

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Monascus purpureus*
EN MEDIOS DE CULTIVO A BASE DE HARINA DE QUINUA
ENRIQUECIDA CON DIFERENTES SUPLEMENTOS”**

Presentada por:

EVELYN MICHELLE QUISPE RIVERA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Lima – Perú

2023

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

EVELYN_MICHELLE_QUISPE_RIVERA_TESIS_DE_BIOLOGÍA

INFORME DE ORIGINALIDAD

1 %	1 %	0 %	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	pdfs.semanticscholar.org Fuente de Internet	<1 %
2	core.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
3	sciforum.net Fuente de Internet	<1 %
4	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
5	repositorio.espe.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
6	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
7	Nanis Gomah, H. Abdel-Raheam. "Stability and Components Identification of Monascus ruber's pigments", Journal of Food and Dairy Sciences, 2017 Publicación	<1 %
8	submission.intelaquares.com Fuente de Internet	<1 %

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Monascus purpureus*
EN MEDIOS DE CULTIVO A BASE DE HARINA DE QUINUA
ENRIQUECIDA CON DIFERENTES SUPLEMENTOS”**

Presentada por:

EVELYN MICHELLE QUISPE RIVERA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Mg. Sc. Patricia Angélica Moreno Díaz de Saco
PRESIDENTE

Blgo. Roberto Raúl Ramos Chaupín
MIEMBRO

Mg. Sc. Beatriz Alma Hatta Sakoda
MIEMBRO

Blgo. Juan Gabriel Juscamaita Morales
ASESOR

Dr. Marcial Ibo Silva Jaimes
CO-ASESOR

DEDICATORIA

A mis maravillosos padres Carmen y Bill por su cálido amor, confianza y gran apoyo incondicional que siempre me brindan.

A mi querida hermana Alison que me inspira, motiva, enseña a seguir mejorando como persona y compartir el corazón molinero.

A mi tío Pedro por el apoyo incesante y consejos de vida.

A mi novio Franz, por el sinergismo que hacemos como equipo, mi compañero de vida, gracias por siempre motivarme a seguir adelante y compartir el amor por nuestra carrera de Biología.

AGRADECIMIENTOS

A mi mentor, amigo y asesor Blgo. Juan Juscamaita por todo el apoyo, enseñanzas, motivación, consejos, amistad y experiencias compartidas.

A mi co-asesor el Dr. Marcial Silva por darme la oportunidad de formar parte del equipo *Monascus* en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos, por su apoyo, confianza y enseñanzas.

A los miembros de mi jurado integrado por: Mg. Sc. Patricia Moreno; Blgo. Roberto Ramos y Mg. Sc. Beatriz Hatta por el apoyo brindado, aportes en la revisión y culminación de la presente investigación.

Al Dr. Christian Encina, por su apoyo en los análisis estadísticos de la tesis.

A mis futuros suegros Gladys y Felipe, por apoyarme como a una hija desde el día en que me conocieron.

A cada uno de mis grandes amigos del Laboratorio de Biotecnología Ambiental-Biorremediación y del Laboratorio de Microbiología de Alimentos, por su amistad y apoyo para culminar con la presente tesis. En especial a Natalia Vega, Michel Tômas, Sonia Quiroz, Tyfani Vera y Verónica Rodríguez.

A PROInnovate en el marco del proyecto I+D+i Reto Bio [contrato IDIBIO-1-P-306-17 INNÓVATE PERÚ] denominado: “Desarrollo y validación de un proceso de fermentación con *Monascus purpureus* para la obtención de harinas funcionales pigmentadas de granos andinos y su aplicación en productos alimentarios” por el financiamiento otorgado para la realización de la presente investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Monascus purpureus</i>	3
2. 1. 1. Taxonomía	3
2. 1. 2. Morfología y fisiología	4
2. 1. 3. Factores requeridos para el cultivo de <i>Monascus</i>	6
2. 1. 4. N-acetilglucosamina	8
2. 1. 5. Pigmentos.....	9
2. 1. 6. Citrinina	10
2.2. Suplementos	11
2. 1. 7. Glucosa	11
2. 1. 8. Fructosa.....	12
2. 1. 9. Melaza.....	12
2. 1. 10. Hidrolizado de pescado.....	13
2. 1. 11. Fermentado de pescado.....	13
2. 1. 12. Glutamato monosódico	14
2. 1. 13. Cloruro de sodio.....	15
2.3. Quinoa.....	15
2. 1. 14. Descripción botánica.....	15
2. 1. 15. Clasificación taxonómica.....	16
2. 1. 16. Composición nutricional.....	17
2. 1. 17. Diversos productos a partir de la quinoa	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Materiales.....	19
3. 1. 1. Material biológico.....	19

3. 1. 2. Medios de cultivo.....	19
3.2. Metodología	21
3. 1. 3. Lugar de ejecución.....	21
3. 1. 4. Obtención del microorganismo y mantenimiento.....	21
3. 1. 5. Producción del inóculo	21
3. 1. 6. Determinación de la velocidad de crecimiento de <i>M. purpureus</i>	21
3. 1. 7. Determinación de biomasa fúngica.....	23
3. 1. 8. Medición de los pigmentos producidos por <i>Monascus</i>	24
3. 1. 9. Diseño experimental y análisis estadístico	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
4.1. Evaluación de la velocidad de crecimiento de <i>M. purpureus</i> en diferentes medios de cultivo.	27
4. 1. 1. Efecto del suplemento glucosa (S1) en la velocidad de crecimiento radial.	27
4. 1. 2. Efecto del suplemento fructosa (S2) en la velocidad de crecimiento radial	30
4. 1. 3. Efecto del suplemento melaza (S3) en la velocidad de crecimiento radial	32
4. 1. 4. Efecto del suplemento fermentado de pescado (S4) en la velocidad de crecimiento radial.....	34
4. 1. 5. Efecto del suplemento hidrolizado de pescado (S5) en la velocidad de crecimiento radial.....	36
4. 1. 6. Efecto del suplemento glutamato monosódico (S6) en la velocidad de crecimiento radial.....	39
4. 1. 7. Efecto del suplemento cloruro de sodio (S7) en la velocidad de crecimiento radial.	41
4. 1. 8. Comparación de las mayores velocidades de crecimiento de <i>M.</i> <i>purpureus</i> en los medios de cultivo suplementados	43
4.2. Cuantificación de biomasa por N-acetilglucosamina y peso seco	44

4.3. Densidad óptica de pigmentos producidos por <i>M. purpureus</i>	46
V. CONCLUSIONES	51
VI. RECOMENDACIONES	52
VII. BIBLIOGRAFÍA	53
VIII. ANEXOS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Monascus purpureus</i>	4
Tabla 2. Clasificación taxonómica de la quinua	16
Tabla 3. Comparación de los valores nutricionales de la quinua	17
Tabla 4. Velocidad de crecimiento (mm h^{-1}) de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con glucosa.	28
Tabla 5. Velocidad de crecimiento de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con fructosa.....	30
Tabla 6. Velocidad de crecimiento de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con melaza	33
Tabla 7. Velocidad de crecimiento de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con fermentado de pescado.....	35
Tabla 8. Velocidad de crecimiento de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con hidrolizado de pescado.....	37
Tabla 9. Velocidad de crecimiento de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con glutamato monosódico.	39
Tabla 10. Velocidad de crecimiento de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con cloruro de sodio.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caracteres culturales de especies de <i>Monascus</i> en diferentes medios de agar y condiciones de incubación.	5
Figura 2. Biosíntesis asumida para sintetizar los seis pigmentos clásicos de <i>M. purpureus</i>	10
Figura 3. Estructura química del glutamato monosódico	15
Figura 4. Sección longitudinal de la semilla de quinua.....	16
Figura 5. Etapas del diseño experimental para evaluar el crecimiento de <i>M. purpureus</i> en medios de cultivo a base de harina de quinua enriquecido con diferentes suplementos en placas Petri.....	26
Figura 6. Crecimiento radial de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con glucosa al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días.....	29
Figura 7. Crecimiento radial de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con fructosa al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días.....	31
Figura 8. Crecimiento radial de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con melaza al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días.....	34
Figura 9. Crecimiento radial de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con fermentado de pescado al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días.....	36
Figura 10. Crecimiento radial de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con hidrolizado de pescado al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días.....	38
Figura 11. Crecimiento radial de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con glutamato monosódico al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días.....	40
Figura 12. Crecimiento radial de <i>M. purpureus</i> en AHQ suplementado con cloruro de sodio al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días	43
Figura 13. A) Aspecto visual de los micelios de <i>M. purpureus</i> comparados a las 288h de los mejores tratamientos por suplemento. B) Gráfica de los mayores radios alcanzados por <i>M. purpureus</i> comparando los mejores tratamientos por suplemento a las 288h.	44

Figura 14. Producción de biomasa fúngica como N-acetilglucoamina y peso seco utilizando el suplemento glutamato monosódico al 0.5% y pH 5 (S6T1) en medio de cultivo a base de harina de quinua.	45
Figura 15. Producción de biomasa fúngica como N-acetilglucosamina y peso seco utilizando el suplemento cloruro de sodio al 0.5% y pH 6 (S7T2) en medio de cultivo a base de harina de quinua.	46
Figura 16. Producción de pigmentos utilizando el suplemento glutamato monosódico al 0.5% y pH 5 (S6T1) en medio de cultivo a base de harina de quinua.....	48
Figura 17. Producción de pigmentos utilizando el suplemento cloruro de sodio al 0.5% y pH 6 (S7T2) en medio de cultivo a base de harina de quinua.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Instrucciones para la resuspensión de cultivos liofilizados de CECT.	67
Anexo 2: Análisis proximal de hidrolizado de pescado: S5 (A), fermentado de pescado: S4 (B) y melaza: S3 (C).	69
Anexo 3: Representación gráfica de los trazos perpendiculares en el reverso de las placas Petri para medir el crecimiento micelial durante 12 días.	70
Anexo 4: Curva estándar de N-acetilglucosamina.	70
Anexo 5: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento glucosa a las 288 horas.	71
Anexo 6: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento fructosa a las 288 horas.	72
Anexo 7: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento melaza a las 288 horas.	73
Anexo 8: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento fermentado de pescado a las 288 horas.	74
Anexo 9: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento hidrolizado de pescado a las 288 horas.	75
Anexo 10: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento glutamato monosódico a las 288 horas.	76
Anexo 11: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento cloruro de sodio a las 288 horas.	77
Anexo 12: ANOVA para los mayores valores de radios (mm) alcanzados por <i>M.</i> <i>purpureus</i> comparando los mejores tratamientos por suplemento a las 288 horas.	78
Anexo 13: ANOVA para N acetilglucosamina (mg) y biomasa en peso seco (g) de S6T1.	78
Anexo 14: Comparación de resultados obtenidos por cuantificación de N- acetilglucosamina (mg) y biomasa en peso seco (g) de S6T1.	80

Anexo 15: ANOVA para N-acetilglucosamina (mg) y biomasa en peso seco (g) de S7T2.....	80
Anexo 16: Comparación de resultados obtenidos por cuantificación de N-acetilglucosamina (mg) y biomasa en peso seco (g) de S7T2.	81
Anexo 17: ANOVA para densidad óptica de pigmentos S6T1.....	82
Anexo 18: Comparación de resultados obtenidos por densidad óptica de pigmentos S6T1.....	84
Anexo 19: ANOVA para densidad óptica de pigmentos S7T2.....	84
Anexo 20: Comparación de resultados obtenidos por densidad óptica de pigmentos S7T2.....	86

RESUMEN

Se evaluó el crecimiento de *M. purpureus* en medios de cultivo a base de harina de quinua enriquecida con diferentes suplementos midiendo la velocidad de crecimiento, biomasa y pigmentos miceliales. La velocidad de crecimiento radial (V_{cr}) (mm h^{-1}) se calculó por regresión lineal de los radios miceliales medidos con vernier digital durante los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12. La biomasa fúngica se midió de forma directa e indirectamente por peso seco (g) y N-acetilglucosamina (mg) respectivamente, la biomasa indirecta se midió por espectrofotometría UV-Vis a $\lambda=537$ nm y la conversión se realizó con la curva de calibración. La medición de los pigmentos se calculó mediante espectrofotometría UV/Vis como (UA/ml) a $\lambda=400$, 470 y 500 nm para los pigmentos amarillos, anaranjados y rojos respectivamente. Los resultados demostraron que hubo diferencias significativas en la V_{cr} siendo seleccionado un tratamiento por suplemento que presentó el valor más alto de V_{cr} ordenados de mayor a menor como S7T2, S3T2, S1T6, S5T2, S2T3, S4T2 y S6T1. En cuanto a la biomasa fúngica se analizó para los tratamientos S6T1 y S7T2 donde la N-acetilglucosamina y biomasa por peso seco fueron 1.41 y 2.26 veces en S7T2 respecto a S6T1 al día 12. Con respecto a los pigmentos de los tratamientos S6T1 y S7T2 alcanzaron la producción de pigmentos amarillos, anaranjados y rojos de 1.99, 0.84 y 1.23 veces en S7T2 respecto a S6T1 al día 12. Por lo tanto, el uso de medios de cultivo en base de harina de quinua suplementada ya sea con glucosa, fructosa, melaza, fermentado de pescado, hidrolizado de pescado, glutamato monosódico y cloruro de sodio permitieron el crecimiento de *M. purpureus*, siendo el primer estudio reportado donde se utilizó un pseudocereal para el desarrollo fúngico en placas Petri.

Palabras clave: *Chenopodium quinoa*, regresión lineal, biomasa fúngica, pigmentos naturales.

ABSTRACT

The growth of *M. purpureus* on quinoa flour media enriched with different supplements was evaluated by measuring growth rate, biomass and mycelial pigments. The radial growth rate (V_{cr}) (mm h⁻¹) was calculated by linear regression of the mycelial radii measured with digital vernier during days 2, 4, 6, 8, 8, 10 and 12. The fungal biomass was measured directly and indirectly by dry weight (g) and N-acetylglucosamine (mg) respectively, the indirect biomass was measured by UV-Vis spectrophotometry at $\lambda=537$ nm and the conversion was performed with the calibration curve. Pigment measurement was calculated by UV-Vis spectrophotometry as (AU/ml) at $\lambda=400$, 470 and 500 nm for yellow, orange and red pigments respectively. The results showed that there were significant differences in V_{cr} with one treatment per supplement being selected as having the highest V_{cr} value ordered from highest to lowest as S7T2, S3T2, S1T6, S5T2, S2T3, S4T2 and S6T1. Fungal biomass was analysed for treatments S6T1 and S7T2 where N-acetylglucosamine and biomass per dry weight were 1.41 and 2.26 times higher in S7T2 than in S6T1 at day 12. Regarding pigments, S6T1 and S7T2 treatments achieved yellow, orange and red pigment production of 1.99, 0.84 and 1.23 times in S7T2 with respect to S6T1 at day 12. Therefore, the use of quinoa flour-based culture media supplemented with either glucose, fructose, molasses, fermented fish, fish hydrolysate, monosodium glutamate and sodium chloride allowed the growth of *M. purpureus*, being the first reported study where a pseudocereal was used for fungal growth in Petri dishes.

Keywords: *Chenopodium quinoa*, linear regression, fungal biomass, natural pigments.

I. INTRODUCCIÓN

Monascus purpureus es un hongo filamentoso conocido como “levadura de arroz rojo”, “koji de arroz rojo”, “ang kak”, “akakoji”, “anka”, se consume en Asia como un ingrediente de la comida tradicional, colorante de comida y uso medicinal. Se viene utilizando desde el año 800 d.C. (Hong *et al.* 2008). *Monascus* también se ha utilizado para hacer alimentos fermentados, queso de soja roja, vino tinto, medicamentos y conservas de carne (Akihisa *et al.*, 2005).

La biomasa fúngica de *Monascus* se estudia debido a su relación con la productividad y se puede medir directa o indirectamente mediante la cuantificación de la N-acetil-D-glucosamina (Chysirichote *et al.*, 2014). Este aminoazúcar está relacionado a la salud humana como en la protección y reparación de cartílagos, articulaciones, utilizado ampliamente en productos farmacéuticos, alimentos funcionales y bebidas deportivas (Pei *et al.*, 2022).

