

Análisis de Sensibilidad Paramétrica de *Xanthophyllomyces dendrorhous* en cultivo por Lote y Lote Alimentado

Allan F. Sánchez¹, Javier A. Hernández¹, Anne Gschaedler¹, Ricardo Femat², Jesús Cervantes¹, Lorena Amaya¹, Javier Arrizon¹, Melchor Arellano Plaza¹, Enrique J. Herrera López^{1,*}

¹Unidad de Biotecnología. CIATEJ, Av. Normalistas 800, Colinas de la Normal, C.P. 44270. Guadalajara, Jalisco, México.

²División de Matemáticas Aplicadas, IPICYT. Camino a la presa San José 2055. Lomas 4ta Secc. C.P. 78216. San Luis Potosí. México.

*email:eherrera@ciatej.net.mx

Teléfono: (52)33-33455200

Resumen—La producción de carotenoides, y en general, la producción de metabolitos de interés industrial mediante fuentes microbianas puede ser afectada por la naturaleza impredecible del microorganismo con el que se esté trabajando. Los microorganismos pueden presentar comportamiento no lineal, diferentes tiempos de crecimiento, incertidumbre en las mediciones y en ocasiones, desconocimiento de los parámetros cinéticos del bioproceso respecto al crecimiento, generación de productos y consumo de sustratos. A través del modelado matemático del bioproceso se puede obtener un panorama general de los sucesos dentro del biorreactor. Sin embargo, un conocimiento más detallado de la influencia sobre el sistema de las variables y parámetros en un modelo, permitirán crear estrategias para optimizar y controlar el bioproceso. En este trabajo se desarrolló un análisis de sensibilidad paramétrica a dos modelos cinéticos que describen la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous*, con el fin de obtener mayor información sobre los parámetros que tienen mayor influencia en el sistema.

Palabras clave: Modelo cinético, análisis de sensibilidad paramétrica, astaxantina, *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

I. INTRODUCCIÓN

La astaxantina (3,3' - dihidroxi - β , β - caroteno - 4,4' - diona) es un carotenoide ampliamente distribuido en la naturaleza y es el principal pigmento en los crustáceos y los salmónidos, así como diversas aves como el flamenco, el ibis escarlata y muchos otros microorganismos (Johnson y col., 1991).

Existe un creciente interés en el uso de astaxantina como pigmento para la acuicultura e industria de aves de corral, debido a que estos animales no pueden sintetizar la astaxantina. Por lo tanto, ésta debe ser incluida en sus alimentos para obtener un color atractivo para el consumidor (Meyers, 1994). Por otra parte, la astaxantina tiene una alta actividad antioxidante, lo cual ha creado un creciente interés en la industria farmacéutica para

la prevención de algunos tipos de cáncer (Nishino y col., 1999).

En términos económicos, la astaxantina sobresale debido a que su valor en el mercado genera ganancias mayores a los 100 millones de dólares por año (Johnson, 2003).

Aunque el pigmento astaxantina puede ser producido por tecnología química sintética, algunos de los subproductos resultantes de los procesos químicos pueden tener efectos secundarios para el consumidor. Es por esta razón que la producción de carotenoides mediante fuentes microbianas ha sido objeto de extensas investigaciones (Frengova y col., 2009).

Una de las fuentes microbianas más reconocidas de producción de astaxantina es la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (antes *Phaffia rhodozyma*) que sintetiza la astaxantina como su principal carotenoide (Phaff y col., 1976).

Principalmente, se han utilizado tres enfoques para la mejora en la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous*: (i) obtención de astaxantina con cepas mutantes de sobreproducción (An y col., 1989; An, 1996; Fang y col., 1993; Domínguez y col., 2004), (ii) desarrollo de medios de cultivos industriales (Parajó y col., 1998; Florencio y col., 1998; Ramírez y col., 2000; Domínguez y col., 2004), (iii) implementación de diversos sistemas de producción (Reynders y col., 1997; Nishio y col., 1977; Yamane y col., 1997; Ramírez y col., 2006).

