mM Tris-HCl pH:7,2; 0,2M ClNa; 2mM EDTA pH:8,0 más 275 ml de etanol absoluto). Luego de 1 hora de secado al vacío se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e incubó por 8 min. a 55°C. Se centrifugó (9.980 g, 8 seg.) y se guardó el sobrenadante. El sedimento se volvió a calentar con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y luego de centrifugar, se juntaron los sobrenadantes (ADN), guardándolos a 4°C hasta su uso.

**Restricción de plásmidos de *P. rhodozyma*:** Cada 40  $\mu\text{g}$  de ADN se agregaron 6  $\mu\text{l}$  de amortiguador N°3 (BIORAD), 7  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada y 1  $\mu\text{l}$  de enzima BamH1, se incubó a 37°C durante una 1-2 horas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### ESTUDIOS GENETICOS Y FISIOLÓGICOS DE *Phaffia rhodozyma*

#### I. Obtención de protoplastos

Los primeros experimentos de fusión se realizaron según la técnica de dador muerto, en la cual una de las dos cepas a fusionar no se encuentra en estado viable. Uno de los factores de presión de selección sobre los híbridos fue el crecimiento a 30°C. Por este motivo la preparación de protoplastos de *P. rhodozyma* se llevó a cabo a dicha temperatura. Como esta levadura no desarrolla a 30°C se consideró a la misma como el dador muerto (Miller, M.W.; 1976).

Cuando se digiere total o parcialmente la pared celular de una levadura, ésta estalla a menos que el medio extracelular esté osmóticamente estabilizado con respecto al medio intracelular. (Brenner, S.; 1958)

Para determinar la concentración óptima de estabilizador, se siguió la formación de células osmóticamente frágiles (c.o.f.) en incubaciones con diferentes concentraciones de KCl, tanto en el pretratamiento como en la solución enzimática.

En la fig. 12 se ve claramente que a menor concentración de KCl el porcentaje de células totales restantes es menor.

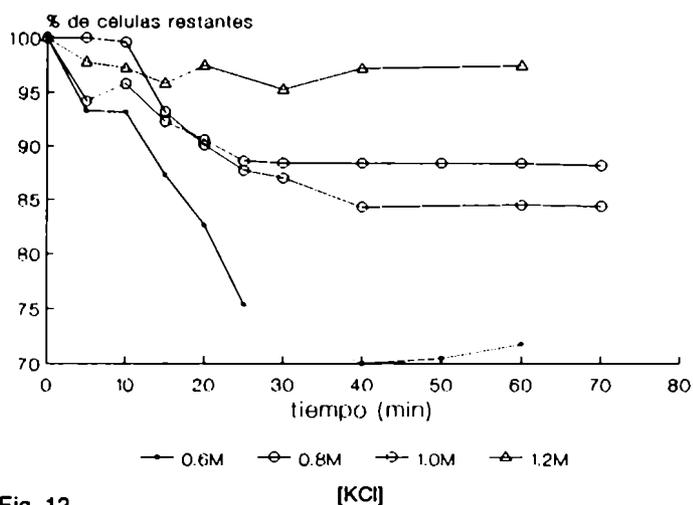


Fig. 12

Esto se debe a que

durante el proceso

de obtención de protoplastos las células estallan (lo que se observa

microscópicamente). Al calcular el porcentaje de c.o.f. con respecto a la

concentración inicial de células (fig. 13) se puede concluir que, para lograr

un medio isotónico con respecto al medio intracelular de *Phaffia*

*rhodozyma*, la concentración de estabilizador osmótico 0,6 M,

normalmente usada para *Saccharomyces cerevisiae* y demás especies no

osmotolerantes (Spencer, J.F.T.; 1989) es insuficiente en este caso. A

concentraciones iguales o mayores que 1,2 M cae la eficiencia, siendo la

óptima 1.0 M.

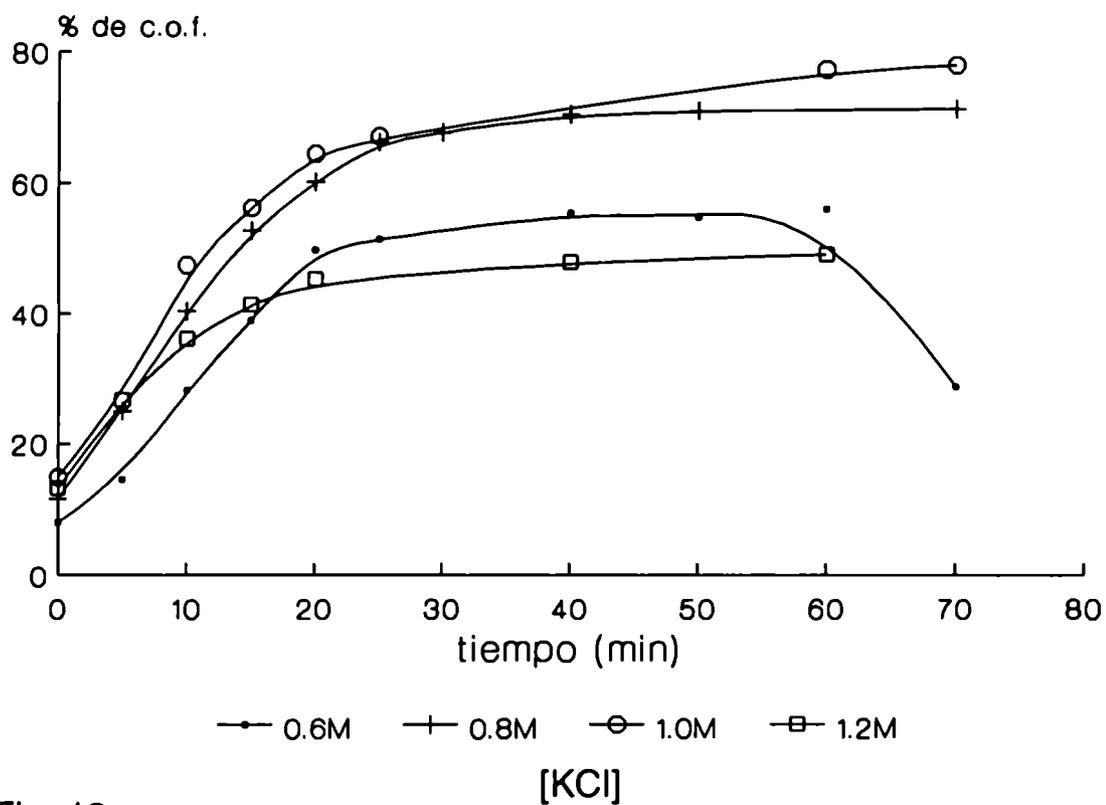


Fig. 13

Una vez definida la concentración óptima de estabilizador osmótico, se siguió el mismo esquema de trabajo para ensayar distintas concentraciones de enzima (6; 8 y 10

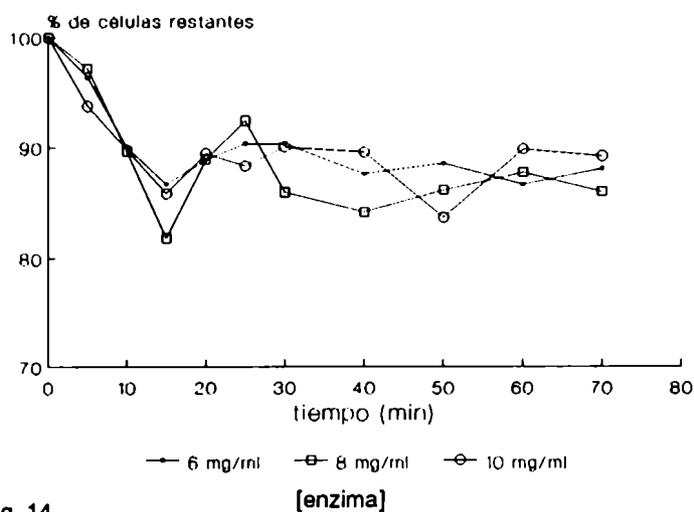
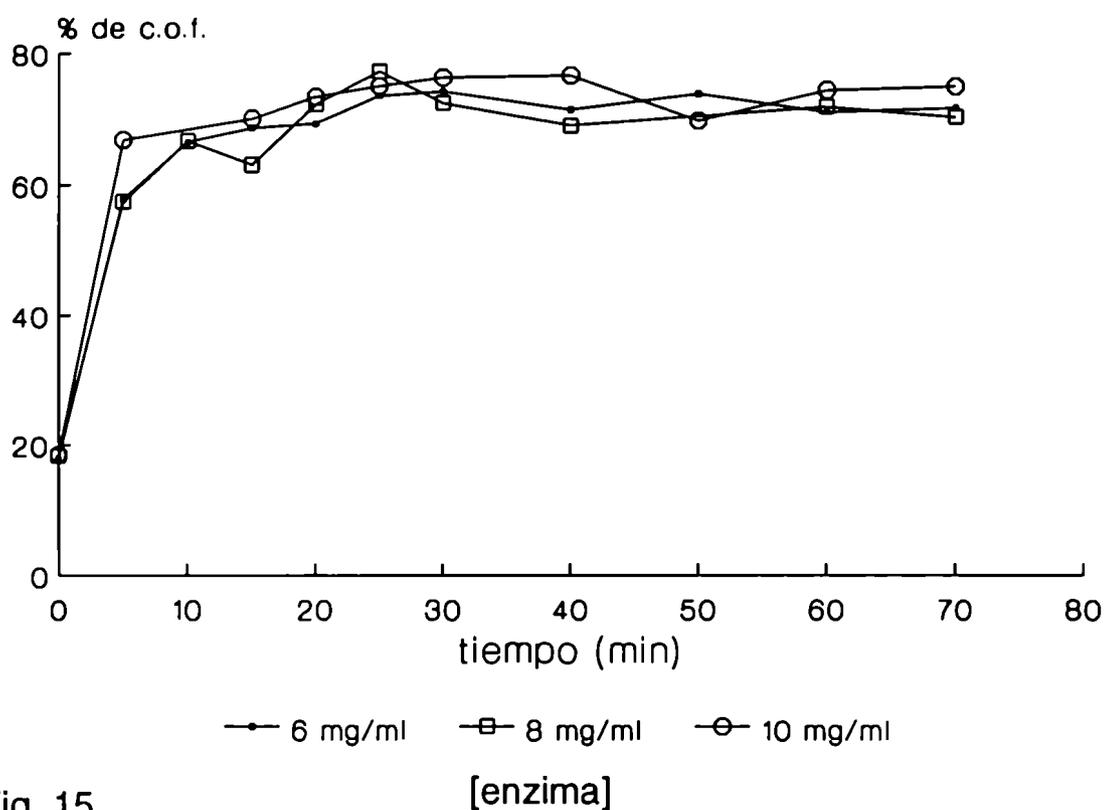


Fig. 14

mg/ml). En la fig. 14 se observa que la concentración enzimática no afecta el porcentaje de células restantes con respecto a la concentración inicial (KCl 0,1 M). Finalmente al observar el porcentaje de c.o.f. obtenidas (Fig.15), podemos observar que aunque la pendiente inicial de aparición de células frágiles es mayor a la concentración de 10,0 mg/ml



de enzima, ya a los 10 min. practicamente se equiparan los resultados, y las diferencias no son significativas con respecto a la variación de la concentración de enzima. Por lo tanto se concluye, que la menor concentración es la óptima pues se necesita un menor número de lavados posteriores de las células para excluir la enzima, logrando así que ésta no

interfiera en los experimentos posteriores.

Recopilando los resultados hasta aquí presentados, se propone el siguiente protocolo para obtener protoplastos de *Phaffia rhodozyma*:

- 1- Hacer un cultivo de *P. rhodozyma* ya sea en YM-líquido o a modo de césped en YM-agar, durante aproximadamente 24 horas.
- 2- levantar el cultivo de la placa de petri suspendiéndolo en H<sub>2</sub>O destilada estéril.
- 3- Lavar con KCl 1.0 M (centrifugar a 5.000 g 5 min.)
- 4- Resuspender el precipitado en solución de pretratamiento hasta una concentración aproximada de  $5 \times 10^7$  células/ml. Incubar durante 30 min. a 30°C.
- 5- Centrifugar (5.000 g 5 min.) y resuspender (en igual volumen que en el punto 4) en solución de enzima (Novozyme 234 6,0 mg/ml). Incubar a 35°C.
- 6- Determinar el progreso de la incubación observando al microscopio. Se alcanza el mayor porcentaje de protoplastos (80%) en aproximadamente 25 min..
- 7- Lavar 3 veces con KCl 1,0 M.
- 8- Guardar a 4°C hasta su utilización en el mismo día.

El protocolo propuesto es útil en casos como fusiones con dador muerto, extracción de ADN, ARN o cualquier otro proceso que implique la remoción de la pared celular sin necesidad de mantener la viabilidad.

Para casos en los cuales sí es esencial obtener protoplastos viables,

la primera modificación que hay que plantear es la disminución de la temperatura a 22-25°C durante las distintas incubaciones.

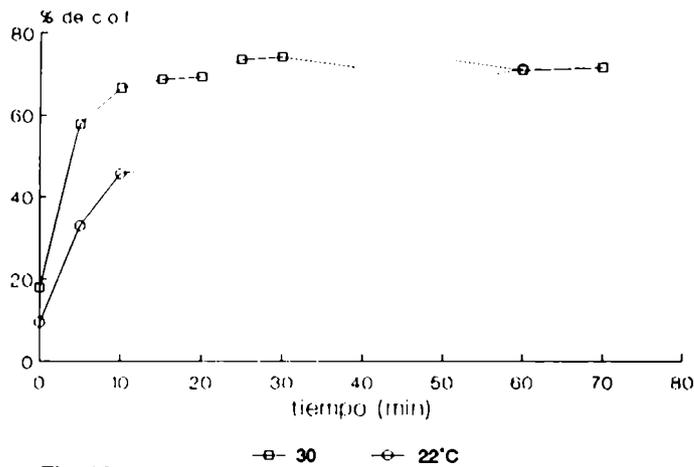


Fig. 16

En la fig. 16 se puede ver cómo es la evolución de la obtención de c.o.f. cuando se sigue el protocolo propuesto, variando solamente la temperatura de incubación en los puntos 4 y 5, fijándola a 22°C. Los

lavados (puntos 3 y 7) se realizaron en centrífuga refrigerada a 20°C.

Si comparamos la obtención de c.o.f. a 30-35°C con respecto a 22°C (fig. 16), podemos ver que a la menor temperatura se requieren 60 min. para obtener un 70% de c.o.f., mientras que a 35°C el tiempo se reduce a 25 min., lo cual se explicaría como una cinética enzimática directamente relacionada con la temperatura. Esto es importante cuando se requiere un alto rendimiento de c.o.f. no viables ya que aunque el medio se encuentre osmóticamente equilibrado, a medida que el tiempo pasa, las células van explotando.

Para estudiar la viabilidad y capacidad de regeneración de las células tratadas, se realizaron plaqueos de las muestras en los respectivos medios (YM con y sin estabilizador osmótico). Observándose que la regeneración fue de aproximadamente 46%, cuando la obtención de c.o.f

correspondió al 30%; a medida que la conversión a c.o.f. aumentaba, la regeneración disminuía, 23% para un 75% de conversión.

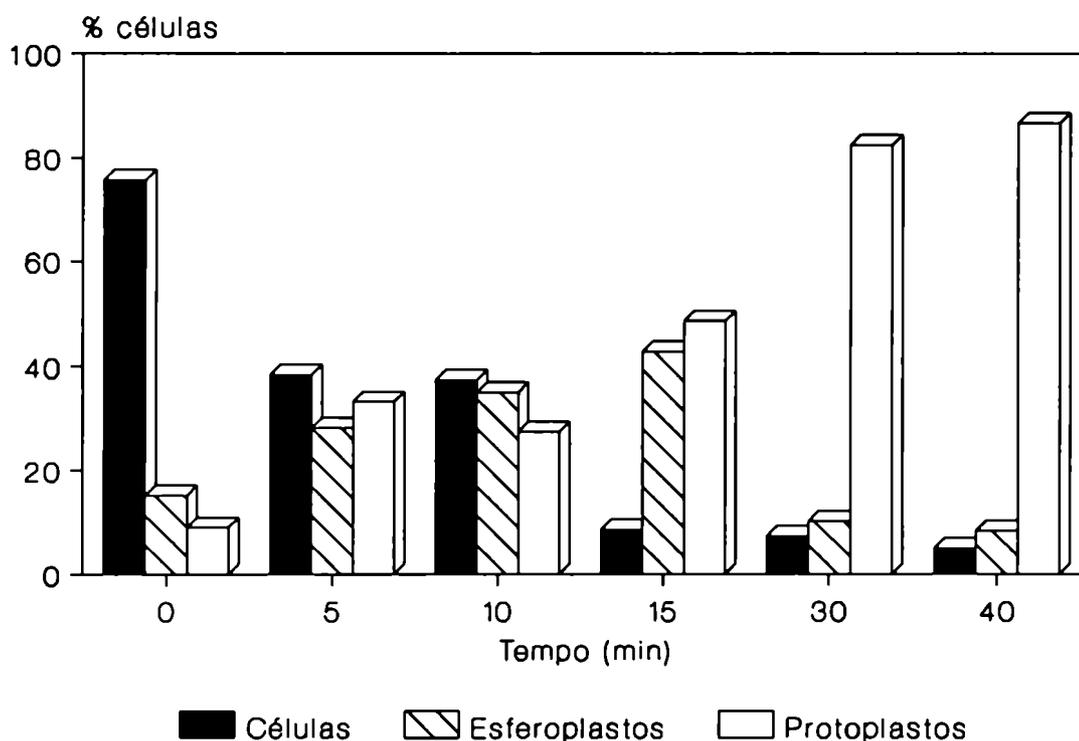


Fig. 17

Se define como protoplasto a una c.o.f. que carece totalmente de pared celular (Bacon, J.S.D.; 1969. Brenner, S.;1958). Se llaman esferoplastos a las células que aunque son osmóticamente frágiles, conservan fragmentos de pared (Darling, S.; 1969). Dependiendo de la naturaleza y cantidad de pared remanente, los esferoplastos pueden mantener su morfología original o presentar forma esférica en medios isotónicos.

Si el objetivo es realizar fusiones se pueden utilizar esferoplastos,

aunque es más conveniente el uso de protoplastos. Ahora bien, si los experimentos a realizar implican transformación con plásmidos o cromosomas artificiales, el uso de esferoplastos es esencial para lograr altos rendimientos (Sipiczki, M.; 1985).

Para determinar si la formación de protoplastos en *P. rhodozyma* implica una transición por estados de esferoplastos, se incubaron muestras de c.o.f. obtenidas con Fluorescent Brightnes 28. En la fig. 17 se observa cómo evoluciona la formación de c.o.f. y la proporción de protoplastos y esferoplastos.

La fluorescencia en las células fue disminuyendo durante el transcurso de la incubación, aunque siempre hubo células que mantuvieron alta la misma. Esta disminución se vio relacionada con la pérdida de la morfología normal (esferoplastos), llegando las células a tomar un aspecto esférico de gran tamaño y sin fluorescencia (protoplastos).

Este pasaje por el estadio de esferoplastos explicaría que la regeneración va disminuyendo a medida que aumenta el porcentaje de c.o.f.. La regeneración sería más eficiente a partir de esferoplastos que de protoplastos, ya que los restos de pared actuarían como núcleos elongadores en la síntesis de pared celular. (Bacon, J.S.D.; 1969; Nečas, O.; 1971)

## II. Fusión de protoplastos

Una vez obtenidos los protoplastos de *P. rhodozyma*, se los utilizaron para realizar fusiones con otras especies de levaduras. El objetivo se centró en la obtención de híbridos que sintetizaran astaxantina y pudieran a su vez crecer a mayor temperatura que *P. rhodozyma*. De esta manera se podrían acortar los tiempos de crecimiento y también se evitaría el costo que implica refrigerar un fermentador a 22°C.

### Fusión de *Phaffia rhodozyma* y *Saccharomyces cerevisiae*:

Se utilizaron diversas cepas de *S. cerevisiae* para ser fusionadas con *P. rhodozyma*. En la tabla I se detallan las diferentes cepas de *S. cerevisiae* utilizadas detallando sus marcas genéticas y qué presión de selección se utilizó (medio y temperatura de incubación) para aislar los híbridos resultantes. Además se detalla si se obtuvieron híbridos y si producían carotenoides. Para *P. rhodozyma* se utilizó como marca su inhabilidad de crecer a 30°C.

En el caso de *P. rhodozyma* x *S. cerevisiae* K-382-382 se obtuvieron híbridos que crecieron a 30°C con xilosa como única fuente de carbono. Los parentales no poseían dichas capacidades juntas.

Las levaduras "petite" son mutantes deficientes en respiración. Estas mutantes tienen alguna deficiencia en su cadena respiratoria, y por este motivo no pueden asimilar hidratos de carbono no fermentables (por ejemplo glicerol, etanol). Las mutantes "petite", por lo tanto, obtienen

energía solamente por medio de la glucólisis. Esto determina que no puedan utilizar, como se dijo anteriormente, el glicerol como única fuente de energía. Dicha deficiencia puede ser revertida mediante fusión de protoplastos con cepas de levaduras que sean competentes respiratorias (Spencer, J.F.T.; 1981). En este caso lo que se logra es un intercambio de material citoplasmático. Así la cepa competente respiratoria, que posee mitocondrias funcionales, transfiere estas organelas a la cepa receptora, la cual revierte su condición de "petite". (Ferenczy, L.;1977)

En base a dicha técnica se realizaron las fusiones de *P. rhodozyma* con las cepas de *S. cerevisiae* K-382-382 "petite", p155 "petite" y p522 "petite". Los híbridos se aislaron en YPglicerol a 30°C.

Tabla I:

cepas de <i>S. cerevisiae</i>	Medio de Selección	T(°C)	Híbridos	Carotenoides
K-382-382	YPXilosa	30	SI	no
K-382-382 petit	YPGlicerol	30	no	--
p155 petit	YPGlicerol	30	SI	no
p522 petit	YPGlicerol	30	SI	no
p164 <u>a</u> ,leu <sub>3</sub>	YNB °/Aa	30	no	--
p352 killer, arg	YNB °/Aa	30	SI	no
p165 <u>a</u> ,his	YNB °/Aa	30	no	--
p173 <u>g</u> ,ade <sub>2</sub>	YNB °/Aa	30	no	--

Como se puede observar en la tabla I, la reversión de la deficiencia respiratoria fue exitosa, excepto en el caso de la cepa K-382-382, en la cual no se logró revertir el carácter "petite", aún luego de repetidas fusiones. Esto podría deberse a alguna deficiencia a nivel nuclear no complementada, o a alguna incompatibilidad entre las mitocondrias de *P. rhodozyma* y la de la cepa K-382-382 "petite".

Cuando en las cepas parentales se utilizaron auxotrofías como marcas genéticas (Spencer, J.F.T.; 1978), sólo se lograron híbridos en las fusiones realizadas entre *P. rhodozyma* y la cepa p352.

Finalmente, de la tabla I se puede extraer, que no se obtuvieron híbridos carotenogénicos. Pero sí se logró la fusión y transferencia de información genética entre especies de distinto género. Más aún, reconociendo a *P. rhodozyma* como posible basidiomiceto, sería una fusión entre grupos distintos.

En las fusiones, cuando existe cariogamia (unión de los núcleos), se produce un reordenamiento cromosómico, que implica la posible fijación de cromosomas mezclados (provenientes de ambos parentales) y eventos de recombinación.

