



**UNIVERSIDAD
DEL AZUAY**

**Facultad de Ciencia y Tecnología
Escuela de Ingeniería en Alimentos**

**Caracterización molecular y biotecnológica de levaduras
pigmentadas aisladas de quesos artesanales elaborados en
la parroquia Jima**

**Trabajo de grado previo a la obtención del título de
Ingeniera en Alimentos**

Autora: Nube Gardenia Rivera Rivera

Director: Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

Codirectora: Rosa Cecilia Palacios Ochoa

Cuenca, Ecuador

2019

DEDICATORIA

A mi familia. Siempre serán la razón de mis visiones.
Con todo mi ser, Nube.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece:

A la Universidad del Azuay por subvencionar una parte de la tesis. A la Dra. Cecilia Palacios, por facilitar a *Rhodotorula* de su proyecto 2017-106. Al Ing. Diego Montero por platicarme del proyecto de investigación y ser parte del proceso de este trabajo.

Al Dr. Rodrigo Caroca, quién con gran sapiencia ha sabido dirigir esta tesis.

A los profesionales: Dr. Piercosimo Tripaldi, Ing. Andrés Pérez, Dr. Cristian Rojas, Blgo. Edwin Zárate, Dra. Rebeca Webster, Ing. María Fernanda Rosales, Dr. Marco Lazo e Ing. Johanna Tacuri, por su tiempo, asesoría y apoyo.

Al personal técnico de los laboratorios y sus colaboradores, a las compañeras y compañeros tesisistas y a mis pasantes Josselyn Verdugo García, Cinthia Castro y Soraya Gallegos.

A la Señora Carmen Monge Espinosa y su distinguida familia, al Don Fernando Yanzaguay, Ing. Ximena Orellana e Ing. María Isabel Méndez Rojas, por brindarme un ambiente familiar durante mi preparación en esta Institución.

A los patrocinadores de este tercer nivel de educación: María Alba, Abdón y a mis hermanos: Estela, Rina, Abdón Mesías y de manera especial a: Gladys, Silvia y su esposo Luis Mesías y Marina.

Gracias a ti estoy aquí. Eres ese alguien que jamás quisiera lastimar. Gracias Dios en tus tres manifestaciones.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	vii
RESUMEN	viii
Palabras clave	viii
ABSTRACT.....	ix
Keywords	ix
INTRODUCCIÓN	1
Método molecular para identificar y caracterizar a las levaduras	2
Método basado en el análisis de la región ribosómica de las levaduras.....	2
PCR y electroforesis	3
Secuenciación.....	3
Género <i>Rhodotorula</i>	4
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4
Carotenoides	5
CAPÍTULO I.....	7
1 MATERIALES Y METODOLOGÍA	7
1.1 Obtención de las levaduras pigmentadas.....	7
1.1.1 Preparación de las cepas.....	7
1.1.2 Purificación de las levaduras pigmentadas.....	7
1.1.2.1 Método del antibiótico	7
1.1.2.2 Método de acidificación.....	7
1.2 Caracterización molecular.....	8
1.2.1 Extracción del ADN genómico (ADNg).....	8
1.2.2 Amplificación del ADNg.....	8
1.2.3 Verificación del producto de PCR en gel de electroforesis	9
1.2.4 Purificación del producto de PCR	9
1.2.5 Preparación de muestras para la secuenciación	9
1.2.6 Identificación del género y especie de las levaduras por el algoritmo BLAST	9
1.3 Producción y extracción de los carotenoides totales de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain DMic 144831	10
1.3.1 Tiempo de cultivo y producción de los carotenoides totales.....	10
1.3.2 Extracción de los carotenoides totales.....	11
1.3.3 Cuantificación de los carotenoides totales.....	11

1.4	Efecto de temperatura, luz solar y tiempo de almacenamiento de los carotenoides totales disueltos en etanol.....	12
CAPÍTULO II.....		14
2	RESULTADOS.....	14
2.1	Caracterización molecular.....	14
2.2	Producción y extracción de los carotenoides totales <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain DMic 144831	15
2.2.1	Tiempo de cultivo y producción de los carotenoides totales de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain DMic 144831.....	15
2.2.2	Extracción y cuantificación de los carotenoides totales	16
2.2.3	Efecto de diferente temperatura y tiempo en los carotenoides totales disueltos en etanol absoluto y 38 % de etanol con 30 % de sacarosa	18
CAPÍTULO III.....		21
3	DISCUSIÓN	21
3.1	Caracterización molecular.....	21
3.2	Optimización en la extracción de los carotenoides totales con solvente “verde”	21
3.3	Efecto de temperaturas altas, luz solar y congelación en los carotenoides totales en etanol.....	23
CAPÍTULO IV		24
CONCLUSIÓN		24
BIBLIOGRAFÍA		25
ANEXOS		29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curvas de proliferación de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain DMic 144831.....	15
Figura 2: Gráfica de Pareto de los efectos estandarizados.....	17
Figura 3: Gráfica Semi normal de los efectos estandarizados	17
Figura 4: Porcentaje de variación de los carotenoides totales disueltos en diferentes condiciones y concentraciones de etanol y evaluación bajo luz solar, a temperatura ambiente y - 20 ° C	20
Figura 5: Amplificación del ADNr en gel de electroforesis.....	31
Figura 6: Purificación de PCR en gel de electroforesis	32
Figura 7: Primera y segunda extracción (I y II Ext.) de carotenoides totales con etanol absoluto frío después del proceso osmosis con NaCl.....	32
Figura 8: Muestra de los carotenoides totales en etanol absoluto y en 38 % de etanol con 30 % de sacarosa para evaluar bajo las condiciones de luz solar, a temperatura ambiente y - 20 ° C	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diseño factorial.....	11
Tabla 2: Carotenoides totales en etanol expuesto a diferente temperatura, tiempo, luz solar y - 20 ° C	13
Tabla 3: Identificación molecular de las levaduras pigmentadas y resistencia a la prueba del antibiótico y la acidez.	14
Tabla 4: Diseño factorial y rendimiento de la extracción de los carotenoides totales.....	16
Tabla 5: Ajuste factorial: Carotenoides vs. A; B.....	17
Tabla 6: Resumen del análisis de la varianza.....	17
Tabla 7: Evaluación de los carotenoides totales en etanol absoluto expuesto a diferentes temperaturas y tiempos.....	18
Tabla 8: Evaluación de los carotenoides totales en etanol absoluto y a 38 % de etanol con 30 % de sacarosa expuesto a la luz solar, a temperatura ambiente y - 20 ° C.....	19

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Parroquia Jima	29
Anexo 2: Proyecto 2017-106.....	29
Anexo 3: Método de extracción del ADNg por el kit de MO BIOMétodo de extracción del ADNg por el kit de MO BIO.....	30
Anexo 4: Amplificación del ADNr en gel de electroforesis.....	31
Anexo 5: Purificación del producto de PCR en gel de electroforesis	32
Anexo 6: Primera y segunda extracción (I y II Ext.) de carotenoides totales con etanol absoluto frío después del proceso osmosis con NaCl.....	32
Anexo 7: Muestras de los carotenoides totales en etanol absoluto y en 38 % de etanol con 30 % de sacarosa para evaluar bajo las condiciones de luz solar, a temperatura ambiente y - 20 ° C	33
Anexo 8: Medio de Agua de Sales (SW).....	33

Caracterización molecular y biotecnológica de levaduras pigmentadas aisladas de quesos artesanales elaborados en la parroquia Jima

RESUMEN

Levaduras aisladas de quesos de la parroquia Jima de la provincia del Azuay, se caracterizaron por secuenciación de la región 5.8S-ITS; tres se identificaron como *Rhodotorula mucilaginosa* y una como *Rhodotorula sp.* A partir de una cepa seleccionada se extrajo los carotenoides totales aplicando un diseño factorial 2². La mejor extracción se produjo con 15 % de NaCl y etanol absoluto frío. Al evaluar la estabilidad de los carotenoides expuestos a – 20 ° C por 96 horas, en 38 % de etanol con 30 % de sacarosa incrementaron 2,50%, mientras que, en etanol absoluto aumentaron 6,84% y, a 72 ° C por 30 segundos, en etanol absoluto se perdió 2,66%. Estos pigmentos naturales podrían ser aplicados en alimentos procesados.

Palabras clave: Región 5.8S-ITS, *Rhodotorula mucilaginosa*, carotenoides, queso, cepa



Ing. Ma. Fernanda Rosales Medina, MSc.
Coordinadora de la Escuela de Ingeniería
en Alimentos



Ing. Rodrigo Caroca Cáceres, PhD
Director de Tesis



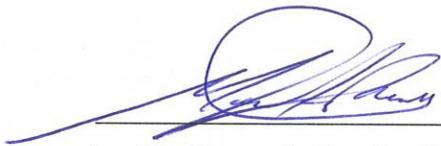
Nube Rivera Rivera
Autora

Molecular and biotechnological characterization of pigmented yeasts isolated from artisanal cheeses made in the Jima parish

ABSTRACT

The isolated yeasts of cheeses from the Jima parish of the Azuay province were characterized by sequencing the 5.8S-ITS region. Three were identified as *Rhodotorula mucilaginosa* and one as *Rhodotorula sp.* From a selected strain, the total carotenoids were extracted by applying a 2² factorial design. The best extraction occurred with 15% NaCl and cold absolute ethanol. When evaluating the stability of carotenoids exposed at -20°C for 96 hours, they increased 2.50% in 38% ethanol with 30% sucrose, while in absolute ethanol they increased 6.84%. A 2.66% was lost at 72°C for 30 seconds in absolute ethanol. These natural pigments could be applied in processed foods.

Keywords: 5.8S-ITS region, *Rhodotorula mucilaginosa*, carotenoids, cheese, strain.



Ing. Ma. Fernanda Rosales Medina, MSc.
Food Engineering Faculty Coordinator



Ing. Rodrigo Caroca Cáceres, PhD.
Thesis Director



Nube Rivera Rivera
Author

Nube Gardenia Rivera Rivera

Trabajo de graduación

Rodrigo Caroca Cáceres / Cecilia Palacios Ochoa

Septiembre, 2019

Caracterización molecular y biotecnológica de levaduras pigmentadas aisladas de quesos artesanales elaborados en la parroquia Jima

INTRODUCCIÓN

La aplicación de levaduras y productos derivados de levaduras por parte de la industria alimentaria continúa siendo un área de rápido crecimiento. Los metabolitos de las levaduras han sido reconocidos como potenciales nutraceuticos, dando impulso a la investigación en este campo. Los metabolitos, particularmente los carotenoides, se aprovechan como fuentes de colorantes, vitaminas, aditivo para piensos de animales y, por su capacidad antioxidante como suplemento alimentario, por ser considerados promotores de la salud humana (Nagarajan y colaboradores, 2014).

Los carotenoides evitan enfermedades, como las cardiovasculares, varios tipos de cáncer y neurológicas, así como trastornos fotosensibles o relacionados con los ojos (Fiedor y Burda, 2014).