De los sistemas más utilizados para producir astaxantina está el cultivo por lote, que es afectado por altas concentraciones de sustrato (Reynders y col., 1997), y el sistema por lote alimentado, el cual ha mostrado mejoras

en la producción de astaxantina y biomasa (Yamane y col., 1997; Ramírez y col., 2006). En la actualidad, el monitoreo y control de bioprocesos se han vuelto indispensables para el desarrollo científico e industrial. Un conocimiento más detallado del biosistema permitirá una mejor comprensión del fenómeno y eventualmente, la optimización del proceso (Fredrik, 2004). Una herramienta para desarrollar lo anterior es el uso de modelos cinéticos que describan el crecimiento microbiano, el consumo de sustrato y la formación de producto (Zhang y col., 1999). Estos modelos pueden ser usados para identificar los parámetros y condiciones óptimas de operación y posteriormente como base para implementar un sistema de control.

Sin embargo, de la teoría de ecuaciones diferenciales ordinarias es sabido que sus coeficientes tienen repercusión en su solución, y que los modelos cinéticos no pueden ser considerados exactos, por esta razón, la certidumbre del modelo requiere de un estudio de sensibilidad paramétrica, el cual investiga, de manera sistemática, como influyen los parámetros de las ecuaciones diferenciales sobre las variables de estado que describen el proceso. Este trabajo se enfoca a determinar los parámetros que impactan de manera importante sobre cada una de las ecuaciones diferenciales de los modelos cinéticos; así como en qué proporción lo hacen y, lo más importante, que salidas se ven afectadas con los cambios en los valores numéricos de los parámetros.

II. MODELOS CINÉTICOS

Tanto los modelos cinéticos analizados en este trabajo como la metodología fueron descritos y reportados por Luna y col. (2010). En la tabla 1 se describen las variables y los parámetros utilizados.

Para estos modelos se tomaron en cuenta los siguientes supuestos:

1. Aunque el jugo de dátil se compone principalmente de fructosa y glucosa, la concentración de azúcar en el medio se trató como un sustrato único.
2. No existe limitación de oxígeno en el cultivo.
3. No existe limitación de nitrógeno.
4. La producción de etanol y glicerol son despreciables.

III. MODELO CINÉTICO POR LOTE

Un balance diferencial para describir la biomasa está dado por:

$$\frac{dx_1}{dt} = \mu x_1 \quad (1)$$

donde μ es la velocidad de crecimiento específico. El balance de masa de sustrato rige la producción de biomasa,

TABLA I: Nomenclatura usada en el desarrollo de este trabajo

\	Nomenclatura
x_1	Concentración de biomasa (gL^{-1})
x_2	Concentración de sustrato (gL^{-1})
x_3	Concentración de producto (μgL^{-1})
x_4	Volumen (L)
α	Coefficiente de formación de producto asociado al crecimiento (μgg^{-1})
β	Coefficiente de formación de producto no asociado al crecimiento ($\mu\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$)
γ	Término exponencial para el modelo de inhibición por producto
D	Tasa de dilución (h^{-1})
F	Velocidad de flujo (Lh^{-1})
K_i	Constante de inhibición por sustrato (gL^{-1})
K_p	Constante de inhibición por producto (μgL^{-1})
K_s	Constante de saturación de sustrato (gL^{-1})
m_s	Coefficiente de mantenimiento celular ($\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$)
S_f	Concentración de sustrato de entrada (gL^{-1})
μ	Velocidad de crecimiento específico (h^{-1})
μ_{max}	Velocidad máxima de crecimiento específico (h^{-1})
$Y_{x/s}$	Rendimiento de biomasa sobre sustrato (gg^{-1})

así como el mantenimiento celular y está dado por:

$$\frac{dx_2}{dt} = -\left(m_s + \frac{\mu}{Y_{x/s}}\right)x_1 \quad (2)$$

La levadura *X. dendrorhous* produce carotenoides en la fase de crecimiento exponencial y en la fase estacionaria, por lo tanto, la producción de carotenoides puede ser descrita por la ecuación de Luedeking-Piret (1959).