Los pigmentos que produce *Monascus* tienen un alto valor económico en todo el mundo, además de que la producción de estos metabolitos es manejable en sustratos no costosos y tienen buena solubilidad en agua y etanol. Los investigadores intentan reemplazar el colorante alimentario sintético por pigmentos naturales de *Monascus* (Júzlová *et al.*, 1996) ya que mejoran las características sensoriales en los alimentos. En farmacología y medicina, estos pigmentos tienen amplios usos en la prevención y el tratamiento de numerosas enfermedades humanas (Carvalho *et al.*, 2005) como antioxidante, antihipertensivo, antiinflamatorio, neuroprotector, antihiperlipidémico, antitumoral, antibiosis, entre otros (Bogsrud *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2017).

Por otro lado, la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) ha sido reconocido como un cultivo alternativo a los cereales debido a su excelente valor nutricional. En la actualidad, se cultiva principalmente en Perú, Bolivia, Ecuador y Chile, desde donde se exporta (Fabio & Parraga, 2017), siendo Perú el principal productor, seguido de Bolivia (59.8% y 38.8% respectivamente). Este grano ganó cada vez más atención, llegando a ser promovida en gran

medida por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, que dedicó el año 2013 a esta planta (Ruiz *et al.*, 2014).

De esta investigación se espera difundir información básica y novedosa sobre el crecimiento de *M. purpureus* en un nuevo medio de cultivo a base de harina de quinua suplementado con fuentes carbonadas, nitrogenadas y sales. Con este conocimiento se pueden promover futuras investigaciones como producción a gran escala de biomasa, pigmentos u otros metabolitos de interés comercial, considerando factores que influyen en el crecimiento y producción de pigmentos como la presencia de oxígeno, fuente de nitrógeno, fuente de carbono, morfología del hongo, temperatura, pH, y medio de cultivo (Bühler *et al.*, 2015).

Objetivo general:

Evaluar el crecimiento de *Monascus purpureus* en medios de cultivo a base de harina de quinua enriquecido con diferentes suplementos en placas Petri.

Objetivos específicos:

- i. Evaluar la velocidad de crecimiento de *Monascus* en diferentes medios de cultivo.
- ii. Determinar la biomasa fúngica cuantificando la N-acetilglucosamina y peso seco.
- iii. Evaluar los pigmentos producidos por *Monascus* a través de la medición de la densidad óptica.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Monascus purpureus*

2.1.1. Taxonomía

Van Tieghem en 1884 describió el género *Monascus* (Barbosa *et al.*, 2017; Pan & Hsu, 2014), posteriormente *M. purpureus* se aisló en 1895 a partir del arroz de moho rojo obtenido del mercado de Java en Indonesia (Dufossé, 2009). *Monascus* es xerófilo que crece en una amplia variedad de sustratos naturales (Silbir & Goksungur, 2019), se encuentra en la naturaleza como contaminante de cereales, ensilaje, almidón y leche de vaca (Martínková & Patáková, 1999).

A la actualidad se introdujeron diez especies nuevas de *Monascus*: *M. albidulus*, *M. floridanus*, *M. sanguineus*, *M. argentinensis*, *M. aurantiacus*, *M. eremophilus*, *M. fumeus*, *M. lunisporas*, *M. pallens* y *M. rutilus*, con ello el género se volvió más diverso morfológicamente y fisiológicamente (Barbosa *et al.*, 2017). Se han registrado 58 cepas de *Monascus* en la American-Type Culture Collection y la mayoría de las cepas pertenecen a sólo tres especies: *M. pilosus*, *M. purpureus* y *M. ruber* (Lin *et al.*, 2023; Pan & Hsu, 2014; Silbir & Goksungur, 2019).

La taxonomía y su relación con los metabolitos secundarios de *Monascus* es importante para la industria alimentaria (Lin *et al.*, 2023), su clasificación (Tabla 1) fue resultado de una investigación de caracteres culturales y microscópicos (Hawksworth & Pitt, 1983). Los estudios taxonómicos que incluyen datos de secuencias son limitados por ello la delimitación de especies se basa principalmente en características fenotípicas (Barbosa *et al.*, 2017). A la actualidad, se puede aplicar el Reconocimiento Filogenético de Especies de Concordancia Genealógica (GCPSR) para delimitar especies en el genotipo, aunque en *Monascus* aún no se ha aplicado (Barbosa *et al.*, 2017).

Tabla 1. Taxonomía de *Monascus purpureus*

Dominio	Eukaryota eukaryotes
Reino	Fungi
Subreino	Dikarya
Filo	Ascomycota
Subfilium	Pezizomycotina
Clase	Eurotiomycetes
Subclase	Eurotiomycetidae
Orden	Euritiales
Familia	Monascaceae
Género	<i>Monascus</i>

FUENTE: Velázquez, (2013).

2. 1. 2. Morfología y fisiología

El hongo *M. purpureus*, produce colonias compactas llamadas micelio que a su vez acumula pigmentos. Este hongo tiene reproducción sexual por la formación de cleistotecio con ascosporas y reproducción asexual mediante la formación de conidios. En especies como *Monascus* ambas formas de reproducción es una estrategia de crecimiento eficaz (Barbosa *et al.*, 2017).

Según caracteres morfológicos *Monascus* puede dividirse en dos grupos: clado *M. floridanus* donde la mayoría de especies pertenecientes a este grupo crecen restringido en los medios de cultivo MEA (agar extracto de malta), PDA (agar papa dextrosa), CYA (agar extracto de levadura Czapek), CMA (agar harina de maíz), OA (agar avena) y YES (agar extracto de levadura sacarosa), además de un crecimiento nulo o restringido en CYA incubado a 37 °C. Las colonias tienen tonos marrones, los conidios están pigmentados de marrón y el micelio es de color blanco a marrón oliváceo. El otro grupo es el clado *M. ruber* que presentan un mayor crecimiento en los medios de cultivo MEA, PDA, CYA, CMA, OA y YES a 25 °C y CYA incubado a 37 °C, las colonias son de color blanco (jóvenes) y cambian a tonos rojo pardusco, y de naranja a rojo después de 7 a 10 días de incubación (Barbosa *et al.*, 2017). Algunos caracteres culturales de nueve especies de *Monascus* sp se presentan en la Figura 1, desarrolladas en diferentes medios de cultivo.

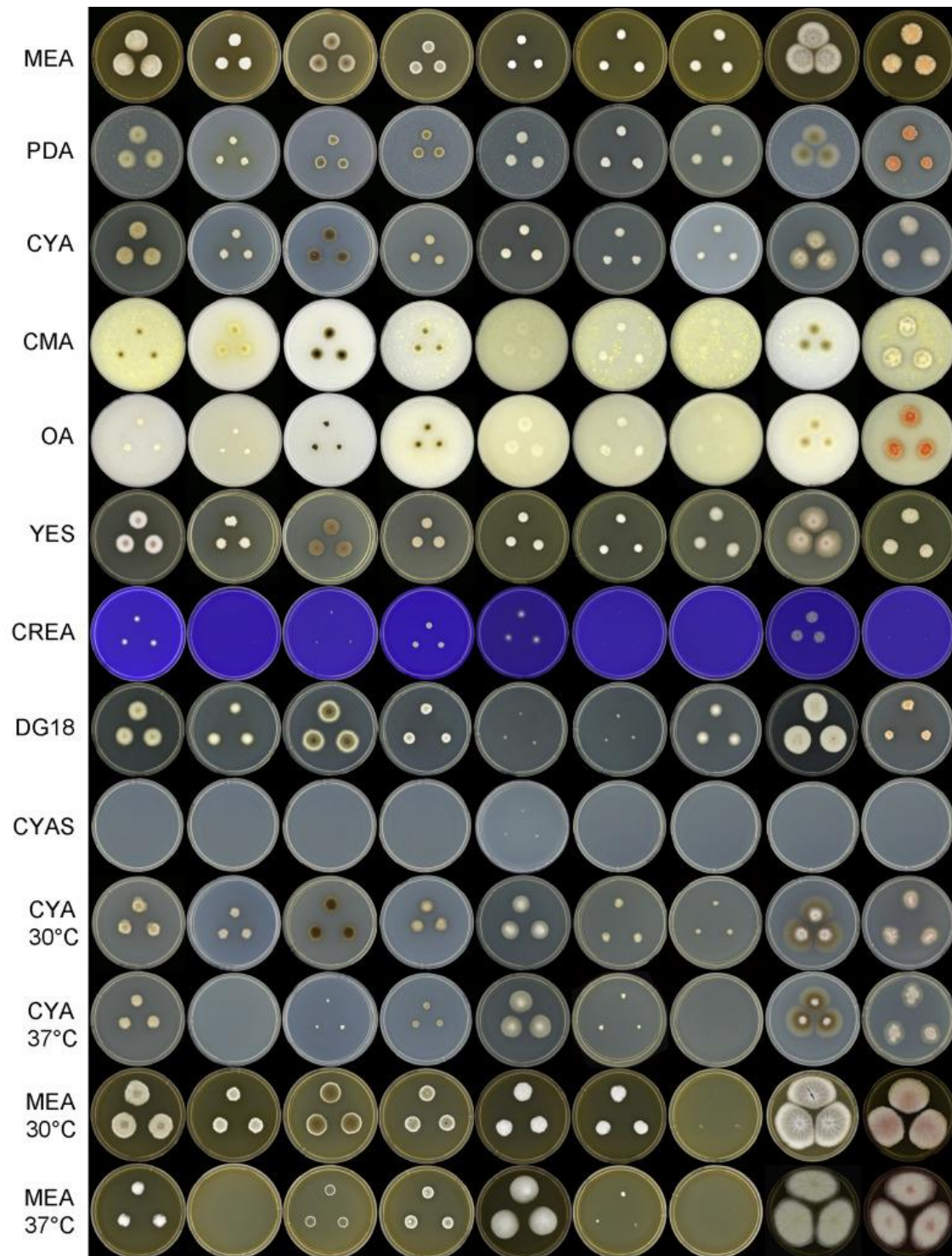


Figura 1. Caracteres culturales de especies de *Monascus* en diferentes medios de agar y condiciones de incubación. De izquierda a derecha: *M. lunisporas*, *M. flavipigmentosus*, *M. recifensis*, *M. mellicola*, *M. pallens*, *M. floridanus*, *M. argentinensis*, *M. ruber* y *M. purpureus*.

FUENTE: Barbosa *et al.* (2017).

2. 1. 3. Factores requeridos para el cultivo de *Monascus*

El crecimiento, producción y estructuras de pigmentos de *Monascus* dependen de factores como el medio de cultivo, temperatura, presencia de oxígeno, pH, fuente nitrogenada, morfología, reología del medio de cultivo (Bühler *et al.*, 2015; Silbir & Goksungur, 2019).

A. Medios de cultivo

Los seres vivos se adaptan a las condiciones ambientales para sobrevivir modificando sus procesos biológicos. Sus respuestas se evalúan con frecuencia en el laboratorio, *in vitro*, bajo el control de cada factor ambiental de interés (Bohórquez & Rico, 2019).

El cultivo de hongos puede darse con medios similares para bacterias, por ello se han diseñado estrategias como elevar la concentración de azúcar con un pH bajo para inhibir gran parte de bacterias sin afectar a los hongos. Varios tipos de medios de cultivo naturales existen para estos microorganismos como infusiones vegetales, jugos de frutas o granos de cereales usados para estudios especializados mas no para uso frecuente; también existen medios sintéticos constituidos por lo general por carbohidratos, peptona y agar, siendo el más conocido: agar Sabouraud (contiene maltosa, peptona y agar, a un pH de 5.6 y una alta concentración de azúcar). Otro medio conocido es el agar papa dextrosa (infusión de papa más dextrosa o glucosa y agar) que combina en su formulación ingredientes de un medio natural y sintético (García, 2004).

B. Fuentes de nitrógeno y carbono

La fuente de carbono y nitrógeno es fundamental en *M. purpureus* para la producción de biomasa y pigmentos (Dikshit & Tallapragada, 2011; Tong *et al.*, 2022). Varios subproductos de la industria alimentaria que contienen carbono y nitrógeno se utilizaron para producir pigmentos de *Monascus*, como: paja de arroz, desperdicio de cerveza, granos gastados de cerveza, cáscaras de naranja, pluma de pollo, bagazo de caña de azúcar, desechos de panadería, medio a base de agua de arroz, papa en polvo, pulpa de uva, licor de maíz y trigo (Mehri *et al.*, 2021; Silbir & Goksungur, 2019).

Fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, y almidón se han utilizado para el crecimiento de *Monascus*; dextrina y almidón para la producción volumétrica de pigmentos en medios sumergidos y para la producción específica es mejor usar maltosa y glucosa. El etanol es buena fuente de carbono alternativo que produce el hongo cuando se encuentra en un medio con exceso de glucosa y oxígeno limitado (Carvalho *et al.*, 2003).

Las fuentes de nitrógeno más utilizadas para el crecimiento de *Monascus* pueden ser de origen inorgánico u orgánico, como: son $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4) \text{H}_2 \text{PO}_4$, NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, NH_4Cl , peptona, extracto de levadura, glutamato monosódico (MSG), urea y triptona (Musaalbakri *et al.*, 2005). El crecimiento celular de *M. purpureus* es mejor con fuentes de nitrógeno orgánico en comparación con las fuentes inorgánicas, en caso de ser orgánico estimulará también a la producción de pigmentos. El nitrógeno orgánico como en los aminoácidos mejora la formación de pigmentos rojos (Carvalho *et al.*, 2003; Silbir & Goksungur, 2019); las peptonas promueven el crecimiento celular y producción de pigmentos, las polipeptonas favorecen la producción de pigmentos amarillos. El nitrógeno inorgánico estimula el crecimiento celular, el amoniaco favorece la producción de pigmentos anaranjados (Carvalho *et al.*, 2003; Musaalbakri *et al.*, 2005).

C. Oxígeno

Los hongos se pueden clasificar según Cepero de García (2012) en:

- Aerobios obligados o estrictos, aquí se encuentran los hongos con crecimiento limitado si la presión parcial de oxígeno es menor al del aire; tienen metabolismo oxidativo ya que utilizan el oxígeno como último aceptor de electrones en la respiración. La mayoría de hongos son aerobios estrictos favoreciendo su crecimiento en presencia de un suministro abundante de oxígeno (García, 2004).
- Aerobios facultativos o fermentadores facultativos, los hongos crecen en condiciones aeróbicas y en ausencia de oxígeno fermentando azúcares, realizando una respiración anaeróbica donde el último aceptor de electrones no es el oxígeno sino por ejemplo el nitrato.
- Fermentadores obligados o estrictos, no presentan mitocondrias o son rudimentarias y crecen en presencia o ausencia de oxígeno, pero realizan fermentación.
- Anaerobios obligados o estrictos, no crecen en presencia de oxígeno, tienen metabolismo de fermentación mixta que producen ácido acético, fórmico, succínico y láctico.

Monascus crece en condiciones limitantes de oxígeno donde produce una mayor cantidad de etanol y CO_2 , pero menor cantidad de pigmentos; mientras que en presencia de una mayor cantidad de oxígeno disminuye la producción de etanol y aumenta la de pigmentos (Carvalho *et al.*, 2003).

D. Temperatura

Uno de los parámetros ambientales más importantes es la temperatura, que afecta el crecimiento y sobrevivencia de los microorganismos (Cervantes-Martínez *et al.*, 2017). Los hongos en su mayoría son mesófilos, crecen a temperaturas óptimas entre 22 a 30°C (García, 2004). Temperaturas altas (mayor a 45°C) durante la incubación produce estrés térmico ocasionando cambios significativos en el crecimiento del hongo y producción de metabolitos secundarios (Babitha *et al.*, 2007a).

Los pigmentos de *Monascus* para su aplicación industrial es afectado por la temperatura de incubación, si la temperatura es muy alta el hongo producirá pigmentos amarillos (Babitha *et al.*, 2007a), si la temperatura de incubación es de 30°C se obtienen pigmentos rojos estables en un amplio rango de pH (Babitha *et al.*, 2007b). Así, la temperatura favorable para el crecimiento del micelio y producción de pigmentos de *M. purpureus* es de 30°C (Dikshit & Tallapragada, 2011).

E. pH

El pH del medio es un factor indispensable para el crecimiento celular y producción de metabolitos del microorganismo (Li *et al.*, 2019). Los hongos crecen en un rango amplio de pH (Barzee *et al.*, 2021) debido a que ajustan su expresión génica metabólica, síntesis proteica y transporte/secreción para adaptarse al pH del medio que les rodea (Li *et al.*, 2019).