La popularización de los carotenoides por sus ventajas bioactivas, ha llevado a emplear la ingeniería genética y las tecnologías emergentes para optimizar la producción y extraer el pigmento de diversos microorganismos en varios países de primer mundo. Estos carotenoides se emplearon ampliamente en la Unión Europea, los Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda y otros países como aditivo alimentario, lo que hizo que reportara un mercado global de \$1.5 mil millones en el 2017 y se espera una tasa de crecimiento anual de 5,7% hasta el 2022, para alcanzar los \$2.0 mil millones (Andrew, 2018).

Según, Nagarajan y colaboradores (2014), en un futuro carotenogénico (los carotenoides entrarán "en boga" por efectos positivos en la salud humana debido a su capacidad antioxidante) las cepas *Rhodotorula* jugaran un papel importante ya que son consideradas "levaduras rojas" (por la producción de pigmentos; carotenoides que están en la sangre y tejidos humanos como la luteína por ejemplo y, *Rhodotorula* es una excelente productora de este pigmento), además presentan ventajas competitivas como un ciclo de producción corto,

un uso respetuoso con el medio ambiente y la facilidad de manipular la producción mediante fermentadores diseñados.

Este trabajo se enfocó en contribuir con datos verificables, confiables y aplicables para impulsar el macroproyecto 2017-106, denominado “Selección de bacterias autóctonas con beneficios potenciales a partir de lácteos artesanales de la parroquia Jima” (anexo 1 y 2). El macroproyecto pretende dinamizar una potencial fuente de ingreso económico sustentable a las comunidades productoras de alimentos artesanales. Con el proyecto 2017-106, las comunidades serán beneficiadas con temas de pigmentos naturales, obtención de pigmentos de microorganismos pigmentados aislados de productos artesanales elaborados en aquellas comunidades y su posible aplicación como biopigmento en la industria alimentaria. Por ello, se caracterizó molecularmente a levaduras pigmentadas aisladas de quesos artesanales frescos y semimaduros elaborados en la parroquia Jima. Adicionalmente, se optimizó la extracción de los carotenoides con etanol absoluto después de una previa lisis celular con cloruro de sodio (NaCl) y se investigó el potencial uso en alimentos de estos carotenoides al evaluar su estabilidad en diferentes temperaturas y condiciones de luz.

Método molecular para identificar y caracterizar a las levaduras

Los estudios dirigidos a identificar diferentes especies de levaduras, así como las cepas que pertenecen a una especie, se han basado en enfoques morfológicos y fisiológicos. Estas características pueden variar según las condiciones de crecimiento y, a veces, las especies están definidas por una característica fisiológica única que está controlada por un solo gen. La reproducibilidad de esta técnica es algo cuestionable (Fernández-Espinar y colaboradores, 2006). Por el contrario, las técnicas que utiliza la biología molecular se consideran una alternativa a los métodos tradicionales, ya que analizan el genoma, independiente del estado fisiológico de la célula. Estas técnicas son rápidas, fáciles y confiables. Una de estas técnicas es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) la cual permite la amplificación exponencial de un fragmento de ADN. Otras tecnologías automáticas complementan a la PCR, por medio de la determinación de las secuencias de los nucleótidos de las regiones dianas y su posterior comparación con bases de datos, como por ejemplo el GenBank. Con esta estrategia es posible asignar la especie de la levadura desconocida ya que proporciona una homología igual o superior al 99 %, respecto a secuencias de levaduras conocidas existentes en la base de datos (Fernández-Espinar y colaboradores, 2006).

Método basado en el análisis de la región ribosómica de las levaduras

Los genes ribosómicos 18S, 5.8S y 28S se agrupan en tándem (unión o al trabajo de dos componentes complementarios que se colaboran entre sí con un fin) formando unidades de transcripción que se repiten entre 100 y 200 veces en el genoma. De acuerdo a la ubicación

de la unidad de transcripción estable existen otras regiones, los espaciadores transcritos internos (ITS, por sus siglas en inglés), externos (ETS) e intergénicos (IGS). Las secuencias conservadas se encuentran en los genes 18S, 5.8S y 28S, mientras que las secuencias variables están presentes en las regiones ITS y ETS. La secuenciación de estas regiones variables representa una herramienta poderosa para establecer las relaciones filogenéticas e identificar especies de hongos y levaduras (Fernández-Espinar y colaboradores, 2006).

PCR y electroforesis

La PCR es una técnica "*in vitro*" que amplifica secuencias específicas de ADN gracias a una enzima ADN polimerasa termoestable. La especificidad de la reacción está determinada por el uso de primers que se hibridan con el gen diana y delimitan la secuencia de ADN que será amplificada por la ADN polimerasa. La amplificación se da en un ciclo de tres etapas combinando temperaturas y tiempos. Primero las hebras de ADN se separan por medio de una desnaturalización a 95 ° C; luego los primers se unen al ADN diana en un paso conocido como anillamiento (60 ° C) y finalmente nuevas hebras de ADN son sintetizadas desde los primers en el paso denominado amplificación (72 ° C). Para amplificar la cantidad de ADN diana, el proceso se repite por 35 ciclos (Gibbs, 1991).

Por otra parte, una técnica denominada electroforesis sirve para verificar los productos de PCR. En la electroforesis el ADN migra a través del gel, debido a su carga eléctrica, formando bandas en base a su tamaño. El tamaño de las bandas es estimado en pares de bases (pb) al compararlas con bandas de tamaño conocido presente en un patrón de peso molecular de ADN. Las bandas son visualizadas con luz UV gracias a un colorante fosforescente que se agrega al gel de agarosa y que se unen específicamente al ADN (Koontz, 2013).

Si las bandas formadas no presentan interferencia, el producto de PCR es purificado con kits comerciales para eliminar los primers y el exceso de desoxinucleótidos que podría interferir en la reacción de la secuenciación (Koontz, 2013).

Secuenciación

En la secuenciación se emplea cuatro marcadores fluorescentes que representan a cada nucleótido (A, G, C y T). Los productos de PCR purificados son sometidos a una amplificación agregando los marcadores fluorescentes. Los fragmentos de ADN se separan por tamaños y se excitan simultáneamente con un láser, produciendo una emisión que es diferente para cada uno de los nucleótidos. Las señales generadas son transformadas en cromatogramas, donde se identifica cada nucleótido por su color. De los cromatogramas se obtiene la secuencia que es de buena calidad y se utiliza para identificar al microorganismo en la base de datos genéticos del GenBank (Fernández-Espinar y colaboradores, 2006).

Género *Rhodotorula*

Es un género de levaduras pigmentadas unicelulares (Goodwin, 1980). Según los últimos registros de Mycobank (www.mycobank.org), hay 164 especies en este género, algunos de ellos son *R. glutinis*, *R. toruloides*, *R. mucilaginosa*, *R. graminis* y *R. sp.* Las células de estas cepas son de forma polifilética, que aparecen como subglobosas, ovoides, elipsoides y alargadas (Kurtzman y colaboradores, 2011). Las colonias son lisas o reticuladas, de aspecto húmedo a mucoide o seco (Kidd y colaboradores, 2016).

Rhodotorula puede crecer en diferentes sustratos en condiciones ecológicas de gran envergadura, como el aire, el suelo y el estiércol, así como en la piel, uñas y membranas mucosas de los seres humanos sin presentar pigmentación. También están en el cuerpo de animales, plantas y algunos organismos inferiores (Wirth y Goldani, 2012; Reyes Martínez y colaboradores, 2013).

El género *Rhodotorula* contiene patógenos oportunistas que producen infecciones conocidas como rodotorulosis; las personas inmunodeprimidas son las más propensas a padecer esta infección; por lo tanto, las cepas de *Rhodotorula* no son reconocidas como parte de la flora alimentaria (Tuon y Costa, 2008 y Reyes Martínez y colaboradores, 2013).

Una de las características más nobles de *Rhodotorula* es la biosíntesis de carotenoides naturales, además, la biomasa puede servir como una fuente de proteína, glucógeno y lípidos para piensos de animales (Elsanhoty, Abdel-Razik y Al-Turki, 2017).

La producción de carotenoides de *Rhodotorula* se lleva a cabo en la parte final de la fase exponencial o la inicial de la fase estacionaria, lo que permite una sobreproducción sin afectar ninguna de las fases. Estos carotenoides son de color rosado, variando de azafrán-naranja a coral profundo. El color depende de la molécula sintetizada (como astaxantina, β -caroteno, γ -caroteno, licopeno, luteína, toruleno, torularodina, zeaxantina, etc.) una y de las modificaciones físicas y químicas del cultivo, ya que estas condiciones interactúan con la propiedad quiral de los carotenoides (Kadian y Garg, 2012).

Rhodotorula mucilaginosa

Con un hábitat terrestre y acuático, *R. mucilaginosa* se encuentra dispersa en todas partes. Se encuentra con facilidad en las materias primas y en productos procesados con poco o nulo control de calidad (Guamán-Burneo y Carbajal-Barriga, 2009); estos productos permiten su proliferación al proporcionar un ambiente rico en nutrientes como carbono, nitrógeno y vitaminas. Con esta disponibilidad, el crecimiento óptimo se logra a 28 ° C, pH 4,5 y actividad acuosa de 0,65 (Uribe Gutiérrez, 2007).

R. mucilaginoso es una patógena oportunista y es incapaz de fermentar azúcares (Kidd y colaboradores, 2016), pero es reconocida como una potencial fuente de carotenoides (Dhaliwal y Chandra, 2015; Asku y Tugba, 2005; Xian Lau y colaboradores, 2011 y Elsanhoty, Abdel-Razik y Al-Turki, 2017). Sin embargo, un máximo de 5 % de NaCl dificulta la biosíntesis de los carotenoides, según Sadat y colaboradores (2014). Esta es una especie aerobia estricta, por ello la producción de carotenoides es costosa, no obstante, se puede minimizar costos optimizando los nutrientes porque no son exigentes en su alimentación (Dufosé, 2018; Banzatto, Freite y Mutton, 2012; Elsanhoty, Abdel-Razik y Al-Turki, 2017; Xian Lau y colaboradores, 2011 y Manimala y colaboradores, 2017).

Carotenoides

Los carotenoides representan uno de los grupos más amplios de los pigmentos naturales; están ampliamente distribuidos entre bacterias, levaduras, hongos filamentosos, algas, plantas y organismos superiores (Buzzini y colaboradores, 2005).

