

PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS A PARTIR DE LA LEVADURA *Rhodotorula mucilaginosa* USANDO DESECHOS AGROINDUSTRIALES

MARILYN VANESSA HERRERA JIMÉNEZ
ANGIE CAMILA JIMÉNEZ SARMIENTO

ASESOR INTERNO:

MSc. ANA GRACIELA LANCHEROS DÍAZ

ASESOR EXTERNO:

MSc. LICETH ALEJANDRA CABREJO CÁRDENAS



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ, MARZO 2020

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que contribuyeron en el desarrollo y conclusión de este trabajo de grado. En primer lugar agradecemos a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca donde nos hemos formado, al programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico del cual nos sentimos orgullosas de pertenecer, particularmente agradecemos al semillero de investigación Bioprocesos y Control en donde obtuvimos toda la dedicación y apoyo por parte de la docente y asesora interna Ana Graciela Lancheros Diaz, a ella gracias por sus enseñanzas y seguimiento.

A Tecnoparque Nodo Bogotá que junto con la gestora y asesora externa Liceth Alejandra Cabrejo Cárdenas, nos brindaron una grata disposición de sus instalaciones y ofrecieron de manera atenta todo lo necesario para el desarrollo de este trabajo de grado.

Por último, agradecemos a nuestros familiares por su amor, fortaleza y principalmente por representar motivación en la ejecución de nuestro trabajo de grado.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
12	
1.1 Pregunta problema.....	13
1.2 Justificación	13
1.3 Revisión de antecedentes.....	14
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo general.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. MARCO REFERENCIAL	24
3.1 Pigmentos naturales.....	24
3.1.1 Definición	24
3.1.2 Tipos de pigmentos naturales.....	24
3.2 Carotenoides.....	24
3.2.1 Definición.....	25
3.2.2 Biosíntesis de carotenoides.....	26
3.2.3 Clasificación de los Carotenoides.....	27
3.2.4 β -carotenos.....	27
3.2.5 Aplicaciones industriales.....	27
3.3 Desechos agroindustriales.....	28
3.3.1 Definición.....	28
3.3.2 Problemática ambiental.....	28
3.4 Cacao.....	29
3.4.1 Definición.....	29
3.4.2 Manejo de los desechos en Colombia.....	29
3.5 Caña de azúcar.....	30
3.5.1 Definición.....	30
3.5.2 Manejo de los desechos en Colombia.....	31
3.6 Lactosuero.....	31
3.6.1 Definición	32
3.6.2 Manejo de los desechos en Colombia	33
3.7 Procesos biotecnológicos.....	33
3.7.1 Definición.....	33
3.7.2 Fermentación microbiana.....	33
3.7.3 Microorganismos productores de pigmentos.....	34
3.8 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	34
3.8.1 Definición y características generales.....	34
3.8.2 Características bioquímicas.....	35
3.9 Pintura plástica.....	35

3.9.1 Definición.....	35
3.9.2 Componentes.....	35
4. DISEÑO METODOLÓGICO.....	
36	
4.1 Universo, población, muestra.....	36
4.2 Hipótesis, variables, indicadores.....	36
4.3 Técnicas y procedimientos.....	37
4.3.1 Reactivación y mantenimiento de la cepa.....	37
4.3.2 Obtención de sustratos.....	37
4.3.3 Tratamiento de sustratos.....	38
4.3.4 Preparación de medios de cultivo.....	38
4.3.5 Preparación y siembra de inóculo.....	41
4.3.6 Densidad óptica.....	41
4.3.7 Recuento en placa.....	41
4.3.8 Ruptura celular.....	42
4.3.9 Extracción de pigmentos.....	42
4.3.10 Purificación de las muestras.....	43
4.3.11 Cuantificación de pigmentos.....	43
4.3.12 Análisis estadístico ANOVA.....	44
4.3.13 Aplicación de pigmento en pintura plástica.....	45
5. RESULTADOS.....	46
5.1 Identificación morfológica de la cepa.....	46
5.2 Condiciones de los medios de cultivo y parámetros de fermentación.....	46
5.3 Recuento de levaduras.....	47
5.4 Curso temporal de la producción de biomasa y carotenoides.....	47
5.5 Producción de carotenoides en diferentes sustratos.....	48
5.6 Control de pH y luz.....	49
5.7 Evaluación de medios de cultivo.....	50
5.8 Análisis estadístico ANOVA.....	51
5.9 Prueba cualitativa para aplicación en pintura plástica.....	52
6. DISCUSIÓN.....	53
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	
57	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8. ANEXOS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	29
Figura 2.....	31
Figura 3.....	32
Figura 4.....	34
Figura 5.....	42
Figura 6.....	43
Figura 7.....	43
Figura 8.....	45
Figura 9.....	46
Figura 10.....	47
Figura 11.....	49
Figura 12.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	26
--------------	----

Tabla 2.....	46
Tabla 3.....	47
Tabla 4.....	48
Tabla 5.....	50
Tabla 6.....	50
Tabla 7.....	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo preparación de medio de cultivo.....	65
Anexo 2. Protocolo extracción de carotenoides	66
Anexo 3. Protocolo purificación de la muestra	67
Anexo 4. Protocolo cuantificación de carotenoides totales	68
Anexo 5. Ficha técnica rota-evaporador	69
Anexo 6. Ficha técnica Shaker.....	70

RESUMEN

El desaprovechamiento de los residuos agroindustriales y mal manejo de los mismos en el país actualmente es causa contaminación ambiental, afectando no sólo cuerpos de agua y suelos sino el desarrollo ecosistémico, ésto debido al incremento significativo de los desechos tras la producción. El objetivo de este trabajo de investigación es mediante procesos biotecnológicos, producir pigmentos naturales a partir de la fermentación de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* usando como única fuente de carbono desechos agroindustriales. Los desechos agroindustriales para el desarrollo del proyecto fueron utilizados como sustrato, la mazorca del cacao, el bagazo de caña de azúcar y el lactosuero, seleccionados de acuerdo a sus propiedades y la capacidad de sustituir los requerimientos nutricionales del medio en el que la levadura se desarrolla habitualmente. El microorganismo *Rhodotorula mucilaginosa* se obtuvo del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, para su crecimiento fueron establecidos los medios de cultivo selectivos y a partir de éstos se formuló cada medio de cultivo: con mazorca de cacao, bagazo de caña de azúcar y lactosuero por separado, según Noel. J y colaboradores³³, y Costa J y colaboradores³⁴, seguido de la provisión de condiciones ambientales requeridas por la levadura para llevar a cabo el proceso fermentativo, se llevó a cabo el proceso de lisis celular para liberar el pigmento intracelular para la extracción y purificación del pigmento, según metodología de Landolfo y colaboradores (2018). El uso de desechos agroindustriales permite minimizar el costo de la producción de pigmentos útiles en la industria alimenticia, cosmetológica, farmacéutica, entre otras y a su vez reducir el impacto ambiental que generan.

PALABRAS CLAVES: *Rhodotorula mucilaginosa*, β -carotenos, mazorca de cacao, bagazo de caña de azúcar, lactosuero.

ABSTRACT

The waste of agro-industrial residues and their mismanagement in the country currently causes environmental pollution, affecting not only bodies of water and soils but also the development of the ecosystem, due to the significant increase of these wastes after production. The objective of this research work is, through biotechnological processes, to produce natural pigments from the fermentation of *Rhodotorula mucilaginosa* yeast using agro-industrial waste as the only source of carbon. Agro-industrial waste was used as a substrate for the project. Cocoa pods, sugar cane bagasse and whey were selected according to the properties of each one and the capacity to substitute the nutritional requirements of the environment in which the yeast usually develops. The microorganism *Rhodotorula mucilaginosa* was molecularly characterized, was obtained from the strain of the University Colegio Mayor de Cundinamarca and were established selective culture mediums suitable for growth and from this each culture medium was formulated: with cocoa pod, sugar cane bagasse and whey separately, according to Noel. J and collaborators³³, and Costa J and colaboradores³⁴, followed by the provision of environmental conditions required by the yeast to carry out the fermentation process, the process of cell lysis was carried out to release the intracellular pigment for the extraction and purification of the pigment, according to methodology of Landolfo and collaborators (2018). The use of agro-industrial waste allows minimizing the cost of production of useful pigments in the food, cosmetology, and pharmaceutical industries, among others, and at the same time reducing the environmental impact they generate.

KEY WORDS: *Rhodotorula mucilaginosa*, β -carotenes, cocoa cob, sugarcane bagasse, whey.

INTRODUCCIÓN

Los desechos agroindustriales, considerados subproductos y/o excedentes de la producción, con frecuencia presentan problemas de contaminación ambiental en suelos y en cuerpos de agua aumentando la demanda biológica de oxígeno (DBO), además se ve afectado el desarrollo ecosistémico debido al incremento significativo de producción industrial¹.

Actualmente se presenta una gran problemática ambiental de las aguas residuales de las industrias, tales como taponamientos de tuberías por parte de los desechos, por otro lado, los colorantes empleados tanto en industrias de alimentos como en farmacéuticas, cuero entre otras muchas, utilizan pigmentos obtenidos por síntesis química, alterando así las características fisicoquímicas del agua.

Este problema ambiental avanza cada día más y pese a los esfuerzos por parte de las industrias al tomar acciones correctivas e implementar tratamientos para residuos no ha sido suficiente solución^{4 7}. Actualmente el lactosuero está siendo utilizado en procesos fermentativos, bebidas, producción de fertilizantes, empaques, entre otros^{4 6}; el desecho bagazo de caña de azúcar es utilizado en procesos de producción de papel, celulosa, combustible natural, entre otros^{4 4}; el desecho mazorca de cacao se ha venido utilizando como alimento animal, insumo para la industria cosmética y gastronómica, entre otras; sin embargo, el uso de estos desechos debe aumentar hasta obtener expansión y el fortalecimiento de la cadena de valor productiva del lactosuero, el bagazo de caña de azúcar y la mazorca del fruto del cacao como insumo, para garantizar así mismo la sostenibilidad ambiental^{5 0}.

El presente trabajo de grado permite obtener mediante procesos biotecnológicos, pigmentos naturales de interés industrial a partir de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* debido a sus propiedades y desarrollo, los pigmentos a obtener además de su bajo costo de producción tienen un alto rendimiento y no presenta implicaciones toxicológicas². Para ello se estableció un medio de cultivo apto para el crecimiento y desarrollo del microorganismo de acuerdo a la revisión literaria y estricto seguimiento de recomendaciones respecto al pH, cubrimiento de luz durante el proceso fermentativo, temperatura y tiempos de crecimiento sugeridas por los autores, teniendo en cuenta la ruta metabólica y el momento indicado para la obtención del pigmento.

Además de contribuir a la obtención de pigmentos, estas levaduras han servido en el mercado para la extracción de aromas y sabores; es por esto que el área de productos naturales está

creciendo en el campo de química orgánica empleando como herramienta la biotecnología⁴ .

La obtención de pigmentos por fermentación es industrialmente factible ya que el costo de producción se minimiza al utilizar desechos agroindustriales como única fuente de carbono para la levadura. Se pretende evaluar el crecimiento y el potencial de producción de pigmentos de *Rhodotorula mucilaginosa* para evaluar su aplicación en determinados medios de cultivo. La mazorca de cacao, el bagazo de caña de azúcar y el lactosuero se seleccionaron como sustratos en el estudio debido a su alto contenido de azúcar y otros nutrientes, su bajo costo, su fácil disponibilidad y su fácil almacenamiento.

La falta de procesos de aprovechamiento, recuperación y disposición final óptima de los residuos del cacao, la caña de azúcar y el lactosuero resultan ser un impedimento para que la economía de cada sector sea completa; siendo obstáculo para las industrias el acceso a técnicas, tecnologías y conocimientos para el aprovechamiento de residuos al salirse de su presupuesto y en ocasiones por procedimientos que ponen en riesgo la estabilidad económica cuando el resultado de estos es incierto.

Se considera como valor agregado para la producción de carotenoides: el hecho de ser obtenidos no por síntesis química sino mediante proceso biotecnológico, reducir el costo de producción, emplear tres tipos de desechos agroindustriales de gran impacto ambiental, siendo la mazorca del cacao el desecho nunca antes utilizado como sustrato para la fermentación microbiana, y generar una buena alternativa de aplicación en el sector industrial de la pintura, ya que con frecuencia son utilizados como agentes colorantes de alimentos, precursores de vitaminas en alimentos, aditivos para cosméticos y se le atribuyen propiedades antioxidantes.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se presenta una gran problemática ambiental debido a las aguas residuales de las industrias, ya que los colorantes empleados tanto en industrias de alimentos como

farmacéuticas, cuero entre otras muchas, utilizan pigmentos obtenidos por síntesis química, alterando así el equilibrio ecosistémico.

A nivel mundial se estima que se desecha hasta una tercera parte de los alimentos de consumo humano, generando residuos desde el cultivo hasta su comercialización. Desde el Departamento Nacional de Planeación en Colombia, se incentiva el reciclaje y manejo de desechos, sin embargo no se ha logrado superar un 20% del aprovechamiento de residuos y es limitada la implementación de diversos procesos y/o alternativas para disminuir el impacto ambiental. Se considera que la actividad agrícola es la mayor generadora de residuos, el procesamiento de productos como: café, palma de aceite, caña de azúcar, cacao, maíz, panelera, arroz, banano y plátano, anualmente es de 14.976.807 toneladas de las cuales se producen 71.943.813 toneladas de residuos que en su mayoría son destinados a rellenos sanitarios o incinerados, procesos que tienen alto impacto ambiental^{5 2}.

Dada esta problemática se plantea e investiga la posibilidad de producir pigmentos naturales a partir de procesos de fermentación empleando microorganismos, esto es industrialmente factible ya que el costo de producción se minimiza al utilizar desechos agroindustriales como única fuente de carbono para la levadura y esta es la razón por la cual se quiso investigar la producción de colorantes a partir de microorganismos como alternativa de producción ecológica y evaluar la posibilidad para poder ser utilizados como agentes colorantes para la industria.

El trabajo de grado es innovador al emplear como sustrato mazorcas de cacao ya que es uno de los cultivos agrícolas promisorios del país y que al incrementarse las áreas de producción así mismo producirán residuos de mazorca de cacao. Esto daría pie a utilizar este como sustrato para la fermentación dándole utilidad y generando un valor agregado en la cadena productiva.

1.1 Pregunta problema

¿Cómo obtener mediante procesos biotecnológicos, pigmentos naturales de interés industrial a partir de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando desechos agroindustriales?

1.2 Justificación

El presente trabajo de grado permite obtener mediante procesos biotecnológicos, pigmentos naturales a partir de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*, debido a sus propiedades y desarrollo, los pigmentos a obtener además de su bajo costo de producción, tienen un alto rendimiento y no presenta implicaciones toxicológicas.

Este trabajo de grado le es útil al sector industrial en toda su dimensión, al sector ambiental puesto que para la producción de pigmentos se utilizaron desechos agroindustriales, y a la comunidad universitaria, a quienes aportará herramientas para futuras investigaciones tanto del microorganismo como de los métodos biotecnológicos para la obtención de pigmentos naturales a partir de subproductos de la industria tales como mazorca de cacao, bagazo caña de azúcar y lactosuero.

A nivel industrial, los pigmentos naturales son utilizados como agentes colorantes de alimentos, precursores de vitaminas, aditivos cosméticos y se les atribuyen propiedades antioxidantes. La producción química de pigmentos de importancia a nivel industrial es un proceso costoso que implica contaminación ambiental.