Considerando lo expuesto se buscó un género relacionado con *P. rhodozyma*, con respecto a la característica de ser carotenogénica, eligiéndose a *Cryptococcus*. (Yamada, Y.; 1989)

*Cryptococcus* es un género de levadura cuya principal característica es ser productora de carotenoides. Su temperatura óptima de crecimiento está entre los 30 y 35°C, dependiendo de la especie. (Rodrigues de

Miranda, L.; 1984)

Para seleccionar cepas pertenecientes a este género se plaquearon muestras de agua de estanques en medio YM ácido. Se aislaron levaduras que fueron caracterizadas en base a la producción de pigmentos y cápsulas amiloideas. 7 de ellas pertenecían al género *Cryptococcus*. Una de éstas fue identificada como *C. laurentii* (C7) según la utilización de diversas fuentes de carbono. (Rodriguez de Miranda, L.; 1984)

Mediante mutagénesis por luz U.V. se obtuvieron mutantes auxotróficos de la cepa *C. laurentii* C7 (C7-27; C7-88) y blancos (deficientes en la producción de pigmentos, C7-Wn). Las marcas genéticas logradas, las hace óptimas como cepas parentales de fusión, para poder diferenciar los híbridos resultantes de las fusiones con *P. rhodozyma*. Como la temperatura de regeneración y selección de los híbridos fue 30°C, *P. rhodozyma* no pudo crecer a esa temperatura restrictiva.

#### **Fusión de *Phaffia rhodozyma* y *Cryptococcus laurentii*:**

De los mutantes C7-27 y diversas C7-Wn, se obtuvieron esferoplastos, los que fueron fusionados con esferoplastos de *P. rhodozyma*.

Los productos de fusión de *P. rhodozyma* y C7-27 fueron aislados en medio mínimo (YNB sin aminoácidos + glucosa 2%) a 30°C. En estas condiciones no crecieron los parentales. De los fusantes se reaislaron

cepas (H27-12, H27-13, H27-14 y H27-15) para determinar presencia de pigmentos a través de extracción y cromatografía de capa delgada.

De la fusión de *P. rhodozyma* y C7-W4 se aislaron en medio YM a 30°C a los híbridos HW4-66, HW4-78, HW4-81, HW4-84.

Los híbridos así obtenidos fueron caracterizados según las bandas obtenidas en cromatografías en placa delgada de extractos de sus pigmentos. En la tabla II se resumen los valores de Rf de las bandas obtenidos para cada híbrido.

Tabla II:

CEPAS	Valores de Rf de cada banda en cromatografías en placa						
<i>P.rhodozyma</i>	.19	.24	.28	.35	.37	.48	.65
C7-27							.80
C7-W4					.41		.75
H27-12	N.D.						
H27-13					.41		
H27-14	N.D.						
H27-15	N.D.						
HW4-66					.41		
HW4-78					.41		.75
HW4-81							.80
HW4-84					.41		

N.D. = No se detectan bandas.

Aunque no se lograron aislar cepas híbridas que produzcan astaxantina y sean capaces de crecer a 30°C, sí se obtuvieron híbridos que complementaron auxotrofías entre *P. rhodozyma* y *C. laurentii* (H27-12; -13; -14; -15) y también se complementaron mutaciones que afectaban la carotenogénesis en *C. Laurentii* (HW4-81). De acuerdo a estos resultados se puede postular que ambas especies podrían compartir cierta información genética con respecto a la carotenogénesis. Cabe destacar que no hay información alguna sobre los genes responsables de la síntesis de carotenoides, para ninguna de las dos especies.

### III. Patrón Electroforético de los cromosomas de *Phaffia rhodozyma*

En la electroforesis convencional, moléculas superiores a 20 kb migran en forma independiente a su tamaño (Brewer, B.J.; 1987).

En la electroforesis de campo pulsado (ECP) el campo eléctrico aplicado varía alternativamente en dos direcciones. Esto hace que las moléculas deban reorientarse en respuesta al cambio, y el tiempo que tardan en lograrlo depende de su tamaño (Bustamante, C.; 1993). Se logra de este modo caracterizar largos segmentos de ADN, a tal grado que puede trabajarse con cromosomas enteros desde 30 hasta 2000 kb (Carle, G.F.; 1985).

El uso de diversos sistemas de ECP ha permitido armar cariotipos de diversas especies de levaduras (Johnston, et al, 1988) como así también aislar cromosomas para ser utilizados en experimentos de transformación celular (Goto, K.; 1990).

En el caso de *Phaffia rhodozyma* aún no se ha informado sobre el aislamiento de cromosomas y mucho menos sobre resultados referentes al número de los mismos.

Como se ha logrado óptimas condiciones para obtener protoplastos de *P. rhodozyma*, se trabajó en las mismas condiciones ideales para caracterizar a la especie según su número de cromosomas.

Se variaron el tiempo de pulsado, el voltaje aplicado, la concentración de agarosa, tiempo de corrida y el número de ciclos, y se hicieron numerosas corridas tratando de considerar la influencia de las

variables en juego. Se obtuvieron desde corridas rechazables con una única banda en el frente de corrida, hasta lograr obtener 7 bandas (foto 2) con las siguientes condiciones:



FOTO 2: Calles 1 y 2: *Phaffia rhodozyma*. Calle 5: *Saccharomyces cerevisiae*.

Diferencia de potencial: 11 volts/cm de gel.

Tiempo de corrida: 20 horas

Número de ciclos: 1

Duración del pulso al comienzo: 1 seg

Duración del pulso al final: 60 seg

Incremento del pulso: exponencial

% del tiempo del ciclo en alcanzar el 50% del pulso: 40

Relación pulso hacia adelante/pulso inverso: 3:1

Pausa como % del pulso hacia adelante: 2

Concentración de agarosa: 1 %

Temperatura: 10°C

Una de las 7 bandas obtenidas correspondería, por su tamaño e intensidad, a dos moléculas diferentes ; con lo cual se podría inferir que el patrón electroforético de los cromosomas de *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17269 estaría compuesto por lo menos por 8 cromosomas.

#### IV. Plásmidos de *Phaffia rhodozyma*

Una de las tantas estrategias posibles a considerar cuando se quieren estudiar caminos biosintéticos y sistemas de regulación, es la de aislar los genes responsables. Para ello se ensayó si la preparación de protoplastos de *Phaffia rhodozyma* sería satisfactoria para la extracción de su ADN total.

Luego de obtener los protoplastos y extraer el ADN, se lo analizó electroforéticamente contra patrones de peso molecular. Se obtuvo una banda correspondiente a ADN > a 50 Kb. y tres grupos de bandas, siendo uno de ellos una banda única de muy bajo peso molecular (<0.5 Kb). El otro grupo consistió en tres bandas de 3 a 3,8 Kb y finalmente el tercer grupo también conformado por tres bandas de 5 a 7 Kb. En la foto 3, se muestran corridas electroforéticas de extracciones independientes de ADN, las cuales se realizaron según se describe en Materiales y Métodos, pero el tratamiento con RNAsa fue obviado en las muestras N° 2 y 3 (calles 3 y 4). En la corrida electroforética se puede observar la presencia de una banda intensa y de muy bajo peso molecular, correspondiente al ARN.

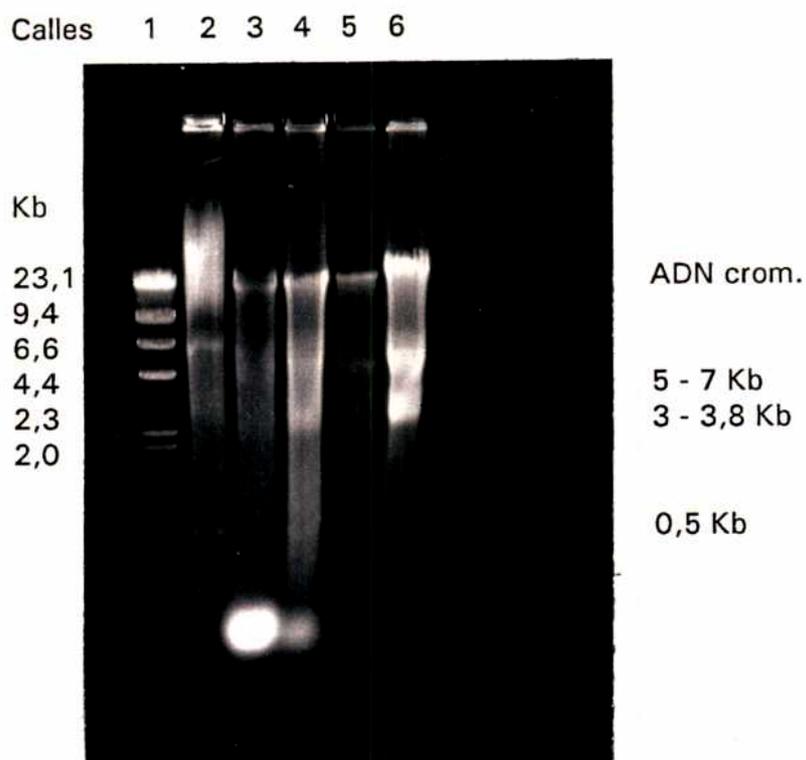


FOTO 3: Calle 1: Fago  $\lambda$  digerido con HindIII. Calles 2 a 6: muestras 1 a 5 respectivamente.

La banda de mayor peso molecular ( $>50$  Kb) correspondería al ADN cromosomal de *P. rhodozyma*. Esta a su vez fue cortada del gel de agarosa, extraída y digerida con BamH1. Se incubó por espacios de 1, 2 y 3 horas y luego se determinó electroforéticamente que el tiempo óptimo de incubación fue de 1 hora. En este caso dio como resultado una digestión parcial enriquecida en fragmentos de 12 kb (Foto 4).

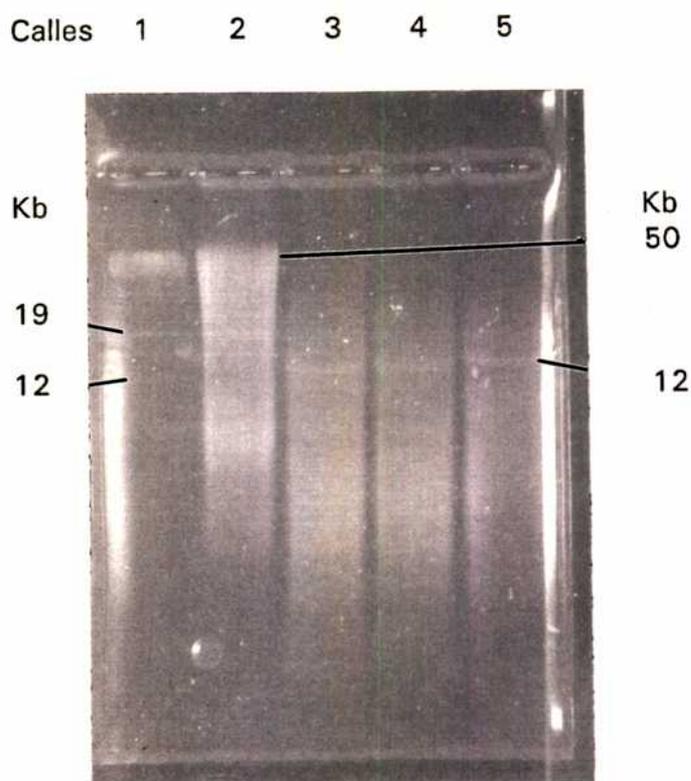


FOTO 4: Calle 1: Marcador de alto peso molecular (Gibco) 48 a 8 Kb. Calle 2: ADN cromosomal. Calles 3 a 5: digestión con BamH1 por 1, 2, 3 hs respectivamente.

Todo esto permite concluir que los protoplastos obtenidos son aptos para la extracción de ADN y éste es asequible a las enzimas de restricción. Esto podría en el futuro servir para armar bancos genómicos de *P. rhodozyma*.

Para caracterizar en forma preliminar las bandas no correspondientes a ADN cromosomal, se trató a la muestra N°5 (Foto 5) con solución alcalina (60 min, 60°C; calle 3); con DNAsa (60 min, 37°C; calle 4); con RNAsa (60 min, 37°C; calle 5) y RNAsa en alta fuerza iónica, ClNa 0,3 M (60 min, 37°C, calle 6).

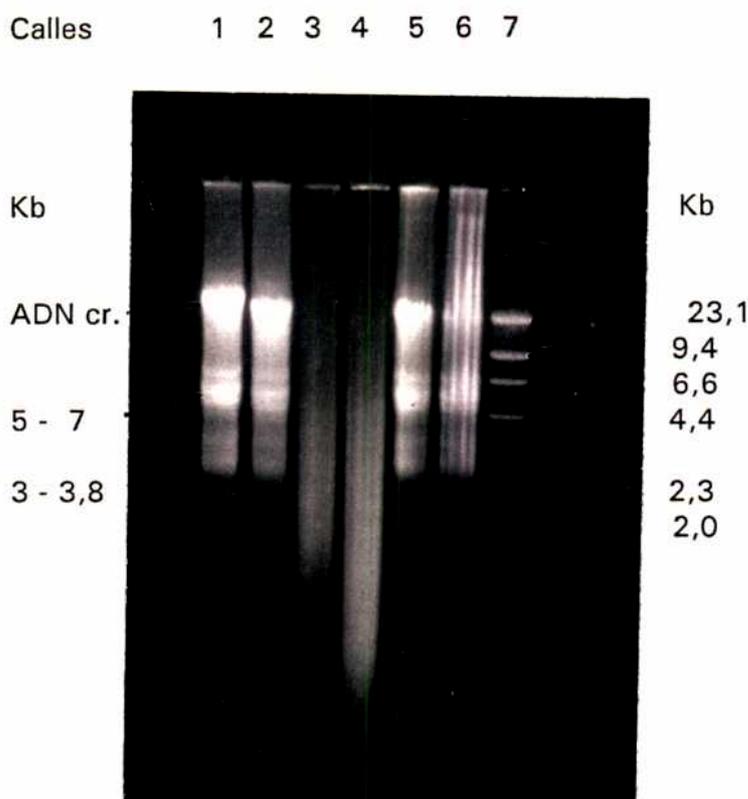


FOTO 5: Calle1: control. Calle 2: 60 min a 60°C. Calle3: NaOH 10M 60 min, 60°C. Calle 4: DNAsa. Calle 5: RNAsa. Calle 6: RNAsa en CINA 0,3 M. Calle 1: Fago  $\lambda$  digerido con HindIII.

De los resultados obtenidos se pudo inferir que dicho patrón de bandas indicaría la presencia de moléculas en particular y no de artefactos de la técnica, ya que se repitió en diversas e independientes extracciones.

Castillo y Cifuentes (1993) aislaron de *P. rhodozyma* UCD 67-385 4 bandas de 4,5; 3,1; 0.95 y 0.75 Kb respectivamente, correspondientes a RNA de doble cadena. En este caso el análisis preliminar indicaría que dichas bandas no corresponden a ARN ya que las mismas resisten a los tratamientos con RNAsa aún en condiciones desnaturalizantes. Por el contrario serían moléculas de ADN episómico, pequeño y probablemente circular, característico de plásmidos.

## V. Obtención de mutantes de *Phaffia rhodozyma*

Cuando se pretende estudiar los genes de una vía biosintética es prácticamente obligatorio disponer de mutantes que presenten alguna clase de interrupción en el camino a estudiar. Por lo tanto se planeó mutagenizar a *P. rhodozyma* en busca de mutantes de color, es decir células posiblemente defectivas en la síntesis de astaxantina.

Primero se hizo una curva de sobrevivencia siguiendo el protocolo propuesto y tomando muestras a intervalos de 10 min.. Las mismas se plaqueaban y luego se contaban las colonias que aparecían, relativizando con el número de colonias en muestras donde el tiosulfato se agregó antes que el agente mutagénico (tiempo 0 , 100%). De este modo se determinó que ya a los 30' de incubación con MNNG se logra un 90% de mortalidad, por lo cual, en posteriores pruebas, se incubó en ese lapso de tiempo.

Como resultado se obtuvieron diversos mutantes de color, los cuales fueron caracterizados por su producción de pigmentos y estabilidad de la mutación. Para esto último se hicieron sucesivos repiques verificando así la estabilidad de las mutaciones (detectada por su fenotipo de color) en el tiempo.

Para tratar de caracterizar las mutaciones se extrajeron los pigmentos y se hicieron cromatografías en capa delgada (TLC). Dos mutantes, col2-1 y col5-7, aparentemente tendrían una mutación posterior a la síntesis de  $\beta$ -caroteno, acumulándose éste en las células y

dándoles un fenotipo amarillento.

Otros mutantes, col3-2 y col3-4, cuyo fenotipo fue blanco, estarían mutados en pasos anteriores a Fitoeno, pero como crecen en medio mínimo (YNB-Glucosa), la mutación sería posterior a Geranil-PP necesario para las células.

La mutante col1-5 (salmón oscuro) presenta los 3 intermediarios inmediatos de astaxantina, pero la banda correspondiente a astaxantina es muy débil con respecto a *P. rhodozyma* tipo salvaje. Esto podría indicar una mutación no total en el último paso de la síntesis de astaxantina.

Todos los mutantes presentaron una remarcable estabilidad del color a través de sucesivos subcultivos; además dichos fenotipos de color nunca aparecieron espontáneamente. (Foto 6)

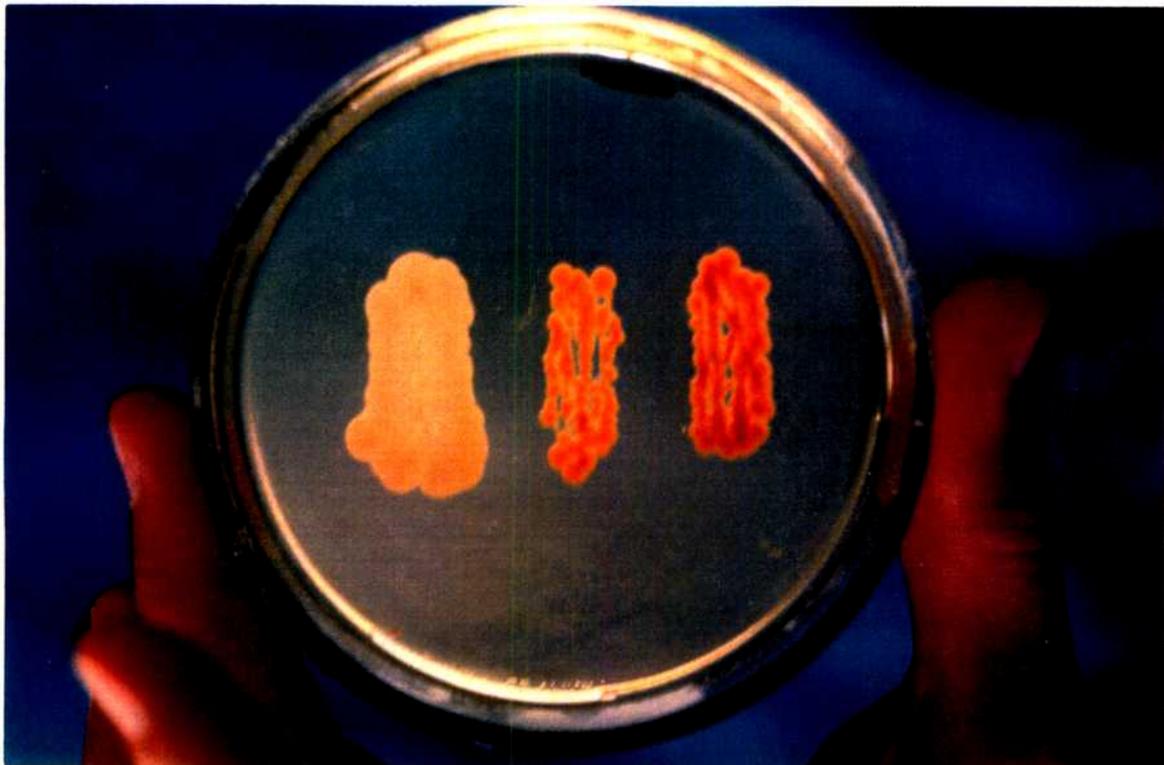


FOTO 6: Mutantes de *Phaffia rhodozyma*, de izquierda a derecha: col3-4, col5-7 y *Phaffia rhodozyma*

## VI. Respuestas de *Phaffia rhodozyma* a condiciones de estrés oxidativo

Cuando se estudia la producción de algún metabolito microbiano cuya síntesis no es común, surge la pregunta: ¿por qué lo produce?.

Este es el caso de la síntesis de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*. Para tratar de explicar algunos aspectos de ese metabolismo, se estudió cómo reacciona *P. rhodozyma* ante el estrés oxidativo.

La presencia de un generador de radicales anión superóxido ( $O_2^-$ ) en el medio de cultivo, como duroquinona, induce la acumulación de carotenoides en *P. rhodozyma* (Schroeder, W.A.; 1993). En estos estudios se utilizó una mezcla generadora de radicales libres ( $H_2O_2 + Fe^{2+}$ ) en cultivos continuos de *P. rhodozyma* y mutantes derivados.

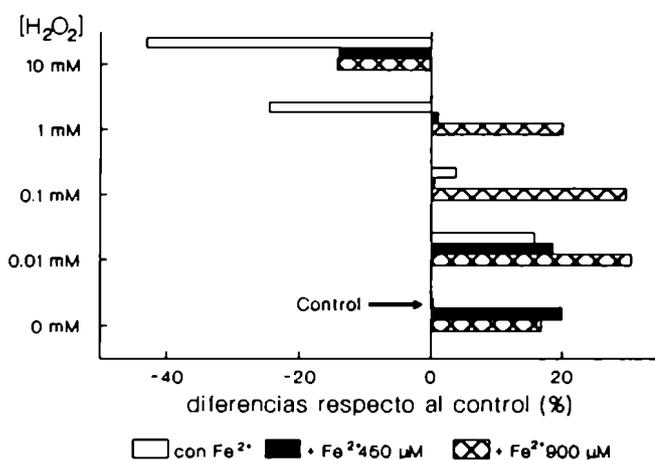


Fig. 18

Cuando se adicionó  $H_2O_2$  al medio de cultivo en concentraciones menores a 1 mM, se observó un incremento de carotenoides con respecto al control y, con concentraciones mayores el efecto fue el

inverso. Se agregó además  $Fe^{2+}$  y se mantuvo el mismo patrón, pero a partir de concentraciones 1 mM de  $H_2O_2$  (Fig 18).

El  $H_2O_2$  junto al  $Fe^{2+}$  producen radicales hidroxilos ( $HO\cdot$ ), altamente reactivos según la reacción de Fenton (Halliwell, B.; 1989):  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + HO\cdot + Fe^{3+}$ , y éstos pueden ser capturados por carotenoides,

quienes a su vez se degradan (Schroeder, W.A.; 1993).

Para estudiar este comportamiento con mayores detalles se incubaron extractos de carotenoides totales en acetona, provenientes de cultivos controles, con distintos volúmenes de una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  +  $\text{Fe}^{2+}$ . Al realizarse barridos espectrales de las muestras se vio claramente que descienden los máximos correspondientes a los carotenoides y que surge un pico de probables productos de degradación. Este efecto se acentúa con mayores

volúmenes de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  +  $\text{Fe}^{2+}$ , fig 19. Por cromatografía en placa delgada se verificó la

disminución de los carotenoides, incluso

de astaxantina. Al incubar con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Fe}^{2+}$  por separado no se observó dicho patrón.