El pH del medio afecta la solubilidad y transporte de los nutrientes a la célula, actividad enzimática, características superficiales de la célula, lo cual en conjunto afectará el crecimiento, desarrollo y productividad de metabolitos, es por ello que dependiendo de la aplicación que se busca obtener para cada microorganismo es diferente el valor de pH óptimo (Barzee *et al.*, 2021). El pH para producir pigmentos y crecimiento micelial de *M. purpureus* en cultivo sumergido es de 5.5 (Dikshit & Tallapragada, 2011) y para la producción de pigmentos rojos el pH inicial del cultivo es adecuado en el rango de 5.5 a 9, siendo el óptimo 6.5 (Musaalbakri *et al.*, 2005).

2. 1. 4. N-acetilglucosamina

La biomasa fúngica de *Monascus* se estudia debido a su relación con la productividad y se puede medir directamente o indirectamente (Chysirichote *et al.*, 2014). Los hongos presentan una pared rígida que proporciona forma y soporte a la célula, y sin ella la célula se destruiría por las fuertes tensiones superficiales. La pared celular de los hongos es bastante

compleja, mayormente presenta un polisacárido como constituyente que puede ser quitina, escleroglucano o glucano, y según sea un hongo filamentoso o levadura variará la composición, incluso entre género y especie (Cruz, 2007).

La quitina, segundo polisacárido natural más abundante en la naturaleza después de la celulosa, contiene residuos de N-acetilglucosamina con enlaces β -(1 \rightarrow 4) en vez de residuos de glucosa (Balanta *et al.*, 2010; Cruz, 2007).

2. 1. 5. Pigmentos

Los consumidores prefieren reemplazar los pigmentos artificiales por los naturales debido a su relación con los beneficios para la salud (Zhou *et al.*, 2022). La producción de pigmentos naturales utilizando microorganismos es prometedor debido a que presentan una alta tasa de crecimiento (Ismail *et al.*, 2021). *M. purpureus* es un hongo productor de pigmentos que han sido utilizados durante siglos en los países asiáticos principalmente en la industria alimentaria, biotecnológica, farmacéutica, cosmética y textil, llegando a alcanzar 20 000 toneladas de producción al año en China (Chen *et al.*, 2017; Moghadam *et al.*, 2022; Kongruang, 2011). La industria alimentaria se ha enfocado en la producción de pigmentos naturales para su aplicación en dar color y mejorar características sensoriales (Moghadam *et al.*, 2022; Silbir & Goksungur, 2019).

Los pigmentos pueden producirse tanto en fermentación en estado sólido como en estado líquido (Pineda-Insuasti *et al.*, 2016). Por lo general, *Monascus* se cultiva en fermentación en estado sólido en sustratos como los granos, salvado de cereales, semillas y arroz (Kongruang, 2011). Como es el caso del arroz rojo o angkak que es utilizado hasta la actualidad como colorante de pescado, queso, vino, salchichas, salsas y mariscos procesados (Dikshit & Tallapragada, 2011; Kongruang, 2011), siendo el pigmento rojo el de mayor demanda para su uso en productos cárnicos en reemplazo de nitritos (Mukherjee & Singh, 2011).

Los factores que influyen en la producción de pigmentos son: temperatura, pH, composición del medio de cultivo, fuente de nitrógeno, humedad, presencia de oxígeno, y la combinación de los efectos de factores da tonalidades diferentes de los pigmentos (Pineda-Insuasti *et al.*, 2016).

Los pigmentos de *Monascus* de origen policétido con un esqueleto de azafilona común se dividen de acuerdo con su coloración principalmente en tres grupos: amarillos ankaflavina

(C₂₃H₃₀O₅) y monascina (C₂₁H₂₆O₅); anaranjados monascorubrina (C₂₃H₂₆O₅) y rubropunctatina (C₂₁H₂₂O₅); y rojos rubropunctamina (C₂₁H₂₃NO₄) y monascorubramina (C₂₃H₂₇NO₄) (Kongruang, 2011; Mukherjee & Singh, 2011; Pineda-Insuasti *et al.*, 2016). Aquellos metabolitos son una mezcla compleja de los ya mencionados pigmentos amarillos, anaranjados y rojos que tienen su absorbancia máxima a 330–450, 460–480 y 490–530 nm, respectivamente y hasta la actualmente se han identificado 44 pigmentos amarillos, 8 anaranjados y 42 rojos (Chen *et al.*, 2017).

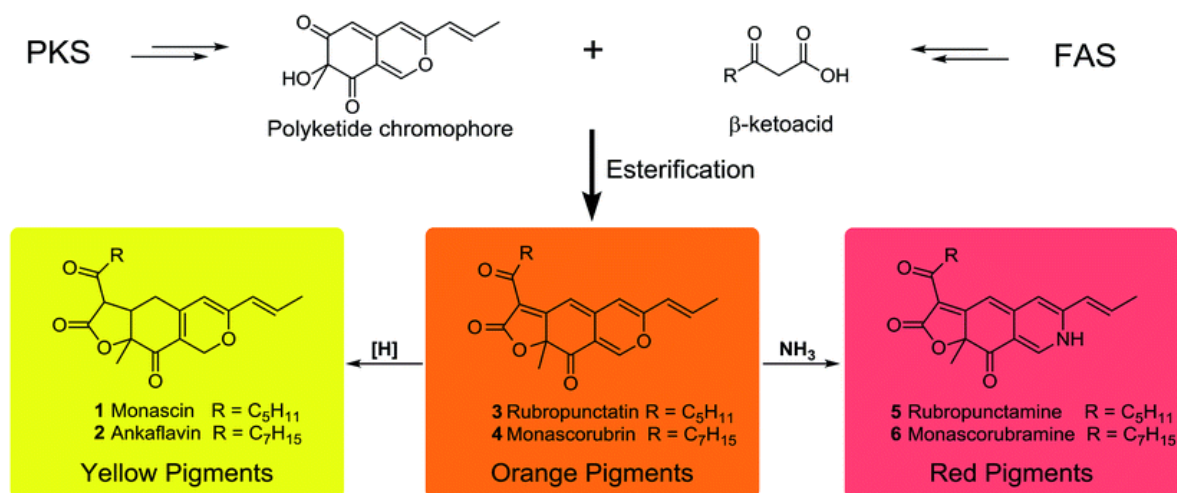


Figura 2. Biosíntesis asumida para sintetizar los seis pigmentos clásicos de *M. purpureus*.
FUENTE: Chen et al. (2017).

La biosíntesis de estos pigmentos aún tiene una comprensión parcial de las rutas donde son suposiciones basadas en principios químicos que pueden no ser necesariamente precisos *in vivo*. Los pigmentos anaranjados como rubropunctatina (3) y la monascorubrina (4) se forman por esterificación de un β-cetoácido, proveniente de la ruta de la sintasa de ácidos grasos (FAS) al cromóforo derivado de la policétido sintasa (vía PKS). Los pigmentos amarillos monascina (1) y ankaflavina (2) se dan por reducción de los pigmentos naranjas, mientras que los pigmentos rojos como rubropunctamina (5) y monascorubramina (6) se dan por aminación de los pigmentos anaranjados con NH₃ (Figura 3) (Chen *et al.*, 2017).

2. 1. 6. Citrinina

Diferentes especies de *Monascus* producen citrinina, una micotoxina, que puede ejercer efectos tóxicos en el hígado, corazón, riñones y sistema reproductivo (de Oliveira Filho *et al.*, 2017). Existen estrategias para disminuir su presencia en la fermentación por *M. purpureus* y continuar con el uso tradicional de sus metabolitos como los pigmentos, estas estrategias incluyen: Co-cultivo de *M. purpureus* con otro microorganismo como

Saccharomyces cerevisiae que permite la reducción significativa de citrinina (Moghadam *et al.*, 2022); optimización de condiciones de fermentación como la fuente nitrogenada y nivel de pH (Kang *et al.*, 2014); aplicación de campo magnético de baja frecuencia (Wan *et al.*, 2017); y mutagénesis (Jia *et al.*, 2010).

Por otro lado, aún es controvertido los efectos genotóxicos y mutagénicos de la citrinina, además la toxicidad depende en gran parte por la concentración, vía, frecuencia, tiempo de exposición y de los sistemas de ensayo utilizados. Es así que se le atribuye a la citrinina bioactividades como: antibacterianos, antifúngicos y posibles efectos anticancerígenos y neuroprotectores *in vitro* (de Oliveira Filho *et al.*, 2017).

2.2. Suplementos

2.1.7. Glucosa

La glucosa es un monosacárido aldósico que forma parte fundamental en los procesos de respiración celular y fotosíntesis, y en la mayoría de organismos sirve como reserva de energía y combustible metabólico, además forma parte de estructuras complejas como polisacáridos y glucósidos (Galant *et al.*, 2015). Es la fuente de carbono más utilizada para el mayor crecimiento de *Monascus* (da Costa & Vendruscolo, 2017).

La glucosa es asimilada más fácilmente que otras fuentes de carbono menos favorable como ácidos orgánicos y alcoholes. Debido a su suministro instantáneo de energía, es utilizada por los microorganismos para favorecer la regulación de su crecimiento y metabolismo con ello ayuda a su supervivencia y colonización de nichos (Adnan *et al.*, 2017; Qadri *et al.*, 2021).

La glucosa es metabolizada por reacciones enzimáticas conectadas, donde los mecanismos reguladores y las vías productoras de ATP han estado sujetos a presión de selección durante la evolución. Los microorganismos utilizan las vías aeróbica y anaeróbica como la respiración y fermentación respectivamente, siendo la vía aeróbica preferida por los hongos filamentosos para obtener energía de la glucosa bajo la forma de ATP (Chambergo *et al.*, 2002).

En los hongos filamentosos existe lo que se conoce como la represión de catabolitos de carbono que es un mecanismo que permite al microorganismo utilizar preferiblemente una fuente de carbono de fácil acceso y eficiencia energética sobre fuentes de carbono relativamente menos accesibles, con ello los microorganismos obtienen una máxima cantidad de glucosa y siguen el ritmo metabólico (Adnan *et al.*, 2017).

2. 1. 8. Fructosa

La fructosa es parte del grupo de las biomoléculas conocidas como carbohidratos o sacáridos, clasificado como una cetohexosa que es un monosacárido de 6 carbonos (Álvarez *et al.*, 2012), tiene una nomenclatura similar a la glucosa, pero presenta diferencias en su metabolismo, como una absorción más lenta que el de la glucosa, sin embargo, su absorción aumenta en presencia tanto de glucosa, galactosa, como de algunos aminoácidos (Riveros *et al.*, 2014).

La fructosa tiene origen exógeno natural que se encuentra en alimentos como frutas, miel de abeja, sacarosa y verduras (Álvarez *et al.*, 2012; Riveros *et al.*, 2014) y es de origen endógeno cuando se sintetiza como monosacárido fosforilado a fructosa-6-fosfato por una hexoquinasa en la vía glucolítica (Álvarez *et al.*, 2012; Meena *et al.*, 2015).

2. 1. 9. Melaza

La melaza es un subproducto viscoso y oscuro obtenido como efluente final en el refinamiento del azúcar proveniente de la caña de azúcar como materia prima (Varaee *et al.*, 2019), por ello es una fuente de carbono barata (Cao *et al.*, 2018), y es considerada como segura GRAS por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Valli *et al.*, 2012).

La melaza se considera adecuada para los procesos de fermentación por su aporte nutricional promoviendo el crecimiento celular debido a su composición: 45.5% p/p de azúcares totales, entre ellos glucosa 8.3% p/p, fructosa 7.2% p/p y sacarosa 30% p/p; y el contenido de nitrógeno es de 0.5-0.9% p/p, además de betaínas, minerales, oligoelementos y vitaminas (Salari *et al.*, 2019; Varaee *et al.*, 2019; Xu & Xu, 2014). Así que la melaza de caña de azúcar podría usarse eficazmente para producir biomasa en lugar de usar las fuentes de carbono puro mucho más caras, como la glucosa o fructosa (Saisriyoot *et al.*, 2019).

Se han realizado estudios sobre microorganismos que utilizan como fuente de carbono de bajo costo la melaza de caña para producir productos de interés con alta demanda en el mercado, como producción de pigmento rojo por *Monascus ruber* (Da Silva *et al.*, 2021), ácido l-láctico por *Bacillus coagulans* (Xu & Xu, 2014) y ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes* (Cao *et al.*, 2018).

2. 1. 10. Hidrolizado de pescado

La industria pesquera produce gran cantidad de residuos de pescado como: cabezas, aletas, vísceras, piel y escamas que pesan entre el 20-70% del peso total (Saravanan *et al.*, 2023), estos residuos se utilizan para producir productos de bajo valor comercial como harina de pescado y fertilizantes, sin embargo, existen opciones para convertirlos en productos de mayor valor agregado como es el hidrolizado de proteína de pescado (Chi *et al.*, 2015a; Santoso *et al.*, 2020). La obtención de cantidad y calidad de un hidrolizado enzimático de pescado dependerá de los métodos empleados para obtenerlo: hidrolisis por enzimas digestivas, fermentación microbiana y proteasas vegetales y bacterianas (Ryan *et al.*, 2011).

El pescado es una buena fuente de proteína debido a sus péptidos bioactivos (Ryan *et al.*, 2011) que por lo general no tienen actividad funcional en las proteínas nativas por lo tanto deben ser adquiridas por proteólisis para obtener las funciones bioactivas específicas, que puede ser a través de digestión in vivo, hidrólisis enzimática in vitro o fermentación microbiana (Chi *et al.*, 2015c). Los péptidos tienen actividad antimicrobiana y antioxidante (Ryan *et al.*, 2011), este último debido a los pequeños tamaños moleculares y los residuos de aminoácidos hidrófobos y/o aromáticos en sus secuencias de aminoácidos, siendo potencialmente útiles como ingredientes alimentarios y aditivos (Chi *et al.*, 2015b).

La industria de la fermentación biotecnológica demanda un creciente número de medios de cultivo microbiano, sobre todo los provenientes de fuente nitrogenada de buena calidad y menos costosa (Herpandi *et al.*, 2011). El hidrolizado de pescado son una fuente nitrogenada eficaz en los medios de cultivo microbiano (Guérard *et al.*, 2001) tiene un impacto considerable en el rendimiento de la tasa de crecimiento y la biomasa (Aspmo *et al.*, 2005) como sustrato alternativo en cultivo de arqueas y bacterias (Martone *et al.*, 2005; Petrova *et al.*, 2021) y como medio de cultivo para la producción de pigmentos del hongo (Kolek *et al.*, 2023).

2. 1. 11. Fermentado de pescado

Las enormes cantidades de subproductos de la industria pesquera se pueden aprovechar para la elaboración de fermentado de pescado que es un producto proveniente de una técnica biotecnológica adecuada para la transformación de subproductos del pescado como cabezas, aletas, vísceras, piel y escamas en un fertilizante líquido rico en nutrientes, fuente nitrogenada y minerales, este proceso es realizado por un consorcio de bacterias acidolácticas (Hepsibha & Geetha, 2019; Saravanan *et al.*, 2023). La fermentación realizada

por estas bacterias permite estabilidad, ausencia de microorganismos patógenos por la producción de ácido láctico, acético y etanol, además que logra dar funciones bioactivas específicas a los péptidos cortos de 2-20 aminoácidos (Chi *et al.*, 2015c; Hepsibha & Geetha, 2019).

El fermentado de pescado diluido se utiliza con frecuencia como biofertilizante líquido por su contenido de proteínas, aminoácidos, potasio, fósforo, calcio y magnesio; también se utiliza como complemento alimenticio y abono bioorgánico, además no es fitotóxico por el método de ensayo en placa de Petri (Hepsibha & Geetha, 2019; Sahu *et al.*, 2014).

2. 1. 12. Glutamato monosódico

Glutamato monosódico (GMS, código E621), un aditivo que da un sabor umami a los alimentos (Elattar *et al.*, 2023), utilizado como potenciador de sabor en el mundo durante más de 100 años (Abdulghani *et al.*, 2022; Bera *et al.*, 2017; Thongsepee *et al.*, 2022).

Su presentación es de un polvo blanco cristalino e inodoro, su composición es: 78% de ácido glutámico, 21% de sodio, 1% de contaminantes y agua (Thongsepee *et al.*, 2022) que se fabrica por fermentación de almidón, caña de azúcar o melaza, que finalmente se purifica y seca (Bera *et al.*, 2017).