$$\frac{dx_3}{dt} = (\alpha\mu + \beta)x_1 \quad (3)$$

IV. MODELO CINÉTICO POR LOTE ALIMENTADO

Las ecuaciones diferenciales (1)-(3) pueden ser modificadas para describir una fermentación por lote alimentado, el modelo incluye los efectos del sustrato de alimentación, el factor de dilución y el cambio de volumen:

$$\frac{dx_1}{dt} = (\mu - D)x_1 \quad (4)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = -\left(m_s + \frac{\mu}{Y_{x/s}}\right)x_1 + D(S_f - x_2) \quad (5)$$

$$\frac{dx_3}{dt} = (\alpha\mu + \beta)x_1 - Dx_3 \quad (6)$$

$$\frac{dx_4}{dt} = F \quad (7)$$

donde $D = F/x_4$ representa la tasa de dilución.

La velocidad de crecimiento de *X. dendrorhous* se inhibe por altas concentraciones de sustrato (Reynders y col., 1997;

TABLA II: Variables y parámetros estudiados en el análisis de sensibilidad paramétrica

Modelo	Variabes	Parámetros
Lote	x_1, x_2, x_3	$\alpha, \beta, \gamma, K_i, K_p, K_s, m_s, \mu_{max}, Y_{x/s}$
Lote Alimentado	x_1, x_2, x_3, x_4	$\alpha, \beta, \gamma, K_i, K_p, K_s, m_s, \mu_{max}, Y_{x/s}, D, F, S_f$

TABLA III: Nomenclatura usada en el desarrollo de este trabajo

Parámetro	Lote	Lote Alimentado
α	371.45 (μgg^{-1})	536.92 (μgg^{-1})
β	1.5502 ($\mu\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$)	1.0184 ($\mu\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$)
γ	3.6558	1.2109
K_i	50.31 (gL^{-1})	57.5259 (gL^{-1})
K_p	8798.15 (μgL^{-1})	8466.25 (μgL^{-1})
K_s	1.6607 (gL^{-1})	1.3463 (gL^{-1})
m_s	0.005 ($\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0.005 ($\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$)
μ_{max}	0.1450 (h^{-1})	0.1258 (h^{-1})
$Y_{x/s}$	0.3941 ($\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0.3713 ($\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$)
S_f	-	65 (gL^{-1})
F	-	0.00021 (Lh^{-1})
D	-	F/x_4

Yu y col., 1997; Yuan y col., 2008). También ha sido reportado que el aumento en la acumulación intracelular de carotenoides ejerce un grado de inhibición (Moon y col., 2008). Una opción directa para representar la velocidad de crecimiento específico es la combinación de la inhibición por sustrato y producto:

$$\mu = \frac{\mu_{max}x_2}{K_i + x_2 + \left(\frac{x_2^2}{K_i}\right)} \left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^\gamma \quad (8)$$

V. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD PARAMÉTRICA

Se realizó el análisis de sensibilidad paramétrica con el propósito de establecer los parámetros "sensibles", es decir, aquellos que tienen un mayor impacto en cada una de las ecuaciones diferenciales que forman los modelos cinéticos. Las variables y parámetros analizados en los modelos cinéticos se muestran en la Tabla 2. Los valores utilizados para los parámetros (Tabla 3) fueron idénticos a los utilizados por Luna y col. (2010).

Flores (2001), describe la metodología para la ejecución de un análisis de sensibilidad paramétrica, en el cual, partimos de un modelo matemático descrito por:

$$\frac{dx}{dt} = f(x, t, p) \quad (9)$$

donde x , son las variables de estado, t es el tiempo y p representa los parámetros del sistema.