La obtención de pigmentos por fermentación es industrialmente factible ya que el costo de producción se minimiza al utilizar desechos agroindustriales como única fuente de carbono para la levadura. Fueron seleccionados como sustrato desechos agroindustriales con alto impacto ambiental, como lo son la mazorca del cacao que representa un 90% del fruto no aprovechado del cacao, el bagazo de la caña de azúcar que representa un 25% de residualidad de la caña de azúcar y el lactosuero representa el 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera; además fueron seleccionados por su alto contenido de azúcar y nutrientes, su bajo costo, su fácil disponibilidad y almacenamiento^{5 2}.

Desde el punto de vista financiero, este trabajo de grado fue viable, puesto que se contó con el apoyo del semillero de investigación Bioprocesos y control, con el acompañamiento de la docente Ana Graciela Lancharos Días como asesora interna y de Tecnoparque Nodo Bogotá, ente del SENA, quienes permitieron el desarrollo del proyecto en sus instalaciones, brindaron apoyo de materiales para los procesos biotecnológicos y asesoría desde sus conocimientos en diferentes áreas del saber por parte de la gestora y asesora externa Liceth Alejandra Carbrejo Cárdenas.

1.3 Revisión de antecedentes

Los desechos agroindustriales, considerados subproductos y/o excedentes de la producción, con frecuencia presentan problemas de contaminación ambiental, su utilización como fuente de carbono ofrece ventajas de bajo costo para las fermentaciones microbianas y permite la obtención de compuestos bioquímicos útiles para industrias farmacéuticas, químicas y alimentarias. Para la producción de carotenoides (pigmentos naturales) se han utilizado una gran variedad de sustratos, es decir, desechos agroindustriales que favorecen la fermentación microbiana como una alternativa para la obtención de colorantes, antioxidantes o posibles inhibidores de tumores¹.

Por su parte la *Rhodotorula* es una levadura epifita (crece sobre un vegetal usándolo solamente como soporte) que muestra reproducción por gemación polar o bipolar dependiendo de la estimulación que se dé, esto indica una reproducción vegetativa; en el caso de *R. glutinis* presenta gemación bipolar, junto con la *R. mucilaginosa* pertenecen al Phylum Basidiomycota. Estas levaduras tienen una capacidad de crecimiento a 37°C, es decir, pueden desarrollarse en condiciones climáticas en donde se presenten condiciones de temperatura alta. En cuanto a sus características vegetativas varían desde un color rosa a rosa tenue y desde una forma esférica a elíptica; esto dependiendo su especie².

En cuanto a los pigmentos naturales, se debe mencionar primeramente los de mayor distribución en la naturaleza, los carotenoides, estos son tetraterpenoides (terpenoides de 40 carbonos, 8 unidades de isopreno) de colores amarillo, naranja y rojo. Son producidos por hongos y levaduras filamentosas, por algunas especies de bacterias, algas y líquenes. La producción de carotenoides por fermentación es factible si se utilizan subproductos industriales como fuente de nutrientes; en numerosas investigaciones esta fuente de nutrientes o sustrato ha sido: diversos granos (avena, trigo, cebada, maíz, etc.), lípidos y sustancias derivadas de glicerol, celobiosa, melaza de caña de azúcar, mosto de uva y lactosuero.

A nivel industrial, son el β -caroteno y la astaxantina los pigmentos de gran demanda, variedad y aplicación; en la literatura se registran aplicaciones: como agentes colorantes de

alimentos, como precursores de vitamina A en alimentos, como aditivos para cosméticos y como antioxidantes para reducciones del daño celular o tisular³.

Además de contribuir a la obtención de pigmentos, las levaduras como la *Rhodotorula mucilaginosa* han servido en el mercado para la extracción de aromas y sabores; en los aromas se da por los procesos físicos utilizados en la elaboración de alimentos que causan pérdidas de estos compuestos y que posteriormente requiere suplementación; y en los sabores aseguran una nutrición sana y a su vez mejoran las propiedades organolépticas de los productos. Es por esto que el área de productos naturales está creciendo en el campo de química orgánica con el uso de la biotecnología⁴.

Con relación a los efectos de los pigmentos carotenoides ubicuos en la naturaleza, es de afirmar que se deben a sus propiedades fisicoquímicas, las cuales son consecuencia de su estructura química. Estos tetraterpenoides están compuestos por 40 átomos de carbono formados por ocho unidades isoprenoides unidas de forma que la secuencia se invierte en el centro de la molécula, es decir, la unión de dichas unidades es “cabeza-cola”, excepto en el centro de la molécula, donde es “cabeza-cabeza”. Debido a ello, los dos grupos metilo centrales de la cadena poliénica están separados por seis átomos de carbono, mientras que el resto están separados por cinco. Teniendo en cuenta los elementos químicos presentes en sus moléculas, se pueden dividir en dos grandes grupos: carotenos que son hidrocarburos (ejemplo β -caroteno) y xantófilas (por ejemplo astaxantina), que contienen átomos de oxígeno. Éste puede estar presente en forma de grupo hidroxilo metoxilo, epóxido, carbonilo o carboxilo, principalmente. Otros grupos oxigenados presentes en carotenoides son acetatos, lactonas y sulfatos⁵.

Para la respectiva obtención de carotenoides por la cepa de *Rhodotorula*, en el 2007 se extrajo a un pH de 6 y temperatura de 30° C; concentración de sulfato de amonio de 2 g para mayor producción y el aceite de semilla la mejora notoriamente. El aumento de concentración inicial de glucosa y melaza en sacarosa aumentó el crecimiento de la levadura y producción de carotenoides; es decir la mayor concentración de carotenoides se obtiene cuando se utiliza 20 g de sacarosa melaza como fuente de carbono y la mayor utilidad del producto se logra cuando se utiliza lactosa de suero a 13.2 g como fuente de carbono⁶.

Dentro de los desechos agroindustriales está el lactosuero que es definido como “la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso”. Es un líquido translúcido verde obtenido de la leche después de la precipitación de la caseína. Existen varios tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la eliminación de la caseína, el primero denominado dulce, está basado en la coagulación por la renina a pH 6,5. El segundo llamado ácido resulta del proceso de fermentación de ácidos para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos⁷ .

Los principales pigmentos encontrados en la levadura *Rhodotorula sp.* son β -caroteno, toruleno y torularhodina. En estudios realizados en Brasil, se encontró que el pigmento producido por *Rhodotorula graminis* y *Rhodotorula glutinis* (levaduras con mayor producción) es toruleno y el β -caroteno en *Rhodotorula mucilaginosa*, resultados obtenidos mediante cromatografía columna abierta, capa fina y líquida de alto rendimiento, técnica utilizada para separar, identificar y cuantificar los carotenoides⁸ .

Agregando a lo anterior, existen diversos factores que influyen la bioproducción de carotenoides. Los carotenoides están compuestos por ocho unidades isoprenoides y la molécula es lineal y simétrica, la estructura básica C puede ser modificada por hidrogenación, deshidrogenación, ciclación y oxidación. La absorción de luz se da por medio de siete conexiones dobles conjugadas para que así presente coloración y confiere a los pigmentos alta reactividad química, es por esto que pueden ser fácilmente isomerizados y oxidados, principalmente al someterse a condiciones no controladas de procesamiento o almacenamiento, más aún en productos naturales (frutas). Así mismo, el calor, la luz, el oxígeno y las enzimas o los ácidos presentes conducen a cambios o destrucción de los pigmentos⁹ .

Las levaduras tienen historia y un futuro amplio en la biotecnología. Durante décadas, su participación e importancia en las fermentaciones de alimentos tradicionales es incomparable con otros organismos de importancia biotecnológica. El uso de levaduras en procesos biotecnológicos se está aumentando debido a propiedades y desarrollo. La mayoría de las especies de levadura no son patógenas para los seres humanos y los animales, por lo que se son usadas en una gran variedad de disciplinas de importancia para las actividades humanas¹⁰ .

En el año 2010, se realizó un estudio para determinar los microorganismos productores de carotenoides, de esta manera se aislaron 116 microorganismos a partir de suelo, hojas, frutas, flores y de productos procesados en descomposición. Se concluye que los microorganismos de manzana, tomate y harina de trigo tienen gran potencial para producir pigmentos rojos; por otro lado las cepas de pulpa de manzana, suelo de la vid y harina de trigo fueron las principales productoras de pigmentos amarillos. Las colonias aisladas que presentaban estas coloraciones amarilla a roja se volvieron a aislar e identificar por sus características morfológicas y de reproducción, más pruebas fisiológicas y bioquímicas y cuatro de estas se clasificaron como *Rhodotorula mucilaginosa* y una cepa como *Rhodotorula graminis*¹¹.

Desde hace muchos años se han descrito las propiedades de los carotenoides así como sus aplicaciones a nivel industrial, dentro de las propiedades se encuentran la actividad provitaminica A, antioxidante, anticancerígenos, efecto antiobesidad, efecto anabólico sobre los huesos, entre otros. Las aplicaciones a nivel industrial también son diversas, en productos farmacéuticos, cosméticos y alimentos. Actualmente la producción comercial de carotenoides de microorganismos compete principalmente con la fabricación sintética por síntesis química¹².

La síntesis microbiana permite la producción de carotenoides, esto explica el creciente interés en la producción de carotenoides microbianos como alternativa para los colorantes alimentarios sintéticos y evidente beneficio para la salud humana. Varias algas (*Dunaliella*, *Dictyococcus* y *Haematococcus*), bacterias (muchas especies de eubacterias además de halobacterias en archaeobacterias), algunos hongos filamentosos (pertenecen a hongos y ascomicetos), levaduras (*Cryptococcus*, *Phaffia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, y *Sporobolomyces*) se identifican para producir carotenoides¹³.

Los pigmentos naturales no solo tienen la capacidad de aumentar la comercialización de los productos, también muestran actividades biológicas ventajosas como lo son las antioxidantes y agentes anticancerígenos. Por otro lado, los pigmentos sintéticos causan contaminación y efectos secundarios toxicológicos adversos. El uso de pigmentos microbianos en alimentos procesados es un potencial económico, sin embargo, los pigmentos microbianos ofrecen desafíos debido a su alto costo, menor estabilidad y variación de tonos debido a cambios en el pH¹⁴.

Teniendo en cuenta que la levadura *Rhodotorula* admite altas concentraciones de cobre de metales pesados. La sobrecarga de cobre en esta aumenta la biosíntesis de carotenoides y de esta manera modifica la proporción de los pigmentos que se producen. El peróxido de hidrógeno también aumenta la biosíntesis de carotenoides. Y estos influyen negativamente en la remoción de metales pesados. De igual manera la exposición a $H_2 O_2$, un agente de estrés oxidativo, solo o en combinación con Cu (II) modifica el contenido de carotenoides, tanto cualitativamente como cuantitativamente¹⁵ .

El género *Rhodotorula* es un grupo diverso de levadura basidiomiceta pigmentada. Es una levadura ambiental común aislada de una amplia gama de hábitats, plantas y animales colonizados. Las cepas: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* y *Rhodotorula mucilaginosa*, son patógenos humanos. La especie *Rhodotorula* se aísla comúnmente de varios alimentos y bebidas¹⁶ .

En el filo Basidiomycota, está presente la *Rhodotorula* que, como ya se mencionó es una levadura pigmentada, de gran importancia para la industria alimentaria por su capacidad biotecnológica, estas tienen una característica en común y es la producción a grandes cantidades de carotenoides, proteínas unicelulares de etanol, ácido acético y acetaldehído¹⁷ .

Para la correcta determinación del mejor medio de cultivo y las condiciones de cultivo son necesarias para la fermentación microbiana con el fin de explotar el potencial de los sustratos. La fermentación en estado sólido permite la construcción de un reactor más compacto con menos consumo de energía y agua, lo que reduce el impacto ambiental¹⁸ .

Los carotenoides representan en la actualidad gran importancia; estos pigmentos además de proporcionar color, actúan como precursores de vitamina A y tienen propiedades antioxidantes. Para su respectiva producción se requiere síntesis química o extracción de plantas que tienen un costo elevado comparado al rendimiento. Podría ser mejor esta producción si se buscan alternativas como usar sustratos de bajo costo como los desechos agroindustriales. Estos residuos puede proporcionar fuente de carbono y nitrógeno suficientes¹⁹ .

Entre los colorantes de origen natural se encuentran los carotenoides, una clase de pigmentos con coloraciones que oscilan entre el amarillo-naranja (β -caroteno) y el rojo (licopeno). En

este estudio, se evidenció crecimiento de *Rhodotorula sp.*, en el medio de cultivo con cáscara de banano, por lo cual muestra ser una fuente de carbono prometedora debido a su contenido de azúcares²⁰.

Adicional a los distintos residuos agroindustriales usados para la obtención de levaduras ya nombrados, se encuentra el cartón que es un subproducto de la industria papelera y contiene una cantidad adecuada y alta de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa), esto significa que es una fuente importante de azúcares fermentables para la producción biotecnológicas de las respectivas levaduras. La levadura *R. glutinis* crece en el hidrolizado de cartón, aun cuando no ha sido destoxificado queriendo decir que es tolerable a los subproductos de degradación²¹.

El aumento del contenido de nitrógeno orgánico en el medio de cultivo ejerce un efecto positivo, tanto en la síntesis de β -carotenos como en la producción de biomasa; por lo que se logra una mayor concentración de levadura con un contenido más alto en β -carotenos a medida que se incrementa la concentración de extracto de levadura²².

En un estudio realizado en Taiwán en el año 2016, se identificó una levadura para producción de carotenoides teniendo en cuenta que entre los candidatos existentes para la producción de carotenoides la levadura es la mejor debido a su crecimiento rápido, incubación fácil y aumento de escala. En el estudio los porcentajes de β -caroteno, toruleno y torularhodina fueron 28.8%, 48.0% y 23.2%, respectivamente. Y, el pH y la temperatura óptimos para la síntesis de carotenoides fueron 5 y 25 ° C, respectivamente²³.

Los mecanismos de biosíntesis de carotenoides son dos, el primero de estos es la etapa de biosíntesis de carotenoides que incluye la conversión de acetil-CoA a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA con la participación de hidroximetilglutaril-CoA sintasa. Posteriormente, HMG-CoA se transforma en ácido mevalónico (MVA) por reductasa específica. Como resultado de cambios subsiguientes, el compuesto se somete a fosforilación en una reacción catalizada por quinasas específicas y descarboxilación a difosfato de isopentenilo (IPP). La reacción de isomerización de IPP, conduce a la formación de pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) y luego a la DMAPP como resultado de la adición de tres moléculas de IPP. Estas reacciones conducen a la formación de geranilgeranil pirofosfato (GGPP) que contiene 20 átomos de carbono. La condensación de dos moléculas de GGPP es catalizada por la fitoeno sintasa, lo que lleva a la formación de Fitoeno (primer producto de 40 carbonos de la vía).

Este compuesto se convierte luego en neurosporeno con la participación de la fitoeno desaturasa. La molécula de neurosporeno se puede transformar en licopeno o β -zeacaroteno. Una segunda reacción probablemente tiene lugar debido a la presencia de inhibidores, tales como difenilamina o en el caso de estrés ambiental. Entonces el γ -caroteno se forma como resultado de ciclación de licopeno. Este compuesto puede ser producido en células de levadura también como resultado de la deshidrogenación de β -zeacaroteno reacción. La ciclación del γ -caroteno. La reacción, catalizada por el β -licopeno ciclasa, conduce a la formación de una molécula de β -caroteno. Además, la molécula de γ -caroteno constituye un precursor de la síntesis de toruleno. Torularhodina se produce como resultado de otras transformaciones de toruleno, que consisten en reacciones de hidroxilación y oxigenación²⁴ .

Los carotenoides también se pueden encontrar en el reino animal (plumaje de aves, peces, crustáceos e insectos), y la astaxantina y la cantaxantina se encuentran en el salmón y los crustáceos. Sin embargo, los animales (incluidos los humanos) no pueden sintetizar carotenoides, por lo que los alimentos son su única fuente de estos compuestos²⁵ .