Los carotenoides son compuestos bioactivos poliisoprenoides y se divide en dos grandes grupos: (a) carotenos (compuestos hidrocarbonados) y (b) xantofilas (compuestos hidrocarbonados oxigenados). Se forman a partir de la ruta de condensación isoprénica o del ácido mevalónico, mediante la adición gradual de unidades de pirofosfato de isopentenilo para formar un precursor de 20 carbonos conocido como geranilgeranfósforo (GGPP, por sus siglas en inglés). Cuando se combinan dos moléculas de GGPP forman el fitoeno, el primer carotenoide en la ruta biosintética. Tras la desaturación, el fitoeno forma 11 enlaces dobles conjugados, que se convierte en licopeno totalmente trans (Ávalos y Limón, 2017). El licopeno se convierte en la estructura fundamental en la que se derivan otros carotenoides a través de la ciclización, la hidrogenación, la deshidrogenación, la migración de dobles enlaces, el acortamiento o la extensión de la cadena, el reordenamiento, la isomerización, la introducción de funciones de oxígeno o las combinaciones de estos procesos. El resultado es la formación de unas 700 variedades, de los cuales solo 50 pueden ser absorbidos, transportados y depositados en el cuerpo humano a través de la ingesta de alimentos. Aunque no son sintetizados por humanos y animales, un aproximado de estos 20 carotenoides está presente en la sangre y tejidos humanos para mantener la salud. Algunas de estas moléculas son el fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno, licopeno, γ -caroteno, α -caroteno, β -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina (Nagarajan y colaboradores, 2014).

La funcionalidad de los carotenoides en los humanos se debe a que evitan el estrés oxidativo. Gracias a su potencial poder inhibidor físico y químico del oxígeno singlete (átomo de oxígeno en estado excitado) y de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), evitan

la formación en exceso de estos radicales, previniendo la aparición de enfermedades crónicas y degenerativas (Fiedor y Burda, 2014).

Los carotenoides son muy estables en la forma trans y se modifican por efecto del oxígeno, temperaturas altas y bajas (Wagner y Warthesen, 1995), congelación, luz, obscuridad, ácidos y tiempo de exposición. Unas veces disminuye o aumenta su concentración, por influencia de las condiciones físicas y químicas del medio que interactúan con la propiedad quiral de los carotenoides o por liberación de las moléculas secuestrantes que se degradan por efecto de altas temperaturas (Meléndez-Martínez y colaboradores, 2004).

CAPÍTULO I

1 MATERIALES Y METODOLOGÍA

1.1 Obtención de las levaduras pigmentadas

Se trabajó con cuatro cepas de levaduras del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

Las levaduras pertenecen al macroproyecto 2017-106, denominado “Selección de bacterias autóctonas con beneficios potenciales a partir de productos lácteos artesanales de la parroquia Jima”.

1.1.1 Preparación de las cepas

Las levaduras se reactivaron en 10 ml de una mezcla estándar de caldo nutritivo (Citerion, Hardy Diagnostic, USA) y 0,2% (m/v) de glucosa. Se incubaron a 28 ° C durante 72 horas sin agitación en una incubadora 12-146 Quincy.

El inóculo fresco se sembró por duplicado en agar YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose Agar), Sabouraud Dextrosa Agar (Simbro y colaboradores, 2009) y en Agar nutritivo, según la metodología estándar. Posteriormente se incubó a 28 ° C por 96 horas y se verificó la pureza del cultivo en el microscopio a 100x mediante tinción de Gram (Arenas, 2008).

1.1.2 Purificación de las levaduras pigmentadas

Se eliminaron las bacterias de las muestras de levaduras, empleando antibióticos y pH ácido. En cada método de purificación se verificó la pureza.

1.1.2.1 Método del antibiótico

Varias colonias de cada cepa se estiraron en agar Sabouraud que contenía 0,05% (v/v) de gentamicina y 0,04% (m/v) de cloranfenicol. Se incubó a 28°C por 192 horas. El control se hizo dos veces al día mediante método cualitativo (Soria Melguizo, 2009) y la pureza se verificó en el microscopio a 100x por tinción de Gram.

1.1.2.2 Método de acidificación

Algunas colonias se sembraron en agar YM (Yeast Mold Agar) acidificado a pH 3,45 con HCl al 10 %; la acidez fue controlada con un potenciómetro Mettler Toledo, Seven Compact™ y

se incubó a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 96 horas. El control se hizo dos veces al día por método cualitativo (Simbro y colaboradores, 2009) y se verificó la pureza en el microscopio a 100x mediante tinción de Gram.

1.2 Caracterización molecular

Para identificar el género y especie de las levaduras en estudio, se siguió una serie de etapas, basada en: extraer el ADN, amplificar el ADN mediante PCR, verificar la amplificación por electroforesis y luz UV, purificar el producto de PCR, secuenciar el ADN, analizar mediante bioinformática y comparar con la base de datos genéticos del Genbank.

Para esto, varias colonias frescas y puras de cada cepa se inocularon en 10 mL de caldo YPD (Simbro y colaboradores, 2009) y se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas sin agitación; luego se verificó la pureza mediante tinción de Gram en un microscopio con el objetivo 100x para tomar 1 mL de cada inóculo y se pasó a tubos Eppendorf estériles de 1,5mL. Se centrifugó en un equipo Eppendorf 5702 R a 4.400 rpm durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y finalmente se descartó el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces, para obtener una mayor cantidad de células. Las células se lavaron tres veces con agua destilada estéril, entre lavado y lavado se homogenizó en un vortex 3030A Daigger por 5 minutos. Después las células se centrifugaron a 4.400 rpm durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se descartó el sobrenadante. Las células puras se mantuvieron en condiciones de congelación ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su uso.

1.2.1 Extracción del ADN genómico (ADNg)

Las células se descongelaron a temperatura ambiente y se procedió a extraer el ADNg de cada cepa usando el kit y las instrucciones del fabricante de MO BIO (anexo 3). El kit de MO BIO permite un alto nivel de pureza del ADNg aislado y, como consecuencia, una amplificación por PCR más exitosa. Este kit es eficaz para eliminar inhibidores de PCR. La lisis celular se produce por métodos físicos y químicos. El ADNg total se captura en una membrana de sílice, luego se lava el ADNg y se eluye de la membrana para posteriores análisis (MO BIO, 2014).

1.2.2 Amplificación del ADNg

Para determinar el género y la especie de las levaduras incógnitas, se analizó mediante PCR la matriz 5.8S con sus respectivas coberturas ITS 1 e ITS 2, según la técnica utilizada por Fernández-Espinar y colaboradores (2006).

Se usó ADN y un Master Mix que consistía en: primers universales ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') a 10 nM;

Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) y agua libre de nucleasas. Estas sustancias se introdujeron en un termociclador (Multigene, Labnet) con un programa basado en: desnaturalización inicial a 94 ° C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos subdivididos en una desnaturalización a 94 ° C por 30 segundos, anillamiento a 60 ° C por 45 segundos y amplificación a 72 ° C por 45 segundos. El programa terminó con una amplificación final a 72 ° C por 7 minutos (Gibbs, 1991).

1.2.3 Verificación del producto de PCR en gel de electroforesis

Se preparó un gel de agarosa al 1,2% (m/v) con SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™). En cada pocillo se depositó una muestra de 5 µL de los productos obtenidos por PCR y 5 µL de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™). La corrida se realizó en buffer TAE 1X, aplicando una corriente eléctrica de 80 voltios por 60 minutos. Se verificó el tamaño de las bandas mediante el equipo fotodocumentador Enduro™ GDS Touch (Labnet) (anexo 4).

1.2.4 Purificación del producto de PCR

Se purificaron los ADNr amplificados usando el kit de Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se controló el grado de pureza mediante electroforesis al correr y verificar las bandas como se describe en 1.2.3 (anexo 5).

1.2.5 Preparación de muestras para la secuenciación

Se estimó la concentración de las muestras en estudio y el testigo en base a la comparación con cantidades conocidas de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™) y se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

1.2.6 Identificación del género y especie de las levaduras por el algoritmo BLAST

El producto de PCR se secuenció en ambas direcciones (3'-5' y 5'-3') empleando los primers ITS 1 e ITS 4. Los cromatogramas recibidos se analizaron con el programa Chromas.Ink. Las secuencias curadas se llevaron al formato FASTA y, se procedió al ensamble de las hebras "plus" y "minus" mediante el programa CAP3 Sequence Assembly (<http://douda.prabi.fr/software/cap3>). La secuencia ensamblada y limpia se comparó con la base de datos del GenBank mediante el algoritmo BLAST y, con ello se identificó el género y especies de las levaduras en estudio.

1.3 Producción y extracción de los carotenoides totales de *Rhodotorula mucilaginosa* strain DMic 144831

Para producir y extraer el pigmento de la levadura se partió de un caldo madre estandarizado en 24 horas. Al caldo madre se ajustó la biomasa mediante la absorbancia a 660nm (A_{660}) en un espectrofotómetro UV visible EVO 60 (Thermo Fisher Scientific). Se inoculó en caldo YPD a pH 4,4 con HCl a 0,5N y se incubó hasta 138 horas controladas cada 23 horas.

1.3.1 Tiempo de cultivo y producción de los carotenoides totales

Se partió de una colonia de 3 días cultivada en agar YPD estándar e incubada a 28 ° C. Se inoculó esta colonia en 10 mL de caldo YPD estándar en un matraz de 50 mL y se incubó a 28 ° C con una agitación de 150 rpm durante 24 horas en un equipo baño de maría. A las 24 horas se ajustó la turbidez del caldo madre, para estar dentro del rango establecido por análisis analíticos. El valor máximo recomendado es 1,2. Este ajuste de A_{660} del caldo madre se hizo desde 2,198 hasta 1,108.

En 100 mL caldo YPD a pH 4,4 fresco y estéril contenido en matraces de 250 mL, se inoculó 5 % (v/v) de caldo madre. Se incubó a 28 ° C con agitación de 150 rpm en un equipo baño de maría por 192 horas. El ensayo expuesto hasta las 192 horas se evaluó de la siguiente manera: el experimento se controló a las cero horas y cada 24 horas hasta las 72 horas. Durante las 72 horas el inóculo permaneció en agitación, mientras que las 120 horas restantes, el inóculo permaneció en modo estático y se controló solo al final del experimento, es decir, al cumplir las 192 horas. Los controles se hicieron midiendo la A_{660} .

Para determinar el tiempo óptimo para la extracción del pigmento de la levadura, se analizaron las curvas basadas en las UFC/mL y la A_{660} . Para que los datos de la absorbancia fueran confiables, se diluyó 7 veces al inóculo en evaluación y para las UFC/mL se tomaron muestras directas.

De acuerdo con el resultado del análisis de las curvas basadas en la absorbancia y UFC/mL, se determinó que el tiempo óptimo de extracción del pigmento de la levadura es dentro de las 72 horas. Para extraer el pigmento de la levadura se realizaron pellets en tubos Falcon estériles de 50 mL. Los pellets se lavaron por agitación y centrifugación con agua destilada estéril hasta obtener un sobrenadante transparente (de 3 a 6 veces). Estos pellets se mantuvieron en refrigeración.