La matriz de sensibilidad paramétrica S está dada por:

$$\frac{dS}{dt} = \left(\frac{\delta f}{\delta x}\right)S + \frac{\delta f}{\delta p} \quad (10)$$

donde:

$$S = \begin{bmatrix} S_{11} & \cdots & S_{1j} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ S_{i1} & \cdots & S_{ij} \end{bmatrix} \quad (11)$$

$$S_{ij} = \frac{\delta x_i}{\delta p_j} \quad (12)$$

Entonces df/dx está dada por la derivada parcial de cada una de las ecuaciones diferenciales con respecto a cada una de las variables. El primer subíndice corresponde al número de ecuación a evaluar y el segundo a la variable evaluada.

$$\frac{\delta f}{\delta x} = \begin{bmatrix} s_{11} & s_{12} & s_{13} \\ s_{21} & s_{22} & s_{23} \\ s_{31} & s_{32} & s_{33} \end{bmatrix} \quad (13)$$

Por ejemplo, s_{12} corresponde a la ecuación diferencial que representa el cambio en la concentración de biomasa con respecto al sustrato, tal como se muestra a continuación:

$$\frac{\delta x_1}{\delta x_2} = \left(\frac{x_1\mu_{max}\left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^\gamma}{\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_i}\right) - \frac{x_2x_1\mu_{max}\left(\frac{\left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^\gamma}{\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_i}\right)}{\left(\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_i\right)^2} \quad (14)$$

De esta forma se generan dos matrices de derivadas parciales, la primera, de todas las ecuaciones con respecto a las variables (13) y la segunda, de todas las ecuaciones con respecto a los parámetros. Cada fila en la segunda matriz representa una variable analizada y la derivada se determinó para cada uno de los 9 parámetros del sistema por lote y 12 parámetros para el sistema por lote alimentado.

Por lo tanto, se generan en total 30 ecuaciones diferenciales para el modelo cinético por lote y 52 para el modelo por lote alimentado; dichas ecuaciones fueron evaluadas con el programa MATLAB 7 [®]. Como ejemplo se muestra la ecuación diferencial ubicada en la fila 1 y columna 2 del modelo por lote:

$$\dot{S}_{12} = \phi_1 - \phi_2 + \phi_3 - \phi_4 \quad (15)$$

donde:

$$\phi_1 = S_{22} \left(\frac{x_1\mu_{max}\left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^\gamma}{\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_i}\right) \quad (16)$$

$$\phi_2 = \left(\frac{x_2 x_1 \mu_{max} \left(\frac{\left(1 - \frac{x_2^2}{K_p}\right)^\gamma}{\frac{2x_2}{K_i + 1}} \right)}{\left(\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_i\right)^2} \right) \quad (17)$$

$$\phi_3 = \left(\frac{S_{12} x_2 \mu_{max} \left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^\gamma}{\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_i} \right) \quad (18)$$

$$\phi_4 = \left(\frac{S_{32} x_1 x_2 \gamma \mu_{max} \left(1 - \frac{x_3}{K_p}\right)^{\gamma-1}}{K_p \left(\frac{x_2^2}{K_i} + x_2 + K_i\right)} \right) \quad (19)$$

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

La figura 1 muestra los resultados del análisis de sensibilidad para el cultivo por lote. En el inciso 'a' se puede observar que el único parámetro que impacta de manera positiva en la generación de biomasa es la velocidad máxima de crecimiento específico (μ_{max}); esto concuerda con el estudio en cultivo continuo de este mismo microorganismo reportado por Calderón y col. (2012). En el inciso 'b' se detectan 3 parámetros con influencia significativa sobre el consumo de sustrato, μ_{max} y m_s tienen un peso negativo sobre el sustrato, mientras que $Y_{x/s}$ lo afecta de manera positiva. En el inciso 'c' se puede apreciar que el parámetro 'sensible' durante la generación de astaxantina es de nueva cuenta μ_{max} , esto positivamente. Cabe señalar que el resto de los parámetros no tuvieron una influencia significativa sobre el sistema.

