



**Obtención y caracterización de pigmentos microbianos del género *Monascus spp*,
a partir del ensilaje de maíz, considerando diferentes medios de cultivo para su
aplicación en la industria de fibras vegetales**

Ramirez Oña, Genecys Jazmín

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología

Neira Mosquera, Juan Alejandro PhD.

16 de febrero del 2023



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Obtención y caracterización de pigmentos microbianos del género *Monascus spp*, a partir del ensilaje de maíz, considerando diferentes medios de cultivo para su aplicación en la industria de fibras vegetales", fue realizado por la señorita Ramirez Oña, Genecys Jazmín, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 16 de febrero del 2023

Firma:



Neira Mosquera, Juan Alejandro PhD.
C. C.: 0501644470



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, Ramirez Oña, Genecys Jazmín, con cédula de ciudadanía N°2300463623, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Obtención y caracterización de pigmentos microbianos del género *Monascus spp*, a partir del ensilaje de maíz, considerando diferentes medios de cultivo para su aplicación en la industria de fibras vegetales"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 16 de febrero del 2023

Firma

.....
Ramirez Oña, Genecys Jazmín

C.C.: 2300463623



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo Ramirez Oña, Genecys Jazmín, con cédula de ciudadanía N° 2300463623, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Obtención y caracterización de pigmentos microbianos del género *Monascus spp*, a partir del ensilaje de maíz, considerando diferentes medios de cultivo para su aplicación en la industria de fibras vegetales"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 16 de febrero del 2023

Firma

Ramirez Oña, Genecys Jazmín

C.C.:2300463623

Dedicatoria

Este trabajo de integración curricular se lo dedico con todo mi corazón a mis padres y hermano, Laura Oña, Manuel Ramirez y Daniel Ramirez, quienes a pesar de todo me demostraron su apoyo, fuerza, valor y confianza, enseñándome que la perseverancia es un valor que te hace llegar a alcanzar tus metas.

A Cristopher Cumbal, por su apoyo incondicional, cariño, amor, paciencia y estar siempre en mis altos y bajos, manteniéndome fuerte durante esta etapa de mi vida.

A mi querida amiga Lisbeth Guamán, quien a pesar de los años me ha brindado risas, confianza y lealtad, enseñándome que la amistad es un valor que no cualquiera puede llegar a tener.

A mis mascotas, Papá, Papá de oreo, Polita, Morita y Lulis, por ser y haber sido un gran pilar en mi vida, brindándome grandes momentos de felicidad y responsabilidad, enseñándome que el amor y la lealtad de una mascota puede llenar el corazón y la vida de colores y paz.

Genecys

Agradecimiento

Agradezco a cada uno de los docentes por sus enseñanzas, consejos y valores dentro de esta etapa universitaria para poder llegar a ser una gran profesional.

A los docentes Juan Neira PhD y Sugely Sánchez PhD por su guía, consejos y enseñanzas durante la elaboración de este trabajo de integración curricular.

A los laboratoristas Ing. Katty Medina, Ing. Gissela Ponce e Ing. Jhoan Plua, por su apoyo, motivación y colaboración dentro de los distintos laboratorios donde se desarrolló la parte experimental de este trabajo de integración curricular.

A mis amigos, Boris T, Eduarda R, Washington B, Wendy C, Andrés M, Jonny M, Kassandra H, Elyan S, por su apoyo y agradable amistad dentro y fuera de esta etapa universitaria, les deseo todo lo mejor en la vida.

Genecys

Índice de contenido

| | |
|--|----|
| Caratula | 1 |
| Reporte de verificación de contenido | 2 |
| Certificación | 3 |
| Responsabilidad de autoría..... | 4 |
| Autorización de publicación..... | 5 |
| Dedicatoria..... | 6 |
| Agradecimiento | 7 |
| Índice de tablas..... | 14 |
| Índice de figuras..... | 16 |
| Resumen | 17 |
| Abstract..... | 18 |
| Capítulo I | 19 |
| Introducción | 19 |
| Problema de la investigación..... | 20 |
| Objetivos | 21 |
| Hipótesis | 22 |
| Justificación..... | 23 |
| Capitulo II..... | 24 |
| Revisión Bibliográfica..... | 24 |
| Pigmentos microbianos | 24 |
| <i>Monascus spp</i> | 24 |

| | |
|--|----|
| Categorías y estructuras de los pigmentos producidos por <i>Monascus</i> | 25 |
| <i>Monascus purpureus</i> | 26 |
| Silo de maíz..... | 26 |
| Medios de cultivo..... | 27 |
| Fermentación sólida | 27 |
| Sustratos sólidos | 28 |
| Fibras vegetales | 29 |
| Capitulo III..... | 30 |
| Metodología | 30 |
| Ubicación del área de investigación | 30 |
| Ubicación política..... | 30 |
| Ubicación Ecológica..... | 30 |
| Ubicación geográfica | 30 |
| Materiales | 32 |
| Preparación de la muestra..... | 32 |
| Cultivo y aislamiento del hongo | 32 |
| Identificación morfológica del hongo..... | 33 |
| Identificación molecular del hongo..... | 33 |
| Cultivo del hongo aislado en distintos medios de cultivo | 34 |
| Extracción del pigmento de los medios de cultivo..... | 34 |
| Producción de pigmento microbiano por medio de una fermentación solida..... | 35 |

| | |
|--|----|
| | 10 |
| Extracción del pigmento microbiano producido en la fermentación sólida | 36 |
| Aplicación del pigmento obtenido a fibras vegetales..... | 36 |
| Conservación de la cepa | 37 |
| Métodos..... | 37 |
| Preparación de la muestra..... | 37 |
| Cultivo y aislamiento..... | 37 |
| Identificación morfológica de los aislamientos | 38 |
| Identificación molecular | 38 |
| Secuenciación | 38 |
| Análisis filogenético | 38 |
| Conservación de la cepa de <i>Monascus purpureus</i> | 39 |
| Producción de pigmentos microbianos en medios de cultivo | 39 |
| Preparación de medios de cultivo e inoculación..... | 39 |
| Determinación de la velocidad de crecimiento radial..... | 39 |
| Extracción de pigmentos microbianos en medios de cultivo..... | 40 |
| Producción de pigmentos microbianos en fermentación sólida..... | 40 |
| Preparación del inóculo y cuantificación de esporas | 40 |
| Preparación del sustrato | 41 |
| Elaboración de la fermentación sólida..... | 41 |
| Extracción de pigmentos microbianos de fermentación sólida | 42 |
| Aplicación de pigmentos microbianos a fibras vegetales | 42 |

| | |
|--|----|
| Diseño Experimental..... | 43 |
| Diseño experimental sobre la producción de pigmentos en medios de cultivo..... | 43 |
| Tratamientos del experimento..... | 43 |
| Tipo de diseño para la producción de pigmentos en medios de cultivo..... | 43 |
| Análisis estadístico..... | 43 |
| Análisis funcional..... | 44 |
| Diseño experimental sobre la producción de pigmentos en fermentación sólida..... | 44 |
| Factores del experimento..... | 44 |
| Tratamientos a comparar..... | 45 |
| Tipo de diseño para la producción de pigmentos en fermentación sólida..... | 45 |
| Análisis estadístico..... | 45 |
| Análisis funcional..... | 46 |
| Capitulo IV..... | 47 |
| Resultados..... | 47 |
| Del Aislamiento e identificación de hongos del género <i>Monascus spp</i> presentes en el ensilaje de maíz..... | 47 |
| De la evaluación del efecto del tipo de medio de cultivo en la velocidad de crecimiento radial y la producción de pigmentos por el hongo <i>Monascus spp</i> | 49 |
| Análisis de varianza para la velocidad de crecimiento radial..... | 49 |
| Análisis de varianza para la cuantificación de pigmentos (Absorbancia)..... | 49 |
| Prueba de significancia de Tukey $p < 0,05$ para los tratamientos..... | 50 |

| | |
|---|----|
| De la producción de pigmentos microbianos por el hongo de género <i>Monascus spp</i> , empleando distintos tipos de sustratos por medio de una fermentación sólida. | 55 |
| Análisis de varianza para la cuantificación de pigmentos..... | 55 |
| Prueba de significancia de Tukey $p < 0,05$ para la concentración del inóculo (Factor A) | 55 |
| Prueba de significancia de Tukey $p < 0,05$ para los sustratos (Factor B) | 56 |
| Prueba de Tukey $p < 0,05$ para la interacción concentración del inóculo*sustrato (A*B)..... | 58 |
| De la aplicación de los pigmentos microbianos a fibras vegetales (piña y abacá) | 60 |
| Determinación de color de los pigmentos obtenidos..... | 62 |
| Capítulo V | 66 |
| Discusión | 66 |
| Respecto al aislamiento e identificación de hongos del género <i>Monascus spp</i> presentes en el ensilaje de maíz | 66 |
| Respecto a la velocidad de crecimiento radial..... | 67 |
| Respecto a la producción de pigmentos en medios de cultivo..... | 68 |
| Respecto a la producción de pigmentos en fermentación sólida | 69 |
| Respecto a la concentración del inóculo (Factor A) | 69 |
| Respecto al sustrato (Factor B)..... | 69 |
| Respecto a la Interacción concentración del inóculo*Sustrato (A*B)..... | 70 |
| Respecto a la aplicación de pigmentos microbianos a fibras vegetales (piña y abacá) | 73 |
| Capítulo VI..... | 73 |
| Conclusiones | 73 |
| Recomendaciones | 75 |

| | |
|--------------------|----|
| Capítulo VII | 76 |
| Bibliografía | 76 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados en la preparación de la muestra de ensilaje de maíz..... | 32 |
| Tabla 3 Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para el cultivo y aislamiento del hongo proveniente de la muestra de ensilaje de maíz..... | 32 |
| Tabla 4 Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para la identificación morfológica del hongo aislado | 33 |
| Tabla 5 Materiales e insumos utilizados para la identificación molecular del hongo aislado | 33 |
| Tabla 6 Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para el cultivo de hongo aislado en distintos medios de cultivo | 34 |
| Tabla 7 Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para la extracción del pigmento producido por el hongo en los distintos medios de cultivo..... | 34 |
| Tabla 8 Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para la producción de pigmento microbiano por medio de una fermentación sólida | 35 |
| Tabla 9 Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para la extracción del pigmento microbiano producido en la fermentación sólida..... | 36 |
| Tabla 10 Materiales e insumos utilizados para la aplicación del pigmento obtenido a fibras vegetales | 36 |
| Tabla 11 Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para la conservación de la cepa | 37 |
| Tabla 12 Tratamientos a comparar en la producción de pigmentos en medios de cultivo. | 43 |
| Tabla 13 Esquema de análisis de varianza (ANOVA) DBCA para el estudio del efecto del tipo de medio de cultivo en la velocidad de crecimiento radial y la producción de pigmentos del hongo <i>Monascus purpureus</i> | 44 |
| Tabla 14 Factores y niveles a analizar en la producción de pigmentos microbianos del hongo <i>Monascus pupureus</i> en fermentación sólida. | 44 |

| | |
|---|----|
| Tabla 15 Tratamientos a analizar en la producción de pigmentos microbianos del hongo <i>Monascus purpureus</i> en fermentación sólida. | 45 |
| Tabla 16 Esquema del análisis de varianza (AxB) para el estudio de la producción de pigmentos microbianos del hongo <i>Monascus purpureus</i> en fermentación sólida. | 46 |
| Tabla 17 Análisis de varianza (ANOVA) DBCA para la velocidad de crecimiento radial | 49 |
| Tabla 18 Análisis de varianza (ANOVA) DBCA para la cuantificación de pigmentos | 49 |
| Tabla 19 Resultados del análisis de Tukey $p < 0,05$ para los tratamientos en las variables de estudio | 50 |
| Tabla 20 Análisis de varianza (ANOVA) para la cuantificación de pigmentos | 55 |
| Tabla 21 Resultados del análisis de Tukey $p < 0,05$ para concentración de inóculo (Factor A) .. | 55 |
| Tabla 22 Resultados del análisis de Tukey $p < 0,05$ para sustratos (Factor B) | 56 |
| Tabla 23 Resultados del análisis de la prueba Tukey $p < 0,05$ para la interacción A*B | 58 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 Pigmentos producidos por <i>Monascus spp.</i> | 25 |
| Figura 2 Ubicación geográfica del lugar de experimentación..... | 31 |
| Figura 3 Morfología externa y microscópica del hongo <i>M. purpureus</i> | 47 |
| Figura 4 Árbol filogenético en base de las secuencias del fragmento 18S ARNr de la cepa obtenida..... | 48 |
| Figura 5 Crecimiento radial de <i>M. pupureus</i> ; en 3 medios de cultivo, durante 8 días. | 51 |
| Figura 6 Velocidad de crecimiento radial ($\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$) de <i>M. pupureus</i> sobre 3 medios de cultivo distintos..... | 52 |
| Figura 7 Barridos de exploración de los tres medios de cultivo analizados | 52 |
| Figura 8 Absorbancia de los pigmentos obtenidos en 3 medios de cultivo diferentes..... | 53 |
| Figura 9 Correlación entre la absorbancia y velocidad de crecimiento radial..... | 54 |
| Figura 10 Efecto de la concentración del inóculo (Factor A) en la producción de pigmentos.... | 56 |
| Figura 11 Efecto del sustrato (Factor B) en la producción de pigmentos..... | 57 |
| Figura 12 Efecto de la interacción Concentración del inóculo*Sustrato (A*B)..... | 59 |
| Figura 13 Muestras de fibra de piña y abacá..... | 60 |
| Figura 14 Muestras de fibra de piña y abacá teñidas con pigmento rojo de <i>M. pupureus</i> | 61 |
| Figura 15 Muestras de fibra de piña y abacá teñidas con pigmento amarillo de <i>M. pupureus</i> | 62 |
| Figura 16 Diagrama de CIE 1931 para los pigmentos obtenidos en medios de cultivo..... | 63 |
| Figura 17 Diagrama de CIE 1931 para los pigmentos rojos obtenidos en fermentación sólida..... | 64 |
| Figura 18 Diagrama de CIE 1931 para los pigmentos amarillos obtenidos en fermentación sólida | 65 |

Resumen

Dentro de los últimos años, la producción de pigmentos a través de hongos ha fomentado el desarrollo científico e industrial, existen distintos microorganismos capaces de producir pigmentos, entre ellos, se destacan los hongos del género *Monascus*, los cuales son capaces de producir pigmentos rojos, naranjas y amarillos que se utilizan como colorantes en alimentos y textiles. El objetivo de esta investigación fue obtener y caracterizar pigmentos microbianos del género *Monascus spp*, a partir del ensilaje de maíz, considerando diferentes medios de cultivo para su aplicación en la industria de fibras vegetales, el trabajo fue realizado en los laboratorios de Bromatología y Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo. Se aisló e identificó la especie *Monascus purpureus* del ensilaje de maíz por medio de análisis filogenético, se planteó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) con tres tratamientos y 8 repeticiones, usando la prueba de significancia Tukey ($p < 0,05$) y una correlación de Pearson para evaluar el crecimiento y la capacidad del hongo en producir pigmentos en distintos medios de cultivo y un diseño bifactorial (AxB) con 4 repeticiones para determinar la producción de pigmentos microbianos por el hongo empleando distintos tipos de sustratos (salvado de trigo, salvado de avena y cascarilla de arroz) por medio de una fermentación sólida, se obtuvo como resultados una velocidad de crecimiento radial ($0,082 \text{ mm h}^{-1}$) y mayor producción de pigmentos rojos ($0,396$) en el medio PDA, mientras que en la fermentación sólida, los mejores resultados se obtuvieron a una concentración del inóculo de 3×10^4 con salvado de avena y salvado de trigo para pigmentos rojos y una concentración de $2,3 \times 10^6$ con Salvado de trigo para pigmentos amarillos, se obtuvo una pigmentación clara tanto del color rojo como el amarillo en la fibra de piña y abacá. Se determinó que la absorbancia se comporta en función de la velocidad de crecimiento radial, y que el tipo de sustrato y la concentración del inóculo influye en la producción de pigmentos.

Palabras clave: pigmentos microbianos, *Monascus spp*, sustratos, fibras vegetales.

Abstract

In the last years, the production of pigments through fungi has promoted scientific and industrial development, there are different microorganisms capable of producing pigments, among them, the fungi of the genus *Monascus* stand out, which are capable of producing red, orange and yellow pigments that are used as colorants in food and textiles. The objective of this research was to obtain and characterize microbial pigments of the genus *Monascus spp*, from corn silage, considering different culture media for its application in the vegetable fiber industry, the work was carried out in the laboratories of Bromatology and Microbiology of the University of the Armed Forces ESPE, Santo Domingo. The species *Monascus purpureus* was isolated and identified from corn silage by means of phylogenetic analysis, a Block Design Completely Randomized (DBCA) with three treatments and 8 replicates, using the Tukey significance test ($p < 0, 05$) and a Pearson correlation to evaluate the growth and ability of the fungus to produce pigments in different culture media and a bifactorial design (AxB) with 4 replicates to determine the production of microbial pigments by the fungus using different types of substrates (wheat bran, oat bran and oat hulls), oat bran and rice husk) by means of solid fermentation, the results obtained were a radial growth rate (0.082 mm h^{-1}) and higher production of red pigments (0.396) in the PDA medium, while in the solid fermentation, the best results were obtained at an inoculum concentration of 3×10^4 with oat bran and wheat bran for red pigments and a concentration of 2.3×10^6 with wheat bran for yellow pigments, a clear pigmentation of both red and yellow color was obtained in pineapple and abaca fiber. It was determined that absorbance behaves as a function of radial growth rate, and that the type of substrate and inoculum concentration influences pigment production.

Key words: microbial pigments, *Monascus spp*, substrates, plant fibers.

Capítulo I

Introducción

Desde la antigüedad, el uso de colorantes o pigmentos, tanto de origen natural como químico, ha causado gran relevancia a nivel mundial dentro de varias industrias, especialmente en la alimentaria y textil, sin embargo, hoy en día, se ha evidenciado un gran aumento en la aplicación de colorantes y/o pigmentos naturales, debido a que el uso masivo de colorantes sintéticos ha provocado efectos negativos y nocivos dentro del área de salud y el medio ambiente (Poorniammal et al., 2021).

Los pigmentos naturales se obtienen principalmente de plantas y tejidos de insectos, sin embargo, también se haya la opción de obtenerlos a partir de microorganismos, tales como bacterias, levaduras, algas, actinomicetos y hongos filamentosos, estos últimos, han alcanzado gran interés, ya que partir de estos, existe una nueva generación de tecnologías y nuevos pigmentos, dando paso a ser una alternativa al uso de los colorantes sintéticos (Velázquez et al., 2016).

