

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



**Producción de pigmentos fúngicos (*Monascus purpureus* 2955)
en residuos agroindustriales por fermentación sólida**

Presentada por:

MARÍA ELENA VELÁZQUEZ ARELLANO

T E S I S

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Septiembre 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Producción de pigmentos fúngicos (*Monascus purpureus* 2955) en residuos agroindustriales por fermentación sólida.

Presentada por:

MARÍA ELENA VELÁZQUEZ ARELLANO

TESIS:

Que Se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito parcial Para Obtener Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El presente trabajo ha sido asesorado por el siguiente comité:

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Dr. Julio César Montañez Sáenz

M.C. Alejandro Méndez Zavala

I.Q. Lourdes Morales Oyervides

I.Q. Juan Roberto Benavente Valdés

Dr. Ramiro López Trujillo
Coordinador De la División de Ciencia Animal
Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Septiembre de 2013





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Producción de pigmentos fúngicos (*Monascus purpureus* 2955) en residuos agroindustriales por fermentación sólida.

Presentada por:

MARÍA ELENA VELÁZQUEZ ARELLANO

TESIS:

Que Se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito parcial para obtener título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El presente trabajo ha sido evaluado por el siguiente comité:

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

M.C. Alejandro Méndez Zavala

M.C. Mildred Inna Flores Verástegui

I.Q. Lourdes Morales Oyervides

Dr. Ramiro López Trujillo

Coordinador De la División de Ciencia Animal

Buenavista Saltillo, Coahuila, México

Septiembre de 2013





ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 9 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 10 |
| 1.1 Colorantes naturales..... | 10 |
| 1.2 Pigmentos microbianos..... | 10 |
| 1.3 Pigmentos producidos por <i>Monascus</i> | 12 |
| 1.4 Sistemas de cultivo en la producción de pigmentos de <i>Monascus</i> | 13 |
| 1.5 Variables de cultivo en la producción de pigmentos de <i>Monascus</i> | 15 |
| 1.5.1 Fuente de carbono | 16 |
| 1.5.2 Fuente de nitrógeno | 17 |
| 1.5.3 pH y temperatura..... | 17 |
| 1.5.4 Presión parcial de oxígeno..... | 17 |
| 1.5.5 Humedad inicial..... | 18 |
| 1.5.6 Metales..... | 18 |
| 1.5.7 Otros microorganismos productores de pigmentos | 19 |
| 1.5.7.1 Pigmentos en levaduras | 19 |
| 1.5.7.2 Pigmentos bacterianos | 19 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 20 |
| 3. HIPÓTESIS | 22 |
| 4. OBJETIVOS | 23 |
| 4.1 General | 23 |
| 4.2 Objetivos Específicos..... | 23 |
| 5. REVISIÓN DE LITERATURA | 24 |
| 5.1 Fermentación..... | 24 |



| | |
|--|----|
| 5.2 Diferencias entre la fermentación sumergida (FS) y la fermentación en estado sólido (FES) | 27 |
| 5.2.1 Ventajas de la fermentación en estado sólido (FES)..... | 28 |
| 5.2.2 Desventajas de la fermentación en estado sólido (FES)..... | 29 |
| 5.2.3 Otros sistemas de cultivo | 33 |
| 5.3 <i>Monascus purpureus</i> | 34 |
| 5.3.1 Taxonomía | 34 |
| 5.3.2 Fisiología..... | 35 |
| 5.3.3 Categorías y estructuras de los pigmentos producidos por <i>Monascus</i> . | 37 |
| 5.3.4 Propiedades de los pigmentos producidos por <i>Monascus</i> | 38 |
| 5.3.4.1 Solubilidad | 39 |
| 5.3.4.2 Temperatura y pH..... | 39 |
| 5.3.4.3 Luz..... | 40 |
| 5.3.4.4 Otros..... | 40 |
| 5.3.4.5 Seguridad | 41 |
| 5.3.5 Extracción, aislamiento, purificación e identificación de los pigmentos producidos por <i>Monascus</i> | 41 |
| 5.3.5.1 Extracción..... | 41 |
| 5.3.5.2 Aislamiento y purificación | 42 |
| 5.3.5.3 Identificación..... | 42 |
| 5.3.6 Funciones de los pigmentos producidos por <i>Monascus</i> | 42 |
| 5.3.6.1 Propiedades anticancerígenas | 42 |
| 5.3.6.2 Propiedades antimicrobianas..... | 43 |
| 5.3.6.3 Propiedades antidiabéticas..... | 44 |
| 5.3.6.4 Regulación de los niveles de colesterol | 44 |
| 5.3.6.5 Propiedades anti inflamatorias..... | 45 |



| | |
|---|-----------|
| 5.4 Producción de pigmentos por <i>Monascus</i> en residuos agroindustriales. | 45 |
| 5.5 Residuos agroindustriales..... | 47 |
| 5.5.1 Producción de cítricos en el mundo y en México | 47 |
| 5.5.2 Naranja..... | 50 |
| 5.5.3 Limón | 51 |
| 5.5.4 Mango | 53 |
| 5.5.5 Papaya | 55 |
| 5.5.6 Piña | 56 |
| 5.5.7 Toronja | 58 |
| 5.5.8 Mandarina | 59 |
| 5.5.9 Tuna | 61 |
| 5.5.10 Frijol | 62 |
| 5.5.11 Sábila o <i>Aloe vera</i> | 63 |
| 5.5.12 Alga Marina | 65 |
| 5.5.12.1 Utilidad de las algas..... | 65 |
| 5.5.12.2 Usos fundamentales de las algas | 66 |
| 5.5.12.3 Otros usos de las algas marinas..... | 66 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 68 |
| 6.1 ETAPA I. Efecto de la composición del medio de cultivo y factores externos sobre la producción de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i> en cultivo en placa. | 68 |
| 6.1.1 Preparación del inóculo | 69 |
| 6.1.1.2 Condiciones de cultivo para propagación de la cepa..... | 70 |
| 6.1.1 Efecto de pH sobre el crecimiento y producción de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i> | 70 |



| | |
|---|-----------|
| 6.1.2 Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i> en cultivo en placa..... | 71 |
| 6.1.2.1 Preparación del inóculo | 71 |
| 6.1.2.2 Determinación de la velocidad de crecimiento radial (V_{CR})..... | 73 |
| 6.1.2.4 Recuperación y determinación de la biomasa fúngica..... | 75 |
| 6.2 ETAPA II: Caracterización de los residuos agroindustriales | 76 |
| 6.2.1 Deshidratación de los residuos agroindustriales | 76 |
| 6.2.2 Caracterización fisicoquímica..... | 77 |
| 6.2.2.1 Punto crítico de humedad (PCH) | 77 |
| 6.2.2.2 Índice de absorción de agua (IAA)..... | 77 |
| 6.2.2.4 Determinación de azúcares totales..... | 78 |
| 6.3 ETAPA III Producción de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i> empleando diferentes residuos agroindustriales en cultivo sólido..... | 78 |
| 6.3.1 Preparación del inóculo..... | 78 |
| 6.3.2 Condiciones de cultivo | 78 |
| 6.3.3 Extracción y recuperación de pigmentos..... | 79 |
| 6.3.4 Consumo de sustrato | 80 |
| 6.4 ETAPA IV. Producción de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i> empleando diferentes residuos agroindustriales en cultivo líquido..... | 80 |
| 6.4.1 Preparación del inóculo..... | 80 |
| 6.4.2 Condiciones de cultivo | 80 |
| 6.4.3 Extracción y recuperación de pigmentos..... | 81 |
| 6.4.4 Consumo de sustrato | 83 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 84 |



| | |
|---|------------|
| 7.1 ETAPA I: Efecto de la composición del medio de cultivo y factores externos sobre el crecimiento y la producción de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i> en cultivo en placa..... | 84 |
| 7.1.1 Efecto de pH sobre el crecimiento y producción de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i> | 84 |
| 7.1.2 Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i> en cultivo en placa..... | 86 |
| 7.1.3 Producción de pigmentos..... | 88 |
| 7.2 ETAPA II: Caracterización de los residuos agroindustriales..... | 93 |
| 7.2.1 Caracterización de los soportes..... | 93 |
| 7.3 ETAPA III: Producción de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i> empleando diferentes residuos agroindustriales en cultivo sólido..... | 97 |
| 7.3.1 Producción de pigmento..... | 97 |
| 7.4 Etapa IV: Producción de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i> empleando diferentes residuos agroindustriales en cultivo líquido..... | 100 |
| 7.4.1 Producción de pigmentos..... | 100 |
| 7.4.2 Consumo de sustrato..... | 104 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 106 |
| 9. PERSPECTIVAS..... | 108 |
| 10. REFERENCIAS..... | 109 |

Palabras clave: Pigmentos, Fermentación sólida, Residuos agroindustriales, *Monascus purpureus*



RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se utilizó para la producción de pigmentos la cepa de *Monascus purpureus* 2955 proporcionada por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila. El trabajo fue dividido en 4 etapas en las cuales se analizó: i) El efecto de la composición del medio de cultivo y factores externos sobre la producción de pigmentos por *Monascus purpureus* en cultivo en placa, ii) La caracterización de los soportes utilizados (residuos agroindustriales), iii) La producción de pigmentos en diferentes residuos agroindustriales en fermentación sólida y iv) La producción de pigmentos en cultivo líquido empleando los residuos agroindustriales analizados en el cultivo sólido. De acuerdo a los resultados obtenidos en la primera etapa se observó que el medio de cultivo afecta el crecimiento y la producción de pigmentos por *Monascus purpureus*. El crecimiento radial de la cepa fue mayor en el medio Agar de Dextrosa Saboraud (SDA) en un tiempo final de 336 h de incubación; sin embargo la producción de pigmentos fue mayor en el medio Agar de Extracto de Malta (MEA) (2.755 UA_{495nm}), ajustado a un pH de 5 y a una temperatura de 30° C. La caracterización de los residuos agroindustriales, punto crítico de humedad (PCH), 7 presentaron un PCH menor o igual del 40 % mientras que 9 presentaron un alto índice de absorción de agua, arriba de 6.9 g gel/g de soporte seco. La mayor producción de pigmentos por *Monascus purpureus* en los residuos agroindustriales evaluados fue obtenida en *Aloe vera* en fermentación sólida (1.401 UA_{495 nm}) y en fermentación líquida (3.78 UA_{495 nm}).



1. INTRODUCCIÓN

1.1 COLORANTES NATURALES

Durante milenios, los colores han fascinado a la humanidad. Por muchos siglos, las materias primas naturales sirvieron como fuente exclusiva para los colorantes; para lo cual se usaban plantas, animales y minerales. Hay pigmentos que se producen de manera natural, como es el caso de los ocre y los óxidos, que eran utilizados en la prehistoria para la decoración de los cuerpos o para las pinturas rupestres.

Los pigmentos se definen como sustancias químicas que imparten color a otros materiales por el efecto óptico de la refracción de la luz del sol, aunque también pueden ser definidos como sustancias en polvo que cuando se mezcla con un líquido vehículo, imparte color a una superficie (Wani y col., 2004).

1.2 PIGMENTOS MICROBIANOS

Las fuentes originales de pigmentos naturales han sido las plantas y tejidos de insectos, sin embargo también es posible producir pigmentos a través del uso de microorganismos (Figura 1.1) Dentro de los microorganismos estudiados para la producción de pigmentos encontramos bacterias, levaduras, actinomicetos, algas, y hongos filamentosos (Benavente –Valdés, 2011). (Ogihara y col., 2001; Ginka y col., 2004; Zhang y col., 2006; Mapari y col., 2008). Estos microorganismos se han estudiado para conocer la naturaleza química de los



componentes causantes del color producido, así como su biosíntesis y sus aplicaciones en diversas áreas. Por otro lado, la producción comercial de pigmentos de origen fúngico es limitada, esto debido a los altos costos de producción y baja productividad en muchos casos. Entre los pigmentos microbianos más comunes podemos citar a los carotenoides, flavonoides, pigmentos proteicos, azafilonas, , antraquinonas, etc. (Morales-Oyervides, 2011).

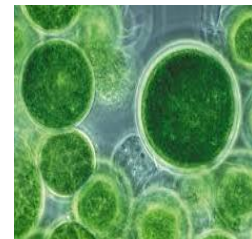
**(a) Hongo****(b) Levadura****(c) Bacteria****(d) Microalga**

Figura 1.1 Microorganismos productores de pigmentos: (a) *Penicillium purpurogenum*, (b) *Phaffia rhodozyma*, (c) *Serratia marscescences*, (d) *Chlorella vulgaris*.

Dichos compuestos son utilizados en diversas industrias, lo que incrementa su demanda, por lo que cada día se buscan fuentes súper-productoras o bien se modifican las fuentes existentes para incrementar la producción. El empleo de microorganismos, especialmente los hongos filamentosos, ha traído consigo la generación de nuevas tecnologías y nuevos pigmentos; así mismo, la obtención de estos productos puede reemplazar en gran parte el uso de colorantes químicos o sintéticos. Los hongos filamentosos han sido estudiados en su actividad



metabólica, por la generación de una cantidad de metabolitos tanto primarios como secundarios (como los pigmentos), además de su capacidad de producción extracelular y facilitar los procesos fermentativos (Carvalho y col., 2003).

Uno de los microorganismos más comúnmente usados para la producción de pigmentos comerciales es el hongo *Monascus* spp. (Teng y Feldheim, 2001), sin embargo se ha reportado que durante la producción de pigmentos este hongo también produce una mico-toxina denominada citrinina, lo cual ha limitado su aplicación en alimentos (Liu y col., 2005).

1.3 PIGMENTOS PRODUCIDOS POR *Monascus*

El hongo *Monascus* spp. Es capaz de sintetizar muchos metabolitos secundarios, tales como pigmentos, monacolinas, ácido γ -aminobutírico, ácido dimerumico y otros (Chen y Hu 2005; Cheng y col., 2010; Hong y col., 2012; Juzlová y col., 1996; Knecht y col., 2006; Liu y col. 2011; Wild y col. 2002). Los pigmentos producidos por *Monascus* han sido ampliamente utilizados en la industria alimentaria, especialmente en países como China, Japón y otros países del sureste asiático (Dufossé y col. 2005) para preparar un arroz fermentado, que encuentra diversas aplicaciones que van de conferir color a productos como el vino, el queso y la carne, usos medicinales y como conservante de carne (Wong & Koehler, 1981). Por otra parte los pigmentos producidos por *Monascus* poseen una amplia gama de actividades biológicas, tales como propiedades anti-mutagénicas y propiedades anticancerígenas (Akihisa y col., 2005a; Izawa y col., 1997; Su y col., 2005), propiedades antimicrobianas (Kim y col., 2006b;



Martínková y col., 1995, 1999), presentan características con potencial de anti obesidad (Kim y col., 2007a, b); así mismo pueden ser utilizados en el área textil (Velmurugan y col. 2010a, b).

Debido al alto potencial de los pigmentos de *Monascus* spp. Como aditivos alimentarios; este microorganismo se estudió con más intensidad en la última década (Martfnkova y col., 1995; Zhang y col., 2000, Babitha y col., 2006). No solo en países orientales se han utilizado estos pigmentos naturales, también los pigmentos rojos de *Monascus* se utilizan en países europeos, y en Estados Unidos como sustituto de nitritos para el curado de carne, por ejemplo los embutidos, los cuales deben su color rosa a la acción de los nitritos sobre la mioglobina, (Chen y Hu 2005;). De esta manera, se puede evitar el uso de compuestos nitrogenados en alimentos, disminuyendo el riesgo de padecer algún tipo de cáncer por el consumo de estos productos. En el continente asiático han sido utilizados para colorear alimentos, y como conservadores de carne y pescado, como agentes de sabor debido a sus aromas y sabores especiales (Lin y col., 2008), y en la producción de vino de arroz rojo (Maeda y col., 2007), y en la industria farmacéutica y textil. (Benavente-Valdés., 2011)

1.4 SISTEMAS DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS DE *Monascus*

El sistema de cultivo es un punto muy importante para la producción de pigmentos y también un tema de controversia. Siendo el sistema de cultivo la matriz de crecimiento de los hongos filamentosos, debe ser considerada en todas



las etapas de escalamiento y de optimización de los procesos biotecnológicos en donde se producen metabolitos de importancia para muchas industrias. Así, dependiendo del tipo de microorganismo, será el sistema de cultivo a emplear para lograr los mejores rendimientos en la producción de pigmentos, sabiendo que los resultados pueden variar de un sistema a otro, inclusive con la misma cepa (Carvalho y col., 2003).

La fermentación en estado sólido y la fermentación en estado líquido han sido los procesos más utilizados para la producción de pigmentos por *Monascus*. Los pigmentos producidos a partir de la fermentación sólida pueden ser directamente utilizados como colorantes (Liu y col., 2010) mientras que para los pigmentos producidos a partir de la fermentación líquida los pigmentos necesitan ser extraídos antes de ser usados como colorantes (Gong y col., 2002).

Para la fermentación en estado sólido comercial, hay poca información disponible sobre los principales factores que influyen en la producción de pigmentos. La fermentación en estado sólido es un proceso convencional utilizado para la producción de pigmentos por *Monascus* en China, donde el microorganismo es inoculado en charolas con arroz e incubadas aproximadamente por 20 días en un cuarto de humedad y temperatura controladas (Dufossé y col., 2005). Comparado con la producción de pigmentos por fermentación en estado líquido, los pigmentos producidos por fermentación en estado sólido presentan mayores ventajas entre las cuales se pueden mencionar: una técnica más simple, menos inversión de capital, menores niveles de inhibición por producto, una mejor recuperación del producto y un mayor rendimiento (Joshi



y col., 2003; Lee y col., 2002). Sin embargo, la fermentación en estado líquido es una alternativa muy atractiva debido a que es más fácil de manejar, requiere menores tiempos de incubación, menores costos de producción y una mayor calidad del producto (Silveira y col., 2011). Las fermentaciones empleando *Monascus* para producir pigmentos son llevadas principalmente en cultivos sólidos (Johns y Stuart, 1991), sin embargo los rendimientos han sido demasiado bajos para permitir la producción a escala industrial (Kim y col., 2002).

1.5 VARIABLES DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS DE *Monascus*

Los principales parámetros en la producción de pigmentos por fermentación en estado sólido son el contenido de humedad, temperatura, pH, tipo de sustrato y la presión parcial de oxígeno (Carvalho y col., 2006; Dufossé y col., 2005; Han y Mudgett, 1992). Por ejemplo, los máximos rendimientos de pigmentos obtenidos por *M. purpureus* ATCC 16365 fueron obtenidos a una presión parcial de oxígeno de 0.5 atm mientras que la producción fue completamente inhibida a 1.0 atm de presión parcial de dióxido de carbono (Han y Mudgett, 1992). Respecto a la producción de pigmentos por *Monascus* en fermentación en estado líquido, existen muchos factores como fuente de carbono, fuente de nitrógeno, pH, temperatura, minerales, presión parcial de oxígeno, entre otros.



1.5.1 Fuente de carbono

Las fuentes de carbono para la producción de pigmentos por *Monascus* incluyen principalmente almidón, varios monosacáridos, oligo y polisacáridos, los cuales presentan diferentes efectos en el crecimiento y la producción de pigmentos. Por ejemplo, la glucosa y sus oligo y polisacáridos resultaron mejores carbohidratos que la maltosa y fructosa para el crecimiento y producción de pigmentos por *Monascus sp.* TTWMB 6042 (Lin y Demain 1991). Existe también un efecto de la fuente de carbono sobre las características colorimétricas de los pigmentos producidos por *Monascus*. Por ejemplo, cuando se utilizó maltosa y glucosa como fuentes de carbono, *Monascus purpureus* produjo principalmente pigmentos color café oscuro, mientras que cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbón produjo pigmentos más claros (Joshi y col., 2003). Así mismo, la maltosa comparada con la glucosa fue una mejor fuente de carbón para la producción de monascorubramina por *Monascus purpureus* (Tseng y col., 2000). Además de los carbohidratos ya mencionados, se han utilizado con éxito algunos residuos agroindustriales para la producción de pigmentos, tales como el olote de maíz (Lin y col., 1992, Velmurugan, 2009) el cual contiene considerable cantidades de polisacáridos (tales como la celulosa y hemicelulosas), que promueven el crecimiento del hongo y de esa manera aumenta el rendimiento de pigmentos. Estudios realizados con *Monascus spp.* Han demostrado que la presencia de sustratos ricos en almidón, como el arroz, favorecen la producción de pigmentos. Su (1983), demostró que el empleo de arroz como fuente de carbono, incrementa la producción de pigmentos, comparado con otras fuentes, como glucosa, almidón de papa y de maíz.



1.5.2 Fuente de nitrógeno

La fuente de nitrógeno también ejerce un efecto muy importante en la producción de pigmentos. Al igual que la fuente de carbono, el empleo de fuentes complejas y orgánicas favorece la producción de pigmentos en comparación con fuentes inorgánicas (Cho y col., 2002).

1.5.3 pH y temperatura

Los rendimientos máximos de pigmento producidos por *Monascus purpureus* se obtienen generalmente en el pH inicial de 5.5 a 6.5.

Generalmente, *Monascus* spp. Crece mejor entre 25 a 32 ° C, igualmente a estas temperaturas se obtiene los mejores resultados para la producción de pigmentos (Hu y col., 2012; Joshi y col., 2003, Liu y col., 2007; Mohamed y col., 2009). Existe diferencia en la producción de pigmentos a diferentes temperaturas de cultivo. Ahn y col (2006), demostraron que cuando *Monascus* spp. J101 se cultivó a 25 °C, el rendimiento pigmentos era 10 veces más que a 30 °C.

