



SEP

SES

TecNM

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

**“OBTENCIÓN DE DOS PIGMENTOS NATURALES A PARTIR
DEL CULTIVO DE HONGOS FILAMENTOSOS EN RESIDUOS
INDUSTRIALES”**

**OPCIÓN I
TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA QUÍMICA**

**PRESENTA:
ALMAZÁN SÁNCHEZ ILSE GABRIELA
NO. CONTROL: 06280373**

**ASESORA:
DRA. CLAUDIA ROSARIO MURO URISTA**

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2019.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mi madre que me enseñó a trabajar duro para lograr mis objetivos, sin su amor y apoyo no hubiera tenido la oportunidad de estudiar una carrera universitaria.

A mi hermana, que continuamente me dio un ejemplo de superación, dedicación y amor a su vocación de estudiante, siempre con el hambre de ser una mejor profesionista.

A mi esposo, quien me ha dado aliento para no dejarme vencer por la adversidad, siendo un excelente compañero de vida y un amoroso padre para nuestros hijos.

A mis hijos, que son mi motor para plantearme nuevos objetivos y poderles ofrecer lo mejor para su bienestar.

A mis profesores, que mostraron su mayor disposición para transmitir sus conocimientos, algunos su cariño a las ciencias exactas y otros a las ciencias ambientales.

A mi asesora de tesis, que me guió en este trabajo y creyó en mí para realizarlo.

A mis revisores, por la voluntad y accesibilidad para revisar el presente trabajo.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

Los colores son de gran importancia en la vida del hombre, tanto es así que a lo largo de la historia de la humanidad, se ha dedicado a extraer colorantes de la naturaleza y sintetizar aquellos que le dieran mayores beneficios a nivel industrial. Derivado de esto último se han comenzado a ver los efectos nocivos a la salud por el uso indiscriminado de los colorantes sintéticos, trayendo consigo contaminación de agua, tierra y aire.

Se ha incrementado últimamente el campo de las investigaciones en la obtención de pigmentos de origen natural para poder llevarlos a su producción industrial, obteniéndolos de animales, plantas y microorganismos.

El objetivo de este trabajo es probar como medio de cultivo de hongos generadores de pigmentos a diferentes residuos del sector agroalimentario, de tal manera que sean una alternativa de sustrato, asimilando la buena obtención de pigmentos como lo ya reportado al sembrar hongos en medios de cultivo sintéticos.

La selección de los residuos fue tomando en cuenta los nutrientes que contienen, una fuente de carbono, azúcares y una fuente de nitrógeno asemejando al medio de cultivo sintético.

Los residuos agroindustriales se prepararon para sembrar en ellos a los hongos productores de pigmentos, variando la concentración de dextrosa y en otro caso de medio sintético. Se incubó dicha preparación a 28°C y se extrajo el color de las preparaciones con una mezcla de etanol-agua. Posteriormente se centrifugó la mezcla y se hizo pasar por una columna de sílica. El líquido obtenido se analizó en un espectrofotómetro en la región VIS.

Los resultados del crecimiento y generación de pigmento se obtuvieron a los 3 días de los 9 en los que es posible obtener el microorganismo, lo cual significó una reducción importante en la obtención del pigmento. En todos los residuos se obtuvo crecimiento, aunque en varios de estos se observó esporulación del hongo, lo que no permitió obtener un color limpio; sin

embargo si fue posible obtener un pigmento consistente en estigmas de maíz con dextrosa y en trigo con dextrosa, que fueron las fuentes mínimas de nutrientes para que se diera el pigmento deseado, equiparado al obtenido en la siembra del hongo en el medio sintético.

ÍNDICE

Introducción.....	1
1 Fundamentos.....	3
1.1 Fuentes naturales de pigmentos.....	3
1.2 Hongos productores de pigmentos.....	9
1.3 Medios de cultivo de hongos productores de pigmentos.....	13
1.3.1 Medios sintéticos o químicamente definidos.....	15
1.3.2 Medios naturales.....	16
1.4 Métodos de análisis para identificación de pigmentos.....	19
1.4.1 Métodos espectrofotométricos.....	22
2 Metodología.....	23
2.1 Cultivo de las cepas en residuos industriales.....	27
2.1.1 Cultivo de cepas en granos de arroz.....	29
2.1.2 Cultivo de cepas en residuos de maíz.....	29
2.1.3 Cultivo de cepas en granos de trigo.....	30
2.1.4 Cultivo de cepas variando la concentración de dextrosa en el residuo industrial como medio natural más favorable.....	30
2.2 Extracción y purificación del pigmento obtenido.....	30
2.3 Análisis de los pigmentos extraídos por espectrofotometría VIS.....	31
3 Resultados.....	33
3.1 Cultivo de las cepas en residuos industriales como medios naturales.....	33
3.1.1 Cultivo de las cepas en granos de arroz.....	36
3.1.2 Cultivo de cepas en residuos de maíz.....	41
3.1.3 Cultivo de cepas en trigo.....	47
3.1.4 Cultivo de cepas variando la concentración de glucosa en el residuo industrial como medio natural más favorable.....	49
3.2 Extracción y purificación del pigmento obtenido.....	52
3.3 Análisis de los pigmentos extraídos por espectrofotometría VIS.....	55
Conclusiones.....	62

Recomendaciones.....	64
Fuentes de consulta.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

1.1	Tonalidades de la brasilina a diferentes pHs.....	6
1.2	Componentes del medio Czapek. Macronutriente.....	16
1.3	Componentes de los elementos traza del medio Czapek. Micronutrientes.....	16
1.4	Componentes de la solución concentrado de Czapek.....	16
1.5	Substratos utilizados para la producción de <i>Pluerotus spp.</i>	18
1.6	Espectro visible y colores complementarios.....	20
3.1	Resultados del cultivo del H-87 en granos de arroz blanco e integral después de 7 días de cultivo.....	37
3.2	Resultados del experimento 1 con hojas de maíz.....	42
3.3	Resultados del experimento 2 con los tallos de maíz.....	43
3.4	Resultados del experimento 3 con los estigmas del maíz.....	44
3.5	Resultados del experimento 4 con el olote de maíz.....	45
3.6	Resultados del experimento en trigo como medio de cultivo natural.....	48
3.7	Resultados de la variación de concentraciones de dextrosa en estigmas del maíz.....	50
3.8	Resultados de la variación de concentraciones de dextrosa en trigo.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Tomate maduro con el color rojo característico (Badui, 2006).....	5
1.2	Betabel, importante fuente de betalaina (Chávez–Islas, 2018).....	6
1.3	Crustáceo <i>Astacus</i> (izquierda), pigmento obtenido de cabezas de camarón (derecha) (Chávez, 2008).....	7

1.4	Plumaje de flamencos (izquierda) y hongo <i>Cantharellus</i> (derecha).....	7
1.5	Placa de <i>Monascus Purpureus</i> (Santana-Fonseca, 2018).....	12
1.6	Representación esquemática de la absorción de luz de sólidos coloridos.....	20
1.7	Efecto de cambios de color en pigmentos.....	21
2.1	Diagrama de flujo de las etapas experimentales.....	23
2.2	Cepas del hongo H-87 (izquierda), Santana-Lara, 2013 y H-29 (derecha) después de cinco días de su siembra en PDA, Santana-Fonseca, 2012.....	25
2.3	Pigmentos obtenidos a partir de las cepas H-87 (pigmento amarillo) y H-29 (pigmento rojo) cultivadas en un medio sintético líquido de formulación conocida (Santana-Lara, 2013, Santana-Fonseca, 2018).....	26
2.4	Agitador oscilatorio (shaker).....	27
2.5	Columna empacada de sílica por la cual se hizo pasar el líquido pigmentado..	31
2.6	Espectrofotómetro Lambda 35, utilizado para el análisis de los pigmentos.....	32
3.1	Caja petri con la siembra de la cepa H-29 en PDA, donde se observó una parte roja a la orilla derecha de la caja y el restante de color morado.....	34
3.2	H-29 sembrado en medio líquido Czapek los 6 días de incubación.....	35
3.3	H-29 después del tercer aislamiento.....	35
3.4	Arroz blanco (izquierda) e integral (derecha) ambos adicionados con agua e inoculados con el H-87.....	38
3.5	Cultivo del H-87 en arroz integral (izquierda) y blanco (derecha) ambos con 10 mL de solución complementaria dextrosa.....	39
3.6	Cultivo del H-87 en granos arroz integral sin Czapek (izquierda), con 10mL de Czapek (centro) y con 5ml de Czapek (derecha).....	40
3.7	Cultivo de H-29 en arroz.....	41
3.8	Matraces con dextrosa (izquierda) y matraz con medio Czapek (derecha).....	42
3.9	De izquierda a derecha. Matraces: con glucosa, medio Czapek y agua.....	43
3.10	Matraz con estigmas y agua (izquierda), matraz con estigmas y glucosa (derecha).....	44
3.11	Matraz con olote y medio Czapek, las esporas estaban dispersas en el solvente.....	45
3.12	Micelio de H-29 en hoja tierna y Czapek.....	46
3.13	Parte inferior del matraz con estigmas de maíz inoculado con H-29.....	46
3.14	Cepa H-29 sembrada en olote con medio Czapek.....	47

3.15	De izquierda a derecha. Matrices: con trigo y agua, trigo y dextrosa, trigo y medio Czapek.....	48
3.16	Matraz testigo de todas las pruebas sin crecimiento (izquierda) y matraz con trigo y la cepa H-29.....	49
3.17	Matrices con estigmas variando la concentración de dextrosa, 30g/L (izquierda), 20g/L (centro) y 10g/L (derecha).....	51
3.18	Trigo con crecimiento uniforme del H-87 sin esporulación (izquierda), matraz con dextrosa 10g/L visto por la parte inferior (derecha).....	52
3.19	Filtración del pigmento obtenido en trigo con: dextrosa 10g/L (izquierda) y dextrosa 20g/L (derecha), ambas soluciones claras y brillantes.....	53
3.20	Filtrados del arroz blanco (izquierda y centro) y arroz integral (derecha).....	54
3.21	Filtrados de los estigmas del maíz con diferentes soluciones complementarias.....	54
3.22	Pigmentos extraídos de trigo y dextrosa 30g/L (izquierda) y estigmas de maíz y dextrosa 10g/L (derecha).....	55
3.23	Espectro del pigmento amarillo purificado (estándar), sembrado en medio Czapek sólido (Santana-Lara, 2012).....	56
3.24	Espectros UV-VIS de la muestras de pigmento amarillo secretadas en hojas, olote y estigma de maíz con medio Czapek.....	57
3.25	Espectros UV-VIS de la muestras de pigmento amarillo secretadas en trigo con medio Czapek, trigo con dextrosa, estigma de maíz con dextrosa, arroz integral con agua y tallos de maíz con medio Czapek.....	58
3.26	Espectros de las soluciones amarillas extraídas de estigmas de maíz y diferentes concentraciones de dextrosa.....	59
3.27	Espectros de las soluciones amarillas extraídas de trigo y diferentes concentraciones de dextrosa.....	60
3.28	Espectro de la solución amarilla extraída de trigo con dextrosa 20g/L sin tratamiento y espectro de la misma solución ya tratada en columna de sílica..	61

INTRODUCCIÓN

El color es una característica presente en nuestra vida diaria y es de gran importancia para el ser humano y otras especies, ya que desencadena una serie de reacciones en el organismo, desde apetito, confortabilidad, desagrado o peligro. Se tiene evidencia de que en la antigüedad el color se obtenía de materiales básicos para expresarse en murales o para teñir fibras, obteniendo el color de plantas y animales, como el rojo de las amapolas y el morado de la malva. Así es como a partir de la evolución de la humanidad y a la creciente industrialización, surgió la necesidad de tener productos coloridos que los hicieran atractivos al consumidor. La industria principalmente de alimentos, comenzó a utilizar pigmentos artificiales, debido a su alto rendimiento, que se fijan con facilidad y no se oxidan, manteniéndose por más tiempo en el producto final. Sin embargo, debido al crecimiento de enfermedades como el cáncer, muchas investigaciones apuntaron al consumo de colorantes artificiales como uno de los contribuyentes de dicha enfermedad, incluso entidades reguladoras como FDA (Food and Drug Administration) han prohibido el uso de estos en varios países. Aunado a ello, los colorantes sintéticos permanecen en las aguas residuales de procesos industriales, haciendo difícil el tratamiento de estas. Debido a lo antes mencionado, ha sido necesario buscar nuevas alternativas para la industria, dando pie al uso de pigmentos naturales que aseguren una vida más saludable y minimicen el impacto ambiental que producen los sintéticos.

Aunque son variadas las fuentes de las que los colorantes naturales se pueden obtener, su explotación radica en la facilidad de su extracción, aplicación y permanencia. Además de las posibles ventajas que los colorantes naturales pueden conservar como propiedades terapéuticas, antioxidantes, anticancerígenas, etc. Los hongos filamentosos figuran entre los principales productores de pigmentos naturales por la cantidad y la facilidad con la que se pueden producir y que, en algunos casos, han resultado ser sustancias bioactivas

En el laboratorio de Ingeniería ambiental se cuenta con dos cepas de hongos filamentosos procedentes del Estado de Hidalgo que producen de forma individual un pigmento rojo y uno amarillo. Ambos hongos han sido estudiados con la finalidad de encontrar las condiciones de cultivo que favorezcan dicha producción. De estos estudios se ha encontrado que el hongo puede ser cultivado en un medio sintético, químicamente conocido con un mínimo de componentes, el cual consta de sales, glucosa y extracto de levadura o al menos un aminoácido que proporcione la fuente de nitrógeno necesaria para el hongo.

Considerando al menos uno de los aspectos siguientes: aumento de la producción de pigmento, la disminución del costo del medio de cultivo, el tiempo en que éste aparece, la prolongación de su producción y el aprovechamiento de residuos de la industria del sector agroalimenticio; el objetivo de este trabajo fue determinar un medio de cultivo natural basado en un residuo industrial que no altere o favorezca la producción del pigmento ya conocida y producida en un medio sintético por dos hongos filamentosos.

Sabiendo que la industria agroalimenticia genera residuos con un alto contenido de celulosa y azúcares, fueron seleccionados residuos de una industria de bebidas, que básicamente contiene dextrosa, una de cereales, cuyos residuos constan de granos de arroz, trigo y residuos de maíz, tales como granos de maíz fresco, olote, hojas y estigmas, a fin de determinar el medio de cultivo adecuado para la producción de pigmento a partir de dos hongos filamentosos. Como hipótesis se planteó que la composición de residuos agroindustriales que contienen glucosa o alguna fuente de azúcar y aminoácidos es suficiente y favorable para el cultivo y producción de pigmento de dos hongos filamentosos.

1 FUNDAMENTOS

Se ha comprobado que el color afecta de manera significativa el comportamiento de los seres vivos y más ampliamente en el aspecto psicológico de las personas. Todo aquello que tiene color puede resultar agradable para el ser humano, incluso para consumir los alimentos que lo contienen, e ingerir sin repudio los fármacos que antes frecuentemente eran rechazados (Rodríguez, 2009).

Desde la antigüedad, los pigmentos se han utilizado principalmente para teñir fibras o alimentos, extendiéndose su uso en la actualidad en tintas diversas para impresión o usos recreativos como la pintura o los cosméticos. En México ya se aplicaba la tinción de fibras por medio de pigmentos rojos naturales producidos por la cochinilla *Coccus Cacti L.*, un insecto que se alimenta del nopal (Yoshiko, 1996). Así mismo en otras partes del mundo se hacía uso de numerosas fuentes naturales de pigmentos para decorar fibras, objetos ceremoniales y la creación de murales pictóricos que han quedado plasmados hasta estos tiempos.

No obstante, en la actualidad la producción y el uso de pigmentos sintéticos, poco ha favorecido al ambiente, conduciendo a buscar otras alternativas para la obtención de pigmentos amigables con el ambiente, cuyo origen son las fuentes naturales.

1.1 Fuentes naturales de pigmentos

Un colorante es cualquier sustancia que imparte color a otro material o mezcla; a la vez, cambia el color de la luz que refleja como resultado de la absorción selectiva del color. Un colorante puede ser tanto un tinte como un pigmento dependiendo del medio en el que se usa, aunque es muy difícil describir una distinción válida entre tintes y pigmentos (Arándiga y Díaz, 2008).

Los pigmentos de origen natural se encuentran en el ambiente formando parte de los seres vivos o de la naturaleza muerta. Son llamados pigmentos naturales y son identificados como sustancias colorantes o extractos que provienen de plantas, animales, insectos y microorganismos, los cuales proporcionan un color menos intenso que sus equivalentes

sintéticos. Son inestables cuando se exponen a la luz o al calor. Ante la presencia de oxígeno, los pigmentos naturales son susceptibles a oxidarse debido a que contienen estructuralmente dobles enlaces conjugados (Hugles, 1984).

Por su estructura molecular los pigmentos naturales se encuentran clasificados en melaninas, carotenoides, flavonoides, antocianinas y betalaininas; quinónicos (benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas); indigoides y derivados del indol; xantonas; y clorofilas. Los pigmentos quinónicos, por ejemplo, presentan una coloración que va desde el amarillo pálido pasando por el anaranjado, rojo y finalmente al negro. Estos compuestos se encuentran en la corteza y la raíz de las plantas superiores, en los líquenes, los hongos, las bacterias, los artrópodos y en los equinodermos (Salaverry, 1998).