Uno de los microorganismos más destacados para la producción de pigmentos es el hongo *Monascus spp*, debido a su capacidad de sintetizar varios metabolitos secundarios, tales como el ácido gama-aminobutírico, la monacolina y las azafilonas (Wang et al., 2015). La cantidad y la tonalidad de los pigmentos producidos por este hongo se encuentra afectado por el perfil metabólico de la cepa, junto con los nutrientes del medio, las condiciones de temperatura, pH y humedad y, métodos de cultivo (Carvalho J. et al., 2006)

La presente investigación se fundamentó en la obtención y caracterización de pigmentos microbianos del género *Monascus spp*, considerando distintos medios de cultivos para su producción y aplicación a fibras vegetales, el hongo fue identificado mediante la secuenciación de la sección 18s del ARNr empleando un árbol filogenético, a su vez, se realizó una fermentación utilizando desechos agroindustriales como sustratos para favorecer a la producción de pigmentos y poder aplicarlos a fibras vegetales de piña y abacá.

Problema de la investigación

Planteamiento del problema

A lo largo de la historia, se ha hecho uso de pigmentos extraídos a partir de plantas, animales y minerales, sin embargo, desde una perspectiva industrial, se presentan distintas desventajas al momento de producir este tipo de pigmentos, especialmente en el ámbito económico, puesto que su obtención y procesamiento tienden a poseer un gran costo. Ante lo expuesto, dentro de los últimos años, se ha podido observar una gran extensión del uso de pigmentos químicos, debido a la fácil productividad y el bajo costo del mismo. No obstante, la creciente utilización de dichos pigmentos sintéticos trajo consigo consecuencias, como alteraciones toxicológicas en el producto final, lo cual conllevó al desarrollo de normas regulatorias para el uso de los mismos (Downham & Collins, 2000).

Ante esta problemática, actualmente se ha tendido a desarrollar bioprocesos para la obtención de distintos compuestos de interés industrial, especialmente la producción de pigmentos, con el fin de obtener mayor rendimiento, alcanzar un bajo costo y evitar alguna toxicología, ante ello, se ha implementado el desarrollo de pigmentos naturales a partir de microorganismos como: hongos filamentosos, algunas levaduras y microalgas.

Los pigmentos desarrollados a partir de microorganismos, se caracterizan por su rendimiento al colorear alimentos, fibras de origen natural y telas, reduciendo los efectos toxicológicos que son provocados por pigmentos químicos. Desde esta perspectiva, el uso de microorganismos para la producción de pigmentos conllevaría a la obtención de pigmentos específicos, sin reacciones tóxicas para la salud y, por ende, fomentaría la economía a la producción a nivel industrial.

Los microorganismos producción de pigmentos de mayor importancia, son los hongos pertenecientes al género *Monascus spp*, del cual se puede obtener tonalidades amarillas, anaranjadas y rojas. *Monascus* es reconocido dentro del continente asiático debido al arroz rojo, a partir del cual, se extrae el pigmento rojo para colorear alimentos, sin embargo, se ha

visualizado el uso de estos pigmentos en la industria farmacéutica y textil, como conservadores de carne y pescado (Ayala, 2017).

Formulación del problema

La producción de pigmentos microbianos a partir del género *Monascus spp*, resultan de gran interés industrial, debido a su capacidad de producir distintas tonalidades de pigmentos, que son de gran interés en el desarrollo de la industria de alimentos, farmacéutica y textil; en este sentido, es de gran importancia fomentar la producción de pigmentos de manera microbiológica con el fin de obtener mayor rendimiento de pigmento y mantener un bajo costo de producción mediante el uso de sustratos como residuos agroindustriales.

Objetivos

Objetivo General

Obtener y caracterizar pigmentos microbianos del género *Monascus spp*, a partir del ensilaje de maíz, considerando diferentes medios de cultivo para su aplicación en la industria de fibras vegetales

Objetivos específicos

Aislar e identificar hongos del género *Monascus spp* presentes en el ensilaje de maíz.

Evaluar el efecto del tipo de medio de cultivo en la velocidad de crecimiento radial y la producción de pigmentos por el hongo *Monascus spp*.

Determinar la producción de pigmentos microbianos por el hongo de género *Monascus spp*, empleando distintos tipos de sustratos (salvado de trigo, salvado de avena y cascarilla de arroz) por medio de una fermentación sólida.

Aplicar los pigmentos microbianos a fibras vegetales (Piña y Abacá).

Hipótesis

Ho: El tipo de medio de cultivo no influye en la velocidad de crecimiento radial y en la producción de pigmentos del hongo de género *Monascus spp.*

Ha: El tipo de medio de cultivo influye en la velocidad de crecimiento radial y en la producción de pigmentos del hongo de género *Monascus spp.*

Hipótesis para Factor A (concentración del inóculo)

Ho: La concentración del inóculo no influye en la producción de pigmento del hongo de género *Monascus spp.*

Ha: La concentración del inóculo influye en la producción de pigmento del hongo de género *Monascus spp.*

Hipótesis para Factor B (sustratos)

Ho: El tipo de sustrato aplicado en la fermentación solida no influye en la producción de pigmento del hongo de género *Monascus spp.*

Ha: El tipo de sustrato aplicado en la fermentación solida influye en la producción de pigmento del hongo de género *Monascus spp.*

Justificación

A lo largo del tiempo, se ha investigado la producción de pigmentos de origen natural mediante distintos métodos de aislamiento, sistemas de caracterización y purificación de varios compuestos de este tipo, los cuales, en su mayoría son principalmente obtenidos a partir de plantas y microorganismos (Durán et al., 2002). Los pigmentos microbianos, además de ser de origen natural, presentan distintas ventajas frente a los pigmentos químicos; tales como, mayor estabilidad a la luz, al pH, a la temperatura, entre otras (Wani et al., 2004), sin embargo, hoy en día, los procesos biotecnológicos han logrado ser una mejor alternativa para la obtención de pigmentos, especialmente si es a partir de hongos filamentosos, puesto que dentro de su actividad metabólica generan como metabolitos secundarios a los pigmentos (Carvalho C. et al., 2003), lo cual permite su uso en varias industrias.

Existe distintos géneros de hongos filamentosos que son productores de pigmentos naturales, como los del género *Monascus spp.* (Vishu et al., 2022), *Paecilomyces spp.* (Cho et al., 2002), *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* (Alvarez, 2017).

La producción de colorantes y/o pigmentos por medio de microorganismos presentan mejor estabilidad, mayor rendimiento del producto, fácil procesamiento, independencia de las condiciones climáticas, tecnología de cultivo (Kumar et al., 2015) y menores costos de producción. Entre los metabolitos destacados que producen estos microorganismos como pigmentos son los carotenoides, melaninas, flavinas, quinonas y más específicamente, monascinas, violaceína, ficocianina, azafilonas e índigo (Tuli et al., 2015).

Las investigaciones sobre la producción de pigmentos a partir de fuentes naturales, específicamente a partir de hongos junto con la aplicación de procesos biotecnológicos han demostrado ser una buena alternativa para la obtención y producción a nivel industrial (Méndez et al., 2007).

Capítulo II

Revisión Bibliográfica

Pigmentos microbianos

Se puede definir como pigmentos a las sustancias químicas que distribuyen el color a otros materiales debido a la refracción de la luz del sol (Wani et al., 2004). Durante el siglo XIX, los pigmentos naturales fueron esenciales dentro de diversas industrias, como la alimentaria como aditivos, intensificación de color, etc., en la industria farmacéutica, se aplicaban para colorear de vehículos, coloración de cosméticos, etc., en el área textil, entre otros (Bechtold et al., 2006; Alvarez, 2017);

La producción de pigmentos a partir de hongos filamentosos, han logrado el desarrollo científico e industrial en los últimos años, ya que, a partir de esos microorganismos, se logra abarcar una amplia gama de colores, debido a que contienen diversas estructuras químicas principalmente del tipo carotenoides y/o policétidos (Álvarez et al., 2021).

Existen muchos microorganismos que son productores de pigmentos, sin embargo, los más conocidos son producidos por el género *Monascus*, especialmente *M. purpureus*, que tradicionalmente se cultiva en arroz en Asia Oriental. Las especies de *Monascus* por lo general, producen un color rojo, que se incorporan fácilmente a los alimentos (Musaalbakri et al., 2017).

Monascus spp

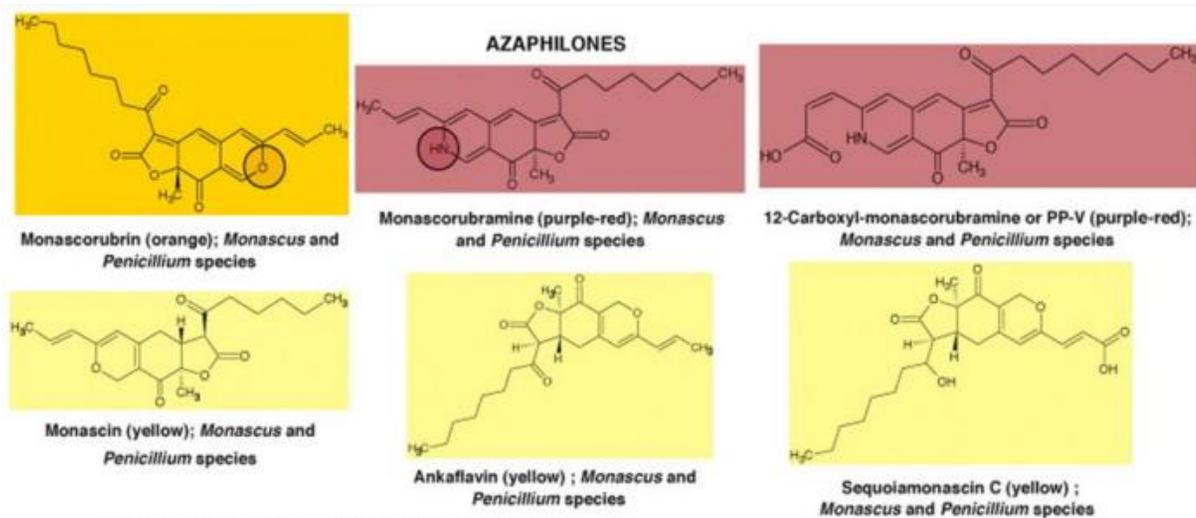
Monascus spp. fue descrito en 1884, se caracteriza por ser un hongo ascomiceto filamento; pertenece a la familia Monascaceae, comúnmente se lo conoce como moho rojo (Vidyalakshmi et al., 2009). El género *Monascus* incluye nueve especies: *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber*, *M. argentinensis*, *M. floridanus*, *M. eremophilus*, *M. lunisporas*, *M. pallens* y *M. sanguineus* (Musaalbakri et al., 2017), de las cuales se destacan *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber* y *M. floridanus* debido a su tradicional en la comida oriental y en la aplicación en la industria textil (Bühler et al., 2013).

Categorías y estructuras de los pigmentos producidos por *Monascus*

Los pigmentos producidos por *Monascus* son a causa de las azafilonas, quienes son un grupo de productos naturales fúngicos (Williams et al., 2021), las cuales producen actividades antitumorales, antifúngicas y antivirales, además, se utilizan como colorantes alimentarios y como colorantes textiles (Gao et al., 2013), dentro del grupo de las azafilonas se encuentran al menos seis pigmentos libres producidos por *Monascus* (Figura 1), dos amarillos, ankaflavina y monascina, dos naranjas, monascorubrina y rubropunctamina y dos rojos, rubropuctamina y monascorubranina (Daud et al., 2020). La obtención de estos colores depende de las condiciones del cultivo, especialmente del pH, las fuentes de carbono, fuentes de fosforo y fuentes de nitrógeno (Velázquez et al., 2016).

Figura 1

Pigmentos producidos por Monascus spp.



Nota. Estructuras químicas de colorantes producidos por *Monascus spp.* Tomado de (Mapari et al., 2010).

Monascus spp. puede crecer en un rango de temperatura de 18 °C hasta los 45 °C, sin embargo, su optima temperatura es entre 25 a 37 °C, en el caso del pH, el rango ideal es entre

4 a 7. Cabe mencionar que, el rendimiento y tono de los pigmentos también es influenciado por el tipo de cepa, perfil metabólico y métodos de cultivo (Carvalho J. et al., 2006).

Monascus purpureus

M. purpureus se caracteriza por tener un micelio blanco en los primeros estados de crecimiento, luego cambia su color a rosado, debido a la producción de pigmentos, posteriormente, tiende a adquirir un color anaranjado amarillento, esto ocurre, debido al aumento de acidez en el medio, finalmente, tiende a obtener un color rojo intenso. Su morfología presenta ascosporas esféricas o ligeramente ovoides, con un diámetro entre 5 a 6 micras y presenta conidios abundantes (Ayala, 2017).

M. purpureus es la especie más común, ya que, a partir de él, se produce el angkak comúnmente conocido como arroz rojo (Pattanagul et al., 2007).

Clasificación taxonómica de Monascus purpureus

| | |
|-----------|------------------|
| Reino | Fungi |
| Subreino | Dikarya |
| Filium | Ascomycota |
| Subfilium | Pezizomycptina |
| Clase | Eurotiomycetes |
| Subclase | Eurotiomycetidae |
| Orden | Euritiales |
| Familia | Monascaceae |
| Género | <i>Monascus</i> |

Nota. Tomado de Velázquez Arellano (2014).

Silo de maíz

El maíz es considerado como el cultivo más empleado para la obtención de forraje en los sistemas de producción bovina mediante su conservación en forma de ensilaje, ya que

presenta mayor rendimiento de biomasa de aproximadamente 35-95 t.ha⁻¹ (Somarribas, 2007), a su vez, tiene un alto contenido de carbohidratos, los cuales favorecen el proceso fermentativo (Castillo et al., 2009).

A pesar de que el silo de maíz es un alimento productivo para los bovinos, puede llegar a tener problemas dentro del proceso de fermentación (Alonso et al., 2013), uno de ellos es la contaminación por bacterias y hongos, lo cual provoca la pérdida de nutrientes y materia seca (Garon et al., 2006). Los géneros y especies de hongos que generalmente contaminan ensilajes de maíz y alfalfa, son: *Penicillium spp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma viride*, *Geotrichum candidum*, *Paecilomyces variotii*, *Monascus ruber* y *Monascus purpureus* (Bočarov-Stančić et al., 2014).

Medios de cultivo

Los medios de cultivo que pueden ser aplicados para el aislamiento de *Monascus spp.*, son: Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Sabouraud, Solución agarosa de Czapek, Agar Batata Dextrosa (BDA), Agar Rosa Bengala con cloranfenicol y Medio Wong modificado (Ayala, 2017).

Los medios de cultivo que pueden ser aplicados para la identificación de especies de *Monascus spp.*, son: Agar autolisado de Levadura Czapek (CYA), Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Glicerol 25 N (G25N), Agar Papa Dextrosa, Agar Harina de Avena (OMA) y, Agar de Harina de Maíz (CMA) (Shao et al., 2011; Stchigel et al., 2004).

Fermentación sólida

La fermentación en estado sólido hace referencia al crecimiento de microorganismos en un sustrato sólido, al cual se le proporciona la humedad suficiente para mantener el crecimiento microbiano y llevar a cabo su metabolismo para la formación de compuestos (Rahardjo et al., 2006). Dentro de la fermentación sólida, los sustratos son un punto muy importante puesto que, son los encargados de suministrar los nutrientes al microorganismo y hacer que las células permanezcan inmóviles en el medio, lo cual, genera un hábitat más adecuado para el

crecimiento de los hongos y que estos aumenten la productividad del metabolito en interés (Pandey et al., 2000).

Dentro de una fermentación en estado sólido, existen factores que afectan el crecimiento y la actividad microbiana, de los cuales se destacan la selección adecuada de un microorganismo y el tipo de sustrato. El sustrato debe pasar por una etapa de pretratamiento, en donde se controla el tamaño de partícula, el contenido de humedad, la actividad de agua, el tipo y tamaño del inóculo antes de comenzar la fermentación (Krishania et al., 2018). Para la producción de pigmentos por medio de una fermentación sólida, se consideran los siguientes parámetros, contenido de humedad, temperatura, pH, tipo de sustrato y la presión parcial de oxígeno (Carvalho J. et al., 2006). En la producción de pigmentos por *Monascus*, la fermentación en estado sólido es un proceso convencional en China, ya que inoculan el microorganismo en charolas con arroz por 20 días controlando la humedad y la temperatura (Dufossé et al., 2005).

Sustratos sólidos

El uso de subproductos agrícolas como sustrato para una fermentación en estado sólido se ha convertido en una alternativa para reducir costos de producción, ya que, a partir de estos, se puede llegar a sintetizar muchos pigmentos con un alto rendimiento (Paillié-Jiménez et al., 2020). Los residuos agroindustriales utilizados para la producción de pigmentos microbianos presentan grandes ventajas en comparación con tintes extraídos de vegetales o animales. Existe gran cantidad de sustratos utilizados para el crecimiento de microorganismos por medio de fermentación sólida, tales como: granos de sorgo, salvado de sorgo, de arroz o de trigo, yuca, casabe, papa en polvo, bagazo de caña de azúcar, el rastrojo de maíz, granos de cereales, salvado de avena, entre otros, los cuales actúan como un soporte físico y como fuente de nutrientes (Babitha et al., 2007; Betini et al., 2009; Sharmila et al., 2013).

Los sustratos sólidos se componen principalmente de almidón y azúcares como monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, los cuales causan diferentes efectos sobre el crecimiento y la producción de metabolitos de *Monascus spp* (Pineda et al., 2016).

Tradicionalmente, *Monascus* es cultivado en arroz, para formar el Ang-Kak o arroz rojo, sin embargo, hoy en día se han aplicado otros sustratos para la producción de pigmentos por este hongo, no obstante, el arroz sigue siendo el sustrato natural en donde se ha observado el mayor rendimiento de pigmentos (Carvalho C. et al., 2003). Sin embargo, existen algunos sustratos han presentado buena producción de pigmentos, como el maíz, el trigo y el bagazo de yuca; en un caso especial, el polvo de la semilla de sandía se ha identificado como un potente sustrato para la producción de pigmentos por *Monascus* (Babitha et al., 2007).

Fibras vegetales

Las fibras naturales se clasifican en tres grupos: fibras vegetales o celulósicas, fibras animales o proteicas y fibras minerales; entre las fibras vegetales están el algodón, lino, yute, piña, coco y abacá, las fibras animales hacen referencia a la lana y la seda, mientras que las fibras minerales son el asbesto. Las fibras vegetales están conformadas por un aproximado de 60 a 90 % de celulosa, haciendo que ese sea su componente principal, adicionalmente poseen cantidades variables de pectina, hemicelulosa, grasa, agua, etc., (Kirk & Othmer, 2001).