1.5.4 Presión parcial de oxígeno

La presión parcial de oxígeno alta es tóxica para *Monascus* spp, ya sea debido a la inhibición de las enzimas esenciales para el crecimiento del microorganismo, la producción de radicales libres y compuestos reactivos, tales como el peróxido de hidrógeno, superóxido, o radicales hidroxilo o un desplazamiento del equilibrio redox en el interior la célula pueden perturbar las



reacciones de la biosíntesis en la producción de pigmentos (Onken y Liefke, 1989).

1.5.5 Humedad inicial

Se han empleado diferentes sustratos agroindustriales, tales como polvo de semilla de yaca (jackfruit), con especial atención en el control de la humedad del sistema, encontrando que a una humedad inicial de 50 % se obtienen los mejores resultados de producción de pigmentos, así mismo, a valores de humedad entre 50 y 60 % se incrementa la actividad amilasa y glucoamilasa, con lo que se obtiene mayor sustrato disponible para el crecimiento de *Monascus* spp. Y la producción de pigmentos.

1.5.6 Metales

Los iones metálicos, especialmente de Zn^{2+} y Mg^{2+} afectan en gran medida el crecimiento y la producción de los pigmentos de *Monascus* spp. (Bau y Wong, 1979; Lin y Demain, 1993). Por ejemplo, el crecimiento y la producción de los pigmentos de *M. purpureus* casi se detuvo cuando las concentraciones de Zn^{2+} fueron entre 2×10^{-3} y 3×10^{-3} Molar en medio líquido, pero las condiciones en medios sólidos fueron opuestas con la cepa NIS, se inhibe el crecimiento y la pigmentación respectivamente, a 5×10^{-5} Molar de Zn^{2+} (Bau y Wong, 1979).



1.5.7 Otros microorganismos productores de pigmentos

1.5.7.1 Pigmentos en levaduras

En el grupo de las levaduras se han utilizado microorganismo con uso industrial específico, como por ejemplo, *Phaffia rodozyma* (Carvalho y col., 2003; Durán y col., 2002; Fontana y col., 1996; Lim y col., 2002), la cual es usada en la producción de astaxantina, pigmento que tiene un mercado bien establecido a nivel mundial.

1.5.7.2 Pigmentos bacterianos

Dentro de las bacterias encontramos a *Serratia* spp. (Kim y col., 1999); *Vibrio cholerae* (Coyine y col., 1992); *Streptomyces* spp. (Gerber y Wieclawek, 1966) y *Escherichia coli* transformada genéticamente para la producción de carotenoides (Yokoyama y col., 1998); sin embargo, estos microorganismos son menos empleados para la producción de pigmentos debido a que algunos son productores de toxinas.



2. JUSTIFICACIÓN

Los colorantes sintéticos son hoy en día los pigmentos más utilizados debido a su gran variedad de colores y su bajo costo (Pattnik, 1997). Sin embargo, la demanda por colorantes sintetizados químicamente ha ido decreciendo, debido a que recientes estudios han reportado que estos colorantes artificiales presentaron efectos adversos a la salud como cáncer de piel y alergias (Kumar y Sinha, 2004). Esto ha atraído la atención por el desarrollo de bioprocesos para la producción de pigmentos naturales, como los de origen microbiano y así sustituir los pigmentos sintetizados químicamente. Las diversas industrias que buscan seguir e implementar estos procesos, en su mayoría se encuentran enfocadas a la elaboración continua de productos farmacéuticos, alimenticios y agroindustriales (Bommarius y Riebel, 2004; Pinheiro y Marsaioli, 2007). Por tales motivos es conveniente encontrar nuevas fuentes para la producción de pigmentos de origen natural.

Debido al alto costo de la tecnología utilizada para la producción de pigmentos microbianos en escala industrial, es necesario el desarrollo de procesos de bajo costo para la producción de estos pigmentos, los cuales podrían reemplazar los pigmentos sintéticos. Diversos estudios han demostrado que el uso de sustratos baratos en la fermentación en estado sólido puede lograr este objetivo. En la fermentación en estado sólido, el sustrato no solo suministra los nutrientes necesarios para que el microorganismo crezca, sino que también sirve como soporte para las células (Pandey, 2003). En años recientes, la fermentación en estado sólido ha generado mucho interés para la producción de metabolitos



primarios y secundarios. La fermentación en estado solida representa un hábitat más adecuado para el crecimiento del microorganismo, con una alta producción y un costo del proceso relativamente bajo usando residuos agroindustriales como sustrato (Pandey y col., 2001). Varios residuos agroindustriales han sido utilizados para la producción de pigmentos tales como arroz, salvado de trigo, yuca entre otros.

Sin embargo existen otros residuos que aún no han sido estudiados como sustratos para la producción de pigmentos, dentro de los cuales algunos se producen en grandes cantidades a nivel local, regional y nacional.

Por tal motivo, la utilización de residuos agroindustriales como materia prima de bajo costo para la producción de pigmentos microbianos está generando interés. El aprovechamiento de los residuos agroindustriales constituye una alternativa para solucionar los problemas de contaminación que se generan en la industria, además de promover la creación de ciencia y tecnología dedicadas a la producción de pigmentos para su posterior aplicación; abriendo de esta manera nuevas oportunidades de generación de empleos y haciendo a las empresas mexicanas más competitivas.



3. HIPÓTESIS

La cepa de *Monascus purpureus* 2955 será capaz de crecer y producir pigmentos en al menos uno de los residuos agroindustriales evaluados como única fuente de carbono y nutrientes.



4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Producir pigmentos por *Monascus purpureus* 2955 utilizando residuos agroindustriales no convencionales en fermentación sólida.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto del medio de cultivo en el crecimiento y la producción de pigmentos por *Monascus purpureus* 2955.
- Determinar el efecto del pH y la temperatura en el crecimiento de *Monascus purpureus* 2955.
- Caracterizar fisicoquímicamente cada uno de los sustratos utilizados (residuos agroindustriales) para la producción de pigmentos.
- Producir pigmentos empleando *Monascus purpureus* 2955 en fermentación sólida y comparar la producción con cultivos líquidos empleando residuos agroindustriales no convencionales.



5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 FERMENTACIÓN

La fermentación microbiana es aquel proceso donde ocurre la transformación de ciertas materias orgánicas bajo la acción de enzimas segregadas por microorganismos y que tiene una naturaleza bioquímica. Este proceso tiene lugar en ambientes aeróbicos o anaeróbicos y en él, se degradan sustancias orgánicas en compuestos intermedios que actúan como donadores y aceptores de electrones con liberación de energía. Es decir, que es un proceso de óxido-reducción (Casp y Abril, 2003; Prescott y col., 2003).

En el transcurso del proceso fermentativo, el microorganismo va aumentando su concentración y al mismo tiempo, el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas de dichos microorganismos. El fermentador (reactor) tiene dos objetivos primordiales: a) proporcionar oxígeno a las células que se están cultivando en suspensión y b) mantener las condiciones ambientales básicas (como la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH), en los niveles que sean óptimos para la producción del metabolito de interés (Galindo y col., 2007; OEA, 2006).

En el transcurso de la fermentación hay 4 fases de crecimiento, por las cuales pasa el microorganismo a través el tiempo, estas fases se muestran en la



Figura 5.1 y son la fase lag, fase exponencial, fase estacionara y fase de muerte o declinación (Willey y col., 2008).

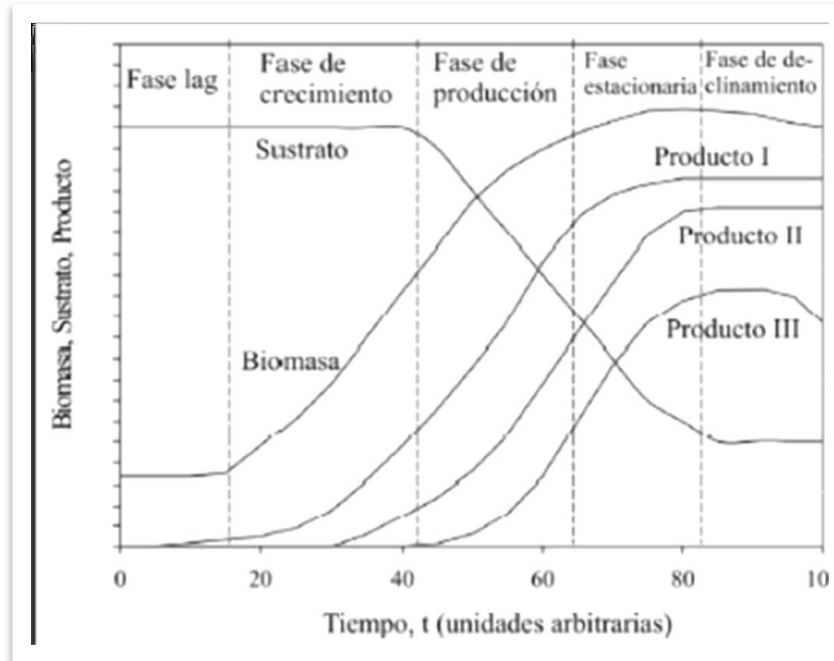


Figura 5.1 Evolución de la biomasa, sustrato y producto para diferentes tipos de fermentaciones.

La fermentación en medio sólido (FMS) ha aparecido como una tecnología potencial para la obtención de productos microbiológicos, los cuales son de utilidad en las industrias alimenticia, química y farmacéutica. La utilización de los residuos agro-industriales como sustratos en los procesos de fermentación en medio sólido proporciona una alternativa de utilización, no obstante que parecían no tener aplicación alguna. El desarrollo de bioprocesos y productos mediante fermentación en estado sólido ha mantenido un interés creciente en los últimos años. Muchas investigaciones se realizan en este tema, fundamentalmente,



dedicadas al enriquecimiento proteico de los residuos agroindustriales de la producción azucarera. Tanto la caña de azúcar como sus residuos agroindustriales se utilizan en la producción de alimento animal enriquecido en proteína por FMS.

Estas fermentaciones pueden llevarse a cabo tanto en medio líquido como en medio sólido. Una fermentación sumergida o en suspensión (FS), es aquella que se lleva a cabo con los agentes biológicos inmersos en fase acuosa (García y col., 2002). En contraparte, la fermentación en estado sólido (FES) es aquel proceso bioquímico, que aprovecha el crecimiento de microorganismos en un medio o matriz sólida, con una humedad entre 12 y 80 por ciento. La FES ocurre naturalmente en muchos sustratos. Por ejemplo, la madera en descomposición y una gran variedad de procesos de alimentos, como en la maduración del queso, el vino de arroz, el mijo y la salsa de soya.

Una de las FES más antiguas y que, al mismo tiempo es una solución ecológica al problema de los desechos putrescibles, ha sido el llamado composteo vegetal, humificación o “producción de abono” orgánico (Alfonso, 2005). Otros ejemplos de productos de la fermentación en estado sólido incluyen la producción de enzimas industriales, combustibles y nutrientes para el enriquecimiento de alimentos para animales. La fermentación en estado sólido (FMS), es una tecnología con orígenes ancestrales y consiste en una fermentación con sólidos en ausencia (o cerca a la ausencia) de agua con libre flujo. En este proceso, el sustrato debe poseer la humedad suficiente, para que el



microorganismo crezca y se desarrolle metabólicamente. Este tipo de características, le confiere a la SSF distintas ventajas sobre la fermentación líquida o sumergida (SmF), como lo son la simplicidad del medio, maquinaria poco compleja, mayores rendimientos de producto, demanda de energía reducida (Gupta y Kar, 2008), bajo empleo de agua y baja posibilidad de contaminación.

5.2 DIFERENCIAS ENTRE LA FERMENTACIÓN SUMERGIDA (FS) Y LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (FES)

En general, la fermentación en estado sólido es simple, en términos del equipo y del control del proceso, es menos costoso y con frecuencia ofrece mejores resultados si se le compara con la fermentación sumergida (Papagianni y col., 2001). Las diferencias básicas entre la FES y la FS de acuerdo con Ruiz y col. (2007) se resumen como sigue:

1. En FES, la distribución microbiana se produce en una superficie sólida, y el crecimiento microbiano y la formación del producto también se producen principalmente en la superficie. El sustrato no es uniforme y no es fácil agitarlo. El cultivo se hace al medio ambiente, por lo tanto, es heterogéneo.
2. El contenido de humedad de una FES es normalmente bajo, en función de las características físicas o químicas del sustrato. Para los medios de cultivo con alto contenido de humedad, la aireación constante es difícil.
3. El calor derivado del metabolismo y el crecimiento del microorganismo aumenta la temperatura del sustrato sólido y causa pérdida de la humedad.



4. En la FES se suele usar como sustratos, materiales naturales como por ejemplo, cereales, soja, la biomasa agrícola y de residuos sólidos.
5. Los microorganismos crecidos en la FES generalmente son hongos que pueden producir enzimas para degradar el material y penetrar en el sustrato sólido.
6. La agitación del sustrato en camas es muy difícil y el cultivo es normalmente estacionario, a excepción de los procesos realizados en fermentadores de tambor rotatorio y de lecho fluidizado.

5.2.1 Ventajas de la fermentación en estado sólido (FES)

Entre las ventajas que presenta la FES con respecto a la FS, se tiene:

1. La FES es relativamente resistente a la contaminación bacteriana, puesto que el crecimiento bacteriano está limitado por la baja actividad de agua, así que rara vez ocurre la contaminación en un medio sólido.
2. Los fermentadores son compactos, es decir que la carga volumétrica del sustrato es mucho mayor en la FES que en la FS, porque el grado de humedad es menor.
3. El tratamiento de los residuos de la fermentación es muy sencillo en la FES, ya que el contenido de humedad en los residuos de la fermentación es muy bajo, pueden ser secados y usados como piensos para animales o abono.
4. La utilización microbiana de gases del oxígeno reduce los costos por el uso de energía para la aireación.



5.2.2 Desventajas de la fermentación en estado sólido (FES)

Ruiz y col., (2007), indican que la FES tiene como desventajas:

1. La agitación del sustrato en cama es difícil. Por lo tanto, la distribución de la masa celular, los nutrientes, la temperatura, el contenido de humedad, etc., es irregular, lo que resulta en una mezcla heterogénea fisiológica, física, química y en medio ambiente del sustrato en cama. Esta complejidad hace que el control del proceso sea muy difícil.
2. El único medio para controlar la temperatura del cultivo es la aireación.
3. La determinación del crecimiento microbiano y otros parámetros fermentativos es muy difícil.
4. La microflora se limita a aquellos capaces de crecer con bajo contenido de humedad. Mohos u otros hongos filamentosos son adecuados, pero el crecimiento bacteriano es raro, a excepción de las bacterias xerófilas.

A pesar de que la fermentación en estado sólido (SSF) se ha practicado durante siglos en la preparación de alimentos fermentados tradicionales, su aplicación a los productos más nuevos en el marco de la biotecnología moderna es relativamente restringida. Se consideró para la producción de enzimas en el año 1900 y para la producción de penicilina en la década de 1940, pero el interés en SSF se desvaneció con los avances en tecnología sumergida en cultivo líquido. El predominio actual del SLF no es sorprendente: para la mayoría de los productos de fermentación, que da mejores rendimientos y es más fácil de aplicar. Es notoriamente difícil de controlar las condiciones de fermentación en SSF; estas



dificultades ya son evidentes a pequeña escala en el laboratorio y son agravados con el aumento de escala. Sin embargo, hay circunstancias particulares y los productos para los que la tecnología SSF es apropiado. Por ejemplo, un deseo de reutilizar los desechos sólidos orgánicos de la agricultura y el procesamiento de alimentos en lugar de simplemente descartando los lleva naturalmente a la utilización de SSF. Además, algunos productos microbianos, tales como enzimas de hongos y esporas, entre otros, se producen en mayor rendimiento o con mejores propiedades en el medio ambiente que ofrecen los sistemas SSF.

Con el reconocimiento del potencial de la SSF, un renacimiento del interés comenzó a mediados de 1970. Sin embargo, la base teórica para la SSF tecnología de biorreactores sólo comenzó a establecerse en 1990. Antes de esto, hay muchos ejemplos de biorreactores para la SSF, especialmente los utilizados en la industria de koji, pero había poca o ninguna información acerca de la eficiencia de los procesos de transferencia de masa y calor dentro de ellos. El trabajo que se ha llevado a cabo durante los últimos 15 años es suficiente para establecer una base general de los principios de ingeniería de biorreactores SSF.

Las condiciones ambientales, tales como la humedad, la actividad del agua, el pH, la temperatura, la concentración y disponibilidad del sustrato, la aireación, el tamaño de partículas y la forma de inoculación afectan significativamente el crecimiento y la formación de productos. En el cultivo líquido agitado, el control de las condiciones ambientales es relativamente simple, ya que estos sistemas son homogéneos desde el punto de vista de la concentración celular, nutrientes y productos. Sin embargo, se presentan serios problemas en los sistemas sólidos



con el mezclado, la transferencia de oxígeno, el intercambio de calor y el control de la humedad y el pH, debido principalmente a la heterogeneidad y la consistencia del sistema.

En este tipo de fermentaciones, la humedad del medio puede variar entre 30 y 80% (Oriol y col., 1988), en dependencia del sólido utilizado, del microorganismo y el objetivo del proceso. La actividad del agua no sólo va a afectar el crecimiento del microorganismo que en el sistema se desarrolle, sino también los productos de interés obtenidos a partir del metabolismo de dicho microorganismo.

Hoy se reconoce que no es sólo la cantidad de agua presente en el sistema la que ejerce su influencia sobre la eficiencia del proceso, sino el carácter de las interacciones entre el agua y el medio sólido. Por eso no es contradictorio observar que un mismo microorganismo se desarrolle plenamente en dos sustratos diferentes con porcentajes de humedad bastante disímiles.

El pH es otra variable que afecta el desarrollo de los procesos de fermentación en estado sólido, al igual que lo hace en otro tipo de cultivos. Este se puede ver afectado por la secreción de ácidos, o algunos otros metabolitos durante el proceso. Hablando de la fermentación en medio sólido, el control es algo complicado más no imposible; la complejidad es debida a la ausencia de instrumentos capaces de medir el pH en la capa de líquido que rodea el sólido (Mitchell y col., 2002).



Al igual que para cualquier otro organismo, la temperatura es un factor importante en el crecimiento de éstos, y también para que se lleven a cabo toda una serie de diversas y múltiples reacciones químicas, de manera que así puedan llevar a cabo todas sus actividades celulares. Este factor puede ser considerado como una variable crítica, debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo sólido-líquido-gas, lo que favorece la acumulación del calor metabólico en el sistema y un aumento de la temperatura del cultivo.

Con el aumento de la temperatura se van a favorecer tres inconvenientes: la actividad microbiana se desacelera o se detiene; se deshidrata el medio sólido, y el metabolismo se desvía como un mecanismo de defensa ante el calor o ante la deshidratación (Gutiérrez y col., 1995).

Al igual que en cualquier otro medio de cultivo, las relaciones entre algunos de sus elementos son de particular importancia; por ejemplo, carbono-nitrógeno y fósforo-oxígeno. En la mayoría de los procesos de fermentación en medio sólido participan microorganismos aerobios; es decir, que para que los microorganismos puedan crecer requieren de oxígeno, y es por esto que la aireación es un factor fundamental para el desarrollo del proceso. La aireación se utiliza para suministrar el oxígeno necesario, extraer el dióxido de carbono formado, así como para extraer el calor metabólico formado, de manera que el flujo óptimo de aire debe tomar en consideración la naturaleza del microorganismo utilizado, los requerimientos de oxígeno para el crecimiento y/o la formación del producto deseado, la velocidad de generación de calor metabólico, la concentración crítica



del dióxido de carbono y otros metabolitos volátiles, el espesor de la masa de sólido.

La aireación en las fermentaciones en medio sólido es más fácil que las fermentaciones sumergidas, porque la superficie de contacto es mayor entre el aire y el líquido que está absorbido en las partículas (Viniestra y col., 2003). El tipo de inóculo en las fermentaciones en medio sólido puede ser de dos tipos fundamentales tanto a nivel laboratorio y a nivel industrial: esporas o micelio.

La fermentación en medio sólido ha aparecido como una tecnología potencial para la obtención de productos microbiológicos, los cuales son de utilidad en las industrias alimenticia, química y farmacéutica, La utilización de los residuos agro-industriales como sustratos en los procesos de fermentación en medio sólido proporcionan una alternativa de utilización, no obstante que parecían no tener aplicación alguna.

La fórmula elemental de un microorganismo es, aproximadamente, $C_4H_7O_2N_{10}$ que supone que los componentes de las células son: carbono que representa alrededor del 50 % del peso seco, oxígeno (32 %), nitrógeno (14 %), fósforo (3 %), azufre (en torno al 1 %) y otros elementos traza entre los que se encuentran Fe, K, Mg, Mn, Co, Mb, Cu y Zn.

5.2.3 Otros sistemas de cultivo

Existen sistemas que integran el CMS y el CML, lo cual genera dudas acerca del tipo de cultivo que realmente se utiliza. Algunos sistemas emplean



cultivo líquido con partículas de arroz suspendidas en el medio lo que genera un estado semisólido. Este sistema se utiliza durante la producción de pigmentos de *Monascus* spp. (Wu y col., 2000), donde hay que controlar los niveles de oxígeno para permitir una adecuada transferencia de oxígeno en el medio.

5.3 *Monascus purpureus*

5.3.1 Taxonomía

El hongo *M. purpureus* es un hongo filamentoso no patogénico de la familia Monascaceae, de cuyo género *Monascus* se conocen 39 especies, de las que cuatro: *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber* y *M. frigidanus* representan la mayoría de las cepas aisladas de la comida tradicional oriental (Sabater-Vilar y col., 1999). *M. purpureus* fue la segunda especie en ser descubierta por el botánico y micólogo holandés F.A.F.C. Went en 1895 (F.A.F.C. Went, 2010; Hong y col., 2008). Se puede encontrar en ecosistemas marinos (Landy y col., 2006), estuarios y cualquier cuerpo de agua dulce. En el cuadro 5.3 se describe la taxonomía completa de *Monascus purpureus*.