También conocido como la sal de sodio del aminoácido ácido glutámico, químicamente ácido 2-aminopentanodioico (Elattar *et al.*, 2023; Thongsepee *et al.*, 2022) o L-glutamato (forma ionizada) uno de los aminoácidos presentes en la naturaleza más abundantes (Albarracín *et al.*, 2016; Bera *et al.*, 2017).

La producción de pigmentos rojos varía según la suplementación de nitrógeno en el medio de cultivo (Chatterjee *et al.*, 2009). Diversos estudios han demostrado que la adición de GMS aumenta la producción de este metabolito de interés (Silveira *et al.*, 2008). El GMS es utilizado como fuente de nitrógeno para evaluar la cinética de síntesis de pigmentos y el desarrollo micelial de *M. purpureus* (Mehri *et al.*, 2021), además en fermentación en estado sólido la adición de compuestos nitrogenados externos como el GMS mejora la producción de pigmentos solubles en agua (Babitha *et al.*, 2006), a su vez aumenta la intensidad de pigmento, contenido de glucosamina y actividad antioxidante (Kraboun *et al.*, 2013).

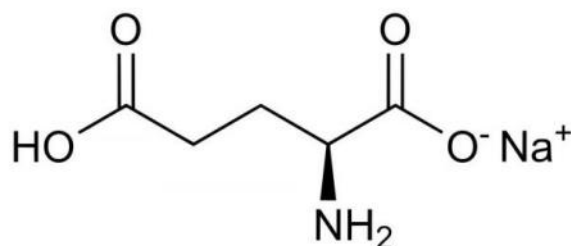


Figura 3. Estructura química del glutamato monosódico
FUENTE: Thuy *et al.* (2020).

2. 1. 13. Cloruro de sodio

El cloruro de sodio (NaCl) es conocido comúnmente como la sal de mesa, es un producto iónico proveniente de la reacción entre el ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio (Atkins & Jones, 2006). Se ha estudiado como suplemento en medios de cultivo debido a que participa en el crecimiento celular y síntesis de metabolitos secundarios de *M. purpureus*. Se vincula que un aumento en la concentración de NaCl puede inhibir el tamaño de la colonia y el crecimiento de micelios aéreos (Zhen *et al.*, 2019).

El NaCl promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) durante la fermentación en estado sólido por *M. purpureus* que disminuye a medida que el tiempo de incubación transcurre (Zhen *et al.*, 2019), además esta sal genera un estrés osmótico que ayuda a la producción de pigmentos de *M. purpureus*, donde a altas concentraciones induce la formación de conidios, pero disminuye la producción de biomasa (Babitha *et al.*, 2007a).

Se conoce que los hongos utilizan diferentes mecanismos de defensa cuando son sometidos a estrés para que puedan mantener las membranas celulares y macromoléculas funcionales, uno de estos mecanismos es la síntesis de osmolitos como: disacárido trehalosa, polioles, glicerol, arabitol, manitol, eritritol y prolina, que pueden proteger a la célula de las EROs, estrés osmótico, estrés por pH, radiación UV-B, frío, calor y sequía. (Danilova *et al.*, 2020).

2.3. Quinua

2. 1. 14. Descripción botánica

La quinua es originaria de la región andina con una variabilidad genética alta, que le permite resistir diversas condiciones climáticas como sequías, heladas, suelos ácidos y salinos (Apaza *et al.*, 2013; Nickel *et al.*, 2016).

Es una planta erguida que mide desde 0.6 a 3.0 m; su raíz es vigorosa, pivotante y profunda

de 1.8 m aproximadamente; su tallo es cilíndrico con una coloración que varía de verde a rojo; las hojas alternas (largos, finos y acanalados) formadas por peciolo y una lámina gruesa, tierna y carnosa de forma romboidal, triangular o lanceolada con coloración de verde a rojo; la inflorescencia es una panoja típica que puede rendir hasta 500 g de semilla; las flores son hermafroditas y pequeñas que miden hasta 3 mm; el fruto es un aquenio con perigonio que envuelve a la semilla (Figura 4), esta es el fruto maduro sin el perigonio que presenta tres partes: episperma (presenta saponina), embrión (constituye el 30% de la semilla y contiene a dos cotiledones y un hipocótilo) y perisperma (almacena el almidón y constituye el 60% de la semilla) (Apaza *et al.*, 2013). La mayor fuente de macronutrientes, micronutrientes y proteínas con alto contenido de aminoácidos esenciales se encuentra en la semilla que a su vez es la parte más consumida (Nickel *et al.*, 2016).

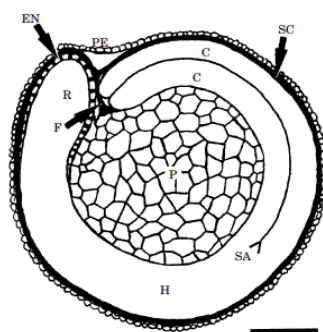


Figura 4. Sección longitudinal de la semilla de quinua. Pericarpio (PE) cubre la semilla. El embrión consta de hipocótilo (H) y dos cotiledones (C). Capa de semilla (SC); endospermo (EN); funículo (F); perisperma (P); pericarpio (PE); radícula (R); brote apical (SA). Barra 500 μ m.
FUENTE: Tomado de Prego *et al.* (1998).

2. 1. 15. Clasificación taxonómica

La quinua se describió botánicamente por primera vez en 1778 por Willdenow, se hizo en base al color de la planta y frutos, posteriormente se clasificó por su morfología de la planta (Singh, 2019). En la Tabla 2 se observa a clasificación taxonómica.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la quinua

Reino:	Vegetal
División:	Fanerógamas
Clase:	Dicotiledóneas
Sub clase:	Angiospermas
Orden:	Centrospermales
Familia:	Chenopodiaceae
Género:	<i>Chenopodium</i>
Sección:	Chenopodia
Subsección	Cellulata
Especie:	<i>Chenopodium quinoa</i> Willdenow

FUENTE: Apaza *et al.* (2013).

2. 1. 16. Composición nutricional

En la Tabla 3 se observan los valores nutricionales de las semillas. Con un alto valor en lípidos, cenizas y proteínas, que a su vez son de excelente calidad debido a su contenido de aminoácidos esenciales.

Tabla 3. Comparación de los valores nutricionales de la quinua

Nutriente	
Energía (kcal)	357-368
Proteína total ^a	13.1-16.7
Grasa total ^a	5.5-7.4
Carbohidratos ^a	59.9-74.7
Fibra ^a	7.0-11.7
Cenizas ^a	2.7-3.8
Minerales ^b	
Ca	27.5-148.7
Fe	1.4-16.7
Mg	26.0-502.0
P	140.0-530.0
K	696.7-1475.0
Na	11.0-31.0
Zn	2.8-4.8
Cu	1.0-9.5
Vitaminas ^b	
Ácido ascórbico (C)	4.0-16.4
α-Tocoferol (E)	2.6-5.4
Tiamina (B ₁)	0.3-0.4
Riboflavina (B ₂)	0.3-0.4
Niacina (B ₃)	1.1-1.5
Piridoxina (B ₆)	0.5
Folato	0.2
Aminoácidos esenciales ^c	
His	1.4-5.4
Ile	0.8-7.4
Leu	2.3-9.4
Lys	2.4-7.8
Met	0.3-9.1
Cys	0.1-2.7
Phe + Tyr	2.7-10.3
Thr	2.1-8.9
Trp	0.6-1.9
Val	0.8-6.1

a: g/100g material comestible; b: mg/100g materia seca; c: g/100g proteína

FUENTE: Vilcacundo & Hernández-Ledesma (2017).

2. 1. 17. Diversos productos a partir de la quinua

Se pueden obtener los siguientes productos a partir de las semillas de quinua (Casas *et al.*, 2018; Valcárcel-Yamani & Lannes, 2012):

- En la industria de panificación, la quinua es utilizada como sustituyente parcial para aumentar la cantidad proteica o es utilizada totalmente para el público con enfermedad celiaca.
- En la elaboración de galletas, la sustitución de harina de quinua ayuda a aumentar el valor nutricional y a dar más suavidad al producto final.
- En la elaboración de pastas, permite la inclusión de proteínas, micronutrientes, además el producto extruido tiene buenas características sensoriales y fisicoquímicas.
- Las bebidas a base de quinua es tendencia en el mercado junto con las bebidas vegetales de soja, avena, arroz, coco y almendra; debido a su aporte nutricional como vitaminas, fibra, calcio, proteínas y probióticos. Se usan los granos germinados directamente en ensaladas o son convertidos en harina para la obtención de cervezas y productos fermentados, siendo una bebida con probióticos que ayuda a la microbiota nativa intestinal y mejora la salud humana.
- En la elaboración de snacks como producto inmediato y un alimento saludable.
- En presentación de barras de quinua con granos del mismo color o diferentes y/o harina de quinua.
- En la producción de hojuelas como quinua pop, por el proceso de extrusión para ser consumidas en sopas, bebidas, ensaladas, etc.
- En la industria de la confitería que se está inclinando a alimentos saludables, adicionando quinua al chocolate oscuro y en la elaboración de mermeladas, para aumentar la cantidad proteica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

A. Microorganismo

Cepa liofilizada *Monascus purpureus* 2955 proveniente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

B. Material vegetal

Semillas de *C. quinoa* var. Blanca de Juli (sin saponinas)

3.1.2. Medios de cultivo

Agar Papa Dextrosa (PDA) marca HiMEDIA: extracto de papa 4 g/L, dextrosa 20 g/L y agar 15 g/L, ajustado a pH 6.

Agar Harina Quinoa (AHQ): harina de quinoa 50 g/L y agar 15 g/L de medio de cultivo:

Suplementos

- Glucosa (S1)
- Fructosa (S2)
- Melaza (S3)
- Fermentado de pescado (S4)
- Hidrolizado de pescado (S5)
- Glutamato monosódico (S6)
- Cloruro de sodio (S7)

Soluciones y reactivos

- Agua destilada marca ALKOFARMA
- Etanol 96° marca Biogenics Lab SAC.
- Ácido sulfúrico marca J.T. BAKER®ACS: 72% v/v
- Acetilacetona marca EMSURE®

- Reactivo de Ehrlich marca SIGMA-ALDRICH
- N-acetilglucosamina marca HiMEDIA
- Carbonato de sodio marca CDH®
- Ácido clorhídrico marca J.T. BAKER®ACS: 0.1N, 1N
- Hidróxido de sodio marca EMSURE®: 0.1N, 1N, 10N

Materiales de laboratorio

- Algodón
- Asa de Kohle
- Frascos ámbar: 250ml
- Vaso de licuadora de acero
- Guantes de nitrilo
- Jeringas: 20ml
- Matraz Erlenmeyer de vidrio: 250ml
- Mechero de Bunsen
- Micropipetas: 0-100 µl, 100-1000 µl
- Papel Kraft
- Placas Petri: 90 x15 mm
- Probeta: 100ml
- Sacabocado: 0.5mm (diámetro)
- Tips con filtro:100 µl, 1000 µl
- Tubos de ensayo: 12x75mm
- Vasos de precipitado: 100 ml, 250 ml
- Vernier digital

Equipos

- Licuadora marca WARING comercial Blendor
- Espectrofotómetro UV/VIS T80+ marca PG INSTRUMENTS
- Potenciómetro HI 9025 marca HANNAinstruments
- Autoclave marca RELES
- Incubadora marca MMM Group
- Incubadora con agitador orbital MRS
- Baño ultrasónico marca JP Selecta™

3.2. Metodología

3.1.3. Lugar de ejecución

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental-Biorremediación “Luis Basto Acosta” de la Facultad de Ciencias, y en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

3.1.4. Obtención del microorganismo y mantenimiento

Se trabajó con el hongo filamentoso *Monascus purpureus* CECT 2955, adquirido de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Se siguió las instrucciones para la resuspensión de cultivos liofilizados de CECT (Anexo 1). Después de la activación se sembró el microorganismo en placas de Petri con medio PDA, donde se incubaron a 30°C por 10 días, luego se preservaron a 4°C para su posterior uso denominándose como cepa stock 1.

3.1.5. Producción del inóculo

Una placa de Petri con la cepa stock 1 se inoculó en AHQ. Se llevó a incubar a 30°C por 10 días (Moharram *et al.*, 2012). Para obtener la cepa de trabajo, se tomó una asada de la placa previa y se realizaron estrías por agotamiento. Se incubó a 30°C por 10 días. Transcurrido el tiempo, en un vaso de acero de licuadora esterilizado, se vertió el medio invadido por el hongo junto con 50 ml de agua estéril. En velocidad máxima se licuó por 15 segundos. Este licuado de cepa de trabajo sirvió como inóculo para la investigación.

3.1.6. Determinación de la velocidad de crecimiento de *M. purpureus*

a. Preparación de los medios de cultivo

Se utilizó AHQ como medio de cultivo base, al 5% p/v equivale decir 5 g de harina de quinua en 100 ml de medio de cultivo (con contenido de agar como agente gelificante al 1.5 por ciento). Los siete medios de cultivo propuestos para esta investigación fueron a base de agar harina de quinua suplementados al 0.5 y 1 por ciento con: glucosa, fructosa, melaza, fermentado de pescado, hidrolizado de pescado, glutamato monosódico y cloruro de sodio. Estos medios recibieron los siguientes códigos respectivamente: S1, S2, S3, S4, S5, S6 y S7. Se ajustó el pH a 5, 6 y 7 con NaOH al 0.5N y HCl al 0.5N.

Los medios S1, S2, S6 y S7 fueron donados por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos (UNALM) y los medios S3, S4 y S5 por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental-Biorremediación (UNALM) donde los análisis proximales de estos últimos se pueden ver en el Anexo 2.

b. Siembra del inóculo en los diferentes medios de cultivo

Se vertieron 20 ml de medio de cultivo por placa de Petri y se dejó solidificar, posteriormente se realizó un pocillo de 5 mm de diámetro en el centro del medio de cultivo con la ayuda de un sacabocado, luego se inocularon 40µl de la cepa de trabajo licuada previamente, dentro del pocillo. Se incubó a 30°C durante 12 días. El proceso se realizó con todos los medios de cultivo por triplicado.

Todos los tratamientos fueron realizados a 30°C, debido a que es la temperatura óptima para la producción de pigmentos y el crecimiento de *M. purpureus* en fermentación en estado sólido (Babitha *et al.*, 2007b). Si el cultivo se somete a altas temperaturas ocasiona estrés térmico produciendo cambios significativos en el crecimiento, morfología y producción de metabolitos secundarios afectando el aspecto comercial de los productos de *Monascus* para su aplicación industrial (Babitha *et al.*, 2007a).

c. Evaluación de la velocidad de crecimiento

Para la evaluación del crecimiento radial se trazaron dos líneas perpendiculares en la base de cada placa de Petri. Con un vernier digital se midió el diámetro de la colonia durante 12 días (Anexo 3), dando 2 valores por placa (denominados a y b). Se tomó en cuenta el promedio de radios de ambos valores por placa para una repetición. Se evaluaron 03 placas por tratamiento.

La velocidad de crecimiento radial se obtuvo por regresión lineal (Bühler *et al.*, 2015) del radio en función del tiempo (ecuación 1)

$$r(t) = Vcr * t + c \quad \text{[Ecuación 1]}$$

donde *Vcr* es la velocidad de crecimiento radial (mm h⁻¹), *t* es el tiempo (h), *r* es el radio (mm) y *c* es el coeficiente de la regresión lineal que incluye el radio del sacabocado 2.5 mm.