Unas de las principales familias de pigmentos que se encuentran en los vegetales son clorofilas, carotenoides y antocianinas, que son responsables de la coloración verde, roja-amarilla, y azul-violeta respectivamente, encontrándose en las vacuolas de las células.

Los carotenoides son pigmentos orgánicos que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como las algas, algunas clases de hongos y bacterias; aunque los animales son incapaces de producirlo, lo toman de su alimento ya que debido a sus propiedades antioxidantes es de gran importancia en funciones básicas (Franco, 2010).

Se conoce la existencia de más de 700 compuestos pertenecientes a los carotenoides. Uno de los ejemplos que puede citarse es el del tomate cuyo color rojo intenso (figura 1.1), se debe a los carotenoides que en su mayor parte están constituidos por el licopeno de un 80 a un 90% (Cardona, 2006), el cual aparece al irse degradando el contenido de clorofila del tomate. El carotenoide es extraído y utilizado en productos finales como cosméticos, gelatina, agar o ceras (Arándiga y Díaz, 2008). La mayoría de los carotenoides estudiados tienen características anti cancerígenas y el licopeno ha sido explotado para la fabricación de fármacos.

El apocaroteno también es un carotenoide que es soluble en lípidos y es capaz de proporcionar color de forma natural a productos vegetales como son las hortalizas: tomates, zanahorias,

espinacas y frutas como las naranjas y mandarinas; también se puede encontrar presente en insectos, mariscos y la yema de huevo, su aplicación en ciertos alimentos se ha hecho de forma extensiva desde comienzos del siglo XX. Es frecuente su empleo en la coloración naranja de margarinas, de salsas y condimentos específicos de ensaladas, lácteos, y dulces diversos (Reyes y Franco, 2006).



Figura 1.1. Tomate maduro con el color rojo característico. (Badui, 2006).

La betalaina es otro pigmento natural que se encuentra en el betabel o remolacha, al ser extraída es utilizada en cosméticos y muy escasamente en alimentos debido al sabor particular de la geosmina y algunas pirazinas que se producen conjuntamente. Debido a esto, se han empezado a explorar fuentes alternativas entre géneros de la familia Cactaceae, y los frutos de dos de ellos, la pera de cactus, o tuna de diversas especies del género *Opuntia* y las pitayas de los géneros *Cereus*, *Hylocereus* y *Selenicereus*. El pigmento obtenido de estos frutos es más aceptable organolépticamente que el de las remolachas, ya que no tienen un sabor desagradable teniendo mayor potencial como colorantes que como alimentos. El color y aspecto del betabel se puede ver en la figura 1.2 (Stintzing et al., 2005).



Figura 1.2. Betabel importante fuente de betalaína (Chávez-Islas, 2018).

El añil flora o azul índigo derivado del indol es considerado el rey de los pigmentos naturales, se obtiene de las hojas del arbusto “choch” (en maya) y se ha usado en todo el mundo, es difícil de usar como pigmento ya que sólo se fija a las superficies después de complejas reacciones de oxido-reducción (Yoshiko, 1996).

Otra de las plantas más utilizadas para obtener pigmento es un arbusto de corteza áspera color café llamado palo de Campeche, de este se obtienen cristales llamados Brasilina que a distintos pHs tiene tonalidades diferentes como se muestra en la tabla 8.1 (Yoshiko, 1996).

Tabla 1.1. Tonalidades de la brasilina a diferentes pHs

A un Ph	Color
Neutro	Rojo subido
Alcalino	Rojo pardo hasta violáceo
Ácido	Amarillo rojizo
Ácido diluido	Amarillo
Ácido concentrado	Rojo violeta

Por otro lado se tienen las astaxantinas que en su forma libre, esterificada o formando complejos con proteínas se encuentra en coloraciones rojas, naranjas o amarillas. Este pigmento es un carotenoide que se puede obtener de forma abundante de los crustáceos, siendo esto la fuente natural de los pigmentos para los salmónidos en estado salvaje (Cruz,

1998). Este compuesto fue extraído originalmente del cangrejo de río *Astacus astacus*, en la figura 1.3, se observa su aspecto y pigmento obtenido. Actualmente se extrae de la harina de cabezas de camarón de la industria pesquera para obtener un pigmento rojo-rosado característico, el cual es usado para la acuicultura en el cultivo de *Artemia*, tilapia y salmón, que requieren de manera comercial en su dieta, un alto porcentaje de este carotenoide para tener un color más llamativo al consumidor, (Chávez, 2008).



Figura 1.3 Crustáceo *Astacus* (izquierda), pigmento obtenido de cabezas de camarón (derecha) (Chávez, 2008).

Las astaxantinas también se pueden encontrar en las plumas de las aves como los flamencos, en microalgas (*Haematococcus pluvialis*), levaduras (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) y hongos como *Cantharellus cinnabarinus* del cual fue originalmente aislada y utilizada como aditivo en alimento de pollos, ver figura 1.4.



Figura 1.4 Plumaje de flamencos (izquierda) y hongo *Cantharellus* (derecha).

Otro de los pigmentos naturales es la melanina. A diferencia de los carotenoides, las melaninas son sintetizadas por el propio organismo a partir de precursores como aminoácidos (Jarén, 2007). Este compuesto otorga color a los seres vivos. Es responsable de la fotoprotección y coloración de plantas y animales; se encuentra en los ojos, el cabello, la piel, el plumaje, la cáscara de los huevos, la cutícula de los insectos, la tinta de los cefalópodos y en la pared y el citoplasma de muchos microorganismos (Urán, 2008).

Los compuestos de melanina pueden ser empleados como materia prima para fines industriales en cosmética (cremas, maquillajes y tintes) y dermatología para tratamiento de enfermedades que causan despigmentación.

La melanina de muchos animales se usa de diversas formas; tal es el caso de la tinta de *Sepia officinalis*, de tono rojizo-marrón que, una vez preparada, es usada por dibujantes y pintores artísticos. El ámbar gris es extraído de sepias, pulpos y calamares, y su principal uso comercial ha sido la elaboración de perfumes, aunque también se ha usado como saborizante y en medicina homeopática. No obstante, la melanina ha mostrado tener actividad antiviral in vitro y contra el virus de la inmunodeficiencia humana (Urán, 2008).

La producción de melanina en muchos de los microorganismos es inducida en respuesta al estrés, particularmente al cambio hiperosmótico y a elevadas temperaturas. Algunos de los microorganismos que producen este compuesto son: *Aeromonas*, *Bacillus* y *Legionella* (bacterias); *Fasciola gigantita* (protozoos); *Cándida álbicans*, *Penicillium marneffeii*, *Cladosporium carionii* (Hongos) (Urán, 2008).

La *Pseudomona aeruginosa* produce un pigmento café descrito en 1897 como una melanina sintetizada a partir de la tirosina (Ogunnariwo y Hamilton, 1975). La melanización de *P. aeruginosa* es de relevancia clínica ya que aumenta su patogenicidad al invadir los tejidos del huésped con mayor facilidad. En otras especies patógenas para los humanos, como *Stenotrophomonas maltophilia*, la melanina es sintetizada intracelularmente en forma constitutiva por tirosinasas.

No solo la melanina es responsable de la coloración de bacterias, en muchos casos se producen compuestos responsables de distintas tonalidades. *Candida pulcherrima*, levadura aislable de zumos de frutas, flores con néctar y el tracto gastrointestinal de las abejas origina un pigmento rojo llamado pulcherrima. En medios que contengan hidratos de carbono se encuentra una bacteria llamada *Serratia marcescens* conocida también como "hongo de las hostias" que genera un pigmento de naturaleza pirrólica de color rojo oscuro, muy parecido al de la sangre. Es el origen del mito de la profanación de la hostia (Schlegel, 1997).

La cianobacteria *Anabaena SP* resulta ser fotosintética y es capaz de producir clorofilas y carotenoides variando el pH y el CO₂ al que se expone, teniéndose que a bajos niveles de CO₂ existe una gran producción de clorofilas y evitando el ajuste de pH (Morales, 2001),

Las microalgas también tienen una parte importante de pigmentos en su pared celular, pudiéndose presentar en colores rojos, amarillos, verdes y azules debido a la clorofila y carotenoides que producen, por ejemplo la microalga verde unicelular *Haematococcus pluvialis* que produce astaxantina (Domínguez, 2007).

1.2 Hongos productores de pigmentos

Los hongos son eucariotas quimioheterótrofos que pueden producir esporas por medio de un ciclo sexual o bien asexual. Se pueden presentar bajo dos formas morfológicas diferentes: la filamentosa, constituida por las hifas, en los denominados hongos filamentosos, y la unicelular en el caso de las levaduras. En todos ellos, la estructura celular de tipo eucariota se presenta envuelta por una pared celular rígida, formada en un 80 a 90% por polisacáridos como quitina, glucanos, mananos o celulosa. Tienen pocos requerimientos nutritivos y crecen bien a valores ácidos de pH, siendo capaces de asimilar nitrógeno de fuentes orgánicas, amonio y nitratos. Los hongos filamentosos tienen como unidad estructural las hifas que pueden ser simples o ramificadas, el crecimiento se produce por alargamiento de las hifas y da lugar a una masa filamentosa conocida como micelio.

Las esporas pueden ser inmóviles (aplanosporas) o móviles (zoosporas o planosporas), de reposo o resistencia y vegetativas, fungen como resguardo de la información genética del hongo, y debido a esto, el mecanismo de proliferación y defensa encapsula la descendencia del microorganismo ante el envejecimiento, agresión del ambiente y organismos externos, como la temperatura, pH, luz, bacterias, etc. (Gódia, 1998).

Debido al potencial bioquímico de los hongos en la generación de diferentes metabolitos, se han aprovechado ampliamente en el sector industrial a lo largo de los años. Entendiéndose como metabolito a toda sustancia que resulta del proceso de metabolismo de la célula (Schlegel, 1997).

Los metabolitos primarios son producidos en la etapa activa de crecimiento o fase exponencial del crecimiento microbiano, ya sean ácidos orgánicos, vitaminas aminoácidos, entre otros. Los metabolitos secundarios son el resultado del metabolismo secundario obteniéndose a partir de los metabolitos primarios, en etapas donde el crecimiento es lento y sostenido (Cortés et al., 2013).

Los pigmentos de los microorganismos son metabolitos secundarios. Algunos pigmentos tienen propiedades antibióticas y muchos microorganismos pigmentados son productores de antibióticos (Schlegel, 1997).

Los metabolitos secundarios son generados por diferentes rutas bioquímicas por ejemplo productos derivados de la glucosa en los cuales esta molécula llega a ser parte estructural como en el caso de algunos antibióticos; o el caso de terpenos y esteroides que son compuestos sintetizados mediante reacciones de polimerización de moléculas de isopreno, como el caso de carotenoides (Cortés y Mosqueda, 2013).

Dependiendo del tipo de compuesto presente en la coloración y su reacción defensiva, se han conformado tres grandes grupos de hongos sintetizadores de pigmentos (Durán, 2002):

- 1) Los de acción protectora contra las foto-oxidaciones mortales, cuyo compuesto colorante pertenece a los carotenoides con coloraciones que van del amarillo, anaranjado y rojo.

- 2) Los de acción protectora contra la tensión ambiental, produciendo melaninas, las cuales corresponden a los tonos oscuros y la gran mayoría de los hongos la contienen.
- 3) Los que actúan como cofactores en la catálisis de la enzima como las Flavinas, con coloraciones azules y verdes.

En el caso de la acción protectora contra la tensión ambiental las melaninas han sido consideradas como el escudo de los hongos por su capacidad de proteger al microorganismo contra un amplio rango de agresiones tóxicas, y también al producto de la respuesta inmune del huésped durante la infección. La importancia de la melanina en los hongos como un producto metabólico es señalada por el hecho de que los hongos melánicos ofrecen una gran cantidad de este producto. Por ejemplo, la melanina aporta, aproximadamente, 30% del peso seco de las esporas de *Agaricus bisporus*; si este componente representa una parte considerable del hongo, así como las fuentes de energía que debe haber usado para sintetizarla, podría suponerse que las melaninas en los hongos tienen una función predominante (Urán, 2008).

Las especies de *Monascus* son las más estudiadas por ser precursoras en la producción de pigmentos naturales para el uso humano, entre estas se encuentran *M. purpureus*, *M. rubropunctatus*, *M. rubiginosus* y *M. rubra* (figura 1.5). Estos pigmentos han sido utilizados durante cientos de años en Japón y China como colorantes alimenticios para el arroz, queso y el vino, o en la medicina para el tratamiento de trastornos circulatorios y como conservante. Originalmente se hacía crecer sobre el arroz de Oriente produciendo una masa roja que puede incorporarse como tal, a los alimentos o bien en forma de polvo desecado (Calderón, 2007). Se sabe que se puede producir hasta 11,000 µg de pigmento por cada gramo de *Monascus sp* cultivado en arroz (Barrios, 2005). El uso de estos pigmentos naturales es de importancia industrial en países occidentales para colorear embutidos, aunque no figuren en la lista positiva de colorantes permitidos en la Unión Europea ni tampoco en la de Estados Unidos.

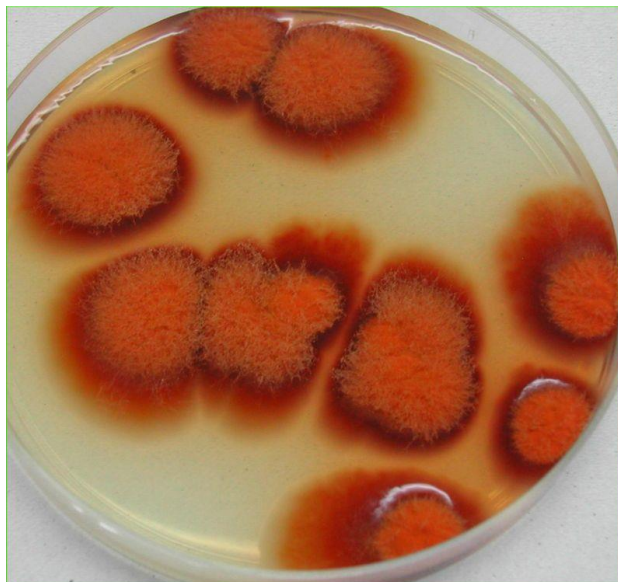


Figura 1.5 Placa de *Monascus Purpureus* (Santana-Fonseca, 2018)

Los hongos *Monascus* producen pigmentos amarillos llamados monascina y ankaflavina, naranjas como monascorubrín y rubropuctatín y rojos como monascorubramina y rubropuctamina. En el estudio de Hajjaj et al, (2000) se evidencia que la producción de pigmentos y citrinina aumenta durante la fase inicial del cultivo y luego decrece para los dos compuestos. Sin embargo, la adición de ácidos orgánicos como el L-málico y el succínico inhiben la producción de los pigmentos.

Los hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* también han sido estudiados como potenciales productores de pigmentos naturales como el rojo y púrpura; estos son de crecimiento relativamente rápido sobre medios ricos en aminoácidos (Méndez, et al., 2007). Algunas variantes de este hongo son sembradas en medios en los cuales se cambia la fuente de nitrógeno de sales de amonio o nitratos por la levadura y malta.

Otro ejemplo es el hongo *Sclerotium rolfsi* cuya máxima producción de β -carotenos es de aproximadamente 50 a 60 nmol/g de peso seco. Se afirma que *Blakeslea trispora* es otro microorganismo que sintetiza β -carotenos y que la clonación de los genes *carRA* y *carB* de este hongo puede ser utilizada para alterar la expresión genética de algunas cepas, logrando producir β -carotenos (Reyes y Franco, 2006).

1.3 Medios de cultivo de hongos productores de pigmentos

Entre los mecanismos generales de regulación en la biosíntesis de metabolitos secundarios se tiene, la inducción, que consiste en la presencia de un sustrato en la fase de crecimiento que actúa como inductor de algunas enzimas necesarias para la biosíntesis; Regulación catabólica, como de nitrógeno, debiendo consumirse casi en su totalidad para poder iniciar la producción del compuesto de interés; regulación de ATP, el metabolismo secundario es menos tolerante en cuanto a las concentraciones de fósforo, en comparación con el metabolismo primario, pero en la producción de metabolitos secundarios se requieren niveles mínimos (el fosfato estimula la tasa de respiración, síntesis de ácidos nucleicos y consumo de glucosa, originando un cambio en la fase de crecimiento) (Cortés et al., 2013).

Como ya se ha mencionado anteriormente, los hongos tienen pocos requerimientos para crecer, teniendo algunos de ellos la habilidad de procesar celulosa y asimilar fuentes de nitrógeno de amonio y nitratos. Sin embargo, los hongos que tienen la capacidad de producir pigmento generalmente requieren de medios de cultivo favorecedores en su producción o desencadenantes específicamente de cierta tonalidad. De acuerdo a las características genéticas de los hongos, los medios de cultivo pueden constituirse por diversas fuentes de carbono como la glucosa, algunas sales de metales y diversas fuentes de nitrógeno, su estudio implica encontrar la composición requerida en el medio para el desarrollo y la secreción de pigmentos. Así mismo se debe tomar en cuenta que requieren de otras condiciones ambientales como un porcentaje adecuado de humedad, pH y temperatura.

Los medios de cultivo se pueden preparar de acuerdo a la consistencia de sus nutrientes, de forma líquida, semisólida o sólida (Santana-Fonseca, 2018).

- **Medios líquidos:** Se utilizan para el crecimiento de cultivos puros en lote. Se denominan caldos de cultivo y no tienen agar en su formulación.
- **Medios semisólidos:** Contienen 0.5% de agar en su formulación. Se utilizan para estudiar la movilidad de las bacterias (presencia o ausencia de flagelo).