**Cuadro 5.3** Taxonomía completa de *Monascus purpureus*.

| Taxonomía | |
|------------------|----------------------|
| Dominio | Eukaryota eukaryotes |
| Reino | Fungi |
| Subreino | Dikarya |
| Filium | Ascomycota |
| Subfilium | Pezizomycotina |
| Clase | Eurotiomycetes |
| Subclase | Eurotiomycetidae |
| Orden | Euritiales |
| Familia | Monascaceae |
| Género | <i>Monascus</i> |

5.3.2 Fisiología

Los hongos varían de mohos microscópicos y levaduras a champiñones macroscópicos y trufas (Bennet, 1998), son aerobios o anaerobios facultativos y no se conocen a la fecha anaerobios estrictos (Ochoa-Álvarez, 2004). El cuerpo de los hongos filamentosos, denominado hifas, consiste de la unión de células alargadas, unas veces seccionadas y otras carecen de división con hifas largas (células continuas con muchos núcleos) llamadas hifas cenocíticas (Tortora y col., 1992; Austin, 1993). Normalmente las hifas crecen por elongación de su punta; cuando las condiciones son adecuadas, las hifas se entrelazan entre sí y forman una gran masa conocida como micelio, la cual tiene la función de obtener los nutrimentos y de servir de anclaje al sustrato (Tortora y col., 1992; Austin, 1993).



La especie *M. purpureus* fácilmente se distingue por sus ascosporas como se muestra en la figura 5.2 de forma esférica de 5 μm , o ligeramente ovoide (6x5 μm).

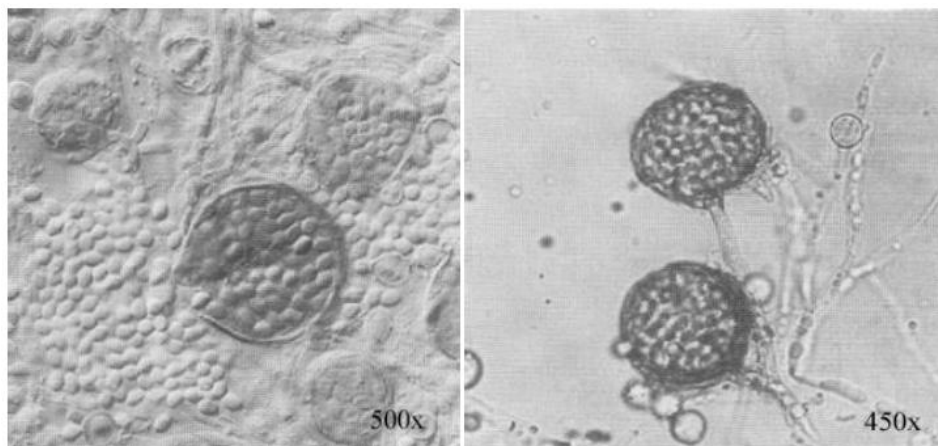


Figura 5.2 Ascosporas de *Monascus purpureus* (Samson y col., 2002).

El micelio es blanco en etapas tempranas y cambia rápidamente a rosado y posteriormente, reflejo del incremento de la acidez del medio, cambia a un color amarillo-naranja distintivo. Un profundo color rojo se forma conforme envejece el cultivo (INPR, 2006). La parte del micelio donde se realiza la producción de esporas es llamado micelio reproductivo o micelio aéreo. Dependiendo de la especie la reproducción puede ser sexual o asexual (Pelczar y col., 1977; Tortora y col., 1992).

El crecimiento de *Monascus* es un indicador clave de la síntesis de pigmentos y otros metabolitos. Los factores físicos que más influyen en el crecimiento de los hongos son: la salinidad, pH, bajo potencial del agua, altas



concentraciones de iones de sodio, baja temperatura, condiciones oligotróficas de los nutrientes y presión hidrostática (Raghukumar, 2008).

5.3.3 Categorías y estructuras de los pigmentos producidos por *Monascus*

Los pigmentos producidos por *Monascus* consisten de al menos seis pigmentos libres (Figura 5.3), dos amarillos, ankaflavina ($C_{23}H_{30}O_5$) y monascina ($C_{21}H_{26}O_5$), dos naranjas, monascorubrina ($C_{23}H_{26}O_5$) y rubropunctanina ($C_{21}H_{22}O_5$) y dos rojos, rubropuctamina ($C_{21}H_{23}NO_4$) y monascorubramina ($C_{23}H_{27}NO_4$) (Wong y Koehler, 1983; Blanc y col., 1994). El color puede ser influenciado por las condiciones del cultivo, en particular el pH y por las fuentes de fósforo y nitrógeno en el medio (Meyer, 1990).

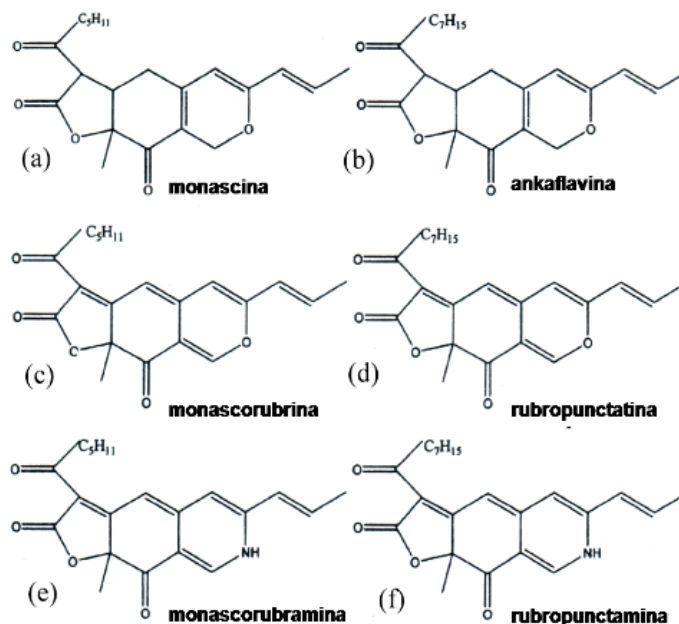


Figura 5.3 Estructura química de los pigmentos por *Monascus*, (a-b) pigmentos amarillos, (c-d) pigmentos naranjas y (e-f) pigmentos rojos (Jung y col, 2003).



5.3.4 Propiedades de los pigmentos producidos por *Monascus*.

Los pigmentos producidos por *Monascus* spp., en especial a partir de la fermentación del arroz, han sido utilizados recientemente no sólo para colorear alimentos sino por sus múltiples compuestos bioactivos. Las monacolinas y policetidos son el tipo de compuestos más abundantes en este campo de moléculas nutracéuticas, beneficiando al organismo de la siguiente manera:

1. Combaten la hipertensión arterial, la cual es una condición médica caracterizada por un incremento de las cifras de presión arterial por encima de 140/90 mm Hg y considerada uno de los problemas de salud pública en países desarrollados afectando a cerca de 1000 millones de personas a nivel mundial (Benavente-Valdés, 2011).
2. Efecto antioxidante y protección del hígado ante los radicales libres, los cuales recientemente se han relacionado no sólo con el envejecimiento, sino también con la aparición de diversas enfermedades. (Benavente-Valdés, 2011).
3. Reducir los niveles de glucosa sanguínea, ayudando así al tratamiento de personas diabéticas (Benavente-Valdés, 2011).
4. Toxicidad ante células humanas cancerígenas (Benavente-Valdés, 2011).
5. Evita el aumento de los adipocitos o células adiposas del cuerpo (Benavente-Valdés, 2011).
6. Actividad antimicrobiana, lo que hace posible su uso como conservador de alimentos (Wang y Bau, 1977).



7. Estímulo al sistema inmunológico o de defensa del organismo (Wang y col., 1989).
8. Reducir los niveles de colesterol LDL conocido como colesterol malo en la sangre, ayudando así al tratamiento de personas con hipercolesterolemia, afección cada vez más común en nuestro país. Estudios realizados a 79 pacientes demuestran que después de 8 semanas de ingerir pigmentos específicos de *Monascus*, sus niveles de colesterol LDL, colesterol total, triglicéridos y apolipoproteínas se redujeron considerablemente (Rahman y col., 2008).

5.3.4.1 Solubilidad

Los seis pigmentos bien conocidos (Figura 5.3) de *Monascus* spp. son insolubles en agua, pero se disuelven en etanol, ácido acético, hexano, etc. (Lin y col., 1992; Sweeny y col., 1981). La solubilidad de los pigmentos en agua se podría promover mediante la adición de glutamato, leucina, glicina (Lin y col., 1992; Jung y col., 2003; Jeun y col., 2008; Kim y col., 2007).

5.3.4.2 Temperatura y pH

Por lo general, los pigmentos son muy estables a temperaturas de 30 a 60 °C y pH 6,0 a 8,0 (Silveira y col., 2011). Sin embargo, algunos pigmentos siguen siendo estables incluso a altas temperaturas y valores de pH extremos. Por ejemplo, Li y col. (2003) reportaron que los pigmentos de *Monascus anka* seguían siendo relativamente estables a un pH de 11,0 y una temperatura de 150 °C.



Huang y col. (2011) encontraron que los pigmentos de *M. purpureus* eran más estables a pH básicos (9.0 a 11.0) que a pH ácidos (3.0 a 5.0).

5.3.4.3 Luz

Los pigmentos son sensibles a la luz, especialmente a la luz solar y ultravioleta, siendo los pigmentos amarillos más fotoestables que los pigmentos rojos (Fabre y col., 1993; Mapari y col., 2009). Derivados de aminoácidos de los pigmentos solubles en agua son siempre más estables que los pigmentos originales (Jung y col., 2011), los derivados de L-fenilalanina de rubropunctamina y monascorubramina fueron más estables que los pigmentos originales en presencia de irradiación de la luz solar, y las vidas medias de los pigmentos derivados de aminoácidos fueron 1.45 a 5.58 h, mientras que los pigmentos originales eran sólo 0.22 h bajo la luz solar (Sheu y col., 2000).

5.3.4.4 Otros

Los iones metálicos también pueden afectar la estabilidad de los pigmentos en cierta medida. Con frecuencia, los pigmentos son estables en la aparición de una pequeña cantidad de Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Al^{3+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , y Zn^{2+} , pero el Fe^{3+} y Fe^{2+} ejerce un efecto negativo obvio sobre la estabilidad de los pigmentos a las concentraciones de 20, 40 y 100 ppm (Song y col., 1995; Li y col., 2003; Zhang y col 2005).



5.3.4.5 Seguridad

Como colorantes alimentarios naturales, los pigmentos se han utilizado en industrias de alimentos en los países asiáticos como China y Japón, desde hace más de 10 siglos (Júzlová y col., 1996; Lin y col., 2008; Mohan Kumari y col., 2009; Jia y col 2010). En China, los pigmentos de *Monascus* spp. se utilizan como colorantes en más de 20 tipos de alimentos y no se ha reportado ningún efecto adverso (Wang y col., 2007 Gheith y col., 2008; Kumari-Mohan y col., 2009).

5.3.5 Extracción, aislamiento, purificación e identificación de los pigmentos producidos por *Monascus*

5.3.5.1 Extracción

La mayoría de los pigmentos de *Monascus purpureus* son insolubles en agua (Hajjaj y col., 1997; Qian y Wu, 2010). Los pigmentos totales se suelen extraer con etanol a diferentes concentraciones (Johns y Stuart 1991; Babitha y col., 2007; Vidyalakshmi y col., 2009 Lai y col., 2011), los constituyentes de los pigmentos insolubles en agua se consigue mediante disolventes orgánicos tales como n-hexano, benceno, metanol, etanol, entre otros y los solubles en agua para los cuales generalmente es utilizada agua destilada (Sweeny y col 1981; Lin y Lizuka, 1982; Sato y col., 1997).



5.3.5.2 Aislamiento y purificación

Los componentes de los pigmentos de *Monascus* se han aislado y purificado por cromatografía en columna (CC), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), electroforesis capilar (CE) y de alta velocidad a contracorriente en cromatografía (Lin y col 1992; Turner y col., 2009).

5.3.5.3 Identificación

En la década de 1970, se utilizó la resonancia magnética nuclear (RMN) para la identificación y aislamiento de los componentes de los pigmentos (Yoshimura y col., 1975). Hoy en día, a pesar de RMN es todavía un buen método para la identificación de la composición de los pigmentos, se combina normalmente con espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis), infrarrojo (IR), espectrometría de masas (MS), cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Akihisa y col., 2005; Loret y Morel, 2010; Mukherjee y Singh, 2011).

5.3.6 Funciones de los pigmentos producidos por *Monascus*

5.3.6.1 Propiedades anticancerígenas

Los extractos pigmentados producidos por *Monascus* tienen actividades anti-mutagénicas y anticancerígenas en un cierto punto del extracto completo, en China han encontrado efectos sobre la proliferación y la apoptosis en las células de cáncer de colon (Hongy col., 2008). En el ensayo de *Ames Salmonella*, los pigmentos rojo y amarillo extraídos de *M. anka* y *M. purpureus* inhibieron las



aminas hetero-cíclicos tales como Trp-P-2 (3-amino-1-metil-5H-pirido [4,3 - b indol] debido a la aceleración de su descomposición (Izawa y col., 1997). Otras investigaciones también han demostrado que los extractos pigmentados poseen actividades anti-mutagénicos potenciales (Ho y col., 2010; Hsu y col., 2011; Hsu y Pan 2012).

La monascina mostró actividad inhibidora marcada en la piel de ratón, carcinogénesis inducida por peroxinitrito y la luz ultravioleta B (Akihisa y col., 2005a), pero ninguna citotoxicidad sobre las células (Su y col., 2005) Hep G2 (líneas celulares de cáncer humano). La concentración inhibitoria al 50 % (CI50) de ankaflavina en células Hep G2 y A549 (líneas celulares de cáncer humano) fue de 15 mg / mL, pero ninguna toxicidad significativa en fibroblastos diploides, líneas celulares normales, tales como células MRC-5 y las células WI-38 en la misma concentración (Su y col., 2005).

5.3.6.2 Propiedades antimicrobianas

Los pigmentos libres rubropunctatina y monascorubrina tienen acción como antibióticos no sólo contra las bacterias, sino también contra las levaduras y los hongos filamentosos (Martínková y col., 1995). Los pigmentos derivados de *Monascus purpureus* poseen altas actividades antimicrobianas comparando con los derivados originales ya que los derivados son más fáciles de ser adsorbidos en la superficie de la célula bacteriana (Martínková y col., 1999; Kim y col., 2006;). Por ejemplo, los derivados de los pigmentos rojos de L-Phe, D-fenilalanina, L-Tyr, y D-Tyr mostraron actividad antimicrobiana mucho mayores contra bacterias G+ y



G- con los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de 4-8 mg / mL de los pigmentos rojos originales con MIC de 32 mg / mL, los derivados de los pigmentos rojos de L-Asp, D-Asp, L-Tyr, y D-Tyr podrían estar en contra de *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*, pero los extractos originales no (Kim y col., 2006).

5.3.6.3 Propiedades antidiabéticas

El pigmento monascina fue capaz de mejorar la sensibilidad a la insulina a través de la vía de AKT (serina / treonina proteína quinasas) por PPAR- γ estabilizando la estructura, la prevención de su fosforilación, y la inhibición de la activación de JNK (c-Jun N-terminal quinasa) (Lee y col., 2011). La monascina también confirió varias propiedades orientadas al tratamiento de ratas diabéticas por reducción de hiperglucemia, la mejora de la capacidad antioxidante y el tejido para proteger además de una resistencia contra termotolerancia y el estrés oxidativo en nematodo *Caenorhabditis elegans* mediante la regulación de la insulina FOXO/DAF-16-dependent vía de señalización (Shi y col., 2012). Estos hallazgos sugieren que la monascina tiene un potencial terapéutico en la diabetes y las complicaciones de estrés oxidativo asociadas con la diabetes (Shi y col., 2012)

5.3.6.4 Regulación de los niveles de colesterol

El derivado de treonina de pigmentos naranja disminuyó significativamente el nivel de lipoproteína de baja densidad (LDL), el aumento de la lipoproteína de



alta densidad (HDL) y la proporción de HDL a LDL en suero de los ratones (Jeun y col., 2008). Y la actividad inhibitoria contra la HMG (hidroxi metilglutaril)-CoA reductasa y la lipoproteína lipasa de L-Leu-OEt de PM fue mayor que la de su derivado de L-Trp in vitro (Kim y col., 2010).

5.3.6.5 Propiedades anti-inflamatorias

Los seis pigmentos bien conocidos de *Monascus* (Figura 5.3), exhiben potentes efectos inhibidores sobre la inflamación inducida por la 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (Akihisa y col., 2005). Existe informaron acerca de que la monascina y ankaflavina reducen la adhesividad endotelial que fueron inducidos por el TNF- α (Lin y col., 2011). La monascina podría degenerar significativamente el TNF- α y en interleucina-6 (IL-6) (asociados con la inflamación citoquinas) en tanto la proteína y los niveles de ARNm, sino que también podría con peroxisoma activado del receptor- γ (PPAR- γ) y regular la expresión de los genes anti-inflamatorios (Hsu y col., 2012; Lin y col., 2011). Así, tanto la monascina y ankaflavina pueden ser agentes anti-inflamatorios potenciales y beneficiosos para reducir el riesgo de enfermedad vascular asociada con la inflamación (Lin y col., 2011).

5.4 PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS POR *Monascus* EN RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.

Algunos procesos de degradación microbiana han sido adaptados para la producción de alimentos, compuestos terapéuticos y aminoácidos, sin embargo



existen un gran número de especies microbianas, principalmente hongos filamentosos sin explotar para su uso industrial. Dentro de estas especies se encuentran los hongos del género *Monascus*. Los hongos *Monascus* y *Aspergillus* son microorganismos que han sido utilizados desde tiempos muy remotos en países orientales en la preparación de comidas tradicionales y medicinas (Lin y Demian, 1991). A partir de los hidrolizados de cereales, *Monascus purpureus* puede producir tres tipos de pigmentos: naranjas, amarillos y rojos. Éstas moléculas debido a sus propiedades de impartir color son consideradas como colorantes naturales, los cuales a diferencia de otros colorantes de éste tipo, son altamente resistentes a altas temperaturas y a cambios extremos de pH, propiedades que los hacen atractivos en la fabricación de alimentos procesados, cosméticos, productos farmacéuticos, teñido de textiles e incluso en la elaboración de polímeros biodegradables (Domínguez y Webb, 1998).

La selección de sustrato para el proceso de Fermentación en Estado Sólido (FES) depende de varios factores, principalmente relacionados con el costo y disponibilidad. En el proceso de FES, el sustrato sólido no sólo suministra los nutrientes para el cultivo de microorganismos, sino que también sirve como un anclaje para las células (Pandey y col., 2000). Tradicionalmente *Monascus* ha sido cultivado en arroz (formación de Ang-Kak o arroz rojo), aunque otros medios de cultivo se han probado para la producción de pigmentos por este hongo. El arroz es el sustrato natural en que se ha observado el mayor rendimiento de pigmentos, en comparación con otros cereales típicos, tubérculos y plantas leguminosas



(Carvalho y col., 2003). Sin embargo, algunos de los sustratos utilizados también presentan buena producción de pigmentos, especialmente el maíz, el trigo y la yuca. El bagazo de yuca ha mostrado un rendimiento bajo de pigmento, pero al ser un residuo agroindustrial cuyo precio es bajo podría compensar su bajo rendimiento. El polvo de la semilla de sandía muy recientemente se ha identificado como un potente sustrato para la producción de pigmento por *Monascus* (Babitha y col., 2007).

5.5 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

5.5.1 Producción de cítricos en el mundo y en México

En 2009, la producción de cítricos fue la mejor de la década con 6'670,478 t de naranja, con 4,193,484 t aportó la mayor parte de ese volumen. Hasta septiembre de 2010, sumando naranja, limón y toronja, México produjo 16.6% más que el volumen total de cítricos del año anterior.

El producto más cultivado en México es la naranja, seguido del limón, la toronja y la mandarina. La producción de cítricos en México, se desarrolla en 28 estados con climas tropicales y subtropicales como se muestra en la Figura 5.4 Con un volumen de producción de 7,119,349.66 t. El principal estado productor de cítricos es Veracruz, donde se cultiva principalmente naranja, limón, mandarina, toronja, tangerina y tangelo. En segundo lugar está Tamaulipas con producción de naranja, mandarina y toronja. El tercer lugar lo ocupa San Luis Potosí con naranja



y mandarina. En el cuarto lugar se ubica Nuevo León con naranja, mandarina y toronja y en el quinto lugar se ubica Michoacán con limón y toronja. Los frutos cítricos se destinan primordialmente al mercado doméstico. Del total de la producción nacional el 88% se dirige al consumo interno y el 12% se destina a la exportación de los cuales se conforma como jugos el 1.4% y como fruta fresca el 0.44% (SAGARPA, 2011).

A nivel mundial, los dos mayores productores de cítricos son Brasil y Estados Unidos, participando con el 21.4% y 12.5% de la producción global, respectivamente. Siguen en orden de importancia México, China, España e India, representando que en conjunto producen el 27.6% del total mundial. Otros productores que merecen mencionarse son Irán, Argentina, Egipto y Turquía (FAO, 2011). México ha pertenecido tradicionalmente al grupo de los productores líderes.

