

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



**Presentado por:**

Marilyn Vanessa Herrera Jiménez

Angie Camila Jiménez Sarmiento

**Asesoras:**

Ana Graciela Lancheros Díaz - UCMC

Liceth Alejandra Cabrejo Cárdenas - Tecnoparque

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

Bogotá - Colombia

2020

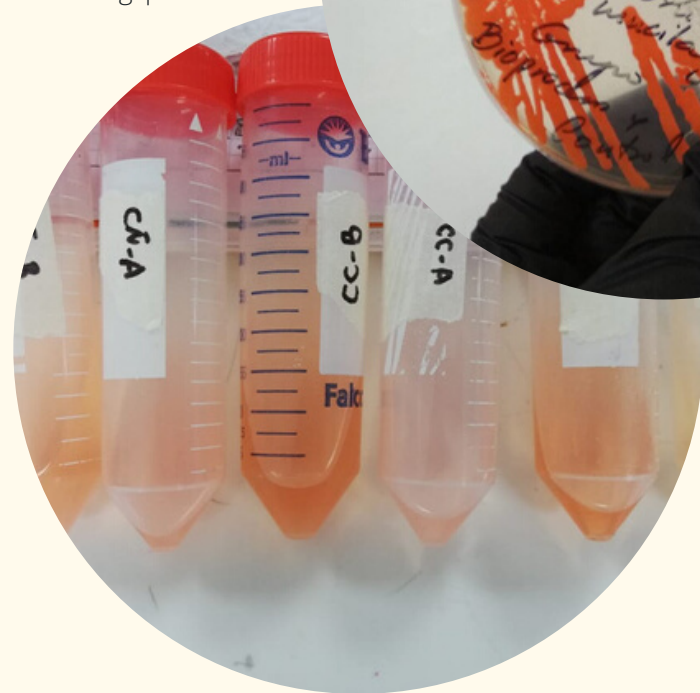
# INTRODUCCIÓN



Problemática ambiental debido al incremento de los desechos agroindustriales y el uso de pigmentos químicos.



Procesos biotecnológicos para la obtención de pigmentos naturales de interés industrial a partir de fermentación microbiana.



Falta de aprovechamiento, recuperación y disposición final de los residuos es impedimento para la economía de cada sector.



Departamento Nacional de Planeación

Anualmente de **14.976.807** toneladas de producto se producen **71.943.813** toneladas de residuos.



# ANTECEDENTES

2000

BUZZINI PIETRO Y  
MARTINI ALESSANDRO

Producción de carotenoides  
por *Rhodotorula glutinis*.

2006

REYES GONZALEZ Y  
FRANCO CORREA

Producción biotecnológica de  
aromas, sabores y pigmentos a  
partir de hongos y levaduras.

2011

ERIC JOHNSON Y  
CARLOS ECHAVARRI

Levaduras para la formación  
de: biocombustibles, nuevas  
fuentes de energía y  
biorremediación ambiental.

2018

SARA LANDOLFO, ET AL.

Método de extracción de  
carotenoides mediante técnicas  
químicas y físicas.

# MARCO TEÓRICO



## DESECHOS AGROINDUSTRIALES

La mazorca del cacao representa un 90% del fruto no aprovechado, el bagazo de la caña representa un 25% de residualidad y el lactosuero representa el 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera.



## PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

La posibilidad de producir pigmentos naturales a partir de procesos biotecnológicos empleando microorganismos es industrialmente factible.



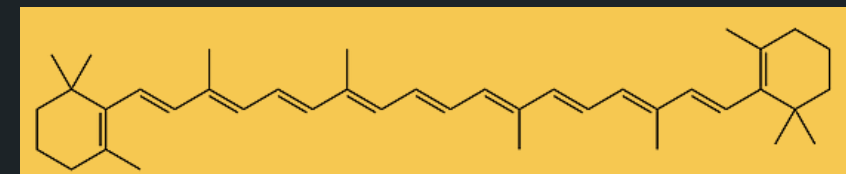
## *Rhodotorula mucilaginosa*

Levadura pigmentada, perteneciente a la división Basidiomycota, reproducción por gemación y capacidad de crecimiento de 25 a 30°C.