- Medios sólidos: Contienen de 1.5 a 2% de agar en su formulación. Estos medios inmovilizan a las células, permitiéndoles crecer y formar masas aisladas visibles llamadas colonias. Las colonias permiten al microbiólogo reconocer la pureza del cultivo; las placas que contengan más de un tipo de cultivo no provienen de un cultivo puro. Las placas de agar también se utilizan para la determinación de células viables (recuento en placas).

De acuerdo a la composición los medios se clasifican en: (Schlegel, 1997)

- Medios sintéticos o químicamente definidos: Llevan fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sales que suplan iones (P, K, Mg, Fe, Ca), otros elementos como son estimuladores del crecimiento (eritritol para *Brucella abortus*) pero siempre a concentraciones conocidas.
- Medios complejos o de composición indefinida: Estos medios llevan ingredientes como extracto de levadura, peptona, infusión de cerebro, extracto de carne, etc. que contienen nutrientes en abundancia pero sin saber con exactitud la composición cualitativa ni cuantitativa de estos.
- Medios de enriquecimiento: Son medios complejos (normalmente) con aditivos adicionales para favorecer el crecimiento de determinados microorganismos (particularmente heterótrofos exigentes). Ejemplo: adicción de sangre, suero o extractos de tejidos de animales y plantas.
- Medios selectivos: Son aquellos que favorecen el crecimiento específico de un microorganismo particular (o grupo de microorganismos). Es de gran utilidad para el aislamiento de microorganismos a partir de una población microbiana mixta. Como ejemplo está el CO₂ que se usa como fuente de carbono para autótrofos y adicionando cristal violeta se inhibe el crecimiento de los Gram (+).
- Medios diferenciales: Son aquellos destinados a facilitar la discriminación de microorganismos de una mezcla por sus propiedades diferenciales de crecimiento en dichos medios. Como ejemplo se tiene el Agar sangre que diferencia organismos

hemolíticos de no hemolíticos y el McConkey que diferencia organismos que requieren de diferentes concentraciones de lactosa.

- Medios de mantenimiento: Suelen ser distintos a los de crecimiento óptimo ya que el crecimiento rápido y prolífico suele ocasionar la muerte rápida de las células. Ejemplo: al añadir cantidades grandes de glucosa, al utilizarla los microorganismos producen ácidos, acidificándose el medio por lo que es preferible utilizar la glucosa necesaria en los medios de mantenimiento.
- Medios naturales: Estos medios pueden ser sólidos o líquidos, se encuentran constituidos originalmente en la naturaleza, es decir, tienen una proporción definida de sales, carbohidratos o fuentes de nitrógeno como los cereales, o las frutas. A estos medios también se les pueden agregar otros complementos de los que carezcan para provocar el crecimiento del microorganismo.

1.3.1 Medios sintéticos o químicamente definidos

Dentro de esta clasificación se encuentra el medio Kirk y Czapek, cuya composición en común consta básicamente de sacarosa o dextrosa como fuente de carbono, sales y tartrato de amonio como fuente de nitrógeno. La diferencia entre estos dos medios se encuentra en el medio Czapek porque contiene extracto de levadura como fuente alternativa de nitrógeno. Variando la concentración de algunos de sus componentes, estos medios de cultivo se pueden ajustar a los requerimientos del hongo en estudio, tanto para su desarrollo como para la producción de los metabolitos deseados.

Particularmente, ambos medios han sido probados en la producción de pigmentos a partir de los hongos filamentosos utilizados en la presente investigación (Santana-Fonseca, 2012 y Santana-Lara, 2013). El medio Czapek fue el referente para la secreción de pigmentos y, a través de la variación de la concentración de dextrosa y el uso y diferencia en la concentración de extracto de levadura o aminoácidos en forma individual, se ha establecido un medio sintético de formulación conocida para la producción de un pigmento amarillo y un rojo a partir del cultivo de dos hongos cada uno en forma separada.

El medio Czapek se constituye por una solución base de macronutrientes, una de micronutrientes llamada solución de elementos traza y una solución de concentrado de sales, llamado concentrado de Czapek. La composición de cada solución se muestra en las tablas 1.2, 1.3 y 1.4 (Santana-Lara, 2013).

Tabla 1.2 Componentes del medio Czapek. Macronutrientes.

Compuesto	Cantidad (g/L)
K_2HPO_4	1
Extracto de levadura	5
Sacarosa	30

Tabla 1.3 Componentes de los elementos traza del medio Czapek.
Micronutrientes.

Compuesto	Cantidad (g/L)
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	30
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	5

Tabla 1.4 Componentes de la solución concentrado de Czapek.

Compuesto	Cantidad (g/L)
$NaNO_3$	30
KCl	5
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	5
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.1

De acuerdo a la formulación, el medio Czapek contiene en un litro de solución de macronutrientes, 10 mL de solución de micronutrientes y 1 mL de concentrado de Czapek.

1.3.2 Medios naturales

Por su naturaleza, algunos hongos crecen en medios naturales ricos en carbohidratos y nitrógeno que requieren para su desarrollo, además de otras sustancias que complementan

su alimentación. Algunas especies fúngicas son de interés agrícola por su rápido desarrollo en cultivos de papa, frijol, maíz, arroz, plátano, etc.

El maíz es uno de los medios de cultivo naturales con más nutrimentos y en el que habitan varios hongos. La semilla o granos de maíz además de carbohidratos contienen esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos, beta-caroteno y un polipéptido inhibidor de alfa-amilasa. En el olote se han identificado los benzenoides, el flavonoide cianina y ligninas y en los estilos de maíz se ha encontrado monoterpeneo, sesquiterpenos, esteroides, compuestos, alcanos y alquenos, alcoholes y cetonas inferiores con diferentes grados de insaturación y ácido glicólico.

Algunos hongos también se pueden encontrar, en residuos agroalimentarios; en residuos de árboles, plantas, (frutos, tallos o raíces), de leguminosas y cereales, así como residuos de frutas y verduras, constituyendo un medio favorable para su desarrollo.

Los medios mencionados, generalmente contienen glucosa, fructosa, sacarosa, etc., la cual es utilizada como fuente de energía, mientras que nitratos o amonio es utilizado por la mayoría de los hongos para proveer el nitrógeno necesario, y por algunos otros hongos, las proteínas, aminoácidos y urea. Entre los macronutrientes, se encuentra el potasio, que es utilizado por el hongo para metabolizar los carbohidratos y/o mantener el balance iónico. Los micronutrientes como hierro, cobre manganeso etc., son requeridos como activador de enzimas requeridas en el metabolismo. Por ejemplo, medios que contienen celulosa son rápidamente habitados por hongos basidiomicetos. Se tiene conocimiento que algunas de las especies macroscópicas de hongos que presentan coloración parda durante su crecimiento como *Pluerotus spp.* crecen en prácticamente todo medio rico en celulosa sin afectar la coloración característica de este hongo. En la tabla 1.5, se presentan algunos residuos que han sido probados para esta especie (Rodríguez, 1996).

Una vez que el hongo es aislado de su hábitat, en laboratorio se llega a establecer un medio sintético que simula un ambiente que puede favorecer la secreción de metabolitos, ya sea para asimilar dichos nutrientes o como defensa al estrés que produce dicho ambiente.

Tabla 1.5 Substratos utilizados para la producción de *Pluerotus spp.*

Sustratos	Cepa
Cáscara de cacahuete	<i>P. ostreatus</i>
Hoja seca de maíz	<i>P. ostreatus</i>
Fibra de coco	<i>P. ostreatus</i> var. <i>Florida</i>
Paja de cebada	<i>P. ostreatus</i> INIREB-26
Pulpa de café	<i>P. ostreatus</i> INIREB-20
Pulpa de café	<i>P. ostreatus</i> INIREB-26
Pulpa de café	<i>P. Florida</i>
Tamo de maíz	<i>P. ostreatus</i>
Olote de maíz	<i>P. ostreatus</i>
Bagazo de caña	<i>P. ostreatus</i>
Bagazo de maguey	<i>P. dejamor</i> INIREB-8
Zacate buffel	<i>P. dejamor</i> INIREB-29
Viruta de encino	<i>P. dejamor</i> INIREB-29
Bagazo de henequén	<i>P. dejamor</i> INIREB-29
Paja de trigo	<i>P. ostreatus</i>
Bagazo de henequén	<i>P. ostreatus</i> comercial
Bagazo de henequén	<i>P. dejamor</i>
Vaina de frijol	<i>P. ostreatotoseus</i>
Orégano	<i>Pleurotus sp.</i>

Sin embargo, el uso de residuos como medios naturales para la producción de metabolitos a partir de hongos a nivel industrial ha sido prácticamente poco probado, sobre todo en aquellos hongos que producen pigmentos.

Una de las especies que secretan pigmentos y de la más estudiada es el *Monascus sp.* El cual ha sido originalmente cultivado en arroz para producir un pigmento rojo y de esta manera es explotado comercialmente. El arroz utilizado en el cultivo es un producto procesado rico en almidón y algunos aminoácidos. Este hongo también ha sido cultivado sobre residuos de cáscara y semilla de uva adicionados con peptona y glutamato sódico. El residuo fue evaluado como fuente de carbono para producir un pigmento rojo (Silveira et al., 2007), la concentración de peptona tuvo gran efecto sobre la coloración y el glutamato sobre producción del pigmento

para cualquier cantidad de residuos de uva probados. En otro estudio se analizó como la temperatura (entre 30 y 32 °C) y pH (5 y 6), tamaño de partícula y aireación afectan el crecimiento de *Monascus sp*, siendo estos parámetros adicionales a pruebas en diferentes residuos agroindustriales en estado sólido (Velázquez, et al. 2016). Otros estudios acerca del cultivo de este hongo, han mostrado que algunos medios sintéticos estimulan la secreción de otros metabolitos que acompañan la pigmentación.

1.4 Métodos de análisis para identificación de pigmentos

El color es fundamental para que el ojo humano detecte y seleccione un determinado objeto. Se puede decir que existen tres formas fundamentales en las que el color puede ser descrito cuantitativamente: espectrofotométricamente, colorimétricamente y sensorialmente (De Dios, 2002). El último en particular es un método subjetivo debido a que existe gran variación por ser dependiente de tres parámetros fisiológicos (brillo, matiz, y saturación).

Los cuerpos luminosos, como el sol o una lámpara eléctrica, emiten un amplio espectro que comprende muchas longitudes de onda. Aquellas longitudes de onda que están asociadas con la luz visible son capaces de afectar la retina del ojo humano y con ello dan origen a las impresiones subjetivas de visión. Pero gran parte de la radiación que emiten los cuerpos calientes cae fuera de la región en donde el ojo es sensible: ultravioleta (UV) e infrarrojo (IR) que caen a ambos lados de la región visible.

El color es el resultado de procesos físicos, químicos, fisiológicos y psicológicos, por los cuales se capta la radiación por el ser humano en una longitud de onda entre 400 y 700 nm (Figura 1.6), en este intervalo se inicia una reacción fotoquímica. Posteriormente, hay una transferencia de información entre el ojo y el cerebro resultando en la percepción visual. Los tonos de los colores se deben principalmente al grado de absorbancia o reflectancia que tiene la luz visible sobre un sólido. Si la luz visible se refleja completamente en el sólido en una forma difusa y con completa reflectancia, el ojo humano percibe el color blanco. En caso de que el sólido absorba toda la luz, percibe el color negro. Si se absorbe una fracción constante de luz en el intervalo visible, aparece el color gris. Estos colores se denominan colores acromáticos y se caracterizan por estar en el intervalo de 400 a 700 nm (De Dios, 2002).

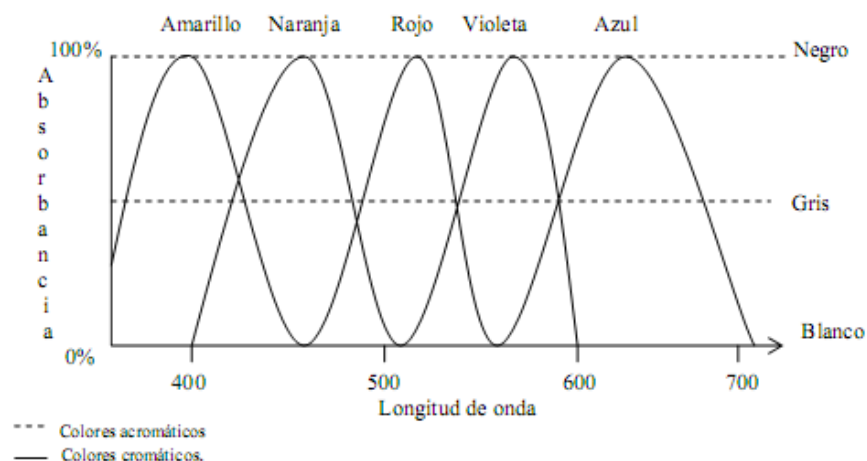


Figura 1.6. Representación esquemática de la absorción de luz de sólidos coloridos.

Los colores cromáticos muestran más de una banda en el espectro visible, específicamente en el intervalo de 400 a 700 nm donde absorben la luz que incide. Cuando la luz se refleja por varios cromóforos en el sólido y la suma de los tonos iguala las intensidades relativas del espectro visible de la luz solar, se obtiene una impresión de luz incolora la cual se le denomina mezcla aditiva de colores.

Nosotros vemos los objetos por medio de la luz emitida o reflejada. Cuando la luz blanca, que contiene todo un espectro de longitudes de onda, pasa a través de un medio como una solución química que es transparente en ciertas longitudes de onda pero que absorbe otras, para el observador el medio parece coloreado. Puesto que solo las ondas emitidas llegan al ojo, sus longitudes de onda indican el color del medio. Se dice que este color es complementario al color que se percibiría si la luz absorbida se pudiera detectar, debido a que la luz emitida y absorbida juntas forman la luz blanca original (Underwood, 1989).

De esto se tienen las siguientes longitudes para cada color absorbido y el color observado por el ojo humano, tabla 1.6:

Tabla 1.6 Espectro visible y colores complementarios.

Longitud de onda, nm	Color observado	Color absorbido
380 a 435	Amarillo-verde	Violeta
435 a 480	Amarillo	Azul
480 a 490	Anaranjado	Verde-azul

Tabla 1.6 Espectro visible y colores complementarios (Continuación).

Longitud de onda, nm	Color observado	Color absorbido
490 a 500	Rojo	Azul-verde
500 a 560	Púrpura	Verde
560 a 580	Violeta	Amarillo-verde
580 a 595	Azul	Amarillo
595 a 610	Verde-azul	Anaranjado
610 a 750	Azul-verde	Rojo

Los pigmentos pueden sufrir cambios de coloración a través de movimientos de posiciones e intensidades de las bandas de absorbancia. Estos cambios en la absorbancia, de longitud de onda de mayor a menor, recibe el nombre efecto batocrómico e hipsocrómico (De Dios, 2002). Al incrementar la magnitud del coeficiente de extinción (absorción) se produce un cambio conocido como efecto hipercrómico, mientras que al disminuir dicho coeficiente, desciende la magnitud de la longitud de onda denominándose efecto hipocrómico (Figura 1.7).

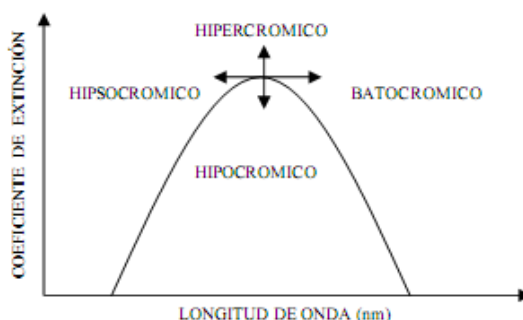


Figura 1.7 Efecto de cambios de color en pigmentos.

Hendry (1996) menciona la causa de los cambios batocrómicos por las modificaciones estructurales en las moléculas:

1. Incremento en la longitud de la cadena.
2. Ramificación de la cadena.
3. Arreglo en una estructura de anillo individual (ciclización).
4. Adición de moléculas de nitrógeno u oxígeno.
5. Enlace de dos o más anillos.
6. Adición de ciertos metales de transición.

1.4.1 Métodos espectrofotométricos

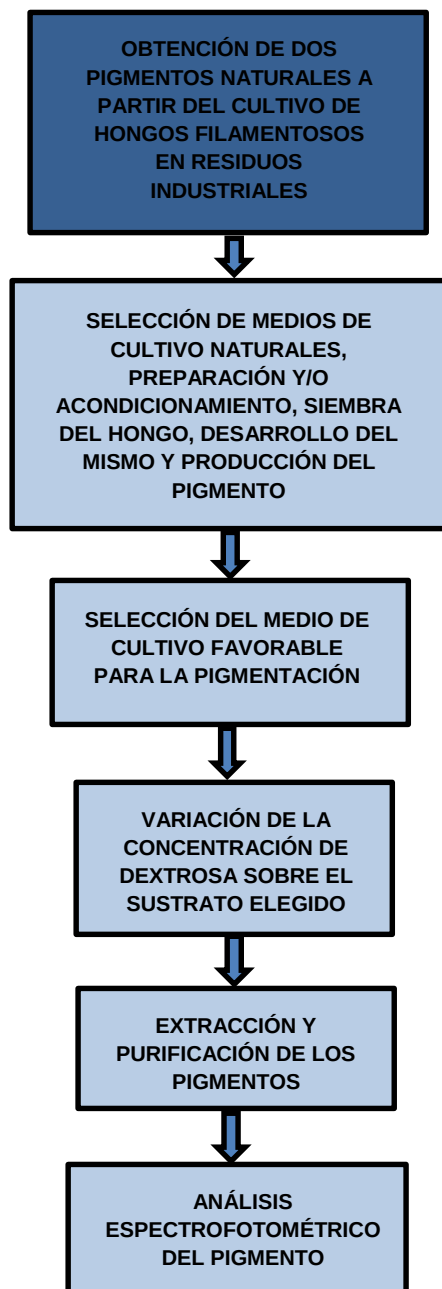
El método espectrofotométrico se basa en la determinación del espectro y cálculo de las coordenadas del espectro físico, graficando la transmisión o extinción (absorción) de una solución colorante utilizando como fundamento la Ley de Lambert-Beer. También se aplica por la relación entre la reflectancia de la materia colorante en un material como una función de la longitud de onda. De esta forma, la absorbancia de un colorante es directamente proporcional a la concentración del mismo (De Dios, 2002). La cuantificación dada para cada molécula depende del coeficiente de absorción.