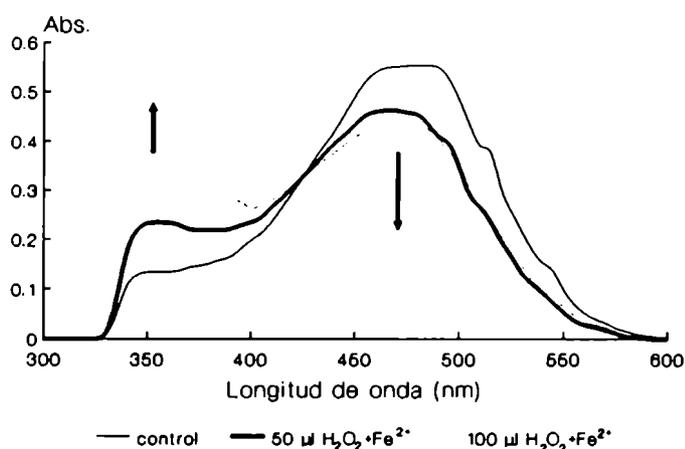
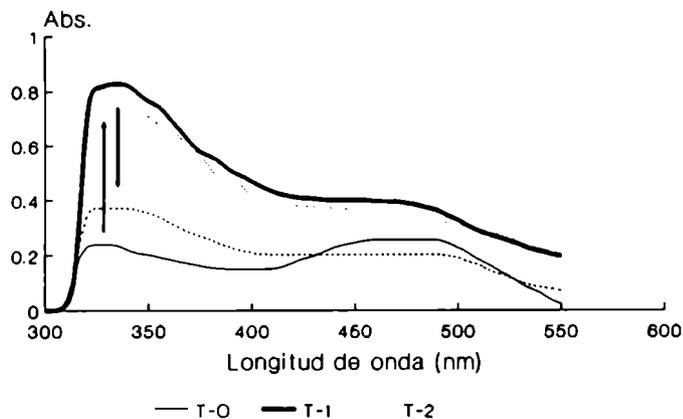


Fig. 19

Para ver si los espectros de absorción podrían dar información de lo que estaría ocurriendo intracelularmente en *P. rhodozyma*, se realizó un pulso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50mM +  $\text{Fe}^{2+}$  100 $\mu\text{M}$  (las concentraciones corresponden al

fermentador) en cultivo continuo a una  $D=0.14 \text{ h}^{-1}$ . Las muestras fueron tomadas a los tiempos, T0:prepulso; T1:40'; T2:180' y T3:24 h. En la figura 20 se muestran los espectros de extractos en acetona. Si



Temp:22°C O.D.:50% pH:4.6  
Fig. 20

comparamos las figuras 18 y 19 se observa que el patrón de degradación observado in-vitro se repite entre T0 y T1. T2 sería similar a T1, y a T3 el cultivo ya

estaría recuperándose del estrés oxidativo. Esto significaría que en respuesta a la degradación de los carotenoides, provocada por la presencia de radicales libres, se induciría la síntesis de los mismos obedeciendo a algún mecanismo de control.

Como se describió en la introducción, este género de levadura siempre fue aislado de ambientes fríos. Está descrito que en medios ambientes extremos, se acentúa la aparición de radicales libres. Pensando en ello se cultivó a *P. rhodozyma* durante 4 días a 22°C, en céspedes en placa de Petri. Luego se incubaron las placas a 4°C y se analizaron los espectros de las extracciones, antes de la incubación en frío (T0), a los 4 días (T1) y a los 8 días de incubación a 4°C (T2), fig 21. A T1 se observó la acumulación de productos de degradación, pero no una disminución de

carotenoides con respecto a T0. Esto indicaría una activa síntesis de carotenoides a medida que se degradan. A T2 desciende el nivel de productos de degradación, lo cual indicaría que los mismos no se acumulan. Este

fenómeno podría ser correlacionado con lo observado en presencia de radicales libres y la ausencia aparente de degradación a T2

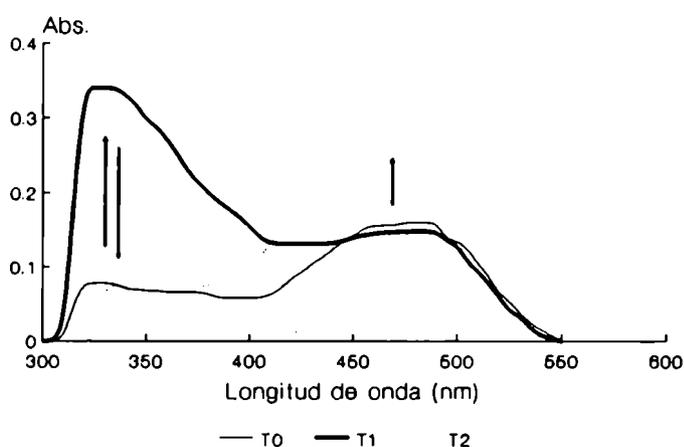


Fig. 21

podría deberse a una

depleción de las fuentes generadoras de radicales libres.

Como se planteó anteriormente, esto podría representar un sistema de control de la síntesis de astaxantina. Para ahondar en ello, se realizó el mismo procedimiento con los mutantes col3-4 y col5-7, cuya obtención se explicó en la sección V de Resultados. A T0, ambos mutantes presentaron su normal característica (col3-4 no produjo carotenoides y col5-7 produjo  $\beta$ -caroteno). A T1, col5-7 también presentó acumulación de productos de degradación que desaparecieron a T2 (Fig 22). Este mutante difiere de *P. rhodozyma* debido a que la concentración de  $\beta$ -caroteno aumentó aproximadamente 2,7 veces, manteniéndose constante en T2. Esto denotaría cierto grado de desregulación en la síntesis de carotenoides.

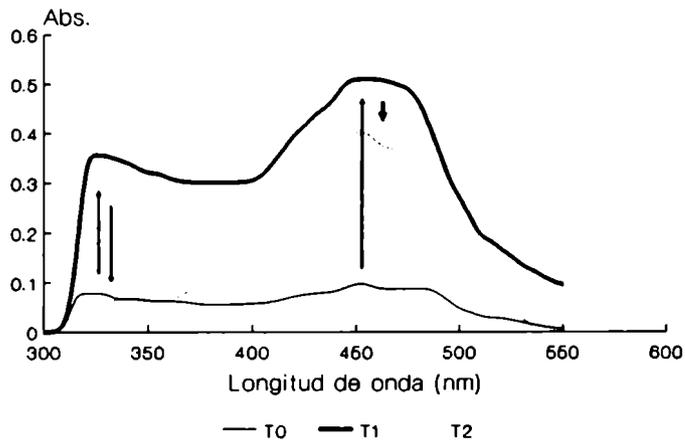


Fig. 22

Respecto al comportamiento de col3-4, a T1 se observó la acumulación de carotenoides y degradación de los mismos. En este caso la velocidad de síntesis es mucho menor

que en los otros dos casos debido a que la concentración es baja y a T2 todavía se observa el pico correspondiente a degradación (Fig 23).

Según

Johnson, E.A.

(1991) podría haber

dos vías para la

biosíntesis de

astaxantina. Esto

explicaría el

comportamiento del

mutante col3-4, el cual en condiciones normales presentó un fenotipo

blanco (ausencia de carotenoides) y bajo estrés comenzó a producir

astaxantina sin acumular  $\beta$ -caroteno.

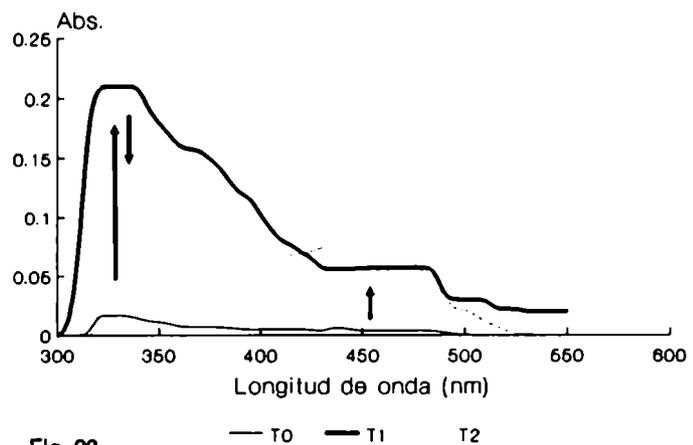


Fig. 23

En muchos casos y especialmente en hongos, existe en la biosíntesis de  $\beta$ -caroteno, una regulación por retroalimentación negativa (feedback negativo) del producto final sobre

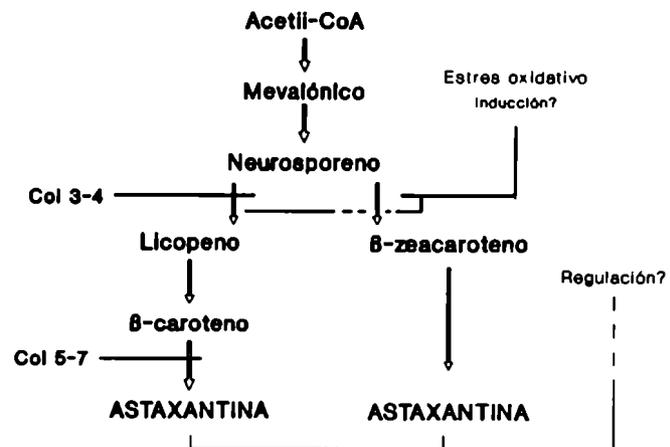
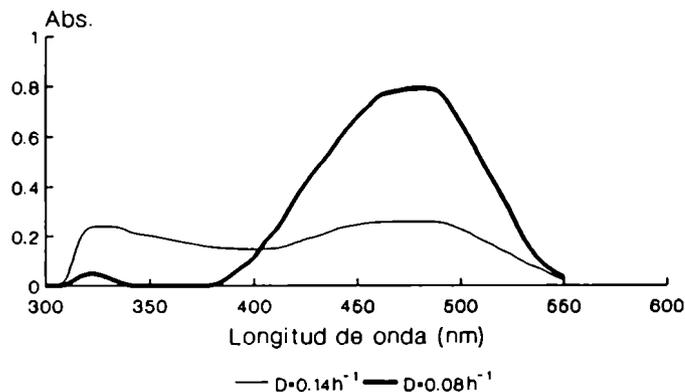


Fig. 24

la enzima mevalonato fosfoquinasa (Johnson, E.A.; 1991). En el caso de *P. rhodozyma* podría ocurrir lo mismo, pero aquí sería astaxantina el producto final que ejercería el control. En el caso de no producirse ésta, como en la mutante col5-7, se induce el aumento de la carotenogénesis bajo estrés, y se incrementa la concentración de  $\beta$ -caroteno, (dicho aumento no ocurre en *P. rhodozyma*).

En base al comportamiento de col3-4 se puede postular la existencia de alguna molécula que, ante el estrés oxidativo, actuaría como inductor de la vía alternativa o de ambos caminos metabólicos, fig 24.

Si comparamos los espectros correspondientes a extractos de muestras de cultivos continuos de *P. rhodozyma*, obtenidos a diferentes velocidades de dilución ( $D=0,08$  y  $D=0,14 \text{ h}^{-1}$ , correspondientes al 40 y



Temp:22°C O.D.:50% pH:4.5

Fig. 25

70% de la  $D_{CRÍTICA}$ , fig 25), encontramos que a la menor  $D$  no se encuentra acumulación de productos de degradación, pero sí a la mayor velocidad, cayendo al mismo tiempo la concentración de carotenoides totales. Por lo

tanto, se puede pensar que a una mayor velocidad de crecimiento de la población, la velocidad de degradación aumenta aunque sin superar a la de síntesis.

Hasta ahora dijimos que la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma* podría ayudar a este género a defenderse de la generación exógena y/o endógena de radicales libres, principalmente recordando el nicho ecológico en que habita. Pero ¿és esto real?. Todos los experimentos hasta aquí realizados y los presentados en la literatura por otros autores, corresponden a estudios de la cepa aislada, sin la misma tener que competir contra otros microorganismos. Para tratar de estudiar ese aspecto se realizó un cultivo continuo mixto, con la cepa salvaje de colección de *P. rhodozyma* y los mutantes col3-4 y col5-7. Estos últimos

sólo serían deficientes en la síntesis de carotenoides pero no en su crecimiento normal, teniendo velocidades de crecimiento máximas iguales a la cepa salvaje.

Se sembró el fermentador al 20% con una mezcla, partes iguales en número de células, de cultivos en fase logarítmica de cada cepa.

En base a los resultados expuestos en la sección IX, se utilizó una velocidad de dilución de  $0,1 \text{ h}^{-1}$ , ya que a dicha velocidad no sólo el crecimiento es bastante rápido, favoreciendo la velocidad de respuesta de los microorganismos, sino que también se asegura que la acumulación de carotenoides en las células sea alto.

Cuando el cultivo llegó a un estado estacionario, se determinó la proporción de cada cepa por recuento en placa. Gracias al fenotipo visible en las colonias se pudo a simple vista reconocer a cada una de ellas (cepa salvaje: color rosa; mutante col5-7: color naranja y col3-4: blancas).

Luego de sucesivos plaqueos, en los cuales se determinó que la proporción se mantenía constante, se realizó un pulso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50mM +  $\text{Fe}^{2+}$  100 $\mu\text{M}$  (las concentraciones corresponden al fermentador) y se siguió la evolución del cultivo por medio del crecimiento y por plaqueo de muestras a los tiempos T0; T1; T2; T3 y T4, correspondientes al prepulso, 1, 3, 6 y 24 horas respectivamente.

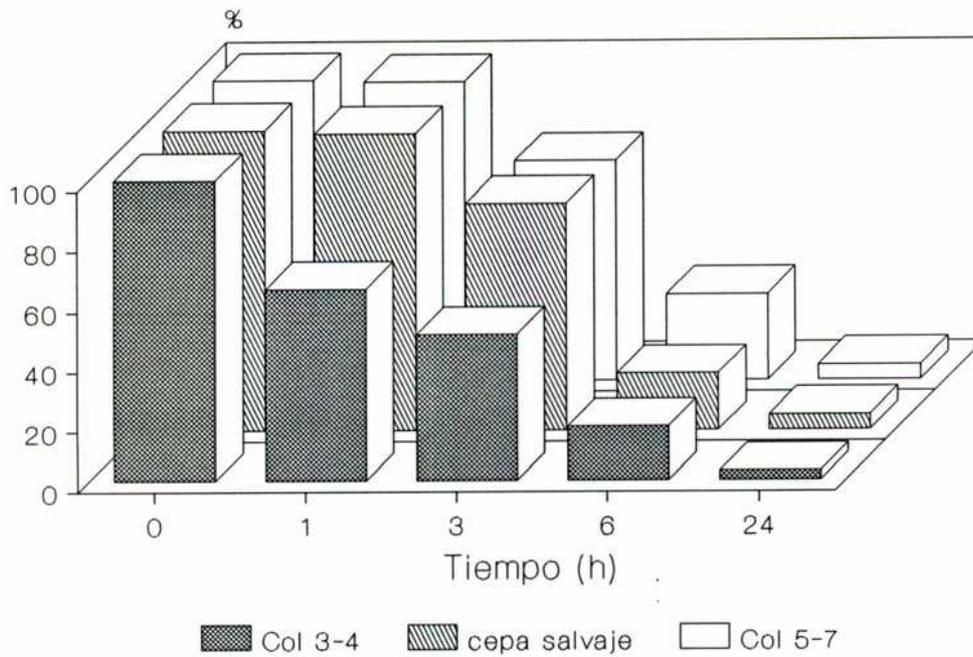


Fig. 26

En la fig. 26 se muestra como descendió la concentración porcentual (en base a las concentraciones iniciales) de cada cepa a los distintos tiempos. De la misma surge que la concentración de las tres cepas cae a lo largo del tiempo, pero mientras col5-7 y la cepa salvaje se mantienen prácticamente invariables a T1, col3-4 sufre una significativa caída en su concentración.

Para analizar los resultados, se parte de la hipótesis que luego del pulso todas las células quedan inhibidas en su capacidad de dividirse, manteniéndose morfológicamente intactas. Esto permite calcular cómo descendería la concentración celular por el único efecto de la velocidad de

dilución. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$X_t = X_0 e^{(t D)}$$

Siendo  $X_t$ : concentración celular al tiempo t [cel/ml]

$X_0$ : concentración celular a  $T_0$  [cel/ml]

t: tiempo [h]

D: velocidad de dilución [ $h^{-1}$ ]

Por recuento en placa se calculó la concentración total a  $T_0$  y luego

la caída de

concentración

teórica.

Comparando la

concentración total

calculada por

plaqueo a los

distintos tiempos

( $T_i$ ) con la

concentración teórica, se puede ver que las caídas de ambas curvas son

similares (Fig 27).

Cuando se realizaron los mismos cálculos, pero para cada cepa individualmente; se observa que a  $T_1$  no cae la concentración tanto para col5-7 como para la cepa salvaje (figs 28 y 29), pero desde  $T_2$  la caídas son similares a las respectivas teóricas.

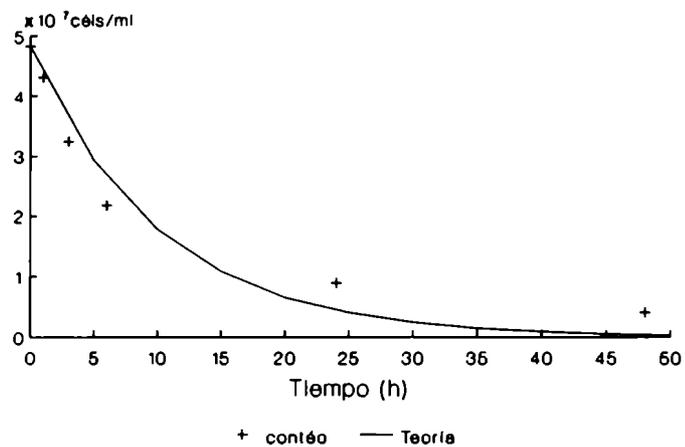


Fig. 27

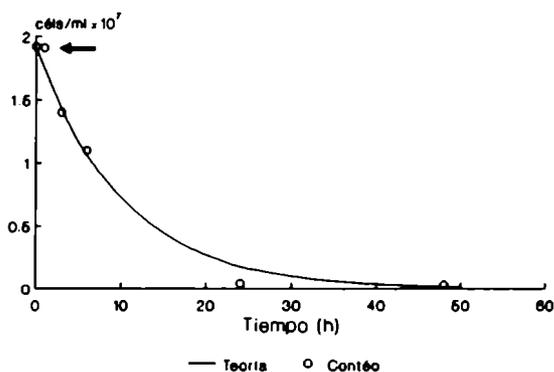


Fig. 28

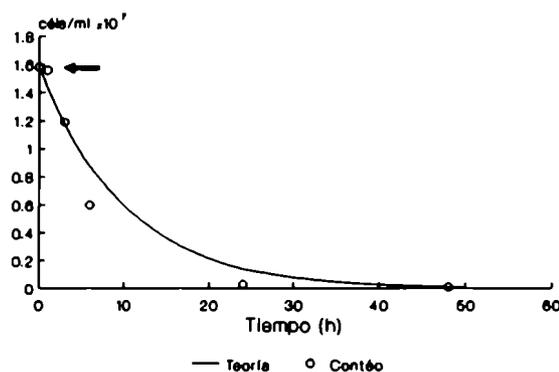


Fig. 29

Al analizar a col3-4, podemos ver que a diferencia de las otras cepas, a T1 la concentración cae considerablemente (36 %, Fig 30). Esto sólo sería explicable por pérdida total de la capacidad de dividirse, ya que la caída es significativamente mayor a la esperada, sólo por lavado (cae un 30 % más). Luego se calculó como sería el descenso considerando la concentración a T1 como inicial, pudiéndose ver que responde a la función de lavado.

Concluyendo,  
se destaca que la presencia de la solución generadora de radicales libres inhibe el crecimiento de *P. rhodozyma* y a un mutante

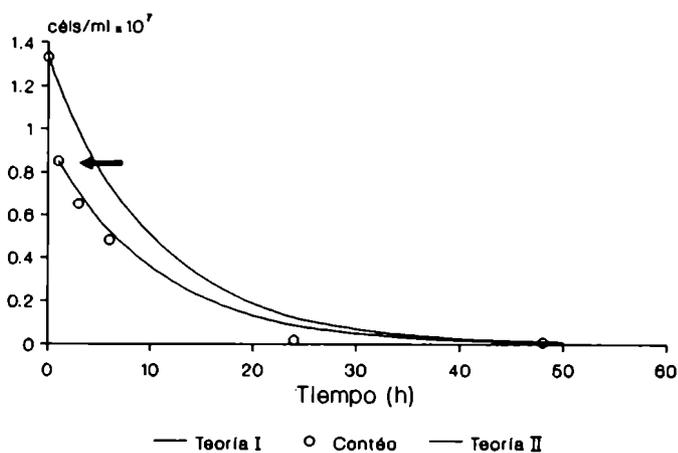


Fig. 30

relacionado (col5-7) que acumula  $\beta$ -caroteno. A diferencia, un mutante que no acumula carotenoides (col3-4), no sólo se ve inhibido en su

crecimiento sino que más de 1/3 de su población se ve afectada letalmente.

Esta aparente protección brindada por la acumulación de carotenoides, podría explicar cómo se fijó y se mantiene en la naturaleza un genotipo que acumula carotenoides. Así mismo un mutante blanco, tendría una baja probabilidad de fijarse en ecosistemas donde la concentración de radicales libres sea alta.

## CONTROL COMPUTARIZADO DE LA PRODUCCION DE ASTAXANTINA

### VII. Medición del crecimiento en el fermentador

El crecimiento celular es una de las variables más importantes a tener en cuenta en los procesos fermentativos. Los métodos disponibles para determinarlo implican la toma de muestra y posterior análisis (densidad óptica, peso seco, etc.), o la estimación a través de otras variables como por ejemplo el consumo de oxígeno (Riedel, K.; 1988b), variación del pH (Allison, S.M.; 1993), etc.

El PROIMI-2 (Castro, G.; 1992) fue diseñado para medir la concentración celular dentro del fermentador en cultivos bacterianos. Cuando se quiso medir el crecimiento de levaduras se saturaba el sistema, debido al mayor tamaño celular y para adaptarlo se desarrolló un nuevo sensor (sensor-II), manteniéndose el resto del equipo en su diseño original (Foto 7).



FOTO 7: PROIMI 2 - Sensor II

En la figura 31 se detalla la arquitectura del sensor-II, El mismo posee dos características principales:

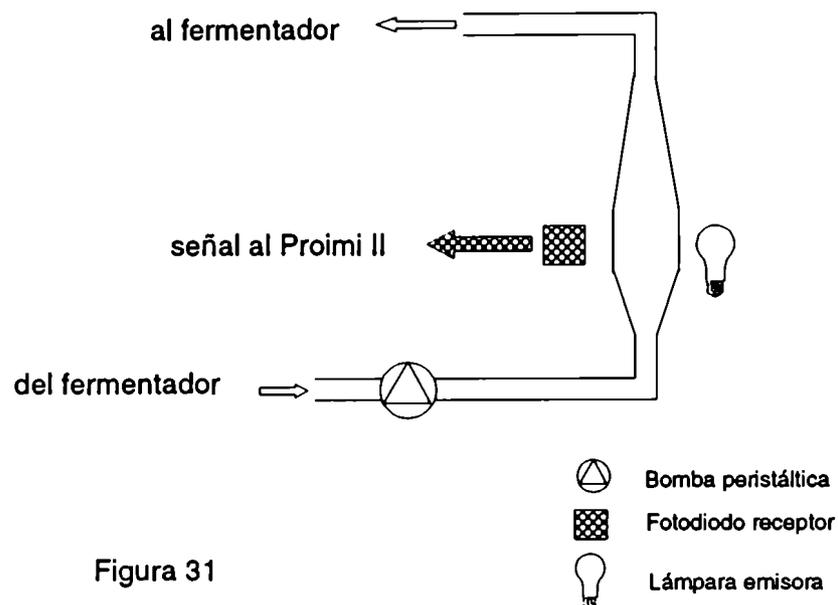


Figura 31

-Poder variar el paso de luz. Esto se logra variando la altura donde se alinean la lámpara y el fotodiodo receptor

-Un diseño que impide el crecimiento en las paredes del mismo. Esto último se logra con un constante correr del medio a través del sensor, posiblemente debido al efecto Venturi que se produce en la celda de medición.