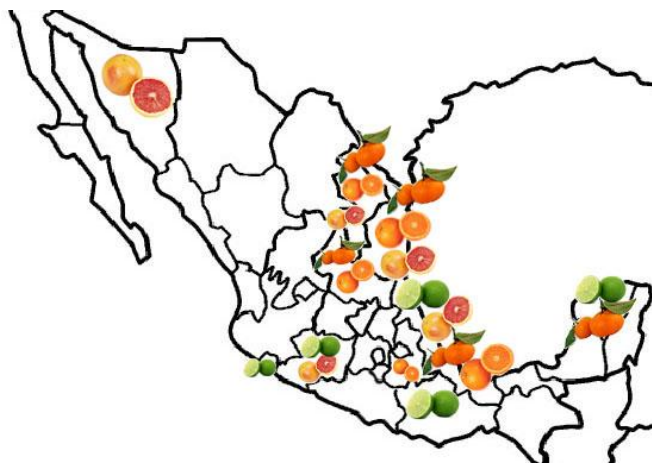


Figura 5.4 Principales Estados productores de cítricos en México.



En la actualidad, nuestro país se ubica como el quinto productor de cítricos en el mundo (ASERCA, 2010). Para México, la citricultura es una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional y se destina aproximadamente medio millón de hectáreas para este propósito, las cuales se distribuyen en 23 estados con clima tropical y subtropical de la república. El cultivo de cítricos representa una fuente importante de ingreso en zonas rurales de nuestro país. Se estima que cerca de 67,000 familias dependen de esta actividad, la que genera más de 6'000,000 t de frutos cítricos, con un valor superior a los 8,500 millones de pesos (ASERCA, 2010).

México al pertenecer al grupo de los países productores líderes en cuanto al cultivo de cítricos, y teniendo en cuenta que una gran parte de su producción se destina a consumo interno, lo convierte en un generador importante de desechos sólidos de cítricos (por ejemplo, de cáscara), ya que alrededor del 50% del fruto corresponde sólo a la cáscara (Rojas y col., 2009).

Este desecho proviene de la industria citrícola, principalmente del procesado de la fruta para la obtención de jugos. Dicho residuo normalmente se envía a tiraderos a suelo abierto generando un problema serio de contaminación. Esta situación hace deseable el aprovechamiento de los residuos citrícolas para la generación de cantidades abundantes de aceites cítricos a bajo costo para usar en procesos biocatalíticos, obteniendo derivados oxigenados de alto valor por sus aplicaciones cosméticas y farmacéuticas.



5.5.2 Naranja

La naranja es la fruta que más se produce en el mundo, alcanzando volúmenes cercanos a 80 millones de toneladas (Siller, 1998). De acuerdo con la FAO (2009) la naranja ocupa el quinto lugar de producción en México. En Diciembre de 2012 la producción de naranja aumentó 1.2% con 4.1 millones de toneladas. La naranja representa uno de los frutos de alto consumo a nivel mundial, tal como se demuestra en el Cuadro 5.4 donde se indica la distribución geográfica de producción mundial.

Cuadro 5.4 Principales países productores de naranja (FAO, 2009)

| País | Producción de naranja (t) | | | | |
|------------------|---------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 |
| Brasil | 17.853.443 | 18.032.313 | 18.685.000 | 18.389.752 | 18.340.240 |
| EUA | 8.393.270 | 8.166.480 | 7.357.000 | 9.138.980 | 8.280.780 |
| India | 3.314.000 | 3.435.200 | 4.266.900 | 4.396.700 | D.N.D |
| México | 4.112.711 | 4.156.907 | 4.248.715 | 4.306.633 | D.N.D |
| China | 2.740.931 | 2.806.225 | 3.172.910 | 3.454.125 | 4.054.125 |
| España | 2.376.230 | 3.397.011 | 2.740.300 | 3.367.000 | 2.779.600 |
| Italia | 2.261.401 | 2.346.071 | 2.197.304 | 2.527.453 | 2.478.200 |
| Egipto | 1.789.000 | 2.120.050 | 2.054.626 | 2.138.425 | 2.200.000 |
| Indonesia | 2.214.019 | 2.565.543 | 2.625.884 | 2.322.581 | 2.102.562 |

D.N.D= Datos No Disponibles

La naranja consta de exocarpo (flavedo: presenta vesículas que contienen aceites esenciales necesarios para la polinización como estímulo para el desarrollo del fruto). Existen ensayos que indican que la polinización cruzada incrementaría el cuaje, pero el consumidor no desea las naranjas con semillas. Algunos naranjos sufren apomixis celular (se produce un embrión sin que haya



fecundación) lo que origina frutos sin semillas. En el Cuadro 5.5 se muestra la composición proximal de la cáscara de naranja y se compara con la de mandarina y toronja, donde la naranja contiene mayor proteína que la toronja pero menos que la mandarina al igual que la cantidad de grasa, en cuanto a cenizas si es superior la naranja y contenido de humedad es más bajo en comparación con la mandarina y toronja.

Cuadro 5.5 Composición proximal de harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) (g/100 g bs).

| | NARANJA | MANDARINA | TORONJA |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Humedad | 3.31 ^a ± 0.19 | 4.33 ^b ± 0.07 | 7.81 ^c ± 0.10 |
| Ceniza | 4.86 ^a ± 0.02 | 3.96 ^b ± 0.21 | 2.99 ^c ± 0.20 |
| Grasa | 1.64 ^a ± 0.13 | 1.45 ^b ± 0.16 | 2.01 ^c ± 0.10 |
| Proteína | 5.07 ^a ± 0.25 | 7.55 ^b ± 0.24 | 4.22 ^c ± 0.25 |

5.5.3 Limón

Los principales países productores de este fruto son Italia, Estados Unidos, México y España. Es la especie de los cítricos más sensible al frío, ya que es la más tropical y presenta floración casi continua. Los períodos de sequía seguidos de precipitaciones juegan un importante papel en la floración. Presenta una producción bastante aceptable en suelos pobres, pedregosos y poco profundos, aunque es muy sensible a la salinidad.

Mundialmente México es el segundo productor de limón (1.9 millones de toneladas) y el primero en exportación (453 mil toneladas), mientras que Estados



Unidos es el principal importador de este fruto y el principal mercado de nuestro país (México abastece el 92.5% de las exportaciones de Estados Unidos).

Al mes de Diciembre de 2011, la producción de limón creció a una tasa anual de 7.1% equivalente a 2.1 millones de toneladas, 138 mil más a las obtenidas en 2010 (SAGARPA, 2012). La comercialización se da durante todo el año, siendo los meses más activos de julio a septiembre.

En México, los principales estados productores son Veracruz, Colima, Michoacán, Oaxaca y Yucatán. Que juntos producen 1,799,397.95 t. Más del 80% de la producción se concentra en cinco estados. En el 2011 se produjeron 2 millones 133 mil toneladas (SAGARPA, 2012).

Las características morfológicas principales de esta planta son poseer un árbol pequeño o arbusto de 4-5 m de altura, con tronco a menudo torcido y ramas con espinas axilares cortas y duras. Hojas ovales o elípticas de 2.5- 9 cm de longitud y 1.5-5.5 cm de anchura. Base redondeada y ápice ligeramente recortado. Márgenes ligeramente crenulados. Pecíolos notablemente alados. Flores blancas de 1.5-2.5 cm de diámetro, fragantes, que se disponen en inflorescencias axiliares de 1-7 flores. Frutos ovales o globosos con un ápice ligeramente deprimido, de color verde oscuro al principio pasando a verde amarillento a amarillo en la madurez. Miden 3.5-5 cm de diámetro o más. Su piel es delgada y se rompe fácilmente. La pulpa es verdosa, jugosa, muy ácida. Semillas pequeñas, ovales. Como se muestra en la Figura 5.5. El porcentaje de cáscara de limón en estado verde es de 19.65 %, en estado pintón con 19.98% y en estado maduro es de 18.91% (Puente, 2006).



Figura 5.5 Limón en estado de madurez.

5.5.4 Mango

Industrialmente la pulpa de mango se utiliza para la elaboración de concentrados, pulpas, néctares y jugos. La cascara que es un subproducto de estas industrias representa aproximadamente el 21.51% del peso de la fruta, la cual es desechada debido a que no se cuenta con ninguna tecnología para su aprovechamiento (García-Itzel, 2003).

La media de las características morfológicas de las principales variedades comerciales de mango son: un peso promedio de 350 g; una composición promedio de de 56.39% de pulpa, 21.51% de cáscara y 22.09% semilla. La pulpa es de consistencia firme, con sabor dulce y baja acidez; la cáscara es firme, de color amarillo como se muestra en la Figura 5.6 y poco resistente al manejo poscoscha (FIRA, 1997)



Figura 5.6 Mango en estado de madurez donde se aprecia la cáscara de color amarillo y firme.

El árbol de mango es erecto, de (aproximadamente de 10-30 m) de alto, con una corinilla amplia, redondeada, que puede con la edad alcanzar (30-38 m) de ancho, o una más erguida, oval relativamente delgada. En suelos profundos la raíz principal desciende hasta una profundidad de (6 m), el profuso y amplio sistema de raíces, también produce muchas raíces de anclaje que penetran en el suelo profundamente. El árbol es de vida larga, se conocen algunos especímenes que tienen 300 años y todavía fructifican.

México ocupa el segundo lugar como exportador (269 mil toneladas). Abasteciendo más del 60% del principal mercado de importación de esta fruta, a Estados Unidos. Como productor de mango se encuentra en el quinto lugar (1.6 millones de toneladas) y los principales son: India (13.6 millones de toneladas), China (4.1 millones de toneladas) y Pakistán (1.7 millones de toneladas), en 6to lugar está Brasil con 1.2 millones de toneladas.

El periodo de mayor actividad va de marzo a agosto, alcanzando su punto máximo en junio. De enero a octubre del 2011 se ha exportado alrededor de 273 mil toneladas de mango, con un valor superior a los 188 millones de dólares.



México es el sexto productor a nivel internacional Guerrero es el mayor productor, en el 2011 se produjeron un millón 536 mil toneladas. (SAGARPA, 2012).

5.5.5 Papaya

Los principales productores mundiales de papaya son India (3.9 millones de toneladas, Brasil (1.8 millones de toneladas), Indonesia (766 mil toneladas), Nigeria (764 mil toneladas) y México (616 mil toneladas), siendo México el primer lugar como exportador de papaya, sus exportaciones representan el 36.7 % del mercado mundial (90.3 mil toneladas). Brasil es el segundo exportador mundial con el 12.2% (30 mil toneladas). Estados Unidos es el principal importador de papaya con una demanda anual que va de las 100 mil toneladas a las 150 mil toneladas). La comercialización se da durante todo el año, habiendo mayor actividad de marzo a junio. En los últimos diez años las exportaciones han crecido a una tasa de crecimiento media anual del 5.8%. México es el principal exportador a nivel internacional, siendo Chiapas el mayor productor (SAGARPA, 2011).

El color de la cáscara es la característica más utilizada para evaluar la maduración de los frutos de papaya; las recomendaciones para la cosecha, comercialización y consumo se basan en la aparición de porcentajes de color verde, amarillo y naranja (Figura 5.7). La madurez de consumo de papaya maradol se alcanza entre los 13 y 15 días después de la cosecha en condiciones de almacenamiento de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ y 75% de humedad relativa. El ángulo del tono de la cáscara entre 70 y 80° , el contenido de sólidos solubles totales entre 10 y 11.5



°Brix, y la firmeza de la pulpa de 4.7 a 6.9 N/m² permitieron diferenciar dos estados de madurez de consumo.



Figura 5.7 Características del color de la papaya en su estado óptimo de madurez.

5.5.6 Piña

Su nombre científico *Ananas comosus*. Pertenece a la familia de las Bromeliáceas, que son herbáceas, que requiere climas tropicales aunque se desarrolla bien en los subtropicales, mientras no haya heladas. No necesita de suelos profundos por tener raíces superficiales, no resiste a la humedad. En el primer año sólo tiene un fruto por planta, en el segundo hay dos hijuelos por planta y por tanto dos frutos por planta, al tercer año tres y así sucesivamente.



Figura 5.8 Fruto con las condiciones óptimas para consumo.

El momento de cosecha lo indica el cambio de color de la fruta, la cual se empieza a tornar más clara y algunas variedades emiten un aroma característico. El fruto de la piña una vez recolectado no continúa con su proceso de maduración (es un fruto no climatérico), por lo tanto la cosecha debe hacerse mínimo con un cuarto de madurez, cuando el mercado está muy lejano.

La recolección del fruto se realiza manualmente con un cuchillo cortando el pedúnculo con 10 a 15 cm, utilizando canastillas que el cosechero carga en sus espaldas.

El producto debe presentarse fresco y sano, sin elementos extraños, en estado pintón y textura firme; sin deformaciones y con una sola corona (Figura 5.8). El pedúnculo debe tener entre 2 y 3 cm. México es el noveno exportador a nivel internacional, siendo Veracruz el mayor productor. En el 2011 se produjeron cerca de 742 mil 926 toneladas (SAGARPA, 2011).



5.5.7 Toronja

Las toronjas son frutos amarillos en forma de globo que miden entre 10 y 15 cm de diámetro. Encierran una pulpa jugosa, ácida, envuelta en una cáscara coriácea. La pulpa suele ser amarilla clara (Figura 5.9). Pero se han obtenido algunas variedades de color rosado.



Figura 5.9 Toronja en estado de madurez.

El árbol de la toronja necesita temperaturas cálidas durante el verano para la correcta maduración de los frutos. Presenta escasa resistencia al frío; no tolera las heladas, porque sufren tanto flores y frutos como las hojas. A diferencia de otros árboles frutales, no necesita pasar por una temporada de frío para que se dé la floración. Tampoco presenta reposo invernal, sino una pausa en su crecimiento por las bajas temperaturas, un fenómeno al que se llama quiescencia. Necesita buenas lluvias, alrededor de mil doscientos milímetros al año. Esta especie requiere mucho sol para los procesos de floración y fructificación, que tienen lugar especialmente en la parte exterior de la copa y las faldas del árbol.

La producción nacional obtenida fue de 219 mil 853 toneladas a septiembre, con respecto al programa significa un avance de 55 por ciento. Veracruz obtuvo la



mayor producción, con 97 mil 407 toneladas (30.3 toneladas por hectárea). Con un rendimiento de 12.9 toneladas por hectárea, Michoacán produjo hasta el noveno mes del año 51 mil 644 de toneladas. El mejor rendimiento en este fruto corresponde a Sonora con 35 toneladas por hectárea (SAGARPA, 2010). México es el tercer exportador a nivel internacional, Veracruz es el mayor productor. En el 2011 se produjeron 397 mil 266 toneladas (SAGARPA, 2011).

5.5.8 Mandarina

La mandarina es el fruto del mandarino, árbol que pertenece a la familia de las Rutáceas, con características similares al naranjo, aunque más pequeño y delicado. Esta familia comprende más de 1.600 especies. Además, el género botánico Citrus, que incluye a esta fruta, es el más importante de la familia y consta de unas 20 especies con frutos comestibles, todos ellos muy abundantes en vitamina C, flavonoides y aceites esenciales. Los frutos, llamados hespérides, tienen la particularidad de que su pulpa está formada por numerosas vesículas llenas de jugo. La mandarina se considera como el cítrico más afín a la naranja. Su pequeño tamaño, su sabor más aromático y la facilidad de quitar su piel, hacen de esta fruta una de las más apreciadas.

Mandarina es un nombre utilizado para una clase particular de los cítricos, se caracterizan por tener la piel delgada y en general suelta o casi suelta de los segmentos interiores. Ellas se tratan como miembros de una especie diferente, *Citrus reticulata*.



El color, tanto de su cáscara como de su pulpa, es anaranjado (Figura 5.10), en algunas variedades la piel puede tener un tono naranja rojizo. Su piel, en general, no se adhiere al fruto y su pulpa se divide en 8 ó 10 gajos que se separan con facilidad.



Figura 5.10 Color característico de la mandarina tanto de la cáscara como de los gajos.

El árbol de la mandarina puede ser mucho menos o igual en tamaño que el de la naranja dulce, dependiendo de la variedad. Con gran edad, algunos pueden alcanzar una altura de 25 pies (7,5 m) con alta difusión de las ramas. El árbol generalmente espinoso, con ramas delgadas, con las hojas tanto amplias como delgadas, lanceoladas con diminutos dientes redondeados y peciolo con a las estrechas.

Su composición es bastante similar a la de la naranja, pero posee mayor contenido hídrico y menor proporción de hidratos de carbono; su consumo aporta pocas calorías, aunque tiene menos vitamina C que la naranja es más rica en vitamina A, vitamina B y ácido fólico, destaca su contenido en calcio y en fósforo.



Es un alimento dentro de los cítricos de fácil ingestión, ya que se pela fácilmente y el comer el gajo ayuda a la digestión y es muy utilizado en dietas para la reducción de peso, ya que provoca saciedad. La mandarina se emplea para preparar jugos, mermeladas, licores, nieve y en la repostería como elemento decorativo en tartas y pasteles y su extracto se emplea en la fabricación de dulces y caramelos (Martínez, 2009).

5.5.9 Tuna

Entre los países que están desarrollando el cultivo de tuna destacan: México, Chile, Argentina, Bolivia, Perú, Colombia, Estados Unidos, Sudáfrica, Marruecos, Argelia, Túnez, Egipto, Jordania, Pakistán, Israel, Grecia, Italia, España y Portugal. Para el comercio internacional los principales productores son México, Italia, Sudáfrica, Chile, Israel y Estados Unidos.

Con aproximadamente 75,000 ha cultivos, cuatro países suman el 97.3% de la producción mundial de tuna: México (79.4%), Italia (12.2%), Sudáfrica (3.7%) y Chile (2%). México cuenta con la mayor producción del planeta con 72,500 ha dedicadas a las tunas y 10,500 de los nopalitos.

A nivel mundial, México es el principal productor de tuna, con alrededor de 20 mil productores, una superficie aproximada de 72,500 ha ubicadas principalmente en tres regiones: Puebla, Valle de México y el Altiplano Potosino-Zacatecano como se muestra en la Figura 5.11. De ello 10,500 ha se destinan para la producción de nopalitos. El rendimiento promedio de los tunales mexicanos es de 7 toneladas por hectárea de tuna fruta (5 a 20 t/ha son los extremos).



Figura 5.11 Principales Estados de México productores de tuna.

Según cifras del Sistema de Información Comercial Mexicano de la Secretaría de Economía, entre 1998 a 2001, México exportó 3.374 t de tuna, principalmente hacia EEUU (39.5%), Bélgica (26.9%), España (8.6%), Alemania (7.8%) y Holanda (5.3%).

5.5.10 Frijol

El cultivo de frijol se practica en toda la república Mexicana, sin embargo. Existen regiones que destacan por la superficie destinada a su producción y por la cantidad de grano que aportan al consumo nacional; tal es el caso de los estados de Zacatecas, Durango, Chihuahua, Sinaloa, Nayarit, Jalisco y Tamaulipas. El nombre científico del frijol es *Phaseolus vulgaris*. Planta anual, erguida, de 60-90 centímetros de alto; hojas trifoliadas, con foliolas grandes, ovadas, mucronadas, vellosas; estípulas estrechas, puntiagudas se presentan en la base de las foliolas como en las de las hojas. Flores pequeñas, blanco-amarillentas, en corto racimos axiliares. Legumbres rectas, vellosas, con tres a cinco semillas. Semillas que



varian en color y tamaño según las variedades. El rastrojo se considera la parte aérea de la planta después de removida las semillas (Figura 5.12).



Figura 5.12 Rastrojo de la vaina de frijol.

Las semillas de frijol, son de un valor excepcionalmente alto como alimento, con un 20% de aceite, 35% de proteínas y un 30% de glúcidos; no se halla presente el almidón. El alto contenido de proteína lo ha justificado como uno de los principales alimentos básicos (Lépiz, 1983).

5.5.11 Sábila o *Aloe vera*

El *Aloe* es un género de la subfamilia Asfodeloides de las Liliáceas. Desde el punto de vista técnico, el *Aloe* puede ser definido como una planta siempre verde, que puede alcanzar hasta seis metros de altura (según la variedad), con hojas largas terminadas en punta (Figura 5.13) y de consistencia carnosa dispuesta en forma de roseta, con nervadura recta y acanalada. Posee un número variable de espinas, principalmente en sus bordes (Figura 5.13). Puede soportar un estrés hídrico de hasta 90 días. Llega a su estado de madurez y puede ser cosechada entre los 14 y los 24 meses de edad dependiendo de la variedad. La planta de aloe es 98% a 99.5% agua y menos de 2% cenizas. El acíbar contiene



un 20% de aloína, que es un glucósido. El aloe contiene minerales en su hoja (Cuadro 5.6).

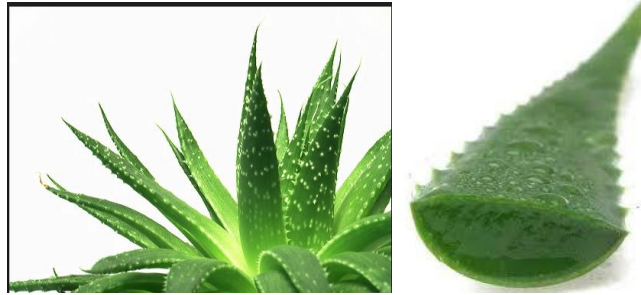


Figura 5.13 Características físicas de la hoja del aloe vera

Cuadro 5.6 Minerales presentes en la hoja del *Aloe vera*.

| Mineral | Concentración |
|--------------------|----------------|
| Aluminio | 22 ppm |
| Calcio | 140- 4,600 ppm |
| Como trazas | |
| Cobalto | |
| Hierro | 30-300 ppm |
| Magnesio | 930 ppm |
| Manganeso | 6 ppm |
| Fosforo | 6-940 ppm |
| Potasio | 100-850 ppm |
| Selenio | Trazas |
| Silicio | 22 ppm |
| Sodio | 40-510 ppm |
| Estaño | 11 ppm |
| Zinc | 11-770 ppm |



5.5.12 Alga Marina

Las algas marinas se han utilizado como alimento humano desde la antigüedad, especialmente en China, la península de Corea y el Japón. Al emigrar a otras regiones, los naturales de esos países han llevado este uso de las algas marinas a sus nuevos países, por lo que pueden encontrarse productos a base de algas saladas, desecadas y frescas en casi todas las partes del mundo. Esta es la base comercial de la industria alimentaria de las algas marinas.