1.3.2 Extracción de los carotenoides totales

Para optimizar la extracción de los carotenoides totales y determinar la mejor combinación de las variables independientes se hizo un diseño factorial 2^2 (tabla 1 y anexo 6). La variable de respuesta medida fue la concentración de carotenoides expresada en $\mu\text{g}/0,1\text{g}$ de levadura de aproximadamente 45 % de humedad y, las variables independientes fueron: el porcentaje de NaCl (para deshidratar a las células por el proceso de ósmosis) y el volumen de etanol absoluto frío (para extraer el pigmento). Los niveles inferiores y superiores de las variables independientes fueron 0,9% de NaCl y 1 mL de etanol absoluto frío y 15 % de NaCl y 3 mL de etanol absoluto frío (Elsanhoty, Abdel-Razik y Al-Turki, 2017 y Arias Bautista, 2014).

Las células temperadas se deshidrataron en la incubadora Gemmyco a 37 ° C hasta perder un 55 % de humedad. Luego se deshidrataron las células por ósmosis con NaCl por 5 minutos en vortex y se centrifugó a 4.400 rpm durante 10 minutos a 4 ° C, para descartar el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces. Para eliminar el NaCl, se lavaron seis veces las células con el doble de volumen de agua en relación al volumen de solvente utilizado para la extracción (tabla 1). Finalmente, el pigmento se extrajo con etanol absoluto frío sometiendo a las levaduras tres veces a este solvente. Para ello se agitó vigorosamente la solución por 5 minutos usando un vórtex y se centrifugó a 4.400 rpm por 10 minutos a 4 ° C.

Tabla 1: Diseño factorial

Ensayo	X1	X2	NaCl (%)	Etanol absoluto frío (mL)
1	-1	-1	0,9	1
2	1	-1	15	1
3	-1	1	0,9	3
4	1	1	15	3

1.3.3 Cuantificación de los carotenoides totales

Considerando que la concentración de los carotenoides está dentro de un rango lineal, cumpliendo la ley de Lambert-Beer, se procedió a su cuantificación por espectrofotometría. La cuantificación dependió del coeficiente de absorción, el cual depende del tipo de solvente y la longitud de onda a la que se mide la absorbancia de la solución de un carotenoide específico. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración (Rodríguez-Amaya, 2001). Para cuantificar los carotenoides se empleó la fórmula 1.

Fórmula 1

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g/g}) = \frac{\frac{A \cdot V \cdot 10^6}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100}}{P_m} \text{ (Schiedt \& Liaaen-Jensen, 1995)}$$

Donde:

A = Máxima absorbancia de carotenoides total en etanol a 474 nm (Arias Bautista, 2014).

V = Volumen total (mL) de la solución.

10^6 = Masa en μg de la condición 1 % (m/v) del coeficiente de absorción.

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = Coeficiente de absorción para una solución al 1 % que pasa por 1 cm de paso de luz a través de la celda. Para carotenoides totales el valor es 2200 (Arias Bautista, 2014).

100 = Volumen en mL de la condición 1 % (m/v) de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$

P_m = Peso de la muestra extraída, expresada en gramos.

1.4 Efecto de temperatura, luz solar y tiempo de almacenamiento de los carotenoides totales disueltos en etanol

Se evaluaron a los carotenoides en dos vehículos diferentes por triplicado y fueron sometidos a diferente temperatura, luz solar y tiempo de almacenamiento (tabla 2). El control se hizo por espectrofotometría con el espectrofotómetro de microplacas Epoch™ (BioTek) y se aplicó la fórmula 2. Esta es una modificación de la fórmula 1 para expresar la concentración de los carotenoides en masa/volumen.

Fórmula 2

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g/mL}) = \frac{A \cdot 10^6}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100} \text{ (Schiedt \& Liaaen-Jensen, 1995)}$$

El etanol absoluto fue el primer vehículo para los carotenoides totales, los cuales se expusieron a tres condiciones diferentes: 40 ° C por una hora, 60 ° C por 30 minutos y 72 ° C por 30 segundos. En la segunda condición se evaluó el efecto de la luz solar por 96 horas controlado cada 24 hora, a temperatura ambiente. En la tercera condición se evaluó el efecto de – 20 ° C por 96 horas controlado cada 24 horas (anexo 7).

El segundo vehículo fue una solución con 38 % de etanol y 30 % de sacarosa exponiendo los carotenoides a dos condiciones diferentes. En la primera condición se evaluó el efecto de la luz solar por 96 horas controladas cada 24 horas, a temperatura ambiente. En la segunda condición se evaluó el efecto de – 20 ° C por 96 horas controlada cada 24 horas (anexo 7).

Tabla 2: Carotenoides totales en etanol expuesto a diferente temperatura, tiempo y luz solar

Vehículo	Condición	Efecto		
		Temperatura (°C)	Tiempo	Exposición
1	1	40	60 min	
	1	60	30 min	
	1	72	30 s	
	2	Ambiente	4 días	Luz solar
	3		4 días	- 20 ° C
2	1	Ambiente	4 días	Luz solar
	2		4 días	- 20 ° C

CAPÍTULO II

2 RESULTADOS

2.1 Caracterización molecular

Se analizó la región ADNr que contiene ITS 1 e ITS 2, utilizando los primers ITS 1 e ITS 4. Las secuencias obtenidas presentaron tamaños entre 586 y 598 pb. De acuerdo con la comparación con el GenBank usando el algoritmo BLAST, las levaduras se identificaron como *Rhodotorula mucilaginosa* strain WCS3-2; *Rhodotorula mucilaginosa* strain QCC/Y21/17; *Rhodotorula sp.* EY12114-2-19 y *Rhodotorula mucilaginosa* strain DMic 144831 (tabla 3). Los porcentajes de identidad fueron de 99 % las tres primeras y 100 % la última, con un error de 0.0. Cabe destacar, las cuatro levaduras crecieron con facilidad en medio de cultivo acidificado y enriquecido con antibióticos.

Tabla 3: Identificación molecular de las levaduras pigmentadas y resistencia a la prueba del antibiótico y la acidez.

Código	Procedencia	Fenotipo	Resistencia a la prueba del antibiótico y acidez	Caracterización Molecular		
				Anotación de las levaduras en base al Algoritmo BLAST	Error	% Identidad
1	Queso freco		+	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain WCS3-2	0.0	598/601 (99 %)
2	Queso fresco		+	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain QCC/Y21/17	0.0	590/591 (99 %)
5	Queso semimaduro		+	<i>Rhodotorula sp.</i> EY12114-2-19	0.0	598/603 (99 %)
7	Queso semimaduro		+	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain DMic 144831	0.0	586/586 (100 %)

2.2 Producción y extracción de los carotenoides totales *Rhodotorula mucilaginosa* strain DMic 144831

El trabajo continuó con solo una de las cuatro especies caracterizadas molecularmente. Esta selección se realizó tomando en cuenta que todas las cepas presentan igual coloración e intensidad de la pigmentación.

2.2.1 Tiempo de cultivo y producción de los carotenoides totales de *Rhodotorula mucilaginosa* strain DMic 144831

La levadura se cultivó por 192 horas dentro de las cuales se midió la A_{660} y las UFC/mL (figura 1). De acuerdo con la curva de UFC/mL, a las 48 horas la levadura entró en la fase estacionaria y a las 72 horas la levadura estaba en la fase de muerte. La turbidez del medio basado en la A_{660} llegó a su máximo nivel a las 72 horas y se mantuvo prácticamente invariable hasta las 192 horas.

De un cultivo de 200 mL inoculado en caldo YPD según lo descrito en 1.3.1, se obtuvo 1,611g de levadura de un pellet húmedo, el cual corresponde a 0,506g de levadura en peso seco.

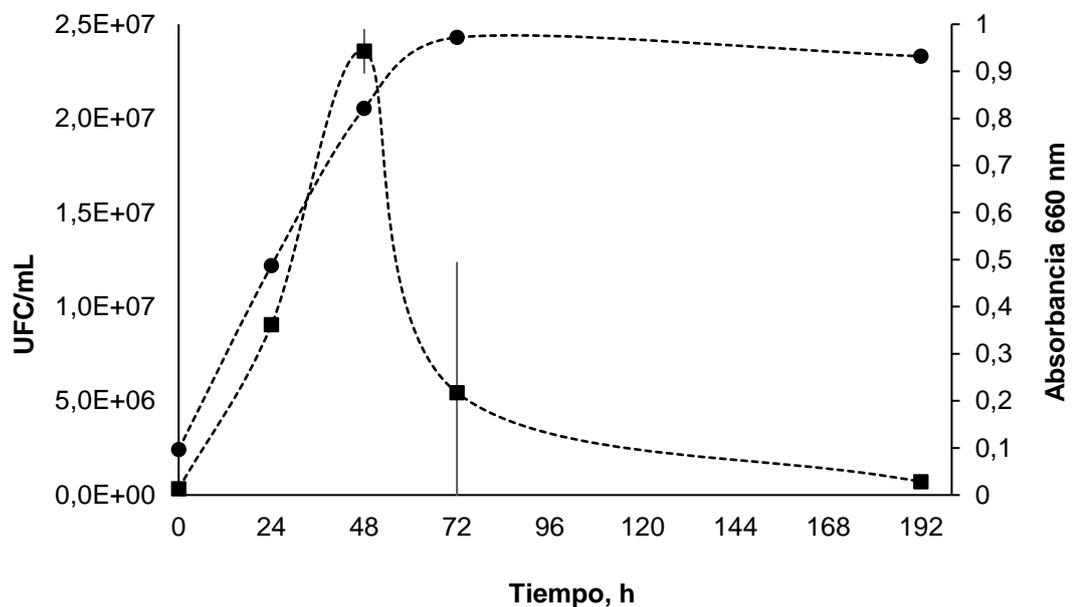


Figura 1: Curvas de proliferación de *Rhodotorula mucilaginosa* strain DMic 144831

---■--- Curva basada en las UFC/mL y ---●--- Curva basada en la A_{660} . Las colonias se recontaron de agar YPD a pH 6,5 y la A_{660} de la biomasa en caldo YPD a pH 4,4.

2.2.2 Extracción y cuantificación de los carotenoides totales

De 0,1g de levadura de aproximadamente 45 % de humedad se obtuvo como máximo: 35,16µg de carotenoides total al extraer con 15 % NaCl y 3 mL etanol absoluto frío; 30,38µg de carotenoides totales al extraer con 0,9% NaCl y 3 mL etanol absoluto frío; 23,44µg de carotenoides totales al extraer con 0,9% NaCl y 1 mL etanol absoluto frío y 20,54µg de carotenoides totales al extraer con 15 % NaCl y 1 mL etanol absoluto frío (tabla 4).

Tabla 4: Diseño factorial y rendimiento de la extracción de los carotenoides totales

Orden Est	Orden corrida	Punto		Carotenoides (µg/0,1g de levadura de ~ 45 % de humedad)		
		Central	Bloques	A	B	
4	1	1	1	1	1	35,16
12	2	1	1	1	1	32,75
2	3	1	1	1	-1	19,43
11	4	1	1	-1	1	29,41
8	5	1	1	1	1	33,16
7	6	1	1	-1	1	30,22
13	7	1	1	-1	-1	21,61
9	8	1	1	-1	-1	23,44
14	9	1	1	1	-1	20,54
15	10	1	1	-1	1	30,38
10	11	1	1	1	-1	19,61
1	12	1	1	-1	-1	20,28
16	13	1	1	1	1	32,35
5	14	1	1	-1	-1	21,26
6	15	1	1	1	-1	20,06
3	16	1	1	-1	1	29,25

A = Niveles en % NaCl; B = Niveles en volumen (mL) de etanol absoluto frío.