Por otra parte, el Gobierno Nacional Colombiano ha considerado de alta importancia económica la producción de cacao, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) estima aumentar para el año 2020 las áreas de siembra. En la explotación cacaotera solo se aprovecha la semilla, que representa aproximadamente un 10% del peso del fruto. Los desechos generados están constituidos por la cáscara, la cual tiene un gran impacto ambiental, se considera de gran importancia el uso de este desecho para disminuir causa principal de pérdidas económicas de la actividad cacaotera²⁶ .

Bonadio M. y colaboradores en el año 2018 registraron en su investigación que el sustrato de caña de azúcar es de bajo costo y tiene altos niveles de carbohidratos y nutrientes, por lo que se considera un medio complejo. Sin embargo, aseguran que no se ha definido los nutrientes ideales para la producción de biomasa. Por lo tanto, utilizaron estas fuentes de nutrientes para preparar un medio sintético para conocer mejor el efecto singular de cada uno en el crecimiento de la levadura y la producción de carotenoides²⁷ .

En cuanto a la extracción del pigmento, en un estudio realizado en el Departamento de Ciencia, Tecnología y Educación Universitaria del Gobierno de Aragón en el año 2018 se

reveló que por medio de un tratamiento de PEF a las levaduras *Rhodotorula* (que se realiza con pulsos en forma de onda cuadrada con 10 kV de voltaje máximo, 180 A de corriente máxima y 3.5 kW de potencia) se obtuvo extracción de carotenoides utilizando etanol como disolvente; este método podría reemplazar otros ya que es más sostenible y genera menos impacto ambiental²⁸ .

En el año 2018, Landolfo y colaboradores utilizan un método de extracción de carotenos más complejo pero efectivo en la obtención de los mismos, se basa en alícuotas de 1–3 ml de cultivos de levadura lavadas dos veces en agua destilada estéril, resuspendidas en 1 ml de acetona, se centrifugaron durante 3 minutos a 3500 rpm y dejaron secar brevemente. El sedimento celular se resuspendió en 2 ml de DMSO precalentado a 40 ° C, se añadieron 0,5 g de perlas de vidrio lavadas con ácido, se agitó durante 5 min y se incubó a 40 ° C durante 10 min, posteriormente se lleva a ultrasonido durante 30 minutos a 60% Hertz a 60°C, y se somete a tratamientos de temperatura elevada y baja proporcionando choque térmico a las muestras. Se agregaron 2 ml de acetona, 2 ml de éter de petróleo y 2 ml de NaCl al 20%, la mezcla se agitó vigorosamente durante 5 minutos y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. La fase que contenía carotenoides se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 2 ml de DMSO al sedimento celular y se repitieron todos los pasos descritos anteriormente para obtener una segunda parte alícuota de éter de petróleo que contiene carotenoides que se agregaron a la primera²⁹ .

En el año 2018, The Business Communications Company Research informó que el β -caroteno tiene la mayor participación en el mercado mundial de carotenoides (más de \$ 300 millones para 2018), la demanda de β -caroteno está aumentando. Sin embargo, la concentración de β -caroteno en vegetales (por ejemplo, zanahoria, 0,02 mg / g) es baja y disminuye durante la transferencia y el almacenamiento. Por lo tanto, sintetizar β -caroteno por microbios es un enfoque ideal. *Rhodotorula* es una levadura productora de β -caroteno muy conocida en la industria, aunque hay muchos estudios que se centran en diferentes huéspedes, *Rhodotorula* puede utilizar varias fuentes de carbono de bajo costo, lo que lo convierte en un candidato atractivo para producir lípidos y β -caroteno en las industrias³⁰ .

Por su parte, la ingesta suficiente de β -caroteno es importante ya que actúa como fuente de vitamina A, ayudando al cuerpo a alcanzar el nivel de vitamina A necesario para un crecimiento y desarrollo normal, una buena visión y salud ocular, un fuerte sistema

inmunitario y una piel sana; como antioxidante que protege el cuerpo contra los efectos nocivos de los radicales libres, los cuales pueden aumentar el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades, inclusive enfermedades cardiovasculares o cáncer³¹.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Obtener pigmentos naturales de tipo β -caroteno de interés industrial a partir de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* mediante proceso biotecnológico usando desechos agroindustriales.

2.2 Objetivos específicos

- Formular tres medios de cultivo a partir de desechos agroindustriales (Lactosuero, bagazo de caña de azúcar y mazorca de cacao) como fuente de carbono para la fermentación de la levadura.
- Determinar la metodología que permita la obtención y cuantificación del metabolito secundario responsable de la producción del pigmento natural.
- Identificar el medio de cultivo formulado en el que la levadura crece y produce mayor concentración de β -caroteno.
- Realizar pruebas cualitativas que evalúan la aplicabilidad del pigmento en algún sector industrial.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 Pigmentos naturales

3.1.1 Definición

Sustancia utilizada como aditivo para recuperar su color, perdido tras un procesado industrial, para acentuar el color original o para dotarlo de un color más atractivo. Los pigmentos son naturales, si son extraídos de una sustancia vegetal, animal o mineral, o sintéticos, si son productos modificados química o físicamente³⁹.

Estos compuestos tienen características de importancia para muchas industrias. En la industria alimentaria, se utilizan como aditivos, intensificadores de color, antioxidantes, etc. Los pigmentos vienen en una amplia variedad de colores, algunos de los cuales son hidrosolubles. Estos pigmentos son considerados para su uso seguro como un colorante natural para alimentos en reemplazo de los sintéticos debido al mercado indeseable¹³.

3.1.2 Tipos de pigmentos naturales

Teniendo en cuenta los elementos químicos presentes en sus moléculas, se pueden dividir en dos grandes grupos: carotenos que son hidrocarburos (ejemplo β -caroteno) y xantófilas (por ejemplo astaxantina), que contienen átomos de oxígeno. Éste puede estar presente en forma de grupo hidroxilo metoxilo, epóxido, carbonilo o carboxilo, principalmente. Otros grupos oxigenados presentes en carotenoides son acetatos, lactonas y sulfatos⁵.

Los carotenoides son un tipo de pigmento liposoluble de origen vegetal que está presente en el organismo humano, el cual no lo sintetiza de novo (síntesis de moléculas complejas a partir

de moléculas simples) y los obtiene a partir de la dieta. La principal actividad de estos compuestos en las plantas es la fotoprotección del sistema fotosintético, y en el organismo humano destaca, entre otras, la actividad pro-vitamínica A⁵ 1.

3.2 Carotenoides

3.2.1 Definición

Estos tetraterpenoides están compuestos por 40 átomos de carbono formados por ocho unidades isoprenoides unidas de forma que la secuencia se invierte en el centro de la molécula, es decir, la unión de dichas unidades es “cabeza-cola”, excepto en el centro de la molécula, donde es “cabeza-cabeza”. Debido a ello, los dos grupos metilo centrales de la cadena poliénica están separados por seis átomos de carbono, mientras que el resto están separados por cinco. Algunos carotenoides son acíclicos, la mayoría contienen anillos a uno o ambos extremos de la molécula.

Teniendo en cuenta los elementos químicos presentes en sus moléculas, se pueden dividir en dos grandes grupos: carotenos que son hidrocarburos (ejemplo β -caroteno) y xantófilas (por ejemplo astaxantina), que contienen átomos de oxígeno. Éste puede estar presente en forma de grupo hidroxilo metoxilo, epóxido, carbonilo o carboxilo, principalmente. Otros grupos oxigenados presentes en carotenoides son acetatos, lactonas y sulfatos⁵ .

Son compuestos responsables de la coloración de gran número de alimentos, como zanahorias, naranja, tomates, salmón y yema del huevo. Desde hace muchos años, se sabe que algunos de estos compuestos, como α y β -caroteno, así como la β -criptoxantina, son provitaminas A. Estudios recientes han puesto exponen las propiedades antioxidantes de estos pigmentos y su eficacia en la prevención de ciertas enfermedades del ser humano, como la aterosclerosis o incluso el cáncer. Todo ello ha hecho que desde un punto de vista nutricional, el interés por estos pigmentos se haya incrementado notoriamente⁴ 0 .

3.2.2 Biosíntesis de carotenoides

Los mecanismos de biosíntesis de carotenoides son dos, el primero de estos es la etapa de biosíntesis de carotenoides que incluye la conversión de acetil-CoA a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA con la participación de hidroximetilglutaril-CoA sintasa. Posteriormente, HMG-CoA se transforma en ácido mevalónico (MVA) por reductasa específica. Como resultado de cambios subsiguientes, el compuesto se somete a fosforilación en una reacción catalizada por quinasas específicas y descarboxilación a difosfato de isopentenilo (IPP). La reacción de isomerización de IPP, conduce a la formación de pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) y luego a la DMAPP como resultado de la adición de tres moléculas de IPP. Estas reacciones conducen a la formación de geranilgeranil pirofosfato (GGPP) que contiene 20 átomos de carbono. La condensación de dos moléculas de GGPP es catalizada por la fitoeno sintasa, lo que lleva a la formación de Fitoeno (primer producto de 40 carbonos de la vía).

Este compuesto se convierte luego en neurosporeno con la participación de la fitoeno desaturasa. La molécula de neurosporeno se puede transformar en licopeno o β -zeacaroteno. Una segunda reacción probablemente tiene lugar debido a la presencia de inhibidores, tales como difenilamina o en el caso de estrés ambiental. Entonces el γ -caroteno se forma como resultado de ciclación de licopeno. Este compuesto puede ser producido en células de levadura también como resultado de la deshidrogenación de β -zeacaroteno. La reacción de ciclación de γ -caroteno, catalizada por la β -licopeno ciclasa, conduce a la formación de una molécula de β -caroteno. Además, la molécula de γ -caroteno constituye un precursor de la síntesis de toruleno. Torularhodina se produce como resultado de otras transformaciones de toruleno, que consisten en reacciones de hidroxilación y oxigenación²⁴.

3.2.3 Clasificación de los Carotenoides

Entre los colorantes de origen natural se encuentran los carotenoides, una clase de pigmentos con coloraciones que oscilan entre el amarillo y el rojo. En esta clasificación se encuentran los carotenos como el β -caroteno, α -caroteno, toruleno, torularhodina y licopeno, y las xantofilas como la luteína, la zeaxantina, la capsantina y la astaxantina (Tabla 1).

CAROTENOIDES	CAROTENOS (Carbono e hidrógeno)	α - caroteno	Zanahoria, melón, frambuesa,	Naranja
		Licopeno	Tomate, papaya, guayaba	Rojo
		β -caroteno	Zanahoria, Calabaza, papaya, espinaca, verdolaga	Naranja
		Toruleno	Yema de huevo, plantas, algas	Amarillo - Rojo
	XANTOFILAS (Carbono, hidrogeno y oxígeno)	Luteína	Verduras, frutas, ortigas, pétalos y hortalizas	Amarillo
		Zeaxantina	Algas, bacterias, maíz (zea) y yema de huevo	Amarillo
		Capsantina	Pimentón	Rojo
		Astaxantina	Trucha, salmón	Amarillo

Tabla 1. Clasificación de carotenoides, procedencia y color característico. Fuente: Propia.

3.2.4 β -carotenos

Es un miembro de la familia de los carotenoides, que son compuestos liposolubles con una gran pigmentación (naranja o amarilla) presentes de forma natural en muchas frutas, cereales, aceites y verduras. De los carotenoides que se dan de forma natural y pueden ser convertidos en vitamina A por el organismo, los llamados ‘carotenoides provitamina A’, el betacaroteno es el más abundante y el más eficiente que se halla en los alimentos. Estos compuestos se utilizan principalmente en suplementos dietéticos, colorantes alimentarios y aditivos cosméticos y farmacéuticos³.

3.2.5 Aplicaciones industriales

A nivel industrial, son el β -caroteno y la astaxantina los pigmentos de gran demanda, variedad y aplicación; en la literatura se registran aplicaciones: como agentes colorantes de alimentos, como precursores de vitamina A en alimentos, como aditivos para cosméticos y como antioxidantes para reducciones del daño celular o tisular³.

Además de contribuir a la obtención de pigmentos, estas levaduras han servido en el mercado para la extracción de aromas y sabores; en los aromas se da por los procesos físicos utilizados en la elaboración de alimentos que causan pérdidas de estos compuestos y que posteriormente requiere suplementación; por su parte, en los sabores aseguran una nutrición sana y a su vez mejoran las propiedades organolépticas de los productos. Es por esto que el área de productos naturales está creciendo en el campo de química orgánica con el uso de la biotecnología⁴.

Es notorio el efecto beneficioso de estos compuestos en la salud humana, por lo que la degradación de estos no solo conlleva a la pérdida de color en el alimento sino a la disminución de su valor nutritivo. Los carotenoides son inestables, pero esto se debe al hecho de que son compuestos altamente insaturados, degradándose fundamentalmente debido a procesos oxidativos y a otros factores como la temperatura, la luz o el pH que pueden producir cambios cualitativos en estos debido a reacciones de isomerización⁴ 1.

3.3 Desechos agroindustriales

3.3.1 Definición

Considerados subproductos y/o excedentes de la producción, con frecuencia presentan problemas de contaminación ambiental, su utilización como fuente de carbono ofrece ventajas de bajo costo para las fermentaciones microbianas y permite la obtención de compuestos bioquímicos útiles para industrias farmacéuticas, químicas y alimentarias. Para la producción de carotenoides (pigmentos naturales) se han utilizado una gran variedad de sustratos, es decir, desechos agroindustriales que favorecen la fermentación microbiana como una alternativa para la obtención de colorantes, antioxidantes o posibles inhibidores de tumores¹.

3.3.2 Problemática ambiental

El desarrollo industrial trae consigo una mejora a la calidad de vida de la población y así mismo a la economía, pero puede provocar importantes modificaciones que ocasionan el desequilibrio de ecosistemas, diversas formas de contaminación y otros problemas ambientales y sociales³⁶ .

Muchos de estos residuos son comúnmente desechados en vertederos o reducidos a cenizas provocando contaminación al entorno. Por esto, se busca día a día oportunidades de aplicación para estos materiales funcionales, se afirma que son muy poco explotadas las amplias posibilidades de aplicación de estos materiales y el desarrollo de la misma agroindustria es poco^{4 2} .

3.4 Cacao

3.4.1 Definición

El cacao es una planta originaria de las regiones tropicales de centro y Suramérica; el fruto es denominado comúnmente mazorca que nace directamente del tallo. En la explotación cacaotera solo se aprovecha económicamente la semilla, que representa aproximadamente un 10% del peso del fruto fresco²⁶ .

En Colombia el cacao es uno de los principales productos agrícolas constituyendo una alternativa económica y sostenible para el desarrollo rural. Adicionalmente el procesamiento del grano de cacao ocupa uno de los principales renglones de la economía, siendo el chocolate de mesa el producto derivado del cacao con mayor consumo en el país⁵ °.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL	
Tamaño de la porción: 100 g aprox.	
CALORIAS: 384	
	Por porción
	g
Grasa Total	5,16
Carbohidratos	45,93
Fibra	4,3
Proteína	11,96
Calcio	0,8
Fósforo Total	0,5
Ceniza	0
Ingredientes: 100% Cáscara de cacao	

Figura 1 Información nutricional cáscara de cacao.

Fuente: Mundo pecuario 2019

3.4.2 Manejo de los desechos en Colombia

El Gobierno Nacional Colombiano ha considerado de alta importancia económica la producción de cacao, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) estima aumentar para el año 2020 las áreas de siembra. Los desechos generados están constituidos por la cáscara, que para el año 2018, año de mayor producción de cacao en Colombia, representó 54.481 toneladas de residuos para el país, es decir, el 90% del fruto; se considera de gran importancia el uso de este desecho para disminuir la causa principal de pérdidas económicas de la actividad cacaotera y su impacto en el ambiente²⁶ .