Las poblaciones costeras de muchos países consumen también algas marinas, unas veces como parte de formas de vida basadas en una economía de subsistencia y otras como ingrediente habitual de ciertos tipos de ensalada, especialmente en Hawai y los países más cálidos del Asia sudoriental, como por ejemplo Indonesia, Malasia, Filipinas y Tailandia. Estos productos se recolectan y venden localmente, y no se conoce su volumen ni su valor (FAO, 2011).

5.5.12.1 Utilidad de las algas

Las algas son uno de los elementos naturales más empleados últimamente con diversos fines. Es que, además de la alimentación, también permiten crear biocombustibles y ser destinadas para la producción de cosméticos. Así es como las algas tienen usos que repercuten saludablemente en lo ecológico, pero asimismo en las personas que las consumen.

Las algas están siendo muy difundidas en el mundo entero en muchas de sus clases y en sus diferentes utilizaciones. Ya sean micro o macroalgas, estas son importantes porque sus usos van desde la alimentación hasta la generación de biocombustibles.



5.5.12.2 Usos fundamentales de las algas

- **Para producir biocombustibles.** Hace años ya que se vienen cultivando con tales motivos, sobre todo para conseguir bioetanol, biobutanol y biodiesel, en donde algunas algas funcionan de maravilla, generando una baja en el impacto ecológico y en ahorro de fuentes petrolíferas.
- **Para tratamientos cosméticos.** Son muy saludables para la piel, el cabello y otras partes del cuerpo. Por eso mismo, no extraña que su utilización se haya vuelto moneda corriente en productos como champús o también en trucos de belleza caseros.
- **Para la alimentación.** Este es el uso más clásico de las algas. Allí se encuentran agrupadas una gran cantidad de ellas, ofreciéndote variedad, nutrición y la garantía de estar consumiendo algo sano y natural. Las algas arame, las kombu y las wakame son algunas de ellas.

5.5.12.3 Otros usos de las algas marinas

Las algas marinas se utilizan desde hace tiempo como aditivos para suelos, principalmente en zonas costeras donde es fácil transportar las algas frescas o parcialmente desecadas a la zona que ha de fertilizarse. Las algas marinas actúan como acondicionador del suelo por su alto contenido de fibra y como fertilizante por su contenido de minerales. Las algas pardas de grandes dimensiones (especies de *Laminaria* y *Ascophyllum* en Europa, *Sargassum* en países más cálidos como Filipinas) son las más utilizadas, pero la aparición de fertilizantes químicos sintéticos ha reducido su mercado. Más recientemente, se han comercializado extractos líquidos de algas marinas que se aplican a cultivos más



costosos, como las hortalizas y las vallas; se consiguen productores mejores y de crecimiento más rápido, habiéndose relacionado estos resultados con la presencia en los extractos de hormonas vegetales similares a la auxina. En Sudáfrica se utilizan cada año unas 500 toneladas de Ecklonia fresca para obtener esos extractos, pero en el Reino Unido y Nueva Zelandia también se obtienen se productos similares a partir de otras algas pardas (FAO, 2011).



6. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UAAAN y del Departamento de Ingeniería Química de la UAdeC, en Saltillo, Coahuila, México. Este trabajo se dividió en 4 etapas experimentales, las cuales se describen a continuación.

6.1 ETAPA I. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y FACTORES EXTERNOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS POR *Monascus purpureus* EN CULTIVO EN PLACA.

Se utilizó la cepa de *Monascus purpureus* CECT 2955 adquirida de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España) y fue proporcionada por el Departamento de Ingeniería Química (Universidad Autónoma de Coahuila). La cepa fue reactivada y conservada en una solución de leche descremada y glicerol a un pH de 7.0 (9 % leche descremada y 10 % glicerol) a una temperatura de -21°C en un congelador para los estudios correspondientes.



6.1.1 Preparación del inóculo

La cepa fue reactivada en el medio YPS (Cuadro 6.1) El medio fue esterilizado por autoclavado (Market Forge, USA) a 121°C por 15 min y una presión de 15 psi, a una temperatura de 30°C por un periodo de 10 días.

Cuadro 6.1 Composición del medio YPS

| Composición | Concentración, gL ⁻¹ |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| Extracto de malta | 4.00 |
| Almidón soluble | 7.50 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.50 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.25 |
| Agar | 7.5 |

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 30 mL de una solución estéril de Tween 80 (0.01 % v/v) para remover las esporas mediante agitación mecánica (Thermolyne, USA) por un tiempo de 10 minutos. La cuantificación de esporas se realizó en una camarilla de Neubauer utilizando la Ecuación 6.1:

$$N_{o\text{ esporas}}(\text{mL}^{-1}) = P_{\text{esporas}} * 25 * f_{\text{dil}} * 1 \times 10^4 \quad (6.1)$$

Dónde:

P_{esporas} : Promedio de esporas resultantes del conteo realizado en un determinado número de cuadros de la camarilla,

f_{dil} : Factor de dilución empleado,

1×10^4 : Factor de conversión volumétrico de la camarilla.



6.1.1.2 Condiciones de cultivo para propagación de la cepa

Se evaluó el efecto del pH sobre el crecimiento del microorganismo empleando el medio YPS (Cuadro 6.1). El pH del medio fue ajustado a tres diferentes niveles (5, 6, 7) con HCl 0.1 M y NaOH 0.1 M, además de un control sin ajustar (pH 7.46). Los medios de cultivo ajustados a distintos valores de pH se inocularon en el centro de la placa de Petri con una suspensión de esporas a una concentración de 3×10^6 esporas mL^{-1} . Las cajas se dejaron en reposo por un periodo de 12 horas antes de ser incubadas. Se incubaron a una temperatura de 30°C por un periodo de 192 h. Una vez transcurrido el tiempo se evaluaron los medios cualitativamente para seleccionar el que presentó mejores características, de acuerdo al criterio siguiente:

6.1.1 Efecto de pH sobre el crecimiento y producción de pigmentos por *Monascus purpureus*.

Se realizó mediante un criterio cualitativo de acuerdo al Cuadro 6.2.

Cuadro 6.2 Criterio cualitativo para la selección del pH.

| Criterio | Crecimiento |
|----------|-------------|
| Bueno | *** |
| Moderado | ** |
| Malo | * |



Este criterio se utilizó para la selección del pH a utilizar en las etapas subsecuentes del experimento.

6.1.2 Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de pigmentos por *Monascus purpureus* en cultivo en placa.

6.1.2.1 Preparación del inóculo

La cepa fue reactivada en el medio YPS como se indicó en la subsección 6.1. La evaluación del efecto de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y producción de pigmentos por *Monascus purpureus* CECT 2955 se llevó a cabo empleando 6 medios de cultivo ampliamente utilizados para el desarrollo de hongos filamentosos: Agar dextrosa saboraud (SDA, Cuadro 6.3), agar papa dextrosa (PDA, Cuadro 6.4), agar extracto de malta (MEA, Cuadro 6.5), agar extracto de levadura (YM, Cuadro 6.6), agar Czapek con extracto de levadura (CYA, Cuadro 6.7) y medio de arroz (MA, Cuadro 6.8). Estos medios de cultivo han sido reportados para la producción de pigmentos por hongos filamentosos (Medio ATCC 336, Su y col., 1983; Kim y col., 1999; Velmurugan y col., 2009; Hernández-Rivera, 2006).

Cuadro 6.3 Agar Dextrosa Saboraud (SDA), 65.0 g L⁻¹.

| Composición | Concentración, g L ⁻¹ |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| Digerido pancreático de caseína | 5.0 |
| Digerido pancreático de tejido animal | 5.0 |
| Dextrosa | 40.0 |
| Agar | 15.0 |

**Cuadro 6.4** Agar papa dextrosa (PDA), 39.0 g L⁻¹.

| Composición | Concentración, g L ⁻¹ |
|-------------|----------------------------------|
| Papa | 200.0 |
| Dextrosa | 20.0 |
| Agar | 20.0 |

Cuadro 6.5 Agar extracto de malta (MEA), 61 g L⁻¹.

| Composición | Concentración, g L ⁻¹ |
|-------------------|----------------------------------|
| Extracto de malta | 20.0 |
| Peptona de carne | 1.0 |
| Sacarosa | 20.0 |
| Agar | 20.0 |

Cuadro 6.6 Extracto de levadura (YM).

| Composición | Concentración, g L ⁻¹ |
|----------------------|----------------------------------|
| Agar | 20.0 |
| Dextrosa | 10.0 |
| Extracto de levadura | 3.0 |
| Peptona | 5.0 |

Cuadro 6.7 Czapek con extracto de levadura (CYA), 56.0 g L⁻¹.

| Composición | Concentración, g L ⁻¹ |
|--|----------------------------------|
| Extracto de levadura | 5.0 |
| Agar Czapek | 50.0 |
| (3g ZnSO ₄ , 5g CuSO ₄ , 100 ml de agua) | 1.0 |

**Cuadro 6.8** Medio de arroz (MA), 96.0 g L⁻¹.

| Composición | Concentración, g L ⁻¹ |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Arroz | 40.0 |
| Malta | 9.0 |
| Glucosa | 30.0 |
| MnSO ₄ 7H ₂ | 2.0 |
| Agar | 15.0 |

Todos los medios fueron esterilizados en una autoclave (Sterilmatic STME, USA) a una presión de 15 psi por de 15 minutos y 121°C. Las cajas de Petri fueron inoculadas al centro con un disco de agar de 4 mm de diámetro con crecimiento de la cepa reactivada previamente. Las cajas fueron identificadas e incubadas a 30°C por un período de 14 días.

6.1.2.2 Determinación de la velocidad de crecimiento radial (V_{CR})

El crecimiento radial de la cepa en los medios de cultivo fue evaluado diariamente, las cajas fueron marcadas con los cuatro ejes en la parte inferior externa para seguir el crecimiento de la colonia (Figura 6.1). Las mediciones del crecimiento radial se realizaron del centro a los extremos de la placa. La evaluación de la velocidad de crecimiento radial (V_{CR}) se llevó a cabo por triplicado.

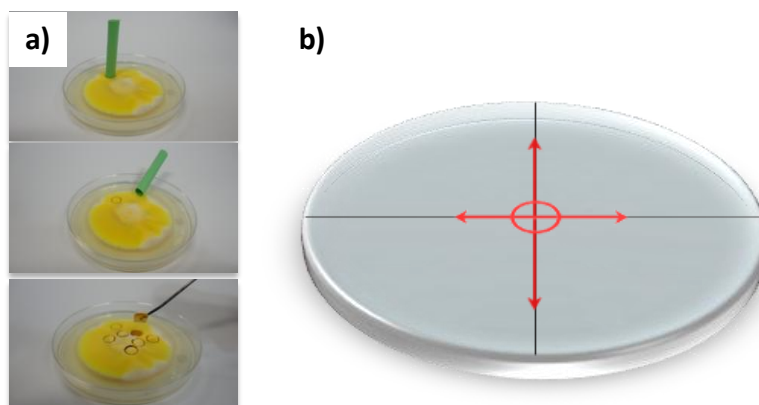


Figura 6.1 Imagen ilustrativa del método seguido para la medición de crecimiento radial, (a) Procedimiento de inoculación en el centro de placas de Petri para la evaluación de la velocidad de crecimiento radial (V_{CR}) mediante discos con crecimiento. (b) Dirección en que se midieron el crecimiento o capacidad de invasión en mm h^{-1} (Benavente-Valdés, 2011).

Para calcular la V_{CR} , se obtuvieron los valores de las pendientes a partir del gráfico de crecimiento del microorganismo en función del tiempo, tomando únicamente los valores lineales de la curva de crecimiento. De esta manera se obtuvieron los valores de la velocidad específica de crecimiento radial o velocidad de invasión, la cual se expresó en unidades de longitud por unidad de tiempo (mm h^{-1}).

6.1.2.3 Evaluación de la producción de pigmentos

Una vez concluido el tiempo final de incubación (336 h) se cortaron cinco cilindros de agar conteniendo pigmento y fueron colocados en tubos de taparrosca (16 x 150 mm). La recuperación de pigmentos se realizó siguiendo la metodología por Su y col. (1983) para pigmento extracelular y por Velmurugan (2008) para



pigmento intracelular. Se adicionó 1.0 mL de una solución de etanol al 90% por cilindro de agar, posteriormente se colocaron en un baño con agua a temperatura de ebullición empleando un baño de temperatura controlada por un periodo de 10 minutos. Los extractos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se microfiltraron empleando membranas de celulosa de 0.45 μm (Millipore, USA). Los extractos microfiltrados fueron depositados en tubos eppendorf y almacenados a una temperatura de 4°C (Torrey, México). Los extractos almacenados fueron mantenidos en oscuridad hasta su análisis.

El análisis de la producción de pigmentos se realizó por la medición de la máxima absorbancia (λ_{max}) del extracto de pigmento obtenido mediante un barrido de exploración en el espectro electromagnético UV-visible desde los 300 hasta los 700 nm (Lin y Demian 1992). Para llevar a cabo el barrido de exploración se empleó un espectrofotómetro Cary 50, UV-Visible (Varian, USA), tomando en cuenta el factor de dilución de la muestra. Se utilizó como blanco cada uno de los medios evaluados sin inocular.

6.1.2.4 Recuperación y determinación de la biomasa fúngica

La recuperación de la biomasa fúngica a partir de los cultivos en placa fue realizada de acuerdo a la metodología reportada por Adjari-Zahra y col. (2011). El contenido de las cajas de Petri fue calentado hasta disolver el agar con agua a 120°C. El agar disuelto fue filtrado a través de papel filtro # 5 (Whatman, USA) con el objetivo de recuperar la biomasa. La biomasa fue lavada con agua destilada a una temperatura de 60-70°C para eliminar cualquier resto de agar. La



determinación de biomasa se llevó a cabo por el método gravimétrico el cual consiste en llevar la biomasa a peso constante en un horno de secado (Felisa, México) a 80°C por 24 h.

6.2 ETAPA II: CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Los residuos agroindustriales evaluados fueron: 1) cáscara de mango, 2) cáscara de papaya, 3) cáscara de piña, 4) cáscara de naranja, 5) cáscara de limón, 6) cáscara de toronja, 7) cáscara de mandarina, 8) cáscara de tuna, 9) Vaina de frijol, 10) restos de las hojas de *Aloe Vera* 11) alga marina y 12) granos de arroz. Los residuos de naranja, mandarina, papaya, piña, toronja, limón y frijol, fueron obtenidos de un supermercado local (Saltillo, Coahuila). Los residuos de tuna, mango, *aloe vera*, alga marina y arroz fueron proporcionadas por el Departamento de Ingeniería Química (Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila).

6.2.1 Deshidratación de los residuos agroindustriales

Las frutas (limón, naranja, toronja, mandarina, piña y papaya) fueron lavadas y desinfectadas, y el fruto fue separado de la cáscara. Posteriormente las cáscaras fueron deshidratadas a una temperatura de 60°C en un horno por convección (CEB-2600, México) por 48 h. Para la vaina de frijol no fue necesario deshidratar. Una vez deshidratados los residuos, estos fueron triturados en un molino de discos (Thomas-Wilye, USA), y tamizados para obtener un tamaño de



partícula del número 80 (W.S. Tyler, USA). El material tamizado fue almacenado en frascos de vidrio hasta su posterior uso.

6.2.2 Caracterización fisicoquímica

6.2.2.1 Punto crítico de humedad (PCH)

La determinación del punto crítico de humedad (PCH) se llevó a cabo mediante la estimación de la humedad de cada uno de los residuos agroindustriales utilizando una termobalanza. Se colocaron 1.0 g de muestra a una temperatura de 120°C por 60 minutos utilizando el método de la AOAC (1980) para obtener el PCH de cada residuo agroindustrial.

6.2.2.2 Índice de absorción de agua (IAA)

El índice de absorción de agua (IAA) fue determinado de acuerdo a la metodología descrita por Anderson y col. (1969) utilizando una suspensión del residuo que consistió en 1.25 g de residuo y 15 mL de agua destilada. Previo a la centrifugación, la suspensión fue agitada vigorosamente durante 10 minutos y colocada en un tubo de centrifuga de 50 mL previamente tarado. La centrifuga (Sorball, Biofuge Primo R Thermo Centrifugation, USA) fue operada a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente (22.5°C), el sobrenadante fue decantado y el peso del gel fue reportado. El IAA fue expresado como gramos de gel/gramos de soporte seco.



6.2.2.4 Determinación de azúcares totales

La cuantificación de azúcares totales fue realizada mediante una técnica colorimétrica reportado por Dubois y col. (1956). En presencia de ácido sulfúrico concentrado, los polisacáridos son hidrolizados a monosacáridos, a su vez estos son degradados a compuestos intermediarios que en presencia de fenol forman productos color amarillo-naranja estables, siendo la intensidad del color naranja proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes en solución.

6.3 ETAPA III PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS POR *Monascus purpureus* EMPLEANDO DIFERENTES RESIDUOS AGROINDUSTRIALES EN CULTIVO SÓLIDO

6.3.1 Preparación del inóculo

La cepa fue reactivada en el medio SDA (Cuadro 6.3) a una temperatura de 30°C por un periodo de 10 días en matraces de 250 mL. La cuantificación de esporas se realizó en una camarilla de Neubauer utilizando la Ecuación 6.1.

6.3.2 Condiciones de cultivo

Se colocaron 5.0 g de sustrato (residuo agroindustrial) en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, adicionando 2.0 mL de una solución de sales minerales (Cuadro 6.9), ajustando el pH de la solución a 5.0 con HCl 0.1 M y NaOH 0.1 M. La humedad inicial del residuo agroindustrial fue ajustada a 50% con agua destilada. Los medios empleados fueron esterilizados en una autoclave (Sterilmatic STME, USA) a una presión de 15 psi por un tiempo de 15 min y



121°C. El matraz se inoculó con una suspensión de esporas a una concentración de $\{1 \times 10^4$ esporas $\text{mL}^{-1}\}$ de *Monascus purpureus* en la solución humectante y posteriormente éstos fueron incubados a 30°C durante 14 días. El experimento fue realizado por triplicado.

Cuadro 6.9 Solución de sales para la fermentación sólida.

| Composición | Concentración, g L^{-1} |
|--------------------------|----------------------------------|
| KH_2PO_4 | 2.0 |
| NH_4NO_3 | 5.0 |
| NaCl | 1.0 |
| MgSO_4 | 1.0 |

6.3.3 Extracción y recuperación de pigmentos

La extracción de los pigmentos fue realizada de acuerdo a la metodología reportada por Babitha y col. (2007). Una vez concluido el tiempo de fermentación se adicionó 1.0 mL de etanol al 70% por cada gramo de material fermentado. Las muestras fueron puestas en agitación por una 1 h a 200 rpm empleando un agitador orbital (New Brunswick, USA). Una vez transcurrido el tiempo de agitación, las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C (Sorball, Biofuge Primo R Thermo Centrifugation, USA). El sobrenadante se microfiltró a través de una membrana de celulosa de 0.45 μm (Millipore, USA). La cuantificación del pigmento producido se realizó mediante medición espectrofotométrica (Cary 50, UV-Visible Varian, USA) de la absorbancia



a una longitud de onda de 390 nm para pigmentos amarillos y 495 nm para pigmentos rojos (máxima absorbancia). La concentración de pigmentos se expresó en unidades de absorbancia (UA).

6.3.4 Consumo de sustrato

La determinación de los azúcares residuales en las muestra al final del cultivo, fue evaluado mediante la metodología reportada por Dubois y col. (1956), para azúcares totales.

6.4 ETAPA IV. PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS POR *Monascus purpureus* EMPLEANDO DIFERENTES RESIDUOS AGROINDUSTRIALES EN CULTIVO LÍQUIDO.

6.4.1 Preparación del inóculo

La cepa fue reactivada en el medio SDA como se indicó previamente. La cuantificación de esporas se realizó en una camarilla de Neubauer utilizando la Ecuación 6.1.

6.4.2 Condiciones de cultivo

Para la evaluación del crecimiento y producción de pigmentos de *Monascus purpureus* CECT 2955, en cultivo líquido se emplearon los mismos residuos agroindustriales evaluados en cultivo sólido; el medio de cultivo empleado para llevar a cabo la fermentación en estado líquido se muestra en el cuadro 6.10, en donde el residuo agroindustrial fue la única fuente de carbono utilizada. El pH de cada medio de cultivo fue ajustado a 5.0 con HCl 0.1 M y NaOH 0.1 M. Los medios



fueron esterilizados en una autoclave (Sterilmatic STME, USA) a una presión de 15 psi por 15 minutos y 121°C.

El medio de cultivo fue inoculado con una suspensión de esporas de *Monascus purpureus* (5.14×10^4 esporas mL⁻¹) en matraces Erlenmeyer de 125 mL, conteniendo 50 mL del medio de cultivo, los matraces inoculados fueron incubados a 27±3°C en un agitador rotatorio (Innova 43 New Brunswick Scientific) a 125 rpm por un periodo de 14 días.