En la tabla 5 y la fórmula 3 se expresa los datos del polinomio que representa la superficie de respuesta del espacio experimental.

Fórmula 3

Carotenoides totales = 26,1816 + 0,4512% NaCl + 5,4034 mL etanol + 1,3202 (% NaCl * mL etanol)

Solo la cantidad de etanol (B) y la interacción entre esta y la cantidad de NaCl son significativas al 95 % (figuras 2 y 3)

Tabla 5: Ajuste factorial: Carotenoides vs. A; B

Efectos y coeficientes estimados para Carotenoides (unidades codificadas)					
Término	Efecto	Coef.	Coef. de EE	T	P
Constante		26,1816	0,2460	106,41	0,000
A	0,9024	0,4512	0,2460	1,83	0,092
B	10,6069	5,4034	0,2460	21,96	0,000
A*B	2,6404	1,3202	0,2460	5,37	0,000

S = 0,984165

PRESS = 20,6631

R-cuad. = 97,72%

R-cuad. (pred.) = 95,95%

R-cuad. (pred.) = 97,15%

Coef. = Coeficiente; Coef. de EE = Error Estándar del Coeficiente; T = Valor T; P = Valor P (Valor de la probabilidad); A = % de NaCl; B = Volumen (mL) de etanol absoluto frío; S = Desviación estándar; R-cuad. = R²; PRESS = Suma de los cuadrados de error de predicción y R-cuad. (pred.) = R² pronosticada

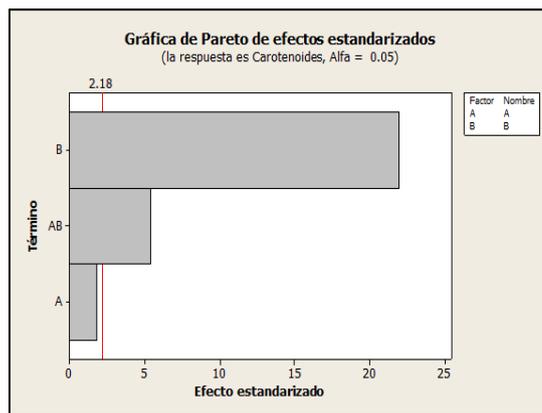


Figura 2: Gráfica de Pareto de los efectos estandarizados

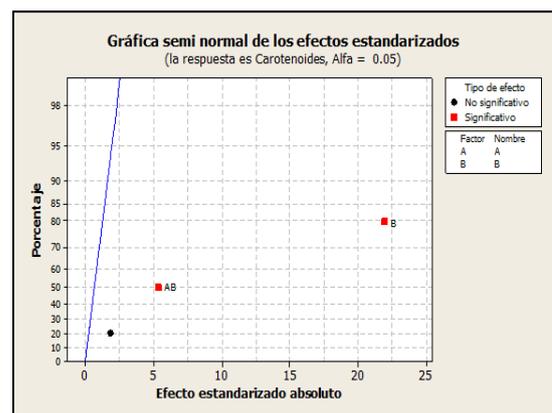


Figura 3: Gráfica Semi normal de los efectos estandarizados

Aplicando el análisis de la varianza, se obtuvieron los resultados de la tabla 6

Tabla 6: Resumen del análisis de la varianza

Análisis de la varianza para Carotenoides totales (unidades codificadas)					
Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	CM ajust.	F
Efectos principales	2	470.41	470.41	235.205	242.82
2-Interacciones de (No.) factores	1	27.89	27.89	27.888	28.79
Error residual	12	11.62	11.62	0,969	
Error puro	12	11.62	11.62	0,969	

GL = Grados de libertad; SC sec = Sumas secuenciales; SC ajust = Sumas ajustadas; CM ajust = Cuadros medios ajustados; F = Valor F

Este análisis indica que existe por lo menos un efecto principal significativo, así como es significativa la interacción que es confirmando por los resultados obtenidos por el análisis de la superficie de respuesta.

2.2.3 Efecto de diferente temperatura y tiempo en los carotenoides totales disueltos en etanol absoluto y 38 % de etanol con 30 % de sacarosa

La concentración de los carotenoides totales en etanol absoluto expuestos a 40 ° C por 60 min disminuyó 15,26%; a 60 ° C por 30 min bajó 6,71% y a 72 ° C por 30 segundos la pérdida fue de 2,66%, (tabla 7).

Tabla 7: Evaluación de los carotenoides totales en etanol absoluto expuesto a diferentes temperaturas y tiempos

Ensayo	Condición	Temperatura, °C	Tiempo, min	% de pérdida y $\pm \sigma$
1	Carotenoides totales en etanol absoluto	40	60	15,26 \pm 0,13
2	Carotenoides totales en etanol absoluto	60	30	6,71 \pm 0,03
3	Carotenoides totales en etanol absoluto	72	0,5	2,66 \pm 0,03

Se observó una pérdida paulatina y significativa de los carotenoides totales en etanol absoluto expuestos a la luz solar por 96 horas, llegando a una disminución del 71,13%. Por otra parte, la concentración de los carotenoides totales conservados a – 20 ° C incrementó 6,84% (tabla 8 y figura 4).

Los carotenoides totales al 38 % de etanol con 30 % de sacarosa, expuesto a la luz solar por 96 horas y controlado cada 24 horas, mostraron una pérdida de 12,40%. Por otra parte, cuando los carotenoides fueron expuestos a – 20 ° C por 96 horas y controlados cada 24 horas, se detectó un incremento de 2,50% a las 96 horas (tabla 8 y figura 4).

Tabla 8: Evaluación de los carotenoides totales en etanol absoluto y a 38 % de etanol con 30 % de sacarosa expuesto a la luz solar, a temperatura ambiente y -20°C .

Ensayo	Condición	Tiempo, h	% de variación de la concentración carotenoides totales y $\pm \sigma$
1	Carotenoides en etanol absoluto expuestos a la luz solar, a temperatura ambiente	0	$0 \pm 0,00$
		24	$-33,20 \pm 0,01$
		48	$-49,08 \pm 0,03$
		72	$-58,66 \pm 0,02$
		96	$-71,13 \pm 0,03$
2	Carotenoides en etanol absoluto expuestos a -20°C .	0	$0 \pm 0,00$
		24	$3,32 \pm 0,01$
		48	$4,69 \pm 0,05$
		72	$10,16 \pm 0,00$
		96	$6,84 \pm 0,04$
3	Carotenoides a 38 % de etanol con 30 % de sacarosa expuesto a la luz solar, a temperatura ambiente	0	$0 \pm 0,00$
		24	$-1,57 \pm 0,03$
		48	$-16,97 \pm 0,03$
		72	$-9,66 \pm 0,07$
		96	$-12,40 \pm 0,07$
4	Carotenoides a 38 % de etanol con 30 % de sacarosa expuesto a -20°C	0	$0 \pm 0,00$
		24	$-13,87 \pm 0,03$
		48	$-15,03 \pm 0,05$
		72	$-8,86 \pm 0,01$
		96	$2,50 \pm 0,01$

En la figura 4 se puede ver que, en general, los carotenoides se conservan mejor a -20°C .

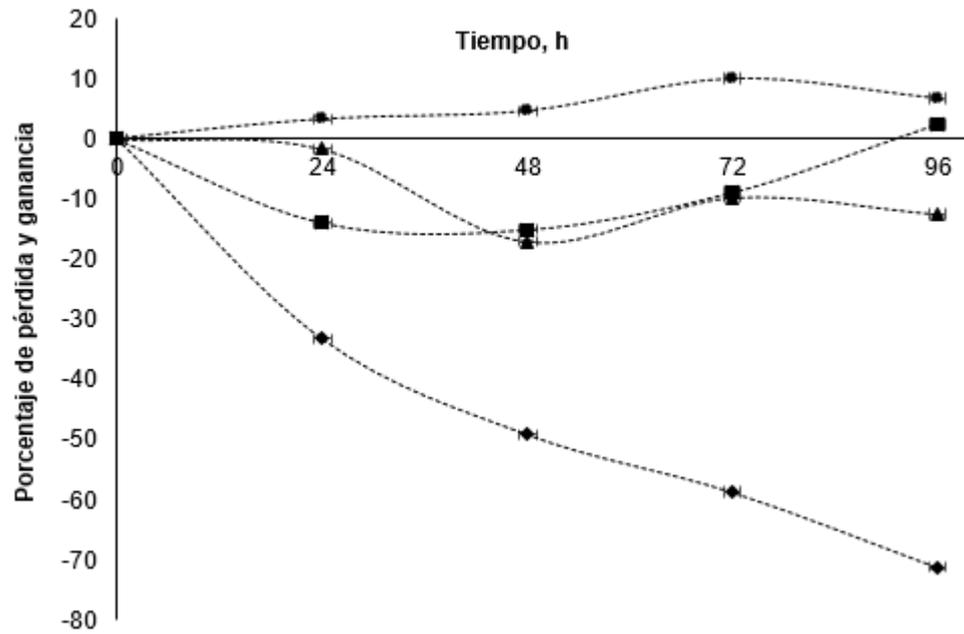


Figura 4: Porcentaje de variación de los carotenoides totales disueltos en diferentes condiciones y concentraciones de etanol y evaluación bajo luz solar, a temperatura ambiente y -20 °C

---◆--- Carotenoides en etanol absoluto expuesto a la luz solar, a temperatura ambiente;
 ---●--- Carotenoides en etanol absoluto expuesto a -20 °C; ---▲--- Carotenoides en 38 % de etanol con 30 % de sacarosa expuesto a la luz solar, a temperatura ambiente y ---■--- Carotenoides en 38 % de etanol con 30 % de sacarosa expuesto a -20 °C

CAPÍTULO III

3 DISCUSIÓN

R. mucilaginosa es una levadura no convencional, se encuentra frecuentemente en ambientes acuáticos, suelo, animales, plantas, alimentos artesanales con poco o nulo control de calidad, utensilios y en humanos. Es causante de rodotorulosis en la especie humana inmunocomprometida (Guamán-Burneo y Carbajal-Barriga, 2009; Fernández-Espinar y colaboradores, 2006 y Tuon y Costa, 2008). No es reconocida como GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro) por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos). En lugar de ser utilizada en alimentos, se usa para la producción comercial de carotenoides, principalmente β -caroteno, toruleno y torularhodin (Aksu y Tugba, 2005; Maldonade y colaboradores, 2012), para procesos de biorremediación líquida (Jarboui y colaboradoress, 2012), para la biotransformación de metales pesados (Rajpert y colaboradores, 2013) y por sus acciones antifúngicas y promotoras del crecimiento de las plantas (Ignatova y colaboradores, 2015).

