

Universidad Autónoma de Coahuila

Facultad de Ciencias Químicas



“Producción de pigmentos fúngicos (*Monascus purpureus* CECT2955) a partir del residuo agroindustrial de *Aloe vera*”

Por

Ing. María Elena Velázquez Arellano

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Saltillo, Coahuila

Febrero de 2017

Autor: María Elena Velázquez Arellano



EL PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COAHUILA A TRAVÉS DEL COMITÉ DE TESIS HACE CONSTAR QUE LA TESIS TITULADA:

“PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS FÚNGICOS (*Monascus purpureus* CECT2955) A PARTIR DEL RESIDUO AGROINDUSTRIAL DE *Aloe vera*”

Que presenta:

Ing. María Elena Velázquez Arellano

Ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

El presente trabajo ha sido dirigido por el siguiente comité:

Dr. Jesús Antonio Morlett Chávez
Director (UAdeC)

Dr. Julio César Montañez Sáenz
Co-director (UAdeC)

Julio C. Montañez S.

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Asesor (UAdeC)

Dra. Solange Inés Mussatto Dragone
Asesor (TU-Delft)

M.C. Alejandro Méndez Zavala
Asesor (UAdeC)



RESUMEN

La producción de pigmentos por diferentes cepas de *Monascus* se ha llevado a cabo en fermentación sólida y fermentación sumergida en diversos residuos agroindustriales, los cuales tienen múltiples aplicaciones en la industria de alimentos, cosmética, farmacéutica y textil. En esta investigación se evaluó el uso de cáscara de *Aloe vera* como sustrato para la producción de pigmentos rojos, amarillos y anaranjados por *Monascus purpureus* CECT2955 en fermentación líquida y sólida. Se evaluó la viabilidad de las cáscaras de *Aloe vera* bajo un pre-tratamiento (hidrólisis ácida) como un sustrato alternativo. Se evaluaron diferentes concentraciones de H_2SO_4 (0.5, 1.0 y 1.5 % v/v) a diferentes tiempos (30, 60 y 90 min) como tratamientos de hidrólisis en dos tipos de cultivo enriquecido (adición de sales) y mínimos (sin sales) a nivel matraz. De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que la mayor producción de pigmentos rojos y amarillos (8.19 ± 0.20 UA_{495nm} y 6.32 ± 0.84 UA_{410nm} respectivamente) se obtuvieron empleando hidrolizado (condiciones de hidrólisis: 0.5 % de H_2SO_4 por 90 min) con la adición de sales. Posteriormente, se evaluó el efecto del tipo de inóculo (esporas y micelio) sobre la producción de pigmentos por *Monascus purpureus* empleando hidrolizados de *Aloe vera* y se optimizaron las condiciones de preparación del inóculo previamente seleccionado para maximizar la producción de pigmentos por *Monascus purpureus* en cultivo sumergido empleando hidrolizados de *Aloe vera* como sustrato. Se llevó a cabo una fermentación a nivel matraz por 7 d, 30 °C y 150 rpm empleando esporas de 5 d y micelio de 3 d como inóculo,



teniendo como respuesta la producción de biomasa y pigmentos (amarillos y rojos). De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que la mayor producción de pigmentos se obtuvo cuando se empleó micelio como inóculo, siendo esta producción mayor en un 41.17 y 27.08 % para pigmentos amarillos y rojos respectivamente en comparación con esporas como inóculo. Posteriormente, se optimizó la preparación del inóculo (micelio) empleando un arreglo ortogonal Taguchi L9 (3^4) evaluando cuatro factores a tres niveles (edad de esporas, concentración, agitación y tiempo de incubación) teniendo como respuesta la producción de pigmento rojo. La experimentación se llevó a cabo a nivel matraz por 7 días a 30°C de acuerdo al diseño experimental empleado. La edad de esporas resultó como el factor con mayor influencia sobre la producción de pigmentos. Las condiciones óptimas obtenidas fueron edad de esporas de 4 días, concentración de 1×10^4 esporas mL^{-1} , velocidad de agitación de 200 rpm y tiempo de incubación de 2 días. Mediante la optimización del inóculo de *Monascus purpureus* se logró incrementar la producción de pigmentos rojos en un 19.82% empleando hidrolizado de *Aloe vera* como medio de cultivo.

Una vez optimizada la preparación del inóculo, se procedió a optimizar las condiciones de producción de pigmentos por *Monascus purpureus* CECT2955 empleando hidrolizados de *Aloe vera* como sustrato en cultivo sumergido. Se utilizó un arreglo ortogonal de Taguchi L9 (3^4 , siendo los factores pH, tamaño de inóculo, agitación y fuente de nitrógeno) para maximizar la producción de pigmentos. Posteriormente, bajo las condiciones óptimas encontradas de producción de pigmentos, se evaluó la producción de pigmentos a nivel bioreactor de tanque agitado (2 L de volumen de trabajo). El pH y la agitación resultaron



ser los factores de mayor influencia en el proceso de producción de pigmentos por *Monascus purpureus* en fermentación sumergida. Bajo las condiciones óptimas encontradas, se logró incrementar la producción de pigmentos intracelulares entre un 67 y 75.1%; mientras que en pigmentos extracelulares se observó un aumento en un rango de 46-56%. A nivel reactor los niveles de rendimiento de pigmento fueron inferiores a lo obtenido a nivel matraz bajo las condiciones de cultivo optimizadas, por lo que es necesario realizar un estudio más detallado del proceso de escalamiento para la producción de pigmentos por *M. purpureus* empleando hidrolizados de *Aloe vera*.