Las fibras vegetales se pueden obtener del tallo, hojas, corteza, ramas o tronco de algunas plantas (Martínez de las Marías, 1976). Desde su estructura pueden ser clasificadas como:

Semilla: Cocotera, algodón, ceiba

Tallo: Lino, cáñamo, kenaf, yute, ramio.

Hoja: Formio, sisal o Henequén, abacá, piña

Fruto: Coco.

Raíz: Agave, tequilana.

Capítulo III

Metodología

Ubicación del área de investigación

Ubicación política

| | |
|------------|--------------------------------|
| País: | Ecuador |
| Provincia: | Santo Domingo de los Tsáchilas |
| Cantón: | Santo Domingo |
| Parroquia: | Luz de América |
| Sector: | Km 24 Vía Quevedo |

Ubicación Ecológica

| | |
|--------------------|------------------------|
| Zona de vida: | Bosque húmedo tropical |
| Altitud: | 224 msnm |
| Temperatura media: | 24.6 °C |
| Precipitación: | 2860 mm/año |
| Humedad relativa: | 85% |
| Heliofanía: | 680 horas luz/año |
| Suelos: | Franco arenoso |

Fuente: Estación Agro Meteorológica "Puerto Ila", Vía Quevedo km 34.

Ubicación geográfica

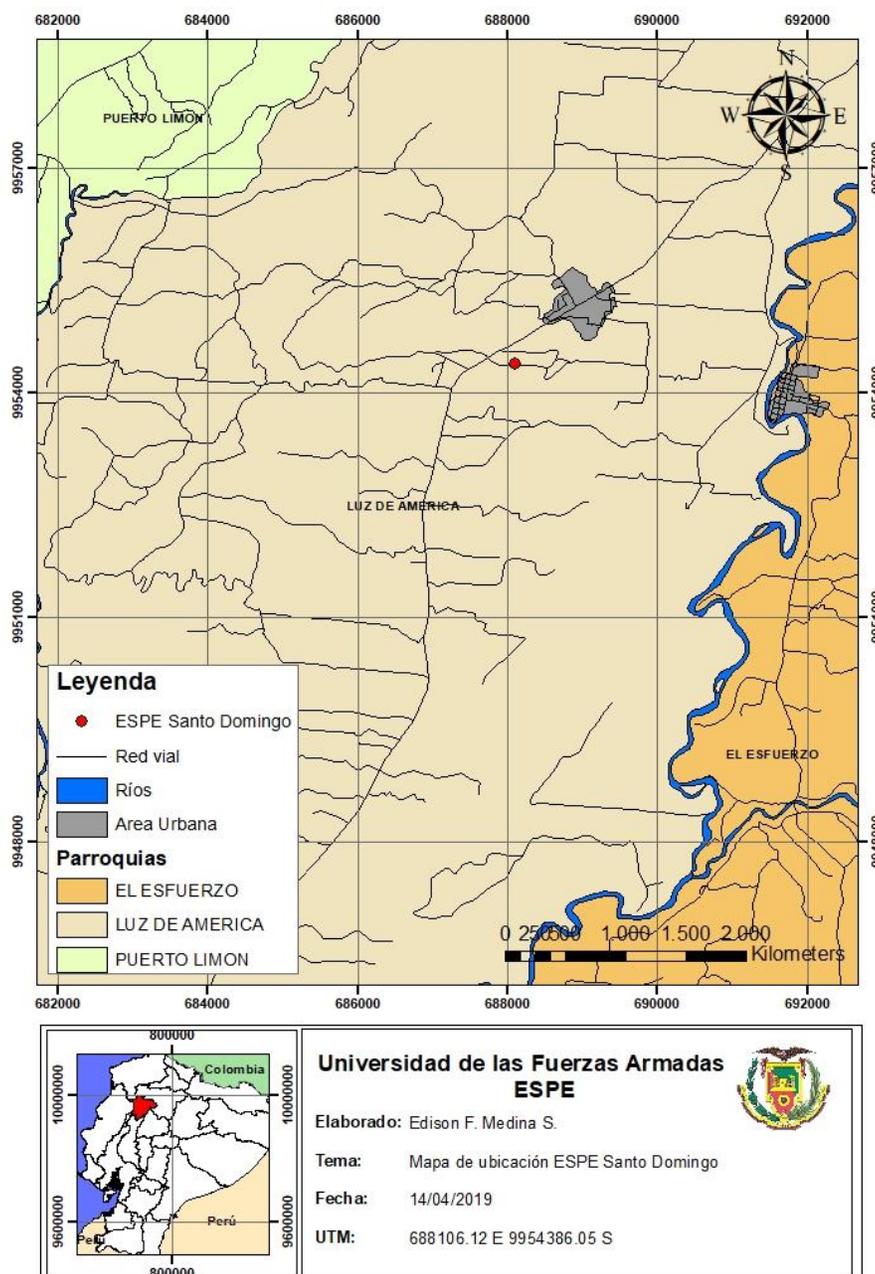
El presente trabajo de investigación se desarrolló en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, específicamente dentro de las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE-Sede Santo Domingo, en los laboratorios de Bromatología y Microbiología, ubicada en el km 24 de la Vía Santo Domingo-Quevedo.

Latitud: 0° 24' 20,74" S

Longitud: 79° 18' 2,23" W

Figura 2

Ubicación geográfica del lugar de experimentación



Nota: Ubicación de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, lugar donde se realizó la parte experimental de la investigación.

Materiales

Preparación de la muestra

Tabla 1

Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados en la preparación de la muestra de ensilaje de maíz

| Equipos | Reactivos | Materiales/Insumos | Muestras |
|-------------------|----------------------|---------------------------|------------------|
| Balanza analítica | Hipoclorito de sodio | Bolsas plásticas | Ensilaje de maíz |
| Autoclave | al 3% | Bisturí | |
| | | Vasos de precipitación de | |
| | | 100 ml | |
| | | Agua destilada estéril | |

Nota. Elaboración propia.

Cultivo y aislamiento del hongo

Tabla 2

Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para el cultivo y aislamiento del hongo proveniente de la muestra de ensilaje de maíz

| Equipos | Reactivos | Materiales/Insumos | Muestras |
|------------------------|----------------------|---------------------------|------------------|
| Balanza analítica | Agar Potato Dextrosa | Frasco con tapa | Ensilaje de maíz |
| Autoclave | Ácido láctico al 85% | Cajas Petri | |
| Cámara de flujo | | Vasos de precipitación | |
| laminar | | 20 y 500 ml | |
| Plancha calentadora | | Probeta de 100 ml | |
| con agitador magnético | | Mecheros | |
| Incubadora | | Pinzas | |
| | | Asa bacteriológica | |

Parafilm

Agua destilada

Nota. Autoría propia.

Identificación morfológica del hongo

Tabla 3

Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para la identificación morfológica del hongo aislado

| Equipos | Reactivos | Materiales/Insumos | Muestras |
|--------------------|---------------------|---------------------------|-----------------|
| Microscopio | Azul de metileno | Porta objetos | Hongo aislado |
| Estereomicroscopio | Azul de lactofenol | Cinta adhesiva | |
| | Aceite de inmersión | Goteros | |
| | | Marcador | |

Nota. Elaboración propia.

Identificación molecular del hongo

Tabla 4

Materiales e insumos utilizados para la identificación molecular del hongo aislado

| Materiales/Insumos | Muestras |
|---------------------------|----------------------------|
| Computador | Hongo aislado y purificado |
| Programa Mega X | |
| Cooler | |
| Plástico burbuja | |
| Cinta adhesiva | |

Nota. Elaboración propia.

Cultivo del hongo aislado en distintos medios de cultivo

Tabla 5

Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para el cultivo de hongo aislado en distintos medios de cultivo

| Equipos | Reactivos | Materiales/Insumos | Muestras |
|-------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------|
| Balanza analítica | Agar Potato Dextrosa | Agua destilada | Cáscara de |
| Autoclave | (PDA) | Cajas Petri | mandarina |
| Cámara de flujo laminar | Ácido láctico al 85% | Frascos con tapa | Cáscara de |
| Plancha calentadora | | Vasos de precipitación | naranja |
| con agitador magnético | | 20, 150 y 500 ml | |
| Incubadora | | Probeta de 100 ml | |
| | | Mecheros | |
| | | Bisturí | |
| | | Parafilm | |
| | | Fundas ziploc | |

Nota. Elaboración propia.

Extracción del pigmento de los medios de cultivo

Tabla 6

Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para la extracción del pigmento producido por el hongo en los distintos medios de cultivo

| Equipos | Reactivos | Materiales/Insumos | Muestras |
|-------------------|------------------|---------------------------|-----------------|
| Agitador orbital | Etanol al 95% | Matraz Erlenmeyer | Cepa del hongo |
| Centrifuga | | de 100 ml | |
| Espectrofotómetro | | Tubos para | |
| Refrigeradora | | centrifuga | |

 Pipeta

Pera de pipeta

Bisturí

Parafilm

 Nota. Elaboración propia.

Producción de pigmento microbiano por medio de una fermentación sólida

Tabla 7

Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para la producción de pigmento microbiano por medio de una fermentación sólida

| Equipos | Reactivos | Materiales/Insumos | Muestras |
|-------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Autoclave | Tween 20 | Micropipeta de 1000 µl | Cepa del hongo |
| Cámara de flujo laminar | KH ₂ PO ₄ | Tubos de tapa rosca | Cascarilla de arroz |
| Cámara de Neubauer | NaNO ₃ | Gradilla | Salvado de trigo |
| Microscopio | NaCl | Agua destilada estéril | Salvado de avena |
| Vortex | MgSO ₄ | Papel aluminio | |
| Refrigerador | HCL 0.1 M | Fundas ziploc | |
| Estufa | NaOH 0.1 M | Matraz Erlenmeyer de 100 ml | |
| Licuada | Suspensión de esporas (inóculo) | Pipeta de 10 ml | |
| Mortero | | Pera de pipeta | |
| Potenciómetro | | Agua destilada | |
| | | Papel aluminio | |
| | | Parafilm | |

 Nota. Elaboración propia.

Extracción del pigmento microbiano producido en la fermentación sólida

Tabla 8

Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para la extracción del pigmento microbiano producido en la fermentación sólida

| Equipos | Reactivos | Materiales/Insumos | Muestras |
|-------------------|------------------|---------------------------|-----------------------|
| Agitador orbital | Etanol al 70% | Tubos para centrifuga | Muestra fermentada de |
| Centrifuga | | Pipeta de 10 ml | cascarilla de arroz |
| Espectrofotómetro | | Gradilla | Muestra fermentada de |
| Refrigerador | | Tubos con tapa | salvado de trigo |
| | | | Muestra fermentada de |
| | | | salvado de avena |

Nota. Elaboración propia.

Aplicación del pigmento obtenido a fibras vegetales

Tabla 9

Materiales e insumos utilizados para la aplicación del pigmento obtenido a fibras vegetales

| Materiales/Insumos | Muestras |
|---------------------------------|-----------------|
| Goteros | Fibra de piña |
| Vidrio de reloj | Fibra de abacá |
| Vasos de precipitación de 20 ml | |

Nota. Elaboración propia.

Conservación de la cepa

Tabla 10

Equipos, reactivos, materiales e insumos utilizados para la conservación de la cepa

| Equipos | Reactivos | Materiales/Insumos | Muestras |
|-------------------------|------------------|---------------------------------|-----------------|
| Cámara de flujo laminar | Glicerol | Tubos esplendor | Cepa del hongo |
| Autoclave | | Vaso de precipitación de 250 ml | |
| Refrigerador | | Micropipeta de 1000 μ l | |
| | | Mecheros | |
| | | Asa bacteriológica | |
| | | Agua destilada estéril | |

Nota. Elaboración propia.

Métodos

Preparación de la muestra

Se tomó un total de 2 kg de ensilaje de maíz y se colocó dentro de una bolsa plástica para su traslado al laboratorio. Dentro del laboratorio, se expandió la muestra sobre una superficie plana, se tomó 20 g del ensilaje de cinco puntos al azar y se homogenizó hasta alcanza un total de 100 g de muestra, de la cual se extrajo 3 submuestras de 10 g respectivamente. Se redujo el tamaño de la muestra realizando cortes de aproximadamente 5 mm a cada submuestra, se desinfecto cada submuestra con una solución de hipoclorito de sodio al 3%, se enjuago tres veces con agua destilada estéril y se dejó secar cada submuestra a temperatura ambiente (Velázquez et al., 2019).

Cultivo y aislamiento

Se realizó una siembra directa con el medio de cultivo Agar Potato Dextrosa (PDA) acidificado con ácido láctico al 85% (200 μ L de ácido láctico al 85% por cada litro), con una pinza estéril se tomó una parte de la submuestra seca y se colocó dentro de cada caja Petri

con el medio de cultivo, ocupando todos los alrededores de la caja, se incubaron a una temperatura de 30°C por un lapso de 7 días.

Luego del tiempo de incubación se observó un crecimiento micelial de varios hongos en las muestras; se realizó la purificación para cada hongo en medio PDA acidificado con ácido láctico al 85%, se incubó a 30°C por 7 días.

Identificación morfológica de los aislamientos

Para la identificación de estructuras como hifas y conidios de las distintas cepas aisladas se tomó como referencia las claves taxonómicas de Barnett & Hunter (1998), con el fin de confirmar la existencia del hongo del género *Monascus spp.*

Se realizó una tinción colocando una gota de azul de metileno sobre el portaobjeto, se tomó un fragmento de cinta adhesiva y se colocó suavemente sobre la colonia para tomar una porción del micelio expuesto, se pegó la cinta cargada con el micelio sobre la gota de colorante en el portaobjetos presionando suavemente para que se adhiriera el color y evitar la formación de burbujas; se realizó el mismo procedimiento con el colorante de azul de lactofenol. Posteriormente se observó en el microscopio a 10x, 40x y 100x.

Identificación molecular

Secuenciación

Para secuenciación de las cepas identificadas morfológicamente como *Monascus spp.*, se enviaron placas Petri con el microorganismo aislado y purificado al pasar 7 días de incubación a la empresa MacroGen Inc. de Corea del Sur, la cual se encargó de extraer el determinado ADN amplificando la sección 18s con una PCR. Las secuencias de las cepas obtenidas se analizaron utilizando la herramienta en línea BLAST.

Análisis filogenético

Para la elaboración del árbol filogenético se realizó una búsqueda en la base de datos GenBank, se tomó 5 secuencias del ARNr 18S de hongos cercanos a la secuencia obtenida y una secuencia de grupo externo, se utilizó el software MEGA X aplicando el algoritmo de

MUSCLE para el alineamiento de las secuencias, se aplicó el método de Neighbor-Joining con el modelo Taruma-Nei con 1000 réplicas de Bootstrap.

Conservación de la cepa de *Monascus purpureus*

Se esterilizó agua destilada en autoclave a 120°C durante 15 min, este proceso se realizó 3 veces, se tomó un vial de 10 ml y se añadieron 3 ml de glicerol junto con 7 ml del agua destilada estéril, la solución realizada se esterilizó a 120°C durante 15 min, se realizaron cortes cuadrados de 5 mm de la cepa de la caja Petri y se colocó un bloque dentro de tubos eppendorf estériles de 1,5 ml que contenían 1 ml de la solución de glicerol estéril al 10%. Los tubos se etiquetaron y fueron almacenados a una temperatura de 5°C (López et al., 2000).

Producción de pigmentos microbianos en medios de cultivo

Preparación de medios de cultivo e inoculación

Se tomó dos vasos de precipitación con un litro de agua destilada, en uno se añadió 100 g de cáscara de naranja y en el otro 100 g de cáscara de mandarina, las cáscaras fueron previamente lavadas y desinfectadas, cada preparación se llevó a hervir en una plancha calentadora por 30 minutos, se tamizó y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 39 g de PDA en cada solución. Para el último medio de cultivo, se siguió de la forma tradicional, se colocó un litro de agua destilada en un vaso de precipitación y se disolvió 39 g de PDA. Cada medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos (Coello et al., 2017).

Se inoculó las cajas de Petri con un disco de agar de 5 mm de diámetro de la cepa en el centro, se etiquetó e incubó cada caja a 30°C por un período de 8 días.

Determinación de la velocidad de crecimiento radial

Para el crecimiento radial de la cepa en los medios de cultivo, se utilizó una cinta métrica con la cual se evaluó diariamente el crecimiento, para ello, se marcó cada caja Petri con cuatro ejes, formando un plano cartesiano. Se realizó la medición del crecimiento radial de cada cepa desde el centro hacia los extremos de la placa (Velázquez Arellano, 2014).

Para el cálculo de la velocidad de crecimiento radial, se realizó una relación entre el crecimiento y el tiempo de medición, con el fin de obtener una línea en donde la pendiente corresponde a la velocidad de crecimiento (Méndez et al., 2007).

Extracción de pigmentos microbianos en medios de cultivo

La extracción de pigmentos microbianos de cultivos sólidos se realizó de acuerdo a la metodología expuesta por Shin et al. (1998). Al terminar el periodo de incubación, se tomaron cinco trozos de placas cultivadas con *Monascus purpureus*, los cuales se colocaron dentro de matraces Erlenmeyer de 100ml, luego se adicionaron 3 ml de etanol al 95%. Posteriormente, los matraces se colocaron en agitación durante 1 hora en un agitador orbital a 180 rpm.

Al terminar el tiempo de agitación, se colocó el líquido pigmentado presente en los matraces en tubos de ensayo, se llevó a centrifugar las muestras a 8000 rpm durante 20 minutos en una centrifuga, el sobrenadante se transfirió a frascos de 10 mL por decantación. Se realizó la cuantificación del pigmento con ayuda de un espectrofotómetro, en donde se midió la absorbancia en un rango de 350 – 800 nm (Méndez et al., 2007).

Producción de pigmentos microbianos en fermentación sólida

Preparación del inóculo y cuantificación de esporas

La preparación del inóculo y cuantificación de esporas, se realizó en base a la metodología empleada por Vélez et al. (1997). Se preparó una solución de Tween al 0.1%, la cual se esterilizó en autoclave a 15 psi y a una temperatura de 121°C durante 20 minutos. Preparar una suspensión de esporas, se colocó 9 ml de la solución de Tween al 0.1% con un disco de agar de 5 mm de la cepa de *Monascus purpureus* en un tubo con tapa, se agitó por 45 segundos para que se separen las esporas. Posteriormente, se preparó diluciones seriadas a partir de la solución madre hasta obtener la apropiada para poder hacer el conteo de las esporas. La cuantificación de esporas se realizó en la cámara de Neubauer, con el fin de obtener dos concentraciones de esporas: 3×10^4 esporas por mililitro y $2,3 \times 10^6$ esporas por mililitro.