3. 1. 7. Determinación de biomasa fúngica

a. Determinación directa de biomasa por gravimetría

La biomasa fúngica por gravimetría se determinó siguiendo los métodos de Coello-Loor *et al.* (2017) y Zhang *et al.* (2013), donde los micelios se obtuvieron empleando un microondas (1400 W) al 100% de potencia durante 2 min para disolver el medio sólido de AHQ, inmediatamente se vertió y filtró todo el contenido por placa con la ayuda de ocho capas de gasa y se lavó tres veces con agua hervida. Se secó en una estufa a una temperatura de 60°C hasta obtener un peso constante y se registró el valor obtenido. Las muestras secas se utilizaron para determinar biomasa por N-acetilglucosamina.

b. Elaboración de la curva estándar de N-acetilglucosamina

Se prepararon nueve concentraciones de N-acetil-D-glucosamina en agua destilada, en un rango de 0.005-0.2 mg/ml. La reacción colorimétrica se leyó en un espectrofotómetro UV/VIS a $\lambda_{\text{max}}=537$ nm y se elaboró la ecuación lineal para N-acetil glucosamina. La curva de calibración fue elaborada en colaboración con el Laboratorio de Biotecnología Ambiental-Biorremediación (Anexo 4).

c. Medición de la biomasa fúngica de la N-acetilglucosamina

Se siguieron las metodologías de Chen & Johnson (1983) y Pérez *et al.* (2017) con algunas modificaciones. Se tomó 0.1g de muestra seca, y se mantuvo en hidrolisis ácida con 500 μL de H_2SO_4 al 72% durante 2 horas a 40°C, luego se diluyó con agua destilada hasta una concentración final de 3%, se continuó con la hidrólisis a 90°C en baño María por 2 horas; se enfrió y neutralizó con NaOH 10N, después se filtró, se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min. Se tomaron 1000 μL del sobrenadante y se añadieron 500 μL de la Solución A (acetilacetona 4% (v/v) en carbonato de sodio 1.25 N), se calentó a 90°C durante 1 hora, posteriormente se enfrió y se añadieron 1600 μL de etanol 96° con agitación por 10 minutos para disolver los precipitados, finalmente se agregaron 500 μL del reactivo de Ehrlich. Se midió en el espectrofotómetro a $\lambda=537\text{nm}$. Para el blanco se utilizó agua destilada en lugar de la muestra junto con los demás reactivos.

3. 1. 8. Medición de los pigmentos producidos por *Monascus*.

a. Medición de la densidad óptica de los pigmentos producidos por *Monascus*

Se realizó la metodología de Kantifedaki *et al.* (2018) con algunas modificaciones para la extracción de pigmentos. Con un sacabocado se tomaron 0.3 g de muestra fresca del micelio, se mezcló con 3 ml de etanol al 70%, la mezcla se llevó a baño ultrasónico por 30 min a 25°C, luego se llevó a un agitador rotativo a 30°C, 180 rpm durante 1 h. Los extractos etanólicos se centrifugaron a 9000 rpm durante 20 min y el sobrenadante sirvió para la estimación del pigmento midiendo la absorbancia en tres longitudes de onda diferentes (400, 470 y 500 nm para amarillo, anaranjado y rojo respectivamente). Se utilizó etanol al 70% como espacio en blanco. Los resultados se expresaron como unidad de absorbancia en la longitud de onda correspondiente por mililitro (AU/ml).

3. 1. 9. Diseño experimental y análisis estadístico

En la Figura 5 se muestra el diseño experimental para la presente investigación, donde la evaluación del crecimiento de *M. purpureus* en medios de cultivo a base de harina de quinua enriquecido con diferentes suplementos en placas Petri se realizó en tres etapas.

En la primera etapa se evaluó la velocidad de crecimiento de *M. purpureus* en medios de cultivo AHQ con siete tipos de suplementos: S1 (Glucosa), S2 (Fructosa), S3 (Melaza), S4 (Fermentado de pescado), S5 (Hidrolizado de pescado), S6 (Glutamato monosódico) y S7 (Cloruro de sodio) en los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12. Los factores de estudio fueron: factor 1 (Concentración del suplemento) con niveles de 0.5% y 1%; factor 2 (pH) con niveles de 5, 6 y 7. Es decir por cada suplemento se evaluaron seis tratamientos siendo T1 (concentración 0.5% a pH 5), T2 (concentración 0.5% a pH 6), T3 (concentración 0.5% a pH 7), T4 (concentración 1% a pH 5), T5 (concentración 1% a pH 6) y T6 (concentración 1% a pH 7). Los resultados obtenidos por triplicado se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba de Tukey con un $\alpha = 0.05$ para cada suplemento.

Un tratamiento por cada suplemento con la mayor velocidad de crecimiento radial fue elegido considerándose el radio máximo alcanzado al día 12 (288h) con 3 repeticiones, siendo un total de siete tratamientos elegidos que fueron evaluados mediante ANOVA seguido de la prueba de Tukey con un $\alpha = 0.05$. De ello se eligieron dos tratamientos con la mayor diferencia significativa: *SaTx* y *SbTy*, para continuar con el análisis.

En la segunda etapa se analizó la biomasa de forma directa e indirectamente en los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12 con 3 repeticiones de dos tratamientos elegidos como *SaTx* y *SbTy* provenientes del análisis previo de la primera etapa. Los resultados fueron evaluados mediante ANOVA seguido de la prueba de Tukey con un $\alpha = 0.05$ para los dos tratamientos con el fin de ver las diferencias significativas en el transcurso del tiempo.

En la tercera etapa se midió la densidad óptica o absorbancia de los pigmentos amarillos, anaranjados y rojos a 400, 470 y 500nm en los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12 con 3 repeticiones de los micelios provenientes de los dos tratamientos: *SaTx* y *SbTy*. Los resultados también fueron evaluados mediante ANOVA seguido de la prueba de Tukey con un $\alpha = 0.05$ para los dos tratamientos con el fin de ver las diferencias significativas en el transcurso del tiempo. En todas las etapas se analizaron los datos con el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.

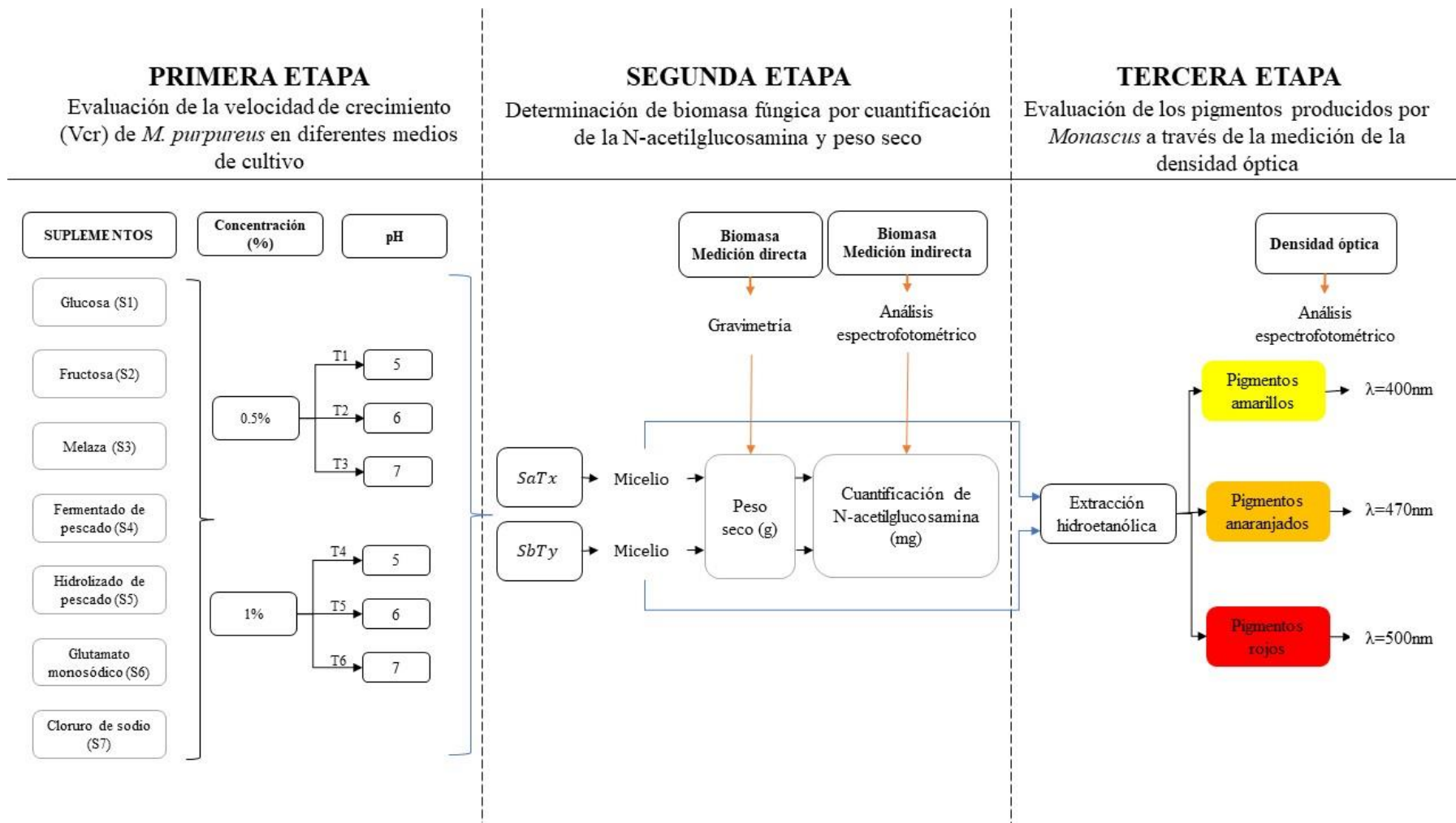


Figura 5. Etapas del diseño experimental para evaluar el crecimiento de *M. purpureus* en medios de cultivo a base de harina de quinua enriquecido con diferentes suplementos en placas Petri.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Evaluación de la velocidad de crecimiento de *M. purpureus* en diferentes medios de cultivo.

El pH óptimo varía según el microorganismo y la aplicación que se requiera (Barzee *et al.*, 2021). En el caso de *Monascus* el pH inicial de cultivo adecuado para producir pigmentos rojos oscila entre el rango de 5.5 a 9, según Musaalbakri *et al.* (2005) determinaron en su investigación que el pH inicial óptimo se estableció en 6.5. En esta investigación los valores de pH inicial de los tratamientos fueron 5, 6 y 7 debido a que se quería conocer el efecto que tiene este factor en la velocidad de crecimiento, biomasa y pigmentos del hongo en los medios de cultivo.

Como sustratos sólidos para la producción de metabolitos de *Monascus* pueden usarse granos de cereales (Domínguez-Espinosa & Webb, 2003), sin embargo, en la presente investigación se eligió un pseudocereal en todos los medios de cultivo, harina de semillas de quinua blanca orgánica, elegida por sus valores nutricionales como proteínas, lípidos, cenizas y alto contenido de aminoácidos esenciales (Vilcacundo & Hernández-Ledesma, 2017), utilizando siete suplementos diferentes para determinar el crecimiento fúngico según corresponda.

4. 1. 1. Efecto del suplemento glucosa (S1) en la velocidad de crecimiento radial.

La glucosa es una fuente de carbono más utilizada para el crecimiento de *Monascus* (da Costa & Vendruscolo, 2017), aunque *Monascus* no crece anaeróticamente utilizando este monosacárido, si crece en condiciones limitantes de oxígeno donde aumenta la producción de etanol junto con el CO₂ y disminuye la producción de pigmentos, mientras que a mayor aireación la producción de etanol disminuye y la producción de los pigmentos aumenta (Carvalho *et al.*, 2003). A menor concentración de glucosa o fructosa se puede tener 2 fases: primero la glucosa se convierte en etanol y biomasa, luego el etanol se convierte en biomasa y pigmento, por otra parte, a altas concentraciones de glucosa (20g/L) produce un efecto tipo Crabtree, en cultivo sumergido, dándose el cambio a un metabolismo predominantemente

anaeróbico, con producción de etanol incluso en buenas condiciones de aireación (Carvalho *et al.*, 2003).

Se evaluó el crecimiento radial del hongo *M. purpureus* en el medio de cultivo AHQ suplementado con glucosa (Tabla 4) a dos concentraciones y tres niveles de pH donde se muestran las ecuaciones de regresión lineal y las Vcr de los seis tratamientos, cada ecuación lineal proviene de tres repeticiones. Los valores de la media corresponden a las 288h (Ajdari *et al.*, 2011) considerado este tiempo como la invasión total del micelio en la placa Petri (tomado como referencia el S7). El análisis estadístico se muestra en el Anexo 5.

Los tratamientos que presentaron menor crecimiento radial a las 288h fueron S1T1 y S1T4 con valores 32.637 ± 0.344 mm y 32.723 ± 0.609 mm respectivamente a su vez las Vcr también son las menores comparándose con los seis tratamientos dentro de S1, 0.099 y 0.101 mm h⁻¹ respectivamente. El tratamiento que mostró mayor Vcr y crecimiento radial a las 288h fue S1T6 con 0.132 mm h⁻¹ y 40.092 ± 0.306 mm respectivamente. Ajdari *et al.* (2011) estimaron el crecimiento radial de siete cepas de *M. purpureus* en diferentes medios de cultivo, los medios que contenían glucosa en su formulación fueron PDA: glucosa (4 g/L o 0.4%) y MEA: glucosa (20 g/L o 2%) con las mayores Vcr de 0.077 mm h⁻¹ y 0.126 mm h⁻¹ respectivamente, con ello se demostró que la glucosa mejoró el crecimiento de *M. purpureus* al igual que los resultados obtenidos por S1 evaluadas a 0.5 y 1.0 % a pH 7 donde si hubieron diferencias significativas, pero a pH 5 y 6 no hubieron diferencias cuando se comparó su crecimiento a diferentes concentraciones, mientras que una comparación dentro de la misma concentración de glucosa presentaron diferencias significativas cuando se variaron los niveles de pH puede ser debido a que el pH del medio de cultivo puede afectar la solubilidad y transporte de los nutrientes a la célula, actividad enzimática, características superficiales de la célula, lo cual en conjunto afectará el crecimiento (Barzee *et al.*, 2021).

Tabla 4. Velocidad de crecimiento (mm h⁻¹) de *M. purpureus* en AHQ suplementado con glucosa.

Tratamiento (S1)	Concentración (%)	pH	Ecuación de regresión lineal	Vcr (mm h ⁻¹)	R ²	Media ± D.E.
S1T1	0.5	5	r(t) = 0.099 t + 5.103	0.099	98.17	32.637 ± 0.344 ^a
S1T2	0.5	6	r(t) = 0.117 t + 3.204	0.117	99.35	35.293 ± 0.357 ^b
S1T3	0.5	7	r(t) = 0.126 t + 1.974	0.126	99.90	38.741 ± 0.288 ^c
S1T4	1	5	r(t) = 0.101 t + 4.364	0.101	98.82	32.723 ± 0.609 ^a
S1T5	1	6	r(t) = 0.116 t + 3.585	0.116	99.14	36.004 ± 0.113 ^b
S1T6	1	7	r(t) = 0.132 t + 2.660	0.132	99.81	40.092 ± 0.306 ^d

S1: Glucosa; D.E.: Desviación Estándar; n=3; Media ± D.E. correspondiente a las 288 h; a-d: Grupos Homogéneos

En la Figura 6 se observa que los micelios que crecieron en menor tamaño a las 288 h corresponden a los tratamientos S1T1 y S1T4, esto es a pH 5, donde el micelio representante de la concentración al 1% presentó mayor pigmentación anaranjada que el de concentración al 0.5%, por otro lado cuando se compararon los micelios de S1T2 y S1T5 no presentaron diferencias significativas en su Vcr (Tabla 4) pero en aspecto visual el micelio tiene mayor pigmentación anaranjada a mayor concentración de S1 demostrando un comportamiento similar a los tratamientos de pH 5, sin embargo a pH 7 no solo hubo diferencias en su Vcr sino que los micelios del tratamiento S1T6 fueron más pigmentados que los micelios del tratamiento S1T3. Entonces a una misma concentración de S1 el micelio tendió a crecer y producir una mayor cantidad de pigmentos a medida que el pH aumentó de 5 a 7 y esto es posiblemente debido a que a diferentes niveles de pH los micelios presentan diferencias en su crecimiento y producción de metabolitos porque hay variación en la solubilidad y transporte de nutrientes de su medio, además todos los micelios crecieron en buen estado a los diferentes niveles de pH, ello fue previsto debido a que los hongos crecen en un amplio rango de pH (Barzee *et al.*, 2021).