Para el caso del espectro visible y ultravioleta se necesita radiación de alta energía o de longitud de onda más corta, en algunos equipos es posible detectar la gráfica de oscilación energética de las moléculas en el rango del espectro ultravioleta y de manera conjunta tener también el espectro de la región visible (Underwood, 1989).

2 METODOLOGÍA

Las etapas experimentales se presentan en el siguiente diagrama, figura 2.1.

Figura 2.1 Diagrama de flujo de las etapas experimentales.



A continuación se describen las etapas experimentales:

- a) Cultivo de dos hongos filamentosos identificados como H-29 y H-87 (en residuos agroalimentarios específicamente de una industria de bebidas utilizando residuos secos obtenido del lavado del azúcar (dextrosa) y de una industria de cereales, particularmente con el uso de arroz trigo y maíz, para producir de cada uno un pigmento amarillo y uno rojo. En esta etapa, se consideró la elección del medio de cultivo a base de residuo, su preparación y/o acondicionamiento; la siembra del hongo en dicho medio, el desarrollo del mismo y la producción del pigmento.
- b) Selección del medio de cultivo favorable para la pigmentación. En esta se eligió el medio natural en que los hongos producen el pigmento buscado.
- c) Variación de la concentración de dextrosa sobre el sustrato elegido en la etapa anterior, a fin de establecer la concentración mínima requerida por el hongo y/o para facilitar la asimilación de la misma.
- d) Extracción y purificación de los pigmentos. En esta etapa se establecieron los medios utilizados para realizar la extracción y la purificación del pigmento obtenido en la primera etapa.
- e) Análisis espectrofotométrico UV-Vis e IR del pigmento. En esta etapa se analizó en el rango Vis el pigmento extraído y el pigmento purificado.

Las cepas de los hongos H-87 y H-29 son conocidas por su secreción de pigmento; el H-29 fue identificado como un hongo que secreta un pigmento rojo y el H-87 secreta un color amarillo verdoso identificada. Las cepas de dichos hongos fueron proporcionadas por la universidad politécnica de Pachuca (UPP).

Los hongos fueron originalmente recolectados del municipio de Molango, Edo. de Hidalgo y aislados en medio de cultivo sólido con Agar Papa Dextrosa (PDA), manteniéndose en refrigeración a 4 °C.

A partir del aislamiento, ambas cepas fueron reproducidas y conservadas en el medio PDA para diferentes estudios. En la figura 2.2, se muestra imágenes de las cajas que contienen las cepas H-29 y H-87 al quinto día de siembra en PDA, reportadas por Hernández (2011); Santana-Lara (2013); Sanjurjo (2015); Chávez-Islas (2018); Santana-Fonseca (2018).

Los estudios citados encontraron que el medio favorable para la producción de ambos pigmentos es el medio Czapek. Además, Santana-Lara (2013) y Santana-Fonseca (2018), encontraron una formulación de cultivo basada en el medio Czapek, en la cual se sustituyó el extracto de levadura por un aminoácido y reduciendo la cantidad de glucosa. En la figura 2.3, se muestran los pigmentos obtenidos de dichas cepas en medio líquido de acuerdo a la formulación indicada.



Figura 2.2 Cepas del hongo H-87 (izquierda), Santana-Lara, 2013 y H-29 (derecha) después de cinco días de su siembra en PDA, Santana-Fonseca, 2012.



Figura 2.3. Pigmentos obtenidos a partir de las cepas H-87 (pigmento amarillo) y H-29 (pigmento rojo) cultivadas en un medio sintético líquido de formulación conocida (Santana-Lara, 2013, Santana-Fonseca, 2018)

Tomando como base los anteriores resultados, fueron probados varios medios de cultivo naturales en fermentación sólida, utilizando residuos de la industria de bebidas azucaradas (dextrosa) y cereales (arroz, maíz y trigo). Para esta investigación se tomó como referencia las investigaciones anteriores donde se establecieron los requerimientos básicos en medios sintéticos de ambos hongos, encontrando que los medios ricos en aminoácidos y glucosa favorecen la producción de pigmento secretada por los hongos H-29 y H-87.

Para llevar a cabo las inoculaciones (siembra) en medio sólido de ambas cepas, se utilizó la cepa fresca para preparar micelio suspendido, vertiendo todo el contenido de agar de una caja petri en 100 mL de agua destilada, poniéndolo en agitación por 24 horas a 200 rpm en un agitador oscilatorio (ver figura 2.4).



Figura 2.4. Agitador oscilatorio (shaker).

El micelio suspendido una vez preparado, se dispuso en refrigeración a 4°C y llevado a temperatura ambiente previamente para cada siembra requerida.

2.1 Cultivo de las cepas en residuos industriales

Los medios naturales utilizados según el nivel de nutrientes convenientes para el hongo fueron granos de arroz blanco e integral y residuos de maíz (hojas, olote, estigmas y tallos) y trigo, debido a que contienen aminoácidos.

Para evitar que sus propiedades decayeran con la esterilización tradicional se tomó como referencia a Monzón, (2001), esterilizándose a 121 °C por 5 min.

Para observar si cada sustrato constituido únicamente por el grano o por otro residuo probado era suficiente para que el hongo creciera adecuadamente, se realizaron diferentes pruebas en las que el sustrato fue adicionado una solución acuosa con otros nutrimentos, humedeciendo ligeramente la muestra con la adición de dicha solución. Las pruebas fueron las siguientes:

a) Adición de agua; en este caso, considerando que el medio fuese suficiente para proporcionar los nutrimentos requeridos por el hongo y el agua solo fuera útil para proveer humedad en el medio.

b) Adición de solución de dextrosa; considerando que el medio requiere mayor cantidad de glucosa para que resultara favorable para el cultivo del hongo.

c) Adición de solución del medio Czapek, ya que se conoce el resultado positivo con este medio de acuerdo a estudios anteriores, por tanto, se consideró que en este caso el sustrato utilizado sirvió como soporte de propagación (mayor superficie de crecimiento) para llevar a cabo el cultivo sólido del hongo.

De esta manera se prepararon las soluciones complementarias: 100 mL de Czapek, 100 mL de Dextrosa utilizando 30 g/L y 100 mL de agua, éstas se colocaron en matraces de 250 mL y se esterilizaron a 121 °C por 15 min, dejándolos enfriar a temperatura ambiente.

Para que se garantizara la buena siembra, es decir que no existiera por error humano un mal manejo de utensilios o microorganismos y que de esto se obtuvieran resultados inconsistentes, se colocó una reproducción de cada experimento y un testigo negativo, el cual se preparó e incubó de igual manera que todos los experimentos excepto que este matraz, o caja no se sembró con algún inóculo.

Para todas las siembras fue necesario esterilizar el material a utilizar como pipetas, espátulas, cajas petri, entre otros, y sanitizar el área con benzal o alcohol etílico al 70 %. También se usaron cubre bocas y guantes, y se trabajó bajo el área de dos mecheros Fisher. Para incubar el hongo se dejó una leve entrada de aire a cada matraz para favorecer su crecimiento, aflojando poco los tapones de algodón que lleva la boquilla del matraz. Todos los experimentos fueron llevados a incubar a 28 °C con un límite máximo de incubación de 9 días, observándose diariamente el avance de cada matraz.

2.1.1 Cultivo de cepas en granos de arroz

Se utilizó arroz blanco e integral, este último considerado por su alto nivel de aminoácidos. Se prepararon 7 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 10 g de arroz blanco seco y 7 matraces con arroz integral seco. Se esterilizó el arroz seco para evitar que se cociera y perdiera sus propiedades; se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Se colocaron 5 y 10 mL de las soluciones complementarias en cada matraz con arroz, para conocer su comportamiento frente a la humedad presente de cada solución, agregándoles 1.5 mL de micelio suspendido de la cepa H-87 y H-29 en forma individual, también a temperatura ambiente.

2.1.2 Cultivo de cepas en residuos de maíz

Otro de los medios naturales utilizados fue el maíz, de este se utilizaron cuatro partes diferentes: el tallo, las hojas, el olote y los estigmas, en experimentos individuales se tuvo todo fresco excepto el olote (que en este caso se consiguió seco para evitar la humedad excesiva que interfiriera en los experimentos). El material se preparó de la siguiente manera:

- Las hojas se cortaron en trozos pequeños pesándose porciones de 5 g.
- Los tallos se cortaron en tiras de aproximadamente 2 cm pesándose porciones de 5 g.
- Los estigmas se separaron y se pesaron porciones de 3 g.
- Los olotes secos se cortaron en trozos de 3 cm de largo pesándose en porciones de 10 g.

Todas las porciones se colocaron en matraces y se esterilizaron. En este experimento sólo se varió el tipo de líquido agregado, utilizando en todos los casos 10 mL de la solución complementaria. En este experimento se tomó como testigo el matraz con tallo y 10 mL de dextrosa.

Posteriormente se agregó 1.5 mL de micelio suspendido de la cepa H-87 y H-29 de manera individual a cada matraz llevándolos a incubación.

2.1.3 Cultivo de cepas en granos de trigo

El trigo fue otra fuente natural de alimento para el hongo, 10 g de este fueron colocados individualmente en 7 matraces Erlenmeyer de 250 mL y esterilizados. Posteriormente se les agregó 10 mL de solución complementaria y 1.5 mL de micelio suspendido de la cepa H-87 y H-29 de manera individual llevándose a incubación.

2.1.4 Cultivo de cepas variando la concentración de dextrosa en el residuo industrial como medio natural más favorable

Después de seleccionar el medio natural favorable (residuos de trigo, maíz o arroz) para el crecimiento de la cepa y producción del pigmento, según los resultados visuales y espectrofotométricos que se obtuvieron, se procedió a variar la concentración de glucosa para hacer más eficiente el consumo de esta y que no se presentaran azúcares no consumidas por el hongo detectadas en el rango VIS del espectro.

De esta manera para el medio natural en cuestión (pesándolo en la misma proporción de los experimentos anteriores) se prepararon y agregaron 10 mL de dextrosa considerando concentraciones de 20 g/L y 10 g/L. En este caso el testigo fue la solución complementaria de dextrosa 30 g/L.

Después de agregar la dextrosa a los matraces se les añadieron 1.5 mL de micelio suspendido de la cepa H-87 y H-29 de manera individual llevándose a incubación.

2.2 Extracción y purificación del pigmento obtenido

Al tener el hongo ya desarrollado y con el color propio que produce en el medio de cultivo, se procedió a la extracción del color con la adición de una solución de alcohol etílico-agua al 50%, agitando fuertemente y separando con papel filtro de 40 μ y un embudo de separación. Se realizó el mismo procedimiento 4 veces para extraer todo el color posible del sustrato. La solución obtenida fue centrifugada a 500 rpm por 15 min y decantada, reservando el líquido pigmentado para su análisis espectrofotométrico.

Posteriormente el líquido pigmentado se hizo pasar por una columna empacada de sílica (figura 2.5) en donde se separaron otros sólidos o impurezas de dicha solución.

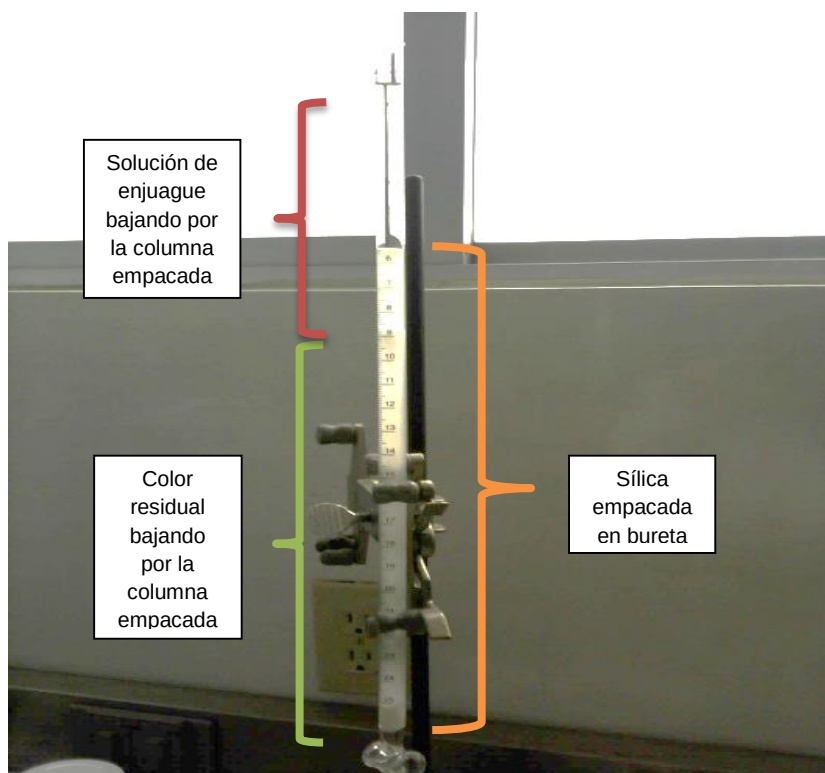


Figura 2.5 Columna empacada de sílica por la cual se hizo pasar el líquido pigmentado.

2.3 Análisis de los pigmentos extraídos por espectrofotometría VIS

Cada pigmento extraído y purificado fue analizado por medio de un espectrofotómetro Lambda 35, Perkin Elmer (figura 2.6), utilizando celdas de cuarzo, tomando como blanco agua destilada, y una referencia de la solución de alcohol etílico-agua utilizada en la extracción, para tener un espectro conocido en la solución a analizar.

Para el análisis se hizo un barrido de 200 a 700 nm en todos los casos.



Figura 2.6. Espectrofotómetro Lambda 35, utilizado para el análisis de los pigmentos.

3 RESULTADOS

Los resultados se muestran en el orden en el que se realizó la experimentación del cultivo de hongos H-29 y H-87 en residuos agroalimentarios para la producción de los pigmentos amarillo a partir de cada hongo respectivamente, sólo se describe la observación de uno de los matraces de cada experimento ya que no existió diferencia significativa entre las repeticiones, no existió crecimiento en los matraces testigo negativo. La pigmentación obtenida fue registrada fotográficamente y en este apartado se contemplan los gráficos arrojados del líquido pigmentado por el espectrofotómetro.

3.1 Cultivo de las cepas en residuos industriales como medios naturales

La reproducción favorable de cepa H-87 (coloración amarilla) permitió su cultivo en los medios establecidos en la metodología, sin embargo la cepa H-29 no mostró el pigmento característico rojo cuyo referente fue mostrado en las figuras 2.1 y 2.2, esto se debió posiblemente a que el medio de cultivo no favoreció la pigmentación roja, la placa presentó contaminación, o bien, mutación del hongo o invasión de otro hongo lo que provocó la secreción de una pigmentación diferente.

Para descartar que el medio de cultivo fuera la causa de la pigmentación, se realizó una siembra en sólido utilizando micelio suspendido, obteniéndose como resultado una pigmentación dividida de pigmentación morada y roja como se muestra en la figura 3.1, en la que se hace visible la división de pigmentación dentro de la placa. Se observó un micelio poco abundante a diferencia del presente en la cepa original, por lo que se consideró que había invasión de otro hongo o bien mutación del H-29.