La comparación de curvas de crecimiento de *S. cerevisiae*, seguidas por densidad óptica a 660nm medida en espectrofotómetro, y a través del PROIMI II - sensor II, probó la eficacia del sensor-II.

De la comparación con densidad óptica, como así también con biomasa como peso seco(g/l), se calibró el sistema en base a una

regresión logarítmica.

$$\text{Log}(y) = a + b x$$

siendo,

y: valor de densidad óptica a 660 nm o biomasa como peso seco

x: valor de crecimiento según PROIMI II - sensor II,

a: ordenada al origen

b: pendiente

La calibración del sensor se realiza para cada especie microbiana a utilizar, considerando también el medio en el cual va a crecer.

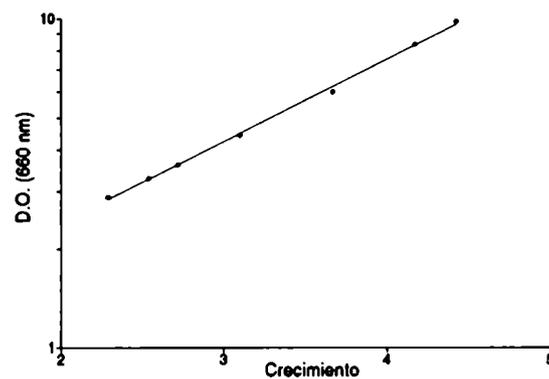


Fig. 32

De este modo se calibró el sistema para *Phaffia rhodozyma* en el medio de cultivo que se detalla en materiales y métodos. Con los valores de densidad óptica a 660 nm y de peso seco de muestras tomadas a lo largo de curvas de crecimiento, se realizó la regresión con respecto a los valores del PROIMI II correspondientes (fig. 32).

El tener en forma cuasi-continua mediciones representativas del crecimiento del cultivo, permite calcular al mismo tiempo la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) variable importantísima para cualquier sistema de control de procesos fermentativos.

### VIII. Programa de computación para el control de fermentadores

Prácticamente todos los fermentadores modernos poseen salidas digitales, y de no ser así, fermentadores de anterior generación poseen salidas analógicas para registradores. En ambos casos, ya sea directamente en el primero o a través de una tarjeta conversora analógica-digital en el segundo, se pueden conectar los fermentadores a computadoras y así almacenar los valores de las distintas variables (pH, oxígeno disuelto, temperatura, agitación, etc.) en la memoria de la misma.

Una vez logrado esto debe decidirse si conviene utilizar un paquete de programas comercial, o bien escribirlo en algún idioma como por ejemplo BASIC, PASCAL, etc. Los programas comerciales disponibles, a pesar de tener la obvia ventaja de estar listos para usar y ser buenos en su mayoría, pecan de rígidos, es decir, hacen y permiten hacer sólo tareas ya definidas, como por ej: leer el valor de pH y mantenerlo mediante la activación de bombas dentro de un valor prefijado. Pero si se pretende agregar otros sensores o controlar otros equipos como bombas peristálticas extras, ya no se pueden usar programas estándares. En la actualidad han surgido programas comerciales con los cuales sí se pueden agregar varios sensores y controlar diversos equipos, pero aquí el mayor problema es el costo de los mismos, pues los precios ascienden a varios miles de dólares.

En base a lo expuesto se decidió desarrollar un programa que cumpla con los requerimientos básicos para adquisición de datos y control

de fermentadores, y que al mismo tiempo sea fácilmente modificable para lograr versiones que cubran futuros requerimientos.

Así se escribió BIOFER 1.0, el cual permite la adquisición de datos, presentándolos en la pantalla y almacenándolos en los archivos.

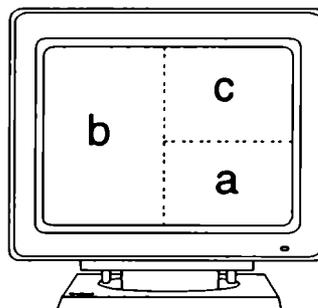
En cuanto a la presentación en la pantalla, un operador generalmente se interesa por tres puntos principales:

- a- el valor actual de cada variable en medición,
- b- la tendencia actual o cambios de los valores de cada variable,
- c- la historia total de la evolución del proceso.

Para ello la pantalla de presentación de BIOFER 1.0 se divide en tres (fig 33), cada una satisface los puntos antes mencionados:

- a- Aparecen en tabla los valores de cada variable actualizados cada 30 seg., pudiéndose cambiar el tiempo de muestreo.
- b- Se grafican los valores de cada variable obtenidos durante la última hora del proceso.

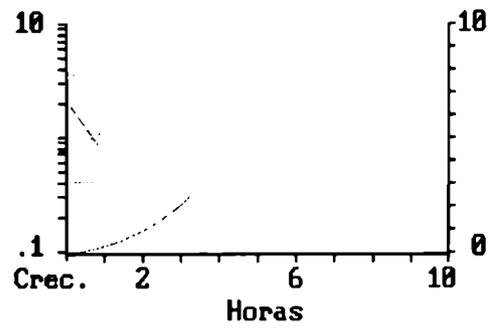
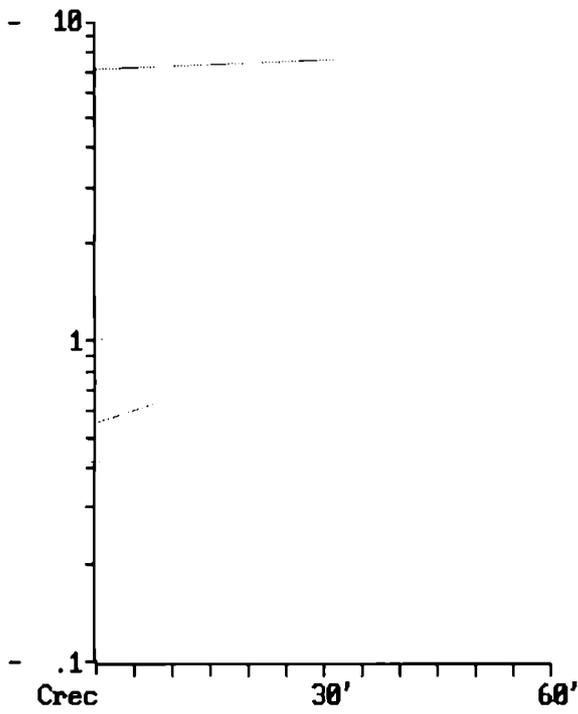
Fig. 33



Cada media hora, la mitad izquierda del gráfico desaparece y la mitad derecha se corre a dicho lugar, dando lugar así a la graficación de la próxima media hora del proceso (un valor cada tiempo de muestreo). De esta manera se ve cómo va evolucionando el sistema, teniendo en pantalla como mínimo la gráfica de la última media hora del proceso.

F1: Menú F3: salir

06-02-1994



Tiempo		8:10:0	
Crec.	8.20	$\mu$	0
pH	5.00	Temp.	30.0
D.O.	40	Bomba	154

Fig. 34

c- Finalmente, se grafica todo el proceso desde el comienzo, pudiendo de esta manera tener en pantalla la historia total de la fermentación. En la figura 34 se muestra un ejemplo de la pantalla durante un cultivo por lote de *Phaffia rhodozyma*.

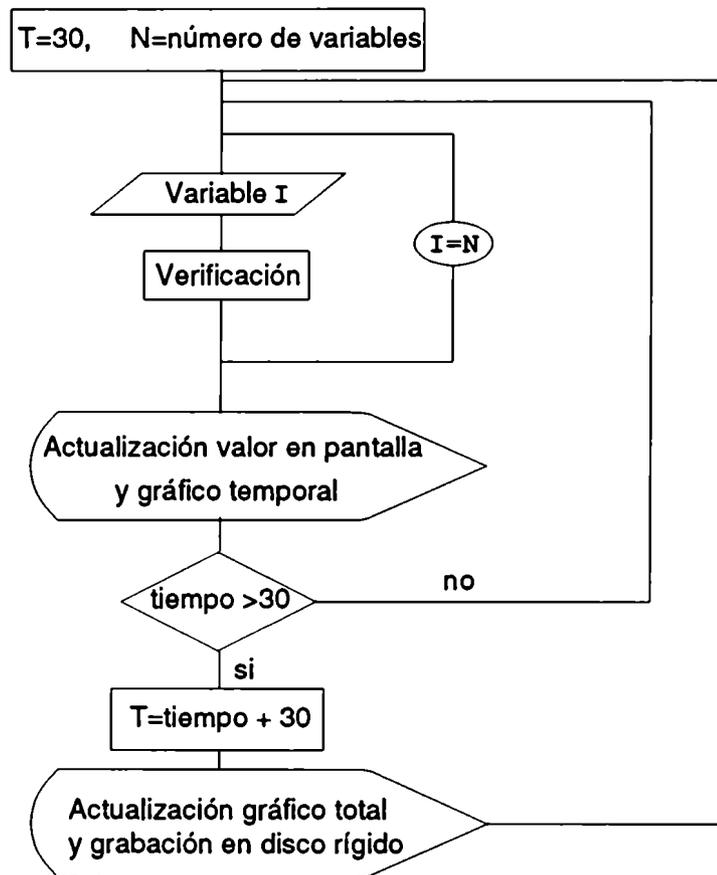


Fig. 35

En las figuras 35 y 36 se muestra el diagrama general de flujo del programa. En el mismo se puede observar que mediante un bucle de lectura se muestrean las distintas variables.

Cada una es leída de 10 a 50 veces, dependiendo del nivel de ruido de las mismas, y los promedios de las lecturas son verificados respecto al valor anterior (fig. 36).

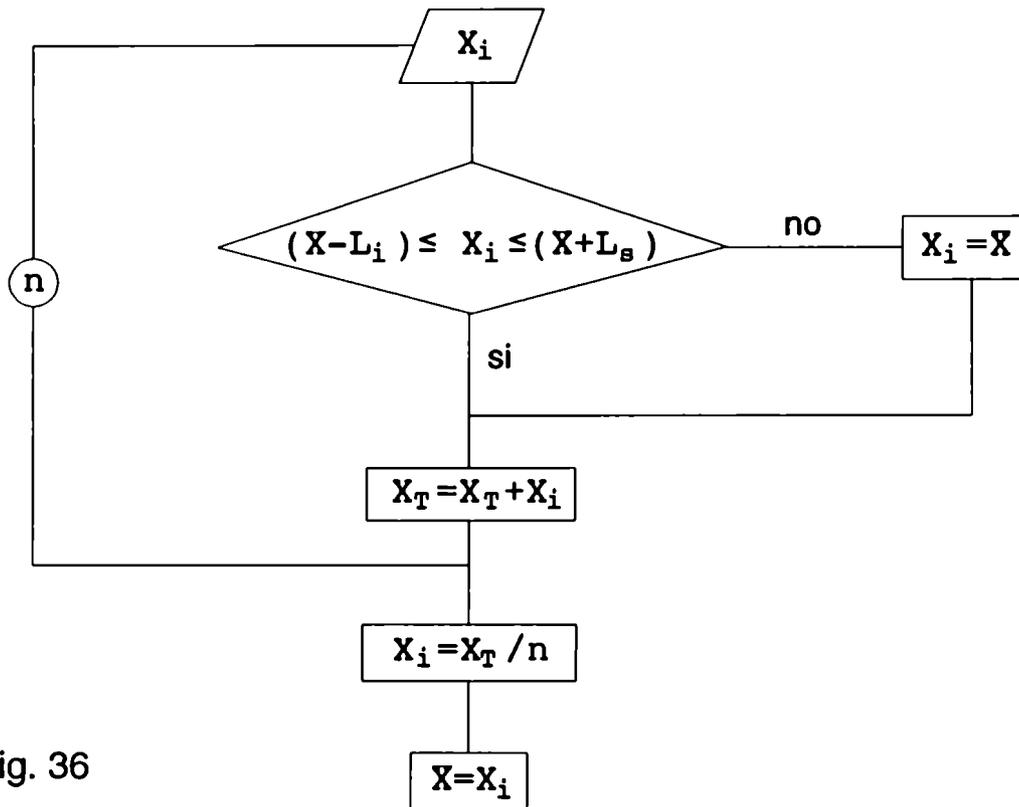


Fig. 36

Ejemplos de cultivos por lotes obtenidos utilizándose el PROIMI II y el BIOFER 1.0 se presentan en las figuras 37 y 38. Dichas curvas son resultados de estudios realizados con *Saccharomyces cerevisiae* (fig. 37) y con *Zymomonas mobilis* (fig. 38).

Posteriormente fue necesario mejorar el programa adecuándolo para cultivos continuos. Con este fin, se desarrollaron las subrutinas, que agregadas al BIOFER 1.0, controlan el comienzo del cultivo continuo y mediante una señal sonora indican el tiempo en que se alcanza el estado estacionario.

De esta manera, quedó definido el programa como BIOFER 2.0.

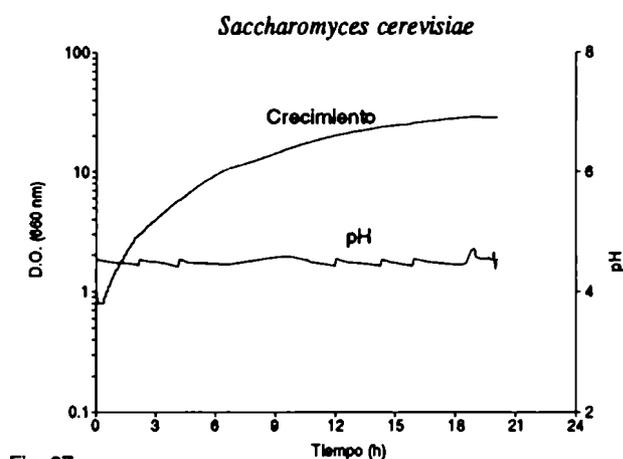


Fig. 37

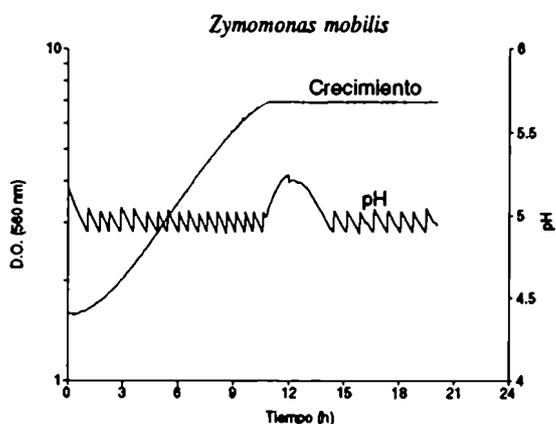


Fig. 38

Con los datos del PROIMI

II el programa registra el crecimiento exponencial del cultivo y hace entrar en funcionamiento la bomba de alimentación a una velocidad determinada, a fin de obtener la velocidad de dilución (D) deseada por el operador, esto se calibra según la bomba peristáltica y mangueras

utilizadas. Luego de transcurridos 3 a 4 tiempos de retención, una

una subrutina específica establece si la densidad celular se mantiene constante, verificando que la misma no varíe a lo largo del tiempo por fuera de un rango preestablecido. Cuando se cumple dicho requisito una alarma da aviso y entonces el operador decide si realmente el cultivo ha llegado a estado estacionario. La velocidad de dilución se puede variar en cualquier momento, y esto queda a criterio del operador.

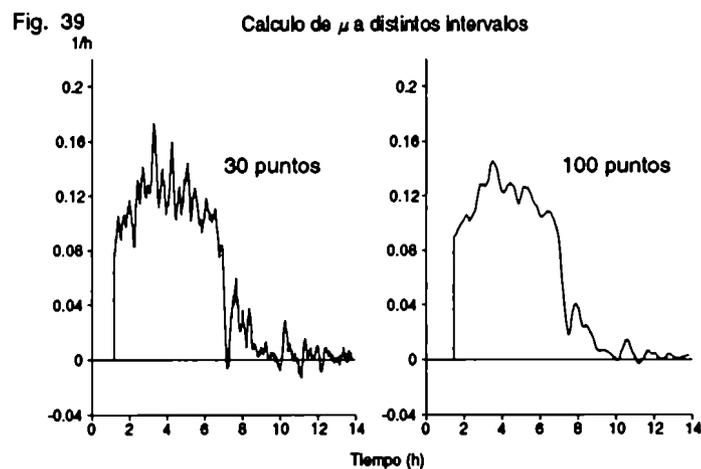
Las variables como por ej., rango de variación de la densidad celular para determinar estado estacionario, tiempos de retención; tiempo de espera para dar la señal sonora y desde ya velocidades de retención, son valores que están a disposición del operador para definirlos según el sistema a estudiar.

En función de las necesidades de estudio con *P. rhodozyma* y para demostrar la versatilidad de BIOFER, se desarrollaron nuevas subrutinas que, agregadas a la versión anterior, permitieron realizar cultivos por lote alimentado totalmente automatizados dando origen a BIOFER 3.0, última versión escrita.

La novel subrutina de BIOFER 3.0 calcula la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). Primero se deben calibrar los valores del PROIMI II en base a, por ejemplo, densidad óptica, como se explicó en la sección VII de Resultados.

Con los valores de densidad óptica calculados el programa va realizando la regresión lineal de un grupo de puntos, y obtiene la velocidad específica como el valor de la pendiente de la misma. Para cada nuevo valor de crecimiento la subrutina calcula el valor de densidad óptica y lo agrega como último valor del grupo, descarta el primer valor y calcula la nueva pendiente. Para determinar la cantidad de puntos óptimos para formar el grupo de valores, se utilizaron archivos generados con BIOFER 1.0 correspondientes a curvas de crecimiento de *P. rhodozyma*. Se hicieron los cálculos de  $\mu$  con diferentes cantidades de valores (desde 30 hasta 300, de a 10 puntos) (fig. 39). Se

concluyó que 200 puntos dan valores de  $\mu$  que no oscilan a causa de pequeñas diferencias, como ocurre con grupos menores, ni pierde sensibilidad, como ocurre con grupos de mayor números de valores.



200 puntos representan 200 muestras realizadas cada 30'', se abarca así un lapso de 1,66 horas, tiempo que se considera

representativo para reflejar cambios en la velocidad específica de crecimiento de *P. rhodozyma* ( $t_d = 3.46 \text{ h}^{-1}$ ). Cabe aclarar que el lapso a cubrir puede variarse sin dificultad de programación.

De esta manera se puede calcular el valor de  $\mu$  y también es posible, luego de que la fase de crecimiento en lote finaliza, controlar la velocidad de crecimiento, regulando las revoluciones de la bomba peristáltica que aporta el medio de cultivo en la fase de lote alimentado. Esto se llevó a cabo conectando una bomba peristáltica (Watson-Marlow MHRE-7) a una salida analógica de la tarjeta convertora AD/DA, en forma tal que la velocidad sea controlada mediante el nivel de voltaje de la señal programada.

La velocidad de alimentación teórica se determina a lo largo del tiempo según la siguiente fórmula: (Shioya, S.; 1992)

$$F = \frac{\mu_d X_0 V_0}{Y_{x/s} S} e^{\mu_d t}$$

$\mu_d$ : velocidad específica de crecimiento requerida [ $\text{h}^{-1}$ ]

$X_0$ : biomasa al comenzar la alimentación [g/l]

$V_0$ : volumen de trabajo al comenzar la alimentación [l]

$Y_{x/s}$ : rendimiento global de sustrato en células [g/g]

S: concentración de sustrato limitante en la alimentación [g/l]

t: tiempo desde el comienzo de la alimentación [h]

Con una estrategia de esta naturaleza se corre el riesgo de que si por

cualquier razón el cultivo deja de responder como se supone, el sistema completo quede fuera de control, lo cual podría llegar a significar la pérdida del proceso. Para evitar dichos desvíos se agregó a la fórmula un término de regulación que incluye la desviación de la  $\mu$  real con la  $\mu$  preestablecida. La velocidad de la bomba peristáltica queda definida por:

$$Bomba = a + F b + ( (\mu_d - \mu_t) \cdot 1000 )$$

a, b: coeficientes de calibración de la velocidad de alimentación con velocidad de la bomba.

$\mu_t$ : velocidad específica de crecimiento calculada al tiempo t[h<sup>-1</sup>].

### III. Cultivo de *Phaffia rhodozyma*

En cultivos por lote de *P. rhodozyma*, la formación de astaxantina está asociada al crecimiento del cultivo; una vez que la glucosa, como fuente de carbono, se termina, finaliza el crecimiento en biomasa, manteniéndose esta constante; sin embargo la síntesis y acumulación de astaxantina continúa.

La disponibilidad de fuente de carbono es esencial para la síntesis de carotenoides, ya que células resuspendidas en solución amortiguadora carente de alguna fuente de carbono, no incrementan su contenido de pigmento, pero sí lo hacen al adicionarse una fuente de carbono o en medio de fermentación ya agotado. Probablemente un cultivo en crecimiento de *P. rhodozyma* excrete intermediarios carbonados del catabolismo de la glucosa, como ser etanol, ácido acético o algún intermediario del ciclo de Krebs; el cual sería luego reasimilado y así continuar la carotenogénesis (Johnson, E; 1991).

A medida que se aumenta la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo, disminuye la velocidad específica de crecimiento como así también el rendimiento en biomasa,

Tabla III.

GLUCOSA (g/l)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/e}$ (g/g)
3.0	0.11	0,91
10.0	0.07	0,62

Esto también fue observado en otras cepas de *P. rhodozyma* como ser J4-3, mutante superproductor derivado de CBS 5905T (Meyer, P.S.; 1993; Meyer, P.S.; 1994) y en UCD 67-210 (Johnson, E.A.; 1979). En todos estos casos al igual que en este trabajo la caída de rendimiento también involucra la síntesis de carotenoides, disminuyendo la acumulación de los mismos.

En cultivos continuos se observó que a bajas velocidades de dilución ( $D$ ) el rendimiento en biomasa ( $Y_{x/s}$ ), es alto como en el caso de

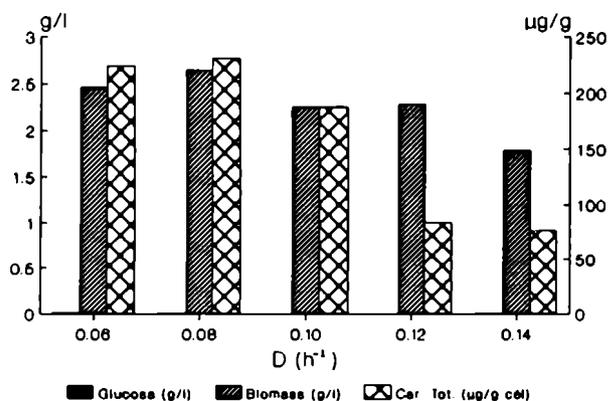


Fig. 40

En altas concentraciones de azúcares fermentables, *S. cerevisiae* utiliza mayormente la glucólisis fermentativa para

la obtención de ATP, aún en presencia de  $O_2$ . El etanol producido en este proceso fermentativo difunde rápidamente a través de la membrana citoplasmática y no es oxidado mientras exista azúcar remanente.

Cuando la glucosa se limita a menos de 50-130 mg l<sup>-1</sup>

lotes con baja concentración inicial de glucosa; pero a altas  $D$  el rendimiento cae (fig. 40); este mismo comportamiento se observa en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (fig. 41).