La concentración de esporas se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$C = N * 1x10^n * 1x10^4$$

Donde:

C = concentración de esporas

N = promedio de esporas por cuadrante

$1x10^n$ = Factor de difusión empleado

$1x10^4$ = Factor de conversión volumétrico de la cámara

Preparación del sustrato

Se seleccionaron 3 sustratos, cascarilla de arroz, salvado de trigo y salvado de avena, debido a su potencialidad para la producción de pigmentos bajo una fermentación sólida (El-Sayed et al., 2022). La cascarilla de arroz se colocó dentro de una estufa a una temperatura de 80°C por 24 horas, para los demás sustratos este proceso no fue necesario; cada muestra se trituró en un mortero y tamizo hasta llegar a un tamaño de partícula en un promedio de 0,3 a 0,5 mm. Se guardó y almacenó cada muestra en fundas ziploc estériles.

Elaboración de la fermentación sólida

Para la producción de pigmentos usando una fermentación sólida, se aplicó la metodología expuesta por Velázquez Arellano (2014), con algunas modificaciones. Se colocó 10 g del sustrato en un matraz Erlenmeyer de 100 ml, se ajustó la humedad inicial del sustrato a un 50% con agua destilada, se adicionó 2 ml de solución de sales minerales, la cual contuvo 2.0 g/L de KH_2PO_4 (Dihidro fosfato mono potásico), 5.0 g/L de NaNO_3 (Nitrato de sodio), 1.0 g/L de NaCl (Cloruro de sodio), 1.0 g/L de MgSO_4 (Sulfato de magnesio); con un pH de 5, el cual fue ajustado con HCL 0.1 M y NaOH 0.1 M., las muestras se esterilizaron en autoclave a 15 psi y a una temperatura de 121°C durante 15 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inoculó cada matraz con 1 ml de la suspensión de esporas previamente preparada. Los matraces se incubaron en oscuridad durante 14 días a 30 °C.

Extracción de pigmentos microbianos de fermentación sólida

Se realizó la extracción de los pigmentos de acuerdo a la metodología reportada por Babitha et al. (2007), con algunas modificaciones. Al finalizar el periodo de fermentación, se colocó 1 ml de etanol al 70% por cada gramo del sustrato fermentado en el matraz, posteriormente, los matraces fueron puestos en agitación por una 1 h a 200 rpm en un agitador orbital, transcurrido el tiempo de agitación, se traspasó el líquido pigmentado a tubos de ensayo, las muestras se llevaron a centrifugar a 8000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró con ayuda de papel filtro en vasos de precipitación de 20 ml. La cuantificación del pigmento producido se realizó mediante un espectrofotómetro, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 390 nm para pigmentos amarillos y 495 nm para pigmentos rojos. Los pigmentos obtenidos fueron refrigerados y almacenados en frascos de vidrio con tapa a una temperatura de 17°C.

Se realizó la determinación del color empleando el programa Origin a partir del diagrama de cromaticidad CIE1931.

Aplicación de pigmentos microbianos a fibras vegetales

Para la aplicación de los pigmentos microbianos obtenidos, se utilizó fibra de piña y fibra de abac; se colocó una porción de la fibra en un vaso de precipitación de 20 ml, se adicionaron 5 ml del pigmento obtenido y se dejó en reposo por 30 minutos. Transcurrido los 30 minutos, se tomó la fibra pigmentada, se colocó sobre vidrios de reloj y se dejó secar a temperatura ambiente.

Diseño Experimental

Diseño experimental sobre la producción de pigmentos en medios de cultivo

Tratamientos del experimento

Tabla 11

Tratamientos a comparar en la producción de pigmentos en medios de cultivo.

| Tratamientos | Combinaciones |
|-----------------|---|
| PDA | PDA + <i>Monascus purpureus</i> |
| PDA + Naranja | PDA + Naranja + <i>Monascus purpureus</i> |
| PDA + Mandarina | PDA + Mandarina + <i>Monascus purpureus</i> |

Nota. Se especifica como tratamientos a los distintos medios de cultivo.

Tipo de diseño para la producción de pigmentos en medios de cultivo

Para la evaluación del efecto del medio de cultivo en la producción de pigmentos en medios sólidos del hongo *Monascus purpureus*., se aplicó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) con 3 tratamientos, el factor de tratamiento fue el tipo de medio de cultivo (PDA, PDA+Naranja y PDA+Mandarina), se aplicaron 8 repeticiones, dando un total de 24 unidades experimentales. La temperatura y el tiempo de incubación se mantuvieron constantes a 30°C por 8 días. Las variables fueron la velocidad de crecimiento radial y cuantificación de pigmentos en medida de la absorbancia.

Análisis estadístico

Modelo matemático

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}; \begin{cases} i = 1, 2, \dots, k \\ j = 1, 2, \dots, b \end{cases}$$

Donde:

Y_{ij} = observación del i-esimo tratamiento del j-esimo replica

μ = promedio global de los tratamientos

T_i = efecto del i-esimo de los medios de cultivo

B_j = efecto del j-esimo de la replica

E_{ij} = error aleatorio

Tabla 12

*Esquema de análisis de varianza (ANOVA) DBCA para el estudio del efecto del tipo de medio de cultivo en la velocidad de crecimiento radial y la producción de pigmentos del hongo *Monascus purpureus*.*

| Fuente de variación | | Grados de libertad |
|---------------------|-------------|--------------------|
| Tratamientos | (k-1) | 2 |
| Réplica | (b-1) | 7 |
| Error | (k-1) (b-1) | 14 |
| Total | (kr)-1 | 23 |

Nota. Se especifica los grados de libertad del diseño experimental.

Análisis funcional

Se aplicó una prueba de significancia de Tukey al 5% ($p < 0,05$) a cada una de las variables que presentaron diferencias significativas en el análisis de varianza.

Diseño experimental sobre la producción de pigmentos en fermentación sólida

Factores del experimento

Tabla 13

*Factores y niveles a analizar en la producción de pigmentos microbianos del hongo *Monascus purpureus* en fermentación sólida.*

| Factores | Simbología | Niveles |
|-------------------------------|------------|---------------------|
| | a0 | 3×10^4 |
| Concentración del inóculo (A) | a1 | $2,3 \times 10^6$ |
| | b0 | Cascarilla de arroz |

| | | |
|--------------|----|------------------|
| Sustrato (B) | b1 | Salvado de trigo |
| | b2 | Salvado de avena |

Nota. Se especifica las concentraciones del inóculo aplicadas y los distintos sustratos.

Tratamientos a comparar

Tabla 14

Tratamientos a analizar en la producción de pigmentos microbianos del hongo Monascus pupureus en fermentación sólida.

| N° | Tratamientos | Combinación |
|----|--------------|---|
| 1 | a0b0 | Concentración 3×10^4 + cascarilla de arroz |
| 2 | a0b1 | Concentración 3×10^4 + salvado de trigo |
| 3 | a0b2 | Concentración 3×10^4 + salvado de avena |
| 4 | a1b0 | Concentración $2,3 \times 10^6$ + cascarilla de arroz |
| 5 | a1b1 | Concentración $2,3 \times 10^6$ + salvado de trigo |
| 6 | a1b2 | Concentración $2,3 \times 10^6$ + salvado de avena |

Nota. Interacciones formadas en el diseño experimental.

Tipo de diseño para la producción de pigmentos en fermentación sólida

Se aplicó un ANOVA con arreglo factorial AxB (2x3), donde el factor A corresponde a la concentración del inóculo que se aplicó para producir el pigmento y el factor B hace referencia al sustrato aplicado para la fermentación sólida; con un total de 6 tratamientos.

Dentro de este diseño experimental se trabajó con 4 repeticiones por tratamiento, dando un total de 36 unidades experimentales.

Análisis estadístico

Modelo matemático

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + R_k + E_{ijk}$$

Donde:

μ = efecto global

A_i = efecto i-esimo nivel A; 1...2

B_j = efecto j-esimo nivel B; 1...3

$(AB)_{ij}$ = efecto de interacción i-j

R_k = efecto de la repetición

E_{ijk} = error experimental

Tabla 15

Esquema del análisis de varianza (AxB) para el estudio de la producción de pigmentos microbianos del hongo Monascus purpureus en fermentación sólida.

| Fuente de variación | | Grados de libertad |
|--------------------------------------|-------------|---------------------------|
| Concentración del inóculo | a-1 | 1 |
| Sustrato | b-1 | 2 |
| Concentración del inóculo + sustrato | (a-1) (b-1) | 2 |
| Réplicas | r-1 | 3 |
| Error experimental | | 15 |
| Total | | 23 |

Se especifica los grados de libertad del diseño experimental.

Análisis funcional

Se aplicó una prueba de significancia de Tukey al 5% ($p < 0,05$) a cada una de las variables que presentaron diferencias significativas en el análisis de varianza.

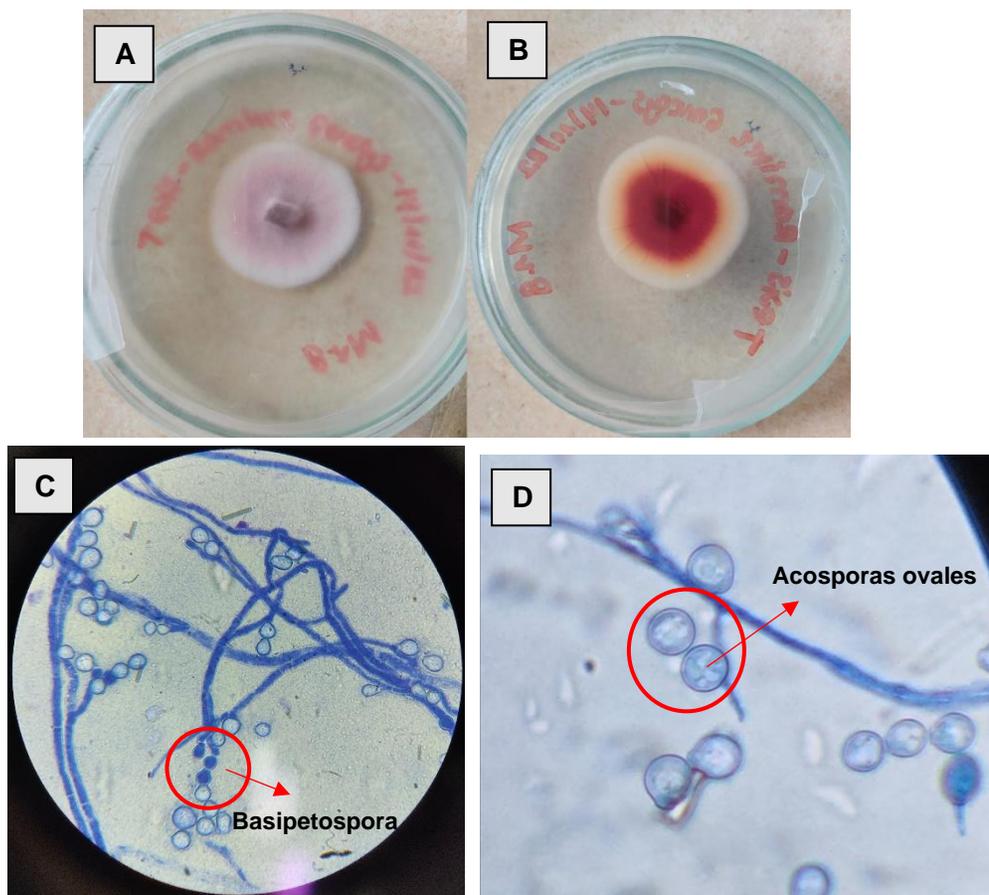
Capítulo IV

Resultados

Del Aislamiento e identificación de hongos del género *Monascus spp* presentes en el ensilaje de maíz

Figura 3

Morfología externa y microscópica del hongo *M. purpureus*.



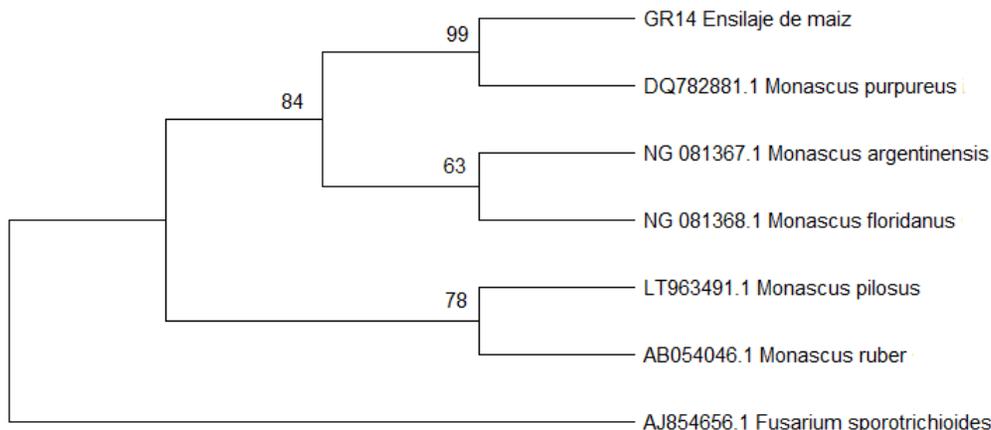
Nota. Características morfológicas y microscopias de la cepa aislada.

La cepa fúngica obtenida, se aisló del ensilaje de maíz, la Figura 3 muestra las características morfológicas de crecimiento de la cepa en placas de Agar PDA, después de 4 días de crecimiento a 30°C. En la vista frontal se observó un micelio con pigmentación rosada (Figura 3 A) mientras que en la parte inversa de la placa se observa una degradación de color de rojo a amarillo de la colonia en crecimiento Figura 3 B). Además, se observó características

microscópicas del aislado de *M. purpureus* con dos tipos de reproducción: la forma asexual con cadenas de conidios sexuales, llamados basipetosporas (Figura 3 C) y la forma sexual con ascocarpos de paredes finas que contienen ascosporas ovales (Figura 3 D).

Figura 4

Árbol filogenético en base de las secuencias del fragmento 18S ARNr de la cepa obtenida



Nota. Árbol filogenético del hongo aislado del ensilaje de maíz, con *Fusarium sporotrichioides* como grupo externo.

En la Figura 4 se observan los resultados de cada una de las comparaciones junto con el análisis de las secuencias de 18 ARNr de 5 cepas con mayor relación a la secuencia de la cepa obtenida y un grupo externo, formando un árbol filogenético en el cual, se formó un clado en el que consta el hongo *Monascus purpureus*, con una similitud del >99% con la cepa aislada. Asimismo, se puede observar que *Monascus ruber* y *Monascus pilosus* presenta una similitud del >84% con la cepa aislada y *Monascus pupureus*.

De la evaluación del efecto del tipo de medio de cultivo en la velocidad de crecimiento radial y la producción de pigmentos por el hongo *Monascus spp.*

Análisis de varianza para la velocidad de crecimiento radial

Tabla 16

Análisis de varianza (ANOVA) DBCA para la velocidad de crecimiento radial

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Medios de cultivo | 230,189 | 2 | 115,094 | 305947,14 | 0,0000 |
| B: Réplicas | 0,00338333 | 7 | 0,000483333 | 1,28 | 0,3257 |
| RESIDUOS | 0,00526667 | 14 | 0,00037619 | | |
| TOTAL | 230,197 | 23 | | | |

Nota. Se considera un $p < 0,05$.

La tabla 17 muestra que el tipo de medio de cultivo influye sobre la velocidad de crecimiento radial total del hongo *M. purpureus*, ya que, se observa diferencia significativa, mientras que en las réplicas no existe diferencia significativa, lo cual indica que existe homogeneidad en la toma de datos.

Análisis de varianza para la cuantificación de pigmentos (Absorbancia)

Tabla 17

Análisis de varianza (ANOVA) DBCA para la cuantificación de pigmentos

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Medios de cultivo | 0,127192 | 2 | 0,0635962 | 11562,94 | 0,0000 |
| B: Réplicas | 0,000068 | 7 | 0,00000971429 | 1,77 | 0,1728 |
| RESIDUOS | 0,000077 | 14 | 0,0000055 | | |
| TOTAL | 0,127337 | 23 | | | |

Nota. Se considera un $p < 0,05$.

La tabla 18 muestra que el tipo de medio de cultivo influye sobre la producción de pigmentos por el hongo *M. purpureus*, ya que, se observa diferencia significativa, mientras que en las réplicas no existe diferencia significativa, lo cual indica que existe normalidad en la toma de datos.

Prueba de significancia de Tukey $p < 0,05$ para los tratamientos

Tabla 18

Resultados del análisis de Tukey $p < 0,05$ para los tratamientos en las variables de estudio

| Tratamientos (Medios de cultivo) | Velocidad crecimiento radial (mm/h) | Cuantificación de pigmento (Absorbancia) |
|---|--|---|
| PDA | 0,082 ^C | 0,396 ^C |
| PDA+Naranja | 0,042 ^A | 0,226 ^A |
| PDA+Mandarina | 0,060 ^B | 0,262 ^B |

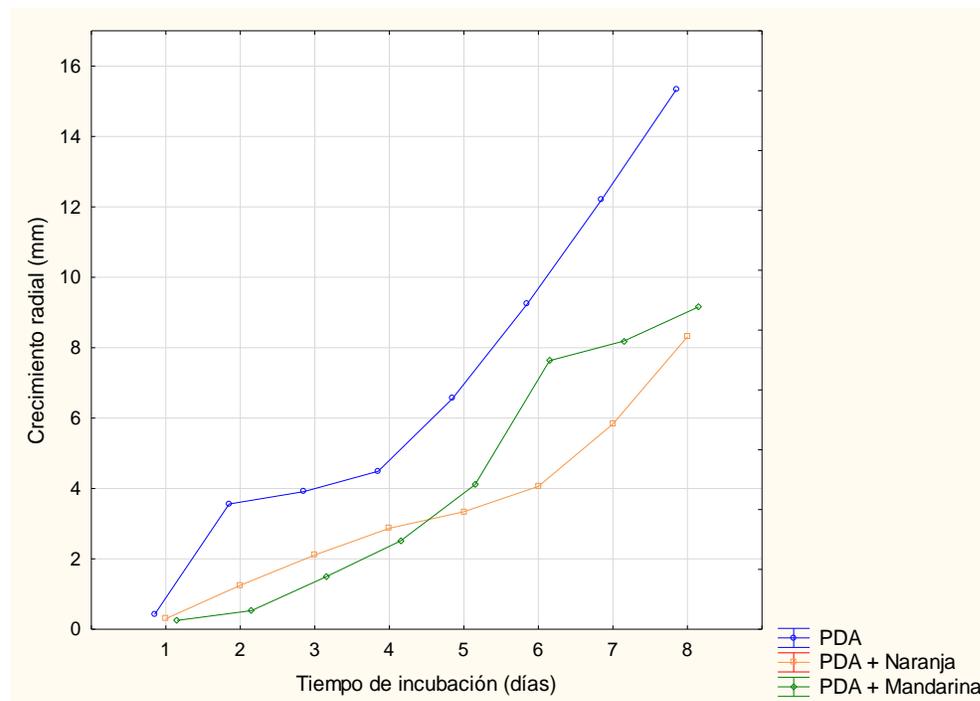
Nota. Las letras A-C indican la presencia de grupos homogéneos o independientes entre los tratamientos.