# PIGMENTOS NATURALES

Un colorante extraído de una sustancia vegetal, animal o mineral.

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

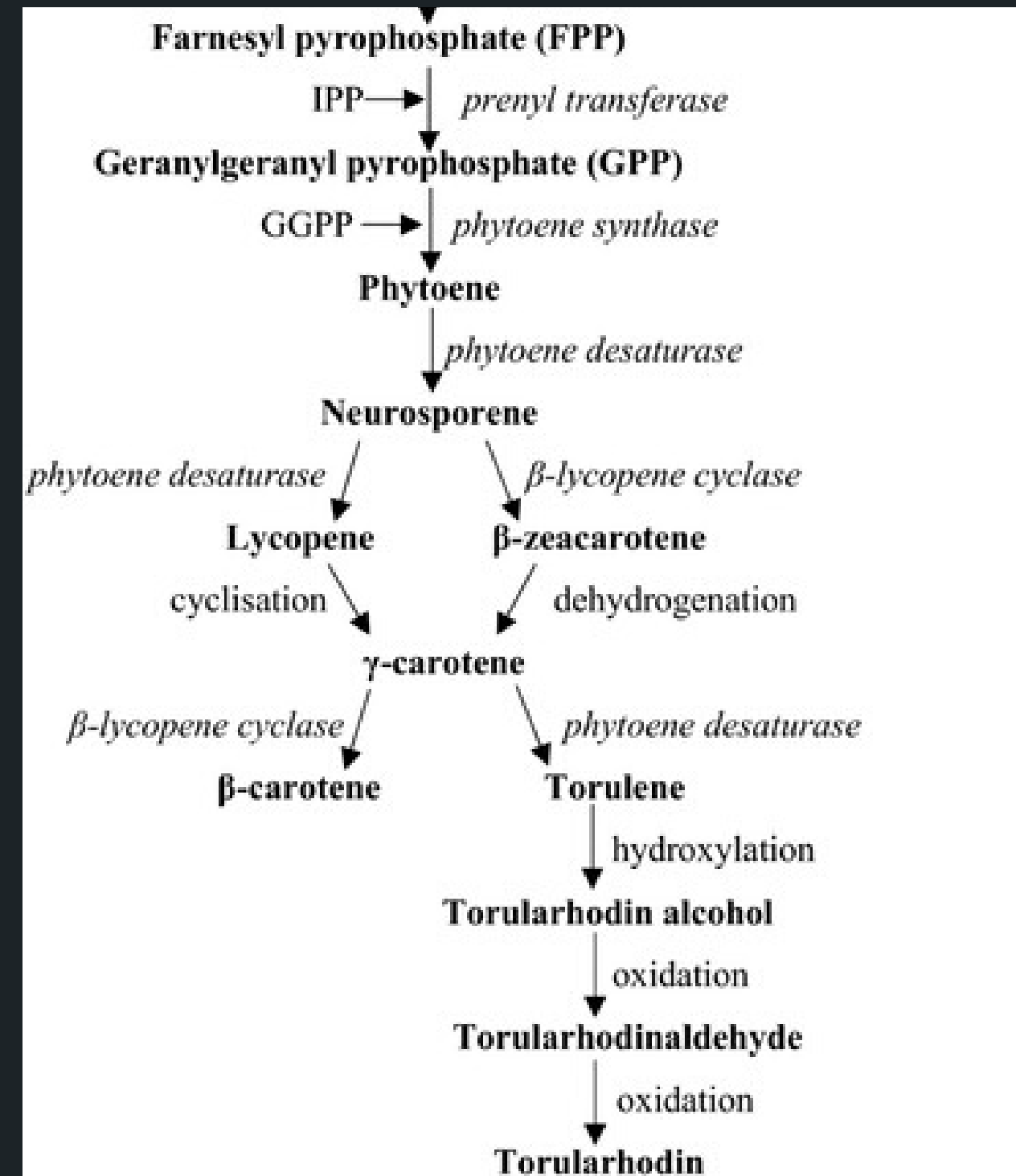
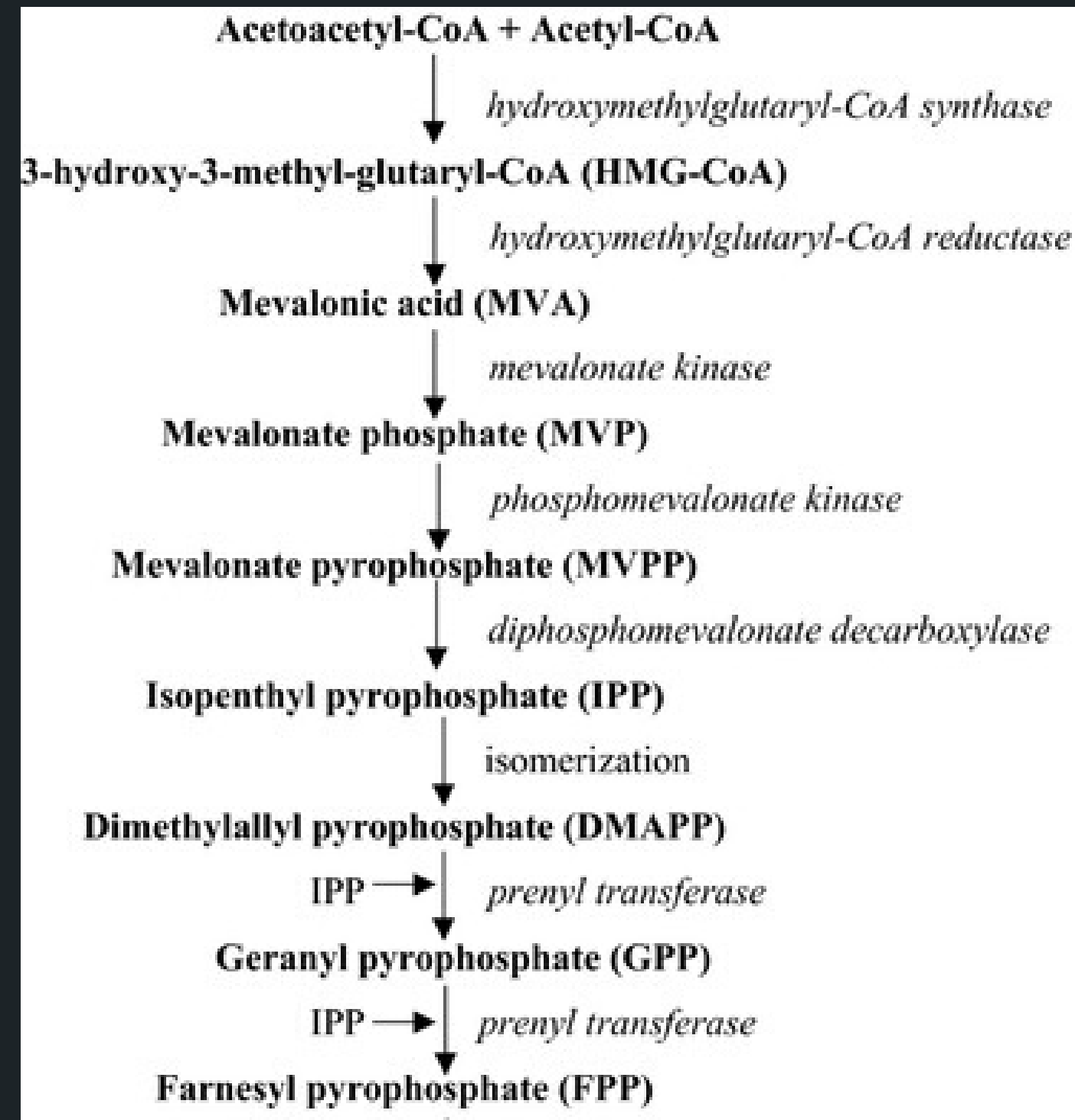


From NEUROtiker - Own work, Public domain,  
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2330317>

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

Imagen: Fuente propia

# BIOSÍNTESIS CAROTENOIDES



# OBJETIVO GENERAL

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



## 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  $\beta$ - caroteno.
- Realizar pruebas cualitativas que evalúan la aplicabilidad del pigmento en algún sector industrial.