Según la Guía ambiental para el cultivo del cacao se encuentran una serie de impactos sobre el medio ambiente, como: impactos sobre el suelo, aire, agua y vegetación. La identificación de impactos se realiza usando una matriz de impactos ambientales desarrollada por Fedecacao para el proceso de siembra, mantenimiento de cultivos y beneficio del cacao, en la cual se evalúan y valoran diferentes aspectos³⁸ .

3.5 Bagazo de caña de azúcar

3.5.1 Definición

Es el desecho agroindustrial de materia que queda luego de que a la caña de azúcar se le extrae el jugo azucarado. Bonadio M. y colaboradores en el año 2018 registraron en su investigación que el sustrato de caña de azúcar es de bajo costo y tiene altos niveles de carbohidratos y nutrientes, por lo que se considera un medio complejo. Sin embargo, aseguran que no se ha definido los nutrientes ideales para la producción de biomasa. Por lo tanto, utilizaron estas fuentes de nutrientes para preparar un medio sintético para conocer mejor el efecto singular de cada uno en el crecimiento de la levadura y la producción de carotenoides²⁷ .

Por otra parte, en un estudio realizado en el Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar exponen que en cifras generales, en una zafra de 8 millones de toneladas de azúcar se deben moler más de 70 millones de toneladas de caña, lo que produciría más de 20 millones de toneladas de bagazo; es decir, para la producción de esta cantidad de azúcar se desecha el 25% del bagazo, aunque en muchas ocasiones se le da uso a

este, en otras solo ocasionan daños ambientales^{4 4} .

Existen numerosos estudios realizados sobre la contaminación ambiental y su relación con enfermedades respiratorias agudas, y en uno realizado en el año 2007 por Eleonora Dávalos se halló una asociación positiva entre aumentos en la quema de la caña de azúcar y la concentración del contaminante, seguida de una relación positiva entre la concentración del contaminante y el número de consultas médicas por infecciones respiratorias agudas (IRA)^{4 5} .

INFORMACIÓN NUTRICIONAL	
Tamaño de la porción: 100 g aprox.	
CALORIAS: 384	
	Por porción
	g
Grasa Total	0,1
Carbohidratos	45,93
Fibra	0
Proteína	0,1
Hierro	0,003
Vitamina C	0,3
Calcio	4
Fósforo Total	0,5
Ingredientes: Caña de azúcar (Natural)	

Figura 2 Información nutricional caña de azúcar.

Fuente: Base de Datos Internacional de Composición de Alimentos 2010

3.5.1 Manejo de los desechos en Colombia

La caña de azúcar es de bajo costo y tiene altos niveles de carbohidratos y nutrientes, por lo que se considera un medio complejo. Sin embargo, se asegura que no se ha definido una disposición final correcta de los desechos o subproductos de la misma. Por lo tanto, se hace indispensable la reutilización, el manejo y uso del bagazo de caña de azúcar²⁷ .

El cultivo de caña de azúcar causa distintos impactos ambientales, entre estos, efectos en el suelo, ríos y aguas subterráneas. Esto debido al uso de plaguicidas, la compactación del suelo debido al uso intensivo de maquinaria agrícola, erosión del suelo, emisiones contaminantes por la quema de caña de azúcar antes de la cosecha y empobrecimiento de la diversidad biológica debido a la eliminación de seres vivos por la expansión de este cultivo³⁷ .

3.6 Lactosuero

3.6.1 Definición

Es el subproducto líquido que se obtiene después de la precipitación de la caseína al elaborar queso, contiene principalmente lactosa, proteínas como sustancias de importante valor nutritivo, minerales, vitaminas y grasa⁸. Es un líquido translúcido verde obtenido de la leche después de la precipitación de la caseína. Existen varios tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la eliminación de la caseína, el primero denominado dulce, está basado en la coagulación por la renina a pH 6,5; el segundo llamado ácido resulta del proceso de fermentación de ácidos para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos.

Para la obtención de este líquido se debe someter a un proceso en el que se rompe el sistema coloidal de la leche en dos fracciones: una fracción sólida y una fracción líquida correspondiente al lactosuero en cuyo interior se encuentran suspendidos los componentes nutricionales que no fueron integrados a la coagulación de la caseína. De esta forma, se encuentran en el lactosuero partículas suspendidas solubles y no solubles (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales), y compuestos de importancia biológica-funcional^{4 6}.

La industria láctea siendo uno de los sectores más importantes de la economía de países en desarrollo elimina aproximadamente 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera como lactosuero el cual retiene cerca de 55% del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales⁸.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL	
Tamaño de la porción: 100 g aprox.	
	Por porción
	g/L
Lactosa	44 - 46
Fosfatos	2 - 4,5
Cloruros	1,1
Proteína	6 - 8,0
Calcio	1,2 - 1,6
Lactato	6,4
Ingredientes: Lactosuero ácido	

INFORMACIÓN NUTRICIONAL	
Tamaño de la porción: 100 g aprox.	
VITAMINAS	
	Por porción
	mg/ml
Tiamina	0,38
Riboflavina	1,2
Acido nicotínico	0,85
Piridoxina	0-ene
Cobalamina	0,03
Acido ascórbico	2,2
Ingredientes: Lactosuero ácido	

Figura 3 Información nutricional Lactosuero.

Fuente: Lactosuero: importancia en la industria de alimentos 2009

3.6.2 Manejo de los desechos en Colombia

El residuo que resulta del proceso de fermentación de ácidos para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos no presenta actualmente un manejo y disposición final correcta, los procesos en los que se ponga en uso este desecho es necesaria en el país⁸. Algunas posibilidades de la utilización de este residuo han sido propuestas, pero las estadísticas indican que una importante porción de este residuo es descartada como efluente el cual crea un serio problema ambiental⁸. Además en un estudio realizado en la Universidad Nacional en Valledupar^{4 7}, se afirma que aproximadamente el 90% de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero y es uno de los subproductos más contaminantes que existen en la industria alimentaria, y el no darle uso a este producto es un gran desperdicio.

3.7 Procesos biotecnológicos

3.7.1 Definición

Es toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos^{4 8}. El uso de procesos biotecnológicos se está aumentando debido a gran variedad de aplicaciones en sistemas biológicos y organismos vivos, para la creación o modificación de productos o procesos específicos¹⁰.

3.7.2 Fermentación microbiana

La posibilidad de producir pigmentos naturales a partir de procesos de fermentación empleando microorganismos, esto es industrialmente factible ya que el costo de producción se minimiza al utilizar desechos agroindustriales como única fuente de carbono para la levadura y esta es la razón por la cual se quiere investigar la producción de colorantes a partir de microorganismos como alternativa de producción ecológica y evaluar la posibilidad para poder ser utilizados como agentes colorantes de alimentos, precursores de vitaminas en alimentos, aditivos para cosméticos así como propiedades antioxidantes.

3.7.3 Microorganismos productores de pigmentos

En el año 2010, se realizó un estudio para determinar los microorganismos productores de carotenoides, de esta manera se aislaron 116 microorganismos a partir de suelo, hojas, frutas, flores y de productos procesados en descomposición. Se concluye que los microorganismos de manzana, tomate y harina de trigo tienen gran potencial para producir pigmentos rojos; por otro lado las cepas de pulpa de manzana, suelo de la vid y harina de trigo fueron las principales productoras de pigmentos amarillos. Las colonias aisladas que presentaban estas coloraciones amarilla a roja se volvieron a aislar e identificar por sus características morfológicas y de reproducción, más pruebas fisiológicas y bioquímicas y cuatro de estas se clasificaron como *R. mucilaginosa* y una cepa como *Rhodotorula graminis*¹¹.

3.8 *Rhodotorula mucilaginosa*

3.8.1 Definición y características generales

Es una levadura epifita (crece sobre otro vegetal usándolo solamente como soporte) que muestra reproducción por gemación polar o bipolar dependiendo de la estimulación que se dé, esto indica una reproducción vegetativa; en el caso de *R. glutinis* presenta gemación bipolar. Pertenecen al Phylum Basidiomycota. Esta levadura tiene una capacidad de crecimiento a 37°C, es decir, puede desarrollarse en condiciones climáticas en donde se presenten condiciones de temperatura alta. En cuanto a sus características vegetativas varían desde un color rosa a rosa tenue y desde una forma esférica a elíptica; esto dependiendo su especie².



Figura 4. *Rhodotorula mucilaginosa*. 100X. Se observan blastoconidios ovales y elongados. Fuente: Propia

3.8.2 Características bioquímicas

El género *Rhodotorula* es un grupo diverso de levadura basidiomiceta pigmentada. Es una levadura ambiental común aislada de una amplia gama de hábitats, plantas y animales

colonizados. Se aíslan comúnmente de varios alimentos y bebidas¹⁶. En el filo Basidiomycota, está presente la *Rhodotorula* que es una levadura pigmentada, de gran importancia para la industria alimentaria por su capacidad biotecnológica. Estas cepas tienen una característica en común y es la producción a grandes cantidades de carotenoides, proteínas unicelulares de etanol, ácido acético y acetaldehído¹⁷.

3.9 Pintura plástica

3.9.1 Definición

Mezcla homogénea de componentes que una vez aplicada y seca se transforma en una película continua de espesor más o menos uniforme, sin pegajosidad al tacto y con las características o aptitud al uso con la que ha sido diseñada. Sus componentes varían en gran manera en función del tipo de acabado que se requiera y de las condiciones de aplicación y secado^{4 6}.

3.9.2 Componentes

- Ligante, resina, polímero o vehículo en algún caso
- Cargas o fillers o componentes de relleno (ocasional)
- Pigmentos
- Disolvente o disolventes más o menos volátiles (Thinner) (ocasional)
- Aditivos

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Universo, población, muestra

- Universo: Desechos agroindustriales
- Población: Residuos de producción de cacao, caña de azúcar y queso
- Muestra: Mazorca de cacao, bagazo de caña de azúcar, lactosuero

El trabajo se desarrolló en los laboratorios e instalaciones de Tecnoparque SENA-Nodo Bogotá.

Este trabajo de grado posee un enfoque industrial haciendo un correcto uso de las herramientas biotecnológicas y un enfoque ambiental ya que mediante la utilización y el aprovechamiento de los desechos se genera un producto nuevo y se disminuye el impacto de contaminación ambiental.

Según la clasificación de Sampieri y colaboradores³² este estudio se clasifica en una investigación experimental, debido a que las variables independientes son manipuladas con el fin de evidenciar su comportamiento bajo ciertas condiciones; y explicativo ya que se determinan las causas de los fenómenos teniendo en cuenta la manipulación intencional de las variables.

4.2 Hipótesis, variables, indicadores

Hipótesis: Se puede biosintetizar pigmento tipo betacaroteno haciendo uso de desechos agroindustriales tales como: mazorca de cacao, bagazo de caña de azúcar y lactosuero como sustratos de la fermentación de la *Rhodotorula mucilaginosa*.

HI: El desecho agroindustrial procedente del cacao es el sustrato ideal en el que el microorganismo mejor se desarrolla y produce mayor cantidad de pigmentos.

HO: El uso de lactosuero como sustrato de la fermentación del microorganismo no supe los requerimientos necesarios para su desarrollo y producción de pigmentos.

Variables: Factores que pueden afectar el proceso

- **Dependientes:** Crecimiento microbiano
- **Independientes:** Extracto puro de los pigmentos y las concentraciones de los mismos.

Indicadores: % de crecimiento microbiano y concentración.

4.3 Técnicas y procedimientos

Se emplearon 3 tratamientos a base de desechos agroindustriales (mazorca de cacao, lactosuero y bagazo de caña de azúcar) por duplicado, con control positivo y negativo también procesados por duplicado. En un Erlenmeyer de 500 ml se adicionan 250 ml de medio de cultivo y se llevan a 28°C en agitador a 250 rpm. La producción de pigmentos se determina colorimétricamente en las muestras obtenidas por duplicado.

A los resultados obtenidos de la totalidad de carotenoides producidos (mg/l) se aplica la técnica estadística ANOVA para obtener la relación de variables (sustratos utilizados) en base a si las medias (producción de pigmentos) eran similares o diferentes entre sí.

4.3.1 Reactivación y mantenimiento de la cepa

La cepa *Rhodotorula mucilaginosa* utilizada en este estudio se obtuvo del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca (Bogotá, Colombia), suministrada con caracterización molecular, en Agar Sabouraud Dextrosa; los repiques se realizaron en Agar PDA y Sabouraud Dextrosa para mantener la cepa y realizar posteriores procedimientos.

4.3.2 Obtención de sustratos

Los sustratos empleados para la producción de pigmentos a partir de la fermentación de la levadura fueron seleccionados porque constituyen una fuente valiosa de nutrientes de crecimiento y desarrollo microbiano, estos se obtuvieron de:

- **Mazorca de cacao.** Municipio de Ortega, Tolima.
- **Bagazo caña de azúcar.** Villeta - Cundinamarca.
- **Lactosuero.** Úmbita - Boyacá.

4.3.3 Tratamiento de sustratos

El tratamiento por el cual se sometieron los sustratos para eliminar la carga microbiana presente en cada uno consistió en selección de producto, corte, desinfección y esterilización a 121°C durante 15 minutos.

4.3.4 Preparación de medios de cultivo

Se formularon medios de cultivo líquidos y sólidos, uno de ellos de acuerdo a Noel. J y colaboradores³³ y otro desarrollado con la formulación de Costa J y colaboradores ³⁴ . Modificados de acuerdo a las condiciones de crecimiento de la levadura con los siguientes componentes. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 6 para el óptimo crecimiento de la levadura.

- **Medio de cultivo:**

0,5 - 1,5 % de lecitina
0,05 g/l de cloranfenicol
1,5 - 3 g/l g/l de peptona
500 ml de agua destilada
20 g/l de glucosa
10 % de sustrato

- **Medio de cultivo modificado:**

0,05 g/l de cloranfenicol
1,5 - 3 g/l de peptona
500 ml de agua destilada
10 % de sustrato

Se realizó formulación de medios a base de desechos agroindustriales (fuente de carbono), peptona (fuente de nitrógeno) y cloranfenicol. La obtención de estos medios fue en fase líquida y sólida, posterior a su preparación se llevaron a esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Seguido de este proceso, se adiciona el cloranfenicol y se inoculan los medios de cultivo.

- **Medio de cultivo Cacao:**

El proceso previo a la preparación del tratamiento se inició con la selección del cacao para obtener la mazorca (cáscara) fresca y la desinfección externa del mismo, posteriormente se realizó el corte con elementos estériles, obteniendo pequeños trozos de la mazorca del cacao.

La preparación sólida del tratamiento se realizó a partir del proceso de secado en incubadora a 45°C durante 24 horas y triturado en máquina trituradora manual.

La preparación líquida del tratamiento a partir del proceso de infusión y filtración para la obtención total de las propiedades de la mazorca del cacao.

0,05 g de cloranfenicol

1,5 g de peptona

500 ml de agua destilada

10 % de sustrato de mazorca de cacao

20% de inóculo

- **Medio de cultivo Caña:**

El proceso previo a la preparación del tratamiento surgió con la selección de la caña de azúcar y la desinfección externa de la misma, posteriormente se realizó el corte con elementos estériles, obteniendo pequeños trozos del bagazo de la caña de azúcar.

La preparación líquida del tratamiento se realizó con un proceso de infusión y filtración para la obtención total de las propiedades del bagazo de la caña de azúcar.

0,05 g de cloranfenicol

1,5 g de peptona

500 ml de agua destilada

50 g o ml de sustrato de bagazo de caña de azúcar

100 ml de inóculo

- **Medio de cultivo Lactosuero:**

El proceso de preparación del tratamiento consistió en la filtración y exposición a temperatura alta con el fin de eliminar microorganismos que puedan ocasionar interferencias, luego se clasificó la muestra como lactosuero ácido por su pH de 6, indicando ser de alto contenido de minerales y proteínas.