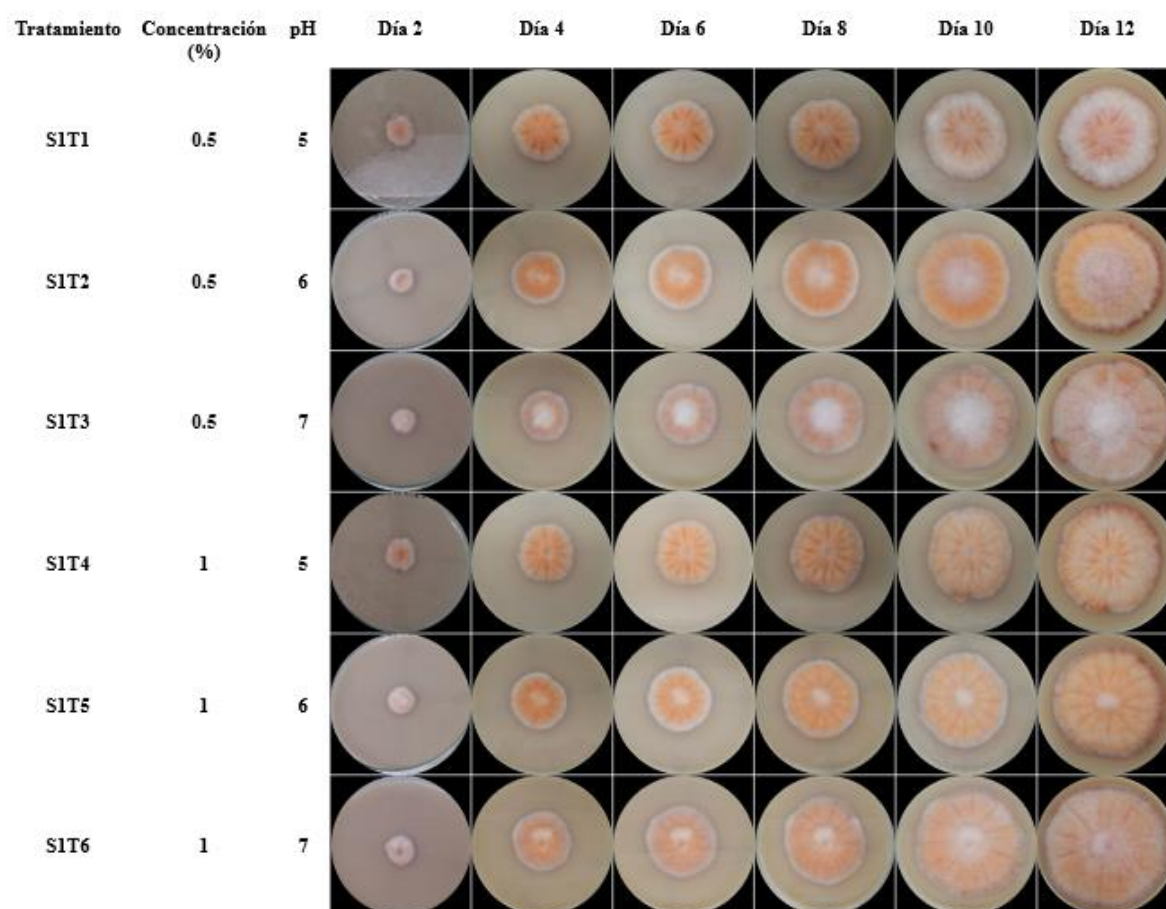


Figura 6. Crecimiento radial de *M. purpureus* en AHQ suplementado con glucosa al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días.

En general todos los micelios de los seis tratamientos presentaron un aspecto algodonoso durante las 288 h (12 días), y de color anaranjado producto de la esporulación, aunque en el tratamiento S1T1 a partir del día 10 los micelios fueron de color blanco algodonoso en los bordes, solo en este caso se corrobora lo estudiado por Ajdari *et al.* (2011) donde evaluaron los requerimientos nutricionales para mejorar el crecimiento y la esporulación de diferentes cepas de *M. purpureus* y revelaron que la glucosa mejoró el crecimiento de todas las cepas del hongo pero inhibió la tasa de esporulación debido a que es el pH, tipo y concentraciones de los suplementos y/o fuentes tanto de carbono como nitrógeno influyen en la cinética de crecimiento.

4. 1. 2. Efecto del suplemento fructosa (S2) en la velocidad de crecimiento radial

La glucosa y fructosa son azúcares simples que son absorbidos directa y rápidamente por los hongos, son además fuentes comunes de carbono orgánico que es el elemento estructural más importante para las células fúngicas en combinación con el hidrógeno, oxígeno y nitrógeno (Barzee *et al.*,2021). En el caso de los hongos como *Saccharomyces cerevisiae*, la fructosa externa ingresa al citoplasma de la célula y se convierte en fructosa 6-fosfato, después a fructosa 1.6-bifosfato, luego a gliceraldehido 3-fosfato que ingresa a la ruta de la glucólisis (Velagapudi, 2009).

Tabla 5. Velocidad de crecimiento de *M. purpureus* en AHQ suplementado con fructosa

Tratamiento (S2)	Concentración (%)	pH	Ecuación de regresión lineal	Vcr (mm h ⁻¹)	R ²	Media ± D.E.
S2T1	0.5	5	r(t) = 0.097 t + 4.663	0.097	98.58	31.474 ± 0.378 ^a
S2T2	0.5	6	r(t) = 0.111 t + 3.958	0.111	98.97	35.146 ± 0.599 ^b
S2T3	0.5	7	r(t) = 0.123 t + 1.740	0.123	99.89	37.842 ± 0.278 ^{cd}
S2T4	1	5	r(t) = 0.097 t + 4.908	0.097	98.38	32.178 ± 0.411 ^a
S2T5	1	6	r(t) = 0.116 t + 3.898	0.116	99.24	36.43 ± 0.812 ^{bc}
S2T6	1	7	r(t) = 0.128 t + 2.472	0.128	99.83	38.323 ± 0.484 ^d

S2: Fructosa; D.E.: Desviación Estándar; n=3; Media ± D.E. correspondiente a las 288 h; a-d: Grupos Homogéneos

Carrillo-Inungaray *et al.* (2006) compararon parámetros de crecimiento, crecimiento máximo y velocidad de crecimiento de dos hongos *Rhizopus oryzae* y *Penicillium digitatum* donde han utilizado diversos solutos entre ellos sacarosa (glucosa+ fructosa) para ajustar el parámetro aw de los medios de cultivo con ello dar estabilidad a los microorganismos en su desarrollo, obtuvieron que para el hongo *P. digitatum* la Vcr fue 0.243 mm h⁻¹ (aw =0.895) y para *R. oryzae* la Vcr fue 0.167 mm h⁻¹ (aw =0.895), así como el máximo crecimiento radial fueron 31.707 y 25.265 mm respectivamente. En comparación con los obtenidos por

el presente estudio (Tabla 5 y Anexo 6) se tiene que el crecimiento radial menor reportado del S2 corresponden a los tratamientos S2T1 y S2T4 con 31.474 ± 0.378 y 32.178 ± 0.411 mm respectivamente sin diferencias significativas, y teniendo el menor V_{cr} 0.097 mm h^{-1} igual para ambos tratamientos, un similar comportamiento se observó con el suplemento glucosa (Tabla 4), mientras que el mayor crecimiento radial a las 288h corresponde a los tratamientos S2T3 y S2T6 con 37.842 ± 0.278 y 38.323 ± 0.484 mm ambos valores no presentaron diferencias significativas, además sus respectivos valores de V_{cr} fueron 0.123 y 0.128 mm h^{-1} .

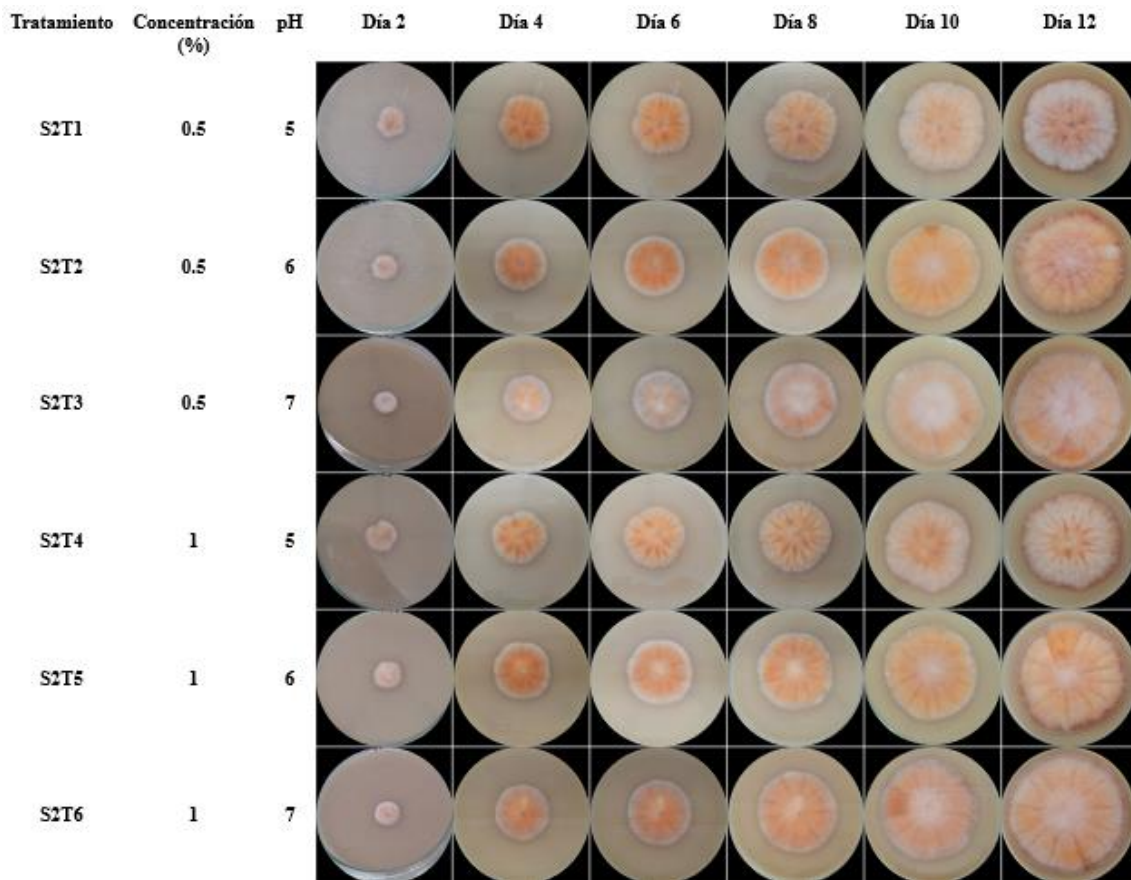


Figura 7. Crecimiento radial de *M. purpureus* en AHQ suplementado con fructosa al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días.

En la Figura 7, ambos micelios representativos S2T1 y S2T4 que presentaron menor crecimiento radial tienen un aspecto algodonoso blanquecino puede estar relacionado al pH inicial del medio ajustado a 5, por otro lado, los tratamientos S2T3 y S2T6 invaden casi en su totalidad a las placas Petri a las 288h presentando un aspecto del micelio más anaranjado que blanco, tanto el crecimiento mayor como el color puede deberse al pH inicial igual a 7 y que la fructosa promueve el proceso metabólico y transporte de aminoácidos, amidas y

péptidos (Lu *et al.*, 2021). Los micelios de todos los tratamientos son muy similares en apariencia en comparación con la Figura 6 donde se utilizó como suplemento glucosa, puede deberse a que la fructosa se incorpora a la ruta de la glucólisis. Algo similar fue reportado por Ajdari *et al.* (2011) cuando utilizaron sacarosa (glucosa + fructosa) donde la combinación de ambas fuentes mejoró tanto el crecimiento como la esporulación de *M. purpureus*.

4. 1. 3. Efecto del suplemento melaza (S3) en la velocidad de crecimiento radial

Los medios con melaza son ricos en compuestos nitrogenados, por ello no suelen ser complementados con otras fuentes de nitrógeno (Papagianni, 2007), aunque ello dependerá de lo que se desee producir. Por ejemplo Da Silva *et al.* (2021) estudiaron tres medios de cultivo para la producción de pigmentos y biomasa de *M. ruber*, estos medios eran: harina de arroz 20 g L^{-1} (2% p/v), melaza 30 g L^{-1} (3% p/v), y harina de arroz + melaza 10 g L^{-1} (1% p/v), $+10 \text{ g L}^{-1}$ (1% p/v), los resultados fueron que el medio con solo melaza indujo un alto crecimiento fúngico $11,09 \text{ g L}^{-1}$, un medio solo de harina de arroz produjo una buena cantidad de pigmentos $7,05 \text{ UA}_{\lambda=510\text{nm}}$, y la mezcla de ambos mostró los mejores resultados para pigmentos rojos $16,38 \text{ UA}_{\lambda=510\text{nm}}$, por lo tanto la asociación de una fuente de carbono sólido (harina de arroz) con una fuente rica de nutrientes (melaza) aumentó la producción de pigmentos principalmente rojos por *M. ruber*.

En lugar de usar harina de arroz + melaza, se utilizó harina de quinua + melaza (Tabla 6) y el análisis estadístico en el Anexo 7, donde se observa que el menor crecimiento radial a las 288h corresponde a los tratamientos S3T1 y S3T3 a un valor de pH inicial de 5 y 7 respectivamente y una concentración de melaza de 0.5% en ambos casos, con valores de V_{cr} de 0.107 y 0.111 mm h^{-1} ; por otro lado, los tratamientos S3T2 y S3T5 mostraron los mayores valores de V_{cr} 0.133 y 0.139 mm h^{-1} respectivamente, así como el tamaño de sus radios a las 288h fue de 40.598 ± 0.897 y $42.194 \pm 0.051 \text{ mm}$ correspondientes a un pH inicial de 6 pero a diferentes concentraciones de melaza 0.5 y 1% respectivamente. Con la diferencia que los micelios correspondientes presentaron un aspecto de color más anaranjado en S3T2 que en S3T5 que era blanco desde el inicio de su crecimiento (Figura 8).

Tabla 6. Velocidad de crecimiento de *M. purpureus* en AHQ suplementado con melaza

Tratamiento (S3)	Concentración (%)	pH	Ecuación de regresión lineal	Vcr (mm h ⁻¹)	R ²	Media ± D.E.
S3T1	0.5	5	r(t) = 0.107 t + 4.524	0.107	98.33	33.758 ± 0.829 ^a
S3T2	0.5	6	r(t) = 0.133 t + 1.893	0.133	99.74	40.598 ± 0.897 ^d
S3T3	0.5	7	r(t) = 0.111 t + 2.119	0.111	99.67	34.866 ± 0.421 ^{ab}
S3T4	1	5	r(t) = 0.118 t + 4.368	0.118	98.96	36.142 ± 0.189 ^{bc}
S3T5	1	6	r(t) = 0.139 t + 1.488	0.139	99.75	42.194 ± 0.051 ^d
S3T6	1	7	r(t) = 0.116 t + 2.302	0.116	99.56	36.84 ± 0.996 ^c

S3: Melaza; D.E.: Desviación Estándar; n=3; Media ± D.E. correspondiente a las 288 h; a-d: Grupos Homogéneos

Los tratamientos al 1% fueron los que presentaron mayor crecimiento micelial correspondiente a los tres niveles de pH evaluados. Los micelios que tienen un aspecto más anaranjado que hifas blanquecinas corresponden a los tratamientos S3T1, S3T2 y S3T4 (Figura 8) a su vez de tener una apariencia algodonosa, así como el tratamiento S3T5 con la diferencia que este último tiene un micelio blanco en todo su periodo de incubación de 288h, posiblemente si se evaluaba en un mayor tiempo este tratamiento hubiese cambiado de color blanco a anaranjado ya que altas densidades celulares en la fase estacionaria pueden resultar en una mayor producción de pigmentos, por lo tanto la melaza estimula el crecimiento de *Monascus* y da como resultado una mayor producción de pigmentos (Da Silva *et al.*, 2021), en cambio la estimación visual del color del micelio aéreo de *M. ruber* en melaza fue anaranjado tenue y de un buen crecimiento a pH 6 al día 10 (240h) (Moharram *et al.*, 2012).

Por otro lado, los tratamientos S3T3 y S3T6 tienen un aspecto del micelio de color blanco y compacto en comparación con los demás tratamientos hasta ahora vistos respecto a los suplementos S1 y S2 (Figura 6 y 7), dando a entender que el factor pH igual a 7 fue el responsable de esta macromorfología bajo las condiciones de harina de quinua + melaza, posiblemente debido a que la composición de los medios como fuente de carbono y nitrógeno, temperatura, pH y oxígeno interfieren con el crecimiento celular, por ende la producción de pigmentos (Da Silva *et al.*, 2021).