Los resultados arrojados por el análisis de sensibilidad paramétrica para el sistema por lote alimentado se observan en la figura 2. En el inciso 'a' se aprecia la existencia de 2 parámetros 'sensibles' sobre la generación de biomasa, el de mayor impacto y de manera negativa es la tasa de dilución (D) y el segundo, de forma positiva, es la μ_{max} . En el inciso 'b' se observa que sólo D tiene influencia negativa sobre el consumo de sustrato. En el inciso 'c' se detecta la presencia de dos parámetros con repercusión sobre la generación de astaxantina, el de mayor relevancia y de forma negativa fue la D y posteriormente de carácter positivo la μ_{max} . Por último en el inciso 'd' se observa que sólo el flujo (F) tiene influencia sobre el cambio de volumen (x_4) en el biorreactor, esto de modo positivo. Para todos los casos anteriores, los parámetros restantes no tuvieron un impacto mayor sobre el desarrollo del proceso.

El valor de μ_{max} es inherente y específico para cada microorganismo. Además μ_{max} depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, y de la presencia de inhibidores. En el análisis de sensibilidad paramétrica realizado sobre el modelo por lote se observa que el parámetro con más influencia es la μ_{max} , además es

visto que la presencia de inhibidores, representada por las constantes de inhibición por sustrato y producto (K_i, K_p), no tiene una mayor influencia en el sistema. Lo anterior nos lleva a pensar en el uso de bajas concentraciones de sustrato para un mejor desarrollo del proceso de producción de astaxantina vía *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ramírez y col., 2000).

Del análisis de sensibilidad paramétrica realizado sobre el modelo por lote alimentado se puede dilucidar la influencia de la tasa de dilución no sólo para la formación de biomasa, sino también para el consumo del sustrato y la formación de astaxantina. (Reynders y col., 1997; Ramírez y col., 2006).

VII. CONCLUSIONES

El análisis de sensibilidad paramétrica permitió visualizar los parámetros de mayor influencia en el proceso de producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous* en sistemas en lote y lote alimentado. Del análisis de sensibilidad paramétrica, se pueden escoger ahora aquellas variables físicas que tuvieron más peso para realizar la optimización matemática del cultivo buscando una función objetivo que permita maximizar la producción de un metabolito de interés, a través de una curva óptima de alimentación prediseñada y consecuentemente después el control del bioproceso. La obtención de estos parámetros 'sensibles' genera una nueva perspectiva para la creación de estrategias de control que permitan la obtención de mejores resultados.

VIII. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las becas de posgrado 283294 y 290747. Así como por los apoyos a los proyectos 128894 y 162712.

REFERENCIAS

- An, G.H. (1992). Characterization of yellow mutants isolated from the red yeast *P. rhodozyma*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6, 110–115.
- An, G.H., Schuman, D.B. y Johnson, E.A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 116–124.
- Calderón-Soto, L.F., Lara-Cisneros, G., Herrera-López, E.J. y Femat, R. (2012). Hopf bifurcation in a CSBT with inhibition by substrate and product. *IFAC CHAOS 2012, Junio 20-22, Cancún México* ISBN: 978-3-902823-02-1.
- Domínguez-Bocanegra, A.R. y Torres-Muñoz, J.A. (2004) Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66(3), 249–252.
- Fang, T.J. y Cheng, Y., (1993). Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 75(6), 466–469.
- Florencio, J.A., Soccol, C.R., Furlanetto, T.M.B., Bonfim, N y Fontana, J.D. (1998). A factorial approach for a sugarcane juice-based low cost culture medium increasing the astaxanthin production by the red yeast *Phaffia rhodozyma*. *Bioprocess Engineering* 19, 161–164.
- Flores, A. (2001). Sensibilidad Paramétrica *Universidad Panamericana, Departamento de Ciencias, México D.F.*
- Fredrik, C.M. (2004). Recent developments in the monitoring, modeling and control of biological production systems. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 26, 347–351.