La tabla 19, indica que con respecto a la velocidad de crecimiento radial se generaron 3 grupos independientes de la siguiente manera: en el grupo A (PDA+Naranja: 0,082), grupo B (PDA+Mandarina: 0,060), grupo C (PDA: 0,042); siendo el tratamiento PDA el que presentó mayor velocidad de crecimiento radial en comparación a los demás tratamientos.

Con respecto a la cuantificación de pigmento, se generaron 3 grupos independientes: en el grupo A (PDA+Naranja:0,226), grupo B (PDA+Mandarina: 0,262), grupo C (PDA: 0,396); siendo el tratamiento PDA el que presento mayor absorbancia en comparación a los demás tratamientos.

Figura 5

Crecimiento radial de *M. purpureus*; en 3 medios de cultivo, durante 8 días.



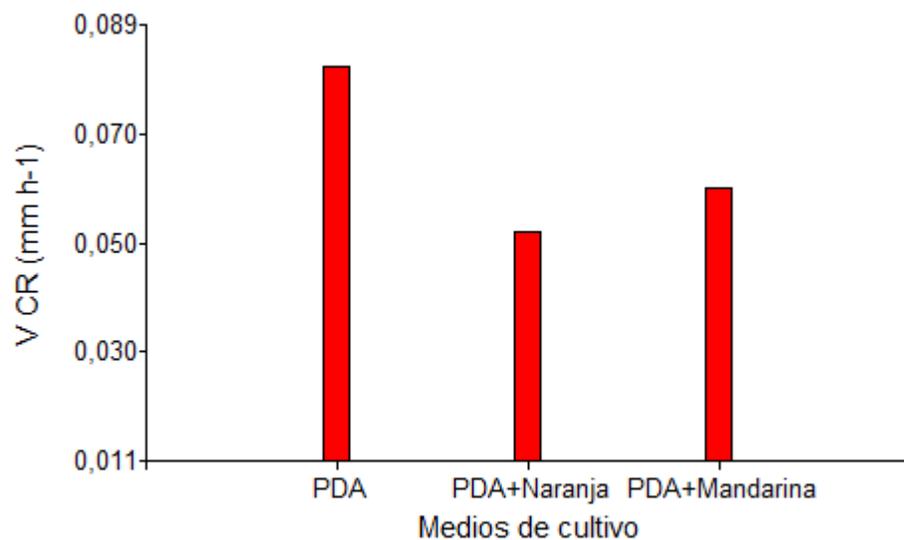
Nota. Crecimiento radial en relación al tipo de medio de cultivo y el tiempo de incubación.

La Figura 5 muestra el crecimiento del hongo *M. purpureus* durante los 8 días de incubación, en donde el medio PDA presenta incremento del crecimiento radial a partir del día 4 hasta el día 8, dando un total de 15,35 mm, mientras que en los PDA+Naranja y PDA+Mandarina se observa un crecimiento de tipo radial lento, en el caso del medio PDA+Naranja se presenta un incremento del crecimiento a partir del día 6 hasta el día 8, dando un total de 8,33 mm mientras que en el medio PDA+Mandarina, el crecimiento empieza a aumentar a partir del día 5 y se mantiene constante desde el día 6 hasta el día 8, dando un total de 9,35 mm.

La Figura 6 resume la velocidad de crecimiento radial (V CR) en los 3 medios de cultivo aplicados, en donde la cepa de *M. purpureus* presentó mayor velocidad de crecimiento radial en el medio de cultivo PDA ($0,082 \text{ mm h}^{-1}$), mientras que el medio PDA+Naranja obtuvo el menor valor de velocidad de crecimiento radial ($0,060 \text{ mm h}^{-1}$).

Figura 6

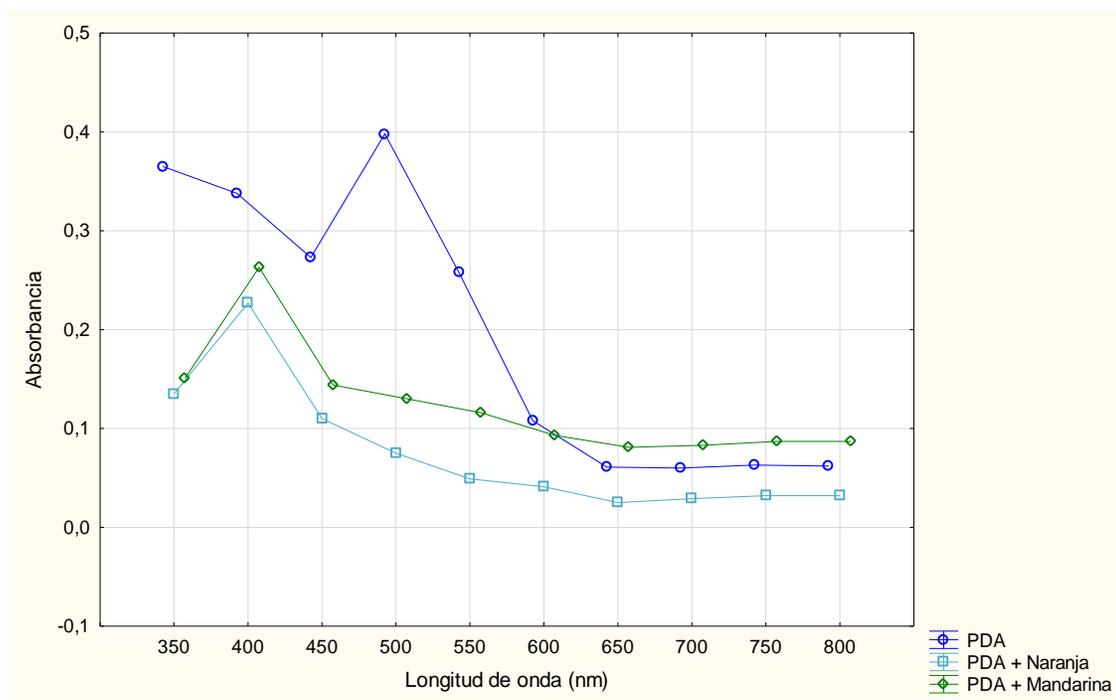
Velocidad de crecimiento radial ($\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$) de *M. pupureus* sobre 3 medios de cultivo distintos



Nota. Velocidad de crecimiento específica sobre distintos medios de cultivo.

Figura 7

Barridos de exploración de los tres medios de cultivo analizados

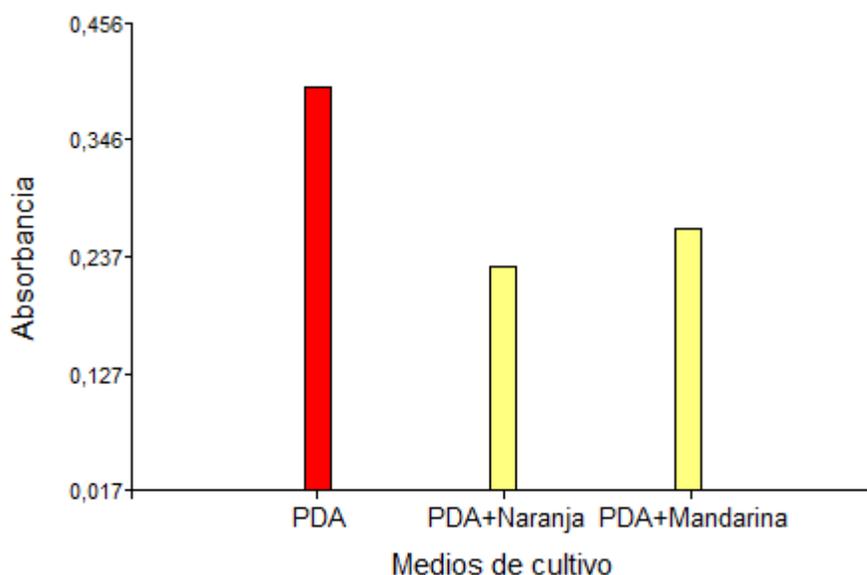


Nota. Absorbancia en relación a la longitud de onda y medio de cultivo.

En la Figura 7 se muestra las máximas absorbancias en donde se produjo la pigmentación, en donde a una longitud de onda entre los 400 – 500 nm, se observan picos significativos, en el medio PDA se encontró un pico a los 495 nm, en donde se produjo pigmentos de color rojo, en el medio PDA+Mandarina se encontró un pico a los 405 nm, dando una pigmentación amarilla, mientras que en el medio PDA+Naranja se encontró un pico a los 400 nm, en donde se observó una pigmentación amarilla.

Figura 8

Absorbancia de los pigmentos obtenidos en 3 medios de cultivo diferentes

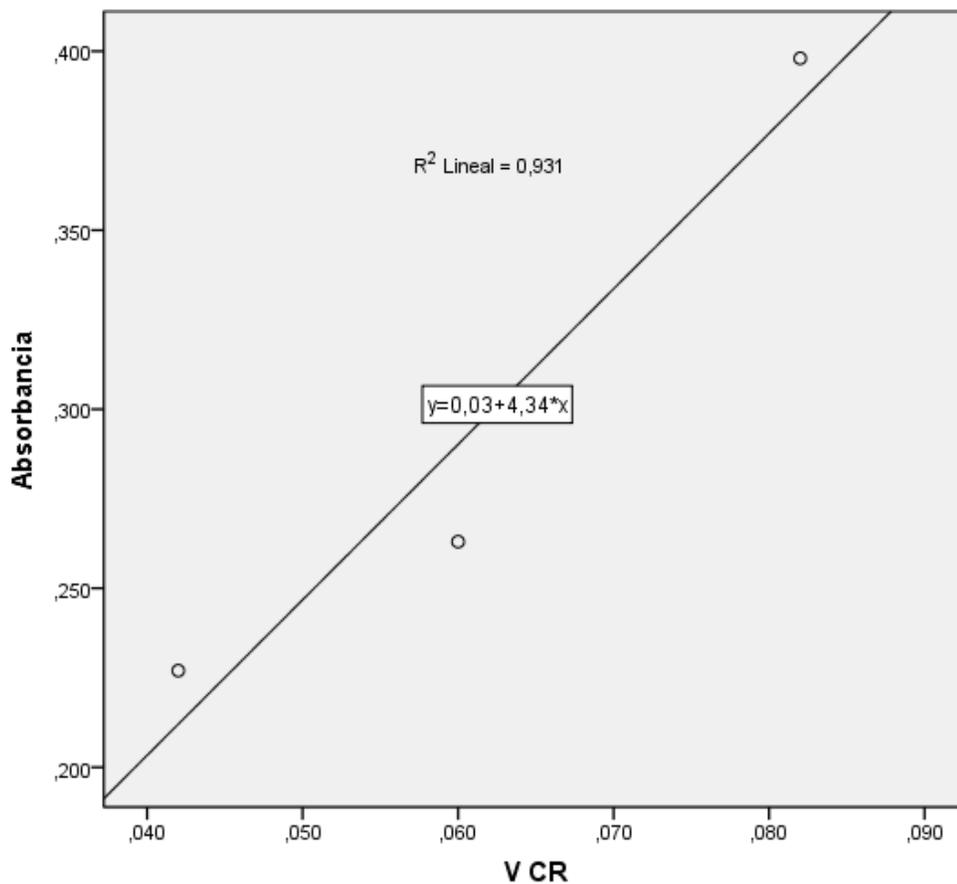


Nota. Producción de pigmentos por *M. purpureus* en distintos medios de cultivo.

La Figura 8 muestra la producción de pigmentos en distintos medios de cultivo, en donde el medio PDA obtuvo mayor producción de pigmentos rojos (0,396), mientras que en el medio PDA+Mandarina obtuvo mayor producción de pigmentos amarillos (0,262).

Figura 9

Correlación entre la absorbancia y velocidad de crecimiento radial



Nota. Gráfico de correlación con el método Pearson.

La Figura 9 muestra que existe correlación entre la absorbancia y la velocidad de crecimiento radial con un valor de 0,968, por lo tanto, se puede decir que la absorbancia se comporta en función de la velocidad de crecimiento radial.

De la producción de pigmentos microbianos por el hongo de género *Monascus spp*, empleando distintos tipos de sustratos por medio de una fermentación sólida.

Análisis de varianza para la cuantificación de pigmentos

Tabla 19

Análisis de varianza (ANOVA) para la cuantificación de pigmentos

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|--|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| EFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Factor A (Concentración de inóculo) | 0,537303 | 1 | 0,537303 | 3,99 | 0,0643 |
| B: Factor B (Sustrato) | 1,68194 | 2 | 0,840972 | 6,24 | 0,0107 |
| C: Réplica | 0,150463 | 3 | 0,0501544 | 0,37 | 0,7743 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 1,91584 | 2 | 0,95792 | 7,11 | 0,0067 |
| RESIDUOS | 2,02163 | 15 | 0,134775 | | |
| TOTAL | 6,30718 | 23 | | | |

Nota. Se considera un $p < 0,05$.

La Tabla 20 muestra que existe diferencia significativa para los sustratos (Factor B) y para la interacción A*B, mientras que para la concentración del inóculo (Factor A) no se encontró diferencia significativa.

Prueba de significancia de Tukey $p < 0,05$ para la concentración del inóculo (Factor A)

Tabla 20

Resultados del análisis de Tukey $p < 0,05$ para concentración de inóculo (Factor A)

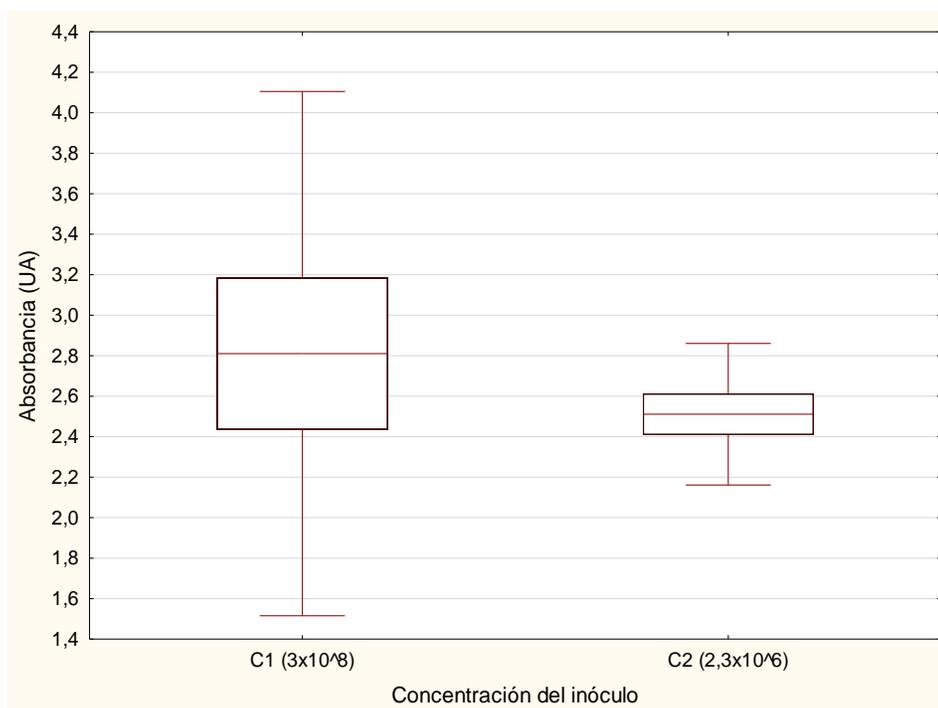
| Concentración del inóculo (Factor A) | Absorbancia |
|--------------------------------------|-------------------|
| C1 (3×10^4) | 2,81 ^A |
| C2 ($2,3 \times 10^6$) | 2,51 ^A |

Nota. Las letras A-B indican la presencia de grupos homogéneos o independientes.

La Tabla 21 muestra que la concentración del inóculo (Factor A) no presentar diferencia significativa entre las medias, dando valores de 2,81 para la concentración 3×10^4 y 2,51 para la concentración $2,3 \times 10^6$.

Figura 10

Efecto de la concentración del inóculo (Factor A) en la producción de pigmentos



Nota. Efecto de la concentración del inóculo aplicado en la fermentación sólida para la producción de pigmentos.

Prueba de significancia de Tukey $p < 0,05$ para los sustratos (Factor B)

Tabla 21

Resultados del análisis de Tukey $p < 0,05$ para sustratos (Factor B)

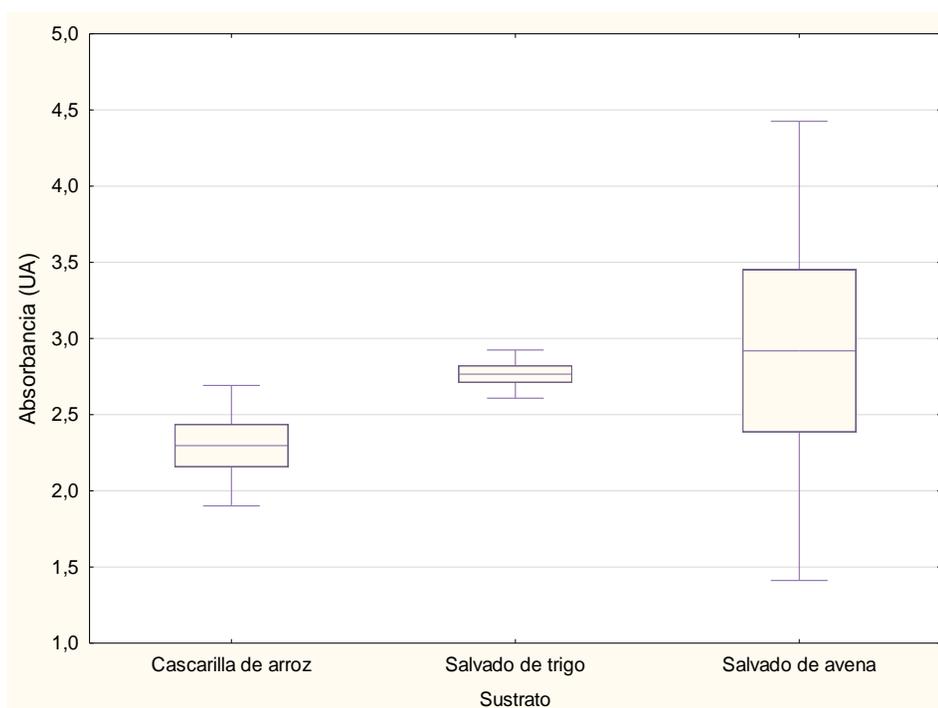
| Sustrato (Factor A) | Absorbancia |
|----------------------------|--------------------|
| Cascarilla de arroz | 2,30 ^A |
| Salvado de trigo | 2,77 ^{AB} |
| Salvado de avena | 2,92 ^B |

Nota. Las letras A-B indican la presencia de grupos homogéneos o independientes.