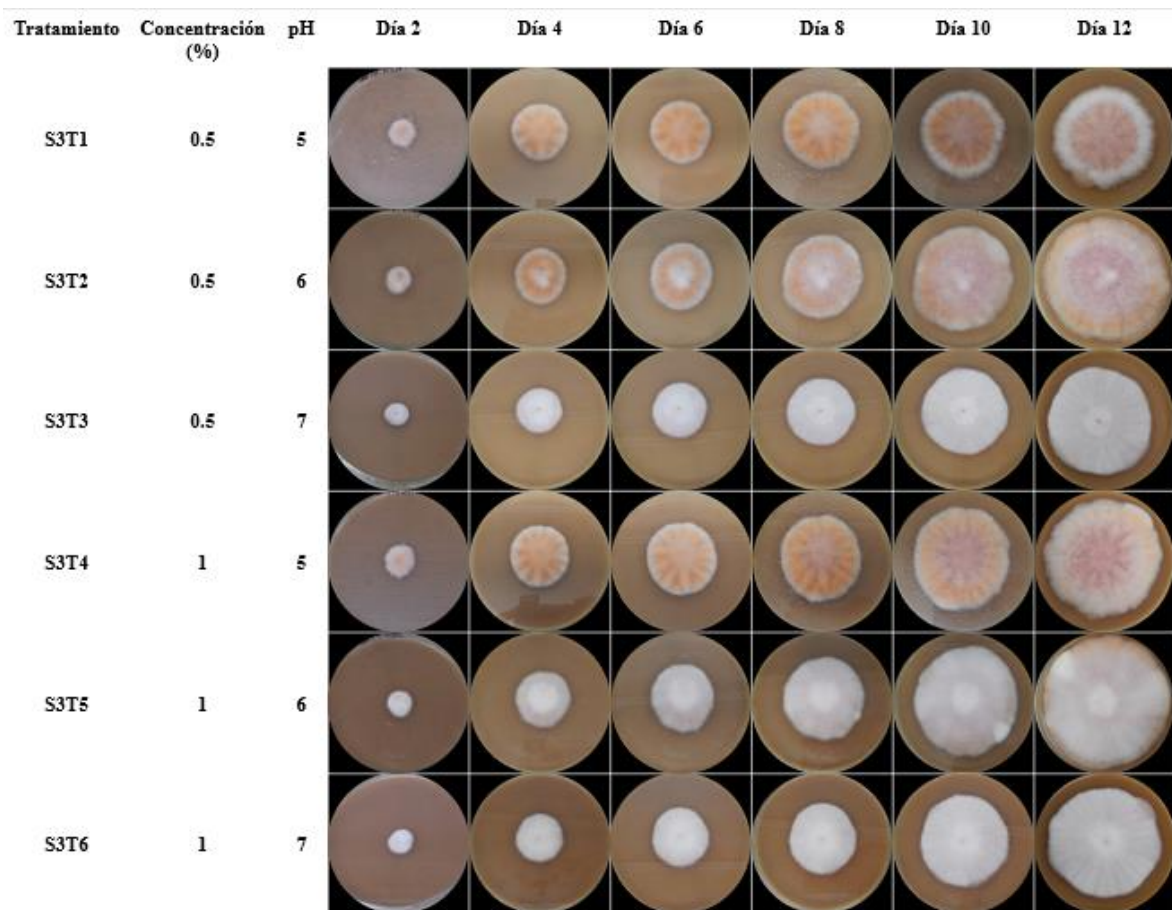


Figura 8. Crecimiento radial de *M. purpureus* en AHQ suplementado con melaza al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días.

4. 1. 4. Efecto del suplemento fermentado de pescado (S4) en la velocidad de crecimiento radial

Las bacterias acidolácticas pueden participar en el proceso de obtención del suplemento de fermentación de pescado por proteólisis, pero pueden hacerlo también las levaduras y hongos filamentosos como *M. purpureus*, produciendo péptidos bioactivos (Dineshbhai *et al.*, 2022; Martí-Quijal *et al.*, 2021). Chen *et al.* (2021) investigaron el uso de *M. purpureus* para la fermentación de espinas de pescado y los resultados indicaron que aumentó el contenido de proteína soluble, péptido, aminoácido y fenol total, así como la capacidad antioxidante; ya que por lo general este proceso tiene cambios deseables que mejoran su valor agregado.

Sin embargo, en la presente estudio se utilizó el fermentado de pescado para determinar el crecimiento de *M. purpureus* resultando que la Vcr en AHQ suplementado es menor en los tratamientos S4T1, S4T3 y S4T6 con los valores correspondientes de 0.099 mm h⁻¹ para los dos primeros y 0.096 mm h⁻¹ para el tercero, además el crecimiento radial al día 12 (análisis estadístico en el Anexo 8) para los tratamientos mencionados son 31.233 ± 0.091, 31.773 ±

0.772 y 30.698 ± 0.903 mm respectivamente; mientras que los micelios más grandes a las 288h corresponden a los tratamientos S4T2 y S4T5 ambos a un pH inicial de 6 pero a diferente concentración de 0.5 y 1% respectivamente con valores de 37.373 ± 0.676 y 38.205 ± 0.690 respectivamente sin diferencias significativas y con Vcr de 0.121 y 0.123 mm h⁻¹ respectivamente.

Tabla 7. Velocidad de crecimiento de *M. purpureus* en AHQ suplementado con fermentado de pescado.

Tratamiento (S4)	Concentración (%)	pH	Ecuación de regresión lineal	Vcr (mm h ⁻¹)	R ²	Media ± D.E.
S4T1	0.5	5	r(t) = 0.099 t + 4.369	0.099	98.75	31.233 ± 0.091 ^a
S4T2	0.5	6	r(t) = 0.121 t + 2.364	0.121	99.79	37.373 ± 0.676 ^c
S4T3	0.5	7	r(t) = 0.099 t + 2.630	0.099	99.52	31.773 ± 0.772 ^a
S4T4	1	5	r(t) = 0.109 t + 4.496	0.109	99.04	35.192 ± 0.835 ^b
S4T5	1	6	r(t) = 0.123 t + 2.238	0.123	99.25	38.205 ± 0.690 ^c
S4T6	1	7	r(t) = 0.096 t + 2.734	0.096	99.51	30.698 ± 0.903 ^a

S4: Fermentado de pescado; D.E.: Desviación Estándar; n=3; Media ± D.E. correspondiente a las 288 h; a-d: Grupos Homogéneos

El suplemento fermentado de pescado tiene potencial para el crecimiento microbiano y esto debido a que los péptidos son solubles en agua por lo tanto importantes en la formulación de medios de cultivo, ya que ninguna peptona por si sola es autosuficiente en el desarrollo de un microorganismo en el cultivo celular debido a que tienen sus propias características biológicas (Herpandi *et al.*, 2011). Como lo demostró también Safari *et al.* (2012) donde obtuvieron de residuos de cabeza de atún a dos peptonas eficaces en la promoción del crecimiento de bacterias acidolácticas como *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* y *L. sakei*, siendo mejor sus resultados en comparación del crecimiento microbiano en medio comercial MRS.

Con respecto a los micelios (Figura 9) son en su mayoría blanquecinos y algodonosos excepto en los tratamientos S4T3 y S4T6 que son compactos y tienen en común el factor de pH inicial igual a 7, mientras que S4T2 y S4T5 son los micelios que presentaron el mayor crecimiento radial, ambos corresponden a un pH inicial de 6 pero a diferentes concentraciones de fermentado de pescado 0.5 y 1% respectivamente, donde S4T2 a diferencia de S4T5 creció, pero produciendo pigmentos anaranjados en menor cantidad con respecto al blanco. Los tratamientos que tienen un aspecto de color más rojo respecto al resto son S4T1 y S4T4 ambos a un pH de 5.

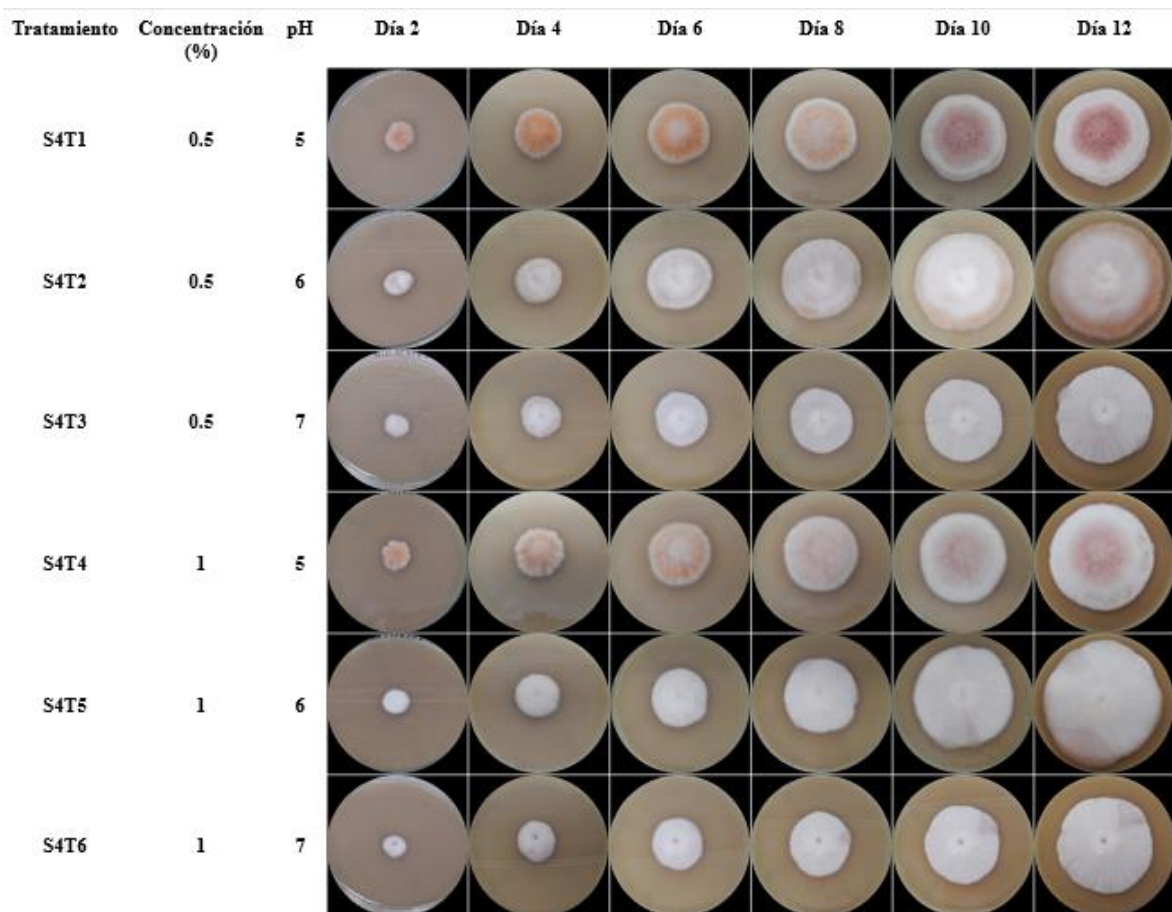


Figura 9. Crecimiento radial de *M. purpureus* en AHQ suplementado con fermentado de pescado al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días.

4. 1. 5. Efecto del suplemento hidrolizado de pescado (S5) en la velocidad de crecimiento radial

El hidrolizado de pescado como suplemento en medios de cultivo AHQ permitió un mayor crecimiento radial del hongo en los tratamientos S5T2 y S5T4 con valores de 37.984 ± 1.095 y 39.131 ± 0.486 (véase en Anexo 9), además de las Vcr de 0.127 y 0.123 respectivamente que no mostraron diferencias significativas, por otro lado, el micelio que creció menos fue el perteneciente al tratamiento con una Vcr de 0.094 mm h^{-1} y un tamaño radial de $30.498 \pm 0.626 \text{ mm}$ al doceavo día (Tabla 8).

Kolek *et al.* (2023) demostraron que se puede utilizar una hidrólisis alcalina simple y económica de escamas y residuos del fileteado de pescado para preparar un medio de cultivo complejo como fuente de nitrógeno, fósforo y otros elementos para el cultivo de *M. purpureus* adecuado para la producción de pigmentos donde obtuvieron estos metabolitos al día 14 de fermentación; además sugirieron que existe un gran potencial de que este medio también sea adecuado para muchas aplicaciones biotecnológicas. De igual manera Guérard

et al. (2001) mencionan que los hidrolizados de proteína de pescado son excelentes fuentes nitrogenadas para la formulación de medios de cultivo de crecimiento microbiano.

Investigadores como Martone *et al.* (2005) también utilizaron hidrolizado de pescado como fuente de nutrientes para arqueas (*Halobacterium salinarum*) y como medio de cultivo para bacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis*) demostraron que el crecimiento celular y los tiempos de generación resultantes del control y los cultivos de hidrolizado de pescado no mostraron diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que el hidrolizado de pescado puede usarse como un sustrato alternativo para fines de cultivo de microorganismos. Adicionalmente Aspino *et al.* (2005) probaron hidrolizados hechos de vísceras de bacalao mediante diferentes procedimientos de hidrólisis enzimática como fuente combinada de nitrógeno, aminoácidos y vitaminas en medios de crecimiento microbiano en comparación con peptonas comerciales comunes para *E. coli*, *B. subtilis*, *Lactobacillus sakei*, *S. cerevisiae* y *Aspergillus niger*; demostraron que la elección de las enzimas proteolíticas utilizadas para producir el hidrolizado de pescado tuvieron un impacto considerable en el rendimiento del hidrolizado resultante, en tasa de crecimiento máximo y producción de biomasa. En lugar de peptonas estándar Ovissipour *et al.* (2009) utilizaron hidrolizados de pescado generados por enzimas comerciales, para formular medios de cultivo y promover el crecimiento de bacterias como: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *Micrococcus lysodeikticus*; demostraron que el grado de hidrólisis enzimática varía según la enzima elegida, siendo directamente proporcional de que a mayor grado de hidrólisis se producirá mayor biomasa microbiana.

Tabla 8. Velocidad de crecimiento de *M. purpureus* en AHQ suplementado con hidrolizado de pescado.

Tratamiento (S5)	Concentración (%)	pH	Ecuación de regresión lineal	Vcr (mm h ⁻¹)	R ²	Media ± D.E.
S5T1	0.5	5	r(t) = 0.101 t + 4.587	0.101	98.61	33.077 ± 0.395 ^b
S5T2	0.5	6	r(t) = 0.127 t + 2.274	0.127	99.54	37.984 ± 1.095 ^d
S5T3	0.5	7	r(t) = 0.104 t + 2.875	0.104	99.64	33.407 ± 0.569 ^b
S5T4	1	5	r(t) = 0.123 t + 3.211	0.123	99.61	39.131 ± 0.486 ^d
S5T5	1	6	r(t) = 0.112 t + 2.932	0.112	99.75	36.003 ± 0.297 ^c
S5T6	1	7	r(t) = 0.094 t + 2.661	0.094	99.55	30.498 ± 0.626 ^a

S5: Hidrolizado de pescado; D.E.: Desviación Estándar; n=3; Media ± D.E. correspondiente a las 288 h; a-d: Grupos Homogéneos

La diversa aplicación de hidrolizado de pescado en los medios de cultivo se debe a que los hidrolizados de proteínas activas o péptidos sirven como alimentos funcionales debido a que

presentan propiedades nutricionales y biológicas (Chi *et al.*, 2015a). La actividad biológica de un péptido depende de la composición de aminoácidos, hidrofobicidad, carga, secuencia y longitud, los péptidos de bajo peso molecular se absorben rápido, son menos tóxicos y más estables (Kapasob *et al.*, 2022).

El aspecto visual de los micelios con suplemento de hidrolizado de pescado (Figura 10) son similares a los micelios con el suplemento de fermentado de pescado correspondientes (Figura 9) con la diferencia más notoria en el tratamiento S5T4 que no muestra pigmentación roja en gran parte del micelio aéreo como si lo es en el tratamiento S4T4. En la figura 10 el tratamiento S5T1 presenta un intenso color rojo al centro del micelio, siendo similar al tratamiento S4T1 que fue evaluado con los mismos niveles de concentración (0.5 %) y pH (5).