Cuadro 6.10 Medio de producción de pigmentos por *Monascus purpureus* empleando residuos agroindustriales en cultivo líquido.

| Composición | Concentración, g L ⁻¹ |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| Residuo agroindustrial* | 20.0 |
| NH ₄ Cl | 2.50 |
| K ₂ HPO ₄ | 5.0 |
| KH ₂ PO ₄ | 5.0 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.1 |
| CaCl ₂ | 0.025 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.01 |
| MnSO ₄ | 0.02 |

*Se emplearon once diferentes residuos agroindustriales previamente mencionados.

6.4.3 Extracción y recuperación de pigmentos

La recuperación de pigmentos extracelulares fue realizada de acuerdo a la metodología reportada por Babitha y col. (2007). Una vez concluido el tiempo de fermentación las muestras fueron colocadas en tubos de centrifuga de 50 mL (Axygen, USA) y centrifugadas a 8000 rpm por 20 minutos a 4°C (Sorball, Biofuge Primo R Thermo Centrifugation, USA). Posteriormente el sobrenadante se



microfiltró a través de membranas de celulosa de 0.45 μm (Millipore, USA). La cuantificación del pigmento producido se realizó mediante medición espectrofotométrica (Cary 50, UV-Visible Varian, USA) de la absorbancia a una longitud de onda de 390 nm para pigmentos amarillos y 495 nm para pigmentos rojos (máxima absorbancia). La concentración de pigmentos se expresó en unidades de absorbancia (UA).

Por otra parte la extracción del pigmento intracelular, éste fue realizada a partir de la biomasa precipitada obtenida en la centrifugación según la metodología reportada por Velmurugan (2009); la biomasa fue lavada con agua destilada con el objetivo de remover los restos de pigmento extracelular. La biomasa fue transferida a un matraz de 125 mL, en dónde se adicionó etanol al 70% a la biomasa a una relación del 50% del volumen inicial antes de la fermentación y se mantuvieron en agitación durante una hora a 200 rpm en una agitador orbital (New Brunswick, USA). Posteriormente las muestras fueron transferidas a tubos de centrifuga de 50 mL (Axygen, USA) y centrifugadas a 8000 rpm por 20 minutos a 4°C (Sorball, Biofuge Primo R Thermo Centrifugation, USA). El sobrenadante se microfiltró empleando membranas de celulosa de 0.45 μm (Millipore, USA) para su posterior análisis. La cuantificación del pigmento producido se realizó mediante medición espectrofotométrica (Cary 50, UV-Visible Varian, USA) de la absorbancia a una longitud de onda de 390 nm para pigmentos amarillos y 495 nm para pigmentos rojos (máxima absorbancia). La concentración de pigmentos se expresó en unidades de absorbancia (UA). Así mismo, también fue llevado a cabo un análisis colorimétrico de los pigmentos obtenidos empleando



el sistema CIELab empleando un colorímetro de líquidos ColorEye XTS (GretagMacbeth, USA).

6.4.4 Consumo de sustrato

La determinación de los azúcares residuales en las muestra al final del cultivo, fue evaluado mediante la metodología reportada por Dubois y col. (1956), para azúcares totales.



7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 ETAPA I: EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y FACTORES EXTERNOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS POR *Monascus purpureus* EN CULTIVO EN PLACA.

En la presente etapa se evaluó el medio de cultivo y las mejores condiciones (pH, Temperatura) para la preparación del inóculo a usar en las siguientes etapas.

7.1.1 Efecto de pH sobre el crecimiento y producción de pigmentos por *Monascus purpureus*.

El pH es un parámetro de suma importancia para el crecimiento y la producción de pigmentos en hongos filamentosos ya que regulan el metabolismo y la actividad enzimática relacionada con la biosíntesis de los procesos internos y el intercambio de nutrientes entre el medio de cultivo y la célula. En el Cuadro 7.1 se muestran los resultados para la evaluación cualitativa del efecto del pH sobre el crecimiento de *Monascus purpureus* 2955. Se puede observar que a valores de pH ácidos el crecimiento se ve favorecido, presentándose el mayor crecimiento a un valor de 5.0.

**Cuadro 7.1** Efecto del pH sobre el crecimiento de *Monascus purpureus*.

| pH | Crecimiento |
|------|-------------|
| 5 | *** |
| 6 | ** |
| 7 | * |
| 7.46 | * |

Estos resultados demuestran que el pH claramente afecta el crecimiento y síntesis de pigmentos para esta cepa de *Monascus purpureus*. Resultados similares han sido reportados para hongos productores de pigmentos. En una cepa de *Monascus purpureus* 192F se observó que el crecimiento y la actividad metabólica del hongo se vieron favorecidos a un pH de 4.0. Siendo este comportamiento mas evidente por el alto consumo de glucosa a un pH ácido de 4.0 y las altas concentraciones de glucosa residual a un pH de 6.5 (Chen and Johns, 1993). Por lo contrario Su y col. (1983) encontró en un estudio con una cepa de *Monascus purpureus* que el pH óptimo para la producción de biomasa y pigmentos fue de 6.0, mientras que a pH mayores de 7.0, la producción de pigmentos disminuyó notablemente. Suhr y col. (2002) trabajando con una cepa de *Penicillium caseifulvum* productora de un pigmento amarillo, encontraron que a pH 4.0 se intensifica la producción de este metabolito. En el presente trabajo se estableció un pH de 5.0 para el crecimiento y la producción de pigmentos por *Monascus purpureus* 2955.



7.1.2 Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de pigmentos por *Monascus purpureus* en cultivo en placa

La cepa de *Monascus purpureus* 2955 fue capaz de crecer en todos los medios de cultivo evaluados. Se observó que la velocidad de crecimiento radial está relacionada con el tipo de medio de cultivo empleado.

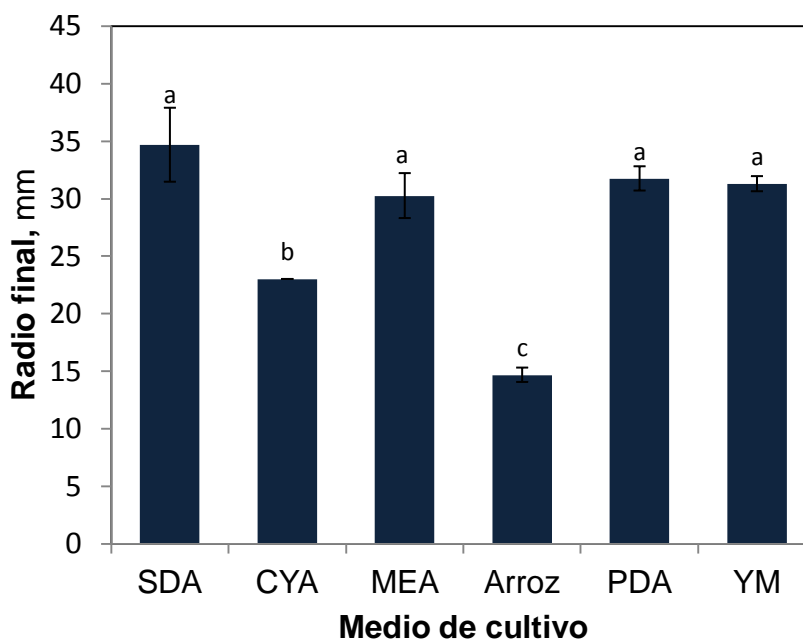


Figura 7.1 Radio final de invasión (mm) por *Monascus purpureus* bajo los diferentes medios de cultivo evaluados a las 336 h.

La Figura 7.1 muestra el radio final de crecimiento del microorganismo, en donde se observa que la mayor capacidad de invasión se obtuvo en el medio SDA (34.66±3.21 mm) mientras que en el CYA se presentó el menor crecimiento (23.00±0.01 mm) después de 336 h de cultivo. Carvalho y col. (2007) evaluaron la velocidad de crecimiento radial a las 264 horas de 4 cepas diferentes de



Monascus en caja de Petri utilizando como medio PDA, observando que la cepa LPB31 mostró un crecimiento de 35 mm de radio mientras que la cepa 3802 al mismo tiempo de incubación presentó un crecimiento de 20 mm. Estos resultados nos sugieren que el crecimiento del microorganismo es dependiente de la cepa y del medio de cultivo evaluado.

La Figura 7.2 resume la velocidad de crecimiento radial (V_{CR}) para cada uno de los medios de cultivo evaluados. En esta Figura se puede apreciar que la cepa de *Monascus purpureus* presentó una mayor velocidad de crecimiento radial en el medio SDA (1.00 ± 0.009 mm h⁻¹), seguido de los medios MEA, PDA y YM (0.083 ± 0.001 , 0.085 ± 0.04 y 0.086 ± 0.002 mm h⁻¹, respectivamente), no habiendo diferencia significativa entre ellos. El medio que presentó la velocidad de crecimiento radial más baja fue el medio de Arroz con 0.044 ± 0.002 mm h⁻¹. Estos resultados son muy similares a los reportados por Ajdari y col. (2011), en donde se estudiaron los requerimientos nutrimentales para el mejoramiento del crecimiento y esporulación de cepas de *Monascus* utilizando diferentes medios de cultivo reportando una velocidad máxima de crecimiento radial de 0.12 mm h⁻¹ para *Monascus purpureus* FTC5391 en el medio MEA y una velocidad de crecimiento menor de 0.069 mm h⁻¹ para *Monascus purpureus* DSM1379 en el medio PDA.

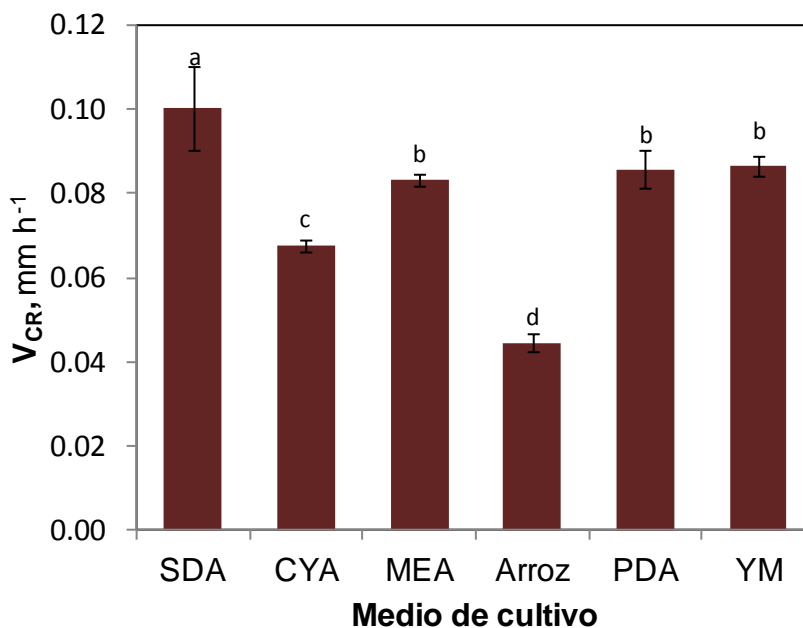


Figura 7.2 Velocidad de crecimiento radial (mm h⁻¹) por *Monascus purpureus* bajo los distintos medios de cultivo evaluados a las 336 h.

7.1.3 Producción de pigmentos

El análisis de la producción de pigmentos se realizó de acuerdo a lo descrito por Tseng y col. (2000), donde la concentración del pigmento es expresado como la densidad óptica a su máxima absorbancia. La Figura 7.3 ilustra el resultado de los barridos de exploración para cada uno de los medios de cultivo evaluados (SDA, PDA, MEA y Arroz). Se observó claramente que las máximas absorbancias se encontraron a una longitud de onda de 495 nm y 390 nm para la mayoría de los medios evaluados, lo que indica la presencia de pigmentos rojos y amarillos respectivamente. Así mismo no se observó la presencia de un pico a los 470 nm, lo que sugiere la ausencia de pigmentos naranjas. Esto coincide con lo



reportado para la producción de pigmentos por *Monascus spp.* (Cho y col., 2002; Domínguez y col., 2002; Velmurugan y col., 2009).

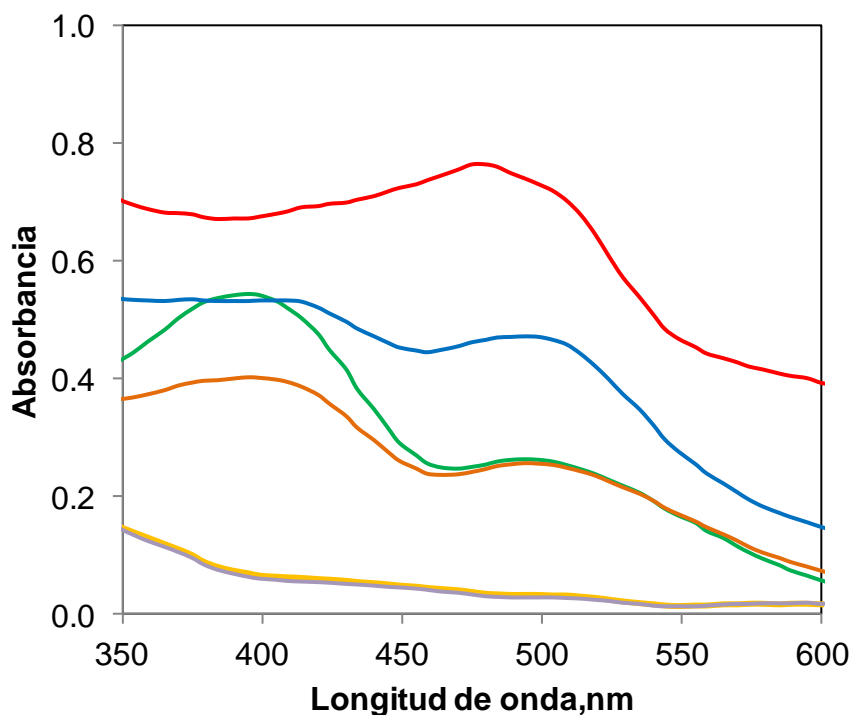


Figura 7.3 Barridos de exploración de los seis medios de cultivo analizados:
■ SDA, ■ PDA, ■ Arroz, ■ MEA, ■ CYA, ■ YM

Se encontró la producción de pigmentos rojos (495 nm) solo en los medios SDA, PDA, MEA y Arroz mientras que la producción de pigmentos amarillos (390 nm) solo fue encontrada en los medios YM y PDA. Con base en esto se seleccionó la longitud de onda de 495 y 390 nm para evaluar la producción de pigmentos rojos y amarillos respectivamente en las etapas subsecuentes.

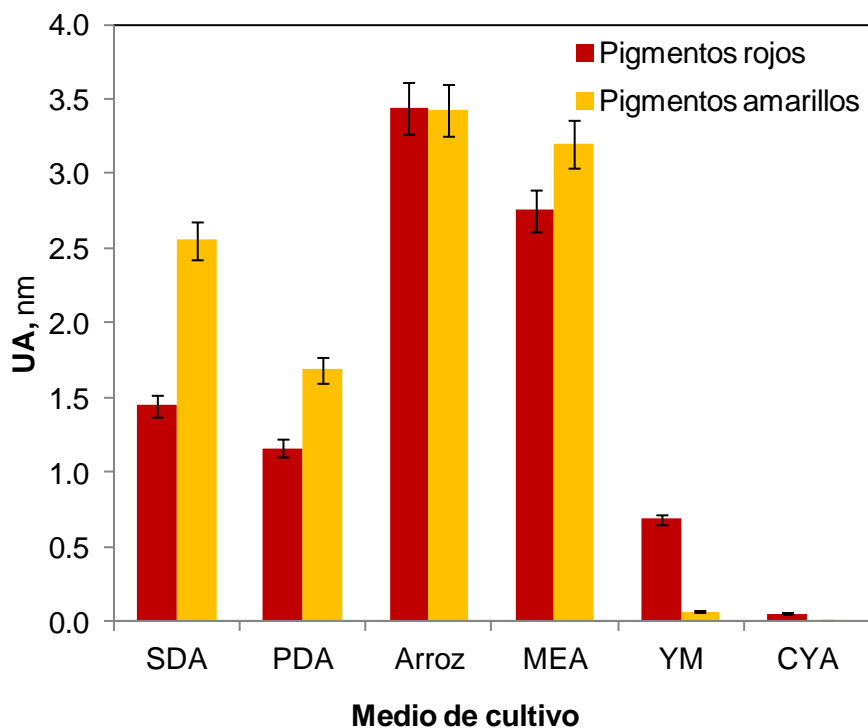


Figura 7.4 Producción de pigmentos por *Monascus purpureus* en diferentes medios de cultivo después de 336 h de incubación.

Los resultados de producción de pigmentos son presentados en la Figura 7.4. Se puede observar que la producción de pigmentos es mayor en el medio MEA tanto en pigmentos rojos como amarillos (2.755 ± 0.75 UA_{495nm}, 3.205 ± 0.71 UA_{390nm}). Esto es atribuido a la fuente de carbono ya que el medio MEA contiene sacarosa como fuente de carbono, lo cual coincide con lo reportado por Velmurugan (2009) donde se empleó sacarosa como fuente de carbono y se incrementó la producción de pigmentos amarillos en cinco distintas cepas productoras (*M. purpureus*, *P. farinosus*, *E. nidulans*, *F. moniliforme* y *P. purpurogenum*). Se ha reportado que la presencia de sacarosa ha mostrado efectos positivos sobre la producción de pigmentos por *Monascus* (Soo y col.,



2000; Cho y col., 2002). Benavente-Valdés (2011) reportó la mayor producción de pigmentos amarillos (2.971 ± 0.255 UA_{400nm}) por *Penicillium pinophilum* utilizando como fuente de carbono sacarosa. Sin embargo, no se alcanzaron los niveles de producción de pigmentos que lo obtenido utilizando el medio de Arroz (3.43 ± 0.89 UA_{495nm}, 3.425 ± 0.93 UA_{390nm}) el cual fue empleado como control debido a que es el sustrato comúnmente utilizado para la producción de pigmentos por *Monascus*. La producción de pigmentos más baja se presentó al utilizar el medio CYA (0.055 ± 0.014 UA_{495nm}, 0.015 ± 0.014 UA_{390nm}).

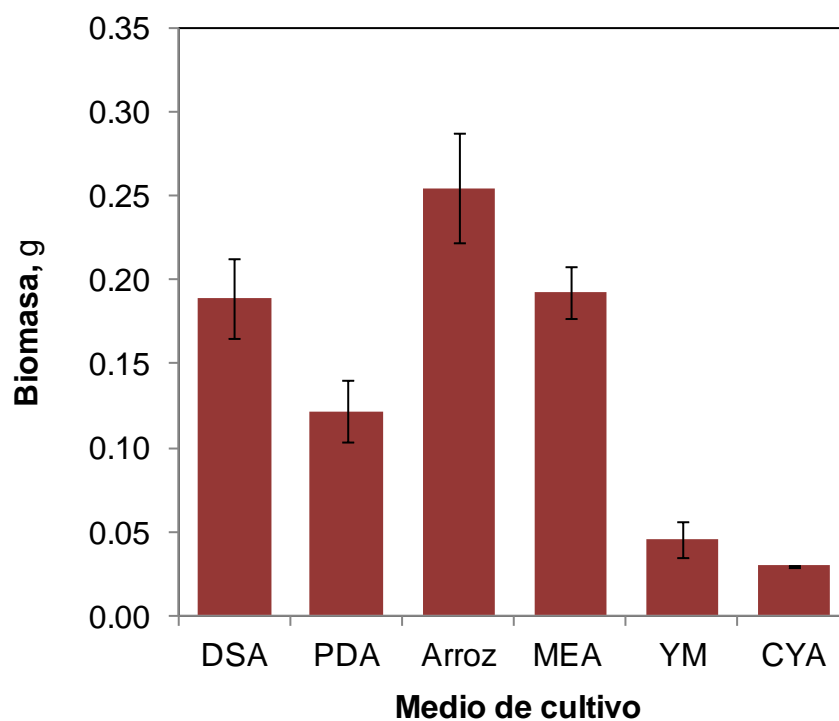


Figura 7.5 Producción de biomasa en base seca para cada uno de los medios de cultivos evaluados a un tiempo final de 336 h.



La Figura 7.5 ilustra la biomasa obtenida para cada uno de los medios de cultivo evaluados. Se puede apreciar que la biomasa está relacionada con la producción de pigmentos. La mayor producción de biomasa fue obtenida con el medio control Arroz (0.254 ± 0.032 g) y en el medio MEA (0.192 ± 0.014 g) mientras que la menor producción de biomasa se presentó en el medio CYA (0.025 ± 0.0070 g).

De acuerdo a los resultados anteriores, el medio de cultivo MEA fue seleccionado para la producción de pigmentos rojos y amarillos por *Monascus purpureus* 2955.