# METODOLOGÍA



Reactivación cepa



Sustratos



Medios de cultivo



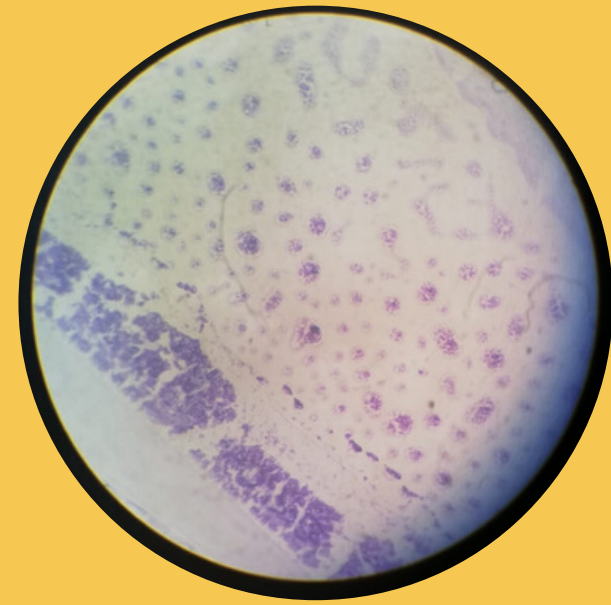
Recuento en placa



Densidad Óptica



Inóculo



Lisis celular



Extracción



Purificación



Cuantificación



Análisis estadístico



Aplicación

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA



### CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Colonias puntiformes de color naranja, suaves, lisas y húmedas.



### CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Se observan blastoconidias ovales y elongadas.

# CONDICIONES Y PARÁMETROS

Finalizados los 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.