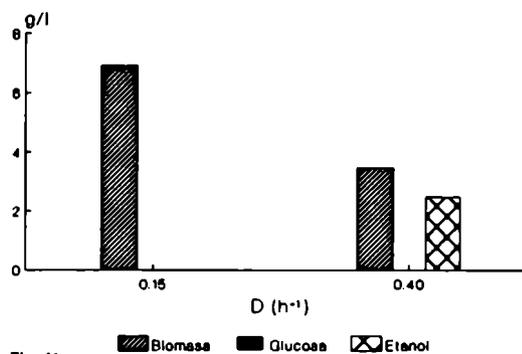


Fig. 41

(dependiendo de la cepa), el metabolismo de *S. cerevisiae* es completamente respiratorio, lográndose una eficiente conversión de la fuente de carbono en biomasa celular (alrededor de 0,5 g de biomasa por gramo de glucosa consumida). El coeficiente respiratorio (producción de  $\text{CO}_2$  / consumo de  $\text{O}_2$ ) es cercano a 1,0 y el rendimiento en ATP es de 16-18 por mol de glucosa oxidada. (Piper, P.W. 1991).

A concentraciones de glucosa mayores que 50-130  $\text{mg l}^{-1}$  el metabolismo cambia de respiratorio a fermento-respiratorio; dicho cambio podría deberse a un efecto de represión por glucosa según Polakis (Käppeli, O.; 1986) o por una capacidad limitada del camino respiratorio, saturándose el mismo y causando que el pirúvico restante se convierta en

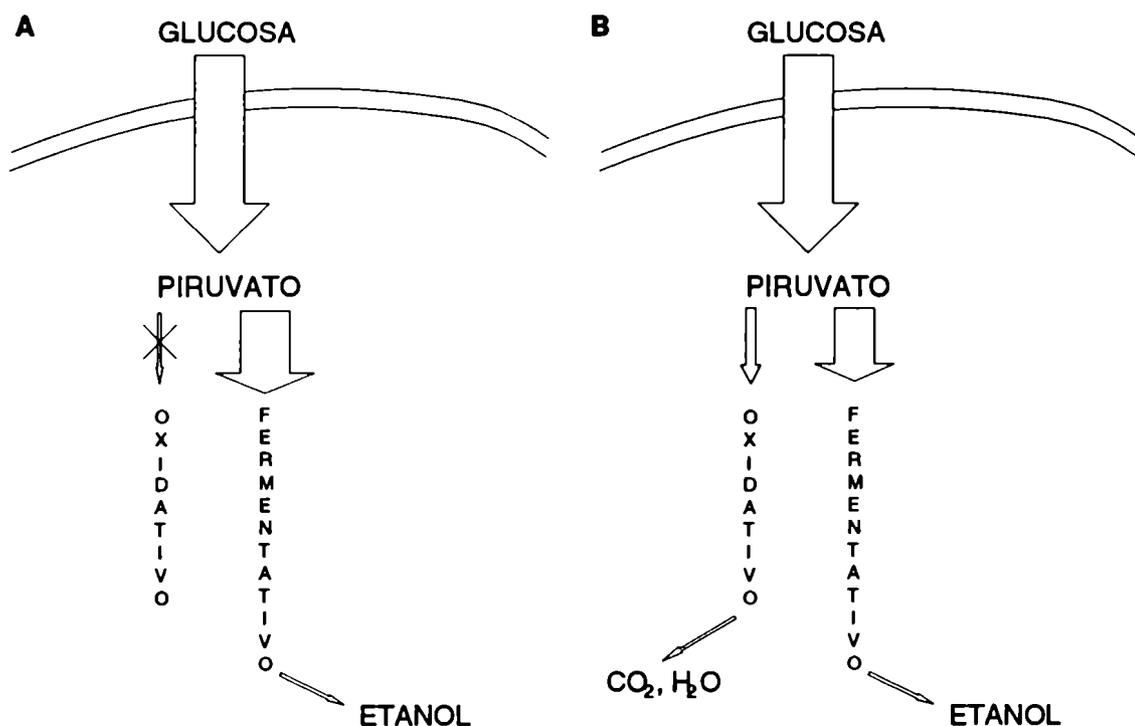


Fig. 42 A. Modelo de represión

B. Modelo de capacidad limitada

etanol (Fig 42). En la actualidad ambos mecanismos se los considera responsables del cambio de metabolismo. Como consecuencia el rendimiento en biomasa cae a aproximadamente 0,15 g de biomasa seca por g. de glucosa consumida, el coeficiente respiratorio es mayor que 1,0 y el rendimiento en ATP es de sólo 2 por mol de glucosa oxidada. En dichos cultivo aeróbicos con alta concentración de glucosa, sólo el 3-5% de la misma es metabolizado respiratoriamente, el resto es fermentado. (Lagunas, R.; 1982)

Este fenómeno es también denominado efecto Crabtree, por analogía a las observaciones realizadas por H.G. Crabtree (1929), donde células tumorales en condiciones aeróbicas presentaban una velocidad de la vía glicolítica superior a la velocidad de la vía respiratoria. (Käppeli, O., 1986).

Ya puntualizamos que en cultivos por lote de *P. rhodozyma* durante el crecimiento se excretarían intermediarios del catabolismo de la glucosa; uno de ellos es el etanol, el cual luego de terminarse la fuente de carbono disponible, comienza a bajar su concentración y se incrementa la actividad de la enzima etanol deshidrogenasa, sugiriendo que el etanol es convertido a acetoaldehído y posiblemente a acetil-CoA. (Johnson, E.A., 1992)

Esto indicaría que el fenómeno de metabolismo respiro-fermentativo estaría presente en *P. rhodozyma*. Para demostrarlo se estudió el comportamiento de un cultivo continuo de *P. rhodozyma* ante un pulso de glucosa.

Cuando a un cultivo

continuo de *S. cerevisiae* en estado estacionario, creciendo a una velocidad de dilución en la cual el metabolismo de la glucosa es respiratorio ( $D=0,15\text{ h}^{-1}$ , fig. 41), se la agrega una cantidad de glucosa tal que

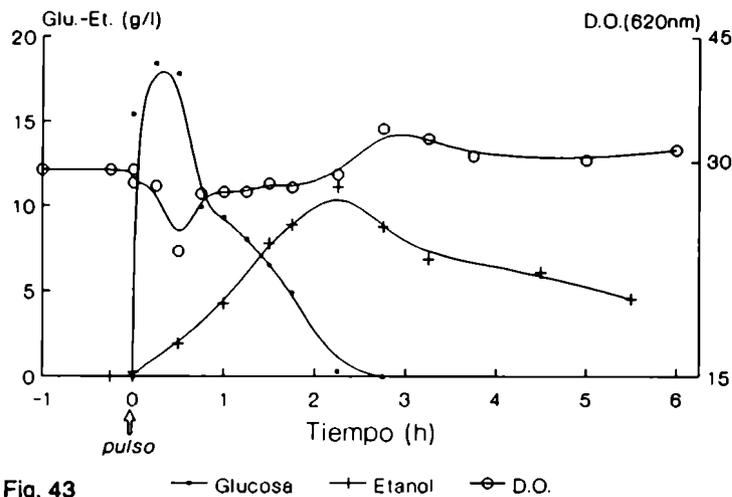


Fig. 43 — Glucosa — Etanol — D.O.

aumente considerablemente su concentración, diluyendo lo menos posible el cultivo (pulso de glucosa), el metabolismo cambia a respiro-fermentativo (fig. 43). Como consecuencia del pulso ( $20\text{ g l}^{-1}$  en el fermentador) se observa la aparición de etanol ( $10\text{ g l}^{-1}$  máximo a las 2,5 h del pulso) en el cultivo, debido al cambio de metabolismo, y aumenta la biomasa, demostrando que la glucosa como fuente de carbono era el sustrato limitante.

Luego de consumido el exceso de glucosa comienza a metabolizarse el etanol. Analógicamente, cuando se realiza un pulso de glucosa a

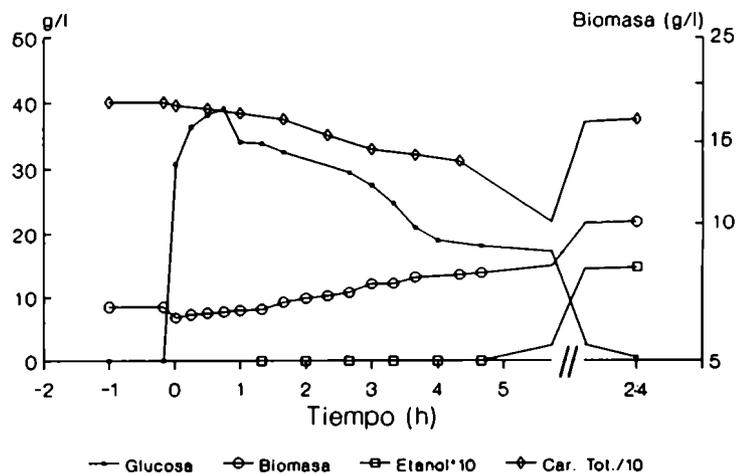


Fig. 44 — Glucosa — Biomasa — Etanol\*10 — Car. Tot./10

un cultivo continuo de *P. rhodozyma*, creciendo a una velocidad de dilución menor por sobre la cual el rendimiento en biomasa cae (fig. 44), también aparece etanol, pero en menor concentración ( $1,5 \text{ g l}^{-1}$ ) y a tiempos mayores (aproximadamente 24 h).

Según Petrik (1983), en *Saccharomyces uvarum* el proceso regulador que lidera el cambio de metabolismo respiratorio a fermento-respiratorio como consecuencia de un pulso de glucosa, no sería una represión de las enzimas respiratorias, ya que los niveles de citocromos a, b y c se mantienen constantes por varias horas y la tasa de consumo de  $\text{O}_2$  no varía aún cuando se está acumulando etanol. En este caso el tiempo de respuesta es similar a *S. cerevisiae* (fig. 43), pero en *P. rhodozyma* el tiempo es considerablemente mayor, lo que podría estar reflejando un mecanismo de regulación a nivel enzimático y no solamente una capacidad respiratoria limitada, además considerando que *P. rhodozyma* posee una vía respiratoria alternativa, insensible a la antimicina (bloquea al citocromo b) e inducida por la presencia de luz (An, G.H., 1990).

Este cambio de metabolismo no sólo involucra a la oxidación de la glucosa, pues es de imaginar que si la vía central del metabolismo celular sufre cambios, el resto de las vías pueden sufrirlo también, y esto se ve reflejado en la síntesis de carotenoides. En la figura 40, se puede observar que no sólo cae el rendimiento en biomasa sino también en carotenoides totales al aumentar la velocidad de dilución por sobre  $0,10 \text{ h}^{-1}$ , de  $231 \mu\text{g/g}$  a  $D=0,08 \text{ h}^{-1}$  hasta  $76 \mu\text{g/g}$  a  $D=0,14 \text{ h}^{-1}$ . También se ve que como consecuencia del pulso de glucosa (fig. 44), la concentración de carotenoides totales cae hasta un 50%, recuperándose cuando la glucosa

en exceso se termina.

La producción de astaxantina mediante cultivo continuo no sería económicamente viable, debido a la baja  $\mu_{\max}$ ,  $0.20 \text{ h}^{-1}$ , medido en fermentador por método de lavado (Pirt, S.J.; 1960), la caída en concentración de carotenoides a velocidades de dilución de  $0,12 \text{ h}^{-1}$  o mayores, el efecto negativo de la glucosa y la velocidad de crecimiento sobre la producción de astaxantina y los prolongados tiempos de crecimiento y acumulación de carotenoides (5 días). Por lo dicho el cultivo por lote alimentado es el más indicado para este proceso, pues permite regular la disponibilidad de glucosa en el medio de cultivo, controlando al mismo tiempo la velocidad de crecimiento. Cabe también la posibilidad de realizar repetidos lotes alimentados aumentándose así la productividad.

Con ayuda del programa Biofer 3.0 se realizaron cultivos por lote alimentado totalmente automatizados (Foto 8). En las figuras se pueden observar curvas de crecimiento, sin alimentación (Fig 45), y por lote alimentado regulando la velocidad específica de crecimiento en  $0.05 \text{ h}^{-1}$  (Fig 46) y en  $0.10 \text{ h}^{-1}$  (Fig 47).



FOTO 8: Fermentador LH 502D conectado a una computadora AT-386 y corriendo Biofer 3.0.

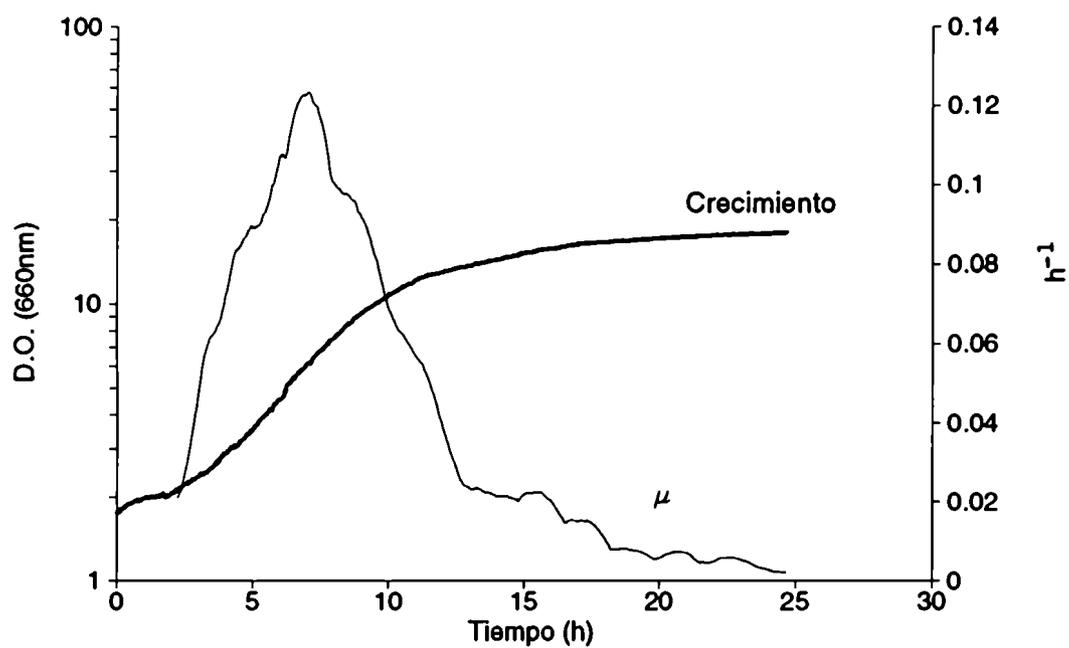


Fig. 45

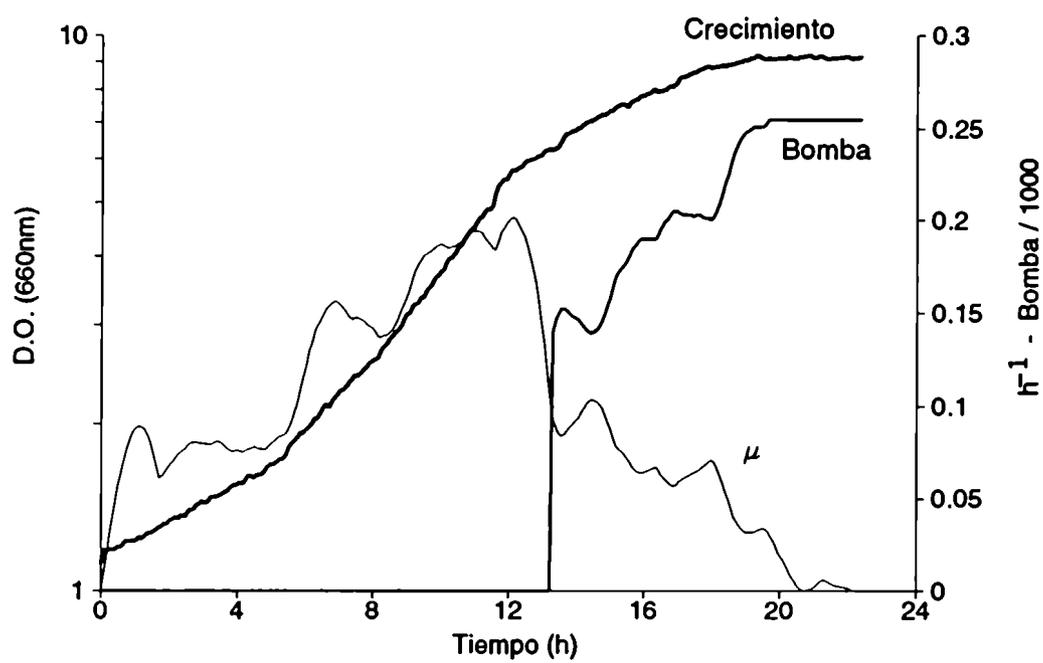


Fig. 46

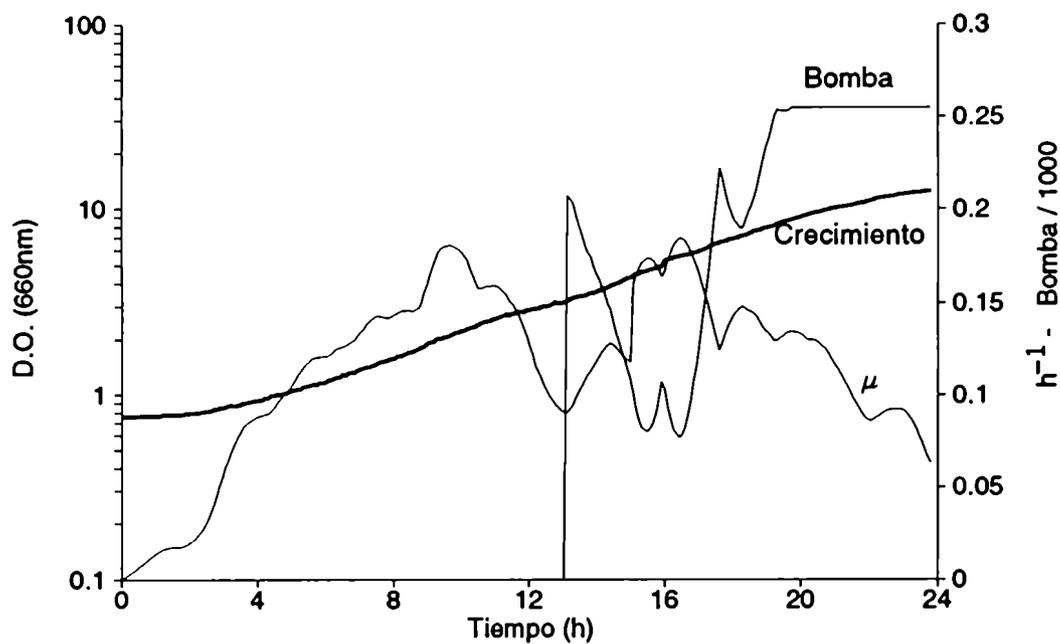


Fig. 47

Quando se calcula la concentración de carotenoides totales en los tres casos,

Tabla IV

Descripción	Car. Tot. ( $\mu\text{g/l}$ )
LOTE	375,10
LOTE ALIMENTADO - $\mu:0,05 \text{ h}^{-1}$	628,65
LOTE ALIMENTADO - $\mu:0,10 \text{ h}^{-1}$	565,60

se puede observar que mediante un sistema computarizado de control, se

pudo mantener el crecimiento cercano a velocidades específicas determinadas, lográndose de este modo evitar el efecto de la glucosa y la velocidad de crecimiento en *Phaffia rhodozyma* y aumentar así la producción de carotenoides totales.

## CONCLUSIONES

Se logró obtener esferoplastos y protoplastos a partir de cultivos de *Phaffia rhodozyma*, los cuales demostraron ser óptimos para realizar experimentos de fusión de protoplastos.

Se logró el pasaje de información genética intergenérica entre *Phaffia rhodozyma* y *Cryptococcus laurenti*, como así también entre grupos distintos como lo son *Phaffia rhodozyma* (tipo basidiomicete) y *Saccharomyces cerevisiae* (ascomicete).

Se aislaron plásmidos indígenas de *Phaffia rhodozyma*, los cuales posibilitarán en un futuro crear vectores híbridos de clonado en *P. rhodozyma*, y así tener herramientas fundamentales para estudios moleculares de la biosíntesis de carotenoides en dicha especie de levadura.

Por primera vez se logró obtener un cariotipo de *Phaffia rhodozyma* a través de la separación de cromosomas por medio de electroforesis de campo invertido.

Se determinó, en principio, que la presencia de carotenoides en *Phaffia rhodozyma*, le otorga una mayor resistencia al estrés oxidativo.

Se desarrollaron un sensor de biomasa para alta densidad celular y un programa de computación en BASIC que adquiere datos desde el fermentador y controla su funcionamiento, determinando las condiciones de cultivo por lote alimentado automatizado. Este sistema permitió aumentar al doble la producción de carotenoides por *Phaffia rhodozyma*, ya que controla el suministro de glucosa al sistema, evitando así el efecto negativo que ésta genera sobre el crecimiento de *Phaffia rhodozyma* y su producción de carotenoides.