3.1 Caracterización molecular

Es común encontrar a *R. mucilaginosa* en ambientes insalubres. En este trabajo, los quesos frescos y semimaduros elaborados en las pequeñas fábricas artesanales de la parroquia Jima, fueron el vehículo para obtener este género.

R. mucilaginosa se puede reconocer fácilmente por su peculiar forma, aspecto y color o por su resistencia a los antibióticos y medios ácidos. Con el objetivo de tener plena confianza respecto a la identidad de la levadura aislada, en este trabajo se analizó la secuencia de la región 5.8S-ITS. Para ello se extrajo ADN, se amplificó la región 5.8S-ITS con los primers ITS 1 e ITS 4 y, posteriormente secuenció el amplicón en las direcciones 3'-5' y 5'-3'. Luego, las secuencias se consensuaron a través de la limpieza, alineamiento y ensamble para introducirlas en el GenBank e identificar el género y la especie de las levaduras incógnitas con las existentes en la base de datos genéticos a través del algoritmo BLAST. Esta investigación reportó una identidad entre el 99 y 100 % en tandems de 589 y 592, como *Rhodotorula mucilaginosa* a tres de ellas y una como *Rhodotorula* sp. Estas identidades tuvieron un porcentaje de error de 0.0 en la cobertura de la investigación.

3.2 Optimización en la extracción de los carotenoides totales con solvente “verde”

Debido a que la identificación molecular permitió saber que es una levadura bien estudiada, no fue necesaria la caracterización biotecnológica ni la capacidad fermentativa de *R. mucilaginosa* (Aksu y Tugba, 2005; Turk y colaboradores, 2007; Sadat Naghavi y

colaboradores, 2014 y Kidd y colaboradores, 2016). Tampoco fue necesaria la caracterización biotecnológica del pigmento. Generalmente los carotenoides son pigmentos liposolubles. Esta propiedad es un limitante para ensayos en bases hidrofílicas, debido a esto, se caracterizó el pigmento en etanol sometiéndole a condiciones del proceso de pasteurización y semejantes al proceso de escaldado; exponiéndole a la luz solar, a temperatura ambiente y -20°C durante cuatro días.

Los carotenoides de acuerdo a su estructura se extraen con solventes polares o apolares. El etanol es una sustancia polar y es uno de los solventes considerados “verdes” para las extracciones en las industrias de alimentos, farmacéutica, cosmética y agroindustrial. Debido a la producción intracelular de los carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa*, se desarrolló un diseño factorial 2^2 para determinar las condiciones óptimas de extracción del pigmento. En este diseño las variables independientes fueron el NaCl y el etanol.

El NaCl no extrae el pigmento, sino contribuye a mejorar la extracción al deshidratar las células por efecto de la osmosis, lo que provoca una muerte celular (Samuel, 2012).

En este estudio. Un 15 % de NaCl y 3 mL de etanol absoluto frío extrajo una sola vez 35,16 μg de carotenoides totales de 0,1g de levadura de aproximadamente 45 % de humedad. Aunque las variables independientes para la extracción se tomaron del artículo de Elsanhoty, Abdel-Razik y Al-Turki (2017) y el trabajo de Arias Bautista (2014), este resultado no es comparable con sus resultados porque las condiciones de cultivo de los microorganismos, cantidad y estado de los microorganismos, porcentaje de la solución salina, cantidad y condiciones del solvente y la acción mecánica empleada son totalmente diferentes. Por ejemplo, Elsanhoty, Abdel-Razik y Al-Turki (2017) obtuvieron 1,29mg/g de carotenoides de *R. mucilaginosa* al lavar el sedimento dos veces con una solución de 9 g/l de NaCl y extraer con 3 mL de etanol absoluto, por tres veces mediante agitación en un vortex por 5 minutos y centrifugación a 5 000 x g por 10 min a 4°C ; ellos partieron con una alicuota de 10 mL de cultivo de 3 días, cultivado en YM enriquecido con jarabe de dátiles e incubado a 28°C y pH 6,0 y agitación de 200-250 rpm y 5 litros de aire/min, mientras que, Arias Bautista (2014) obtuvo 44,98mg/L de carotenoides de *Haloferax sp.* al lavar el pellet con una solución salina (SW, anexo 8) y extraer con 1 mL de etanol frío a los carotenoides hasta que el sedimento quede color blanco, mediante vortex y centrifugación a 10 000 rpm durante 5 min; Arias partió con una alicuota de 10 mL de cultivo de 7 días, cultivado en YE 10,08 g/L y SW 18,50%, pH 6,22 y $34,5^{\circ}\text{C}$ y agitación de 100 rpm.

3.3 Efecto de temperaturas altas, luz solar y congelación en los carotenoides totales en etanol

La pérdida del pigmento fuera de su matriz se asocia generalmente con el calor. En la primera etapa se isomeriza a la forma *cis* en una extensión comparable a la energía recibida y, a mayor temperatura y tiempo de exposición se oxidan todas las moléculas. Si continúa el proceso, se obtiene productos incoloros (Pérez Gálvez y Garrido Fernández, 1997). Sin embargo, cuando los pigmentos están en su matriz el calor incrementa la concentración de los carotenoides al destruir las moléculas encapsulantes por efecto de las altas temperaturas (D'Evoli, Lombardi-Boccia y Luarini, 2013). No obstante, las temperaturas bajas y congelación incrementan la concentración de los carotenoides sea que estén en su matriz o fuera de ella (Lado, Pascual y Rodrigo, 2015 y Jiao y colaboradores, 2018).

En esta investigación se perdió 15,26%; 6,71% y 2,66% de carotenoides sometidos a 40 ° C por 60 minutos; 60 ° C por 30 minutos y 72 ° C por 30 segundos en etanol absoluto, respectivamente. Los carotenoides en etanol absoluto expuestos a la luz solar y a temperatura ambiente, perdieron hasta un 71,13% en 4 días, mientras que a –20 ° C, incrementaron hasta un 10,16% en 72 horas y las siguientes 24 horas se perdió 3,32%. Los carotenoides en 38 % de etanol y 30 % de sacarosa expuestos a la luz solar o condiciones ambientales no controladas, disminuyeron un 16,97% a las 48 horas, las siguientes 24 horas se recuperó un 7,31%, luego se perdió 2,74% y, a –20 ° C a las 48 horas se perdió un 15,03% y las siguientes horas se recuperó hasta un 12,52%. Estos resultados no son comparables con otras investigaciones, porque las matrices de los carotenoides investigados son diferentes. Por ejemplo, a 12 ° C incrementa de 25 – 30 µg/g de fitoeno, fitoflueno y licopeno de pomelo rojo a 92 µg/g de fitoeno, fitoflueno y licopeno del pomelo rojo en 8 semanas (Lado y colaboradores, 2015). A –20 ° C incrementa de 1,17 - 2,52µg/g de luteína y zeaxantina del gluten de la harina de maíz no tratada a 2,23 - 16,39µg/g y 4,66 – 36,3µg/g de luteína y zeaxantina, respectivamente de la muestra prostrada (Jiao y colaboradores, 2018).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIÓN

Rhodotorula es una especie aerobia estricta, muy útil en la producción de carotenoides. Es capaz de crecer en diferentes sustratos en condiciones ecológicas muy variadas y, los quesos artesanales frescos y semimaduros elaborados en la parroquia Jima no fueron una excepción. Con herramientas de biología molecular en el análisis de la región 5.8S-ITS se identificaron a tres de las cuatro cepas como *Rhodotorula mucilaginosa* y la otra como *Rhodotorula sp.*

Rhodotorula mucilaginosa strain DMic 144831 alcanzó el 100 % de identidad en el Genbank y produjo en condiciones no aptas para la sobreproducción de carotenoides, 35,16 μ g de carotenoides totales a partir de 0,1g de levadura de aproximadamente 45 % de humedad. La combinación óptima de las variables independientes para esta cantidad fue 15 % de NaCl y 3 mL de etanol absoluto frío.

Los carotenoides por su naturaleza quiral, interactúan con otras sustancias químicas y sufren efectos de factores físicos que generan nuevas moléculas, lo que provoca disminución o aumento de su concentración. Esto se ha comprobado cuantitativamente por espectrofotometría y la ecuación previamente modificada de Lambert-Beer, lo que permite concluir que a -20°C los carotenoides son más estables o esta condición facilita la síntesis de carotenoides *de novo* o incrementa la molécula dominante. En consecuencia, los carotenoides producidos por *R. mucilaginosa* strain DMic 144831, se podrían utilizar en alimentos que requieran la cadena de refrigeración o congelación (-20°C) o en alimentos que requieran el proceso de uperización; en esta última condición la pérdida de carotenoides totales debe ser mínima porque a condiciones de pasteurización la pérdida es de 2,66% y a procesos semejantes al escaldado la pérdida es de 6,71% a 15,26%.

BIBLIOGRAFÍA

- Aksu, Z., & Tugba Eren, A. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Elsevier*, 40, 2985-2991. doi:10.1016/j.procbio.2005.01.011
- Andrew, M. (2018). The global market for carotenoids. *bccResearch*. Obtenido de <https://www.bccresearch.com/market-research/>
- Arenas, R. (2008). *Micología Médica* (Tercera ed.). México: McGrawHill. Obtenido de https://issuu.com/cynthiaaymmeteoribequispe/docs/micolog__a_m__dica_ilustrada__3ra_e
- Arias Bautista, A. J. (2014). Optimización de la producción de carotenoides por *Haloferas sp.* utilizando el método de superficie de respuesta. *Tesis de Tercer Nivel, Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 80. Obtenido de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3739>
- Ávalos, J., & Limón, M. C. (2017). Biosíntesis de carotenoides en hongos. En A. J. Méndez-Martínez, *Carotenoides en agroalimentación y salud* (1 ed., pág. 710). México: Terracota. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Damaso_Hornero-Mendez/publication/321310561_Carotenoides_en_agroalimentacion_y_salud/links/5a1bfa83a6fdcc50adecad92/Carotenoides-en-agroalimentacion-y-salud.pdf
- Banzatto, D., Freite, L., & Mutton, M. (2012). Carotenoids production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33(1), 14-18. doi:10.1590/S0101-20612013000500003
- Buzzini, P., Martini, A., Gaetani, M., Turchetti, B., Pagnoni, U. M., & Davoli, P. (2005). Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. *Elsevier*, 36, 687-692. doi:10.1016/j.enzmctec.2004.12.028
- D'Evoli, L., Lombardi-Boccia, G., & Lucarini, M. (2013). Influence of Heat Treatments on Carotenoids Content of Cherry Tomatoes. *Foods Journal*, 2, 352-363. doi:10.3390/foods2030352
- Dhaliwal, M. K., & Chandra, N. (2015). Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Intenational Journal Pharmaceutical Sciences and eseach*, 6(3), 1161-1165. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(3).1161-65
- Dufosé, L. (2018). Microbial pigments from bacterial, yeasts, fungi, and microalgae for the food and feed industries. *Elsevier*, 113-132. doi:10.1016/B97-0-12-811518-3.00004-1
- Elsanhoty, R. M., Abd El-Razink, M. M., & Al-Turki, A. I. (2017). Production of carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa* and their applications as colorant agent in sweet candy. *WFL Plublisher Science and Technology*, 15(2), 21-26. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/316277941_Production_of_carotenoids_from_rhodotorula_mucilaginosa_and_their_applications_as_colorant_agent_in_sweet_candy