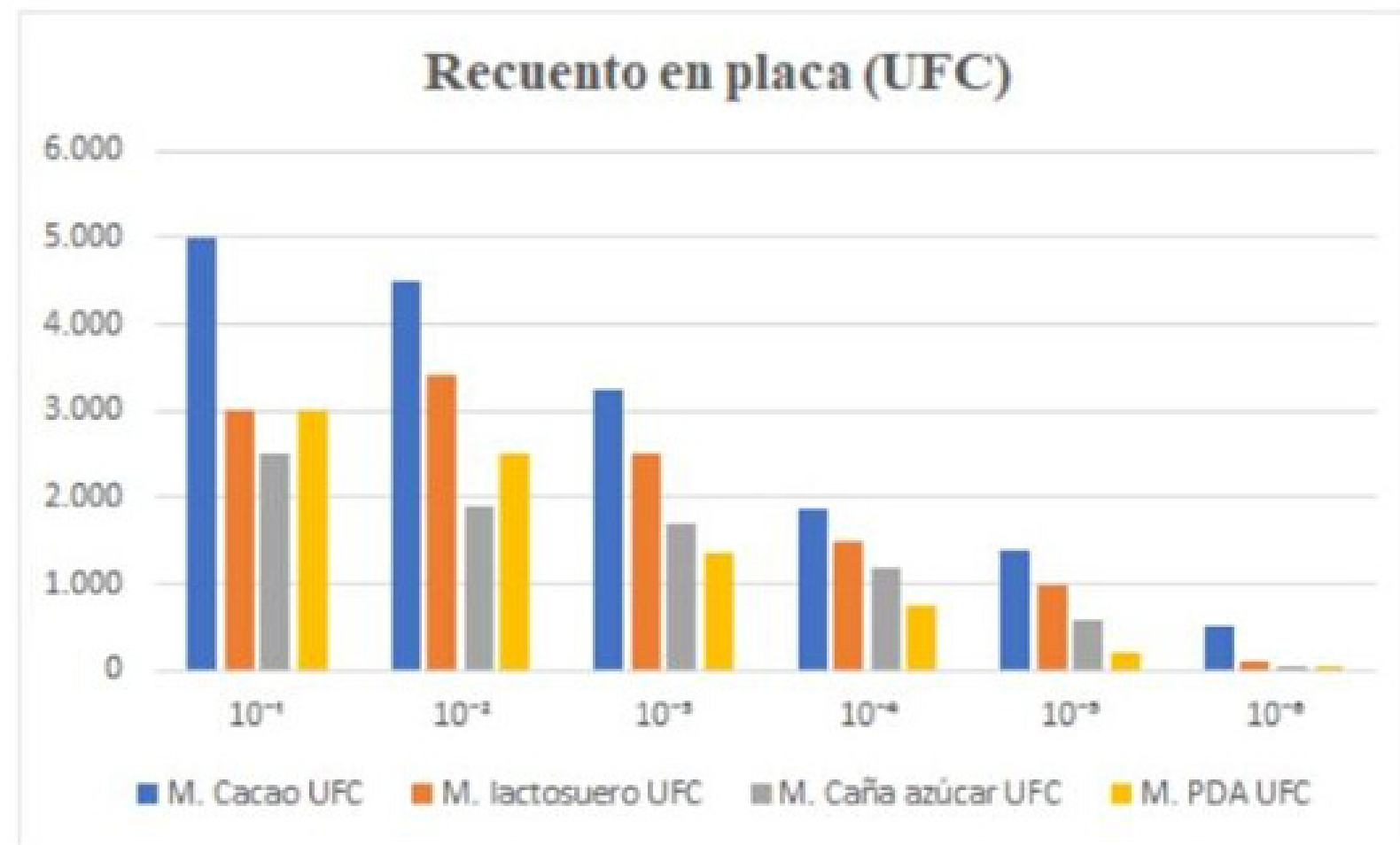
Parámetro	Observación
Temperatura	28°C
pH	6,5-7
Sustrato	Fase líquida
Peptona	Fuente de nitrógeno
Cloranfenicol	Antibiótico
Inóculo	$1 \cdot 10^{-4}$
Luz	Protección permanente