La Tabla 22 muestra que, con respecto a la cuantificación de pigmento, se generaron 2 grupos homogéneos de la siguiente manera: grupo A (Cascarilla de arroz: 2,30; Salvado de trigo: 2,77), grupo B (Salvado de trigo: 2,77; Salvado de avena: 2,92), siendo el grupo B el que presenta mayor absorbancia.

Figura 11

Efecto del sustrato (Factor B) en la producción de pigmentos



Nota. Efecto del tipo de sustrato aplicado en la fermentación sólida para la producción de pigmentos.

La Figura 10 muestra el efecto del tipo de sustrato aplicado en la producción de pigmentos, se observó mayor producción en el sustrato de salvado de avena (2,92) para pigmentos rojos y mayor producción en sustrato de salvado de trigo (2,77) para pigmentos amarillos y la cascarilla de arroz (2,30) en menor proporción.

Prueba de Tukey $p < 0,05$ para la interacción concentración del inóculo*sustrato (A*B)

Tabla 22

Resultados del análisis de la prueba Tukey $p < 0,05$ para la interacción A*B

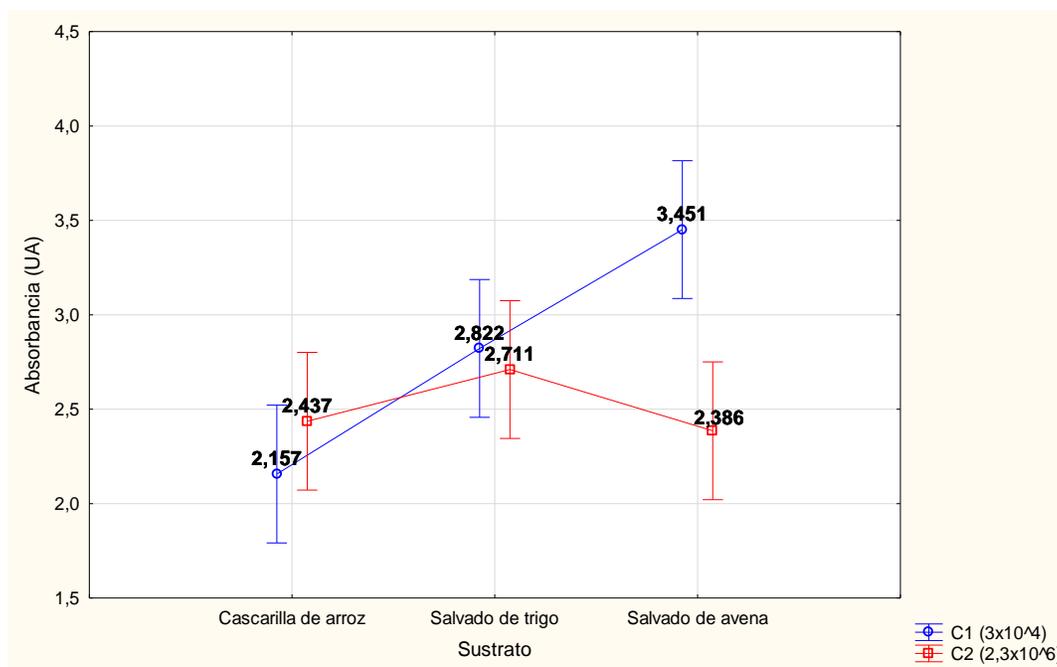
| Factor A (Concentración del inóculo esporas/ml) | Factor B (Sustrato) | Absorbancia |
|---|---------------------|--------------------|
| C1 (3×10^4) | Cascarilla de arroz | 2,16 ^A |
| C1 (3×10^4) | Salvado de trigo | 2,82 ^{AB} |
| C1 (3×10^4) | Salvado de avena | 3,45 ^B |
| C2 ($2,3 \times 10^6$) | Cascarilla de arroz | 2,44 ^A |
| C2 ($2,3 \times 10^6$) | Salvado de trigo | 2,71 ^{AB} |
| C2 ($2,3 \times 10^6$) | Salvado de avena | 2,39 ^A |

Nota. Las letras A-B indican la presencia de grupos homogéneos o independientes.

La Tabla 23 muestra la influencia de la interacción concentración del inóculo*sustrato (A*B) en la producción de pigmentos, en donde se formaron 2 grupos homogéneos de la siguiente manera: grupo A (3×10^4 *Cascarilla de arroz; 3×10^4 *Salvado de trigo; $2,3 \times 10^6$ *Cascarilla de arroz; $2,3 \times 10^6$ *Salvado de trigo; $2,3 \times 10^6$ *Salvado de avena) y grupo B (3×10^4 *Salvado de trigo; 3×10^4 *Salvado de avena; $2,3 \times 10^6$ *Salvado de trigo), siendo el grupo B el que presenta mayor absorbancia.

Figura 12

*Efecto de la interacción Concentración del inóculo*Sustrato (A*B)*



Nota. Efecto de la interacción en la producción de pigmentos.

La Figura 11 muestra la influencia de la interacción concentración del inóculo*sustrato (A*B) obteniendo mayor producción de pigmentos rojos a una concentración de 3×10^4 en los sustratos de salvado de avena (3,451) y salvado de trigo (2,822), en cuanto a pigmentos amarillos la mayor producción, se encontró a una concentración de $2,3 \times 10^6$ con el sustrato de salvado de trigo (2,711), cascarilla de arroz (2,437) y salvado de avena (2,386), mientras que la menor producción se produjo a una concentración de 3×10^4 en el sustrato de cascarilla de arroz.

De la aplicación de los pigmentos microbianos a fibras vegetales (piña y abacá)

Figura 13

Muestras de fibra de piña y abacá

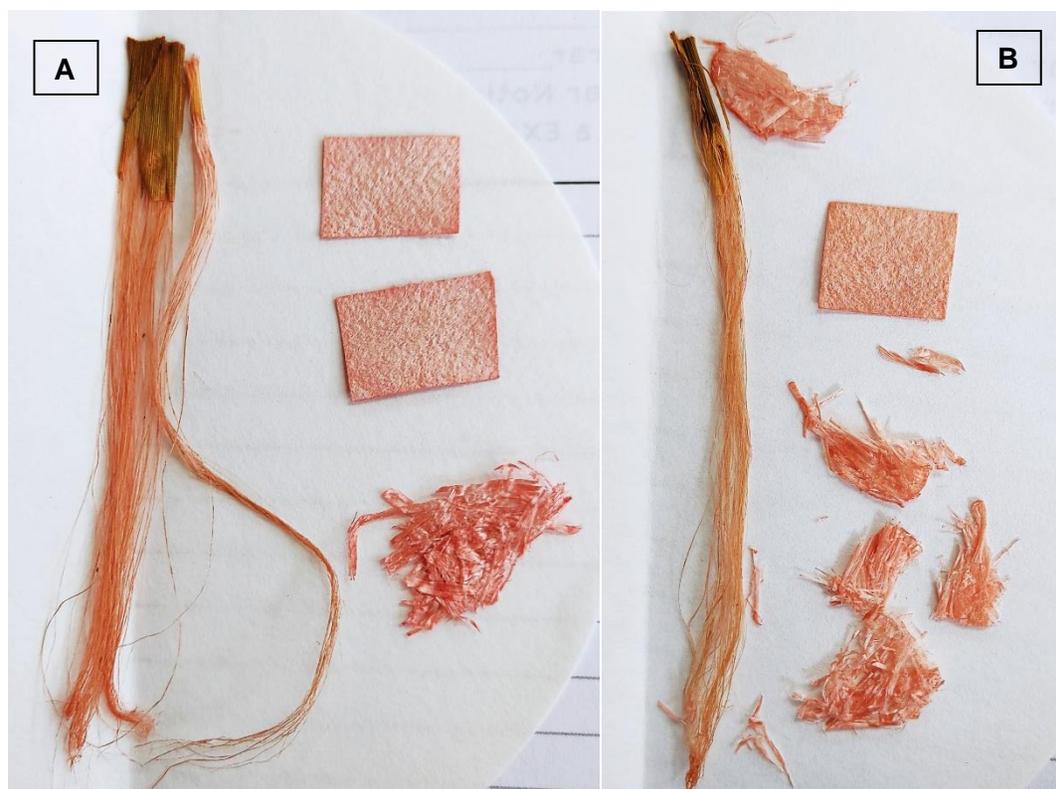


Nota. Fibra de piña (derecha) y fibra de abacá (izquierda).

La Figura 12 muestra las muestras de fibra de piña y abacá a utilizar para la aplicación de los pigmentos obtenidos por *M. purpureus*.

Figura 14

Muestras de fibra de piña y abacá teñidas con pigmento rojo de *M. purpureus*.

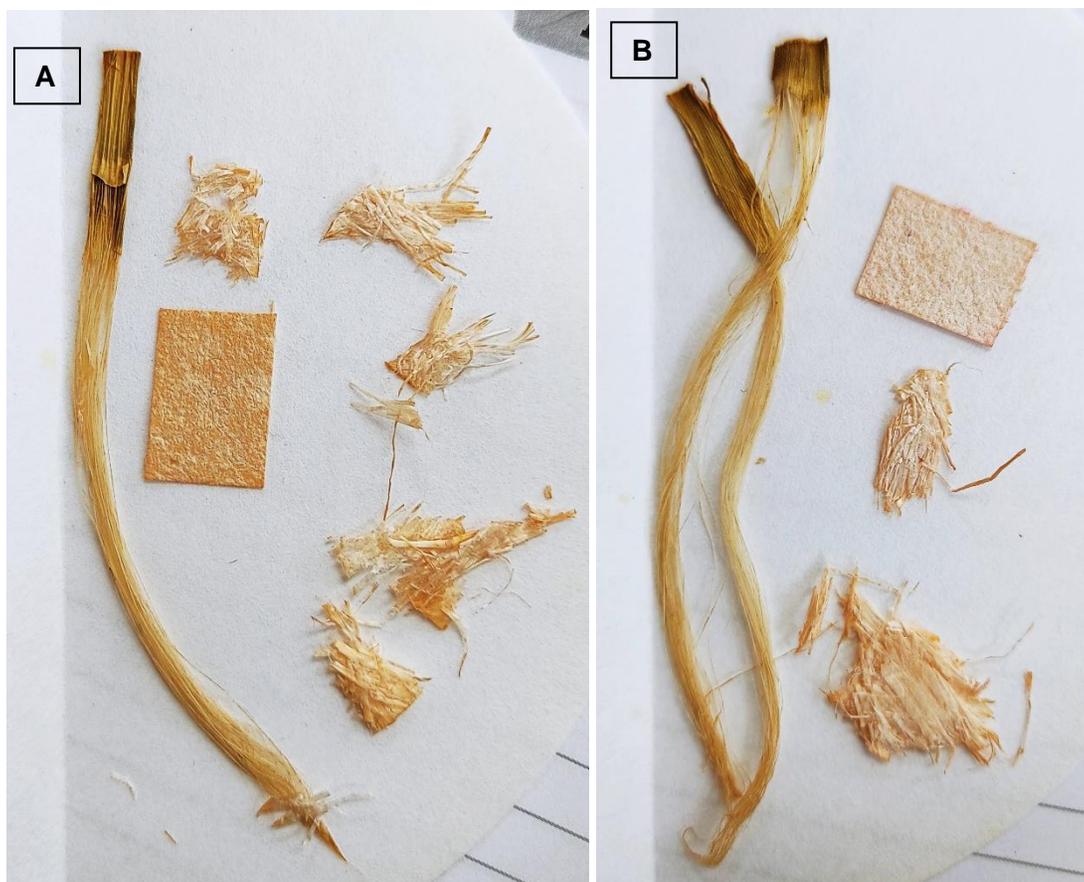


Nota. Aplicación de pigmentos rojos a fibra de piña y abacá.

La Figura 13 muestra las fibras de piña y abacá teñidas con el pigmento rojo obtenido de *M. purpureus*, a una concentración 3×10^4 con Salvado de avena (Figura 12 A) se encuentra mayor pigmentación en comparación a las muestras con una concentración 3×10^4 con Salvado de trigo (Figura 12 B).

Figura 15

Muestras de fibra de piña y abacá teñidas con pigmento amarillo de *M. purpureus*



Nota. Aplicación de pigmentos amarillos a fibra de piña y abacá.

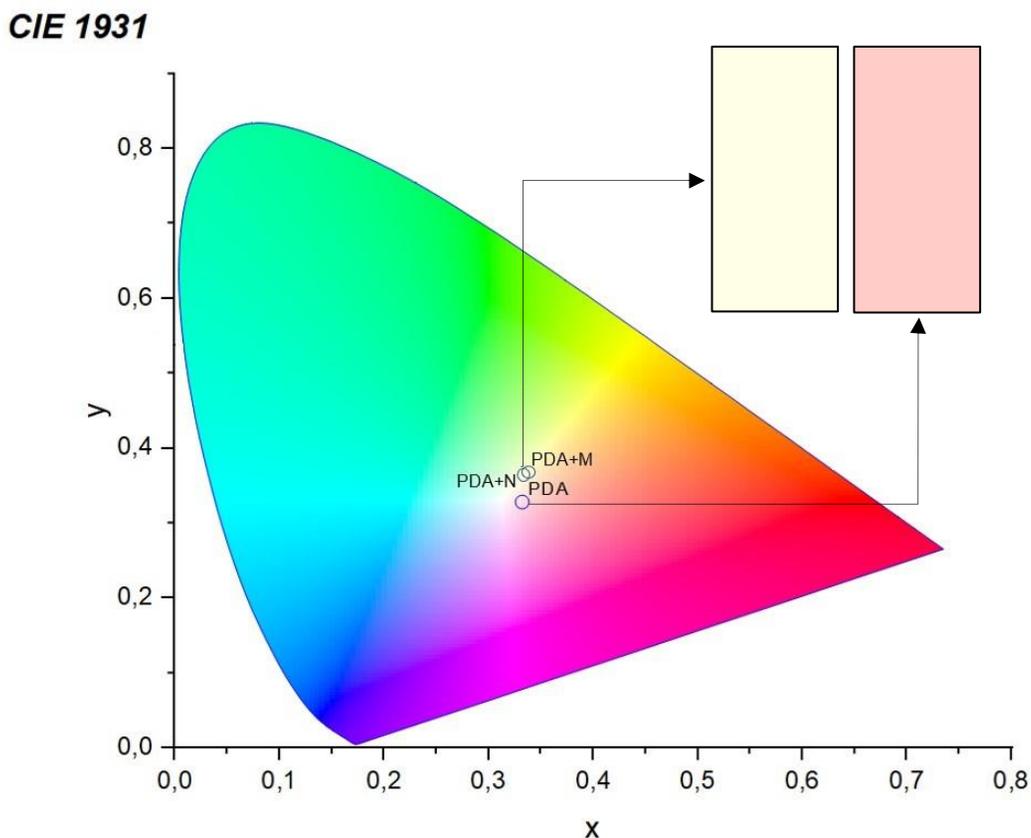
La Figura 14 muestra las fibras de piña y abacá teñidas con el pigmento amarillo obtenido de *M. purpureus*, a una concentración $2,3 \times 10^6$ con Salvado de trigo (Figura 13 A) se encuentra mayor pigmentación en comparación a las muestras con concentración $2,6 \times 10^6$ con cascarilla de arroz (Figura 13 B).

Determinación de color de los pigmentos obtenidos

Se evaluaron las características colorimétricas de los pigmentos obtenidos en medios sólidos y de los sustratos fermentados por medio del programa Origin, el cual permitió obtener calcular los colores específicos de los pigmentos, mediante un diagrama de cromaticidad CIE1931.

Figura 16

Diagrama de CIE 1931 para los pigmentos obtenidos en medios de cultivo

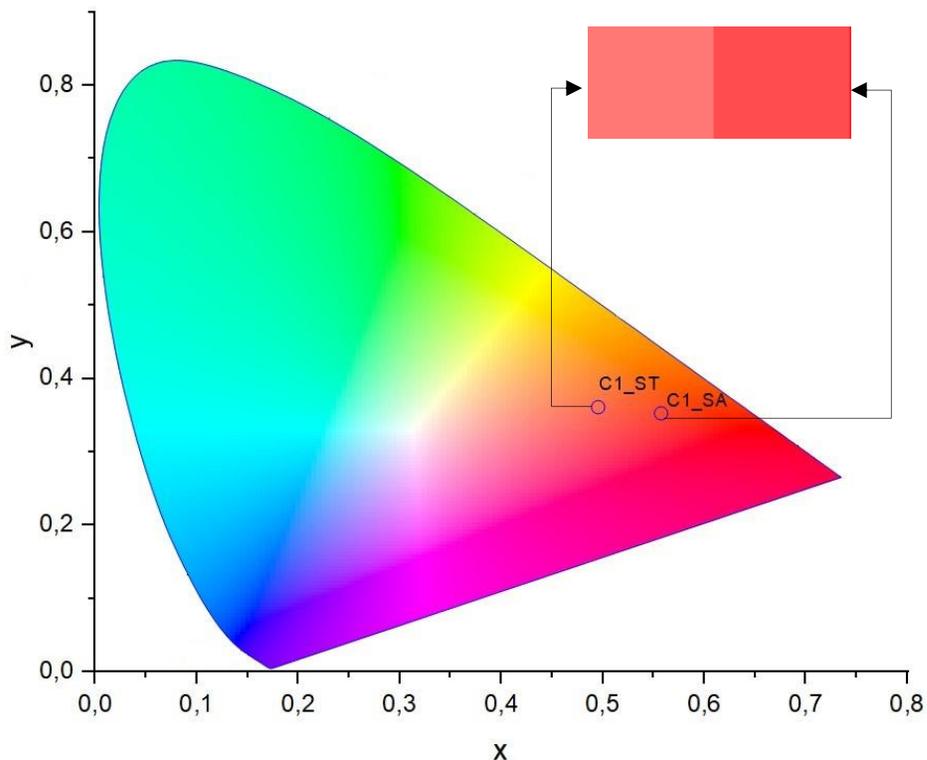


Nota. Diagrama CIE 1931 donde se muestra la posición de color para los pigmentos obtenidos en los 3 medios de cultivo.