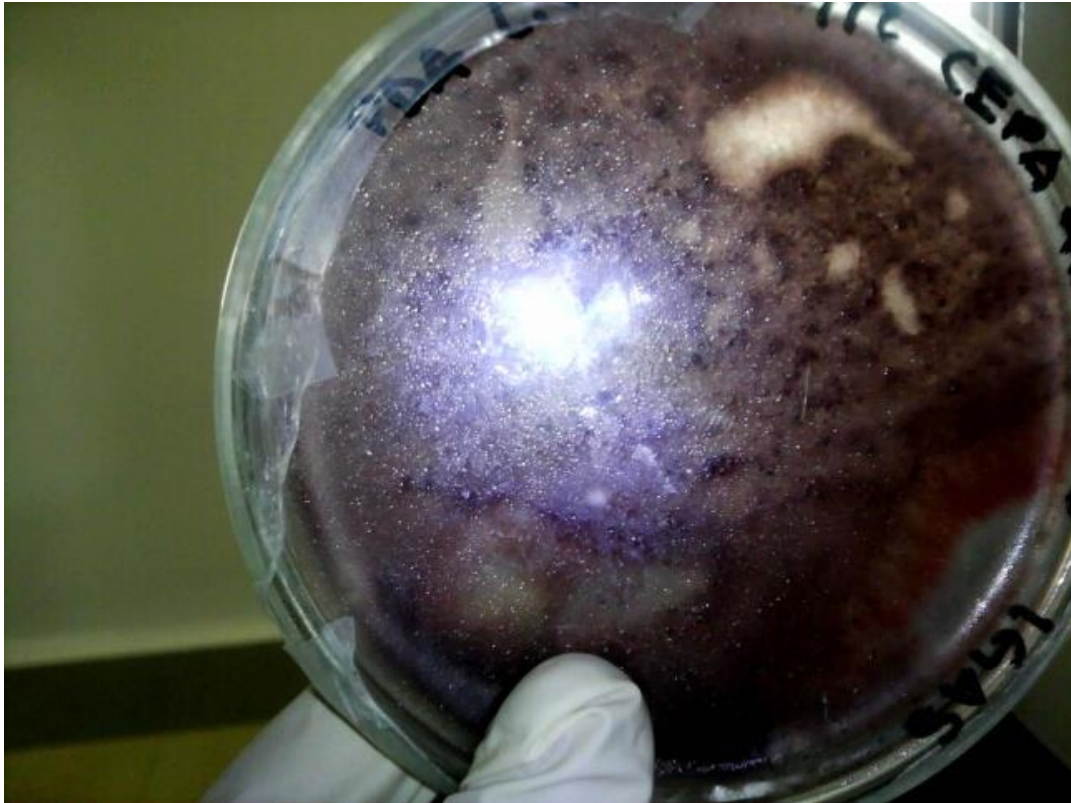


Figura 3.1. Caja petri con la siembra de la cepa H-29 en PDA, donde se observó una parte roja a la orilla derecha de la caja y el restante de color morado.

Para rescatar al H-29 de una posible invasión, se realizó una siembra en medio líquido Czapek, del cual se conoce el resultado de la siembra, pero sin haber obtenido la pigmentación deseada. Este resultado se puede ver en la figura 3.2, donde se observó una débil coloración rosa sin alcanzar el pigmento rojo conocido aún después de 6 días de siembra.

Posteriormente, se insistió en la recuperación de la cepa original aislando de la placa pequeños trozos de micelio rojo y sembrándolos en agar PDA, obteniendo un hongo que se acercaba al original, pero un poco debilitado, figura 3.3.



Figura 3.2. H-29 sembrado en medio líquido Czapek los 6 días de incubación.

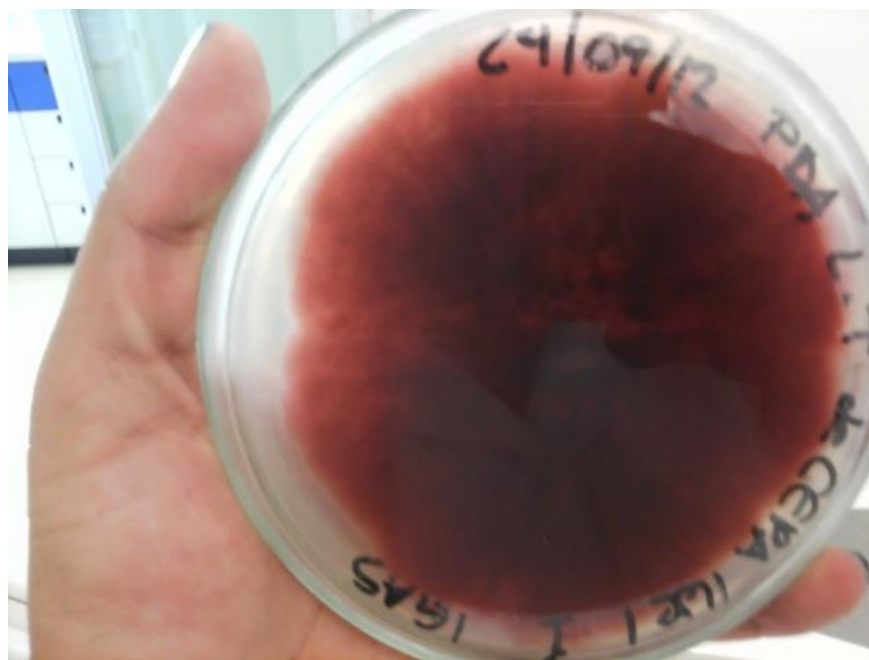


Figura 3.3 H-29 después del tercer aislamiento.

Pese a esta limitante para el hongo H-29, se trabajó con este y se obtuvieron los resultados de la siembra de los dos hongos en estudio, sobre los residuos indicados.

3.1.1 Cultivo de las cepas en granos de arroz

a) Cultivo del H-87

De la siembra de este hongo en granos de arroz blanco e integral, se obtuvieron los resultados presentados en la tabla 3.1, en la que se reportó el tipo de grano de arroz utilizado como medio, la solución complementaria agregada al medio, volumen agregado de esta solución y las observaciones que se tuvieron para cada experimento.

Dentro de las observaciones se remarcó, el crecimiento del hongo, la pigmentación, características observables de la misma y la esporulación del hongo.

Al finalizar el ciclo de vida de los hongos, estos esporularon debido a su mecanismo de reproducción asegurando su proliferación a futuro, en estos experimentos fue muy visible este fenómeno para el caso del H-87.

Tabla 3.1. Resultados del cultivo del H-87 en granos de arroz blanco e integral después de 7 días de cultivo.

Tipo de arroz	Solución complementaria	Volumen agregado (mL)	Observaciones
Blanco	Dextrosa	5	Sin pigmentación, se observó poco crecimiento y fue nulo en las partes secas del sustrato.
		10	Abundante crecimiento, la pigmentación fue intensa, sin esporulación
	Czapek	5	Color amarillo intenso, en las zonas secas no hubo pigmentación, sin esporulación
		10	Color amarillo intenso, todos los granos se encontraban teñidos, poca esporulación.
	Agua	5	Sin coloración.
		10	Sin coloración.

Tabla 3.1. Resultados del cultivo del H-87 en granos de arroz blanco e integral después de 7 días de cultivo (Continuación).

Tipo de arroz	Solución complementaria	Volumen agregado (mL)	Observaciones
Integral	Dextrosa	5	Color amarillo-naranja tenue, crecimiento poco uniforme, sin esporulación
		10	Color amarillo-naranja tenue, crecimiento uniforme con poca esporulación.
	Czapek	5	Color amarillo, crecimiento poco uniforme, mucha esporulación que enmascara el color
		10	Color amarillo, crecimiento uniforme, poca o nula esporulación.
	Agua	5	Color amarillo tenue crecimiento poco uniforme en las zonas secas, poca esporulación
		10	Color amarillo tenue, crecimiento uniforme, poca esporulación

Los resultados del seguimiento fotográfico del cultivo del H-87 en los sustratos de arroz blanco y arroz integral con sus variantes, se muestran en las siguientes figuras.

En el caso del cultivo en arroz blanco e integral adicionado con 10mL de agua, se observó la ausencia de pigmentación en el arroz blanco y una coloración amarilla tenue en el arroz integral como producto de la secreción del pigmento por el hongo figura 3.4. La adición de 5 mL de agua generó el mismo resultado.



Figura 3.4. Arroz blanco (izquierda) e integral (derecha) ambos adicionados con agua e inoculados con el H-87.

Para los experimentos de cultivo en arroz integral y blanco con adición de 10 mL de dextrosa, al tercer día de incubación del hongo H-87, se observó que el arroz blanco obtuvo una intensidad de color mayor que en el matraz con arroz integral, figura 3.5.

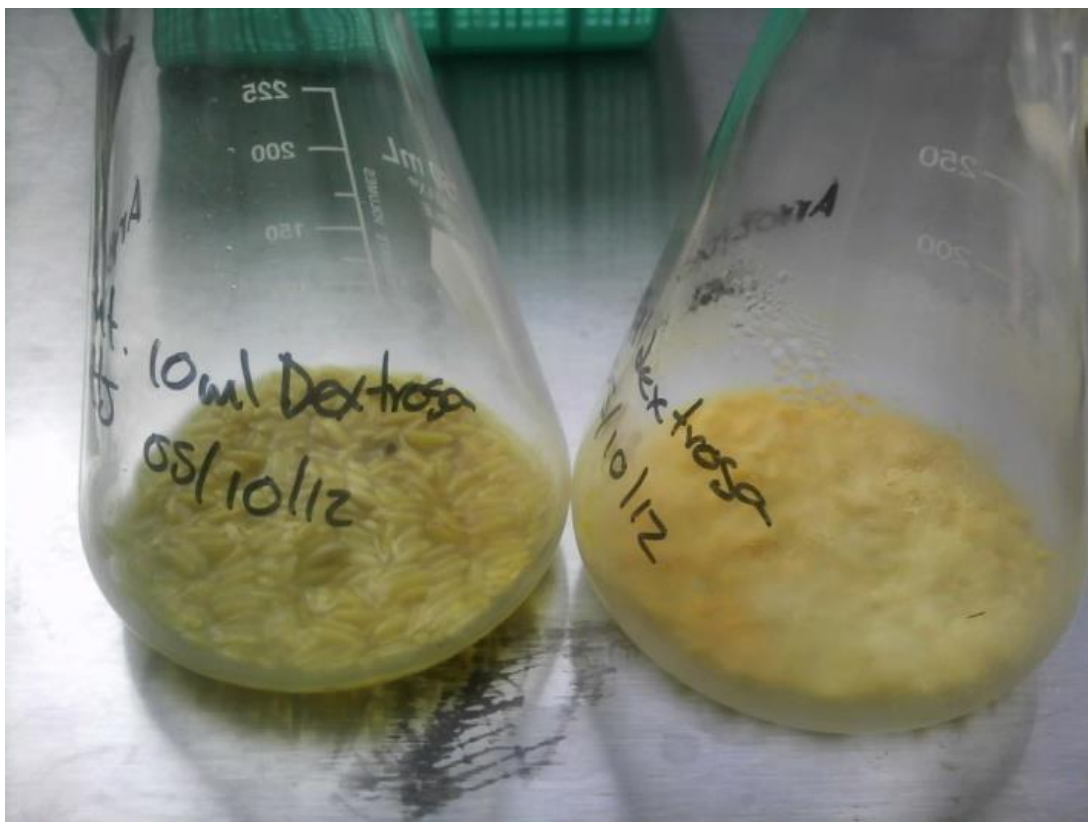


Figura 3.5. Cultivo del H-87 en arroz integral (izquierda) y blanco (derecha) ambos con 10 mL de solución complementaria dextrosa.

El cultivo en matraces con arroz blanco e integral adicionados con 5mL de dextrosa no presentaron crecimiento a los 3 días de incubación y en algunos casos el hongo respondió a la falta de líquido esporulando.

En los experimentos cuya adición al sustrato fue la solución de Czapek, se presentó pigmentación amarilla, pero además esporulación, siendo abundante en el arroz integral para cualquier volumen utilizado de esta solución. Esto se observa en la figura 3.6.

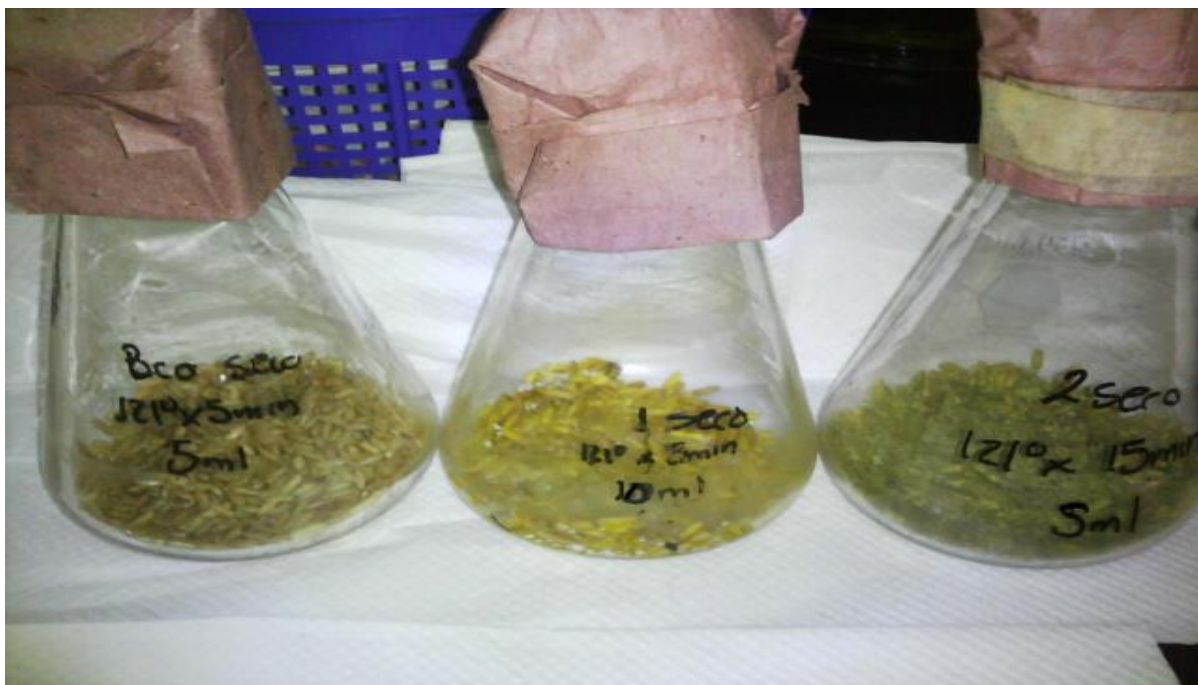


Figura 3.6. Cultivo del H-87 en granos arroz integral sin Czapek (izquierda), con 10 mL de Czapek (centro) y con 5 mL de Czapek (derecha).

En vista de que los experimentos con la adición de 5mL de la solución complementaria al sustrato, presentarían ausencia de micelio por falta de humedad, todos los experimentos posteriores fueron realizados con 10 mL de dicha solución.

b) Cultivo del H-29

Para el caso del hongo que secreta el color rojo, se observó un crecimiento abundante, sin embargo el color fue púrpura intenso que no correspondió al buscado y se presenta únicamente la fotografía de su cultivo en arroz blanco e integral en la figura 3.7.



Figura 3.7. Cultivo de H-29 en arroz

3.1.2 Cultivo de cepas en residuos de maíz

a) Cultivo del H-87 en hojas tiernas de maíz

En este apartado se muestran los resultados por experimento de cada residuo de maíz. En este caso no existieron problemas con la distribución de la humedad, ya que el maíz no fue secado antes de la esterilización, por tanto, el medio se encontró húmedo en forma homogénea en todo el matraz durante las pruebas.

Todos los experimentos arrojaron resultados a los 3 días de la siembra, el avance del crecimiento fue monitoreado diariamente observándose que la producción de pigmento es decisiva del día 2 al día 3, es decir, si no se presentó color al tercer día, el hongo simplemente esporuló sin secretar nada. Este comportamiento regularmente se presentó en todos los experimentos. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Resultados del experimento 1 con hojas de maíz.

Solución	Observaciones
Complementaria	
Dextrosa 10 mL	Poca coloración y bastante crecimiento, hubo mucha esporulación verde.
Czapek 10 mL	El color fue el característico pero si hubo esporulación.
Agua 10 mL	No hubo ningún indicio de secreción de pigmento, mucha esporulación, incluso más que en los matraces de dextrosa

Para el caso de las hojas con agua y dextrosa se observó una esporulación excesiva y ausencia del pigmento, figura 3.8, y a diferencia de los matraces con medio Czapek si existe una coloración amarilla pero persistió la esporulación.

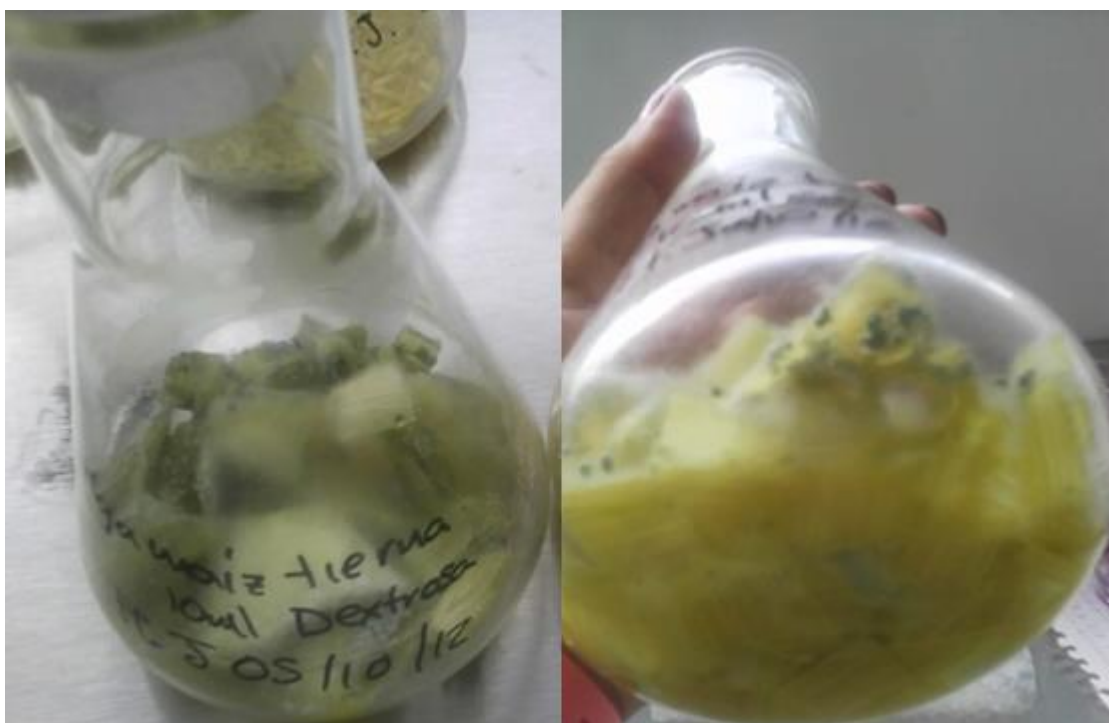


Figura 3.8. Matraces con dextrosa (izquierda) y matraz con medio Czapek (derecha).

b) Cultivo del H-87 en caña o tallos de maíz

Para el experimento de los tallos del maíz se introdujo el testigo ya que debido al alto grado de azúcares de la caña fue más fácil saber que se había sembrado o esterilizado correctamente ya que prácticamente cualquier microorganismo se desarrolla sin dificultad en presencia de azúcares, tabla 3.3.