7.2 ETAPA II: CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

7.2.1 Caracterización de los soportes

En la Figura 7.6 se muestran los resultados obtenidos del análisis del índice de absorción de agua (IAA) de cada uno de los residuos agroindustriales evaluados. Los residuos que presentaron un mayor porcentaje de IAA son la cáscara de piña, seguida de la cáscara de toronja y *Aloe vera* (10.53 ± 0.60 , 9.85 ± 0.05 y 9.57 ± 0.03 g gel/g soporte respectivamente), aunque el resto de los residuos tiene valores no muy lejanos a los ya mencionados, sólo el alga marina y la cáscara de tuna son los que tienen un porcentaje de IAA más bajo (4.22 ± 0.09 y 2.25 ± 0.02 g gel/g soporte respectivamente). El IAA representa la cantidad de agua que puede ser absorbida por el soporte. Se prefieren materiales con altos valores de IAA, ya que presentan una mayor facilidad para modificar el contenido de humedad durante los cultivos sólidos. De acuerdo con Orzúa-González (2009), el IAA de 10 residuos agroindustriales (cáscara de nuez, barbas de coco, cáscara de pistache, cáscara de naranja, salvado de trigo, cáscara de limón, cáscara de manzana, residuos de frijol, residuos de lechuguilla y follaje de gobernadora), es distinto dependiendo del tipo de material; en este estudio 6 de los residuos están por debajo de los 6 g gel/g de soporte seco, y podemos observar que en el presente trabajo los resultados favorecen su empleo como soportes para la fermentación sólida debido a que 9 de los residuos evaluados en el presente estudio mostraron un IAA superior 6 g gel/g de soporte seco.

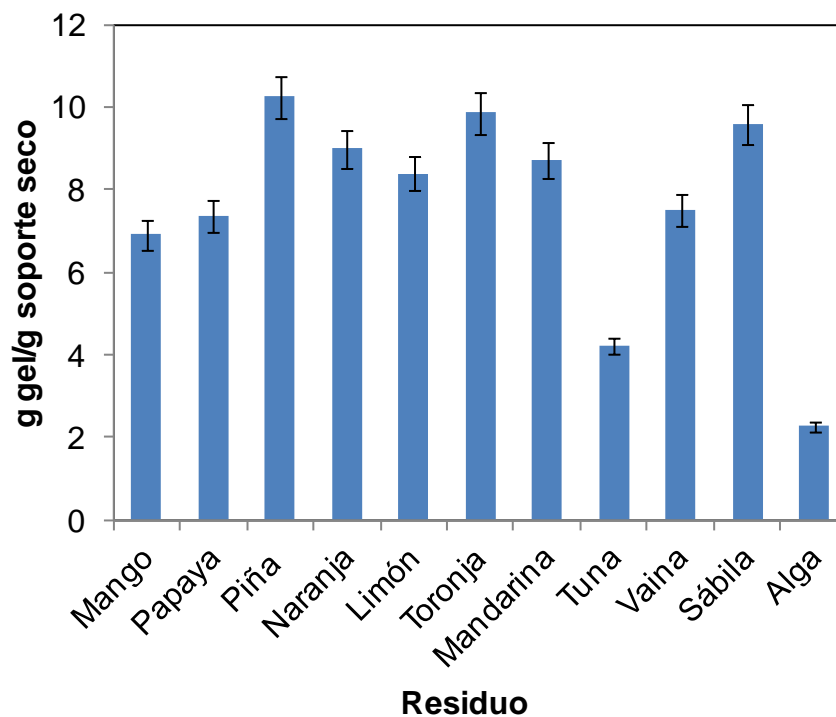


Figura 7.6 Índice de absorción de agua para cada uno de los residuos agroindustriales.

El estudio del análisis del punto crítico de humedad (PCH) de los soportes se muestra en la Figura 7.7. El punto crítico de humedad representa la cantidad de agua ligada al soporte que no puede ser empleada por el microorganismo y se encuentra fuertemente relacionado con la actividad de agua (a_w).

La a_w es la cantidad de agua disponible en el soporte para las funciones metabólicas del microorganismo. Los valores reportados en la literatura se encuentran entre 0.88 y 0.99. Los valores superiores al 40 % de PCH indican que el agua no se encuentra ligada al soporte, si no en solución y por lo tanto esto afecta el crecimiento fúngico, en cultivos sólidos se requiere que los PCH sean



bajos para poder modificar el valor de la humedad en función del contenido del medio absorbido. Cuatro soportes (cáscara de piña, tuna, vaina y alga marina) presentaron valores superiores al 40% mientras que los 7 restantes están dentro del rango de los PCH permitidos. Los valores obtenidos son similares a los reportados por Orzúa-González (2009) para condiciones similares.

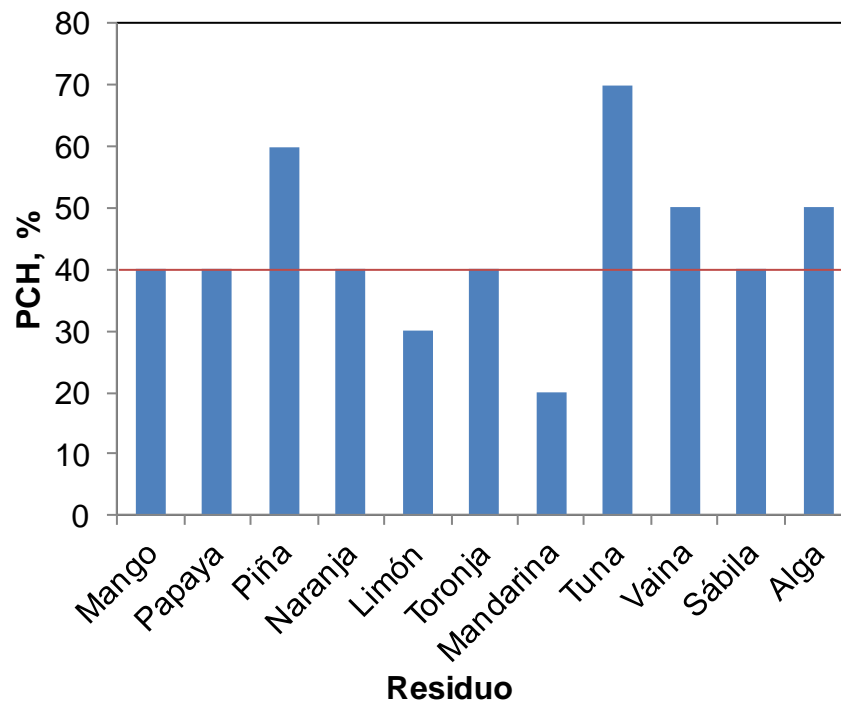


Figura 7.7 Punto crítico de humedad (PCH) para los residuos agroindustriales estudiados.

En la Figura 7.8 podemos observar la concentración de azúcares en cada uno de los residuos agroindustriales antes de la fermentación, donde la cáscara de mango presentó la mayor concentración (15.94 g/L) seguida de la cáscara de tuna (15.45 g/L), mientras que el alga marina presentó la menor concentración de azúcares (0.2 g/L) seguida de la sábila (0.86 g/L). El resto de los residuos tienen



una concentración entre los 9 y los 12 g/L. Mejía-Giraldo y col. (2007), reportaron para la cáscara de mango un valor de 15.44%, mientras que para la cáscara de tuna se ha reportado un contenido de carbohidratos del 4% (Velázquez-Arellano, 2012). Buslig (1991) menciona que la cantidad de azúcares en la cáscara de naranja puede variar de entre el 7 y el 12% y para la cáscara de piña un contenido aproximado del 21.09 % (Castaño y col., 2010). Estos residuos contienen un material vegetal que contiene una gran cantidad de material lignocelulósico el cual puede ser aprovechado para la obtención de azúcares fermentables utilizados en procesos biotecnológicos.

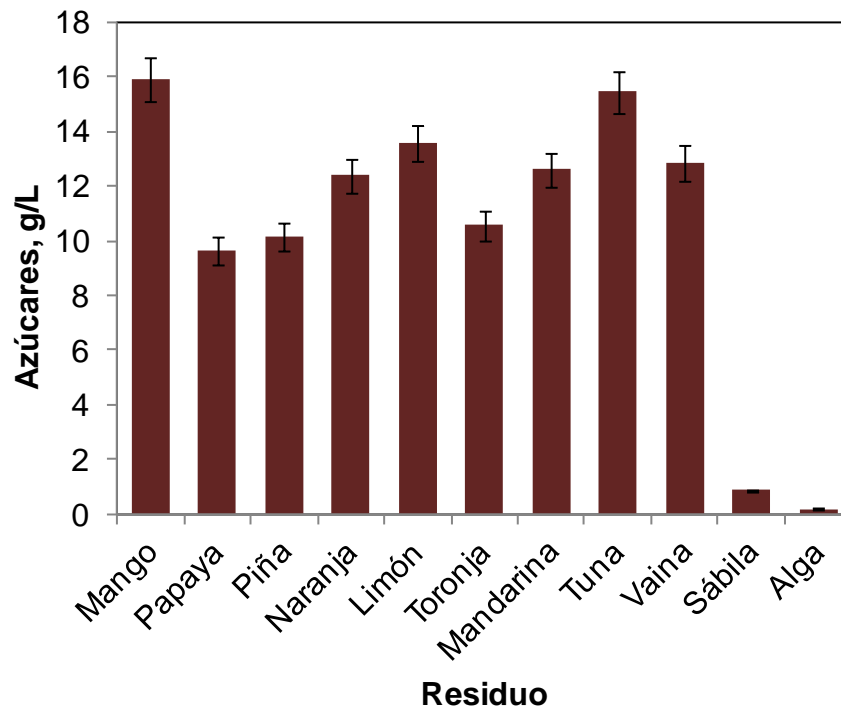


Figura 7.8 Concentración de azúcares totales para los distintos residuos agroindustriales evaluados.



7.3 ETAPA III: PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS POR *Monascus purpureus* EMPLEANDO DIFERENTES RESIDUOS AGROINDUSTRIALES EN CULTIVO SÓLIDO.

7.3.1 Producción de pigmento

Los resultados de la producción de pigmentos en medio sólido son presentados en la Figura 7.9. Se observó que la mayor producción se presentó en el residuo de sábila para pigmentos rojos (1.781 ± 0.73 UA_{495nm}) mientras que la vaina de frijol (0.244 ± 0.23 UA_{495nm}) y piña (0.190 ± 0.16 UA_{495nm}) mostraron poca producción. En cuanto la producción de pigmentos amarillos el residuo de mango mostró el mayor rendimiento (2.37 ± 0.132 UA_{390nm}), seguido por el limón (1.55 ± 0.73 UA_{390nm}) y la mandarina (1.38 ± 0.23 UA_{390nm}). Sin embargo se observó que la producción de pigmentos rojos en el medio de arroz utilizado como control (15.905 ± 3.46 UA_{495nm}) es sumamente elevada en comparación a los residuos en estudio. Los residuos que los que no fue posible producir pigmentos fueron papaya y tuna.

Velmurugan y col. (2011) reportó una producción para pigmentos amarillos de 18.92 UA_{412nm} y para pigmentos rojos de 14.26 UA_{412nm} a una humedad del 60% en sustrato de mazorca de maíz. Sin embargo en ese trabajo la humedad fue controlada durante todo el experimento en comparación con el presente estudio, donde solo se controló la humedad inicial. Se ha demostrado que la humedad está altamente relacionada con el rendimiento en la producción de pigmentos por *Monascus purpureus* (Velmurugan y col., 2011). El decremento en la humedad tiene como resultado la baja disponibilidad de nutrientes debido a la reducida



disolución de sales, así como una menor transferencia de calor y oxígeno (Babitha y col., 2007).

Resultados similares han sido reportados por Kernel (2009) para pigmentos de *Monascus purpureus* en polvo de arroz ($1136.6 \text{ U}^{-1} \text{ mL/g}$).

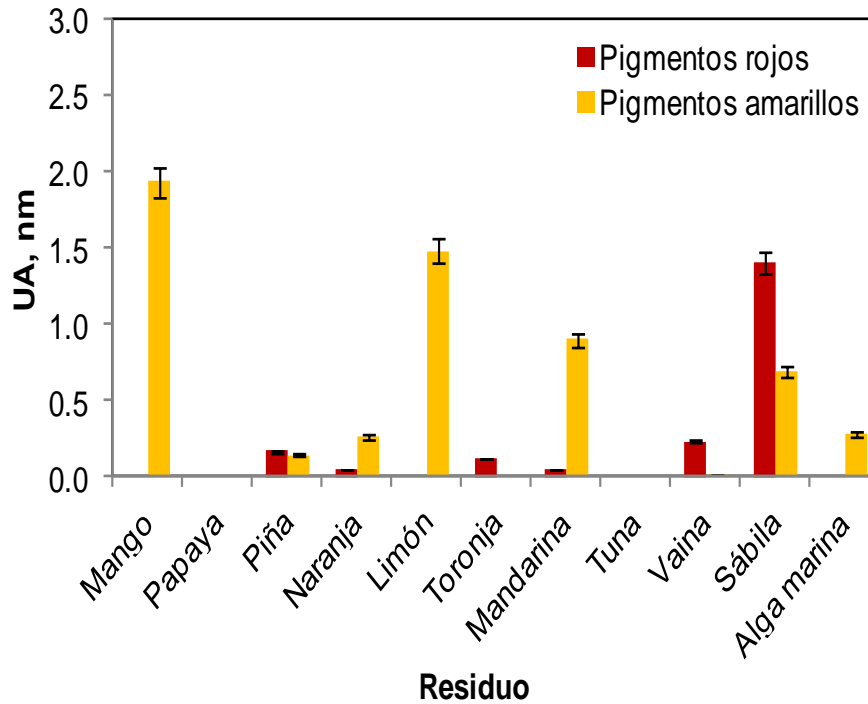


Figura 7.9 Producción de pigmentos por *Monascus purpureus* al tiempo final de fermentación para cada uno de los residuos evaluados.

7.3.2 Consumo de sustrato

La Figura 7.10 ilustra el resultado de consumo de sustrato por *Monascus purpureus*. El mayor consumo de sustrato se presentó en el residuo de toronja



(63.23%), sin embargo no fue este residuo el que presentó la mayor producción de pigmento. Los residuos con menor porcentaje de consumo fueron la papaya y piña (12.36 y 17%, respectivamente) siendo estos residuos los que arrojaron menor producción de pigmento. Estos resultados nos indican la necesidad de realizar un estudio cinético que incluya la producción de pigmentos, biomasa y consumo de sustrato para encontrar una relación más específica del crecimiento y la producción de pigmentos por *Monascus purpureus* sobre el consumo de sustrato.

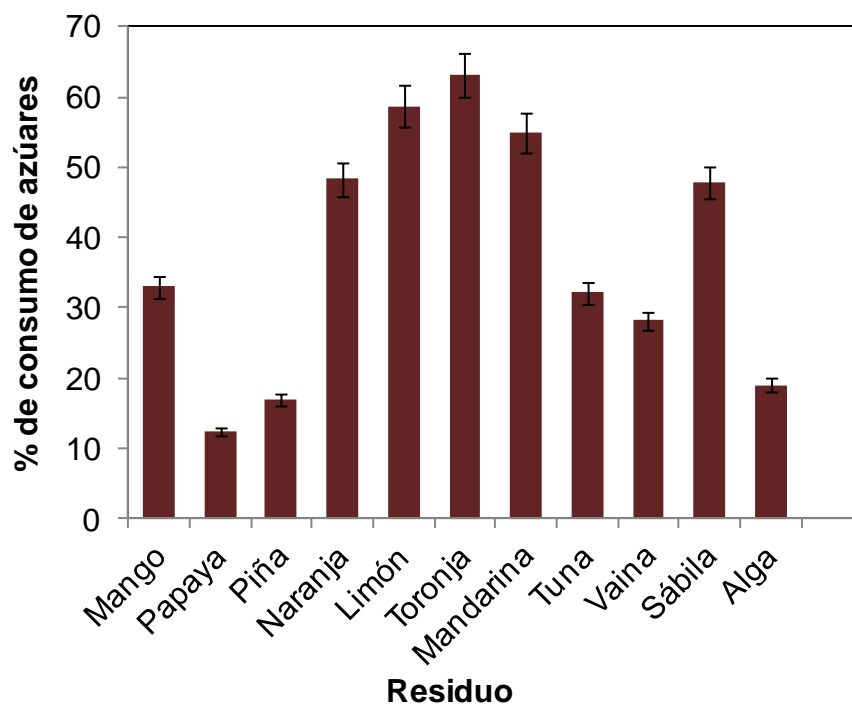


Figura 7.10 Consumo de azúcares por *Monascus purpureus* al tiempo final de la fermentación sólida.

Los resultados obtenidos en esta etapa resaltan el potencial aprovechamiento de los residuos agroindustriales como fuente de sustrato para la producción de pigmentos y su aplicación en procesos biotecnológicos integrales.



7.4 ETAPA IV: PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS POR *Monascus purpureus* EMPLEANDO DIFERENTES RESIDUOS AGROINDUSTRIALES EN CULTIVO LÍQUIDO.

7.4.1 Producción de pigmentos

En la Figura 7.11 se muestran los resultados de la producción de pigmentos al término de la fermentación líquida. De acuerdo a los resultados se observa que en todos los residuos se produjo pigmento (ya sea rojos, amarillos, o ambos).

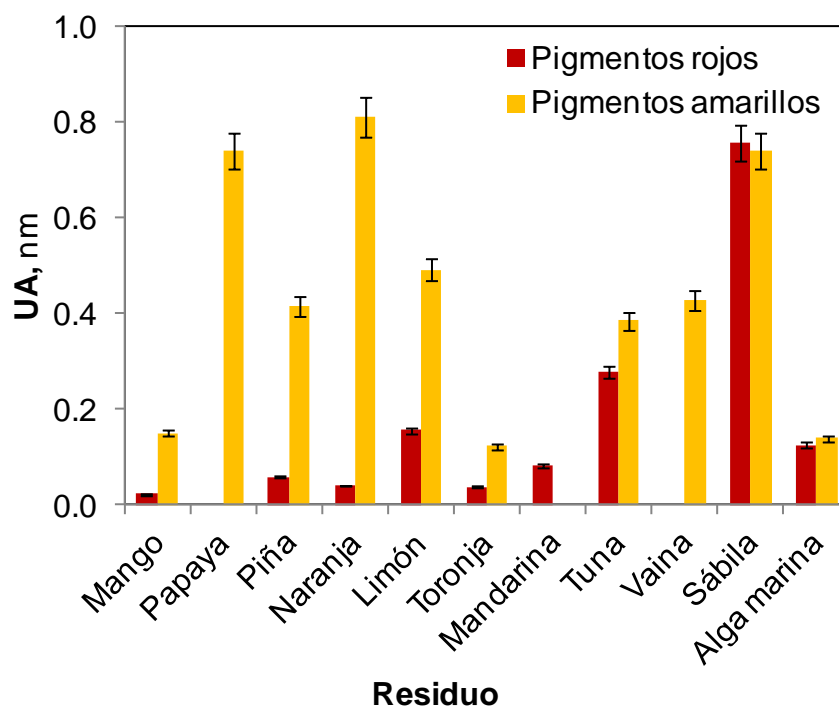


Figura 7.11 Producción de pigmentos por *Monascus purpureus* para los distintos residuos en medio líquido.

La mayor producción de pigmentos rojos se observó en el residuo de sábila (0.757 ± 0.055 UA_{495nm}), seguido por la tuna (0.278 ± 0.046 UA_{495nm}) mientras que la menor producción se observó en el mango (0.023 ± 0.02 UA_{495nm}). Por lo contrario



los residuos de papaya y vaina no se presentaron producción de pigmentos rojos. En cuanto la producción de pigmentos amarillos, el residuo de naranja presentó la mayor producción con 0.812 ± 0.015 UA_{390nm}, seguida de la papaya (0.741 ± 0.05 UA_{390nm}), y sábila (0.741 ± 0.011 UA_{390nm}) con valores similares de producción. El residuo de mandarina no mostró producción de pigmentos amarillos.

El arroz mostró mayor producción para pigmentos amarillos (0.816 ± 0.07 UA_{390nm}), mientras que para pigmentos rojos mostró menor producción que la sábila (0.585 ± 0.012 UA_{495nm}). Silveira y col. (2011) reportaron la producción de pigmentos por *Monascus purpureus* en fermentación líquida utilizando bagazo de caña de azúcar como única fuente de carbono, alcanzando una producción máxima de pigmentos de 3.380 UA₅₀₀/mL siendo este valor mucho mayor al alcanzado en el presente estudio. Sin embargo la fuente de nitrógeno utilizada fue distinta, observando un efecto significativo de la fuente de nitrógeno utilizada sobre la producción de pigmentos rojos, encontrando que el uso de fuentes de nitrógeno inorgánicas como el NH₄Cl no favorecen la producción de pigmentos rojos.

7.4.2 Determinación del color para cada uno de los extractos de los residuos

Se evaluaron las características colorimétricas de los extractos de los residuos pigmentados (Cuadro 7.2) en donde los valores de L^* , a^* y b^* , fueron similares para cada residuo. Así mismo, el parámetro Croma (C) y el ángulo del color (h_{ab}) fueron calculados a partir de estos valores. El parámetro Croma (C) corresponde a una de las tres coordenadas polares del espacio de color (las



otras dos son luminosidad y tono) que indica la fuerza de saturación o intensidad del color. Por otro lado el ángulo del color h_{ab} representa el ángulo en el espacio de color CIELab medido en grados. En el espacio de color CIELab, la cromacidad de un color puede ser representada como un punto en una gráfica $a^* b^*$. La longitud de una línea trazada desde este punto hasta el origen se denomina croma métrico (C). El ángulo que la línea del croma métrico forma con el eje a^* se define como el ángulo tono. El ángulo de tono siempre se mide en la dirección opuesta a las manecillas del reloj desde el eje a^* (+).