0,05 g de cloranfenicol

1,5 g de peptona

500 ml de agua destilada

50 g o ml de sustrato de de lactosuero

100 ml de inóculo

La validación de los resultados obtenidos en los medios de cultivo se realizó con un control positivo constituido por todos los componentes antes descritos, excepto el sustrato y un control negativo constituido por todos los componentes antes descritos, excepto el inóculo también utilizado como blanco y solución diluyente. Los experimentos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 250 ml de medio, el cultivo se realizó a 28°C en un agitador (WIS-20 Shaking incubator) a 150 rpm durante 50 horas, con pH de 7 y protección de exposición a la luz.

Para validar los resultados de los medios de cultivo se utiliza un control positivo y uno negativo, la formulación de los controles a partir de un medio líquido fue:

0,05 g/l de cloranfenicol

1,5 - 3 g/l g/l de peptona

500 ml de agua destilada

10 % de sustrato

Para el control negativo se utilizó el medio de cultivo sin inocular.

4.3.5 Preparación y siembra de inóculo

Previo a la preparación del medio se realizaba un pase de la cepa en medio de cultivo PDA, a partir de allí se realizaron diluciones seriadas preparadas en tubos de ensayo con 9 ml

con buffer de agua peptonada. Adicionando en cada uno de ellos asadas de colonias de la levadura, llevándola a la escala de Mcfarland de 0,5, el recuento se realizó por medio del método de recuento en placa, obteniendo unidades formadoras de colonia (UFC).

4.3.6 Densidad óptica

El crecimiento de la levadura se determinó mediante la concentración de biomasa midiendo la turbidez de la muestra a 620 nm, las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro modelo Jenway 6320D. La turbidez producida por el crecimiento microbiano de microorganismos unicelulares puede ser medida de acuerdo a la capacidad de absorber la luz. Las muestras a determinar son generalmente translúcidas cuando no presentan crecimiento microbiano.³⁵ El medio sin crecimiento de levadura se utilizó como blanco y solución diluyente.

4.3.7 Recuento en placa

En tubos de ensayo con agua peptonada se realizan diluciones adicionando un mililitro a cada tubo del tubo anterior en cajas de petri con medio de cultivo Agar extracto de Malta, se incuban a 28°C por 24h y se realiza lectura de las cajas dando reporte en unidades formadoras de colonia (UFC).

4.3.8 Ruptura celular

Las muestras obtenidas de los tratamientos se adicionaron en tubos falcon que se centrifugaron a 6000 rpm a 10°C durante 20 minutos en centrífuga HERMLE Z 326 k, posteriormente se lleva a ultrasonido WiseCleaner durante 30 minutos a 60% Hertz a 60°C, y se somete a tratamientos de temperatura elevada y baja proporcionando choque térmico a las muestras. Luego de esto se adiciona DMSO y nuevamente se centrifuga a 6000 rpm por 10 minutos a 30°C. Para la verificación de la ruptura de pared celular se realiza coloración con Cristal Violeta y bajo microscopio se evidencia la ruptura o no de la pared.



Figura 5. Lisis celular de *Rhodotorula mucilaginosa*. 100X. Se observan blastoconidios lesionados debido a una lesión en su membrana. Fuente: Propia

4.3.9 Extracción de pigmentos

Las muestras son lavadas tres veces con agua destilada estéril y se llevan a vortex en cada lavado, posteriormente se centrifugan a 6000 rpm, a 25°C durante 20 minutos en la centrífuga HERMLE Z 326 k, se adiciona 1ml de acetona a cada muestra y se centrifugan a 6000 rpm, a 25°C durante 20 minutos en la centrífuga HERMLE Z 326 k, luego las muestras se refrigeraron durante 72 horas, luego se adiciona acetona, se lleva a vortex y nuevamente centrifugación. Este proceso se repite hasta obtener en el sobrenadante el pigmento total de la muestra y el sedimento completamente blanco. Para la verificación de ruptura y extracción total de pigmentos se hace coloración con Cristal Violeta y bajo microscopio se evidencia la estructura celular.



Figura 6.
y después de obtener el pigmento en el
Fuente: Propia



Muestras antes
sobrenadante.

4.3.10 Purificación de las muestras

De las muestras obtenidas en los procesos anteriores, de cada tratamiento empleado se llevó a rotoevaporador en ciclo completo con las siguientes configuraciones: Vacío de 175 mbar, 60 rpm, 60 °C; teniendo en cuenta que el disolvente a recuperar es la acetona que tiene punto de ebullición de 58°C. La muestra purificada quedó disuelta en agua y se pudo recuperar el 100% de la acetona.



Figura 7. Proceso de purificación. Fuente: Propia

4.3.11 Cuantificación de pigmentos

De la muestra purificada se realizó cuantificación de pigmento total por medio de espectrofotometría a 420 nm, esta cuantificación se proyectó en una curva patrón para determinar la concentración del mismo. Esta curva patrón se realizó mediante la preparación de un estándar comercial a partir de las cápsulas Natural Nutrition Beta carotene con un contenido total 5000 UI de betacaroteno por cada cápsula, realizadas en diluciones seriadas con éter de petróleo como disolvente del pigmento concentrado de cada cápsula.

4.3.12 Análisis estadístico ANOVA

Esta técnica estadística fue aplicada a los resultados obtenidos de la totalidad de carotenoides producidos (mg/l) por cada medio de cultivo con los diferentes sustratos, permitió obtener la relación de variables en base a si las medias eran similares o diferentes entre sí.

Este programa estadístico concluye con el rechazo o no de la hipótesis nula (H₀) lo que permite comparar si las variables (sustratos utilizados) tienen niveles de producción diferentes o iguales.

4.3.13 Aplicación de pigmento en pintura plástica

Para darle aplicación a los pigmentos obtenidos se realizó una prueba cualitativa que consistió en identificar características del pigmento para determinar si funcionaba como pigmento de pintura plástica. Teniendo en cuenta que la composición genérica de una pintura es la siguiente, aun cuando algunos tipos pueden no contener todos los ingredientes:

- Ligante, resina, polímero o vehículo en algún caso.
- Cargas o fillers o componentes de relleno (no imperativo).
- Pigmentos.
- Disolvente o disolventes más o menos volátiles (Thinner) (no imperativo).
- Aditivos.

El pigmento debía cumplir con las condiciones de proporcionar a la pintura color, poder cubriente, alta solidez a la degradación ambiental, poder homogeneizador perdurante con los componentes de la pintura. Para ello se aplicó a los componentes de la pintura plástica en tonalidad blanca, el ensayo permitió establecer conclusiones de idoneidad tras 24 horas de montaje.

5. RESULTADOS

5.1 Identificación morfológica de la cepa

Los resultados obtenidos de la caracterización morfológica de la cepa suministrada por el cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca con previa caracterización molecular, fueron los siguientes:

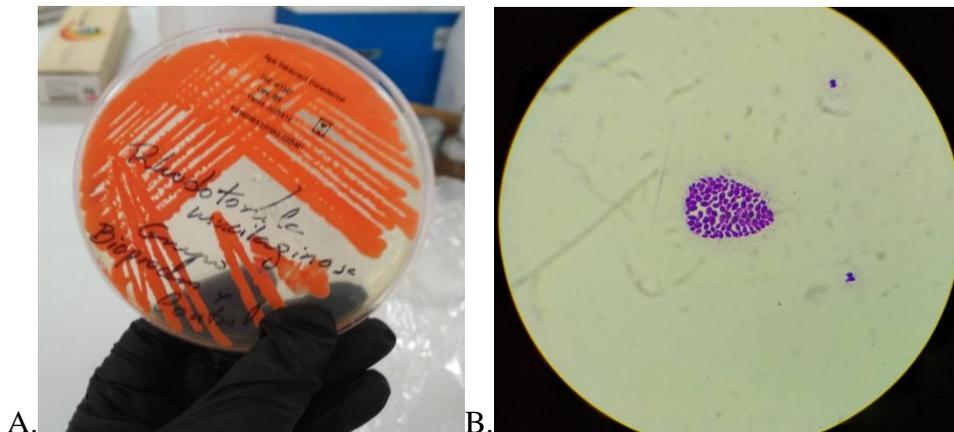


Figura 8. A.Cepa de *Rhodotorula mucilaginosa*. en medio de cultivo Sabouraud Dextrosa. B. Imagen microscópica de *Rhodotorula mucilaginosa*. coloración Cristal Violeta. Fuente: Propia

- A. Las características macroscópicas: colonias puntiformes de color naranja, suaves, lisas y húmedas.
- B. Las características microscópicas: se observan blastoconidias ovales y elongadas.

5.2 Condiciones de los medios de cultivo y parámetros de fermentación

Para la preparación y formulación de medios de cultivo se tuvo en cuenta los protocolos elaborados por Noel. J y colaboradores³³ y la formulación de Costa J y colaboradores³⁴ con algunas modificaciones. Finalizados por experimentos preliminares se obtuvo estandarización de los parámetros tenidos en cuenta para el óptimo crecimiento de la levadura y el desarrollo de la fermentación dando lugar a la producción de carotenoides.

Parámetro	Observación
Temperatura	28°C
pH	6,5-7
Sustrato	Fase líquida
Peptona	Fuente de nitrógeno
Cloranfenicol	Antibiótico
Inóculo	1*10 ⁴
Luz	Protección permanente

Tabla 2. Condiciones y parámetros de crecimiento y fermentación para *Rhodotorula mucilaginosa*.

5.3 Recuento de levaduras

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos la dilución 10^{-4} es la que se asemeja a la cantidad de levaduras necesarias para el proceso fermentativo.

En comparación con el medio PDA, utilizado como medio estándar, los medios preparados a partir de los tres desechos agroindustriales presentaron recuento de levaduras (UFC) mucho mayores.

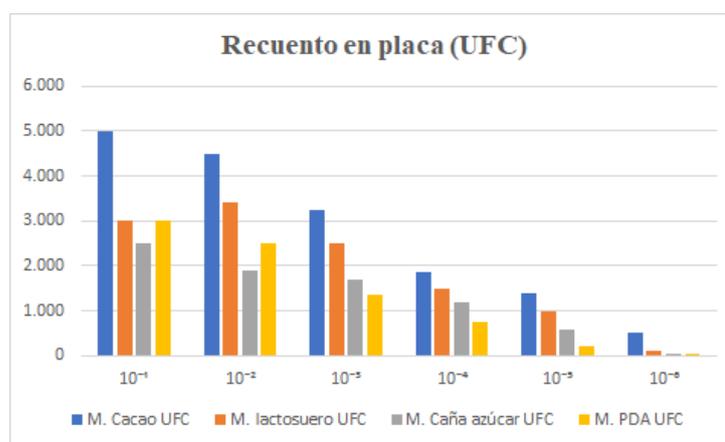


Figura 9. Gráfico de barras de Recuento de UFC de *Rhodotorula mucilaginosa*. en diferentes medios de cultivo utilizando desechos agroindustriales.

5.4 Curso temporal de la producción de biomasa y pigmentos

La concentración total en peso seco de biomasa se produjo dentro de 30 horas, siendo en promedio la tasa máxima de producción celular después de las 10 horas de incubación, esto paralelo al consumo máximo de carbohidratos por parte de la levadura (Tabla 3).

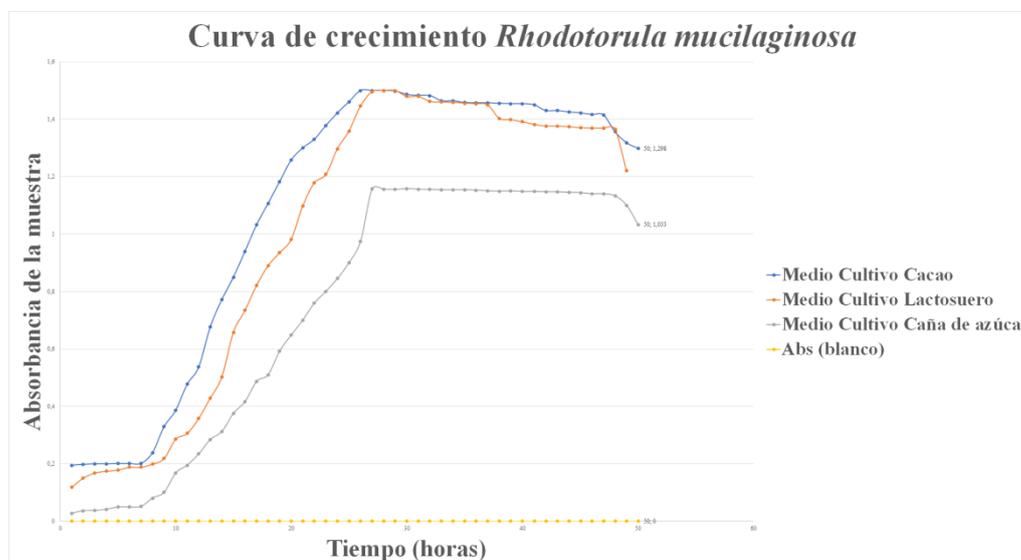


Figura 10. Curva de crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* en diferentes medios de cultivo utilizando desechos agroindustriales.

Sustrato	Fase adaptativa (horas)	Fase exponencial (horas)	Fase estacionaria (horas)	Fase muerte (horas)
Mazorca de cacao	0-8	8-30	30-48	48-
Lactosuero	0-10	10-28	28-46	46-
Bagazo caña de azúcar	0-9	9-28	28-40	40-

Tabla 3. Fases de crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* en diferentes medios de cultivo utilizando desechos agroindustriales.

5.5 Producción de pigmentos en diferentes sustratos

En la obtención de levaduras productoras de carotenoides se observaron diferencias significativas al comparar los dos medios preparados, el medio sólido generó interferencia y complejidad en el proceso de extracción de pigmentos, específicamente en la lisis celular, lo que no permitió una recuperación total de pigmento intracelular. Mientras que el medio líquido, facilitó el proceso de lisis celular y permitió una recuperación total de pigmento intracelular. La producción promedio de biomasa y la producción total de carotenoides

mostraron una relación al ser comparados por técnica de peso seco y espectrofotometría respectivamente.

Se observó un rendimiento alto de carotenoides en el medio mazorca de cacao, obteniendo un promedio de peso seco 5,384mg/l de cultivo líquido.

El medio de cultivo con sustrato bagazo de caña de azúcar no pareció ser el medio más adecuado para la carotenogénesis, mostró diferencias significativas frente a los sustratos mazorca de cacao y lactosuero (Tabla 4), se obtuvo un promedio de 2 a 4 mg/l de cultivo líquido menos que los sustratos mencionados.

Mientras que se estimuló una biomasa significativamente mayor en el medio de cultivo con sustrato de lactosuero, en el proceso de extracción se identificó que la biomasa era inferior al contenido de interferencia que presentaba el medio (Tabla 4). La residualidad del lactosuero una vez finalizó el proceso fermentativo significó dificultad en el momento de extracción y recuperación total de biomasa.

Sustrato	pH final	Temperatura final (°C)	Peso seco Biomasa (g/500ml)	Colorimetría (Abs)	Concentración de carotenoides totales	Total carotenoides (mg/500ml)
Mazorca de cacao	6,5	28	6,73	1,765	2,95	5,384
Lactosuero	6,5	28	8,67	1,283	2,72	3,332
Bagazo caña de azúcar	7	28	4,64	0,631	2,66	2,554

Tabla 4. Resultados obtenidos de la producción total de biomasa y pigmentos en los diferentes medios de cultivo utilizando desechos agroindustriales.