Tabla 3.3. Resultados del experimento 2 con los tallos de maíz.

Solución	Observaciones
Complementaria	
Dextrosa 10 mL	Color amarillo, bastante esporulación verde, crecimiento blanco en la parte superior de la caña.
Czapek 10 mL	Se presentó el color amarillo, hubo menos esporulación verde.
Agua 10 mL	Color amarillo, más esporulación que el caso de la dextrosa y Czapek

En el caso de la caña, se esperaba un mejor crecimiento del H-87 en solamente agua, tomando en cuenta el alto contenido de azúcares que contiene el tallo por sí solo, aunque como se ve en la figura 3.9 hubo mucha esporulación que ensucia el color amarillo secretado. En general no se tuvo un buen resultado para todos los casos.

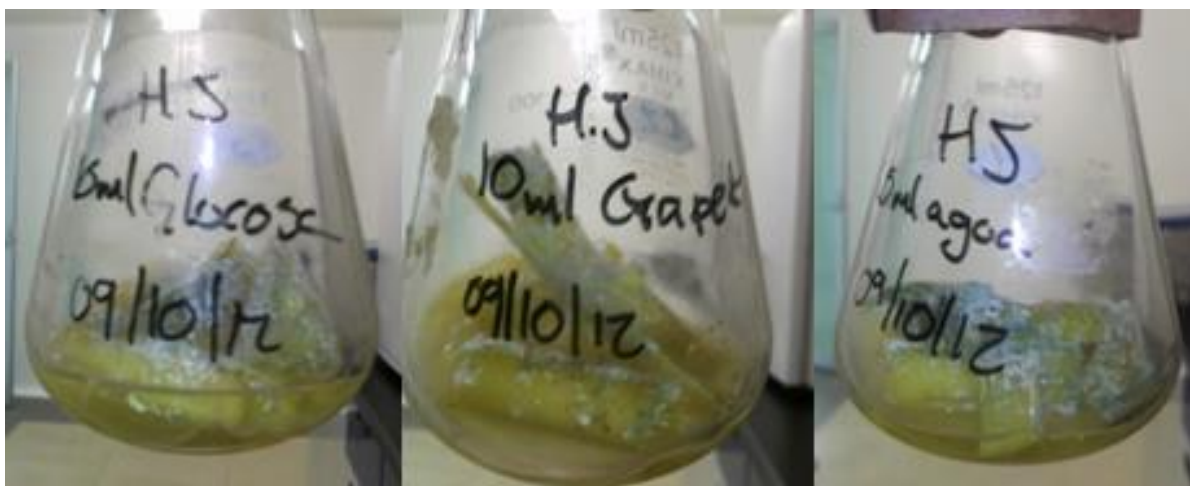


Figura 3.9. De izquierda a derecha. Matraces: con glucosa, medio Czapek y agua.

c) Cultivo del H-87 con estigmas de maíz

En el experimento 3 se obtuvieron mejores resultados por la composición de los estigmas del maíz, los resultados se resumen en la tabla 3.4 obteniéndose a los 3 días de incubación.

Tabla 3.4. Resultados del experimento 3 con los estigmas del maíz.

Solución complementaria	Observaciones
Dextrosa 10 mL	Se observó un color intenso amarillo con casi nula esporulación verde y un poco de crecimiento blanco por encima del sustrato
Czapek 10 mL	Presentó coloración amarilla intensa, con un poco más de esporulación verde y crecimiento blanco encima del sustrato que en el caso de la glucosa.
Agua 10 mL	No hubo coloración amarilla, los estigmas fueron color café oscuro y hubo bastante esporulación verde.

No fueron suficientes los nutrientes para provocar la secreción del pigmento en el caso del matraz con estigmas y agua, lo que conllevó a obtener un color café oscuro en todo el sustrato, en contraste con el matraz que contiene glucosa como se aprecia en la figura 3.10.

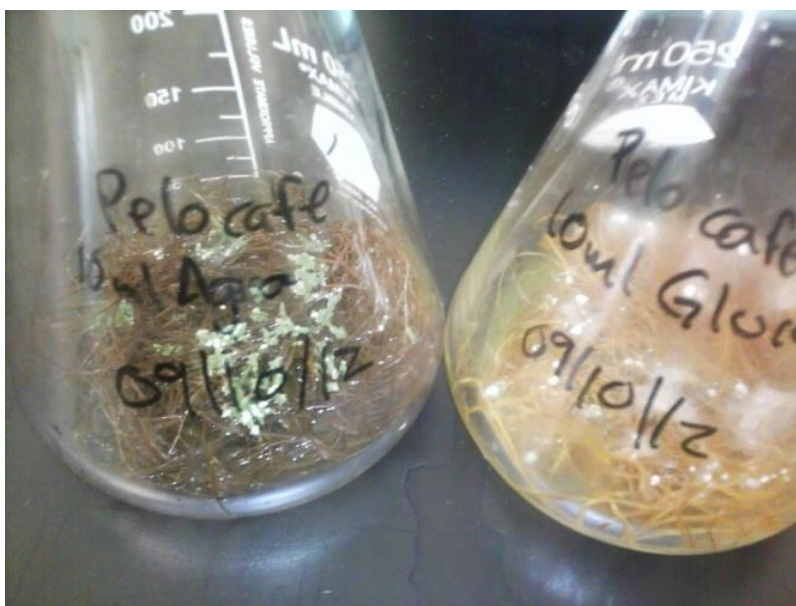


Figura 3.10. Matraz con estigmas y agua (izquierda), matraz con estigmas y glucosa (derecha).

d) Cultivo del H-87 en olotes de maíz

Finalmente se muestran los resultados de la inoculación en olote de maíz, que se obtuvieron a los 3 días de siembra. Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Resultados del experimento 4 con el olote de maíz.

Solución	Observaciones
Complementaria	
Dextrosa 10 mL	Sin pigmentación, mucha esporulación.
Czapek 10 mL	Leve pigmentación, la esporulación estuvo presente en todo el sustrato
Agua 10 mL	Sin pigmentación

En este experimento se muestra en la figura 3.11, de olote y solvente en el matraz, la esporulación es que el líquido se observó opaco totalmente.



Figura 3.11. Matraz con olote y medio Czapek, las esporas estaban dispersas en el solvente.

e) Cultivo del H-29 en hoja tierna de maíz

Se muestra en la figura 3.12 el caso de la cepa H-29 en donde se observó un color púrpura y un crecimiento de micelio delgado superficial blanco.



Figura 3.12. Micelio de H-29 en hoja tierna y Czapek.

f) Cultivo del H-29 en estigmas de maíz

En este caso también se obtuvo un matraz con siembra del H-29 observándose un color marrón-negro en todo el sustrato, con poco crecimiento de micelio blanco en la superficie. Figura 3.13.

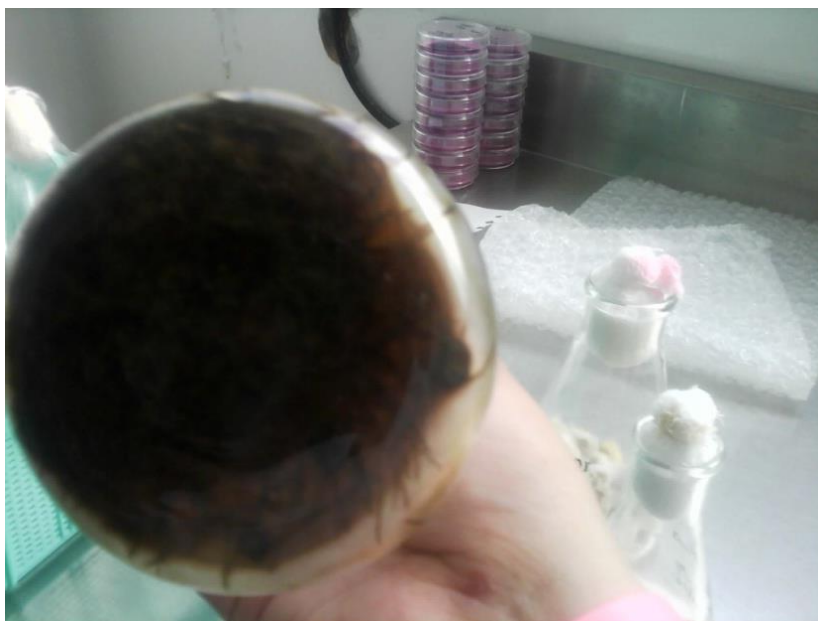


Figura 3.13. Parte inferior del matraz con estigmas de maíz inoculado con H-29

g) Cultivo del H-29 en olotes de maíz

El matraz con H-29 no se vio muy diferente en color con respecto a los demás experimentos, como se ve en la figura 3.14 en las partes donde se absorbió medio Czapek existió pigmentación y en los espacios vacíos hubo crecimiento de micelio blanco.



Figura 3.14. Cepa H-29 sembrada en olote con medio Czapek.

3.1.3 Cultivo de cepas en trigo

a) Cultivo del H-87

En el trigo se obtuvieron buenos resultados con respecto al crecimiento uniforme, color y a la poca esporulación con respecto a los experimentos anteriores. En la tabla 3.6 se muestra lo que se observó para cada caso.

Tabla 3.6 Resultados del experimento en trigo como medio de cultivo natural.

Solución	Observaciones
Complementaria	
Dextrosa 30 g/L	Color amarillo brillante, aunque presentó esporulación verde abundante.
Czapek	Color amarillo brillante, hubo un poco más de esporulación verde pero fue casi imperceptible.
Agua	Poca o nula pigmentación, el trigo presentó esporas verdes y blancas

La dextrosa provocó la esporulación del hongo, sin embargo, permitió diferenciar el color brillante amarillo en los granos de trigo a comparación del matraz con agua, en este último se vio un color pálido en todo el grano, figura 3.15.



Figura 3.15. De izquierda a derecha. Matraces: con trigo y agua, trigo y dextrosa, trigo y medio Czapek.

b) Cultivo del H-29

El trigo tuvo un crecimiento abundante (pero menos que el caso del arroz) de la cepa H-29, sin embargo hubo poca coloración ligeramente púrpura figura 3.16.

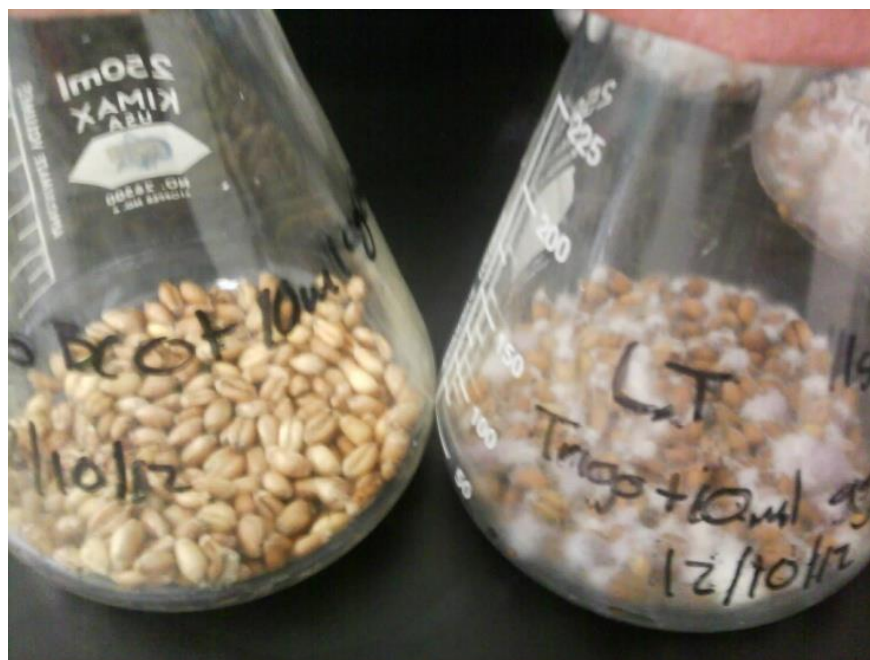


Figura 3.16. Matraz testigo de todas las pruebas sin crecimiento (izquierda) y matraz con trigo y la cepa H-29.

3.1.4 Cultivo de cepas variando la concentración de glucosa en el residuo industrial como medio natural más favorable

De todos los residuos sólidos probados, se seleccionaron aquellos que obtuvieron resultados favorecedores de color con el mínimo de aditivos (estigmas del maíz y trigo). Para el hongo H-87, se procedió al experimento de optimización de las cantidades de solución de dextrosa agregada al medio; ya que deseamos saber si reduciendo la concentración de azúcares y los componentes naturales de los residuos son suficientes para una óptima producción de pigmentos. La variación de concentraciones de dextrosa comenzó con el valor de la formulación original de Czapeck (30 g/L). Como en los experimentos anteriores no se obtuvieron los resultados de color deseados para la cepa H-29 estas pruebas no se realizaron para ella.

a) Estigmas de maíz

En los estigmas del maíz se obtuvieron las observaciones de la tabla 3.7.

Tabla 3.7 Resultados de la variación de concentraciones de dextrosa en estigmas del maíz.

Solución	Observaciones
Complementaria	
Dextrosa 30 g/L	Color intenso amarillo con casi nula esporulación verde y un poco de crecimiento blanco por encima del sustrato
Dextrosa 20 g/L	Hubo crecimiento micelial más abundante que en los casos posteriores, si existió la pigmentación amarilla sin esporulación.
Dextrosa 10 g/L	Menos crecimiento que en el caso de 20 g/L si hubo pigmentación amarilla intensa

En la figura 3.17 se observa que prácticamente todos los matraces eran parecidos en color, crecimiento y la poca o nula esporulación que tenían.



Figura 3.17. Matraces con estigmas variando la concentración de dextrosa, 30 g/L (izquierda), 20 g/L (centro) y 10 g/L (derecha).

b) Trigo

El trigo fue otro de los medios naturales en los que se probó la variación de concentración de dextrosa, obteniéndose la tabla 3.8 en donde se anotaron los resultados de esta prueba.

Tabla 3.8. Resultados de la variación de concentraciones de dextrosa en trigo.

Solución	Observaciones
Complementaria	
Dextrosa 30 g/L	Color intenso amarillo con esporulación verde y un poco de crecimiento blanco por encima del sustrato
Dextrosa 20 g/L	Color amarillo brillante, sin esporulación.
Dextrosa 10 g/L	Pigmentación amarilla intensa, sin esporulación de ningún tipo.

Los matraces con concentraciones de 20 y 10 g/L tuvieron un crecimiento uniforme del hongo, nula esporulación y dieron un color brillante amarillo como el que se da en el medio sintético. Figura 3.18.



Figura 3.18. Trigo con crecimiento uniforme del H-87 sin esporulación (izquierda), matraz con dextrosa 10 g/L visto por la parte inferior (derecha).

3.2 Extracción y purificación del pigmento obtenido

La extracción se realizó en todos los matraces que presentaron coloración, incluso aquellos que tenían presencia de esporas verdes que ensuciaban el color. Al agregar la solución de extracción se observó que el color de las esporas se difuminaba y se integraba a la solución completamente, cambiándola de color a uno más opaco. Sin embargo la centrifugación ayudó a la sedimentación de impurezas y aquellas esporas que impartían el color opaco al extracto.

También hubo casos como el del trigo en donde se variaron las concentraciones de la solución complementaria y el color obtenido de la filtración tenía un mínimo de contaminación visual, figura 3.19.