## APENDICE I

### Abreviaturas y símbolos

Símbolo	Descripción	Unidades
D	Velocidad de dilución	$h^{-1}$
$D_{crit}$	Velocidad de dilución crítica	$h^{-1}$
F	Flujo de alimentación	$l.h^{-1}$
V	Volumen de trabajo	l
S	Concentración de sustrato en el fermentador	$g.l^{-1}$
$S_0$	Concentración de sustrato en la alimentación	$g.l^{-1}$
X	Concentración de biomasa	$g.l^{-1}$
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento	$h^{-1}$
$\mu_{max}$	Velocidad específica máxima de crecimiento	$h^{-1}$
$\beta$	Velocidad específica de muerte	$h^{-1}$
$Q_x$	Productividad en biomasa	$g.l^{-1}.h^{-1}$
$Y_{x/s}$	Rendimiento de biomasa referido al sustrato	$g\text{ bm. }g\text{ sus}^{-1}$
t	Tiempo	h

<b>Abreviaturas</b>	<b>Descripción</b>
<b>Cél</b>	<b>Célula</b>
<b>c.o.f.</b>	<b>Célula osmóticamente fragil</b>
<b>fig.</b>	<b>Figura</b>
<b>r.p.m.</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>MNNG</b>	<b>N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina</b>

## APENDICE II

### Programa BIOFER 3.0

```

*****
*                               BIOFER 3.0                               *
*****

DIM d%(5), sul(6, 500), sc%(10000), MEN1%(11000), setpt(10), set(10), pe!(3, 50)
DIM VALUE(10), VALUE$(10), OPRPT$(10), OPRPT(10), LOOP$(10), cal%(40, 2)
DECLARE SUB calibra (mcal%(), mma, mmb)
DECLARE SUB dattemp (md1!, msetpt())
DECLARE SUB moldetemp (md1!)
DECLARE SUB moldeacum (md1!)
DECLARE SUB quit (mbu, mvu, usul(), mn$)
DECLARE SUB converter (o2d!, md%(), ms1!, mdi!, o1d!, t2el, p2hl, d2ol, t3el, p3hl, d3ol)
DECLARE SUB presentacion (mcal%(), mdi!, ms1!, mn$, msetpt(), mrc, mga, met, mhp, mxo,
mun, ma, mb, mCC, mCP, mCD, mCA, mCT, mCN)
DECLARE SUB menu (mens1%(), mVALUE(), do4!, msetpt(), mset(), mme)
DECLARE SUB newbrun (mMS$, mRA$, mrc$, mRD$, mrb$, msetpt(), mLOOP$(), mVALUE$(),
mOPRPT$(), mVALUE())
DECLARE SUB varigraf (mrcm, mgam, metm, mhpm, mxom, munm)
DECLARE SUB colograf (mmCC, mmCP, mmCD, mmCA, mmCT, mmCN)
SCREEN 0, 0, 0: KEY OFF: CLS

'PROGRAMACION DE TECLAS FUNCION
KEY(1) ON
KEY(3) ON
KEY(6) ON
KEY(7) ON
KEY(9) ON
KEY(10) ON
ON KEY(1) GOSUB menu
ON KEY(3) GOSUB quit
ON KEY(6) GOSUB salana
ON KEY(7) GOSUB finana
ON KEY(9) GOSUB noalarma
ON KEY(10) GOSUB sialarma

'ARMA PANTALLA DE PRESENTACION Y DATOS INICIALES
CALL presentacion(cal%(), di!, s1!, N$, setpt(), rc, ga, et, hp, xo, un, a, b, CC, CP, CD, CA, CT,
CN)
tte! = setpt(2)
pph! = setpt(4)
ddo! = setpt(3)
mu! = setpt(6)
'MARCA INICIO COORDENADA Y DE GRAFICO TEMPORAL
'aY1 = setpt(1) * .28           'μ
eY1 = setpt(2) * 2.8           'temperatura
xY1 = setpt(3) * 2.8           'oxígeno disuelto
hY1 = setpt(4) * 28            'pH
'uY1 = setpt(5) * 2.8         'Pend.pH
d1! = s1! 'di! - s1!           'crecimiento
'd1! = a + (b * d1!)
IF d1! = 0 THEN cY1 = 0: GOTO 50

```

```

IF d1! < .1 THEN ESC = 1: GOTO 10: ELSE ESC = 2: GOTO 20
10 cY1 = LOG(d1! * 100) * .4343 * 93
GOTO 50
20 IF d1! < 1 THEN 30 ELSE 40
30 cY1 = LOG(d1! * 10) * .4343 * 140
GOTO 50
40 cY1 = (LOG(d1!) * .4343 * 140) + 140
50 X1 = 0 'MARCA INICIO COORDENADA X DE GRAFICO TEMPORAL

'MARCA INICIO COORDENADA Y DE GRAFICO TOTAL
aYY1 = (setpt(1) * .1) + 180          'μ
eYY1 = setpt(2) + 180                'temperatura
xYY1 = setpt(3) + 180                'oxígeno disuelto
hYY1 = (setpt(4) * 10) + 180        'pH
uYY1 = setpt(5) + 180                'Pend.pH
IF d1! = 0 THEN cYY1 = 180: GOTO 100 'crecimiento
IF d1! < .1 THEN 60 ELSE 70
60 cYY1 = (LOG(d1! * 100) * .4343 * 33) + 180
GOTO 100
70 IF d1! < 1 THEN 80 ELSE 90
80 cYY1 = (LOG(d1! * 10) * .4343 * 50) + 180
GOTO 100
90 cYY1 = (LOG(d1!) * .4343 * 50) + 230
100 XX1 = 350 'MARCA INICIO COORDENADA X DE GRAFICO TOTAL

CLS : SCREEN 3
WINDOW (-70, -35)-(570, 315)
'-----MOLDE GRAFICO TEMPORAL-----
CALL moldetemp(d1!)
'-----MOLDE GRAFICO TOTAL-----
CALL moldeacum(d1!)
'-----MOLDE DATOS TEMPORALES-----
CALL dattemp(d1!, setpt())
px = 0: py = 0: pz = 0: p1mx = 0: p1my = 0: p1mz = 0 'Variables pendientes
pub = 0: pup = 0: pdb = 0 'Variables pendientes
bomba = 132 'valor salida a bomba peristáltica
bs = 0 'indica que la bomba está apagada

ala = 1 'Activa alarma
LOCATE 1, 55: PRINT "sal-NO"
LOCATE 2, 55: PRINT "ala-SI"

L = 0

vu = 0: b1u = 30: b2u = 120 'CUENTA VUELTAS

FOR i = 1 TO 30
pe!(1, i) = (-450 + (i * 15)) / 3600
pe!(2, i) = LOG(d1!) / LOG(10)
pe!(3, i) = pph!
NEXT i

FOR i = 1 TO 30
px = px + pe!(1, i)
py = py + pe!(2, i)
pz = pz + pe!(3, i)

```

```
NEXT i
```

```
p1mx = px / 30
p1my = py / 30
p1mz = pz / 30
```

```
FOR i = 1 TO 30
pub = pub + ((pe!(1, i) - p1mx) * (pe!(2, i) - p1my))
pup = pup + ((pe!(1, i) - p1mx) * (pe!(3, i) - p1mz))
pdb = pdb + ((pe!(1, i) - p1mx) ^ 2)
NEXT i
```

```
aY1 = ((pub / pdb) * 28) + 140
uY1 = ((pup / pdb) * 28) + 140
aYY1 = ((pub / pdb) * 100) + 230
uYY1 = ((pup / pdb) * 100) + 230
```

```
ERASE sul
```

```
TIME$ = "00:00:00": h = 0
```

```
TIMER ON
```

```
ON TIMER(30) GOSUB rato          'ACTUALIZA MINUTOS PARA GRAFICAR
```

```
o2! = s1!
```

```
200 IF vu >= b1u THEN GOSUB medio
```

```
    IF vu >= b2u THEN GOSUB actualiza
```

```
    IF pepH > 0 AND ala = 1 THEN LOCATE 1, 55: bs = 1: PRINT "sal-SI": SOUND 2000, 5:
```

```
SOUND 500, 5: OUT &H360 + 16, bomba
```

```
GOTO 200
```

```
rato:
```

```
    LOCATE 1, 35: PRINT "Conversión"
```

```
    LOCATE 16, 64: PRINT USING "##:##:##"; VAL(MID$(TIME$, 1, 2)) + h;
```

```
VAL(MID$(TIME$, 4, 2)); VAL(MID$(TIME$, 7, 2));
```

```
    tiempo = TIMER
```

```
    CALL converter(o2!, d%(), s1!, dil, od!, ttel, pph!, ddo!, tel, ph!, do1!)
```

```
    ttel = tel
```

```
    pph! = ph!
```

```
    ddo! = do1!
```

```
    s1! = od!
```

```
    su!(0, vu) = tiempo / 3600
```

```
    su!(1, vu) = od! 'a + (b * od!)
```

```
    'su!(2, vu) = VALUE(1)
```

```
    su!(3, vu) = ph!
```

```
    su!(4, vu) = do1!
```

```
    su!(5, vu) = tel
```

```
    'su!(6, vu) = VALUE(5)
```

```
pe!(1, 31) = su!(0, vu)
```

```
pe!(2, 31) = LOG(od!) / LOG(10)
```

```
pe!(3, 31) = ph!
```

```
FOR i = 0 TO 30
```

```
pe!(1, i) = pe!(1, i + 1)
```

```
pe!(2, i) = pe!(2, i + 1)
```

```
pe!(3, i) = pe!(3, i + 1)
```

```
NEXT i
```

```

px = px - pe!(1, 0) + pe!(1, 30)
py = py - pe!(2, 0) + pe!(2, 30)
pz = pz - pe!(3, 0) + pe!(3, 30)

```

```

p2mx = px / 30
p2my = py / 30
p2mz = pz / 30

```

```

pub = pub - ((pe!(1, 0) - p1mx) * (pe!(2, 0) - p1my)) + ((pe!(1, 30) - p2mx) * (pe!(2, 30) - p2my))

```

```

pup = pup - ((pe!(1, 0) - p1mx) * (pe!(3, 0) - p1mz)) + ((pe!(1, 30) - p2mx) * (pe!(3, 30) - p2mz))

```

```

pdb = pdb - ((pe!(1, 0) - p1mx) ^ 2) + ((pe!(1, 30) - p2mx) ^ 2)

```

```

su!(2, vu) = pub / pdb

```

```

su!(6, vu) = pup / pdb

```

```

peph = su!(6, vu)

```

```

p1mx = p2mx

```

```

p1my = p2my

```

```

p1mz = p2mz

```

```

IF bs = 1 THEN bomba = bomba - ((su!(2, vu) - mu!) * su!(1, vu))

```

```

    X2 = X1 + 2

```

```

IF ga = 0 THEN 250 ELSE

```

```

    aY2 = (su!(2, vu) * 280) + 140

```

```

    LINE (X1, aY1)-(X2, aY2), CA

```

```

    aY1 = aY2

```

```

250 IF et = 0 THEN 260 ELSE

```

```

    eY2 = su!(5, vu) * 2.8

```

```

    LINE (X1, eY1)-(X2, eY2), CT

```

```

    eY1 = eY2

```

```

260 IF hp = 0 THEN 270 ELSE

```

```

    hY2 = su!(3, vu) * 28

```

```

    LINE (X1, hY1)-(X2, hY2), CP

```

```

    hY1 = hY2

```

```

270 IF xo = 0 THEN 280 ELSE

```

```

    xY2 = su!(4, vu) * 2.8

```

```

    LINE (X1, xY1)-(X2, xY2), CD

```

```

    xY1 = xY2

```

```

280 IF un = 0 THEN 290 ELSE

```

```

    uY2 = (su!(6, vu) * 280) + 140

```

```

    LINE (X1, uY1)-(X2, uY2), CN

```

```

    uY1 = uY2

```

```

290 IF rc = 0 THEN 390 ELSE

```

```

'su!(1, vu) = a + (b * su!(1, vu))

```

```

IF su!(1, vu) <= 0 THEN cY2 = 0: GOTO 380

```

```

IF ESC = 1 THEN 300

```

```

IF ESC = 2 THEN 350

```

```

300 IF su!(1, vu) < .1 THEN 310 ELSE 320

```

```

310 cY2 = LOG(su!(1, vu) * 100) * .4343 * 93
GOTO 380
320 IF su!(1, vu) < 1 THEN 330 ELSE 340
330 cY2 = (LOG(su!(1, vu) * 10) * .4343 * 93) + 93
GOTO 380
340 cY2 = (LOG(su!(1, vu)) * .4343 * 93) + 186
GOTO 380

350 IF su!(1, vu) < 1 THEN 360 ELSE 370
360 cY2 = LOG(su!(1, vu) * 10) * .4343 * 140
GOTO 380
370 cY2 = (LOG(su!(1, vu)) * .4343 * 140) + 140

380 LINE (X1, cY1)-(X2, cY2), CC
      cY1 = cY2: X1 = X2
390  IF me = 1 THEN 3000
      LOCATE 19, 57: PRINT USING "###.###"; su!(1, vu);      'crecimiento
      LOCATE 21, 57: PRINT USING "###.###"; su!(3, vu);      'pH
      LOCATE 23, 57: PRINT USING "###.###"; su!(4, vu);      'Oxígeno dis
      LOCATE 19, 72: PRINT USING "###.###"; su!(2, vu);      'μ
      LOCATE 21, 73: PRINT USING "###.###"; su!(5, vu);      'temp
      LOCATE 23, 72: PRINT USING "###.###"; su!(6, vu);      'pend. pH

3000 vu = vu + 1
LOCATE 1, 35: PRINT "Listo"
RETURN

medio:
      LOCATE 1, 35: PRINT "Acumula      "
      XX2 = XX1 + 1      '++PARA VARIAR PASO EN GRAFICO ACUMULADO++

'IF ga = 0 THEN 395 ELSE
'  aYY2 = (su!(2, (vu - 1)) * 100) + 230
'  LINE (XX1, aYY1)-(XX2, aYY2), CA
'  aYY1 = aYY2

395 IF et = 0 THEN 396 ELSE
      eYY2 = su!(5, (vu - 1)) + 180
      LINE (XX1, eYY1)-(XX2, eYY2), CT
      eYY1 = eYY2

396 IF hp = 0 THEN 397 ELSE
      hYY2 = (su!(3, (vu - 1)) * 10) + 180
      LINE (XX1, hYY1)-(XX2, hYY2), CP
      hYY1 = hYY2

397 IF xo = 0 THEN 398 ELSE
      xYY2 = su!(4, (vu - 1)) + 180
      LINE (XX1, xYY1)-(XX2, xYY2), CD
      xYY1 = xYY2

398 'IF un = 0 THEN 399 ELSE
'  uYY2 = (su!(6, (vu - 1)) * 100) + 230
'  LINE (XX1, uYY1)-(XX2, uYY2), CN
'  uYY1 = uYY2

```

```

399 IF rc = 0 THEN 490 ELSE
    IF su!(1, (vu - 1)) <= 0 THEN cYY2 = 180: GOTO 480
    IF ESC = 1 THEN 400
    IF ESC = 2 THEN 450
400 IF su!(1, (vu - 1)) < .1 THEN 410 ELSE 420
410 cYY2 = (LOG(su!(1, (vu - 1))) * 100) * .4343 * 33) + 180
GOTO 480
420 IF su!(1, (vu - 1)) < 1 THEN 430 ELSE 440
430 cYY2 = (LOG(su!(1, (vu - 1))) * 10) * .4343 * 33) + 213
GOTO 480
440 cYY2 = (LOG(su!(1, (vu - 1)))) * .4343 * 33) + 246
GOTO 480

450 IF su!(1, (vu - 1)) < 1 THEN 460 ELSE 470
460 cYY2 = (LOG(su!(1, (vu - 1))) * 10) * .4343 * 50) + 180
GOTO 480
470 cYY2 = (LOG(su!(1, (vu - 1)))) * .4343 * 50) + 230
480 LINE (XX1, cYY1)-(XX2, cYY2), CC
    cYY1 = cYY2: XX1 = XX2
490 b1u = b1u + 6
LOCATE 1, 35: PRINT "Listo"
RETURN

```

actualiza:

```

LOCATE 1, 35: PRINT "Actualiza"
LOCATE 1, 70: PRINT DATE$;
OPEN N$ FOR APPEND AS #2
FOR i = 0 TO vu - 1
PRINT #2, USING "###.#####"; su!(0, i);
PRINT #2, USING "  ##.##"; su!(1, i);
PRINT #2, USING "  ##.#####"; su!(2, i);
PRINT #2, USING "  ##.##"; su!(3, i);
PRINT #2, USING "  ###"; su!(4, i);
PRINT #2, USING "  ##.##"; su!(5, i);
PRINT #2, USING "  ##.#####"; su!(6, i)
NEXT i
CLOSE #2

FOR L = 0 TO 6
    FOR N = 0 TO 250
        su!(L, N) = 0
    NEXT N
NEXT L

GET (121, 282)-(240, 0), sc%
PUT (121, 0), sc%, XOR
PUT (1, 0), sc%, PSET
X1 = 120: vu = 0: b1u = 6: b2u = 60
IF TIMER >= 86399.9 THEN h = h + 24
LOCATE 1, 35: PRINT "Listo"
RETURN

```

menu:

```
CALL menu(MEN1%(), VALUE(), s1!, setpt(), set(), me)
```

```
FOR i = 1 TO 10
setpt(i) = set(i)
NEXT i
tte! = setpt(2)
pph! = setpt(4)
ddo! = setpt(3)
s1! = setpt(5)
RETURN
```

```
salana:
    LOCATE 1, 55: PRINT "sal-SI"
    OUT &H360 + 16, 132
RETURN
```

```
finana:
    LOCATE 1, 55: PRINT "sal-NO"
    OUT &H360 + 16, 0
RETURN
```

```
noalarma:
    'Para desconectar la alarma
    ala = 0
    LOCATE 2, 55: PRINT "ala-NO"
RETURN
```

```
sialarma:
    'Para reactivar la alarma
    ala = 1
    LOCATE 2, 55: PRINT "ala-SI"
RETURN
```

```
quit:
    KEY(12) ON
    KEY(13) ON
    LOCATE 25, 5
    PRINT "SEGURO QUIERE IRSE? si "; CHR$(26); : PRINT "NO"; : LS = 0
    ON KEY(12) GOSUB 6100
    ON KEY(13) GOSUB 6200
6000 IF INKEY$ = CHR$(13) THEN 6300 ELSE 6000
6100 LOCATE 25, 26: PRINT "SI"; CHR$(27); : PRINT " no"; : LS = 1: RETURN
6200 LOCATE 25, 26: PRINT "si "; : PRINT CHR$(26); "NO"; : LS = 0: RETURN
6300 KEY(12) OFF: KEY(13) OFF
IF LS = 1 THEN
    CALL quit(bu, vu, su!(), N$)
ELSE
    LOCATE 25, 1: PRINT "
    RETURN
END IF
```

```
prom:
    s12! = s12! / JD!
    IF s12! >= (s1! - .05) OR s12! <= (s1! + .05) THEN s1! = s12!
RETURN
```

```
SUB calibra (mcal%(), mma, mmb)
```

```

VIEW SCREEN (64, 55)-(583, 160), , 1
CLS
LOCATE 12, 12
INPUT "Con qué unidades va calibrar (D.O., mg/ml, etc)"; uc$
LOCATE 16, 12
INPUT "Cuántos pares de valores tiene"; tu
IF tu > 40 THEN
    CLS
    LOCATE 11, 30
    PRINT "SON DEMASIADOS VALORES,"
    LOCATE 13, 30
    PRINT "Pruebe con menos de 40"
    LOCATE 16, 12
    INPUT "Cuántos pares de valores tiene"; tu
END IF
CLS
ty = 0
fl = 0
LOCATE 19, 20: PRINT "Entre los valores correspondientes";
VIEW SCREEN (64, 85)-(583, 140), , 1

DO
ty = ty + 1
fl = fl + 1
LOCATE 10, 30: PRINT uc$, "DOmetro"
LOCATE 11 + fl, 30: INPUT mcal%(ty, 1)
LOCATE 11 + fl, 45: INPUT mcal%(ty, 2)
IF fl = 6 THEN fl = 0: CLS
LOOP UNTIL ty = tu

x = 0
y = 0
ub = 0
db = 0

FOR i = 1 TO tu
x = x + mcal%(i, 1)
y = y + mcal%(i, 2)
NEXT i
mx = x / tu
my = y / tu

FOR i = 1 TO tu
ub = ub + ((mcal%(i, 1) - mx) * (mcal%(i, 2) - my))
db = db + ((mcal%(i, 1) - mx) ^ 2)
NEXT i
mmb = ub / db
mma = my - (mmb * mx)
CLS
LOCATE 13, 35: PRINT "Ordenada = "; mma;
LOCATE 15, 35: PRINT "Pendiente = "; mmb;
FOR i = 1 TO 1000: NEXT i
VIEW SCREEN (165, 68)-(465, 155), , 1
CLS
LOCATE 11, 30: PRINT "calibración PROIMI II"
LOCATE 13, 30: PRINT "variables a graficar"

```

```

LOCATE 15, 30: PRINT "colores gráficos"
LOCATE 17, 30: PRINT "SEGUIR"
LOCATE 19, 23: PRINT CHR$(24); " o "; CHR$(25); ": seleccionar  ENTER: entrar"
msop = 17

```

```

END SUB

```

```

SUB colograf (mmCC, mmCP, mmCD, mmCA, mmCT, mmCN)

```

```

SCREEN 3

```

```

CLS

```

```

LOCATE 20, 20: PRINT CHR$(24); " o "; CHR$(25); ": seleccionar variable "

```

```

LOCATE 22, 20: PRINT CHR$(26); " o "; CHR$(27); ": cambiar color"

```

```

LOCATE 24, 20: PRINT "ENTER: salir "

```

```

col$ = CHR$(219) + CHR$(219) + CHR$(219) + CHR$(219) + CHR$(219)

```

```

LOC$ = CHR$(219) + CHR$(219) + CHR$(219) + CHR$(219) + CHR$(219) + CHR$(219) + CHR$(219)
+ CHR$(219) + CHR$(219) + CHR$(219) + CHR$(219)

```

```

FOR i = 0 TO 15

```

```

LOCATE 9 + i, 65: COLOR i: PRINT LOC$;

```

```

NEXT i

```

```

LOCATE 1, 3: PRINT "  CRECIMIENTO", col$; CHR$(27);

```

```

LOCATE 3, 3: PRINT "      pH", col$;

```

```

LOCATE 5, 3: PRINT "Oxígeno disuelto", col$;

```

```

LOCATE 7, 3: PRINT "      μ", col$;

```

```

LOCATE 9, 3: PRINT "  Temperatura", col$;

```

```

LOCATE 11, 3: PRINT "  Pendiente pH", col$;

```

```

msop = 1

```

```

DO

```

```

  DO

```

```

    choice$ = INKEY$

```

```

  LOOP WHILE choice$ = ""

```

```

  IF LEN(choice$) = 1 THEN

```

```

    SELECT CASE choice$

```

```

      CASE CHR$(13)

```

```

        GOSUB ada

```

```

      CASE ELSE

```

```

        BEEP

```

```

    END SELECT

```

```

  ELSE

```

```

    choice$ = RIGHT$(choice$, 1)

```

```

    SELECT CASE choice$

```

```

      CASE CHR$(80)

```

```

      IF msop = 1 THEN LOCATE 1, 3: PRINT "  Crecimiento", col$; " "; : LOCATE 3, 3: PRINT
      "pH      ", col$; CHR$(27);

```

```

      IF msop = 3 THEN LOCATE 3, 3: PRINT "      pH", col$; " "; : LOCATE 5, 3: PRINT
      "OXIGENO DISUELTO", col$; CHR$(27);

```

```

      IF msop = 5 THEN LOCATE 5, 3: PRINT "Oxígeno disuelto", col$; " "; : LOCATE 7, 3: PRINT "
      μ", col$; CHR$(27);

```

```

      IF msop = 7 THEN LOCATE 7, 3: PRINT "      μ", col$; " "; : LOCATE 9, 3: PRINT "
      TEMPERATURA", col$; CHR$(27);

```

```

      IF msop = 9 THEN LOCATE 9, 3: PRINT "  Temperatura", col$; " "; : LOCATE 11, 3: PRINT
      "  PENDIENTE pH", col$; CHR$(27);

```

```

      IF msop = 11 THEN LOCATE 11, 3: PRINT "  Pendiente pH", col$; " "; : LOCATE 1, 3: PRINT