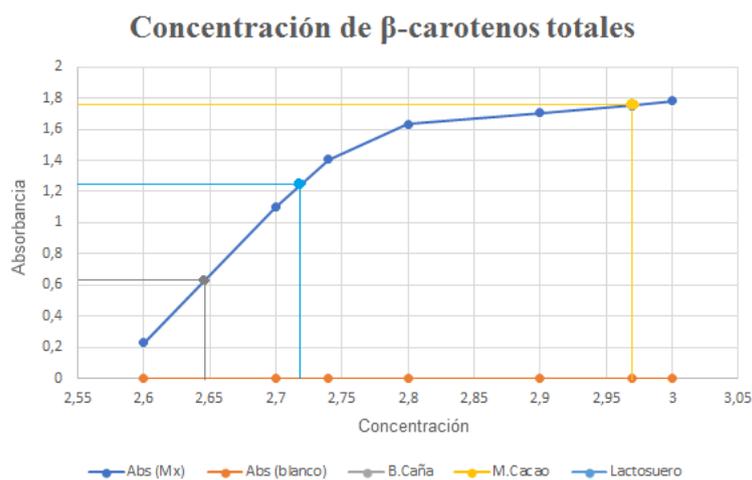


Figura 11. Concentración total de betacarotenos respecto a curva patrón.

5.6 Control de pH y luz

En la figura se evidencia la protección de la exposición a la luz ya que esta inhibe el crecimiento celular y las enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenos y el control de pH se mantuvo ligeramente ácido como preferencia por parte de la levadura en los medios durante todo el proceso fermentativo.



Figura 12. Control de exposición a la luz.

5.7 Evaluación de medios de cultivo

Se realizó un control de calidad a cada medio de cultivo, preparados con los componentes ya mencionados sin inoculación y llevados a incubación por 24 horas a 30°C, de este proceso se evidencio por turbiedad que no habría contaminación microbiológica, sin embargo, se sembró en medio de cultivo PDA en donde no hubo crecimiento de ningún tipo de colonia.

5.8 Análisis estadístico ANOVA

Aplicando la técnica estadística ANOVA para análisis de varianza de un factor, se señala la relación de las variables y con alto nivel de significancia se rechaza la HO: todas las medias son iguales.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Observaciones	Suma	Promedio	Varianza
Sustrato M. Cacao	5	26,92	5,384	0,19363
Sustrato Lactosuero	5	16,66	3,332	0,10102
Sustrato B. Caña azúcar	5	12,77	2,554	0,14388

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	21,37481333	2	10,68740667	73,1129455	1,90293E-07	3,885293835
Dentro de los grupos	1,75412	12	0,146176667			
Total	23,12893333	14				

Tabla 5. Análisis estadístico ANOVA

Mazorca de cacao (mg/500ml)	Lactosuero (mg/500ml)	Bagazo caña azúcar (mg/500ml)	Prueba de hipótesis	
5,95	3,19	2,8	HO: Todas las medias son iguales	
5,27	3,35	2,24	HI: al menos una diferente	
5,64	3,81	3,1	Condiciones de rechazo	
4,78	2,94	2,27	F > V crítico	Rechazo HO
5,28	3,37	2,36	F < V crítico	No rechazo HO

Tabla 6. Referencias del análisis estadístico ANOVA

5.9 Prueba cualitativa para aplicación en pintura plástica

Se realizó un análisis cualitativo con ciertas características que un pigmento debe cumplir para ser apto como colorante de pintura líquida. Las observaciones de aceptabilidad o rechazo se reflejan en la siguiente tabla que resume el resultado obtenido^{4 5}.

Característica	Observación
Tono	Naranja
Poder colorante	Alto
Recubrimiento	Completo
Bajo costo	Sí
No contaminante	Sí
Fácil aplicación	Sí
Color perdurable	Sí
Opacidad	Baja

Tabla 7. Características del pigmento obtenido

De los pigmentos obtenidos se determina que son aptos para el uso o aplicación en pintura plástica la cual corresponde a una pintura disuelta en agua ya que cumple con las condiciones de pigmento cuya función es proporcionar a la pintura color y poder cubriente. Los pigmentos son opacos tanto en seco como en húmedo, presenta un tipo de recubrimiento completo, es permeable, de aspecto mate agradable, de bajo costo y respetuoso con el medio ambiente. Adicionalmente se atribuyen las características de producción natural y buen rendimiento.

6. DISCUSIÓN

El microorganismo suministrado por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca identificado molecularmente como: *Rhodotorula mucilaginosa*, es una levadura registrada en la literatura con varias aplicaciones en el sector industrial, es apta para la carotenogénesis y procesos biotecnológicos, además se identifica como un microorganismo de crecimiento rápido, no fastidioso y estable para la fermentación de medios de cultivo utilizando como única fuente de carbono desechos agroindustriales.

El pigmento obtenido se caracterizó por ser de color naranja, con tonalidades variadas de acuerdo al sustrato utilizado, resultados similares e iguales se evidencian en estudios realizados por Reyes G. y Franco M. donde la producción de pigmentos a partir de *Rhodotorula mucilaginosa* se clasificó como β - caroteno (color naranja), así mismo, en el estudio de Cheng Y. e Yang C. concluyó con la obtención de pigmentos principalmente β - caroteno, torulina y toruladina, estos dos últimos pertenecientes a los carotenos pero con poca información registrada en la literatura.

Las propiedades de producción de β - caroteno de *Rhodotorula mucilaginosa* se examinaron utilizando desechos agroindustriales. Las condiciones óptimas para el crecimiento se encontraron a un pH de 6,5 a 7, a una temperatura de 28°C, cloranfenicol como antibiótico, inóculo al 1×10^4 y sin exposición a la luz. Estos parámetros también se tuvieron en cuenta en el proceso fermentativo, la agitación apropiada permitió una mayor disponibilidad de nutrientes en el medio, el pH ligeramente ácido influyó en el crecimiento celular ya que existe preferencia general por parte de las levaduras, por su parte, la temperatura controló la concentración de enzimas involucradas en la producción de carotenoides, y por último, la falta de exposición luminosa favoreció el crecimiento ya que ésta inhibe las enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides y produce estrés celular.

Según la literatura consultada, las únicas materias primas utilizadas probadas para la producción de carotenoides por levadura *Rhodotorula mucilaginosa* han sido entre otros el lactosuero y la caña de azúcar, siendo desechos agroindustriales destacados como fuente de carbono para la fermentación, nuestros resultados demostraron que la mazorca del cacao podría utilizarse en procesos biotecnológicos siendo fuente adecuada de carbohidratos para la carotenogénesis, haciendo el proceso rentable y favoreciendo al impacto ambiental que ocasiona en la actualidad este desecho.

Los rendimientos obtenidos con los medios de cultivo preparados a partir de sustratos lactosuero y bagazo de caña de azúcar fueron similares comparados con los reportados en la literatura. Durante la fermentación parecía producirse mayor cantidad de carotenoides en el medio de cultivo lactosuero, sin embargo, en la extracción y cuantificación del pigmento se revela que la máxima producción se tuvo en el medio cacao en la finalización de la fase exponencial.

Respecto al resultado del total de carotenoides, se observa que el medio de mazorca de cacao con un total de 5,38 mg/500 ml presenta mayor la mayor cantidad de pigmento con respecto a los medios de bagazo caña de azúcar y de Lactosuero ya que presentan un total de carotenoides de 2,55 mg/500 ml y 3,33 mg/500 ml, respectivamente. Además, el medio con cacao presenta un color perceptible a la vista, lo que en los demás medios no se logró. Con la adición de este sustrato de mazorca de cacao al medio mejoró la producción; en general, el aumento de la concentración de este en el medio aumentó el crecimiento de la formación de las levaduras y así mismo de carotenoides.

Otras investigaciones realizadas por Valduga E, Oliveira P y Tiggemann L. en donde fueron utilizados los desechos agroindustriales caña de azúcar y lactosuero en el proceso fermentativo para la obtención de pigmentos, el resultado de producción total fue 4.165 mg/L de β -carotenos y en el estudio realizado por Rhman A, Mohamed A, Ahmed R. fue de 3.81mg/L de β -carotenos. Frente a los resultados obtenidos en esta investigación se estima la producción total del pigmento con valores similares o inferiores a los mencionados con el bagazo de caña de azúcar (2.554 mg/L) y lactosuero (3.332 mg/L), teniendo en cuenta que en la extracción del pigmento hubo interferencia porque el desecho agroindustrial generaba residualidad que se combinaba con la biomasa obtenida en cada medio de cultivo.

La cuantificación de pigmento total por medio de espectrofotometría a 420 nm, se proyectó en una curva patrón para determinar la concentración del mismo, obteniendo que la máxima concentración de betacarotenos respecto a la curva patrón fue del pigmento obtenido a partir del medio de cultivo mazorca de cacao con 2,95 de concentración, seguido del pigmento obtenido a partir del medio de cultivo lactosuero con 2,72 de concentración y por último el pigmento de bagazo de caña de azúcar con una concentración de 2,66.

Con el fin de obtener el metabolito secundario deseado, sintetizado por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*, según la metodología de Noel. J y colaboradores³³, y Landolfo y

colaboradores (2018) para la extracción del pigmento intracelular se debían realizar una serie de procedimientos con equipos que no estaban a nuestro alcance y uso de químicos costosos. Considerando la complejidad de lisis celular de las levaduras, pared celular compuesta de polímeros de betaglucanos, alfananos manoproteínas y quitina, se estandarizó una metodología que permitió la obtención total del pigmento intracelular al lisar por completo las células mediante procesos físico químicos (Ver anexo 2).

Posterior a la purificación de la muestra y obtención de la concentración final de carotenoides producidos por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*, se realizaron pruebas cualitativas para determinar la idoneidad de estos pigmentos en la industria de la pintura, por lo que se caracterizaron y clasificaron dando como resultado que son aptos para ser componente indispensable en la pintura^{4 5}.

El análisis de la varianza de un factor determinó que la variable independiente: Sustrato (Mazorca de cacao, lactosuero y bagazo caña de azúcar) produce efectos significativos para la variable dependiente: Producción de carotenoides. Esto se puede afirmar por dos razones, la primera es porque el resultado de F es mayor al Valor crítico para F, es decir, tenemos un F significativo, la segunda porque la probabilidad es menor a 0,05 de esta forma se rechaza la hipótesis nula H_0 : la producción de β -carotenos por parte de los tres sustratos es igual. Es importante reconocer que el promedio de las medias de las variables independientes no define la significancia de la prueba, esta es significativa por análisis estadístico que reconoce el comportamiento y efecto de la variable independiente frente a la variable dependiente, existe un comportamiento de esta última variable en los diferentes medios de cultivo.

El rendimiento del sustrato mazorca de cacao en nuestra investigación fue favorable, a pesar de no tener registro en la literatura siendo utilizado en procesos biotecnológicos para la producción de pigmentos, el análisis indica que por su producción total 5.384mg/L de β -carotenos y obtención total de biomasa 6.73g/L el desecho agroindustrial suple los requerimientos de la levadura y promueve su crecimiento. Resultado similar al obtenido con la mazorca del cacao se encontró en el estudio realizado por Buzzini P y Martini A. que se llevó a cabo mediante procesos biotecnológicos y se obtuvo un total de 5.95 mg/L de carotenoides utilizando como única fuente de carbono el mosto de uva y una biomasa total de 6.5g/L.

Se obtuvieron características del pigmento para poder ser clasificado, el tono naranja observado en húmedo indicó la capacidad del pigmento de dar color cuando se mezcla con otro (poder colorante alto) y de ocultar el fondo cuando se incorpora a una superficie (recubrimiento completo). El bajo costo y la no contaminación al medio ambiente fueron características sobresalientes del pigmento. Se clasifica como un pigmento orgánico coloreado: tono brillante, vivo, puro, con baja resistencia a la luz, al calor y a los disolventes. Al ser un pigmento con poca opacidad implica que deben ser utilizados en combinación con los pigmentos inorgánicos.

Por lo tanto, la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* es y será uno de los microorganismos más prometedores para la producción comercial de carotenoides mediante el uso de desechos agroindustriales como fuente de carbono y además muy económica.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La formulación de medios de cultivo se hizo a partir de la metodología empleada por Noel J y colaboradores y la formulación de Costa J y colaboradores con algunas modificaciones estandarizadas para *Rhodotorula mucilaginosa*, condiciones de crecimiento temperatura, pH, exposición a luz, adición de sustrato, peptona e inóculo de levaduras. En estos tres medios de cultivo se obtuvo una producción de metabolito secundario, es por esta

razón que se confirma que los subproductos industriales utilizados como fuente de carbohidratos en los medios de cultivo son propicios por su alto contenido nutricional.

El pigmento obtenido fue el β - caroteno identificado por el color naranja y las características de producción registradas en la literatura por parte de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*, la metodología que se estandarizó fue la aplicada por Noel J y colaboradores³³ con algunas modificaciones y Landolfo y colaboradores (2018) para la extracción y cuantificación del pigmento intracelular considerando la complejidad de lisis celular de las levaduras al presentar una pared celular compuesta de polímeros de betaglucanos, alfamananos manoproteínas y quitina, esta metodología permitió la obtención total del pigmento intracelular al lisar por completo las células mediante procesos físicos y químicos (Ver anexo 2).

El medio de cultivo formulado con mayor crecimiento de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* y producción de carotenoides fue el que contenía el sustrato mazorca de cacao, con una producción total 5.384mg/L de β -carotenos y obtención total de biomasa 6.73g/L; el análisis estadístico demostró la diferencia significativa de los tres medios de cultivo formulados en cuanto a la variable producción de pigmento.

Se realizaron pruebas cualitativas que determinaron que el pigmento obtenido cumplía con las condiciones para ser aplicado como pigmento de pintura plástica por su poder colorante, recubrimiento completo, bajo costo, fácil aplicación, color perdurable y además no es contaminante. Además se obtiene de una producción natural y tiene buen rendimiento.

La concentración más alta de carotenoides en mg de carotenoides totales por litro de medio de cultivo se obtuvo cuando se usaron 20 g /L de mazorca de cacao como fuente de carbono, mientras que el mayor rendimiento del producto mg de células secas se logró cuando 20 g/ L de lactosuero fue la fuente de carbono en el medio de cultivo.

La obtención biotecnológica de pigmentos naturales de interés industrial ha adquirido un gran interés debido a que los procesos de síntesis química terminan siendo dispendiosos y contaminantes. En la actualidad se presenta la necesidad de nuevas estrategias de producción que no sean nocivas para el medio ambiente, este cambio se basa en la idea de hacer uso de los desechos generados por la industria, debido a que son de bajo costo y fácil acceso.

Las levaduras por presentar un alto crecimiento y desarrollo permiten que a través del metabolismo primario de fuentes precursoras, se logre la obtención de sus metabolitos secundarios, lo cual sigue generando una buena expectativa y alternativa en su uso, lo que no sólo le confiere competir con las sustancias sintetizadas químicamente sino la facultad de disminuir la contaminación ambiental.

El mundo actual se caracteriza por una producción mayor que su consumo y, en consecuencia, la generación de subproductos que no sólo rompen con el ciclo económico, sino que tienen repercusión en el ambiente. Debido a eso, la disponibilidad y la necesidad de uso de estas fuentes de carbohidratos se debe extender, hacer más investigaciones y aplicaciones que favorezcan y minimicen el impacto ambiental mundial.

En la actualidad a nivel nacional y mundial existe una tendencia en el mercado por una producción de cacao mucho mayor que en años anteriores y, en consecuencia, por un gran excedente de mazorca de cacao en ciertas regiones. Debido a esto, la fácil disponibilidad de esta fuente de carbohidratos, que debe ser eliminado causando contaminación, podría servir para una mayor investigación de ampliación prometedora y valiosa.