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



**Figura 12.** Control de exposición a la luz.

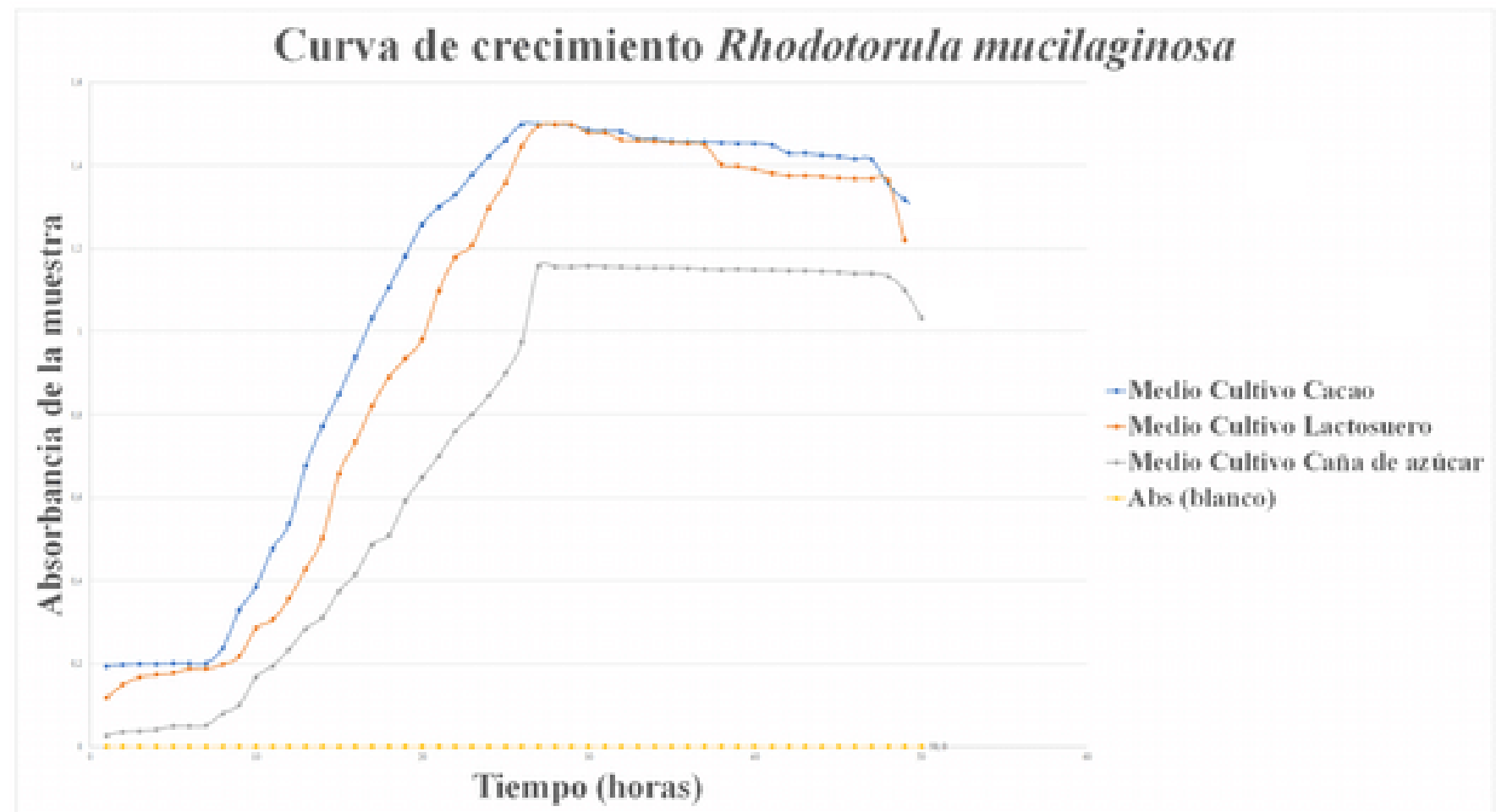
# RECUESTO EN PLACA



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

En estudios de Valduga E, et al. utilizaron caña de azúcar y lactosuero.