- Ferdes, M., Ungoreanu, C., Mihalcea, A., Aurelia Chirvase, A., & Mocanu, E. (2011). The influence of the carbon source on torularhodin pigment biosynthesis. *Chimie*, 62(3), 339-343. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/267202429_The_Influence_of_the_Carbon_Source_on_Torularhodin_Pigment_Biosynthesis
- Fernández-Espinar, M. T., Martorell, P., De Llanos, R., & Querol, A. (2006). Molecular methods to identify and characterize yeast in food and beverages. En A. Querol, & G. H. Fleet, *Yeast in food and beverages* (2da ed., págs. 53-75). Valencia: Springer. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=Cs296pWLCG4C&pg=PA335&dq=Yeasts+in+Food+and+Beverages&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwimkpw4eHjAhVixFkKHd58Cu cQ6AEIJzAA#v=onepage&q=Yeasts%20in%20Food%20and%20Beverages&f=false>
- Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *nutrients*, 6, 466-488. doi:10.3390/nu6020466
- Franzreb, M. (2013). *DMSO: muchas aplicaciones y una gran controversia*. Obtenido de DMF: <https://www.drmarcofranzreb.com/blog/2013/07/23/dms0-muchas-aplicaciones-y-una-gran-controversia/https://www.drmarcofranzreb.com/blog/2013/07/23/dms0-muchas-aplicaciones-y-una-gran-controversia/>
- GAD-Sígsig y GAD-Jima, G. A. (2012). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la Parroquia Jima*. Obtenido de <http://gobiernojima.gob.ec/azuay/wp-content/uploads/2014/10/PDyOT-Jima.pdf>
- Gibbs, R. A. (1991). Polymerase chain reaction techniques. *Elsevier*, 2(1), 69-75. doi:10.1016/0958-1669(91)90063-B
- Goodwin, T. (1980). *The biochemistry of the carotenoids* (Segunda ed., Vol. 1). New York: Chapman and Hall. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=xAfvCAAQBAJ&pg=PA271&dq=carotenoids+off+rhodotorula&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjJ0IXW2PjiAhUq0FkKHUPGCQ8Q6AEILTAB#v=onepage&q=carotenoids%20off%20rhodotorula&f=false>
- Guamán-Burneo, C., & Carbajal-Barriga, J. (2009). Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. *Repositorio de la Universidad Javeriana*, 14(2-3), 187-197.
- Ignatova, L. V., Brazhnikova, Y. V., Berzhanova, R. Z., & Mukasheva, T. D. (2015). Plant growth-promoting and antiungal activity of yeasts from dark chestnut soil. *Elsevier*. doi:10.1016/j.micres.2015.03.008
- Jarboui, R., Baati, H., Fetoui, F., Gargouri, A., Gharsallah, N., & Ammar, E. (2012). Yeast performance in wastewater treatment: case study of *Rhodotorula mucilaginosa*. *Environ Technology*, 33(8), 951-960. doi:10.1080/09593330.2011.603753
- Jiao, Y., Li, D., Chang, Y., & Xiao, Y. (2018). Effect of Freeze-Thaw Pretreatment on Extraction Yield and Antioxidant Bioactivity of Corn Carotenoids (Lutein and Zeaxanthin). *Hindawi Journal of Food Quality*, 8. doi:10.1155/2018/9843503

- Kadian, S. S., & Garg, M. (2012). Pharmacological effects of carotenoids: A review. *International Journal Pharmacological Sciences and Research*, 3(1), 42-48.
- Kidd, S., Halliday, C., Alexiou, H., & Ellis, D. (2016). *Description of medical fungi* (3ra ed.). Australia: Newstyle.
- Koontz, L. (2013). Agarose gel electrophoresis. *Elsevier*, 529, 35-45. doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00004-5
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The yeasts, a taxonomic study* (5ta ed., Vol. 1). London: Taylor & Francis. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=yfg79rIIFIkC&printsec=frontcover&dq=the+yeasts+a+taxonomic+study&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj93sDc4fjiAhUlzkKHdQVB5kQ6AEIJzAA#v=onepage&q=the%20yeasts%20a%20taxonomic%20study&f=false>
- Lado, J., Pascual, M., & Rodrigo, M. (2015). Efecto de la temperatura de conservación en el contenido de carotenoides y vitamina C en frutos de pomelo rojo. *Agrociencia Uruguay*, 19(1), 48-56.
- Maldonado, I. R., Rodríguez-Amaya, D. B., & Scamparini, A. R. (2012). Statical optimization of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 109-115.
- Manimala, M., & Murugesan, R. (2017). Studies on carotenoid pigment production by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* using cheap materials of agro-industrial origin. *The Pharma Innovation Journal*, 6(1), 80-82.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en alimentos. *ALAN*, 54(2).
- MO BIO. (2014). PowerSoil DNA Isolation Kit. Instruction Manual. *MO BIO*, 24. Obtenido de <https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12888.pdf>
- Nagarajan, J., Nagasundara Ramanan, R., Eshwaraiah, M., Galanakis, C. M., & Prasad Krishnamuthy, N. (2014). Carotenoids. doi:10.1016/B978-0-12-805257-0.00008-9
- Pérez Gálvez, A., & Garrido Fernández, J. (1997). Termodegradación de carotenoides en el pimentón. *Grasas y aceites*, 48(5), 290-296.
- Rajpert, L., Sklodowska, A., & Matlakowska, R. (2013). Biotransformation of copper from kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* LM9. *Elsevier*. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.02.022
- Reyes Martínez, I., Pérez Morales, L., Morffi García, M., & Barletta Castillo, J. E. (2013). Aislamiento de *Rhodotorula*. Presentación de un caso en pacientes con leucemia mieloide aguda. *Medisur*, 11(5), 542-545.
- Rodríguez-Amaya, D. B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods*. Campinas, Brasil: Washintong, D. C.
- Sadat Naghavi, F., Hanachi, P., & Saboora, A. (2014). Effect of temperature, pH and salinity on carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa*. *Research in Biotechnology*, 5(4), 01-04.

- Samuel. (2012). Yeast banking- #3 Isotonic. *Eureka Brewing*. Obtenido de <https://eurekabrewing.wordpress.com/2012/09/05/yeast-banking-3-isotonic-sodium-chloride/>
- Schiedt, K., & Liaaen-Jensen, S. (1995). *Insolation and analysis* (Vol. 1). (G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander, Edits.) Basilea: Birkhauser Verlag.
- Simbro, M. J., Power, D. A., Miller, S. M., Wilson, G. E., & Johson, J. A. (2009). *Difco & BBL Manual* (2da ed.). Sparks, Maryland, USA: Copyright. Obtenido de http://galachem.ru/upload/iblock/c79/difcoblmanual_2nded.pdf
- Soria Melguizo, D. F. (2009). *Ficha Técnica: 771642*. Madrid. Obtenido de www.f-soria.es
- Tuon, F. F., & Costa, S. F. (2008). *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Iberoamericana de Micología*, 25, 135-140.
- Turk, M., Abramovic, Z., Plemenitas, A., & Guden-Cimerman, N. (2007). Salt stress and plasma-membrane fluidity in selected extremophilic yeast and-like fungi. *Federation of European Microbiological Societies*, 7, 550-557. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00209.x
- Uribe Gutiérrez, L. (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora (Tesis de Tercer Nivel). *Pontificia Universidad Javeriana*, 39-40. Obtenido de <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis276.pdf>
- Wagner, L. A., & Warthesen, J. J. (1995). Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *Journal of Food Science*, 60, 1048-1052.
- Wirth, F., & Goldani, L. Z. (2012). Epidemiology of *Rhodotorula*: An emerging pathogen. *Hindawi*, 7. doi:10.1155/2012/465717
- Xian Lau, W., Carvajal-Zarrabal, O., Nolasco-Hipólito, C., Kohei, M., & Al-Abideen Gregory, Z. (2011). Production of pigment by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 14(4), 344-350. doi:10.21161/mjm.144188

ANEXOS

Anexo 1: Parroquia Jima

San Miguel de Jima es parroquia del cantón Sígsig ubicada en el sur Oriente de la provincia del Azuay. Se encuentra constituida por altitudes que van desde los 2.600 m.s.n.m a 3.620 m.s.n.m. Los asentamientos poblacionales se ubican en su mayoría entre los 2.600 m.s.n.m y 3.000 m.s.n.m en los cuales se dispone de aproximadamente 2.794 hectáreas productivas. La temperatura en invierno es de 4 ° C a 8 ° C y ocasionalmente puede llegar a 0 ° C, mientras que, en el verano algunas comunidades pueden llegar a temperaturas superiores a 20 ° C. La humedad relativa es superior a 80 %. Jima es caracterizado por ser productor lechero y de ganado de engorde. La leche es el principal producto que se comercializa, seguido del ganado de engorde y productos derivados de la leche como el queso fresco y queso semimaduro (GAD-Sígsig y GAD-Jima, 2012)

Anexo 2: Proyecto 2017-106

“Selección de bacterias autóctonas con beneficios potenciales a partir de lácteos artesanales de la parroquia Jima”

El muestreo de los quesos frescos y semimaduros se realizó en las pequeñas fábricas artesanales de la parroquia Jima y el proceso de aislamiento y cultivo microbiano se desarrolló en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

Los objetivos del proyecto 2017-106 con el Plan Nacional del Buen Vivir son:

- Mejorar la calidad de vida de la población.
- Consolidar el sistema económico social y solidario, de forma sostenible.

El impacto de este proyecto se basa y se enfoca en fortalecer la línea estratégica de investigación de Microbiología y Seguridad Alimentaria, el cual permitirá disponer de una colección de cepas de bacterias autóctonas con potencial para el desarrollo de bioproductos. Se contará con bacterias de características importantes para la fermentación de alimentos como la actividad proteolítica y lipolítica. Se determinarán las cepas de bacterias pigmentadas con estabilidad a factores relacionados con la elaboración de los alimentos como variaciones de pH y temperatura lo que permitirá tener mayores conocimientos sobre las aplicaciones en la elaboración de alimentos con pigmentos naturales más apreciados por los consumidores y alternativos a los artificiales. La utilización futura de las bacterias seleccionadas permitirá la producción de alimentos con características uniformes, contribuirá a la conservación de su

especificidad y la generación de nuevos productos, así como también la posibilidad de optar en el futuro por una denominación de origen protegido. La aplicación de nuevas estrategias, derivadas de esta investigación, en la elaboración de alimentos artesanales permitirá una mayor aceptación por parte de los consumidores y servirá para dinamizar la economía de las comunidades dedicadas a la elaboración de este tipo de alimentos

Anexo 3: Método de extracción del ADNg por el kit de MO BIO
Método de extracción del ADNg por el kit de MO BIO

Para trabajar con una mayor cantidad de células y obviar el primer paso del protocolo del kit de MO BIO; se hizo un pellet con 3 mL de cultivo fresco de levadura en un tubo Eppendorf estéril de 1,5mL. En cada etapa se tomó 1 mL de cultivo fresco de levadura y se centrifugó a 4.400 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Este proceso se repitió tres veces. Luego se procedió a lavar el sedimento con agua estéril hasta obtener un sobrenadante transparente el cual se descartó por completo.