Cuadro 7.2 Valores del sistema CIELab de cada residuo para la determinación del color.

| Residuo | CIELab | | | | |
|-----------|--------|-------|-------|-------|----------|
| | L | a^* | b^* | C | h_{ab} |
| Mango | 83.89 | -0.16 | 14.52 | 14.52 | -89.36 |
| Papaya | 89.73 | 1.01 | -1.23 | 1.59 | -50.82 |
| Piña | 88.00 | 2.49 | -3.36 | 4.18 | -53.52 |
| Naranja | 87.95 | 1.95 | -0.46 | 2.01 | -13.16 |
| Limón | 88.86 | -1.27 | 0.59 | 1.40 | -24.79 |
| Toronja | 89.11 | 3.07 | -7.96 | 8.54 | -68.90 |
| Mandarina | 88.91 | 2.27 | -1.81 | 2.91 | -38.53 |
| Tuna | 88.95 | 3.53 | -8.36 | 9.08 | -67.14 |
| Vaina | 88.32 | 1.34 | 0.93 | 1.63 | 34.73 |
| Sábila | 83.01 | -2.50 | 19.33 | 19.49 | -82.63 |
| Alga | 88.83 | 1.16 | -4.70 | 4.84 | -76.16 |

Estos valores corresponden a un valor determinado, y sólo indican el color en un determinado punto, no la cantidad de pigmento o color producido. Sin embargo es posible determinar mediante el valor del parámetro b^* que tan amarillo es el extracto, para el caso de los residuos evaluados los resultados mostraron una coloración amarillo intenso y uno de los colores producidos por *Monascus*



purpureus son amarillos. No obstante al ser éste, un sistema de medición tridimensional los tres valores determinan el color exacto, como se observa en la Figura 7.12; los valores de L^* , a^* y b^* se localizan en la región de los amarillos-cafés lo cual indica que son amarillos intensos.

El color de *M. purpureus* varía de amarillo-naranja a rojo-púrpura. El color producido puede deberse a la influencia de las condiciones de cultivo, en particular, por el valor de pH (Fabre y col., 1993), por el fósforo y la fuente de nitrógeno en el sustrato (Wong y col., 1981).

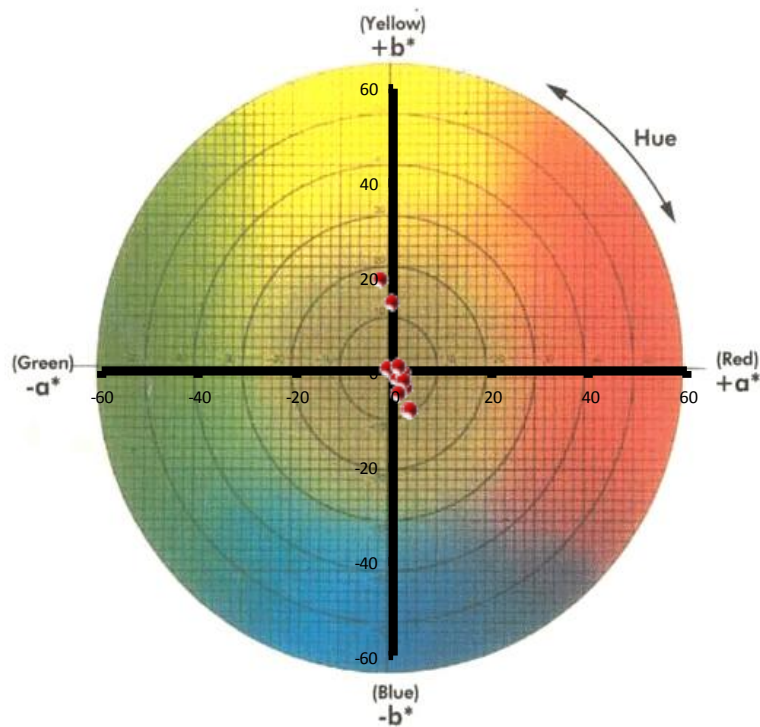


Figura 7.12 Esquema del sistema CIELab en donde se muestra la posición del color para los extractos pigmentados obtenidos en cada uno de los residuos evaluados.



7.4.2 Consumo de sustrato

Los resultados obtenidos para el consumo de sustrato en fermentación líquida por *Monascus purpureus* son presentados en la Figura 7.13, donde es evidente que el consumo de sustrato por *Monascus purpureus* es superior en la fermentación líquida para la mayoría de los sustratos comparada con la fermentación sólida. El residuo de papaya fue el que presentó el mayor porcentaje de consumo (98.25%), el resto de los sustratos presentaron resultados similares. El consumo de los residuos de alga marina y sábila fueron inferiores al 90% (78.76 y 81.67%, respectivamente).

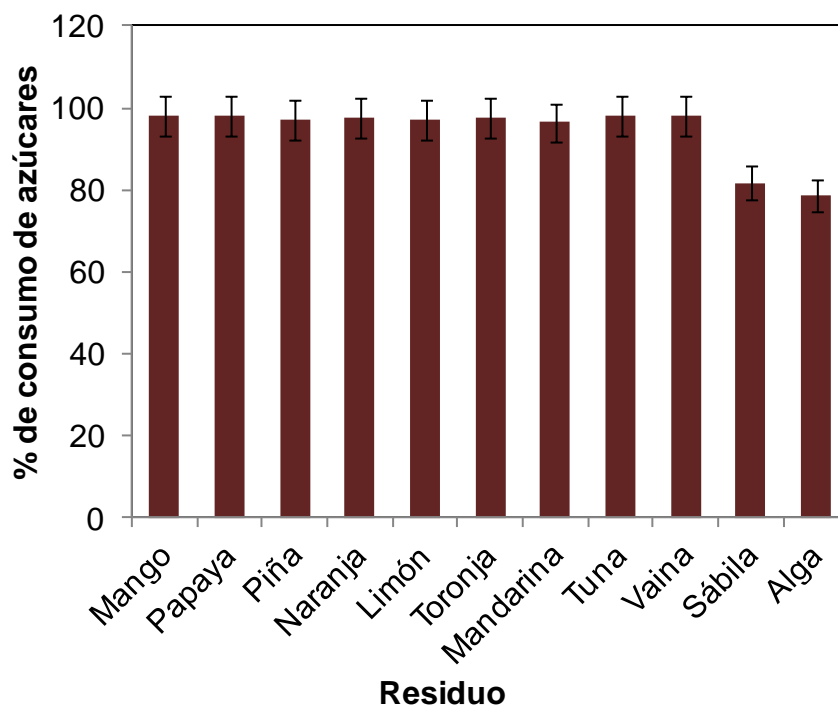


Figura 7.13 Consumo de azúcares por *Monascus purpureus* durante el proceso de fermentación (sólido y líquido).



El residuo de sábila presentó los mejores resultados en cuanto a producción de pigmento, sin embargo al igual que en la fermentación en estado sólido es necesario un estudio cinético (biomasa, pigmento, sustrato) para establecer una relación de crecimiento y producción de pigmentos por *Monascus purpureus* sobre el consumo de sustrato para este residuo.



8. CONCLUSIONES

- La cepa de *Monascus purpureus* 2955 fue capaz de crecer y producir pigmentos en diversos medios de cultivo, con diferente fuente de carbono, obteniéndose diferentes radios de invasión final a las 336 h de incubación, presentándose mayor crecimiento en el medio SDA (37 mmh^{-1}), mientras que la producción de pigmentos fue mayor en el medio MEA ($2.755 \pm 0.75 \text{ UA}_{495\text{nm}}$, $3.205 \pm 0.71 \text{ UA}_{390\text{nm}}$). Estableciéndose al medio SDA como el óptimo para la propagación de *Monascus purpureus* 2955.
- Las cáscaras de mango, papaya, piña, naranja, limón, toronja, mandarina, tuna, vaina, sábila y alga marina, son una fuente potencial para obtener azúcares fermentables los cuales se pueden utilizar como única fuente de carbono para *Monascus purpureus*, durante fermentación sólida y líquida, en la producción de metabolitos secundarios (pigmentos fúngicos), esto resalta el empleo de residuos agroindustriales como única fuente de carbono permitiendo la reducción de los costos de producción además de contribuir con la conservación del medio ambiente.
- La mayor producción de pigmentos fue obtenida cuando se empleó la fermentación sólida, utilizando *Aloe vera* ($1.781 \pm 0.73 \text{ UA}_{495\text{nm}}$) como fuente de nutrientes para la producción de pigmentos rojos y el mango ($2.37 \pm 0.132 \text{ UA}_{390\text{nm}}$) para la producción de pigmentos amarillos; sin embargo estos



resultados están muy por debajo de los resultados obtenidos con el control, por lo tanto se debe trabajar en la optimización de los residuos para elevar la producción de pigmentos por *Monascus purpureus*. En cuanto a la fermentación líquida la mayor producción de pigmentos rojos también fue obtenida en el residuo de *aloe vera* (0.757 ± 0.055 UA_{495nm}) e incluso fue superior a la obtenida con el control. En cuanto a la producción de pigmentos amarillos la mayor producción se obtuvo con la cáscara de naranja (0.812 ± 0.015 UA_{390nm}), la cual fue similar a la producción con el control.

- Los residuos agroindustriales tienen un gran potencial para la producción de pigmentos por *Monascus purpureus* principalmente amarillos y rojos, debido a que tienen una gran cantidad de azúcares que son asimilables por el microorganismo, sin embargo los resultados de éste trabajo de investigación son inferiores a estudios reportados previamente, por lo que un estudio más detallado sería recomendable para optimizar el uso de los residuos agroindustriales para la producción de pigmentos de *Monascus* spp.



PERSPECTIVAS

- Optimizar las condiciones de cultivo utilizando residuos agroindustriales para la producción de pigmentos por *Monascus purpureus*.
- Realizar estudios cinéticos en el proceso de producción de pigmentos por *Monascus purpureus* 2955 en fermentación sólida y líquida.
- Analizar el efecto de la humedad sobre la producción de pigmentos en fermentación en estado sólido.
- Identificar mediante técnicas analíticas especializadas (HPLC-masas) los pigmentos producidos por *Monascus pupureus* 2955.
- Escalar el proceso de producción de pigmentos por *Monascus purpureus* 2955 a nivel reactor.



REFERENCIAS

1. Abd-Aziz S, Hung GS, Hassan MA, Mohamed IAK y Noraini S. 2008. Indirect method for quantification of cell biomass during solid-state fermentation of palm Kernel Cake based on protein. *Journal of Basic Microbiology* 33: 126-132.
2. Ajdari Z, Ebrahimpour A, Manan MA, Hamid M, Mohamad R y Ariff AB. 2011. Assessment of monacolin in the fermented products using *Monascus purpureus* FTC5391. Article ID 426168. 9 pages.
3. Ávila-Lavalle R. 2010. Determinación de lovastatina mediante espectroscopia de impedancia electroquímica en productos fermentativos de arroz con el hongo marino *Monascus purpureus*. Tesis de Maestría. Centro de investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México.
4. Babitha S, Soccol CR y Pandey A. 2007. Effect of stress on growth, pigment production and morphology of *Monascus sp.* in solid cultures. *Journal of Basic Microbiology* 47: 118–126.
5. Babitha S, Soccol CR y Pandey A. 2007. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology* 98: 1554-1560.
6. Babitha S. 2009. Microbial pigments. *Biotechnología para la utilización de residuos agroindustriales* 8: 159-162.
7. Barragán-Huerta BE, Téllez-Díaz YA y Laguna-Trinidad A. 2008. Utilización



- de residuos agroindustriales. Revista Sistemas Ambientales 2: 44-50.
8. Benavente-Valdés JR. 2011. Efecto de los factores nutricionales en la producción de pigmentos por *Penicillium pinophilum*. Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.
 9. Bilbao-Orozco SF y Kilikian BV. 2008. Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT3802. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 263-268.
 10. Blanc PJ, Loret MO, Santerre AL, Pareillux A, Prome D, Prome JC, Laussac JP y Goma G. 1994. Pigments of *Monascus*. Journal of Agriculture and Food Chemistry 59: 862-865.
 11. Carvalho JC, Oisshi JO, Adenise LW, Pandey A, Babitha S y Soccol CR. 2007. Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-state fermentation and pigment extraction using different solvents. Indian Journal of Biotechnology 6:194-199.
 12. Carvalho JC, Pandey A, Babitha S y Soccol CR. 2003. Production of *Monascus* biopigments: An overview. AgroFOOD Industry High-technology 6: 37-42.
 13. Carvalho JC, Soccol CR, Pandey A, Babitha S y Woiciechowski AL. 2007. Production of pigments by SSF. Current Developments in Solid State Fermentation. In- Current Developments in Solid- state Fermentation. Asiatech Publishers Inc. New Delhi. pp 335–353.
 14. Cavalho JC, Soccol CR, Babihta S, Pandey A y Adenise LW. 2008. Produccion of pigments. Current Developments in Solid-state Fermentation.



pp 337-355

15. Chávez-González ML, Rodríguez-Durán LV, Rodríguez-Herrera R y Aguilar CN. 2009. Aspectos Básicos de la fermentación en medio sólido. *Cienciaviva* 20.
16. Chen MH y Johns MR. 1993. Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40: 132-138.
17. Chysirichote T, Asami K y Ohtaguchi K. 2011. Relation between hyphal growth and red pigment production of the fungus *Monascus ruber* MBRC 32318 on rice starch agar. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 152: 8552.
18. Chysirichote T, Takahashi R, Kazuhiro A y Ohtaguchi K. 2013. Quantification of the glucosamine content in the filamentous fungus *Monascus ruber* cultured on solid surfaces. *Journal of Basic Microbiology* IN press.
19. Domínguez RM y Webb C. 2003. Submerged fermentation in wheat substrate for production of *Monascus* pigments. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 19: 329-336.
20. Domínguez-Espinoza RM, Wang R y Pacho-Carrillo JD. 2002. Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos. *Tecnología Ciencia Educación IMIQ* 17: 77-83.
21. Duffosé L, Galaup P, Yaron A, Arad SM, Blanc P, Murthy KN, Ravishankar GA. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of



- pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. Trends in Food Science and Technology 16: 1389-1410.
22. Duran N, Tixeira MFS, Conti R y Esposito E. 2002. Ecological-friendly pigments from fungi. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 42: 53–66.
23. Escobar-Blanco M, Hernández HY y Barragán-Huerta BE. 2009. Extracción de compuestos fenólicos de cáscaras de cítricos producidos en México (Naranja Valencia, Naranja agria, Limón mexicano, Limón real, mandarina, Toronja y Lima). XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica.
24. Fabre CE, Santerre AL, Loret MO, Baberian R, Pareilleux A, Goma G y Blank PJ. 1993. Production and food application of the red pigments of *Monascus ruber*. Journal of Food Science 58: 1099–1102.
25. Feng Y, Shao Y y Chen S. 2012. *Monascus* pigments. Mini review. Applied Microbiology and Biotechnology 96:1421-1440.
26. Fink-Gremmels J, Dresel J, Leistner L. 1991. Use of *Monascus* extracts as an alternative to nitrate in meat products. Fleischwirtsch 71: 1184–1211.
27. González-Ruiz A, Méndez-Zavala A, Rodríguez R, Aguilar CN. 2009. Pigmentos microbianos: ¿aditivos o nutraceuticos? CienciaAcierta 19: 13-16.
28. Hajjaj H, Klaebé A, Goma G, Blanc PJ, Barbier E y Francois J. 2000. Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*. Applied Environment Microbiology 66: 1120–1125.
29. Heliodoro-Gil Rdo, Domiunguez-Esparza RM y Pacho-Carillo JD. 2009.



- Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja:
Procesos de separación y purificación. UNAM. Facultad de Química.
30. Julian-Ricardo MC y Ramos-Sánchez L. 2007. Fermentación en estado sólido (I): producción de alimento animal. Universidad de Camaguey. Tecnología Química.
31. Krairak S, Yamamura K, Irie R, Nakajima M, Shimizu H, Chim-Anage P, Yongsmith B y Shioya S. 2000. Maximizing yellow pigment production in fed-batch culture of *Monascus sp.* Journal of Bioscience and Bioengineering 90: 363-367.
32. Lai Y, Wang L, Qing L y Chen F. 2011. Effects of cyclic AMP on development and secondary metabolites of *Monascus ruber* M-7. Letters in Applied Microbiology 52: 420-426.
33. Li CH, Yu-Han L, Ya-Wen H, Yao-Haur K y Tzu-Ming P. 2013. Anti-inflammatory properties of yellow and orange pigments from *Monascus purpureus* NTU 568. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 2796–2802.
34. Li FQ, Gna-Rong X, Yu-Wei L, Tao J, Yun C, Rong J y Hui-Ling Y. 2004. Study on the production of citrinin by *Monascus* strains used in food industry. Japanese Association of Mycotoxicology 32: 602-605.
35. Liu BH, Wu TS, Su MC, Chung CP y Yu FY. 2005. Evaluation of citrinin occurrence and cytotoxicity in *Monascus* fermentation products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 170-175.
36. Mapari SA, Meyer AS y Thrane U. 2006. Colorimetric characterization for



- comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 7027-7035.
37. Mapari SAS, Meyer AS y Thrane U. 2008b. Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on solid rice medium. Biotechnology Letter 30: 2183-2190.
38. Mapari SAS, Meyer AS y Thrane U. 2006. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. Journal of Agriculture and Food Chemistry 54: 7027-7035.
39. Matute L. 2011. Estudio comparativo del proceso de obtención de un aditivo enzimático mediante fermentaciones microbianas sólida y sumergida de afrechillo de trigo. Tesis de Maestría. Universidad de Carabobo. España.
40. Mee-Ra R, Eun-Young K, Hye-Young K, Byung-Hak A y Cha-Burn Y. 2000. Characteristics of the red rice fermented with fungus *Monascus*. Food Science and Biotechnology 9: 21-26.
41. Méndez-Zavala A, Hernández JS, Pérez-Berumen C, Rodríguez R, Contreras-Esquivel JC y Aguilar CN. 2005. Cinética de producción y recuperación de pigmentos de *penicillium purpurogenum* GH2. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
42. Méndez-Zavala, A. 2005. Proceso de producción y recuperación de pigmentos por *Penicillium purpurogenum* GH2, aislado de la región semidesértica de Coahuila, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. México.
43. Moharram AM, Mostafa EM y Ismaili MA. 2011. Chemical profile of



- Monascus ruber* strains. Journal of Bioscience and Bioengineering.10: 2671-2673.
44. Morales-Oyervides L. 2011. Producción de pigmentos fúngicos por *Penicillium purpurogenum* GH2 utilizando un biorreactor airlift. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila.
45. Orzúa MC, Mussatto S, Contreras- Esquivel JC, Rodríguez R, De la Garza H, Teixeira JA, Aguilar CN. 2009. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. Industrial Crops and products 30: 24-27.
46. Orzúa-González MC. 2003. Aprovechamiento de residuos agroindustriales como soporte de crecimiento fúngico para la fermentación en estado sólido. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Coahuila. México.
47. Pandey A, Soccol C y Mitchell D. 2000. New develop in pigments in solid state fermentation. Bioprocesses and Products 35: 1153-1169.
48. Roseblitt A, Agosin E, Delgado J y Pérez-Correa R. 2000. Solid substrate fermentation of *Monascus purpureus*: growth, carbon balance, and consistency analysis. Biotechnology progress 16: 152-162.
49. Ruiz-Leza HA. 2004. Desarrollo de un bioproceso para la producción de pectinasa fúngica en medio sólido utilizando pomaza de limón. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. México.
50. Saval S. 2012. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. Artículos Instituto de Ingeniería UNAM. Ciudad Universitaria México.



51. Silveira-Silavana T, Daroita DJ, Voltaire SA y Brandelli A. 2011. Stability modeling of red pigments produced by *Monascus purpureus* in submerged cultivations with sugarcane bagasse. *Food and Bioprocess Technology* 6: 1007-1114.
52. Silveira-Silvana T, Daroita DJ and Brandelli A. 2008. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. *Food Science and Technology* 41: 170-174.
53. Su YC. 1983. Fermentative production of anka-pigments (*Monascus* pigments). *Journal of Applied Microbiology and Bioengineering* 21: 325-337.
54. Suhr KI, Haasum I, Streenstrup LD y Larsen TO. 2002. Factors affecting growth and pigmentation of *Penicillium caseifulvum*. *Journal of Dairy Science* 11: 2785-2794.
55. Tan-Chu J, Wenjuan S, Cheng L, Yuanxin G, Yingping Z, Siliang C y Tadayuki I. 2012. High-throughput screening strategy used for enhanced production of pigment by *Monascus purpureus* D39-4. *Food Science and Biotechnology* 2: 1603-1610.
56. Velmurugan P, Hyun H, Vellingri B, Seralathan L, Sang-Myung L, Jong-Chan C, Patrick JS y Byung-Taek O. 2011. *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112: 590-594.
57. Watanabe T, Yamomoto A, Nagai S y Terabe S. 1997. Separation and determination of *Monascus* yellow pigments for food by micellar electrokinetic chromatography. *Analytical Science* 13: 571–575.



58. Wong H y Koehler PE. 1983. Production of water-soluble *Monascus* pigments. *Journal of Food Science* 48: 1200-1203.
59. Wong HC, Lin YC y Koehler PE. 1981. Regulation of growth and pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentrations. *Mycologia* 73: 649–654.
60. Yeu-Ching S y Tzu-Ming P. 2011 Beneficial effects of *Monascus purpureus* NTU 568 fermented products: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1207-1217.
61. Yonghui W, Bobo Z, Liping L, Yan H y Ganrong X. 2010. Enhanced production of pigments by addition of surfactants in submerged fermentation of *Monascus purpureus* H1102. Jiangnan University, Wu XI 214122.China.
62. Zahra A, Manan AEMA, Hamid M, Mohamad R y Ariff AB. 2011. Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several straris of *Monascus purpureus* on solid state cultivation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 48: 73-84.
63. Zhiqiang H, Xuchong Z, Zhenqiang W, Hanshi Q y Zhilong W. 2012. Export of intracellular *Monascus* pigments by-two stage microbial fermentation in nonionic surfactant micelle aqueous solution. *Journal of Biotechnology* 162: 202-209.