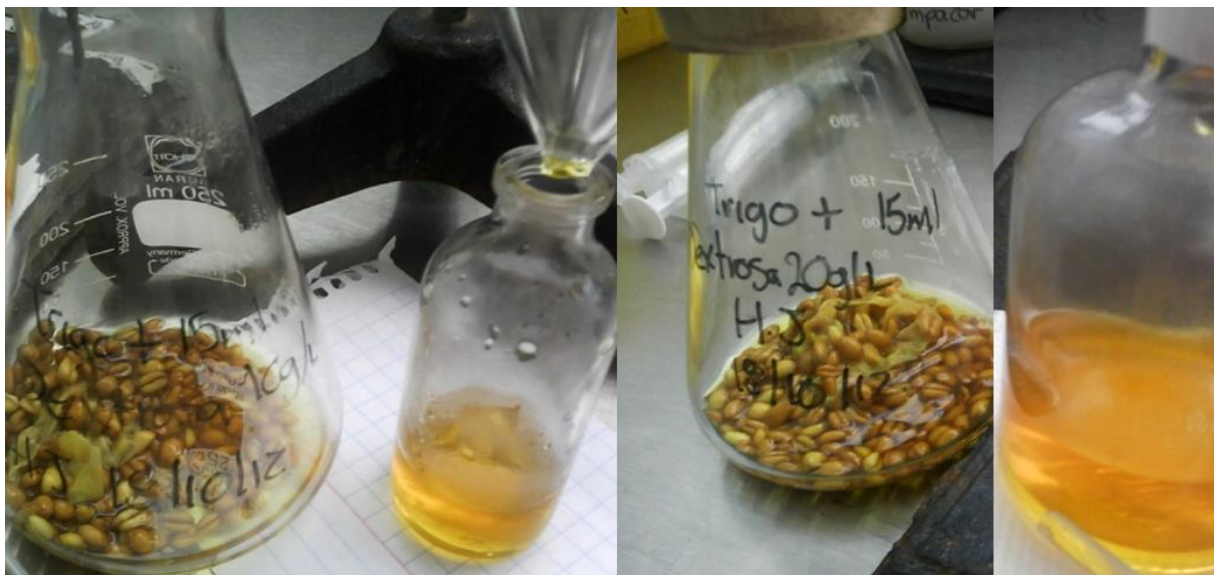


Figura 3.19. Filtración del pigmento obtenido en trigo con: dextrosa 10 g/L (izquierda) y dextrosa 20 g/L (derecha), ambas soluciones claras y brillantes.

Para el caso del arroz se obtuvieron los filtrados de la figura 3.20, en la centrifugación de estas soluciones se observó que no solo las esporas sedimentaban, sino que también sedimentaba el color junto con trozos de arroz muy pequeños. Como se puede apreciar los filtrados son opacos y carentes de color intenso, incluso el filtrado de arroz integral es opaco casi de color café.



Figura 3.20 Filtrados del arroz blanco (izquierda y centro) y arroz integral (derecha).

En el caso de los estigmas de maíz, también las esporas que se presentaron sedimentaron dejando un color limpio, ya que no existió una fragmentación del material por causa del microorganismo o la humedad. Se puede observar que no son colores tan brillantes como los obtenidos con el trigo pero si tienen el color característico del hongo en medio sintético, figura 3.21.



Figura 3.21. Filtrados de los estigmas del maíz con diferentes soluciones complementarias

Los pigmentos que presentaron visualmente un color aceptable fueron los de la figura 3.22, trigo y dextrosa 30 g/L y estigmas de maíz con dextrosa 10 g/L, se aprecia un color amarillo más intenso que los anteriores y este es parecido entre ellos.



Figura 3.22. Pigmentos extraídos de trigo y dextrosa 30 g/L (izquierda) y estigmas de maíz y dextrosa 10 g/L (derecha).

3.3 Análisis de los pigmentos extraídos por espectrofotometría VIS

Fue necesario tener un estándar purificado de pigmento obtenido del hongo H-87, el cual fue sembrado en medio Czapek sólido. Este estándar tiene un espectro que se muestra en la figura 3.23, con una banda máxima entre 380 y 440nm de longitud de onda, correspondiente a la zona VIS de los colores amarillos, sin embargo aún presenta un poco de interferencia en la zona UV. Este espectro es el comparativo para los pigmentos obtenidos en medios naturales.

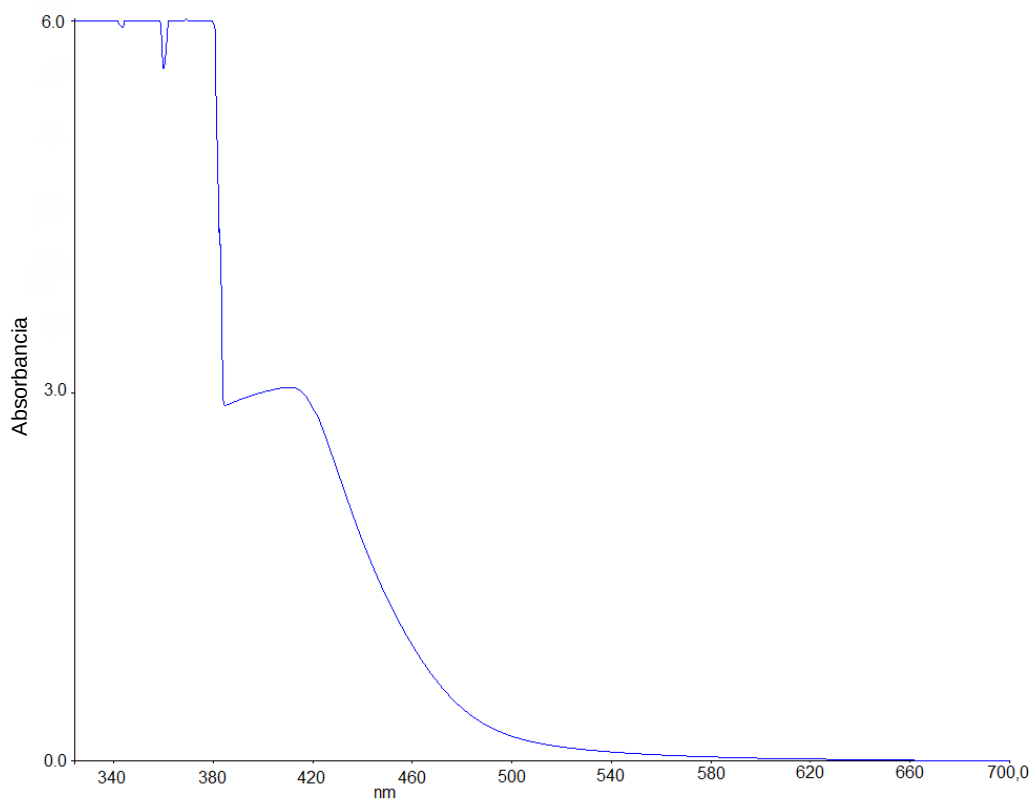


Figura 3.23. Espectro del pigmento amarillo purificado (estándar), sembrado en medio Czapek sólido (Santana-Lara, 2012).

a) Análisis de los extractos

Algunos extractos a simple vista parecían estar en las tonalidades amarillas, sin embargo fue necesario analizarlos en el espectrofotómetro para determinar si pertenecían a la región VIS de los colores amarillos.

En la figura 3.24 se muestran los espectros de los pigmentos adicionados con medio Czapek: hoja, olote y estigma de maíz. En esta gráfica podemos observar que para el caso del pigmento obtenido en olote de maíz y medio Czapek, la banda máxima se encuentra aproximadamente entre 380 y 420 nm de longitud de onda, en la región VIS de los colores amarillos y una interferencia de impurezas en la región UV. Para el caso de la hoja y el estigma de maíz con medio Czapek no hay una banda formada por lo que no se obtuvieron resultados favorables

en la región de amarillos y se descartan como buen medio de cultivo para la siembra de hongos generadores de pigmentos.

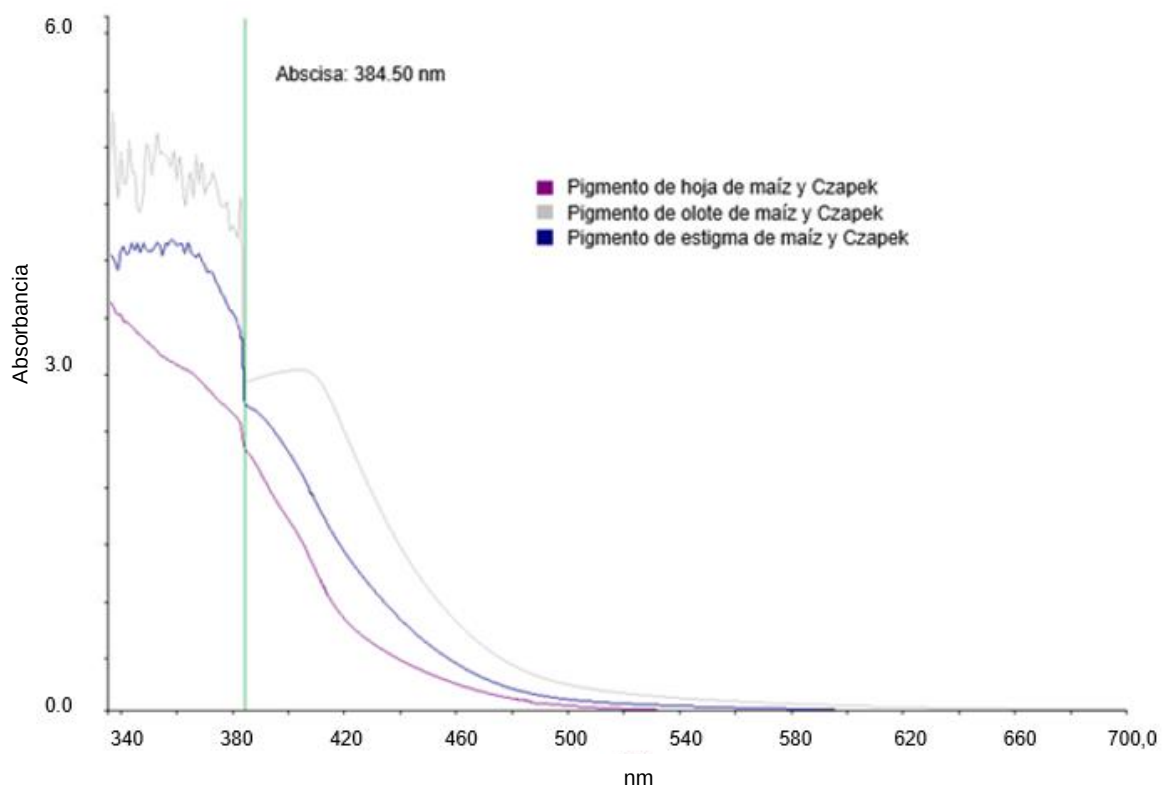


Figura 3.24 Espectros UV-VIS de la muestras de pigmento amarillo secretadas en hojas, olote y estigma de maíz con medio Czapek.

En la figura 3.25 se observan los espectros de pigmentos obtenidos de: trigo con dextrosa y medio Czapek, estigma de maíz con dextrosa, arroz integral con agua y tallo de maíz con medio Czapek. En este caso para el pigmento de trigo con dextrosa se presenta una banda entre 380 y 430 nm en la zona VIS de los colores amarillos, aunque si existe interferencia de las impureza que aún lleva el pigmento reflejado en la región UV.

En las gráficas del trigo con Czapek y estigmas de maíz con dextrosa, se puede observar que la banda máxima se presenta entre 380 y 440 nm de longitud de onda, correspondiendo a la zona VIS de amarillos, sin embargo es más notoria la interferencia de impurezas.

Para los espectros del pigmento obtenido de arroz integral con agua y caña de azúcar con medio Czapek no se formó una campana, por lo que no se consideraron buenos medios de cultivo para la siembra de hongos productores de pigmentos.

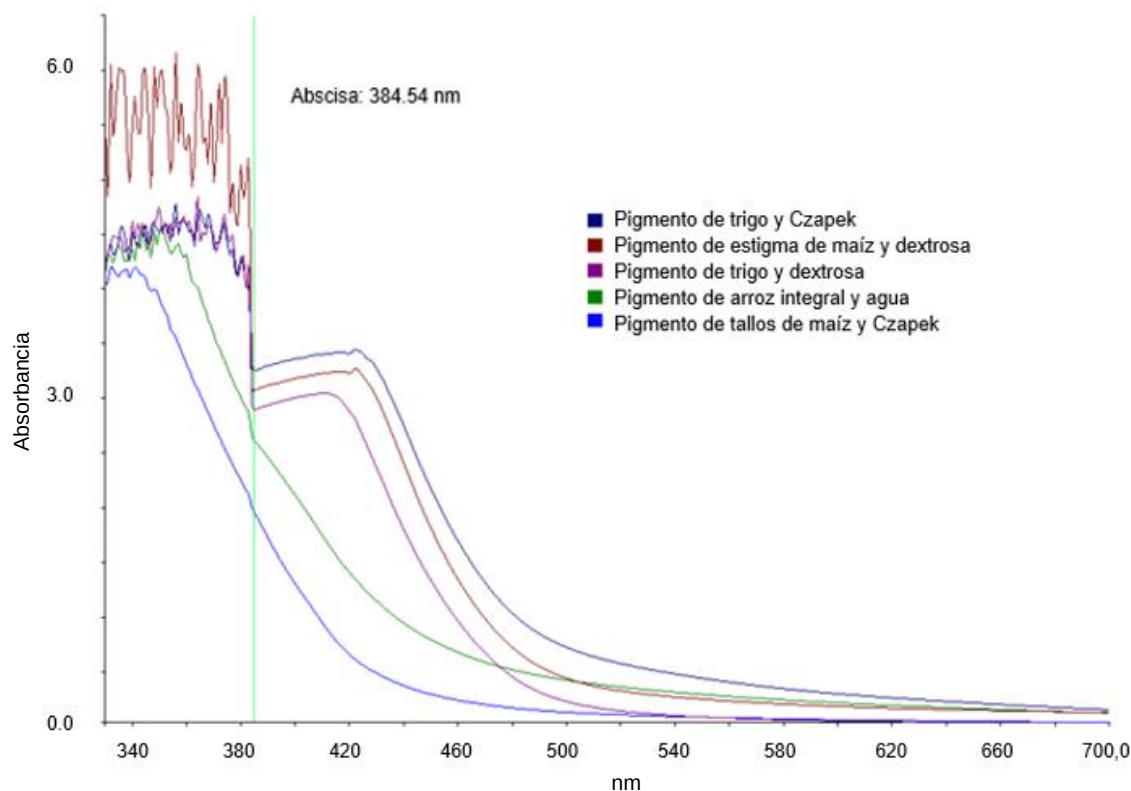


Figura 3.25 Espectros UV-VIS de la muestras de pigmento amarillo secretadas en trigo con medio Czapek, trigo con dextrosa, estigma de maíz con dextrosa, arroz integral con agua y tallos de maíz con medio Czapek.

Para la prueba con diferentes concentraciones de dextrosa en trigo y estigmas de maíz se obtuvieron los siguientes espectros:

- Variación de la concentración de dextrosa en estigmas de maíz, figura 3.26, se aprecia que las curvas de 30 y 20 g/L son las que tienen una mejor definición y la banda máxima se encuentra entre 380 y 430 nm de longitud de onda aproximadamente, mientras que la de 10 g/L presenta una banda máxima entre 380 y 440 nm perteneciente a la zona VIS de colores amarillos, aunque esta presentó unos ligeros saltos en la campana por las impurezas retenidas.

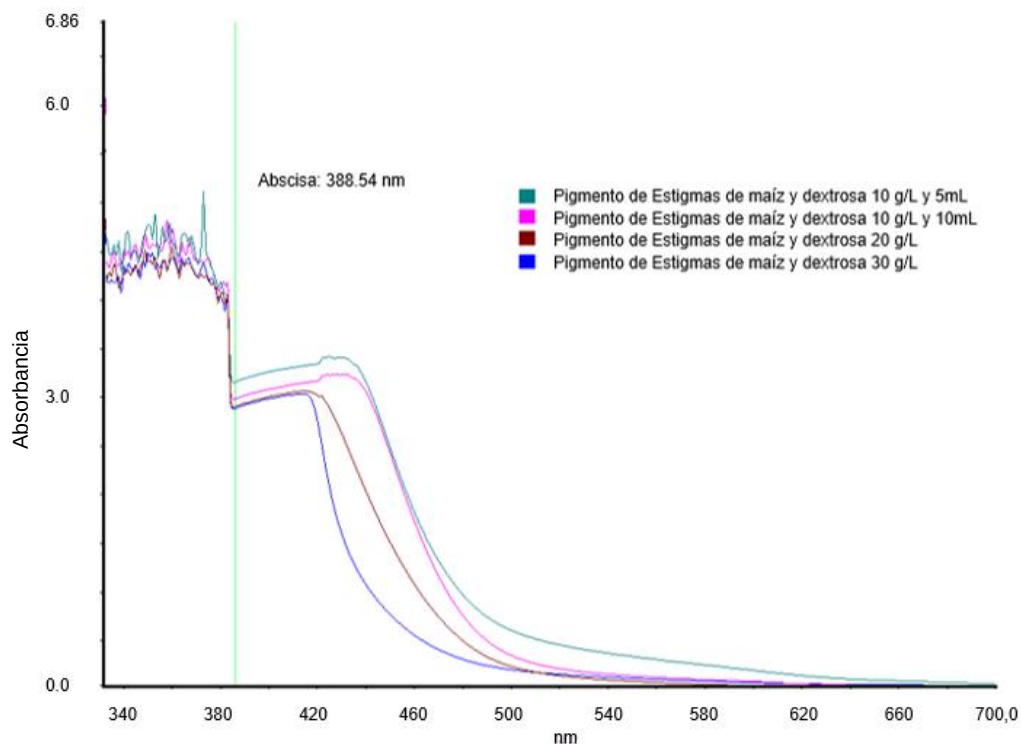


Figura 3.26. Espectros de las soluciones amarillas extraídas de estigmas de maíz y diferentes concentraciones de dextrosa.

- Variación de la concentración de dextrosa en trigo, figura 3.27. En esta figura se observa que todas las curvas tuvieron señales en la zona UV del espectro y presentaron una banda máxima entre 380 y 430 nm de longitud de onda, pertenecientes a la zona VIS de los colores amarillos.