Se plantea confirmar los resultados obtenidos con una cromatografía HPLC, técnica que permite conocer con exactitud el pigmento obtenido y la cuantificación de estos ya que para este estudio esta confirmación no estuvo al alcance. Además se sugieren estudios para la obtención de pigmentos naturales con otros microorganismos y/o desechos agroindustriales para determinar su capacidad de producción y concentración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Buzzini P, Martini A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Tecnología Bioambiental*. [Internet] 2000;71(1):41-44. [Citado 10 feb 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852499000565>
2. Guerrero V, Trevizo M, Gardea A, Figueroa C, Romo A, Blanco A, et al. Identificación de Levaduras Epífitas Obtenidas de Manzana. *Revista Mexicana de*

- Fitopatología. [Internet] 2004;22 (2):223-230. [Citado 10 feb 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222209>
3. Aksu Z, Eren T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. [Internet] 2005; 40 (9):2985-299. [Cited 15 feb 2019]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511305001157#!>
 4. Reyes G, Franco M. Producción biotecnológica de sabores, pigmentos y aromas a partir de hongos miceliales y levaduras. [Internet] 2006;11 (2): 23-30. [Citado 10 feb 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49911202>
 5. Meléndez A, Vicario I, Heredia F. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. [Internet] 2007;57 (2): 109-117. [Citado 12 feb 2019]. Disponible en: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2007/2/art-2/>
 6. Zümriye A, Eren A. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. [Internet] 2007;35 (2): 107-113. [Citado 12 feb 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X07000083>
 7. Maldonade I, Rodriguez D, Scamparini A. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. [Internet] 2008;107 (1):145-150. [Cited 20 feb 2019]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607007716?via%3Dihub>
 8. Ricardo P. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. [Internet] 2008; 62 (1): 4967-4982. [Cited 20 jun 2019]. Available in: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a21v62n1.pdf>
 9. Valduga E, Oliveira P, Tiggemann L, Treichel H, Toniazzo G, Zeni J, et al. Carotenoids production: microorganisms as source of natural dyes. [Internet] 2009; 32 (9): 2429-2436. [Cited 15 feb 2019]. Available in: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000900036
 10. Johnson E, Echavarri C. Yeast Biotechnology. [Internet] 2011; 21-44. [Cited 15 feb 2019]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521491000033?via%3Dihub>
 11. Zeni J, Colet R, Cence K, Tiggemann L, Toniazzo G, et al. Screening of microorganisms for production of carotenoids. [Internet] 2011; 9 (2): 160-166. [Cited 15 feb 2019]. Available in: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/19476337.2010.499570>
 12. Jaswir I, .Noviendri D, Fitri R, Octavianti F. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. [Internet] 2011; 33 (5): 7119-7131. [Cited 15 feb 2019]. Available in:

- https://www.researchgate.net/publication/266354461_Carotenoids_Sources_medicinal_properties_and_their_application_in_food_and_nutraceutical_industry
13. Rhman A, Mohamed A, Ahmed R. Isolation, Identification and Screening of Carotenoid-Producing Strains of *Rhodotorula glutinis*. [Internet] 2012; 3 (1): 627-633. [Cited 15 feb 2019]. Available in: https://file.scirp.org/pdf/FNS20120500006_52932924.pdf
 14. Malik K, Tokkas J, Goyal S. Microbial Pigments: A review. [Internet] 2012; 1 (4): 361-365. [Cited 15 feb 2019]. Available in: <http://ijmrt.inpressco.com/wp-content/uploads/2012/12/IJMRT-12-14-94-F.pdf>
 15. Irazusta V, Nieto C, Cabral M, Amoroso M, figueroa M. Relación entre la producción de carotenoides, la biorremediación de cobre y el estrés oxidativo en *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11. [Internet] 2013; 48 (5-6): 803-809. [Citado 12 feb 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511313001591>
 16. Albertyn J, Pohl V. *Rhodotorula*. Microbiología de alimentos [Internet] 2014; 291-295. [Citado 17 feb 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002895#!>
 17. Hernández A, Montañez J, Aguilar M, Martínez C, Rodríguez R, Aguilar C, et al. *Rhodotorula glutinis* como fuente de pigmentos y metabolitos para la industria alimentaria. [Internet] 2014; 5 (1): 64-72. [Citado 17 feb 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212429213000849>
 18. Hernández A, Montañez J, Martínez C, Rodríguez R, Aguilar C. Producción de carotenoides por *Rhodotorula glutinis* YB-252 en fermentación en estado sólido. [Internet] 2014; 7 (1): 31-36. [Citado 17 feb 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212429214000170>
 19. Mata L, Montañez J, Méndez A, Noé C. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. [Internet] 2014; 13 (1): 1-11. [Cited 15 feb 2019]. Available in: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1475-2859-13-12>
 20. Alzate K, Ramírez D, Betancur D, Osorio V. Producción de pigmentos tipo carotenoides a partir de la levadura *Rhodotorula sp.*, usando cáscara de banano como única fuente de carbono. [Internet] 2015 [Citado 10 feb 2019]. Disponible en: http://www.colmayor.edu.co/archivos/21_produccion_de_pigmentos_tipo_3hgej.pdf
 21. González Y, Meza J, Anzaldo J, Sanjuán R. Obtención de azúcares fermentables desde residuos de cartón para cultivar levaduras de interés biotecnológico: Revista mexicana de ciencias forestales. [Internet] 2015; 6 (28): 88-105. [Citado 26 ene 2019]. Disponible en:

- http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322015000200007&lng=es&tlng=es.
22. Oramas N, Alvarez R, Gómez E, Díaz A. Estudio preliminar de b - carotenos en *Rhodotorula glutinis*. [Internet] 2016; 26 (3): 41-46. [Citado 29 ene 2019]. Disponible en: http://karin.fq.uh.cu/acc/2016/CIENCIAS_TECNICAS/032/New/Documentaci%C3%B3n/Parte%20I/Referencias/Revistas/ICIDCA%20sobre%20los%20derivados%20de%20la%20cana%20de%20az%C3%BAcar/Revista%20ICIDCA%20Vol.%2026%20no.%203%201992.pdf
 23. Cheng Y, Yang C. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. [Internet] 2016; 61 (1): 270-275. [Cited 15 feb 2019]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187610701600002X>
 24. Kot A, Blazajak S, Kurcz A, Gientka I. *Rhodotorula glutinis*-potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. [Internet] 2016; 100 (14): 6113-6117. [Cited 15 feb 2019]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27209039>
 25. Amorim K, Cepeda A, Fende C, Regal P. Review of methods for analysis of carotenoids. [Internet] 2016; 56 (1): 49-73 [Cited 15 feb 2019]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993614000193>
 26. Villamizar Y, Rodríguez J, León L. Caracterización fisicoquímica, microbiológica y funcional de harina de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN-51. [Internet] 2017; 9 (1): 65-75. [Citado 20 feb 2019]. Disponible en: <http://ojs.tdea.edu.co/index.php/cuadernoactiva/article/view/421/493>
 27. Bonadio M, Aline L, Rossini M. Producción de carotenoides en jugo de caña de azúcar y medios sintéticos suplementados con nutrientes por *Rhodotorula rubra* 102. [Internet] 2018; 49 (4): 872-878. [Citado 20 feb 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838217306998>
 28. Martínez J, Delso C, Angulo J, Álvarez I, Raso J. Pulsed electric field-assisted extraction of carotenoids from fresh biomass of *Rhodotorula glutinis*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. [Internet] 2018; 47: 421-427. [Cited 15 feb 2019]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856418303266>
 29. Landolfo S, Laniri G, Salvatore C, Porceddu A, Mulas G, et al. CAR gene cluster and transcript levels of carotenogenic genes in *Rhodotorula mucilaginosa*. [Internet] 2018; 164 (1): 78-87. [Cited 15 feb 2019]. Available in: <https://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000588>

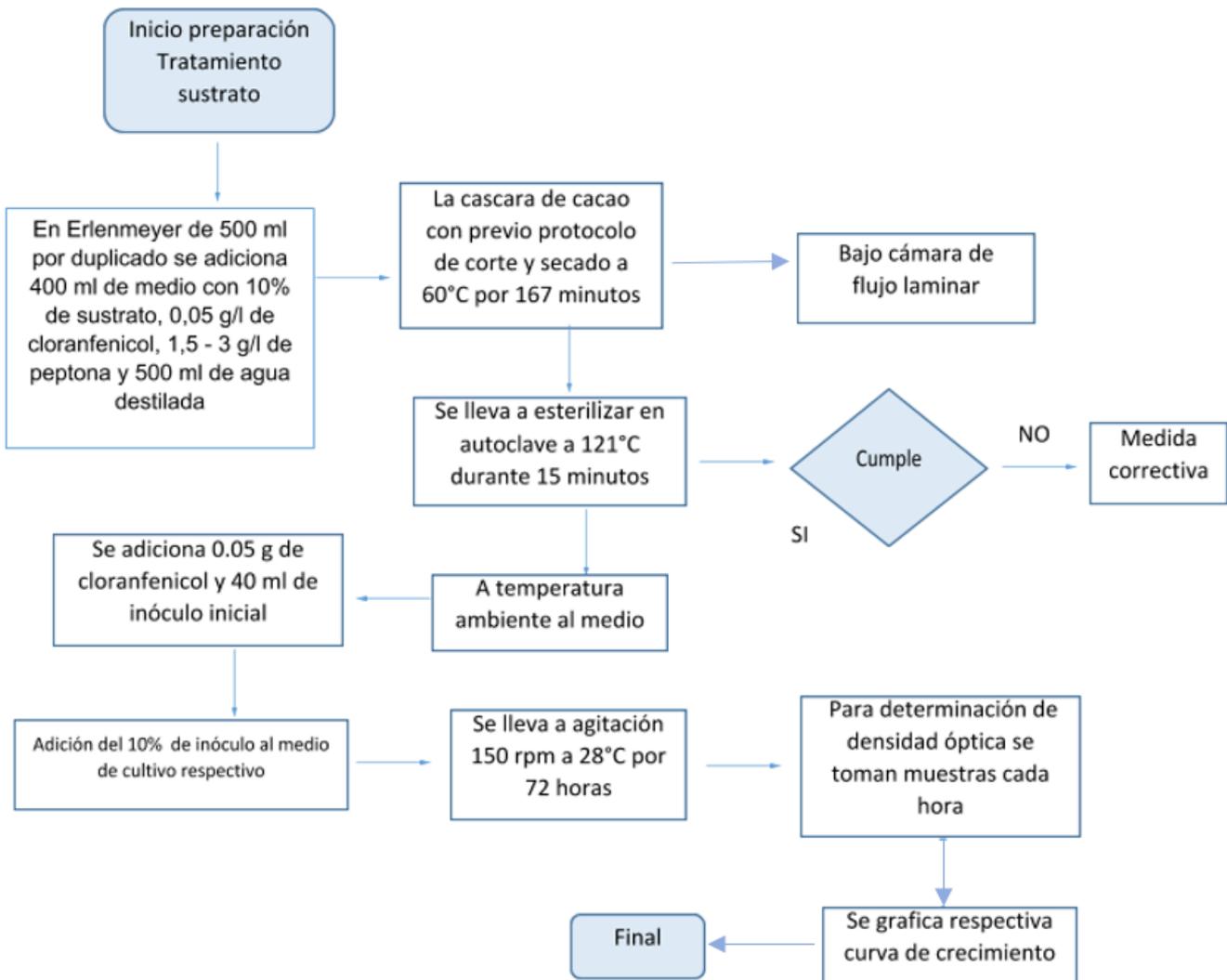
30. Hong P, Marimuthu A, Ying K, Yuju L, Juijen C, et al. Engineering the oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for simultaneous β -carotene and cellulase production. [Internet] 2018; 8 (1): 1-10. [Cited 15 feb 2019]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30022171>
31. Nutri- Facts. Betacaroteno- Funciones para la salud.[Internet] 2018: 1-4. [Citado 20 feb 2019]. Disponible en: <https://www.nutri-facts.org/content/dam/nutrifacts/pdf/nutrients-pdf-es/Betacaroteno.pdf>
32. Sampieri R., Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. [Internet] 2014; 6 (1):1-20. [Citado 6 de Oct 2019]. Disponible en: <http://observatorio.epacartagena.gov.co/wp-content/uploads/2017/08/metodologia-de-la-investigacion-sexta-edicion.compressed.pdf>
33. Noel J, Acacio C, Lourdes M, et al. Desarrollo de un procedimiento para la extracción de β -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella sp.* en la salina Las Cumaraguas [Internet] 2013; 25 (2): 214-228. [Citado 6 de Oct 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543735009.pdf>
34. Costa. J, Estrella. A, et al. Procedimiento de producción de β -caroteno. [Internet] 2002; 2: 1-36. [Citado 6 de Oct 2019]. Disponible en: <https://patentimages.storage.googleapis.com/74/c7/8e/c7a03b7098612a/WO2002010429A1.pdf>
35. UNAM, Facultad de química. Medición del crecimiento Microbiano. [Internet] 2011;1-26. [Citado 6 de Oct 2019]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4b_MedicionCrecimiento_19837.pdf
36. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). La Habana, Cuba. Industrial development and its impact on the environment. [Internet] 2014; 52 (3): 357-363. [Citado 28 de Ene 2020]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300008
37. Zoratto A. Associação. Amigos Da Natureza Da Alta Paulista. Principales impactos de la caña de azúcar. [Internet] 2006 [Citado 28 de Ene 2020]. Disponible en: <https://www.virtualpro.co/biblioteca/principales-impactos-de-la-cana-de-azucar>
38. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Guía ambiental para el cultivo del cacao. [Internet] 2013; 2 (1): 1-127. [Citado 28 de Ene 2020]. Disponible en: https://www.fedecacao.com.co/portal/images/recourses/pub_doctecnicos/fedecacao-pub-doc_05B.pdf

39. Sánchez J. Revista Química viva. La química del color en los alimentos. [Internet] 2013; 12 (3): 234-246. [Citado 29 de Ene 2020]. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/863/86329278005.pdf>
40. Noel J. Revista Cubana de Química. Desarrollo de un procedimiento para la extracción de β -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella sp.* en la salina Las Cumaraguas. [Internet] 2013; 25 (2): 214-228. [Citado 29 de Ene 2020]. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543735009.pdf>
41. Meléndez A. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. [Internet] 2004; 54 (2): 209-215. [Citado 29 de Ene 2020]. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200011
42. Cabrera R. Centro Azúcar. Caracterización de residuos agroindustriales con vistas a su aprovechamiento. [Internet] 2016; 43 (4): 27-35. [Citado 29 de Ene 2020]. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612016000400003
43. Triana O. Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Caracterización de los residuos de la cosecha de la caña de azúcar almacenados a granel. [Internet] 2014; 48 (1): 65-70. [Citado 30 de Ene 2020]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223131337010.pdf>
44. Álvarez E. Desarrollo Y Sociedad. La caña de azúcar: ¿una amarga externalidad? [Internet] 2017; 59: 117-164. [Citado 30 de Ene 2020]. Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/dys/n59/n59a5.pdf>
45. Alonso J. Universidad Politécnica de Madrid. Pinturas, Barnices y afines: Composición, formulación y caracterización. [Internet] 2013 [Citado 30 de Ene 2020]. Disponible en:
<http://oa.upm.es/39501/1/ControlCalidadPinturas.pdf>
46. Poveda E. Revista Chilena de Nutrición. Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. [Internet] 2013; 40 (1): 397-403. [Citado 1 de Feb 2020]. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/469/46929416011.pdf>
47. Álvaro V. Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Valledupar, César, Colombia. Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. [Internet] 2013; 4 (2): 55-65. [Citado 1 de Feb 2020]. Disponible en:
<http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/992/968>