```

```
"  CRECIMIENTO", col$; CHR$(27);
msop = CSRLIN
```

```
    CASE CHR$(72)
```

```
IF msop = 1 THEN LOCATE 1, 3: PRINT "  Crecimiento", col$; " "; : LOCATE 11, 3: PRINT "
  PENDIENTE pH", col$; CHR$(27);
IF msop = 3 THEN LOCATE 3, 3: PRINT "          pH", col$; " "; : LOCATE 1, 3: PRINT "
CRECIMIENTO", col$; CHR$(27);
IF msop = 5 THEN LOCATE 5, 3: PRINT "Oxígeno disuelto", col$; " "; : LOCATE 3, 3: PRINT
"pH          ", col$; CHR$(27);
IF msop = 7 THEN LOCATE 7, 3: PRINT "          μ", col$; " "; : LOCATE 5, 3: PRINT
"OXIGENO DISUELTO", col$; CHR$(27);
IF msop = 9 THEN LOCATE 9, 3: PRINT "  Temperatura", col$; " "; : LOCATE 7, 3: PRINT "
  μ", col$; CHR$(27);
IF msop = 11 THEN LOCATE 11, 3: PRINT "  Pendiente pH", col$; " "; : LOCATE 9, 3: PRINT
"  TEMPERATURA", col$; CHR$(27);
msop = CSRLIN
```

```
    CASE CHR$(77)
```

```
IF msop = 1 THEN LOCATE 1, 3: PRINT "  CRECIMIENTO", col$; CHR$(27); : mmCC =
mmCC + 1
IF msop = 3 THEN LOCATE 3, 3: PRINT "pH          ", col$; CHR$(27); : mmCP = mmCP +
1
IF msop = 5 THEN LOCATE 5, 3: PRINT "OXIGENO DISUELTO", col$; CHR$(27); : mmCD =
mmCD + 1
IF msop = 7 THEN LOCATE 7, 3: PRINT "          μ", col$; CHR$(27); : mmCA = mmCA +
1
IF msop = 9 THEN LOCATE 9, 3: PRINT "  TEMPERATURA", col$; CHR$(27); : mmCT =
mmCT + 1
IF msop = 11 THEN LOCATE 11, 3: PRINT "  PENDIENTE pH", col$; CHR$(27); : mmCN =
mmCN + 1
```

```
    CASE CHR$(75)
```

```
IF msop = 1 THEN LOCATE 1, 3: PRINT "  CRECIMIENTO", col$; CHR$(27); : mmCC =
mmCC - 1
IF msop = 3 THEN LOCATE 3, 3: PRINT "pH          ", col$; CHR$(27); : mmCP = mmCP -
1
IF msop = 5 THEN LOCATE 5, 3: PRINT "OXIGENO DISUELTO", col$; CHR$(27); : mmCD =
mmCD - 1
IF msop = 7 THEN LOCATE 7, 3: PRINT "          μ", col$; CHR$(27); : mmCA = mmCA - 1
IF msop = 9 THEN LOCATE 9, 3: PRINT "  TEMPERATURA", col$; CHR$(27); : mmCT =
mmCT - 1
IF msop = 11 THEN LOCATE 11, 3: PRINT "  PENDIENTE pH", col$; CHR$(27); : mmCN =
mmCN - 1
```

```
    CASE ELSE
```

```
      BEEP
```

```
    END SELECT
```

```
  END IF
```

```
IF mmCC = 16 THEN mmCC = 0
IF mmCP = 16 THEN mmCP = 0
IF mmCD = 16 THEN mmCD = 0
IF mmCA = 16 THEN mmCA = 0
```

```

IF mmCT = 16 THEN mmCT = 0
IF mmCN = 16 THEN mmCN = 0
IF mmCC = -1 THEN mmCC = 15
IF mmCP = -1 THEN mmCP = 15
IF mmCD = -1 THEN mmCD = 15
IF mmCA = -1 THEN mmCA = 15
IF mmCT = -1 THEN mmCT = 15
IF mmCN = -1 THEN mmCN = 15

```

LOOP

```

ada:
CLS
SCREEN 3
b = 0
DEF SEG = 47104!
BLOAD "C:\dometro\panproi2.pic", b
VIEW SCREEN (165, 68)-(465, 155), , 1
CLS
LOCATE 11, 30: PRINT "calibración PROIMI II"
LOCATE 13, 30: PRINT "variables a graficar"
LOCATE 15, 30: PRINT "colores gráficos"
LOCATE 17, 30: PRINT "SEGUIR"
LOCATE 19, 23: PRINT CHR$(24); " o "; CHR$(25); ": seleccionar  ENTER: entrar"
msop = 17

```

END SUB

```

SUB converter (o2d!, md%(), ms1!, mdi!, o1d!, t2e!, p2h!, d2o!, t3e!, p3h!, d3o!)
t! = 0
FOR i = 1 TO 10
OUT &H366, 0
status0: S = INP(&H368) AND &H80
IF S = 0 THEN GOTO status0
md%(1) = INP(&H366)
t1e! = (md%(1) * .29 - .3)
IF t1e! <= (t2e! - .5) OR t1e! >= (t2e! + .5) THEN t1e! = t2e!
t! = t! + t1e!
NEXT i
t3e! = t! / (i - 1)

```

```

p! = 0
FOR i = 1 TO 50
OUT &H365, 0
status1: S = INP(&H368) AND &H80
IF S = 0 THEN GOTO status1
md%(1) = INP(&H365)
p1h! = (md%(1) * .026403 + .043815)
LOCATE 25, 1: PRINT USING "###.###"; p1h!;
IF p1h! <= (p2h! - .1) OR p1h! >= (p2h! + .1) THEN p1h! = p2h!
LOCATE 25, 10: PRINT USING "###.###"; p1h!;
p! = p! + p1h!
NEXT i
p3h! = p! / (i - 1)
LOCATE 25, 15: PRINT USING "###.###"; p3h!;

```

```

O! = 0
FOR i = 1 TO 30
OUT &H364, 0
status2: S = INP(&H368) AND &H80
IF S = 0 THEN GOTO status2
md%(1) = INP(&H364)
  D1O! = (md%(1) * .561188 + .953156)
  IF D1O! <= (d2o! - 200) OR D1O! >= (d2o! + 200) THEN D1O! = d2o!
  O! = O! + D1O!
  NEXT i
d3o! = O! / (i - 1)

```

```

d! = 0
FOR i = 1 TO 100
OUT &H367, 0
status3: S = INP(&H368) AND &H80
IF S = 0 THEN GOTO status3
md%(1) = INP(&H367)
  o1d! = (md%(1) * .026403 - .0557)
  'LOCATE 25, 1: PRINT USING "###.##"; o1d!;
  IF o1d! <= (ms1! - .1) OR o1d! >= (ms1! + .1) THEN o1d! = ms1!
  'LOCATE 25, 5: PRINT USING "###.##"; o1d!;
  d! = d! + o1d!
  NEXT i
  o1d! = d! / (i - 1)
  'LOCATE 25, 10: PRINT USING "###.##"; o1d!;

```

END SUB

SUB dattemp (md1!, msetpt())

```

LINE (325, -30)-(560, -30)
LINE (560, -30)-(560, 125)
LINE (325, 125)-(560, 125)
LINE (325, 125)-(325, -30)
LINE (330, -25)-(555, -25)
LINE (555, -25)-(555, 120)
LINE (330, 120)-(555, 120)
LINE (330, 120)-(330, -25)
PAINT (326, -4)

```

```

LOCATE 12, 12
LOCATE 16, 56: PRINT "Tiempo"; : PRINT " 0: 0: 0";
LOCATE 19, 52: PRINT "Crec."; : PRINT USING "###.##"; md1!;
LOCATE 21, 52: PRINT " pH "; : PRINT USING "###.##"; msetpt(4);
LOCATE 23, 52: PRINT " D.O."; : PRINT USING "###.##"; msetpt(3);
LOCATE 19, 65: PRINT " μ "; : PRINT USING "###.##"; msetpt(1);
LOCATE 21, 65: PRINT " Temp."; : PRINT USING "###.##"; msetpt(2);
LOCATE 23, 65: PRINT "PenPh"; : PRINT USING "###.##"; msetpt(5);

```

```

LOCATE 1, 70: PRINT DATE$;
LOCATE 1, 1: PRINT "F1: Menú F3: salir";
' LOCATE 1, 55: PRINT "Escrito por Luis Ducrey";
END SUB

```

```
SUB menu (mens1%(), mVALUE(), do4!, msetpt(), mset(), mme)
```

```
LOCATE 1, 1
```

```
PRINT CHR$(24); " o "; CHR$(25); ": seleccionar "; CHR$(26); ": aumentar "; CHR$(27); ":  
disminuir ENTER: salir";
```

```
mme = 1
```

```
CONST ENTER = 13
```

```
msop = 14
```

```
mvag = msetpt(1)
```

```
mvte = msetpt(2)
```

```
mvnu = do4!
```

```
mvph = msetpt(4)
```

```
mvod = msetpt(3)
```

```
GET (325, 145)-(560, -30), mens1%
```

```
PUT (325, -30), mens1%, XOR
```

```
LOCATE 14, 55: PRINT "           $\mu$  = "; : PRINT USING "###"; mvag: LOCATE 16, 55: PRINT "  
Temperatura = "; : PRINT USING "##.#"; mvte
```

```
LOCATE 18, 55: PRINT "          pH = "; : PRINT USING "##.##"; mvph
```

```
LOCATE 20, 55: PRINT "Oxígeno dis. = "; : PRINT USING "###"; mvod
```

```
LOCATE 22, 55: PRINT "Crecimiento = "; : PRINT USING "#.##"; mvnu
```

```
DO
```

```
DO
```

```
choice$ = INKEY$
```

```
LOOP WHILE choice$ = ""
```

```
IF LEN(choice$) = 1 THEN
```

```
SELECT CASE ASC(choice$)
```

```
CASE ENTER
```

```
GOSUB fuera
```

```
CASE ELSE
```

```
BEEP
```

```
END SELECT
```

```
ELSE
```

```
choice$ = RIGHT$(choice$, 1)
```

```
SELECT CASE choice$
```

```
CASE CHR$(80)
```

```
IF msop = 14 THEN LOCATE 14, 69: PRINT USING "###"; mvag; : LOCATE 16, 70: PRINT  
USING "##.#"; mvte;
```

```
IF msop = 16 THEN LOCATE 16, 70: PRINT USING "##.#"; mvte; : LOCATE 18, 70: PRINT  
USING "##.##"; mvph;
```

```
IF msop = 18 THEN LOCATE 18, 70: PRINT USING "##.##"; mvph; : LOCATE 20, 69: PRINT  
USING "###"; mvod;
```

```
IF msop = 20 THEN LOCATE 20, 69: PRINT USING "###"; mvod; : LOCATE 22, 69: PRINT  
USING "#.##"; mvnu;
```

```
IF msop = 22 THEN LOCATE 22, 69: PRINT USING "#.##"; mvnu; : LOCATE 14, 69: PRINT  
USING "###"; mvag;
```

```
msop = CSRLIN
```

```
CASE CHR$(72)
```

```

IF msop = 14 THEN LOCATE 14, 69: PRINT USING "###"; mvag; : LOCATE 22, 69: PRINT
USING "#.##"; mvnu;
IF msop = 16 THEN LOCATE 16, 70: PRINT USING "##.#"; mvte; : LOCATE 14, 69: PRINT
USING "###"; mvag;
IF msop = 18 THEN LOCATE 18, 70: PRINT USING "##.##"; mvph; : LOCATE 16, 70: PRINT
USING "##.#"; mvte;
IF msop = 20 THEN LOCATE 20, 69: PRINT USING "###"; mvod; : LOCATE 18, 70: PRINT
USING "##.##"; mvph;
IF msop = 22 THEN LOCATE 22, 69: PRINT USING "#.##"; mvnu; : LOCATE 20, 69: PRINT
USING "###"; mvod;
msop = CSRLIN

```

```

CASE CHR$(77)

```

```

IF msop = 14 THEN LOCATE 14, 69: mvag = mvag + 1: PRINT USING "###"; mvag;
IF msop = 16 THEN LOCATE 16, 70: mvte = mvte + .1: PRINT USING "##.#"; mvte;
IF msop = 18 THEN LOCATE 18, 70: mvph = mvph + .01: PRINT USING "##.##"; mvph;
IF msop = 20 THEN LOCATE 20, 69: mvod = mvod + 1: PRINT USING "###"; mvod;
IF msop = 22 THEN LOCATE 22, 69: mvnu = mvnu + .01: PRINT USING "#.##"; mvnu;

```

```

CASE CHR$(75)

```

```

IF msop = 14 THEN LOCATE 14, 69: mvag = mvag - 1: PRINT USING "###"; mvag;
IF msop = 16 THEN LOCATE 16, 70: mvte = mvte - .1: PRINT USING "##.#"; mvte;
IF msop = 18 THEN LOCATE 18, 70: mvph = mvph - .01: PRINT USING "##.##"; mvph;
IF msop = 20 THEN LOCATE 20, 69: mvod = mvod - 1: PRINT USING "###"; mvod;
IF msop = 22 THEN LOCATE 22, 69: mvnu = mvnu - .01: PRINT USING "#.##"; mvnu;

```

```

CASE ELSE

```

```

BEEP

```

```

END SELECT

```

```

END IF

```

```

LOOP

```

```

fuera:

```

```

mme = 0

```

```

PUT (325, -30), mens1%, PSET

```

```

mset(1) = mvag

```

```

mset(2) = mvte

```

```

mset(5) = mvnu

```

```

mset(4) = mvph

```

```

mset(3) = mvod

```

```

LOCATE 1, 1: PRINT "F1: Menú F3: salir

```

```

' LOCATE 1, 55: PRINT "Escrito por Luis Ducrey";

```

```

END SUB

```

```

SUB moldeacum (md1!)

```

```

LINE (350, 280)-(350, 177)

```

```

LINE (550, 280)-(550, 177)

```

```
LINE (350, 179)-(550, 179)
LINE (347, 180)-(350, 180)
```

```
LOCATE 10, 80: PRINT "0"
LOCATE 3, 79: PRINT "10"
```

```
LOCATE 12, 64: PRINT "Horas"
LOCATE 11, 58: PRINT "2"
LOCATE 11, 68: PRINT "6"
LOCATE 11, 77: PRINT "10"
```

```
t = 20
TX = 350
FOR i = 1 TO 10
    TX = TX + t
    LINE (TX, 179)-(TX, 176)
NEXT i
FOR i = 180 TO 280 STEP 10
    LINE (550, i)-(553, i)
NEXT i
```

```
IF md1! < .1 THEN GOSUB tresde ELSE GOSUB dosde
GOTO 2000
```

```
dosde:
    FOR j = 1 TO 10
        i = (LOG(j) * .4343 * 50) + 180
        LINE (350, i)-(346, i)
    NEXT j
    FOR j = 1 TO 10
        i = (LOG(j) * .4343 * 50) + 230
        LINE (350, i)-(346, i)
    NEXT j

    LOCATE 11, 50: PRINT "Crec."
    LOCATE 10, 50: PRINT ".1"
    LOCATE 3, 50: PRINT "10"
```

```
RETURN
```

```
tresde:
    FOR j = 1 TO 10
        i = (LOG(j) * .4343 * 33) + 180
        LINE (350, i)-(346, i)
    NEXT j
    FOR j = 1 TO 10
        i = (LOG(j) * .4343 * 33) + 213
        LINE (350, i)-(346, i)
    NEXT j
    FOR j = 1 TO 10
        i = (LOG(j) * .4343 * 33) + 246
        LINE (350, i)-(346, i)
    NEXT j
```

```

LOCATE 11, 50: PRINT "Crec."
LOCATE 10, 49: PRINT ".01"
LOCATE 3, 50: PRINT "10"

```

```
RETURN
```

```
2000 END SUB
```

```
SUB moldetemp (md1!)
```

```

LINE (-1, 280)-(-1, 0)
LINE (0, 0)-(0, -5)
LINE (0, -1)-(240, -1)

```

```

FOR i = 0 TO 290 STEP 28
LINE (-40, i)-(-45, i)
NEXT i

```

```

LY = -1
FOR AGI = 10 TO 0 STEP -2
LY = LY + 4
'LOCATE LY, 1: PRINT USING "###"; AGI
NEXT

```

```

t = 20
TX = 0
FOR i = 1 TO 12
TX = TX + t
LINE (TX, -1)-(TX, -6)
NEXT i

```

```

'LOCATE 2, 16: PRINT "GRAFICO TEMPORAL";
LOCATE 24, 24: PRINT "30'";
LOCATE 24, 39: PRINT "60'";
LOCATE 24, 6: PRINT "Crec";

```

```

IF md1! < .1 THEN GOSUB detres ELSE GOSUB dedos
GOTO 1000

```

```
dedos:
```

```

FOR j = 1 TO 10
i = (LOG(j) * .4343 * 140) + 140
LINE (-1, i)-(-5, i)
NEXT j
FOR j = 1 TO 10
i = LOG(j) * .4343 * 140
LINE (-1, i)-(-5, i)
NEXT j

```

```

LOCATE 23, 7: PRINT ".1"
LOCATE 13, 8: PRINT "1"
LOCATE 3, 7: PRINT "10"

```

```
RETURN
```

detres:

```

FOR j = 1 TO 10
  i = (LOG(j) * .4343 * 93) + 186
  LINE (-1, i)-(-5, i)
NEXT j
FOR j = 1 TO 10
  i = (LOG(j) * .4343 * 93) + 93
  LINE (-1, i)-(-5, i)
NEXT j
FOR j = 1 TO 10
  i = LOG(j) * .4343 * 93
  LINE (-1, i)-(-5, i)
NEXT j

LOCATE 23, 6: PRINT ".01"
LOCATE 16, 6: PRINT "0.1"
LOCATE 10, 7: PRINT "1"
LOCATE 3, 6: PRINT "10"

```

```

RETURN
1000 END SUB

```

```

SUB newbrun (mMS$, mRA$, mrc$, mRD$, mrb$, msetpt(), mLOOP$(0), mVALUE$(0),
mOPRPT$(0), mVALUE())
'SET UP PORT COMUNICACIONES
CLOSE #1
OPEN "com1:9600,e,7,2,rs,cs,ds" FOR RANDOM AS #1

```

```

'comienza el loop de comunicaciones
PRINT #1, mRA$;
LINE INPUT #1, x$: mLOOP$(0) = x$
PRINT #1, mrc$,
LINE INPUT #1, x$: mVALUE$(0) = x$
PRINT #1, mRD$,
LINE INPUT #1, x$: mOPRPT$(0) = x$
SP$ = ""
FOR N = 1 TO 10
  SP$ = SP$ + LEFT$(STR$(msetpt(N)) + "      ", 7)
NEXT N
SP$ = mMS$ + SP$ + CHR$(13)
PRINT #1, SP$; : Z$ = INPUT$(1, #1)

```

```

FOR i = 1 TO 5
  mVALUE(i) = VAL(MID$(mVALUE$(0), (11 + 7 * (i - 1)), 7))
NEXT i

```

```

END SUB

```

```

SUB presentacion (mcal%(), mdi!, ms1!, mn$, msetpt(), mrc, mga, met, mhp, mxo, mun, ma,
mb, mCC, mCP, mCD, mCA, mCT, mCN)
SCREEN 3
b = 0
DEF SEG = 47104!
BLOAD "c:\qbasic\panproi2.pic", b
OPEN "c:\qbasic\update" FOR INPUT AS #3
INPUT #3, mdi!

```

```

INPUT #3, ms1!
INPUT #3, msetpt(1)
INPUT #3, msetpt(4)
INPUT #3, msetpt(3)
INPUT #3, msetpt(2)
INPUT #3, msetpt(5)
INPUT #3, ma
INPUT #3, mb
INPUT #3, mrc
INPUT #3, mga
INPUT #3, met
INPUT #3, mhp
INPUT #3, mxo
INPUT #3, mun
INPUT #3, mCC
INPUT #3, mCP
INPUT #3, mCD
INPUT #3, mCA
INPUT #3, mCT
INPUT #3, mCN

```

```
CLOSE #3
```

```
VIEW SCREEN (220, 120)-(480, 250), , 1
```

```
CLS
```

```
LOCATE 11, 30: PRINT "calibración PROIMI II"
```

```
LOCATE 13, 30: PRINT "variables a graficar"
```

```
LOCATE 15, 30: PRINT "colores gráficos"
```

```
LOCATE 17, 30: PRINT "SEGUIR"
```

```
LOCATE 20, 23: PRINT CHR$(24); " o "; CHR$(25); ": seleccionar  ENTER: entrar"
```

```
msop = 17
```

```
DO
```

```
  DO
```

```
    choice$ = INKEY$
```

```
  LOOP WHILE choice$ = ""
```

```
  IF LEN(choice$) = 1 THEN
```

```
    SELECT CASE choice$
```

```
      CASE CHR$(13)
```

```
        IF msop = 11 THEN CALL calibra(mcal%(), ma, mb)
```

```
        IF msop = 13 THEN CALL varigraf(mrc, mga, met, mhp, mxo, mun)
```

```
        IF msop = 15 THEN CALL colograf(mCC, mCP, mCD, mCA, mCT, mCN)
```

```
        IF msop = 17 THEN GOSUB hola
```

```
      CASE ELSE
```

```
        BEEP
```

```
    END SELECT
```

```
  ELSE
```

```
    choice$ = RIGHT$(choice$, 1)
```

```
    SELECT CASE choice$
```

```
      CASE CHR$(80)
```

```
      IF msop = 11 THEN LOCATE 11, 30: PRINT "calibración PROIMI II": LOCATE 13, 30: PRINT "VARIABLES A GRAFICAR";
```

```
      IF msop = 13 THEN LOCATE 13, 30: PRINT "variables a graficar"; : LOCATE 15, 30: PRINT
```

```
"COLORES GRAFICOS";
IF msop = 15 THEN LOCATE 15, 30: PRINT "colores gráficos"; : LOCATE 17, 30: PRINT
"SEGUIR";
IF msop = 17 THEN LOCATE 17, 30: PRINT "seguir"; : LOCATE 11, 30: PRINT "CALIBRACION
PROIMI II";
```

```
msop = CSRLIN
```

```
    CASE CHR$(72)
```

```
IF msop = 11 THEN LOCATE 11, 30: PRINT "calibración PROIMI II": LOCATE 17, 30: PRINT
"SEGUIR";
IF msop = 13 THEN LOCATE 13, 30: PRINT "variables a graficar"; : LOCATE 11, 30: PRINT
"CALIBRACION PROIMI II";
IF msop = 15 THEN LOCATE 15, 30: PRINT "colores gráficos"; : LOCATE 13, 30: PRINT
"VARIABLES A GRAFICAR";
IF msop = 17 THEN LOCATE 17, 30: PRINT "seguir"; : LOCATE 15, 30: PRINT "COLORES
GRAFICOS";
```

```
msop = CSRLIN
```

```
    CASE ELSE
```

```
        BEEP
```

```
    END SELECT
```

```
END IF
```

```
LOOP
```

```
hola:
```

```
VIEW SCREEN (90, 110)-(600, 250), , 1
CLS
```

```
LOCATE 20, 20: PRINT "
LOCATE 20, 28: PRINT "Actualice el valor y ENTER"
LOCATE 10, 15: PRINT " D.O. inicial"; mdi!; : INPUT ; setpt
IF INKEY$ <> " " THEN mdi! = setpt
LOCATE 12, 15: PRINT " D.O. actual "; ms1!; : INPUT ; setpt
IF INKEY$ <> " " THEN ms1! = setpt
LOCATE 14, 15: PRINT "      μ ="; msetpt(1); : INPUT ; setpt
IF INKEY$ <> " " THEN msetpt(1) = setpt
LOCATE 16, 15: PRINT " Temperatura ="; msetpt(2); : INPUT ; setpt
IF INKEY$ <> " " THEN msetpt(2) = setpt
LOCATE 10, 45: PRINT "      pH ="; msetpt(4); : INPUT ; setpt
IF INKEY$ <> " " THEN msetpt(4) = setpt
LOCATE 12, 45: PRINT " Oxígeno dis. ="; msetpt(3); : INPUT ; setpt
IF INKEY$ <> " " THEN msetpt(3) = setpt
LOCATE 14, 45: PRINT " Pendiente pH ="; msetpt(5); : INPUT ; setpt
IF INKEY$ <> " " THEN msetpt(5) = setpt
LOCATE 16, 45: PRINT " Valor de μ ="; msetpt(6); : INPUT ; setpt
IF INKEY$ <> " " THEN msetpt(6) = setpt
```

```
mn$ = "c:\qbasic\" + DATE$
```

```
VIEW
CLS
```

```

L$ = STRING$(65, CHR$(196))
LOCATE 10, 9: PRINT L$; : LOCATE 17, 9: PRINT L$;
LOCATE 15, 20: PRINT " Quiére grabar los cambios?  si "; CHR$(26); "NO"; : qu = 0
DO
  DO
    choice$ = INKEY$
  LOOP WHILE choice$ = ""

  IF LEN(choice$) = 1 THEN
    SELECT CASE choice$
      CASE CHR$(13)
        GOSUB mal
      CASE ELSE
        BEEP
    END SELECT

  ELSE
    choice$ = RIGHT$(choice$, 1)

    SELECT CASE choice$
      CASE CHR$(77)

LOCATE 15, 50: PRINT "si "; CHR$(26); "NO"; : qu = 0

      CASE CHR$(75)

LOCATE 15, 50: PRINT "SI"; CHR$(27); " no"; : qu = 1

      CASE ELSE
        BEEP
    END SELECT
  END IF

LOOP

mal:
IF qu = 0 THEN GOSUB quetal

  OPEN "c:\qbasic\update" FOR OUTPUT AS #3
  PRINT #3, USING "###.##"; mdi!
  PRINT #3, USING "###.##"; ms1!
  PRINT #3, USING "###.##"; msetpt(1)
  PRINT #3, USING "###.##"; msetpt(4)
  PRINT #3, USING "###.##"; msetpt(3)
  PRINT #3, USING "###.##"; msetpt(2)
  PRINT #3, USING "###.##"; msetpt(5)
  PRINT #3, ma
  PRINT #3, mb
  PRINT #3, mrc
  PRINT #3, mga
  PRINT #3, met
  PRINT #3, mhp
  PRINT #3, mxo
  PRINT #3, mun
  PRINT #3, mCC
  PRINT #3, mCP