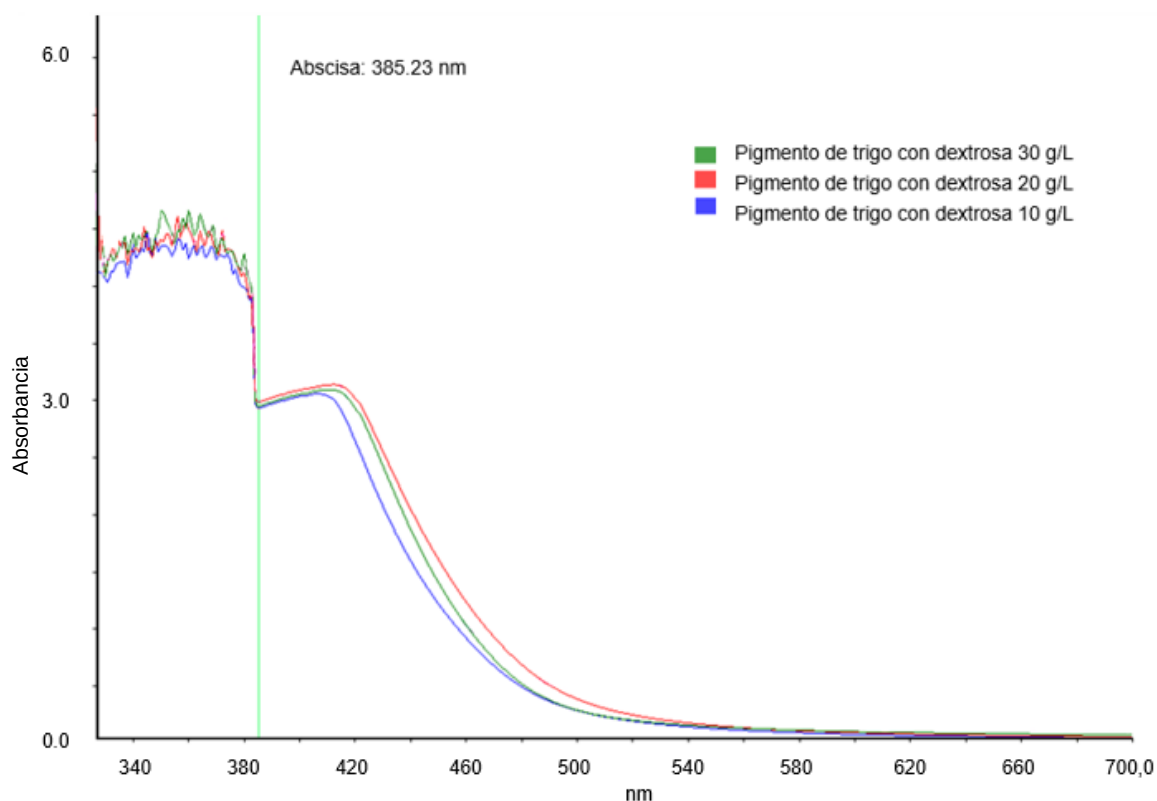


Figura 3.27. Espectros de las soluciones amarillas extraídas de trigo y diferentes concentraciones de dextrosa.

b) Análisis del extracto puro.

Se escogió de manera visual el pigmento de trigo y dextrosa 20 g/L para purificarlo. La gráfica de los espectros obtenidos se encuentra en la figura 3.28 en donde podemos observar la curva del pigmento sin ningún tratamiento posterior a la centrifugación con una banda máxima entre 380 y 430 nm de longitud de onda y la curva después de la purificación con la columna de sílica con una banda máxima entre 380 y 410 nm, ambos en la zona VIS de los colores amarillos.

Se puede apreciar que la curva del pigmento purificado tiene menos interferencia en el rango UV del espectro y su banda máxima se presenta antes que la del pigmento no purificado.

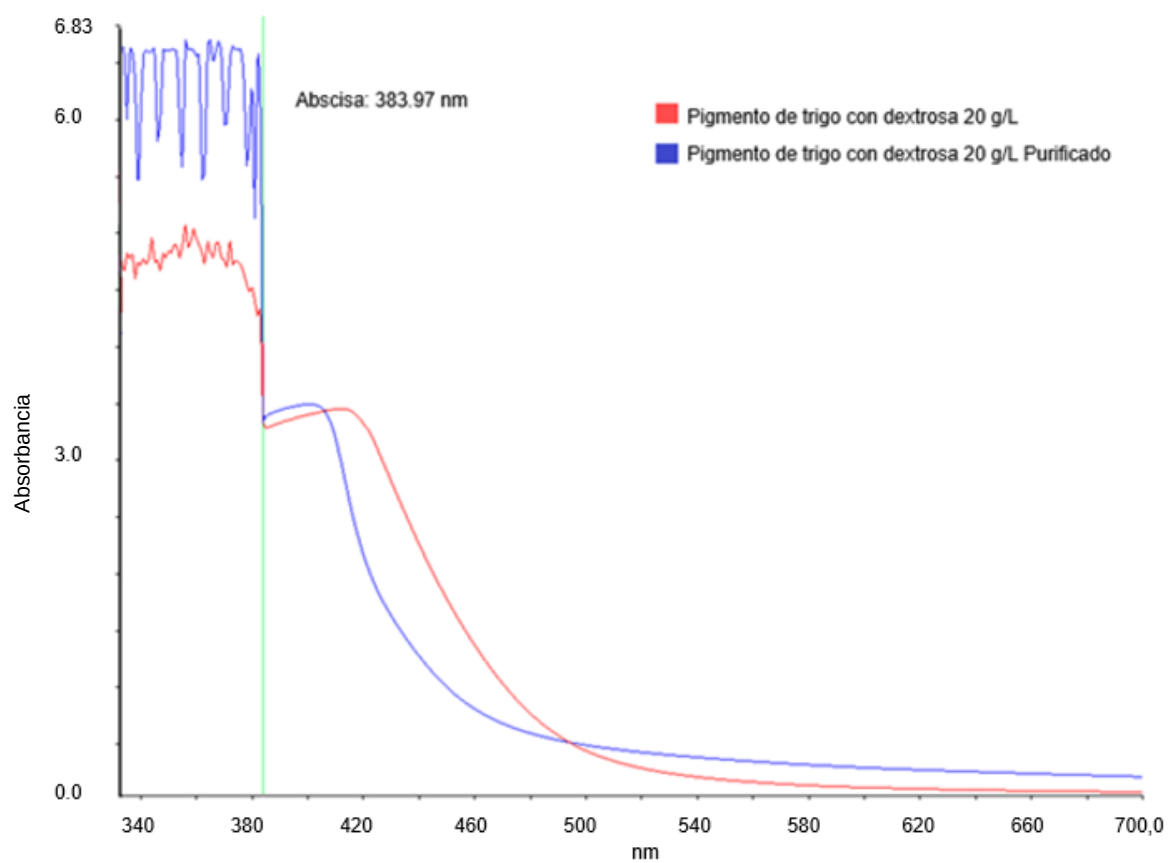


Figura 3.28. Espectro de la solución amarilla extraída de trigo con dextrosa 20 g/L sin tratamiento y espectro de la misma solución ya tratada en columna de sílica.

CONCLUSIONES

No fue posible hacer que el hongo H-29 generara el pigmento rojo original en los medios de cultivo sintéticos, ni naturales. Esto debido a que probablemente la cepa mutó por los pases de siembra excesivos o a la exposición de la misma a condiciones ambientales estresantes. Por lo que no se continuó con la experimentación del hongo H-29.

En todos los residuos industriales usados como medios de cultivo para el hongo H-87 se observó crecimiento, pero no en todos los medios de cultivo se produjo el pigmento amarillo, esto se debió probablemente a falta de una fuente de nitrógeno accesible en el medio para que el hongo pudiera secretar el pigmento.

El hongo generó esporas verdes en respuesta a factores de estrés como pueden ser: falta de humedad, falta o exceso de nutrientes o por el tiempo de incubación (por envejecimiento).

Aunque se observó visualmente que con el arroz las soluciones complementarias dieron resultados suficientes, al tratar los granos, estos se trocearon y al centrifugarlo, las partículas de arroz sedimentaron arrastrando consigo el color del filtrado obteniéndose una solución pálida. De igual manera para el caso del arroz integral con agua no se obtuvo un buen resultado en la solución filtrada, ya que resultó ser de color café.

En el caso del maíz, las hojas, el tallo y el olote junto con las 3 soluciones complementarias tuvieron buen crecimiento pero esporularon demasiado, ensuciando el color dentro del matraz. Al centrifugar se observó que el color amarillo no fue significativo, obteniéndose una cantidad considerable de esporas sedimentadas. Para el caso de los estigmas de maíz con medio Czapek y estigmas de maíz con agua, no se tuvo una solución amarilla consistente y la esporulación fue abundante. Sin embargo, los estigmas de maíz con la solución de dextrosa dieron mejores resultados, la solución extraída era amarilla brillante y no se presentó la esporulación. Esta apreciación visual se corroboró con el espectro que dio una curva presente en la zona VIS de colores amarillos.

Para el caso del trigo, no fue suficiente adicionarle únicamente agua para obtener un pigmento adecuado, ya que se presentó mucha esporulación. No obstante en el caso de trigo con medio Czapek y trigo con dextrosa, se obtuvieron pigmentos amarillos brillantes e intensos. Aunque

fue positivo el resultado para ambos, el objetivo del trabajo fue determinar un medio de cultivo que con condiciones mínimas diera resultados favorables en el crecimiento de un hongo y su secreción de pigmento; por lo que se descartó el medio Czapek como solución complementaria debido a que implica un gasto mayor. De esta manera la dextrosa fungió como aditivo mínimo en conjunto con el residuo agroindustrial para obtener los resultados buscados.

Así fue como se realizó la variación de la concentración de dextrosa en los dos residuos agroindustriales más adecuados para la producción del pigmento: trigo y estigmas de maíz. En los espectros de los extractos sin purificar, se puede observar que las curvas del trigo no presentaron interferencias en la zona VIS a comparación de los estigmas de maíz pues en estos la interferencia de nutrientes no consumidos por el hongo es más notoria.

En los espectros del trigo y la variación de dextrosa se nota que no existe diferencia significativa entre cada curva (30, 20 y 10 g/L), todas tienen una banda entre 380 y 430 nm de longitud de onda, valores que se encuentran en el rango VIS de los amarillos; aunque la curva de 10 g/L es la que tiene menor interferencia de todas las demás, debiéndose probablemente a que se consume la mayoría de la glucosa agregada al trigo.

En los espectros del extracto puro es notorio que la banda máxima se presenta antes, esto debido a que gracias a la columna de sílica hay menos impurezas en el pigmento.

Adicionalmente se vio una importante reducción, en la incubación del hongo productor de pigmentos en residuos agroindustriales, de 9 a 3 días, de lo reportado en experimentos previos. Lo que ayuda a reducir los tiempos de incubación y por lo tanto de obtención de pigmentos que da como resultado un ahorro monetario.

RECOMENDACIONES

Se recomienda implementar el sistema “lote semilla” para mantener viables las cepas de los hongos. Realizando de la cepa original 5 pases y conservarlos en tubo inclinado cubierto se aceite mineral estéril. De cada tubo se puede resembrar como máximo 4 veces más, siempre y cuando se mantengan las condiciones de color de los hongos.

FUENTES DE CONSULTA

Arándiga G. & Díaz S. (2008). Estudio del licopeno del tomate como colorante natural desde la perspectiva analítica e industrial.

Badui Dergal S. (2006). Química de los alimentos. 4ta Edición. Editorial Pearson Educación.

Barrios González J. (2005). Secondary metabolites production by solid state fermentation. Review article, Malaysian Journal of Microbiology, Vol. 1, Año1.

Betchold T. & Mussak R. (2009). Handbook of natural colorants. Editorial Wiley, Austria.

Calderón M. R. (2007). Extracción y caracterización fisicoquímica del extracto colorante de la corteza de aliso común (*alnus jorullensis humboldt, bonpland kunth*), proveniente de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala. Tesis de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, Guatemala.

Cardona E. (2006). Extracción del carotenoide licopeno del tomate chonto (*lycopersicum esculentum*). Colombia.

Chávez D. R. (2008). Factibilidad técnica para el aprovechamiento integral del camarón de la especie *Penaeus Vannamei*.

Chávez-Islas E. J. (2018). Identificación de especies carotenoides en un pigmento natural secretado por un hongo filamentoso. Tesis de licenciatura del Instituto Tecnológico de Toluca.

Cortés S. A, Mosqueda O. T. (2013) Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. Artículo de revista química viva vol.12 núm 2, pp 64-90.

Cruz R. M. (1998). Extracción de pigmento a partir de residuos de los crustáceos mediante el enpleo de aceite de pescado. Proyecto de investigación de la Universidad Autónoma Metropolitana.

De Dios C. (2002). Extracción de pigmentos de residuos de cangrejo azul (*Canellectes sapidus*) fermentados y no fermentados. Tesis de maestría en biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Domínguez A. R. (2007). Comparación de la producción de pigmentos carotenoides por *Haematococcus pluvialis* y *Phaffia rhodozyma*. Tesis de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Duran N. (2002). Ecological-friendly pigments from fungi. Critical review in food science and nutrition. Vol. 42.

Franco M. E. (2010). Extracción de Astaxantina a partir de residuos de camarón ensilados por métodos ácido y bacteriano. Tesis de doctorado en biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Gódia F. (1998). Ingeniería Bioquímica. Editorial Síntesis. México. Pp. 400-534.

Hajjaj, H.; Blanc, P.; Groussac, E.; Uribe Larrea, J.; Goma, G. And Loubiere, P. (2000). Kinetic analysis and red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. Enzyme microbiol and technol Vol. 27.

Hendry, G. A. F. y Houghton, J. D. (1996). Natural food colorants. Editorial AVI. Londres, Inglaterra. pp. 1-141.

Hernández A. O. A. (2011). Evaluación de la toxicidad en cuerpos de agua de un pigmento rojo producido por un hongo filamentoso. Tesis de maestría del Instituto Tecnológico de Toluca.

Hugles, C. (1984). Guía de aditivos. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. P. 69.

Jarén M. (2007). Patente de invención: Procedimiento de obtención de melaninas y sus aplicaciones. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Madrid, España.

Méndez A., Contreras J. C., Lara F., Rodríguez R. y Aguilar C. N. (2007). Producción fúngica de un pigmento rojo empleando la cepa Xerofilica *penicillium purpurogenum* gh-2. Revista mexicana de ingeniería química vol. 6, no. 3.

Monzón A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Revista: Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63.

Morales E. (2001). Crecimiento, producción de pigmentos y expolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena SP PCC7120* en función del pH y CO₂. Revista Interciencia, Vol. 27 No. 007, Venezuela.

Ogunnariwo J, Hamilton. J. M. (1975). Brown and red pigmented *Pseudomonas aeruginosa* differentiation between melanin and pyorubrin.

Reyes G., Franco M. (2006). Producción biotecnológica de sabores, pigmentos y aromas a partir de hongos miceliales y levaduras. Revista de la Facultad de Ciencias, Vol. 11, N° 2. Bogotá Colombia.

Rodríguez R. (1996). Caracterización de cepas del hongo comestible *pleurotos sp.* en medios de cultivo y su evaluación en sustratos lignocelulosicos forrajeros para la producción de carpóforos. Tesis de maestría de la Universidad de Nuevo León.

Rodríguez M. C. (2009). El color en los alimentos. Revista electrónica Eroski Consumer. Consultada 23 noviembre de 2012.

Salaverry O. (1998). Pigmentos naturales quinónicos. Fondo Editorial UNMSM. Perú.

Sanjurjo G. J. A. (2015). Purificación y caracterización de dos pigmentos naturales obtenidos a partir de hongos filamentosos. Tesis de licenciatura del Instituto Tecnológico de Toluca.

Santana-Fonseca Y. (2018). Obtención de un pigmento rojo natural secretado por un hongo bajo condiciones controladas de carbono y nitrógeno orgánico. Tesis de licenciatura del Instituto Tecnológico de Toluca.

Santana-Fonseca Y. (2012). Determinación de un medio de cultivo líquido para la obtención de un pigmento rojo natural a partir de un hongo filamentoso. Informe de Residencia del Instituto Tecnológico de Toluca.

Santana-Lara E. (2013). Efecto de la composición del medio de cultivo en la producción de un pigmento amarillo secretado por un hongo filamentoso. Tesis de licenciatura del Instituto Tecnológico de Toluca.

Silveira Silvana T., Daroit Daniel J., Brandelli Adriano. (2007). Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. Revista Science direct. No. 41. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Schlegel G. (1997). Microbiología General. Ediciones Omega, Barcelona España. Pp 85-89.

Stintzing, F.C., Herbach, K.M., Mosshammer, M.R. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia sp.*) clones. Journal of Agricultural and Food Chemistry, No.53, 442–451.

Underwood A. L., Day R. A. Jr. (1989). Química Analítica Cuantitativa. 5ta Edición. Editorial Pearson, pp 459-471.

Urán M. E. (2008). Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. Revista Asociación Colombiana de Infectología, Año 12, Vol 2.

Velázquez A. M., Benavente V. J., Morlett C. J., Aguilar G. C. (2016). Producción de pigmentos por *Monascus spp.* En medio sólido empleando residuos agroindustriales. Investigación y ciencia vol. 24, núm 69, septiembre-diciembre. Pp 89-95.

Yoshiko S. (1996). Colorantes Naturales. Biblioteca Nacional de Antropología e Historia, México. Pp 323-340.