En la Figura 15 se observa los colores específicos de los pigmentos obtenidos en los distintos medios de cultivo, en el caso del medio PDA, se observa que una tendencia de color de rosado a rojo, en el caso de los medios de cultivo PDA+Mandarina y PDA+Naranja, se observa una tendencia de colores amarillos. Siendo el medio PDA el que obtuvo mayor intensidad de color en comparación a los demás medios, independientemente de los colores obtenidos.

Figura 17

Diagrama de CIE 1931 para los pigmentos rojos obtenidos en fermentación sólida

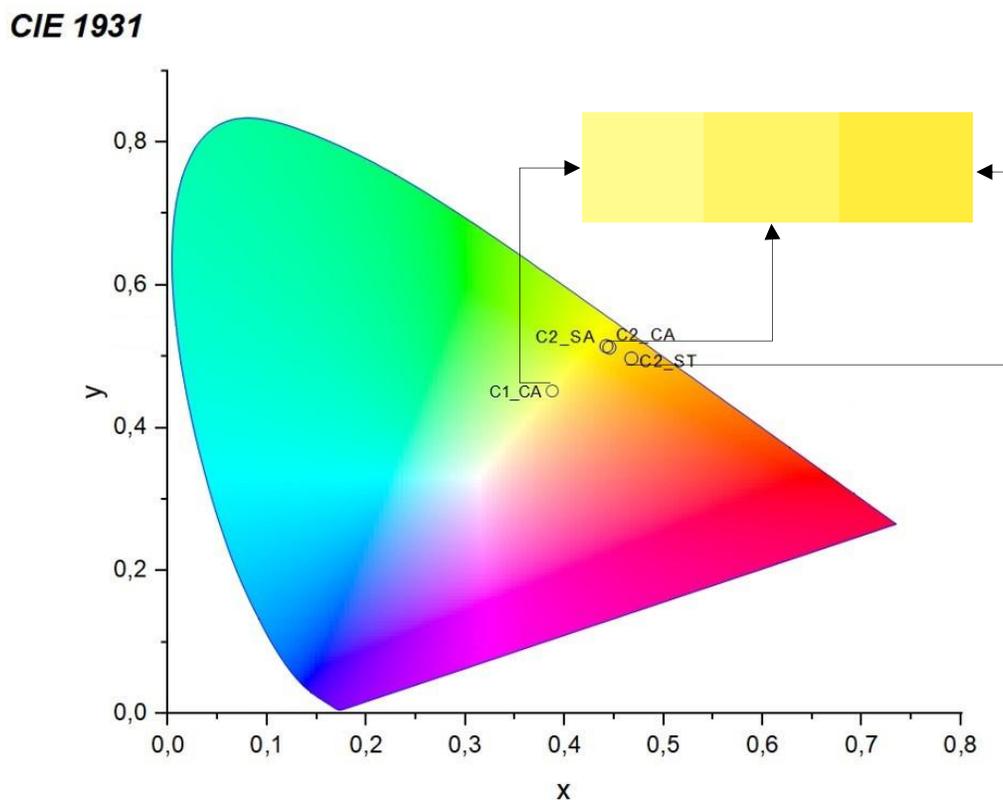
CIE 1931

Nota. Diagrama CIE 1931 donde se muestra la posición de color específicos para los pigmentos rojos obtenidos en fermentación sólida.

En La Figura 16 se observa los colores específicos de los pigmentos rojos obtenidos al culminar la fermentación sólida, en donde el tratamiento con una concentración de 3×10^4 junto con el sustrato salvado de avena presento mayor pigmentación de color rojo, en comparación al tratamiento con una concentración de 3×10^4 junto con el sustrato salvado de trigo. Cabe mencionar que solo estos tratamientos produjeron pigmentos de tonalidad roja.

Figura 18

Diagrama de CIE 1931 para los pigmentos amarillos obtenidos en fermentación sólida



Nota. Diagrama CIE 1931 donde se muestra la posición de color específicos para los pigmentos amarillos obtenidos en fermentación sólida.

En la Figura 17 se observa los colores específicos de los pigmentos amarillos obtenidos al culminar la fermentación sólida, en donde el tratamiento con una concentración de $2,3 \times 10^6$ junto con el sustrato salvado de trigo presento mayor pigmentación de color amarillo, en comparación a los tratamientos con la misma concentración pero con los sustratos de salvado de avena y cascarilla de arroz, mientras que el tratamiento con una concentración de 3×10^4 junto con el sustrato cascarilla de arroz presento menor pigmentación amarilla, cabe mencionar que, este último tratamiento fue el único en presentar un color amarillo a la concentración de 3×10^4 .

Capítulo V

Discusión

Los pigmentos microbianos y pigmentos naturales hoy en día son una alternativa importante ante los pigmentos sintéticos (Velmurugan et al., 2010). Existen distintos microorganismos capaces de producir pigmentos, no obstante, en varios estudios se muestra que los microorganismos del género *Monascus* producen pigmentos rojos, naranjas y amarillos que se utilizan como colorantes en alimentos y textiles (Santis et al., 2005).

Respecto al aislamiento e identificación de hongos del género *Monascus spp* presentes en el ensilaje de maíz

Al momento de analizar la secuenciación de la cepa y obtener el árbol filogenético, se logró determinar que el hongo aislado del ensilaje de maíz, fue *Monascus purpureus*. Este hongo se caracteriza principalmente por su etapa basipetospora en donde se forman conidióforos simples en parecidos a hifas vegetativas que se alargan ligeramente hasta separarse de manera independiente, formando cleistotecios en los cuales se hayan ascosporas de forma ovala (Vasilyeva et al., 2012).

En cuanto a la obtención del hongo *M. purpureus*, Pineda et al. (2016) describe que el hongo *Monascus spp* tiende a crecer fácilmente en residuos agroindustriales, como el capacho de maíz, la hoja de maíz y la tusa de palma de aceite, teniendo en cuenta distintas condiciones para su crecimiento. A su vez, Bočarov-Stančić et al. (2014) exponen que en el ensilaje de maíz y alfalfa en Serbia encontraron hongos del género *Monascus* y, Velázquez et al. (2019) reportan la presencia de *Monascus purpureus* en ensilajes de avena, maíz, triticale y alfalfa de diferentes estados de Mexico, ante estos reportes, se puede decir que la presente investigación coincide con dichos resultados, puesto que se logró obtener la cepa de *M. purpureus* a partir del ensilaje de maíz.

Respecto a la velocidad de crecimiento radial

Analizando los resultados sobre el crecimiento radial, se obtuvo que la cepa de *M. purpureus* presentó mayor crecimiento en el medio PDA, con un total de 15,35 mm por 192 h, con una velocidad de crecimiento radial de $0,086 \text{ mm h}^{-1}$, este resultado difiere con lo reportado por Carvalho J. et al. (2006) en donde evaluaron la velocidad de crecimiento radial a las 264 horas de 4 cepas diferentes de *Monascus*, utilizando PDA, observando que la cepa 3802 al presentó un crecimiento radial total de 20 mm y, con lo reportado por Ajdari et al. (2011), en donde evaluaron 6 cepas de *Monascus purpureus* en 6 medios de cultivo, obteniendo una velocidad de crecimiento radial de $0,069 \text{ mm h}^{-1}$ de la cepa DSM1603 en medio PDA por 7 días de incubación, por lo tanto, se podría decir que el crecimiento del microorganismo es dependiente de la cepa, del medio de cultivo evaluado y del tiempo de incubación.

En cuanto a la velocidad de crecimiento radial en los medios PDA+Naranja y PDA+Mandarina, se observó un valor de $0,042 \text{ mm h}^{-1}$ y $0,060 \text{ mm h}^{-1}$ respectivamente, no se encontró reportes sobre el uso de este tipo de medio para la evaluación de crecimiento en *M. purpureus*, sin embargo, en la investigación de Cornejo (1984) se reporta el uso de medio Agar con cascara de naranja para evaluar el crecimiento de *Aspergillus spp*, ya que, la cascara de naranja sirve como fuente de carbono debido al porcentaje de fibra cruda, la cual se compone de celulosa, pentosas, entre otros componentes.

Se consideró la cascara de mandarina como fuente de fósforo y potasio para el medio, que son elementos que tienen efecto en el crecimiento y la producción de pigmentos en *M. purpureus*. Ahora bien, se observó menor crecimiento en los medios PDA+Mandarina y PDA+Naranja, por lo que se podría decir que la cepa tardó más tiempo en adaptarse a las condiciones tanto fisicoquímicas como nutritivas del medio de cultivo, o bien, la cepa agotó las fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio necesarias para su crecimiento (Ajdari et al., 2011), esto significa que el tipo y la concentración de las fuentes de C, N, P y K son puntos

importantes a considerar al momento de formular un medio de cultivo con el fin de mejorar el crecimiento y la esporulación del hongo.

Respecto a la producción de pigmentos en medios de cultivo

Analizando los resultados de la producción de pigmentos en medios sólidos, se observó un pico a los 495 nm, en donde se produjo pigmentos de color rojo en el medio PDA, mientras que para los medios PDA+Mandarina y PDA+Naranja se observaron dos picos, uno a los 405 nm y el otro a los 400 nm dando una pigmentación amarilla, estos resultados son similares a los de Velázquez Arellano (2014), en donde obtuvo pigmentos rojos a 495 nm en los medios SDA, PDA, MEA y Arroz, también obtuvo pigmentos amarillos a una longitud de onda de 390 nm en los medios YM y PDA. A su vez, los resultados obtenidos concuerdan con lo expuesto por Domínguez et al. (2002), en donde mencionan que la presencia de picos en los barridos de exploración puede ser ocasionado por la mezcla de 2 o más pigmentos, puesto que, los pigmentos amarillos-naranjas se producen a longitudes de onda de 405 nm, mientras que los pigmentos rojos ocurren a una longitud de onda de 495 nm en pigmentos del hongo *Monascus spp.*

Se encontró mayor producción de pigmentos rojos en medio PDA con una absorbancia de 0,396, mientras que en el medio PDA+Mandarina se observa mayor producción de pigmentos amarillos con un valor de 0,262. Estos resultados difieren con lo reportado por Velázquez Arellano (2014), quienes obtuvieron una absorbancia de 0,573 para pigmentos rojos y 0,713 para pigmentos amarillos en medio PDA, cabe mencionar que en la presente investigación el tiempo de incubación fue 8 días en comparación al estudio mencionado que manejaron un tiempo de incubación de 14 días.

Se puede observar diferencia significativa entre los resultados de la absorbancia obtenidos en comparación al estudio mencionado, es decir, que el rendimiento de color es escaso en el presente estudio, esto puede deberse a que el rendimiento de color aumenta con el período de incubación (Velmurugan et al., 2010), por otra parte Daud et al. (2020) expresan

que la eficiencia del color está relacionada con la formación de cleistotécios del hongo, ya que estos indican el inicio de la síntesis de pigmentos. Otro factor influyente, podría ser la combinación de varios factores específicos, ya que dependiendo de la composición del medio y el pH se obtienen distintas tonalidades (Hajjaj et al., 2000). Por otra parte, Ayala (2017), sustenta que a un pH de 6 a 7 se producen pigmentos naranjas y rojos, mientras que a un pH inferior a 4 se producen pigmentos amarillos y dorados.

Respecto a la producción de pigmentos en fermentación sólida

La fermentación en estado sólido, es el método más común aplicado a escala de laboratorio, debido a que es de fácil manejo y bajo costo. A su vez, Además, se ha evidenciado que *Monascus spp.* tiene mayor rendimiento en la producción de pigmentos con este tipo de fermentación, ya que, si se mantiene las condiciones necesarias y se emplea residuos agroindustriales como materia prima se obtendría un producto rentable y de bajo costo (Velmurugan et al., 2010).

Respecto a la concentración del inóculo (Factor A)

Al analizar los resultados de absorbancia referente a las concentraciones del inóculo, no se encontró diferencia en las medias, ya que, se observó un valor de 2,81 para la concentración 3×10^4 esporas/ml y 2,51 en la concentración $2,3 \times 10^6$ esporas/ml, por lo que se podría decir que la concentración del inóculo no influye en la producción de pigmentos, es decir que, se puede aplicar ambas concentraciones, estos resultados se acogen al estudio de Velázquez Arellano (2014), quien utilizó una concentración de 1×10^4 esporas/ml de *M. purpureus*, mientras que El-Sayed et al. (2022) emplearon una concentración de $1,5 \times 10^6$ de *M. ruber*.

Respecto al sustrato (Factor B)

Al analizar los resultados de absorbancia referente al tipo de sustrato, se observó mayor producción de pigmentos rojos en salvado de avena (2,92) y para pigmentos amarillos en salvado de trigo (2,77) y la cascarilla de arroz (2,30) en menor proporción. Estos resultados

concuerdan con lo reportado por El-Sayed et al. (2022), quienes mencionan que la cascarilla de arroz, es un sustrato muy pobre para el crecimiento y para la producción de pigmentos de *M. ruber* SRZ112, asimismo, Babitha et al. (2007), reporta que salvado de trigo obtuvo un bajo rendimiento en la producción de pigmentos con un valor de 3,525 OD Units/gdso en comparación a los demás sustratos aplicados. Por otra parte, Velmurugan et al. (2010) reportó una producción para pigmentos amarillos de 18.92 UA y para pigmentos rojos de 14.26 UA con humedad del 60% en sustrato de mazorca de maíz, por lo que se podría decir que la humedad del sustrato se relaciona con el rendimiento en la producción de pigmentos, debido a que si existe decrecimiento de la humedad, se reduce la disponibilidad de nutrientes y, a su vez, se presenta menor transferencia de calor y oxígeno (Babitha et al., 2007). Otro factor influyente en la producción de pigmentos es el tamaño de partícula, ya que se relaciona con la transferencia de masa entre el microorganismo-sustrato durante la fermentación sólida (Díaz, 2009).

El uso de residuos agroindustriales como sustratos en fermentación sólida ayuda a la producción de pigmentos, ya que, los sustratos sólidos suministran los nutrientes al cultivo microbiano y sirven como anclaje para las células (Pandey A. , 2003). Diversos residuos agroindustriales como salvado de arroz, salvado de trigo, mandioca, etc. se han utilizado para la producción de pigmentos (Babitha et al., 2007). Sin embargo, hasta ahora no se ha reportado el uso de salvado de avena como sustrato para la producción de pigmentos; el salvado de avena es se ubica justo debajo de la cáscara exterior del grano de avena, conformando una capa externa, a su vez, es rica en carbohidratos, proteínas y oligoelementos. Ante los resultados expuestos, se podría decir que el uso de salvado de avena es un sustrato potencial para la producción de pigmentos rojos por *M. purpureus*.

Respecto a la Interacción concentración del inóculo*Sustrato (A*B)

La producción de pigmentos en fermentación sólida presento diferencia significativa entre la concentración del inóculo y el tipo de sustrato. Para pigmentos rojos, los tratamientos con una concentración de 3×10^4 con salvado de avena (3,451) y salvado de trigo (2,822)

obtuvieron mayor producción, en cuanto a pigmentos amarillos la mayor producción, se encontró a una concentración de $2,3 \times 10^6$ con salvado de trigo (2,711), cascarilla de arroz (2,437) y salvado de avena (2,386), mientras que la menor producción se produjo a una concentración de 3×10^4 en el sustrato de cascarilla de arroz.

El salvado de trigo, cascarilla de arroz, bagazo de caña, entre otros, contienen nutrientes fisicoquímicos los cuales hacen que sean adecuados como sustratos para el crecimiento microbiano junto con la producción industrial de biomoléculas a través de una fermentación sólida (Vishu et al., 2022), sin embargo, existen distintos parámetros que determinan la producción de metabolitos secundarios de *Monascus spp*, tales como el nivel de pH, la temperatura, la aireación, la agitación, entre otros.

Según Pawanjot (2018) la producción de pigmentos *Monascus* puede aumentar hasta 10 días después de que la contaminación pudiera reducir el rendimiento del pigmento. Otros autores han reportado que *Monascus* puede crecer hasta los 14 días, sin embargo, Velmurugan et al. (2010) menciona que, a pesar de que el rendimiento del pigmento aumenta con el período de incubación, si esta llega a ser muy prolongada puede producir diferentes contaminaciones, lo cual conlleva al agotamiento de los ingredientes del medio, reduciendo el rendimiento efectivo del pigmento. El porcentaje de humedad es esencial para el crecimiento de hongos y, posteriormente para la producción de metabolitos (Yongsmith et al., 2000). obtuvieron la mayor producción de pigmento con humedades de 60% con una cepa de *Monascus spp*. A su vez, mencionan que la baja productividad de pigmentos tiende a producirse cuando la humedad supera el 65%, puesto que se produce una aglomeración del sustrato, debido a la formación de lodos lo cual disminuye la oxigenación en el medio y, por tanto, inhibe el crecimiento del microorganismo, a su vez, se produce mayor riesgo de contaminación bacteriana.

Debido a la naturaleza mesófila de *M. purpureus*, el crecimiento óptimo requiere una temperatura moderada (Ye et al., 2004) varios autores han reportado que la producción

máxima de pigmento se puede lograr a 30°C. Por otra parte, Pawanjot (2018) reporta que la máxima productividad de pigmento en *Monascus* puede ocurrir con una concentración de inóculo de $10^4 \times 10^6$ esporas/ml. Sin embargo, si se aplica una cantidad mayor de inóculo, la productividad disminuye porque puede conducir a la producción de un exceso de biomasa, lo cual produce un agotamiento de los nutrientes esenciales para la formación de pigmentos (Babitha et al., 2007).

Otro parámetro que influye en la producción de pigmentos, es el tamaño de la partícula, es preferible utilizar tamaños pequeños de partícula, ya que estos incrementan el área de contacto entre el micelio del microorganismo y sustrato, a su vez limita el intercambio de gases. Por el contrario, a mayor tamaño de partícula el área de contacto se reduce e incrementa el intercambio de gases al generarse mayor espacio entre las partículas del sustrato (Srianta et al., 2016). Estos dos efectos opuestos pueden influir en los niveles de producción de metabolitos de interés (Botella et al., 2007).

Ante lo expuesto, se podría decir que la producción de pigmentos en fermentación sólida depende de distintos factores para obtener distintos colores, por lo tanto, la concentración 3×10^4 con salvado de avena y salvado de trigo, lograron producir mayor pigmentación de color rojo, mientras que la concentración $2,3 \times 10^6$ con salvado de trigo y cascarilla de arroz lograron producir mayor pigmentación de color amarillo, debido que la concentración del inóculo se encuentra en el rango reportado por Pawanjot (2018), a su vez, las partículas del salvado de avena fueron favorables para el crecimiento del hongo, cabe mencionar que el salvado de avena es rico en carbohidratos, por lo que es una buena fuente de carbono, mientras que el salvado de trigo contiene 21,1 a 38,9 % (p/p) de almidón (Chaquilla et al., 2018), el cual también ha sido aplicado como fuente de carbono en fermentación sólida para la producción de pigmentos (Musaalbakri et al., 2017).