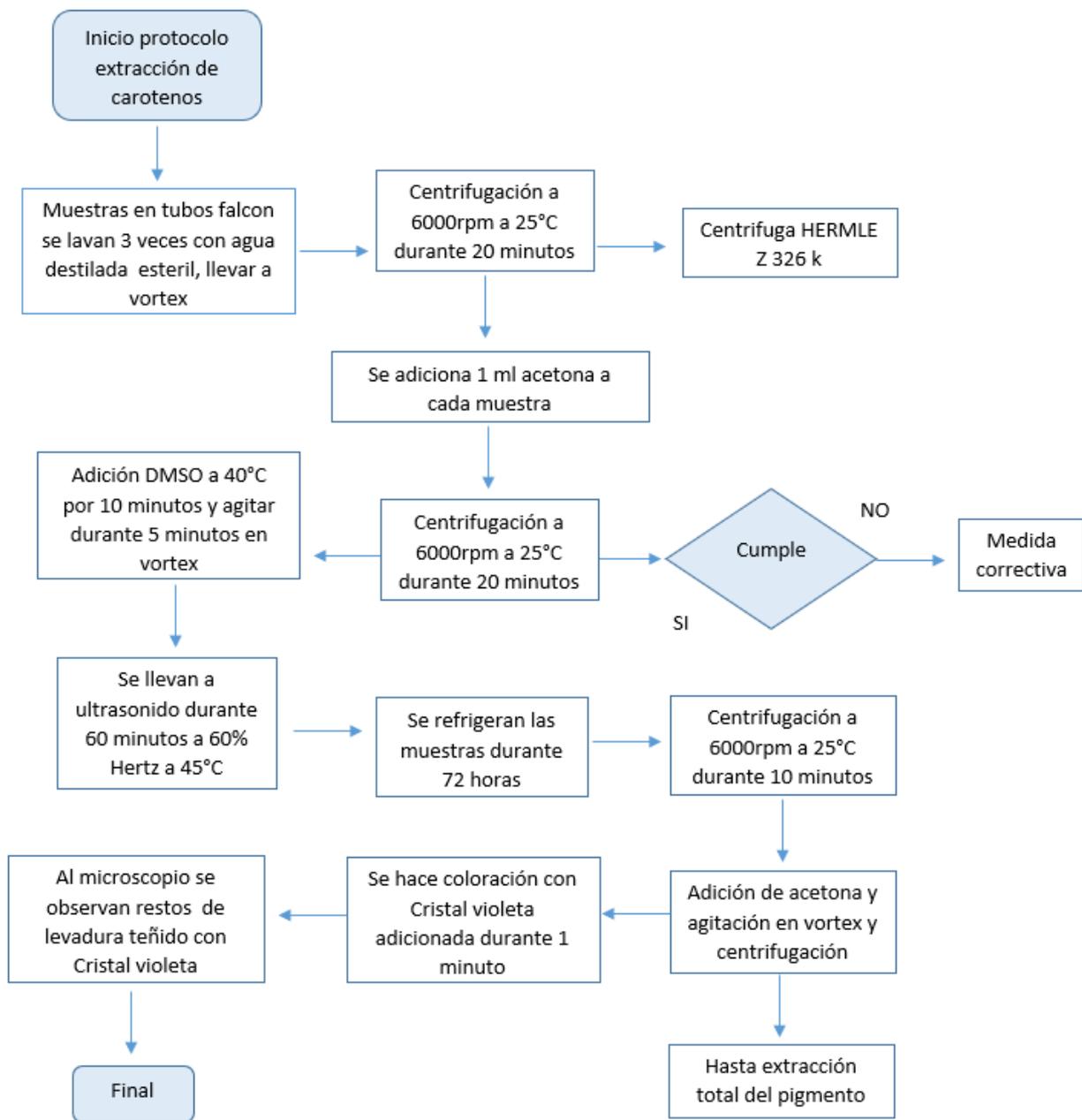
48. Naciones Unidas. Convenio sobre la diversidad biológica. [Internet] 2013 [Citado 1 de Feb 2020]. Disponible en: <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
49. Jelen, P. Encyclopedia of Dairy Sciences. Utilization and Products. [Internet] 2002; 2739- 2745.[Citado 1 de Feb 2020]. Disponible en: <https://sci-hub.tw/10.1016/B0-12-227235-8/00511-3>
50. Villamil J, Herrera J. Revista de la Universidad Industrial de Santander. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. [Internet] 2009; 41 (2): 128-134. [Citado 2 de Feb 2020]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3438/343835695003.pdf>
51. Beltran. B, Estevez R. Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A; utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. [Internet] 2012; 27 (4): 1334-1343.[Citado 2 de Feb 2020]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000400055
52. Laura Victoria Peñaranda Gonzalez, Sandra Patricia Montenegro Gómez y Paula Andrea Giraldo Abad. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. [Internet] 2018; 8 (2): 141-150.[Citado 2 de Feb 2020]. Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/2040/2251>

8. ANEXOS

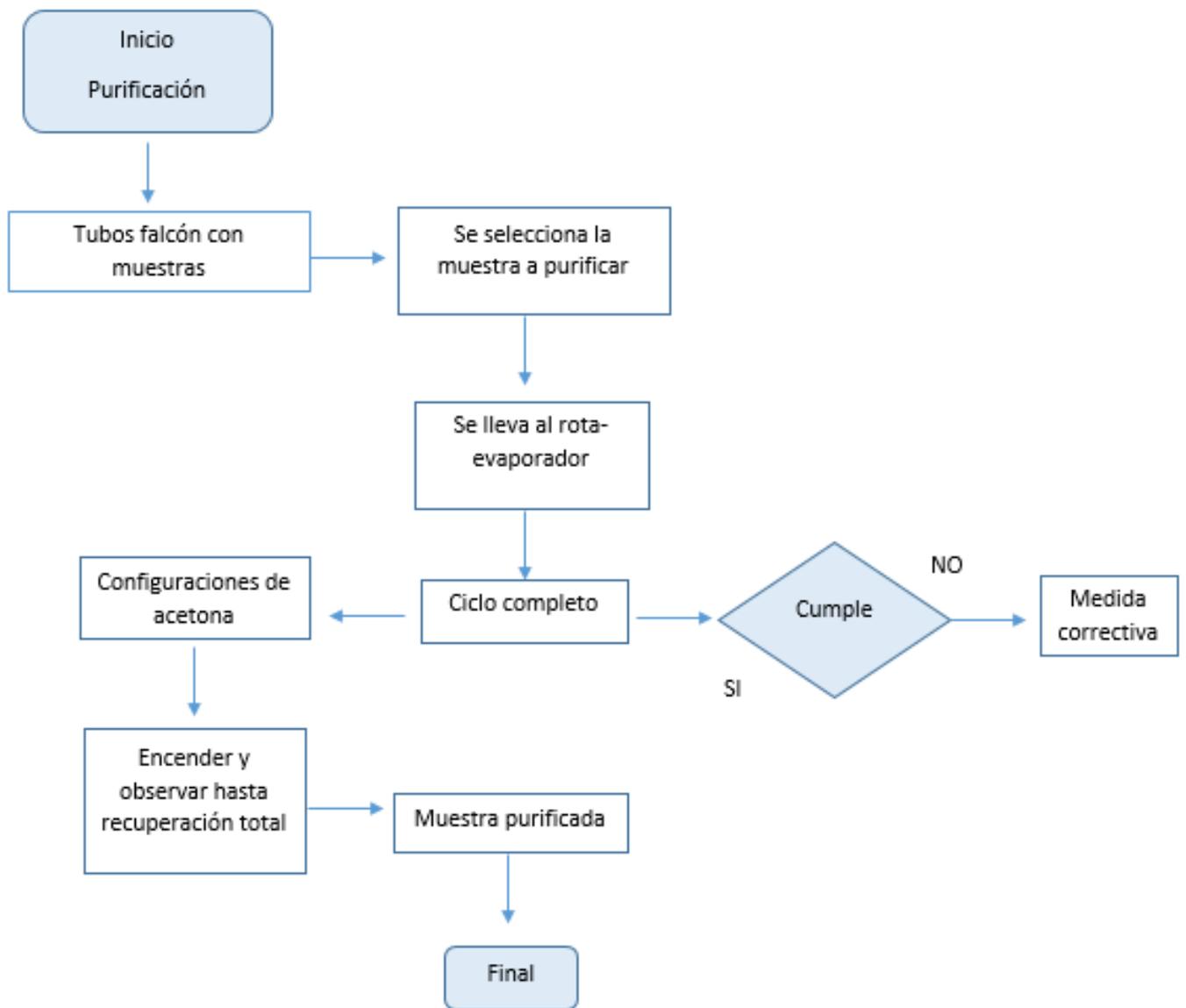
Anexo 1. Protocolo preparación de medio de cultivo



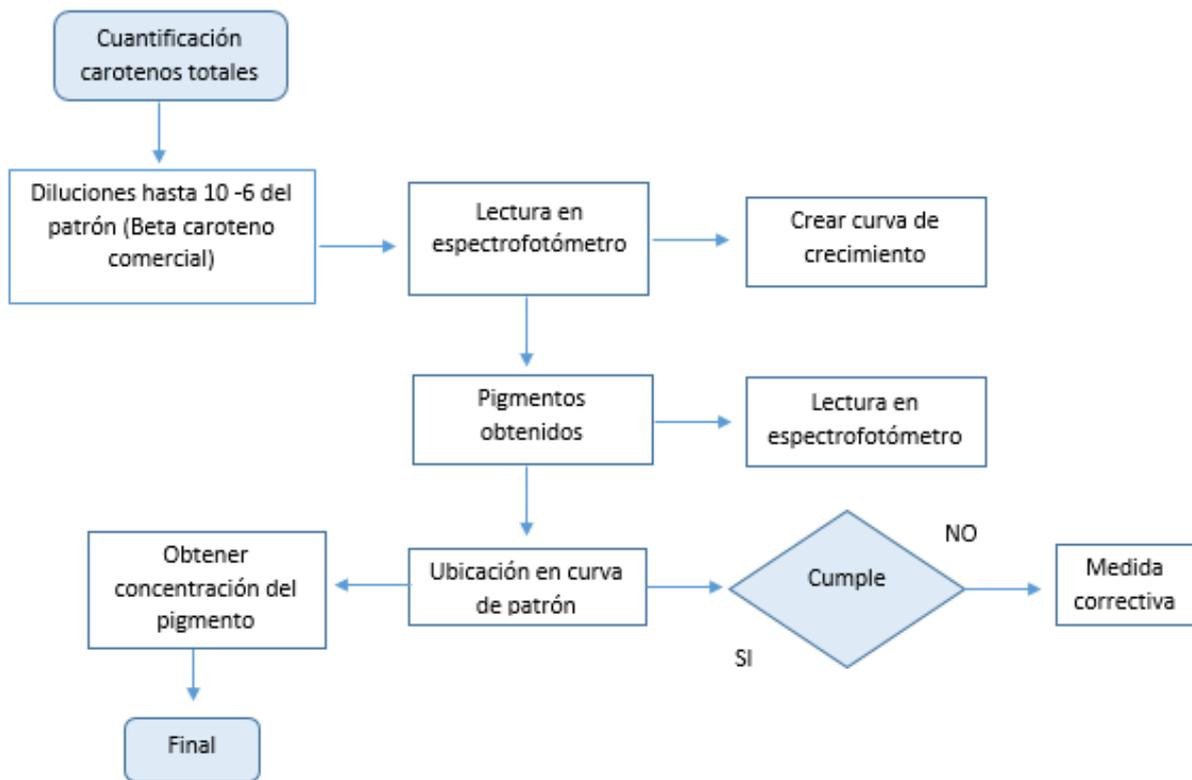
Anexo 2. Protocolo extracción de carotenoides



Anexo 3. Protocolo purificación de la muestra



Anexo 4. Protocolo cuantificación de carotenoides totales



Anexo 5. Ficha técnica rota-evaporador

🔍 Technical data

Hei-VAP Precision

Standard supply voltage	230 V (50/60 Hz)	
Operational voltage (V)	100 - 240	
Supply power (W)	1400	
Protection class (DIN EN 60529)	<ul style="list-style-type: none"> • IP 20 device • IP 67 cable heating bath 	
Lift distance (mm)	155	
Drive	EC motor	
Rotation speed (rpm)	10 - 280	
Speed control	electronic	
Heating bath	<ul style="list-style-type: none"> • inner Ø: 253 mm, outer Ø: 291 mm • material: V4A-steel (1.4404) stainless steel X2CrNiMo 17-12-2 • Volume 4.5 L 	
Heating capacity (W)	1,300	
Temperature range (°C)	20 - 100 H ₂ O / 20 - 210 oil	
Temperature control	electronic	
Temperature accuracy Heating bath (°C)	±1	
Safety temperature protection bath	cut off at 5 °C difference to set temperature	
Overheat protection (°C)	250	
Digital display	<ul style="list-style-type: none"> • Heating bath temperature (°C) • Vapor temperature (°C), (required: vapor temperature sensor) • Rotation speed (rpm) 	
Programming ramps	yes	
Condensing surface (cm ²)	1,400	
Vacuum controller*	integrated	
Timer	yes	
Airborne noise level	< 85 db(A)	
Evaporation rates (L/h) ΔT* = 40°C (continuous operation)	<ul style="list-style-type: none"> • Toluene 8.5 • Acetone 5.8 • Ethanol 3.5 • Water 1.2 	
Weight (without glassware) (kg)	17	
Lift	Manual	Motor
Lifting speed (mm/s)	-	25
Dimensions with glassware set G3 (w x d x h) (mm)	739 x 490 x 887	739 x H 420 x 887

* Only possible in conjunction with vacuum systems

** ΔT = Difference between the heating bath temperature and the vapor temperature

Rotoevaporador Hei VAP Precision, Ficha técnica

Anexo 6. Ficha técnica Shaker

Temp. Range & Model	Ambient +5°C ~ 60°C "WIS-20"	10°C ~ 60°C "WIS-20R"
Temp. Accuracy & Uniformity	Accuracy : ±0.2°C at 37°C, Uniformity : ±0.5°C at 37°C	
Temp. Sensor	PT100 Sensor	
Heater	500 W	700 W
Compressor	None	1/4 HP
Compressor Control	None	Intelligent Control of Refrigerator for preventing Overload of Compressor
Refrigerant	None	CFC-Free(134A) Refrigeration System
Shaking Speed & Stroke	30 ~ 250 rpm, 25mm Orbital Motion	
Timer & Alarm	99hr 59min (with Continuous run.), Error status & Timer-end	
Display	Digital LCD with Back-Light Function	
Controller	Digital Fuzzy Controller with Jog-Shuttle Switch (Turn+Push)	
Room Lamp	60W Krypton Lamp	
Platform	Included Universal Platform for Various Shapes & Sizes of Flasks	
Optional Flask Holder	Durable & Flexible Plastic Flask Holder (up to 1000ml)	
Available Max. Capacity of Flask Holder	for 50~100ml	Available 32 ea Flask Holder FH100 , for 50~100ml Flask
	for 200~300ml	Available 20 ea Flask Holder FH250 , for 200~300ml Flask
	for 500~1,000ml	Available 16 ea Flask Holder FH500 , for 500~1,000ml Flask
Safety Circuit	Over Temp./ Current Protector, Leakage Breaker, Sensor Error Detector	
Material	Internal : Stainless Steel (#304), External : Powder Coated Steel	
Dimension	Internal : 530 x 530 x h350mm, External : 575 x 855 x h850mm	
Packing Size (w x d x h) (mm) & Gross Weight	1,000 x 800 x h1,100mm	
	147 kg	150 kg
Power Consumption	500 W	1.2 kW
Power plug type	Hybrid E+F	
Power Supply*	AC 230V, 1N~, 50/60Hz	

Precise Shaking Incubator, Bench Top-type "WIS-20R"