# CURSO TEMPORAL DE PRODUCCIÓN



**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.

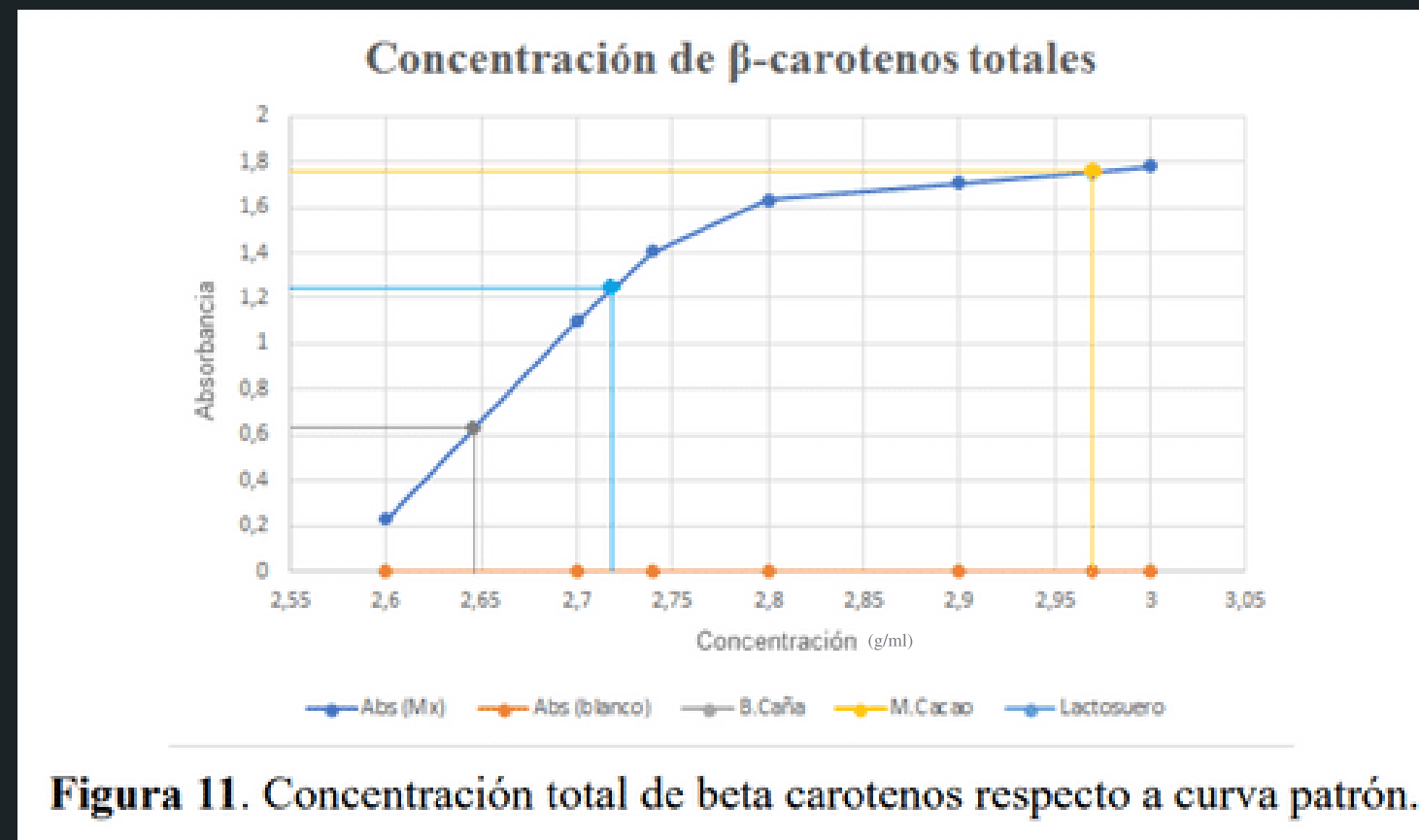
Buzzini Pietro y Martini  
Alessandro en el año  
2000.

# PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS

Sustrato	pH final	Temperatura final (°C)	Peso seco Biomasa (mg/500ml)	Colorimetría (Abs)	Concentración de carotenoides totales (g/ml)	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.

Estudio realizado por Ruhman, et al. obtuvieron 3.81 mg/L de carotenoides.



**Figura 11.** Concentración total de beta carotenos respecto a curva patrón.

Estudio realizado por Valduga, et al. obtuvieron 4.165 mg/L de carotenoides.



# ANÁLISIS ESTADÍSTICO

## 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 <sub>crítico</sub>	Rechazo HO
5,28	3,37	2,36	F < V <sub>crítico</sub>	No rechazo HO

Tabla 6. Referencias del análisis estadístico ANOVA

HO: la producción de  $\beta$ -carotenos por parte de los tres sustratos es igual

## APLICACIÓN

<b>Característica</b>	<b>Observación</b>
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

Propiedades generales de los pigmentos citadas en el artículo de la Universidad Politécnica de Madrid en el año 2013.

# CONCLUSIONES

La formulación de medios de cultivo se hizo a partir de la metodología empleada por Noel J, et al. y la formulación de Costa J, et al. 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.