Protocolo de usuario experimentado

1. Agregue 1,8mL de cultivo de levadura a un tubo de recolección de 2 mL (provisto). Centrifugue a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Descarte el sobrenadante y centrifugue nuevamente los tubos a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente y elimine completamente el sobrenadante con una pipeta.
2. Resuspenda el sedimento celular en 300 µL de solución MicroBead y agite suavemente para mezclar y transfiera las células resuspendidas en un tubo MicroBead.
3. Compruebe la solución MD1. Si la solución MD1 se ha precipitado, caliente la solución a 60°C hasta que el precipitado se haya disuelto. Agregue 50 µL de la solución MD1 al tubo MicroBead.
4. Fije los tubos horizontalmente con cinta adhesiva en un vortex y vortexee a velocidad máxima por 10 minutos.
5. Centrifugue los tubos a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Precaución: asegúrese de no exceder los 10.000 x g, ya que los tubos pueden romperse.
6. Transfiera el sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 mL (provisto).
7. Nota: espere de 300 a 350 µL de sobrenadante.
8. Agregue 100 µL de solución MD2 al sobrenadante. Vórtice durante 5 segundos. Luego conserve a 4°C por 5 minutos.
9. Centrifugue los tubos a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g.
10. Evitando el sedimento transfiera todo el volumen del sobrenadante a un tubo limpio de recolección de 2 mL (provisto). Espere aproximadamente 450 µL de volumen.
11. Agite para mezclar la solución MD3 antes de usar. Añada 900 µL de la solución MD3 al sobrenadante y vortexee por 5 segundos.

12. Transfiera 700 μ L en un filtro giratorio y centrifugue a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Deseche el flujo, agregue el sobrenadante restante al filtro giratorio y centrifugue a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Nota: se requiere un total de 2 a 3 cargas por cada muestra procesada. Deseche todo el flujo.
13. Agregue 300 μ L de MD4 y centrifugue a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g.
14. Descarte el flujo.
15. Centrifugue a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g.
16. Teniendo en cuenta que no debe salpicar liquido en la canasta del filtro giratorio, coloque el filtro giratorio en un tubo limpio de recolección de 2 mL (provisto).
17. Agregue 50 μ L de la solución de MD5 al centro de la membrana blanca del filtro.
18. Centrifugue a temperatura ambiente por 30 segundos a 10.000 x g.
19. Deseche el filtro giratorio. El ADN en el tubo ahora está listo para cualquier aplicación. No se requiere más pasos.

Se recomienda almacenar el ADN en condiciones de congelación (- 20 ° C). La solución MD5 no contiene EDTA.

Anexo 4: Amplificación del ADNr en gel de electroforesis

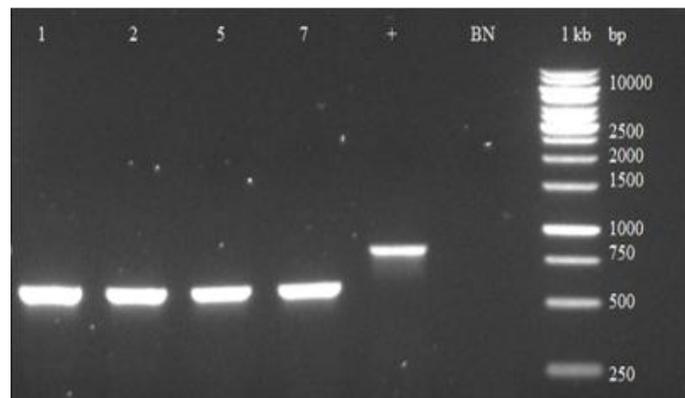
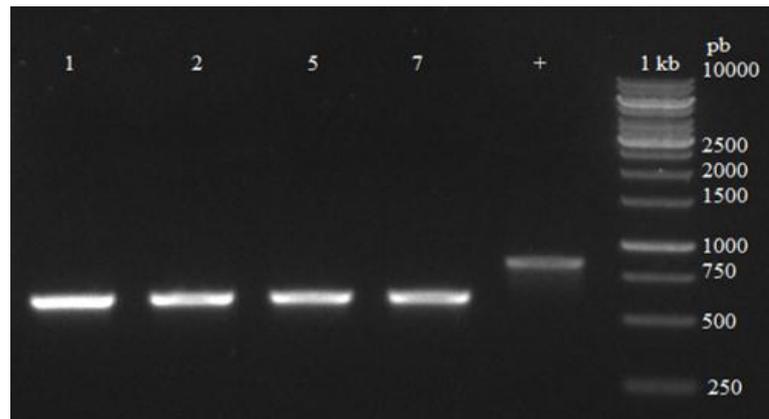
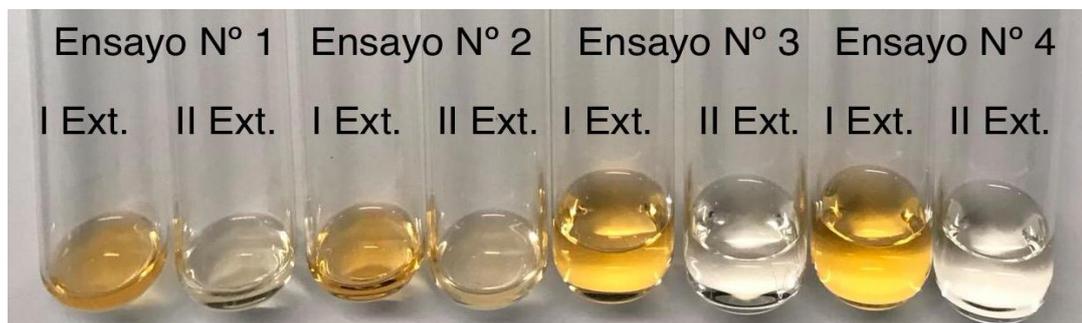


Figura 5: Amplificación del ADNr en gel de electroforesis

De derecha a izquierda; en el carril 1, TrackIt™ 1Kb DNA Ladder; carril 2, control negativo (BN, Blanco); carril 3, control positivo (+, *Saccharomyces cerevisiae*) y desde el carril 4 al 7, amplificones codificados de acuerdo a la cepa en estudio; observado en gel de agarosa a través de luz UV.

Anexo 5: Purificación del producto de PCR en gel de electroforesis**Figura 6:** Purificación de PCR en gel de electroforesis

De derecha a izquierda; en el carril 1, TrackIt™ 1Kb DNA Ladder; carril 3, control positivo (+, *Saccharomyces cerevisiae*) y desde el carril 3 al 6, amplificones codificados de acuerdo a la cepa en estudio; observado en gel de agarosa a través de luz UV.

Anexo 6: Primera y segunda extracción (I y II Ext.) de carotenoides totales con etanol absoluto frío después del proceso osmosis con NaCl**Figura 7:** Primera y segunda extracción (I y II Ext.) de carotenoides totales con etanol absoluto frío después del proceso osmosis con NaCl

En el ensayo N° 1, se deshidrató las células con 0,9% de NaCl y se extrajo con 1 mL de etanol absoluto frío; en el ensayo N° 2 se deshidrató las células con 15 % de NaCl y se extrajo con 1 mL de etanol absoluto frío; en el ensayo N° 3 se deshidrató las células con 0,9% de NaCl y se extrajo con 3 mL de etanol absoluto frío y en el ensayo N° 4 se deshidrató las células con 15 % de NaCl y se extrajo con 3 mL de etanol absoluto frío; los carotenoides de los 4 ensayos se extrajeron por 3 veces a 4.400 rpm por 10 minutos a 4 ° C, en la tercera extracción el líquido fue transparente.

Anexo 7: Muestras de los carotenoides totales en etanol absoluto y en 38 % de etanol con 30 % de sacarosa para evaluar bajo las condiciones de luz solar, a temperatura ambiente y - 20 ° C

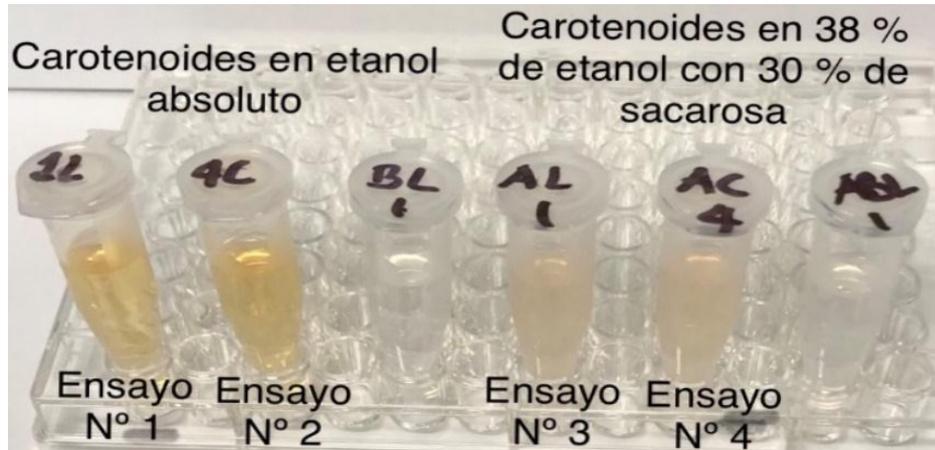


Figura 8: Muestra de los carotenoides totales en etanol absoluto y en 38 % de etanol con 30 % de sacarosa para evaluar bajo las condiciones de luz solar, a temperatura ambiente y - 20 ° C

En el ensayo N° 1 (1L), a los carotenoides totales se disolvió en etanol absoluto y en el ensayo N° 3 (AL 1), a los carotenoides totales se disolvió en 38 % de etanol con 30 % de sacarosa; estos dos experimentos se expusieron a luz solar por 96 horas y los ensayos N° 2 (4C), los carotenoides totales se disolvieron en etanol absoluto y el ensayo N° 4 (AC 4), los carotenoides se disolvió en 38 % de etanol con 30 % de sacarosa; estos dos experimentos se expusieron a - 20 ° C por 96 horas. Cada experimento tuvo su control negativo (BL1 y ABL 1, blancos).

Anexo 8: Medio de Agua de Sales (SW)

Composición para la Solución Stock al 30 % (p/v) de sales:

NaCl.....	234.0 g
MgCl ₂ 6H ₂ O.....	39.0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	61.0 g
KCl.....	6.0 g
NaBr.....	0.7 g
NaHCO ₃	0.2 g
CaCl ₂ 2H ₂ O.....	1.0 g
Agua destilada csp.....	1000.0 mL