Finalmente, se investigó la viabilidad de polvo deshidratado de la piel de *Aloe vera* como sustrato para la producción de pigmentos de *Monascus purpureus* CECT2955 en fermentación en estado sólido. Se utilizó un diseño de compuestos centrales 2^3 donde la mayor producción de pigmento rojo fue de 15.807 ± 1.31 OD_{495nm}, de naranja 15.040 ± 0.077 OD_{450nm} unidades de DO / gramo de sustrato fermentado utilizando 80 % de humedad durante toda la fermentación, pH 1 y una concentración de inóculo de 1×10^7 esporas /g, incubado a 30 ° C y un periodo de incubación de 336 h, la mayor producción de pigmento amarillo se observó a las 144 h con 25.740 ± 0.177 OD 410nm con una humedad del 80 %, pH 3 y una concentración de inóculo de 1×10^7 esporas / g de sustrato. Nuestros resultados indican la viabilidad del residuo de la piel del *Aloe vera* utilizando *M. purpureus* CECT2955 para aplicaciones industriales.

En esta investigación se lograron diseñar dos bioprocesos para la producción de pigmentos amarillos, anaranjados y naranjas empleando dos sistemas de fermentación (líquida y sólida) empleando como sustrato cáscara de *Aloe vera*, lo que evidencia el



potencial del uso de este tipo de residuos para la producción de metabolitos de interés como lo son los pigmentos naturales.



ABSTRACT

The production of pigments by different strains of *Monascus* has been carried out in solid fermentation and submerged fermentation in various agroindustrial residues, which have multiple applications in the food, cosmetic, pharmaceutical and textile industries. In this research the use of *Aloe vera* leaves as substrate for the production of red, yellow and orange pigments by *Monascus purpureus* CECT2955 in liquid and solid fermentation was evaluated. *Aloe vera* leaves were evaluated for viability under a pre-treatment (acid hydrolysis) as an alternative substrate. Different concentrations of H₂SO₄ (0.5, 1.0 and 1.5% v / v) were evaluated at different times (30, 60 and 90 min) as hydrolysis treatments in two types of enrichment media addition of salts and without salts. According to the results, it was observed that the highest production of red and yellow pigments (8.19 ± 0.20 UA_{495nm} and 6.32 ± 0.84 UA_{410nm} respectively) were obtained using hydrolyzate (hydrolysis conditions: 0.5% H₂SO₄ for 90 min) with the addition of salts. Subsequently, the effect of the inoculum type (spores and mycelium) on the production of pigments by *Monascus purpureus* CECT2955 using *Aloe vera* hydrolysates was evaluated and the conditions of preparation of the previously selected inoculum were optimized to maximize pigment production by *Monascus purpureus* CECT2955 in submerged culture using *Aloe vera* hydrolysates as substrate. Fermentation was carried out in flask for 7 d, 30 ° C and 150 rpm using 5 d spores and 3 d mycelium as inoculums, with the production of biomass and pigments (yellow and red) as a response. According to the results, it was observed that the highest production of pigments was obtained when mycelium was used as an



inoculum, with this production being higher in 41.17 and 27.08% for yellow and red pigments, respectively, compared to spores as inoculum. Subsequently, the preparation of the inoculum (mycelium) was optimized using an orthogonal Taguchi L9 (3^4) arrangement, evaluating four factors at three levels (spore age, concentration, agitation and incubation time) with red pigment production as a response. Experimentation was carried out at flask level for 7 days at 30 ° C according to the experimental design. Age of spores was the most influential factor in pigment production. The optimal conditions obtained were spores of 4 d, concentration of 1×10^4 spores mL^{-1} , agitation of 200 rpm and incubation time of 2 d. By optimizing the inoculum of *Monascus purpureus* CECT2955 it was possible to increase the production of red pigments by 19.82% using *Aloe vera* hydrolyzate as culture medium.

Once the inoculum preparation was optimized, the conditions of pigment production by *Monascus purpureus* CECT2955 were optimized using *Aloe vera* hydrolysates as substrate in submerged culture. An orthogonal arrangement of Taguchi L9 (3^4) with the factors of pH, inoculum size, agitation and nitrogen source, was used to maximize pigment production. Subsequently, under optimal conditions of pigment production, pigment production at the agitated tank bioreactor level (2 L working volume) was evaluated. The pH and agitation proved to be the most influential factors in the pigment production process by *Monascus purpureus* CECT2955 in submerged fermentation. Under the optimal conditions found, it was possible to increase the production of intracellular pigments between 67 and 75.1%; while in extracellular pigments an increase in a range of 46-56% was observed. At the reactor level pigment performance levels were lower than those obtained at the flask level under optimized culture conditions.



Finally, the viability of dehydrated skin powder of *Aloe vera* as substrate for the production of pigments of *Monascus purpureus* CECT2955 in solid state fermentation was investigated. A central compound design was used where the highest red pigment production was 15.807 ± 1.31 OD_{495nm}, orange 15.040 ± 0.077 OD_{450nm} OD units per gram of fermented substrate using 80% moisture, pH of 1.0 and inoculum concentration of 1×10^7 spores/g, incubated at 30 ° C for 336 h. The highest production of yellow pigment was observed at 144 h with 25.740 ± 0.177 OD_{410nm} with a humidity of 80%, pH 3 and an inoculum concentration of 1×10^7 spores / g substrate. These results indicate the viability of *Aloe vera* residue using *Monascus purpureus* CECT2955 for industrial applications.

In this research, two bioprocesses were designed for the production of yellow, orange and orange pigments using two fermentation systems (liquid and solid) using *Aloe vera* leaves substrate, which shows the potential of the use of this type of waste for the production of metabolites of interest such as natural pigments.