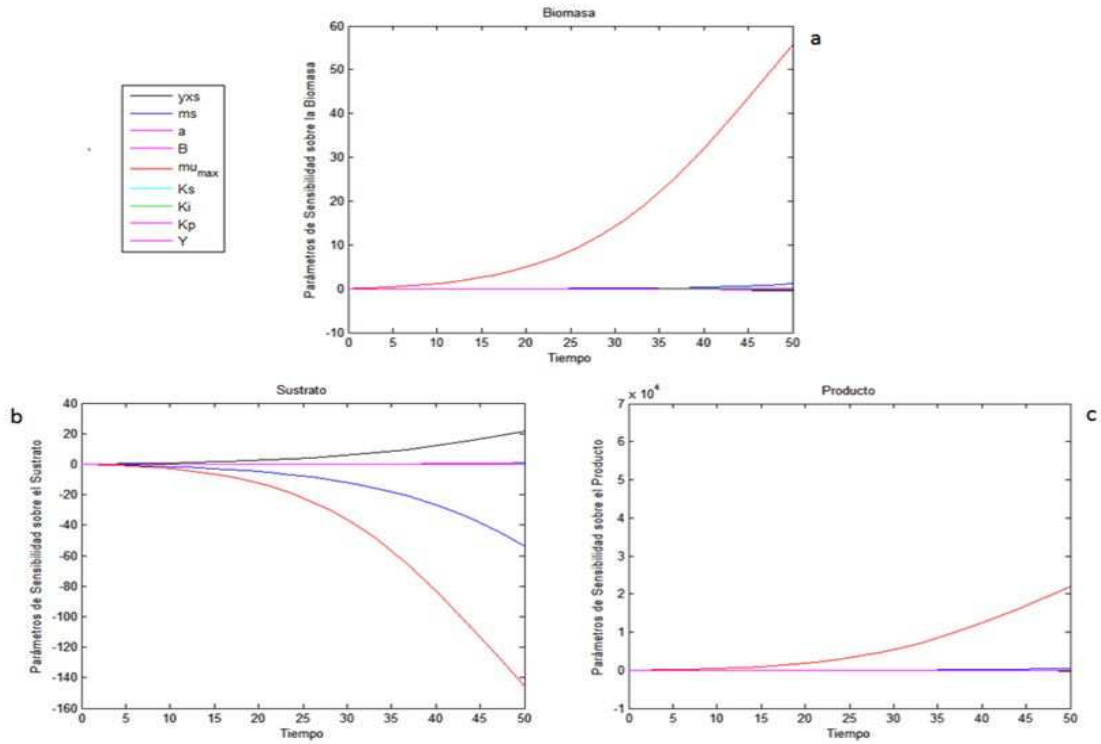


Figura 1: Análisis de sensibilidad paramétrica del modelo por lote

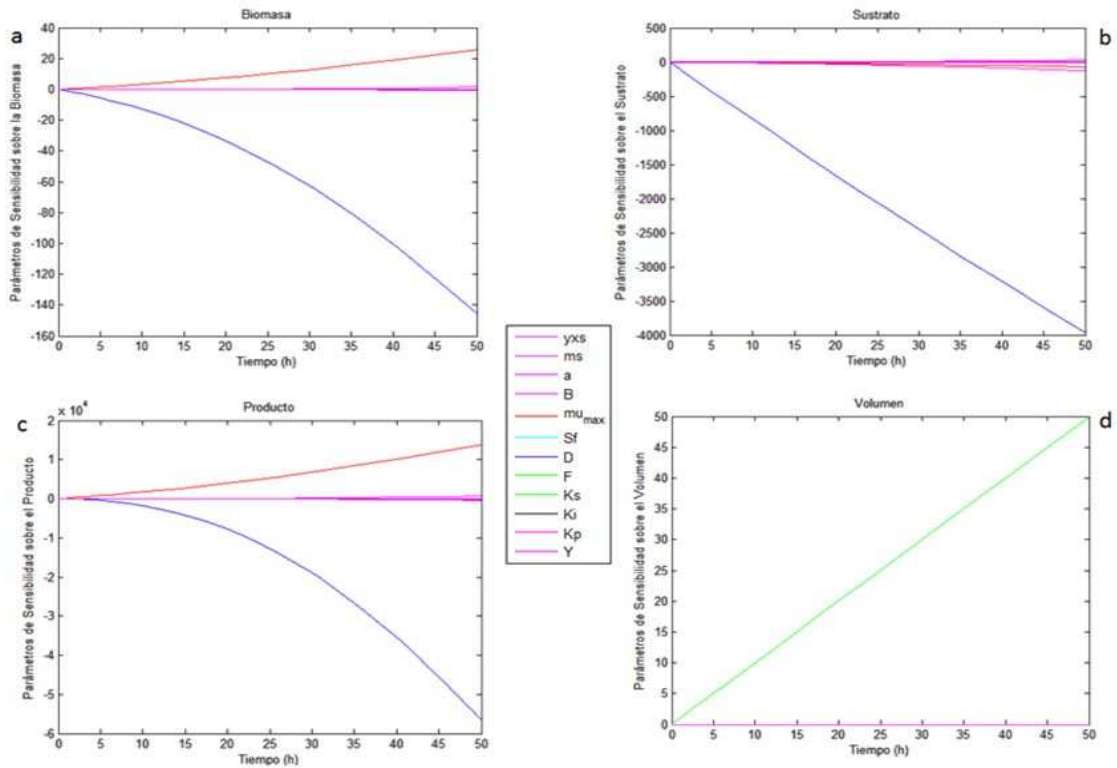


Figura 2: Análisis de sensibilidad paramétrica del modelo por lote alimentado

- Frengova, G.I. y Beshkova, D.M., (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 163–180.
- Johnson, E.A. (2003). *Phaffia rhodozyma* colorful odyssey. *Int. Microbiol.* 6, 169–174.
- Johnson, E.A. y An, G.H. (1991). Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.* 11, 297–326.
- Luedeking R. y Piret E.L. (1959). A kinetic study of lactic acid fermentation batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* 1, 393–412.
- Luna-Flores, C.H., Ramírez-Cordova, J.J., Pelayo-Ortiz, C., Femat, R. y Herrera-López, E.J. (2010). Batch and fed-batch modeling of carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* using *Yucca fillifera* date juice as substrate. *Biochemical Engineering journal* 53, 131–136.
- Meyers, S.P. (1994). Developments in world aquaculture, formulations and the role of carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 66, 1069–1076.
- Moon, P.K., Woo, S.M. y Heung, L.J. (2008). Production of carotenoids by B-Ionone resistant mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* using various carbon sources. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 13, 197–203.
- Nishino, N., Tokuda, H., Satomi, Y., Masuda, M., Bu, P. y Onozuka, M. (1999). Cancer prevention by carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 71, 2273–2278.
- Nishio, N., Tsuchiya, Y., Hayashi, M. y Nagai, S. (1977). A fed-batch culture of methanol-utilizing with pH-stat. *Journal Fermentation Technology* 55(2), 151–155.