Respecto a la aplicación de pigmentos microbianos a fibras vegetales (piña y abacá)

Al aplicar los pigmentos obtenidos por *M. purpureus* a las fibras vegetales, se observó una pigmentación clara tanto para pigmentos rojos como amarillos, estos resultados concuerdan con (Carreño et al., 2021) quienes reportan que se obtienen coloraciones claras en fibras vegetales en comparación a la fibra animal que presenta tonalidades con mayor intensidad.

Capítulo VI

Conclusiones

Se determinó que el hongo aislado a partir del ensilaje de maíz, corresponde a la familia Monascaceae, género *Monascus*, específicamente a la especie *Monascus purpureus*, el cual es la especie más común de este género y de los más destacados para la producción de pigmentos, el micelio es blanco al inicio del crecimiento, posteriormente se vuelve color rosa-rojo.

Para la evaluación del efecto del tipo de medio de cultivo en la velocidad de crecimiento radial y la producción de pigmentos por el hongo *Monascus spp*, se determinó que el tipo de medio de cultivo influye en la velocidad de crecimiento radial, siendo el medio PDA el cual presentó mayor crecimiento la cepa de *M. purpureus*, con una velocidad de crecimiento radial de 0,086 mm h⁻¹, en comparación al medio PDA+Naranja y PDA+Mandarina.(0,042 mm h⁻¹ y 0,060 mm h⁻¹); también influye en la producción de pigmentos; ya que, se encontró mayor producción de pigmentos rojos en medio PDA con una absorbancia de 0,396 a 495 nm; y mayor producción de pigmentos amarillos en el medio PDA+Mandarina con un valor de 0,262 a 405 nm. Adicional, se concluye que el rendimiento de los tonos rojos y amarillos variaron debido a la influencia del pH en cada medio y al tiempo de incubación.

Se determinó que a partir de la absorbancia se puede calcular la velocidad de crecimiento radial, debido a la correlación que existe entre ambas variables.

Para la concentración del inóculo (Factor A), se determinó que la concentración del inóculo no influye en la producción de pigmento del hongo de género *Monascus spp*, ya que, las concentraciones aplicadas fueron 3×10^4 y $2,3 \times 10^6$, las cuales se encuentran en el rango reportado por la bibliografía para la producción de pigmentos, independientemente del color.

Para el tipo de sustrato (Factor B), se determinó que el tipo de sustrato aplicado en la fermentación sólida influye en la producción de pigmento del hongo de género *Monascus spp*, siendo el salvado de avena (2,92) el que tuvo mayor producción de pigmentos rojos y el salvado de trigo (2,77) en pigmentos amarillos, a su vez, se concluye que el tamaño de la partícula y la humedad del sustrato son factores a considerar en la producción de pigmentos.

Para la interacción concentración del inóculo*Sustrato (A*B), se determinó que la producción de pigmentos está relacionada con la interacción entre la concentración del inóculo y el tipo de sustrato, siendo los tratamientos con una concentración de 3×10^4 con salvado de avena y con salvado de trigo los que en la producción de pigmentos rojos; mientras que a una concentración de $2,3 \times 10^6$ con salvado de trigo fue el mejor en la producción de pigmentos amarillo, debido a que las concentraciones del inóculo aplicadas son ideales, a su vez, los sustratos fueron gran fuente de carbono junto con el tamaño de partícula, la humedad fue de 60 %, lo cual también favoreció al crecimiento de *M. purpureus* en fermentación sólida para la producción de pigmentos rojos y amarillos.

Recomendaciones

Se recomienda emplear el medio de cultivo PDA para la obtención de pigmentos rojos, a su vez, se debe tener en cuenta los parámetros de pH en un rango de 4 a 7 y el tiempo de incubación hasta 14 días en la producción de pigmentos, ya que estos pueden influir en el cambio de color y en su rendimiento.

Se recomienda aplicar una concentración de 10^4 a 10^6 del inóculo, para obtener tanto pigmentos rojos como amarillos, ya que si se aplica una cantidad mayor de inóculo la productividad del pigmento disminuye.

Se recomienda emplear salvado de avena y salvado de trigo para la producción de pigmentos rojos y amarillos, considerando un tamaño de partícula pequeño, de aproximadamente 0,3 mm a 0,5 mm.

Se recomienda aplicar una concentración de 3×10^4 con salvado de avena y con salvado de trigo para la producción de pigmentos rojos y una concentración de $2,3 \times 10^6$ con salvado de trigo para la producción de pigmentos amarillos, considerando una humedad del 60%, una temperatura de 30°C por un periodo de incubación hasta los 14 días.

Se recomienda usar los resultados de absorbancia para el cálculo de la velocidad de crecimiento radial, ya que, la absorbancia se comporta en función de la velocidad de crecimiento radial.

Se recomienda aplicar los pigmentos producidos por *M. purpureus* en fibras vegetales de piña y abacá como una alternativa al uso de pigmentos sintéticos.

Capítulo VII

Bibliografía

- Ajdari, Z., Ebrahimpour, A., Manan, M., Hamid, M., Mohamad, R., & Ariff, A. (2011). Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several strains of *Monascus purpureus* on solid state cultivation. *J Biomed Biotechnol*, 11.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2011/487329>
- Alonso, V., Pereyra, C., Keller, L., Dalcerro, A., Rosa, C., Chiacchiera, S., & Cavaglieri, L. (2013). Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3), 637–643. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jam.12178>
- Álvarez, F. P., Hernández, O. E., Alfaro, J. A., Hernández, J., Torres, I., & Corrales, A. (2021). Biosíntesis y potencial aplicación de pigmentos fúngicos. *Jovenes en la Ciencia*, 10, 1-12.
<https://doi.org/https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3372>
- Alvarez, L. (2017). *Obtención y utilización de pigmentos textiles a partir de hongos filamentosos aislados de suelos del Altipano peruano [Tesis de grado]*. Universidad Nacional del Altipano.
- Ayala, K. (2017). *“Desarrollo de un proceso a escala de laboratorio para el aislamiento, conservación y producción de cepas nativas de Monascus spp. a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana”[Tesis de maestría]*. Universidad Técnica del Norte, Ibarra.
- Babitha, S., Soccol, C., & Pandey, A. (2007). Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology*, 98(8), 1554-1560.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.005>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Pub.
<https://doi.org/978-0-89054-192-0>

- Bechtold, T., Mussak, R., Mahmud-Ali, A., Ganglberger, E., & Geissler, S. (2006). Extraction of natural dyes for textile dyeing from coloured plant wastes released from the food and beverage industry. *Science of Food and Agriculture*, 86(2), 233-242.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.2360>
- Betini, J., Michelin, M., Peixoto, S., Terenzi, H., & Polizeli, M. (2009). Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraeus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst Eng*, 32, 819-824.
- Bočarov-Stančić, A., Stanković, S., Lević, J., Janković, S., Adamović, M., Novaković, Z., & Kuzevski, J. (2014). Presence of mycobiota and mycotoxins in silage. *XVI International Symposium, "Feed Technology", 28-30 October*. Serbia.
- Botella, C., Diaz, A., Ory, I., Webb, C., & Blandino, A. (2007). Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 42(1), 98-101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.025>
- Bühler, R., Dutra, A., Vendruscolo, F., Moritz, D., & Ninow, J. (2013). *Monascus* pigment production in bioreactor using a co-product of biodiesel substrate. *Food Science & Technology*, 33(1), 9–13. [https://doi.org/ https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000500002](https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000500002)
- Carreño, S., Cappello, S., García, M., & Xicoténcatl, P. (2021). Potencial tintóreo de cinco especies de macromycetes silvestres nativos de Tabasco, México, sobre fibras de origen natural. *Scientia fungorum*, 52(14), 1-9. <https://doi.org/10.33885/sf.2021.52.1404>
- Carvalho, C., Pandey, A., Babitha, A., & Soccol, R. (2003). Production of *Monascus* biopigments: An overview. *Agro FOOD industry hitech*, 6, 37-42.
- Carvalho, J., Pandey, A., Oishia, B., Brand, D., Rodriguez, J., & Soccol, C. (2006). Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by

- solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 29(3), 262-269.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.01.008>
- Castillo, M., Rojas, A., & WingChing, R. (2009). Valor nutricional del ensilaje de maiz cultivado en asocio con vigna (*Vigna radiata*). *Agronomía Costarricense*, 33(1), 133-146.
- Chaquilla, G., Balandrán, R., Mendoza, A., & Mercado, J. (2018). Propiedades y posibles aplicaciones de las proteínas de salvado de trigo. *CienciaUAT*, 12(2), 137-147.
- Cho, Y. J., Park, J. P., Hwang, H. J., Kim, S. W., Choi, J. W., & Yun, J. W. (2002). Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology*, 35(1), 195–202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01168.x>
- Coello, C., Avellaneda, H., Barrera, A., Peña, M., Yépez, P., & Racines, E. (2017). Evaluation of growth and biomass production of two strains of the *Pleurotus* spp., cultivated in an agar medium with different substrates. *Cienc Tecn UTEQ*, 10(2), 33-39.
<https://doi.org/https://doi.org/10.18779/cyt.v10i2.164>
- Cornejo, M. (1984). *Utilización de cáscara de naranja para producción de proteína unicelular [Tesis de maestría]*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Daud, N., Said, F., Ramu, M., & Yasin, M. (2020). Evaluation of bio-red pigment extraction from *Monascus purpureus* FTC5357. *Materials Science and Engineering*, 736, 1-10.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/736/2/022084>
- Díaz, A. (2009). *Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial [Tesis Doctoral]*. Universidad de Cádiz.
- Domínguez, R., Wang, R., & Pacheco, J. (2002). Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 17(2), 77-83.

- Downham, A., & Collins, P. (2000). Coloring our foods in the last and next millenium. *International Journal of Food Science & Technoogy*, 35(5), 5-22.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x>
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S., Blanc, P., Chidambara Murthy, K., & Ravishankar, G. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 389-406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.006>
- Durán, N., Teixeira, M., Conti, R., & Esposito, E. (2002). Ecological-Friendly Pigments From Fungi. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(1), 53-66.
<https://doi.org/10.1080/10408690290825457>
- El-Sayed, E., Gach, J., Olejniczak, T., & Boratyński, F. (2022). A new endophyte *Monascus ruber* SRZ112 as an efficient production platform of natural pigments using agro-industrial wastes. *Scientific Reports*, 12(12611), 2-3.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-022-16269-1>
- Gao, J.-M., Yang, S.-X., & Qin, J.-C. (2013). Azaphilones: chemistry and biology. *Chem Rev*, 7(4), 755-811. <https://doi.org/10.1021/cr300402y>
- Garon, D., Richard, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D., & Lebailly, P. (2006). Mycoflora and multimycotoxin Detection in corn silage: experimental study. *J. Agric. Food Chem*, 54(9), 3479-3484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf060179i>
- Hajjaj, H., Klaébé, A., Goma, G., Blanc, P., Barbier, E., & François, J. (2000). Medium-Chain Fatty Acids Affect Citrinin Production in the Filamentous Fungus *Monascus ruber*. *Appl Environ Microbiol*, 66(3), 1120–1125. <https://doi.org/10.1128/aem.66.3.1120-1125.2000>
- Kirk, R., & Othmer, D. (2001). Fibers. *Encyclopedia of Chemical Technology*, 10, 264-365.
- Krishania, M., Sindhu, R., Binod, P., Ahluwalia, V., Kumar, V., Sangwan, R., & Pandey, A. (2018). Chapter 5 - Design of Bioreactors in Solid-State Fermentation. *Current*

- Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 83-96.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00005-0>
- Kumar, A., Vishwakarma, H., Singh, J., Dwivedi, S., & Kumar, M. (2015). Microbial pigments: production and their applications in various industries. *Chemical and Biological Sciences*, 5(1), 203–212.
- López, C. C., Hajek, A. E., & Humber, R. A. (2000). Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*, 80(10), 1126-1130.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1139/b02-090>
- Mapari, S., Thrane, U., & Meyer, A. (2010). Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends in Biotechnology*, 28(6), 300–307.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.03.004>
- Martínez de las Marías, P. (1976). *Química y física de las fibras textiles*. Madrid, España: Alhambra S.A.
- Méndez, A., Contreras, J., Lara, F., Rodríguez, R., & Aguilar, C. (2007). PRODUCCIÓN FUNGICA DE UN PIGMENTO ROJO EMPLEANDO LA CEPA XEROFILICA *Penicillium purpurogenum* GH-2. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(3), 267-273.
- Musaalbakri, A. M., Rosfarizan, M., & Arbakariya, A. (2017). *Monascus* spp.: A source of Natural Microbial Color through Fungal Biofermentation. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 5(3), 1-19. <https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00148>
- Paillière-Jiménez, M., Stincone, P., & Brandelli, A. (2020). Natural Pigments of Microbial Origin. *Front. Sustain. Food Syst*, 4(590439).
<https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.590439>
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84.
- Pandey, A., Soccol, C., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35(10), 1153-1169.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)

- Pattanagul, P., Pinthong, R., & Phianmongkhol, A. (2007). Review of Angkak Production (Monascus purpureus). *Chiang Mai J. Sci*, 34(3), 319–328.
- Pawanjot, K. (2018). *Production of food bio-colours from agricultural by-products through solid state fermentation using Monascus purpureus [Tesis maestría]*. Punjab Agricultural University.
- Pineda, J., Duarte, A., Ayala, K., Soto, C., & Pineda-Soto, C. (2016). Producción de metabolitos por Monascus spp.: una revisión. *Rev. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(2), 43-52.
- Poorniammal, R., Prabhu, S., Dufossé, L., & Kannan, J. (2021). Safety Evaluation of Fungal Pigments for Food Applications. *Journal of Fungi*, 7(9), 501–506.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/jof7090692>
- Rahardjo, Y., Tramper, J., & Rinzema, A. (2006). Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances*, 24(2), 161-179.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.002>
- Santis, D., Moresi, M., Gallo, A., & Petruccioli, M. (2005). Assessment of the dyeing properties of pigments from Monascus purpureus. *Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 1072–1079. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jctb.1285>
- Shao, Y., Xu, L., & Chen, F. (2011). Genetic diversity analysis of Monascus strains using SRAP and ISSR markers. *Mycoscience*, 52(4), 224-233.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/S10267-010-0087-Y>
- Sharmila, G., Nidhi, B., & Muthukumaran, C. (2013). Sequential statistical optimization of red pigment production by Monascus purpureus (MTCC 369) using potato powder. *Industrial Crops and Products*, 24, 158-164.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.007>

- Shin, C., Kim, H., Kim, M., & Ju, J. (1998). Morphological change and enhanced pigment production of monascus when cocultured with saccharomyces cerevisiae or aspergillus oryzae. *Biotechnology and Bioengineering*, 59(5), 76-81.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19980905\)59:5<576::aid-bit7>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19980905)59:5<576::aid-bit7>3.0.co;2-7)
- Somarribas, M. (2007). *Efecto de diferentes densidades de maíz y diferentes agotamientos del agua disponible en el suelo sobre la producción de forraje de maíz asociado con mucuna [Tesis de maestría]*. Universidad de Costa Rica.
- Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., Yamada, M., & Harijono, H. (2016). Comparison of Monascus purpureus growth, pigment production and composition on different cereal substrates with solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 181–186.
- Stchigel, A., Cano, J., Abdullah, S., & Guarro, J. (2004). New and interesting species of Monascus from soil, with a key to the known species. *Studies in Mycology*, 50, 299–306.
- Tuli, H., Chaudhary, P., & Beniwal, V. (2015). Microbial pigments as natural color sources : current trends and future perspectives. *Journal Food Science and Technology*, 52, 4669–4678. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13197-014-1601-6>
- Vasilyeva, A., Chekunova, L., Bilanenko, E., Kachalkin, A., & Polyakova, A. (2012). Characterization of the Strain Monascus floricornis P. F. Cannon & E. L. Barnard, Isolated from Aviation Fuel. *Microbiology*, 81(2), 244–250.
<https://doi.org/10.1134/S0026261712010158>
- Velázquez Arellano, M. (2014). *Producción de pigmentos fúngicos (Monascus purpureus 2955) [Tesis de grado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]*. Repositorio Digital de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/542>
- Velázquez, J., Cerna, E., Delgado, J., Hernández, A., Quezada, T., & Ochoa, Y. (2019). Primer reporte de Monascus purpureus en ensilaje de maíz, avena, triticale y alfalfa. *Revista*

Mexicana de Ciencias Agrícolas, 10(8), 1912-1913.

<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i8.1987>

Velázquez, M., Benavente, J., Morlett, J., & Aguilar, C. (2016). Producción de pigmentos por *Monascus* spp. en medio sólido empleando residuos agroindustriales. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 24(69), 90.

<https://doi.org/https://doi.org/10.33064/iycuaa2016691875>

Vélez, P., Posada, F., Marín, P., González, M., Osorio, E., & Bustillo, Á. (1997). *Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatgenos*. CENICAFÉ.

<https://doi.org/ISSN 0120 - 047 X>

Velmurugan, P., Kamala-Kannan, S., Balachandar, V., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J.-C., & Taek Oh, B. (2010). Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 262-268.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.058>

Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R., Muruges, S., & Singaravadivel, K. (2009). Microbial Bioconversion of Rice Broken to Food Grade Pigments. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4(2), 84-87.

Vishu, C., Priya, K., Anuj Kumar, P., Jaspreet, K., Anil Kumar, P., & Harsh, P. (2022). Natural pigment from *Monascus*: The production and therapeutic significance. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 18–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jam.15308>

Wang, B., Zhang, X., Wu, Z., & Wang, Z. (2015). Investigation of relationship between lipid and *Monascus* pigment accumulation by extractive fermentation. *Journal of Biotechnology*, 212(20), 167-173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.08.019>

Wani, S., Naphade, S., Chaudhari, L., & Chaudhari, B. (2004). Pigment Production. In: Concise Encyclopedia of Bioresource Technology. *The Haworth Reference Press*, 645-652.

- Williams, K., Greco, C., Bailey, A., & Willis, C. (2021). Core Steps to the Azaphilone Family of Fungal Natural Products. *ChemBioChem*, 22(21), 3027-3036.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.202100240>
- Ye, Z., Liu, Y., Zhao, Y., & Wen, Y. (2004). Extraction and stability of red biopigment from grape skin. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 6(2), 1005–1007.
- Yongsmith, B., Kitprechavanich, V., Chitradon, L., Chaisrisook, C., & Budda, N. (2000). Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(1-3), 263-272.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00109-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00109-0)