Imagen: Fuente propia

# CONCLUSIONES

El pigmento obtenido fue el  $\beta$ - 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, et al. con algunas modificaciones y Landolfo, et al. 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 lizar por completo las células mediante procesos físicos y químicos.



Imagen: Fuente propia

# CONCLUSIONES

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/500ml de  $\beta$ -carotenos y obtención total de biomasa 6.73mg/500ml; el análisis estadístico demostró la diferencia significativa de los tres medios de cultivo formulados en cuanto a la variable producción de pigmento.



Imagen: Fuente propia

# CONCLUSIONES

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.



Imagen: Fuente propia

# RECOMENDACIONES

## USO DE LEVADURAS

Compite con las sustancias sintetizadas químicamente y disminuye la contaminación ambiental.

## MUNDO ACTUAL

Uso de fuentes de carbohidratos se debe extender, más investigaciones y aplicaciones que favorezcan y minimicen el impacto ambiental.

## PRODUCCIÓN DE CACAO

Gran tendencia en el mercado en producción de cacao, exceso de mazorca que debe ser eliminada causando contaminación.

## MÁS ESTUDIOS

Futuras investigaciones con otros microorganismos y/o desechos agroindustriales para determinar su capacidad de producción.

# AGRADECIMIENTOS

Gracias a nuestros jurados, Yalile Ibeth Lopez y Andres Rincon Riveros por ser excelentes docentes y guías, por su tiempo, disposición y evaluación de nuestro trabajo de grado.

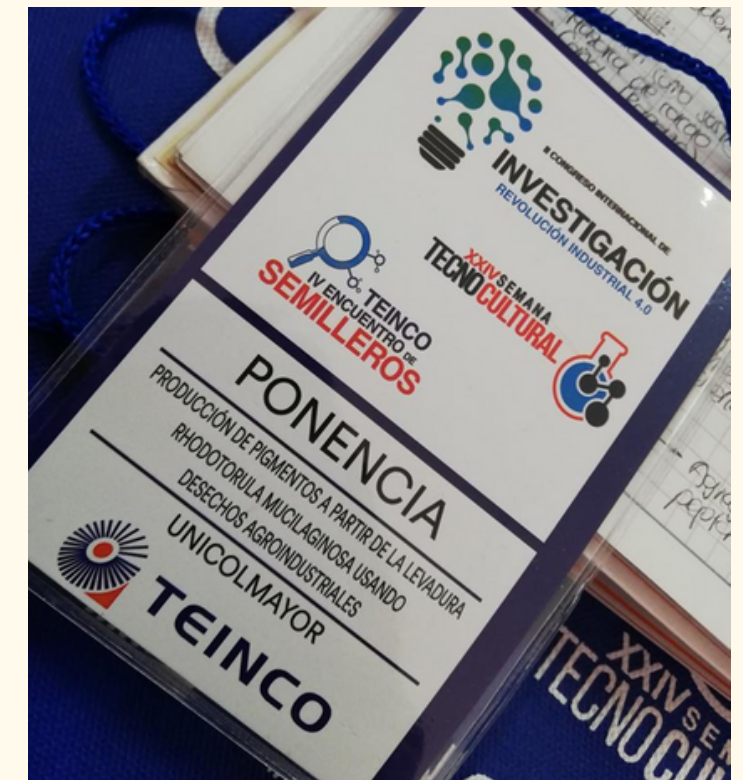
A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca donde nos hemos formado, al programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico del cual nos sentimos orgullosas de pertenecer, particularmente agradecemos al semillero de investigación Bioprocesos y Control en donde obtuvimos toda la dedicación y apoyo por 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 este proyecto.

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







# 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/S09608524990005652>.
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=612222093>.
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>.
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=499112025>.
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>.
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/S1369703X070000837>.
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%3Dihub8>.
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.pdf9>.
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=S0100-4042200900090003610](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-4042200900090003610).
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%3Dihub11>.
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/10.1080/19476337.2010.49957012>.
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\\_](https://www.researchgate.net/publication/266354461_)

*¡Gracias!*