```

```
PRINT #3, mCD
PRINT #3, mCA
PRINT #3, mCT
PRINT #3, mCN
CLOSE #3
```

```
quetal:
END SUB
```

```
SUB quit (mbu, mvu, usu!(), mn$)
```

```
OPEN mn$ FOR APPEND AS #2
FOR i = 0 TO mvu - 1
usu!(0, i) = usu!(0, i) / 3600
PRINT #2, USING "##.####"; usu!(0, i);      'Tiempo
PRINT #2, USING "  ##.##"; usu!(1, i);      'Crecimiento
PRINT #2, USING "  ##.####"; usu!(2, i);      'μ
PRINT #2, USING "  ##.##"; usu!(3, i);      'pH
PRINT #2, USING "  ##.##"; usu!(4, i);      'Oxigeno Disuelto
PRINT #2, USING "  ##.##"; usu!(5, i);      'Temperatura
PRINT #2, USING "  ##.####"; usu!(6, i);      'pendiente pH
```

```
NEXT i
CLOSE #2
```

```
OUT &H360 + 16, 0
```

```
END
END SUB
```

```
SUB varigraf (mrcm, mgam, metm, mhpm, mxom, munm)
```

```
VIEW SCREEN (64, 55)-(583, 160), , 1
```

```
CLS
```

```
LOCATE 9, 31: PRINT "VARIABLES A GRAFICAR";
```

```
IF mrcm = 1 THEN
```

```
    LOCATE 12, 15: PRINT " CRECIMIENTO ?  SI"; CHR$(27); " no";
```

```
    ELSE LOCATE 12, 15: PRINT " CRECIMIENTO ?  si "; CHR$(26); "NO";
```

```
END IF
```

```
IF mgam = 1 THEN
```

```
    LOCATE 14, 15: PRINT "      μ  SI"; CHR$(27); " no";
```

```
    ELSE LOCATE 14, 15: PRINT "      μ  si "; CHR$(26); "NO";
```

```
END IF
```

```
IF metm = 1 THEN
```

```
    LOCATE 16, 15: PRINT " temperatura  SI"; CHR$(27); " no";
```

```
    ELSE LOCATE 16, 15: PRINT " temperatura  si "; CHR$(26); "NO";
```

```
END IF
```

```
IF mhpm = 1 THEN
```

```
    LOCATE 12, 45: PRINT "      pH  SI"; CHR$(27); " no";
```

```
    ELSE LOCATE 12, 45: PRINT "      pH  si "; CHR$(26); "NO";
```

```
END IF
```

```
IF mxom = 1 THEN
```

```
    LOCATE 14, 45: PRINT "oxígeno dis.  SI"; CHR$(27); " no";
```

```

ELSE LOCATE 14, 45: PRINT "oxígeno dis. si "; CHR$(26); "NO";
END IF

```

```

IF munm = 1 THEN
LOCATE 16, 45: PRINT "Pendiente pH SI"; CHR$(27); " no";
ELSE LOCATE 16, 45: PRINT "Pendiente pH si "; CHR$(26); "NO";
END IF

```

```

LOCATE 19, 15: PRINT CHR$(24); " o "; CHR$(25); ": seleccionar "; CHR$(26); ": NO ";
CHR$(27); ": SI ENTER: salir";
msop = 12
vsop = 29

```

```

DO
DO
choice$ = INKEY$
LOOP WHILE choice$ = ""

IF LEN(choice$) = 1 THEN
SELECT CASE choice$
CASE CHR$(13)
GOSUB hasta
CASE ELSE
BEEP
END SELECT

ELSE
choice$ = RIGHT$(choice$, 1)

SELECT CASE choice$
CASE CHR$(80)

```

```

LOCATE msop, vsop - 14
IF msop = 12 AND vsop = 29 THEN PRINT " crecimiento "; : LOCATE 14, 15: PRINT "
μ ?";
IF msop = 14 AND vsop = 29 THEN PRINT " μ "; : LOCATE 16, 15: PRINT "
TEMPERATURA ?";
IF msop = 16 AND vsop = 29 THEN PRINT " temperatura "; : LOCATE 12, 45: PRINT "
pH ?";
IF msop = 12 AND vsop = 59 THEN PRINT " pH "; : LOCATE 14, 45: PRINT
"OXIGENO DIS. ?";
IF msop = 14 AND vsop = 59 THEN PRINT "oxígeno dis. "; : LOCATE 16, 45: PRINT
"PENDIENTE pH ?";
IF msop = 16 AND vsop = 59 THEN PRINT "Pendiente pH "; : LOCATE 12, 15: PRINT "
CRECIMIENTO ?";

```

```

msop = CSRLIN
vsop = POS(0)

```

```

CASE CHR$(72)
LOCATE msop, vsop - 14
IF msop = 12 AND vsop = 29 THEN PRINT " crecimiento "; : LOCATE 16, 45: PRINT
"PENDIENTE pH ?";
IF msop = 14 AND vsop = 29 THEN PRINT " μ "; : LOCATE 12, 15: PRINT "
CRECIMIENTO ?";

```

```

IF msop = 16 AND vsop = 29 THEN PRINT " temperatura "; : LOCATE 14, 15: PRINT "
μ ?";
IF msop = 12 AND vsop = 59 THEN PRINT "          pH "; : LOCATE 16, 15: PRINT "
TEMPERATURA ?";
IF msop = 14 AND vsop = 59 THEN PRINT "oxígeno dis. "; : LOCATE 12, 45: PRINT "
pH ?";
IF msop = 16 AND vsop = 59 THEN PRINT "Pendiente pH "; : LOCATE 14, 45: PRINT
"OXIGENO DIS. ?";

```

```

msop = CSRLIN
vsop = POS(0)

```

#### CASE CHR\$(77)

```

IF msop = 12 AND vsop = 29 THEN LOCATE 12, 32: PRINT "si "; CHR$(26); "NO"; : mrcm
= 0
IF msop = 14 AND vsop = 29 THEN LOCATE 14, 32: PRINT "si "; CHR$(26); "NO"; : mgam
= 0
IF msop = 16 AND vsop = 29 THEN LOCATE 16, 32: PRINT "si "; CHR$(26); "NO"; : metm
= 0
IF msop = 12 AND vsop = 59 THEN LOCATE 12, 62: PRINT "si "; CHR$(26); "NO"; : mhpm
= 0
IF msop = 14 AND vsop = 59 THEN LOCATE 14, 62: PRINT "si "; CHR$(26); "NO"; : mxom
= 0
IF msop = 16 AND vsop = 59 THEN LOCATE 16, 62: PRINT "si "; CHR$(26); "NO"; : munm
= 0

```

#### CASE CHR\$(75)

```

IF msop = 12 AND vsop = 29 THEN LOCATE 12, 32: PRINT "SI"; CHR$(27); " no"; : mrcm =
1
IF msop = 14 AND vsop = 29 THEN LOCATE 14, 32: PRINT "SI"; CHR$(27); " no"; : mgam
= 1
IF msop = 16 AND vsop = 29 THEN LOCATE 16, 32: PRINT "SI"; CHR$(27); " no"; : metm =
1
IF msop = 12 AND vsop = 59 THEN LOCATE 12, 62: PRINT "SI"; CHR$(27); " no"; : mhpm
= 1
IF msop = 14 AND vsop = 59 THEN LOCATE 14, 62: PRINT "SI"; CHR$(27); " no"; : mxom
= 1
IF msop = 16 AND vsop = 59 THEN LOCATE 16, 62: PRINT "SI"; CHR$(27); " no"; : munm
= 1

```

```

CASE ELSE
BEEP
END SELECT
END IF

```

LOOP

hasta:

```

VIEW SCREEN (165, 68)-(465, 155), , 1
CLS
LOCATE 11, 30: PRINT "calibración PROIMI II"

```

```
LOCATE 13, 30: PRINT "variables a graficar"  
LOCATE 15, 30: PRINT "colores gráficos"  
LOCATE 17, 30: PRINT "SEGUIR"  
LOCATE 19, 23: PRINT CHR$(24); " o "; CHR$(25); ": seleccionar  ENTER: entrar"  
msop = 17  
END SUB
```

**BIBLIOGRAFIA**

- Acuña,G.; Latrille,E.; Béal,C.; Corrieu,G. On-line estimation of biological variables during pH controlled lactic acid fermentation (1994). *Biotechnol Bioeng* 44, 1168-1176.
- Allison,S.M.; Small,J.R.; Kacser,H.; Prosser,J.I. Control analysis of microbial interactions in continuous culture: a simulation study (1993). *J. Gen. Microbiol.* 139, 2309-2317.
- An,G.H.; Schuman,D.B.; Johnson,E.A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content (1989). *Appl. Environ. Microbiol.* 55(1), 116-124.
- An,G.H.; Johnson,E.A. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma* (1990). *Antonie van Leeuwenhoek* 57, 191-203.
- Andrewes,A.G.; Phaff,H.J.; Starr,M.P. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast (1976). *Phytochemistry* 15, 1003-1007.
- Armstrong,G.A.; Alberti,M.; Leach,F.; Hearst,J.E. Nucleotid sequence, organization, and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus* (1989). *Mol Gen Genet* 216, 254-268.
- Atanasov,P.; Wilkins,E. Biosensor for continuous glucose monitoring (1994). *Biotechnol Bioeng* 43, 262-266.
- Bacon,J.S.D.; Jones,D.; Ottolenghi,P. Cell wall residues in yeast protoplast preparations (1969). *J. Bacteriol.* 99(3), 885-887.
- Bowler,C.; Slooten,L.; Vandenbranden,S.; De Rycke,R.; Botterman,J.; Sybesma,C.; Van Montagu,M.; Inze,D. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxigen radicals in transgenic plants (1991). *EMBO Journal* 10, 1723-17322.
- Bramley,P.M.; Mackenzie,A. (1988): Regulation of carotenoids biosynthesis. In: *Current topics in cellular regulation*. Vol. 29. (Eds: Horecker,B.L.; Stadtman,E.R.) *Harcourt Brace Jovanovich*, San Diego, 291-343.
- Brenner,S.; Dark,F.; Gerhardt,P.; Kandler,O.; Kellenberger,K.; Klieneberger-Nobel,E.; McQuillen,K.; Rubio-Huertos,M.; Salton,M.; Strange,R.; Tomcsik,J.; Weibull,C. (1958). *Nature* 21, 1713-1715.
- Brewer,B.J.; Fangman,W.L. The localization of replication origins on ARS plasmids in *Saccharomyces cerevisiae* (1987). *Cell* 51, 463-471.
- Bustamante,C.; Gurrieri,S.; Smith,S.B. Towards a molecular description of pulsed-field gel electrophoresis (1993). *TIBTECH* 11, 23-30.

- Buttler, T.; Gorton, L.; Jarskog, H.; Marko-Varga, G.; Hahn-Hagerdal, B.; Meinander, N.; Olsson, L. Monitoring of ethanol during fermentation of a lignocellulose hydrolysate by on-line microdialysis sampling, column liquid chromatography, and an alcohol Biosensor (1994). *Biotechnol Bioeng* 44, 322-328.
- Carle, G.F.; Olson, M.V. An electrophoretic karyotype for yeast (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3756-3760.
- Castillo, A.N.; Cifuentes, V.G. RNA de doble hebra asociado a particulas tipo virus en *Phaffia rhodozyma* (1993). *Anales de Microbiologia* 1, 63:66.
- Castro, G.R. (1992): Estudios fermentativos en especies del Género *Bacillus*. Doctoral Tesis, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Crabtree, H.G. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours (1929). *Biochem. J.* 23, 536-545.
- Darling, S.; Theilade, J.; Birch-Andersen, A. Kinetic and morphological observations on *Saccharomyces cerevisiae* during spheroplast formation (1969). *J. Bacteriol.* 98(2), 797-810.
- Dogbo, O.; Laferriere; D'Harlingue, A.; Camara, B. Carotenoid biosynthesis: isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7054.
- Ferenczy, L.; Maraz, A. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. (1977). *Nature* 268, 524.
- Girard, P.; Falconnier, B.; Bricout, J.; Vladescu, B.  $\beta$ -carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma* (1994). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 183-191.
- Glasse, J.; Montague, G.A.; Ward, A.C.; Kara, B.V. Artificial neural network based experimental design procedures for enhancing fermentation development (1994). *Biotechnol Bioeng* 44, 397-405.
- Goochee, C.F.; Hatch, R.T.; Cadman, T.W. Control of *Escherichia coli-Candida utilis* continuous, competitive mixed-culture system using the dynamic matrix control algorithm (1989). *Biotechnol Bioeng* 33, 282-292.
- Goodwin, T.W. The biosynthesis and function of the carotenoid pigments (1959). *Adv. Enzymol.* 21, 295-365.
- Goto, K.; Motoyoshi, T.; Tamura, G.; Obata, T.; Hara, S. Chromosomal transformation in *Saccharomyces cerevisiae* with DNA isolated by pulse field gel electrophoresis (1990). *Agric. Biol. Chem.* 54, 1499-1504.

Hall, E.A.H. The developing biosensor arena (1986). *Enzyme Microb. Technol.* 8, 651-657.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (Eds.) (1989): *Free radicals in biology and medicine*. 2 ed. Oxford University Press, Oxford.

Heinrich, M.; Reinhardt, T. Bioreactor control using the basic operation concept (1991). *Kontakte* 3, 16-28.

Ito, Y.; Sasaki, R.; Suzuki, S.; Aoki, K. Relationship between serum xanthophil levels and the consumption of cigarettes, alcohol or foods in healthy inhabitants of Japan (1991). *International Journal of Epidemiology* 20, 615-620.

Johnson, E.A.; Konklin, D.E.; Lewis, M.J. The Yeast *Phaffia Rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans (1977). *J. Fish. Res. Board Can.* 34, 2417-2421

Johnson, E.A.; Lewis, M.J. Astaxantin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* (1979). *J. Gen. Microbiol.* 115, 173-183.

Johnson, E.A.; An, G.H. Astaxanthin from microbial sources (1991). *Crit. Rev. Biotechnol.* 11, 297-326.

Johnson, E.A. (1992): New advances in astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. In: *Profiles on biotechnology*. (Eds: Tomas Gonzales Villa; Julio Abalde Alonso) Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 289-299.

Johnston, J.R.; Contopoulou, C.R.; Mortimer, R.K. Karyotyping of yeast strains of several genera by field inversion gel electrophoresis (1988). *Yeast* 4, 191-198.

Käppeli, O. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts (1986). *Advances in Microbial Physiology* 28, 181-209.

Kobayashi, M.; Kakizono, T.; Nagai, S. Enhanced carotenoid Biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis* (1993). *Appl. Environ. Microbiol.* 59(3), 867-873.

Konstantinov, K.B.; Yoshida, T. Knowledge-based control of fermentation processes (1992). *Biotechnol Bioeng* 39, 479-486.

Kreger-van Rij, N.J.W. (Ed.) (1984): *The yeasts, a taxonomic study*. 3 ed. Elsevier, Amsterdam. 1082 pages.

Lagunas, R.; Dominguez, C.; Busturia, A.; Saez, M.J. Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *S. cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems (1982). *J. Bacteriol.* 152(1), 19-25.

- Lim,B.P.; Nagao,a; Terao,J.; Tanaka,K.; Suzuki,T.; Takama,K. Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation (1992). *Biochimica et Biophysica acta* 1126, 178-184.
- Malek,I. (1958): The Physiological State of Microorganism During Continuous Culture. In: *Continuous Cultivation of Microorganism a Symposium*. Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 11-28.
- Meyer,P.S.; du Preez,J.C. Effect of acetic acid on astaxanthin production (1993). *Biotechnology Letters* 15, 919-924.
- Meyer,P.S.; du Preez,J.C.; Kilian,S.G. Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* (1993). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9, 514-520.
- Meyer,P.S.; du Preez,J.C. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice (1994). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10, 178-183.
- Meyer,P.S.; du Preez,J.C.; van Dyk,M.S. The effect of monoterpenes on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* (1994). *Biotechnology Letters* 16, 125-128.
- Miller,M.W.; Yoneyama,M.; Soneda,M. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes) (1976). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26(2), 286-291.
- Misawua,N.; Nakagawa,M.; Kobayashi,K.; Yamano,S.; Izawa,Y.; Nakamura,K.; Harashima,K. Elucidation of the *Edwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli* (1990). *J. Bacteriol.* 172(12), 6704-6712.
- Nečas,O (1971): Cell wall synthesis in yeast protoplasts. *Bacteriol. Rev.* 35, 149-170.
- Ostrander,J.; Martinsen,C.; Liston,J.; McCullough,J. Sensory testing of pen-reared salmon and trout (1976). *J. Food Sci.* 41, 386-390.
- Petrik,M.; Kappeli,O.; Fiechter,A. An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: Involment of short- and long-term regulation (1983). *J. Gen. Microbiol.* 129, 43-49.
- Phaff,H.J.; Miller,M.W.; Yoneyama,M.; Soneda,M. (1972): A comparative study of the yeast flora associated with trees on Japanese Islands and on the west coast of North America. In: *Proceedings IV IFS: Fermentation Technology Today*. (Ed: Terui,G.) Society of Fermentation Technology, Osaka, 759-774.

- Piper, P.W.; Kirk, N. (1991): Inducing heterologous gene expression in yeast as fermentations approach maximal biomass. In: Genetically-Engineered proteins and enzymes from yeast: Production control. (Ed: Wiseman, A.) Ellis Horwood, London, 203.
- Pirt, S.J.; Callow, D.S. Studies of the growth of *Penicillium chrysogenum* in continuous flow culture with reference to penicillin production (1960). J. appl. Bact. 23, 87-98.
- Riedel, K.; Renneberg, R.; Kleine, R.; Kruger, M.; Scheller, F. A microbial sensor for peptides (1988a). Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 272-275.
- Riedel, K.; Renneberg, R.; Kuhn, M.; Scheller, F. A fast estimation of biochemical oxygen demand using microbial sensors (1988b). Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 316-318.
- Rodrigues de Miranda, L. (1984): Discussion of the genera belonging to the imperfect yeasts. In: The yeasts, a taxonomic study. 3 ed. (Ed: Kreger-van Rij, N.J.W.) Elsevier, Amsterdam, 845-872.
- Rolf, M.J.; Lim, H.C. Experimental adaptive on-line optimization of cellular productivity of a continuous baker's yeast culture (1985). Biotechnol Bioeng 27, 1236-1245.
- Ruiz-Vázquez, R.M.; Fontes, M.; Nicolás, F.J.; Botella, J.; Martínez-Argudo, I.; Murillo, F.J. (1992): Genetic of Carotenogenesis and its regulation in *Myxococcus xanthus*: A review. In: Profiles on Biotechnology. (Eds: Villa, T.G.; Abalde, J.) Universidad de Santiago, Santiago de Compostela, 311-321.
- Schmidhauser, T.J.; Lauter, F.R.; Russo, V.E.A.; Yanofsky, C. Cloning, Sequence, and photoregulation of al-1, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa* (1990). Molecular and Cellular Biology 10, 5064-5070.
- Schroeder, W.A.; Johnson, E.A. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma* (1993). J. Gen. Microbiol. 139, 907-912.
- Sedmak, J.J.; Weerasinghe, D.K.; Jolly, S.O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* (1990). Biotech. Techniques 4, 107-112.
- Shioya, S. (1992): Optimization and control in fed-batch bioreactors. In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Vol. 46. (Eds: Fiechter, A.; Scheper, T.) Springer-Verlag, Berlin, 251.
- Simpson, K.L.; Chichester, C.O.; Phaff, H.J. (1970): Carotenoid pigments of yeasts. In: yeast. Vol. 2. (Eds: Rose, A.H.; Harrison, J.S.) Academic Press, London, 493-515.

- Sipiczki, M.; Heyer, W.; Kohli, J. Preparation and regeneration of protoplasts and spheroplasts for fusion and transformation of *Schizosaccharomyces pombe* (1985). *Curr. Microbiol.* 12, 169-174.
- Spencer, J.F.T.; Spencer, D.M. The use of mitochondrial mutants in hybridization of industrial yeast (1981). *Curr. Genet.* 4, 177-180.
- Spencer, J.F.T.; Spencer, D.M.; Reynolds, N. Protoplast fusion for the improvement of Industrial Yeasts (1987). *Proceed. Aiko Symp. Industrial Yeast Genet.* 5, 27-42.
- Spencer, J.F.T.; Spencer, D.M.; Bruce, I.J. (Eds.) (1989): *Yeast Genetics, a manual of methods.* Springer-Verlag, Heidelberg and New York. 104 pages.
- Stanier, R.Y.; Adelberg, E.A.; Ingraham, J.L.; Wheelis, M.L. (1979): *Introduction to the Microbial World.* Prentice-Hall, New Jersey. 468 pages.
- Sykyta, B.; Slezák, J. Continuous cultivation of *E. coli* possessing high penicillin-acylase activity (1964). *Biotechnol Bioeng* 6, 309.
- Takamatsu, T.; Shioya, S.; Okada, Y.; Kanda, M. Profile control scheme in a baker's yeast fed-batch culture (1985). *Biotechnol Bioeng* 27, 1675-1686.
- Torrissen, O.J.; Hardy, R.W.; Shearer, K.D. Pigmentation of salmonids carotenoid deposition and metabolism (1989). *Critical reviews in aquatic sciences* 1, 209-225.
- Turner, C.; Gregory, M.E.; Thornhill, N.F. Closed-loop control of fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* using on-line HPLC (1994). *Biotechnol Bioeng* 44, 819-829.
- Vaccari, G.; Dosi, E.; Campi, A.L.; González-Vara, A.; Matteuzzi, R.D.; Montavani, G. A near-infrared spectroscopy technique for the control of fermentation processes: An application to lactic acid fermentation (1994). *Biotechnol Bioeng* 43, 913-917.
- Whitaker, A. Fed Batch culture (1980). *Proc. Biochem.* 15, 10.
- Winkler, M. (1991): Time-profiling and environmental desing in computer-controlled fermentation and enzyme production. In: *Genetically-engineered proteins and enzymes from yeasts: production control.* (Ed: Wiseman, A.) Ellis Horwood, London, 97-146.
- Wu, W.-T.; Chen, K.-C.; Chiou, H.-W. On-line optimal control for fed-batch culture of baker's yeast production (1985). *Biotechnol Bioeng* 27, 756-760.

Yamada, Y.; Kawasaki, H. The genus *Phaffia* yeast phylogenetically separate from the genus *Cryptococcus* (Cryptococcaceae) (1989). *Agric. Biol. Chem.* 53, 2845-2846.

Zhang, Q.; Reid, J.F.; Litchfield, B.; Ren, J.; Chang, S.-W. A prototype neural network supervised control system for *Bacillus thuringiensis* fermentations (1994). *Biotechnol Bioeng* 43, 483-489.