- Parajó, J.C., Santos, V. y Vazquez, M. (1998). Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of Eucalyptus globules wood. *Biotechnology and Bioengineering* 59, 501–506.
- Phaff, H.J., Andrewes, A.G. y Starr, M.P. (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. *Photochemistry* 15, 1003–1007.
- Ramírez J., Nuñez, M.L. y Valdivia, R. (2000). Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24, 187–190.
- Ramírez, J., Obledo, N., Arellano, M y Herrera, E. (2006). Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a fed-batch culture using a low cost medium feeding. *e-GNOSIS* 4, 1–9.
- Reynders, M.B., Rawlings, D.E. y Harrison, S.T.L. (1997). Demonstration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. *Biotechnol. Lett.* 19, 549–552.
- Yamane, Y., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T. y Nishio, N. (1997). Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. *Biotechnol. Lett.* 11, 1109–1111.
- Yu, Y., Katsuya, H., Yujitaka, N., Toshihide, K. y Naomichi, N. (1997). Influence of oxygen and glucose on primary metabolism in astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11), 4471–4478.
- Yuan, S.L. y Jian, Y.W. (2008). Modeling of *Xanthophyllomyces dendrorhous* growth on glucose and overflow metabolism in batch and fed-batch cultures for astaxanthin production. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 996–1004.
- Zhang, X.W., Gong, X.D. y Chen, F. (1999). Dynamics and stability analysis of the growth and astaxanthin production system of *Haematococcus pluvialis*. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 133–137.