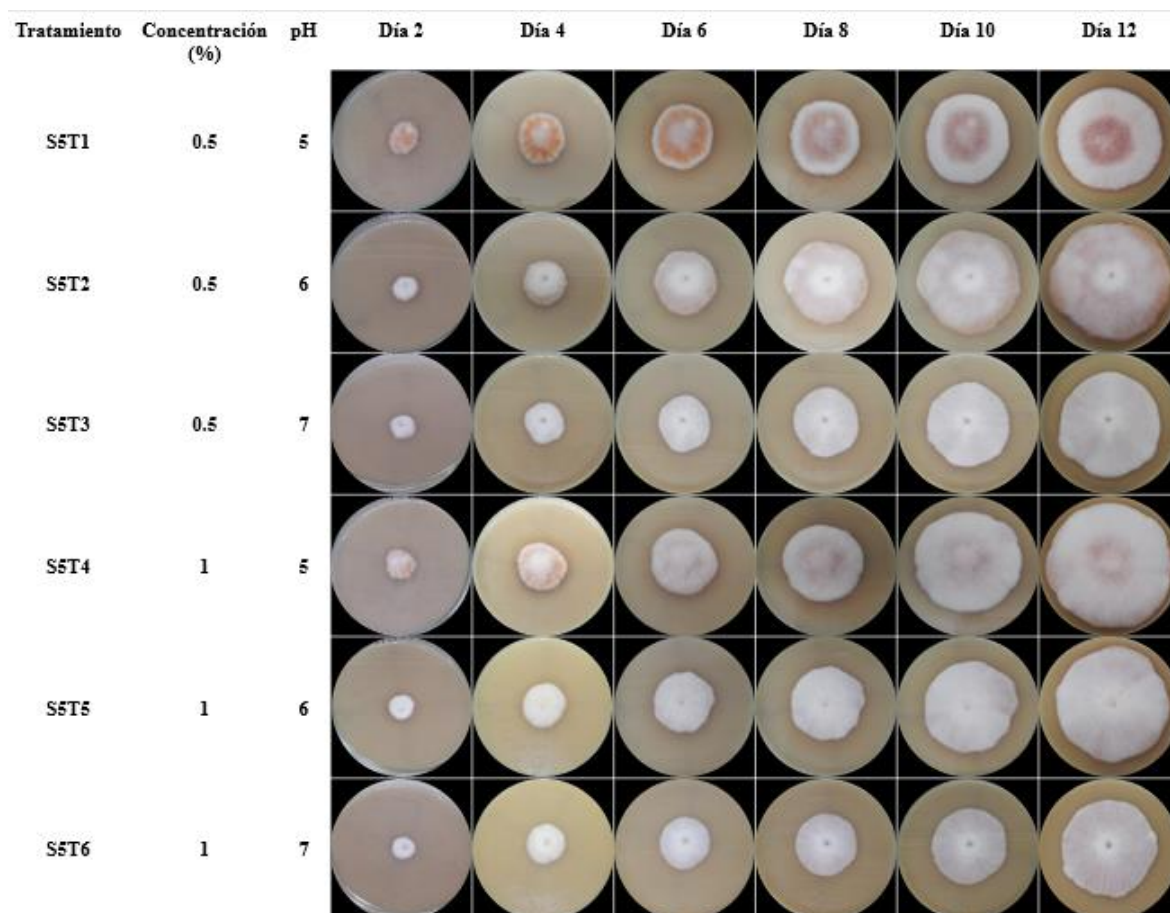


Figura 10. Crecimiento radial de *M. purpureus* en AHQ suplementado con hidrolizado de pescado al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días.

4. 1. 6. Efecto del suplemento glutamato monosódico (S6) en la velocidad de crecimiento radial

Los tratamientos con glutamato monosódico se presentan en la Tabla 9, donde este suplemento permitió el menor crecimiento radial en los tratamientos S6T3 y S6T6 con valores 26.318 ± 0.224 y 27.533 ± 0.291 mm (análisis estadístico en el Anexo 10), ambos fueron a pH 7 a su vez las Vcr fueron 0.081 y 0.087 mm h⁻¹ respectivamente. Los tratamientos que presentaron mayor crecimiento radial del hongo fueron S6T1 y S6T4 con 32.613 ± 0.103 y 32.42 ± 1.247 mm sin diferencias significativas siendo sus valores respectivos de velocidad de crecimiento 0.108 y 0.012 mm h⁻¹. Chatterjee *et al.* (2009) obtuvieron el máximo rendimiento de producción de pigmentos y crecimiento con glutamato monosódico (0.3%) y glucosa (2%) a pH 6 e incubado en oscuridad a 30°C, frente a los suplementos como nitratos y sales de amonio; demostrando que tanto el crecimiento como la producción de pigmentos puede variar según la suplementación con nitrógeno en los medios de cultivo en *Monascus*.

Tabla 9. Velocidad de crecimiento de *M. purpureus* en AHQ suplementado con glutamato monosódico.

Tratamiento (S6)	Concentración (%)	pH	Ecuación de regresión lineal	Vcr (mm h ⁻¹)	R ²	Media ± D.E.
S6T1	0.5	5	$r(t) = 0.108 t + 3.362$	0.108	99.00	32.613 ± 0.103^c
S6T2	0.5	6	$r(t) = 0.088 t + 3.761$	0.088	99.09	28.327 ± 0.291^b
S6T3	0.5	7	$r(t) = 0.081 t + 3.493$	0.081	98.98	26.318 ± 0.224^a
S6T4	1	5	$r(t) = 0.102 t + 4.369$	0.102	98.42	32.42 ± 1.247^c
S6T5	1	6	$r(t) = 0.090 t + 3.565$	0.090	99.36	28.958 ± 0.369^b
S6T6	1	7	$r(t) = 0.087 t + 3.216$	0.087	99.43	27.533 ± 0.291^{ab}

S6: Glutamato monosódico; D.E.: Desviación Estándar; n=3; Media ± D.E. correspondiente a las 288 h; a-c: Grupos Homogéneos

En un estudio de Dikshit & Tallapragada (2011) investigaron diferentes factores como el patrón de crecimiento, temperatura y pH para la producción de pigmentos y el crecimiento micelial de *M. purpureus*, obteniéndose los mejores resultados cuando se usó como sustrato sólido el arroz suplementado con extracto de levadura (1 y 5%) y GMS al 5 %, durante 16 días de incubación a 30°C a un valor de pH de 5,5 (Dikshit & Tallapragada, 2011). En otra investigación de Babitha *et al.* (2006) utilizaron polvo de semilla de yaca como sustrato para la producción de pigmentos por *M. purpureus*, donde la naturaleza amortiguadora del sustrato permitió obtener el color de los pigmentos más estables a diferentes pH iniciales en la preparación del sustrato, y cuando se adicionó glutamato monosódico aumentó la solubilidad de los pigmentos en agua.

La adición de una fuente de nitrógeno (especialmente orgánico) como el glutamato monosódico estimula la producción de metabolitos secundarios como los pigmentos (Carvalho *et al.*, 2003). Una concentración cercana a la realizada en el presente estudio fue estudiada por Musaalbakri *et al.* (2005) quienes usaron 1.2% de GMS para aumentar la producción de pigmento rojo y el crecimiento de *M. purpureus* FTC 5391. Sin embargo, se observa que todos los micelios son blancos (Figura 11) indiferentemente de la concentración de S6 y pH, posiblemente se debe a que el medio de cultivo harina de quinua + glutamato monosódico incrementen más la producción de biomasa que de pigmentos, aunque del lado reverso de todos los micelios de las placas de Petri fueron rojas (datos no mostrados). Se puede deber a que en esta zona la difusión de oxígeno es lenta en comparación con la superficie del medio, a su vez, según Manan *et al.* (2017) el micelio desarrollado en la parte inferior es más envejecido que el micelio que crece en la superficie.

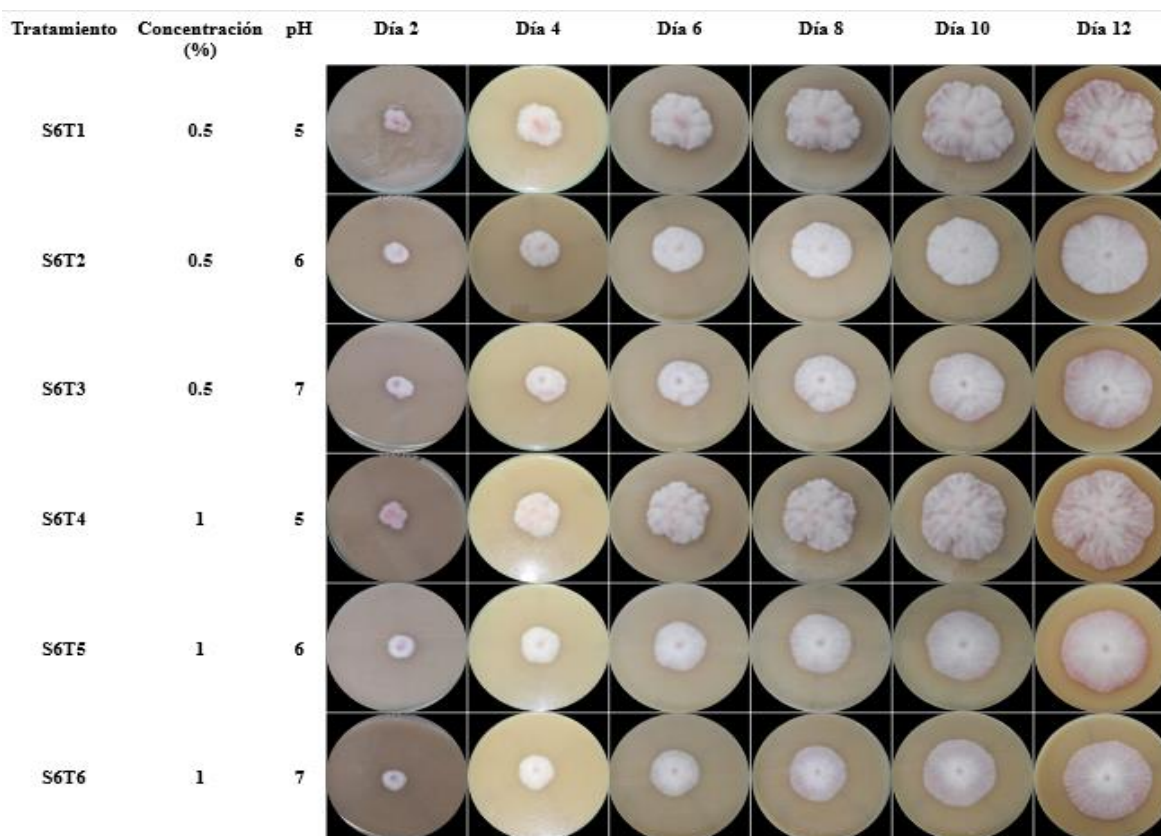


Figura 11. Crecimiento radial de *M. purpureus* en AHQ suplementado con glutamato monosódico al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días.

Además a diferencia de los micelios observados en los suplementos S1, S2, S3, S4, S5 y S7 se observa en la Figura 11 que los tratamientos S6T1 y S6T4 tienen un crecimiento radial no uniforme desde el día 2 hasta el día 12, ambos tratamientos con glutamato monosódico como

suplemento a pH inicial de 5 pero con diferentes concentraciones de glutamato monosódico a pesar de ellos fueron los tratamientos que mostraron mayor crecimiento radial en comparación de los demás evaluados con S6 y los que tuvieron menor crecimiento radial fueron a pH 7 como los tratamientos S6T3 y S6T6. En general los micelios de los seis tratamientos (Figura 11) se muestran compactos con ligera pigmentación roja en el micelio aéreo.

4. 1. 7. Efecto del suplemento cloruro de sodio (S7) en la velocidad de crecimiento radial.

Los tratamientos con suplemento cloruro de sodio S7T2 y S7T5 (Tabla 10) corresponden a un nivel de pH inicial igual a 6 y se obtuvieron los valores más altos de crecimiento radial a las 288h (véase Anexo 11) siendo 43.040 ± 0.230 y 42.445 ± 0.568 mm con sus respectivas Vcr de 0.150 y 0.149 mm h⁻¹. en comparación con los demás suplementos (Tablas 4-9).

Otra investigación donde utilizaron NaCl fue realizada por Carrillo-Inungaray *et al.* (2006) quienes compararon parámetros de crecimiento, entre ellos el crecimiento máximo y la velocidad de crecimiento de dos hongos *P. digitatum* y *R. oryzae* donde utilizaron la sal para ajustar la aw a 0.895 de los medios de cultivo agar D-glucosa Sabouraud, los resultados obtenidos fueron para *P. digitatum* la Vcr fue 0.117 mm h⁻¹ y para *R. oryzae* la Vcr fue 0.232 mm h⁻¹, así como el máximo crecimiento radial fueron 8.522 y 30.070 mm respectivamente.

En otro estudio la sal fue utilizada como osmolito para evaluar su efecto en el crecimiento fúngico como el de Bohórquez & Rico (2019) realizado en *Acremonium chrysogenum* donde se observó que el hongo aumentó su crecimiento vegetativo en condiciones de NaCl 0.5M (2.922 % p/v), considerándose una osmoadaptación a esta sal; sin embargo, fue osmosensible en KCl.

Tabla 10. Velocidad de crecimiento de *M. purpureus* en AHQ suplementado con cloruro de sodio.

Tratamiento (S7)	Concentración (%)	pH	Ecuación de regresión lineal	Vcr (mm h ⁻¹)	R ²	Media ± D.E.
S7T1	0.5	5	r(t) = 0.128 t + 4.353	0.128	97.91	38.915 ± 0.350 ^b
S7T2	0.5	6	r(t) = 0.150 t + 3.022	0.150	98.88	43.040 ± 0.230 ^c
S7T3	0.5	7	r(t) = 0.137 t + 2.538	0.137	99.10	40.185 ± 1.829 ^b
S7T4	1	5	r(t) = 0.123 t + 5.046	0.123	96.13	36.428 ± 0.414 ^a
S7T5	1	6	r(t) = 0.149 t + 2.852	0.149	98.77	42.445 ± 0.568 ^c
S7T6	1	7	r(t) = 0.134 t + 1.724	0.134	99.57	38.760 ± 0.214 ^b

S7: Cloruro de sodio; D.E.: Desviación Estándar; n=3; Media ± D.E. correspondiente a las 288 h; a-c: Grupos Homogéneos

El cloruro de sodio ocasiona estrés osmótico como lo señaló Babitha *et al.* (2007a) donde estudiaron la influencia del estrés sobre la producción de pigmentos por el hongo *M. purpureus* en fermentación en sustrato sólido. El estrés osmótico se realizó con diferentes concentraciones de NaCl observándose cambios significativos en la producción de pigmentos y crecimiento, una alta concentración de esta sal indujo la conidiación aumentando así la producción de pigmento rojo de 11.86 a 20.14 OD / g materia seca fermentada y a su vez causó disminución de la biomasa fúngica en un 50%; este hallazgo los autores lo consideran importante debido a que permitió explotar el cultivo fúngico *M. purpureus* LPB 97 para producir colores de elección: rojo o amarillo, o aumentar considerablemente el rendimiento de pigmentos rojos, además sus resultados bien podrían afectar el aspecto comercial de los pigmentos *Monascus* para aplicación industrial.

En la Figura 12 todos los micelios están pigmentados siendo más evidente desde el día 4, también se observa que los tratamientos S7T1, S7T2, S7T4 y S7T5 tienen un micelio anaranjado que se va intensificando a medida que transcurre el tiempo (hasta las 288h) a diferencia de los tratamientos S7T3 y S7T6 que su aspecto es más rojizo ambos a pH 7. Los micelios no son muy anaranjados algodonosos como fue evidente con los suplementos S1 y S2, pero invadieron prácticamente en su totalidad de las placas Petri para los tratamientos S7T2 y S7T5.

El mismo color de los micelios también fue reportado por Zhen *et al.* (2019) que estudiaron el vínculo de NaCl con el crecimiento celular y metabolitos secundarios en *M. purpureus* a diferentes concentraciones en el medio de cultivo donde obtuvieron que los pigmentos amarillos, anaranjados y rojos aumentaron en 1.7, 1.4, y 1.4 veces respectivamente, evaluados en el décimo día de cultivo, donde el efecto de inhibición sobre el crecimiento de micelios aéreos fue muy evidente con un aumento de la concentración de NaCl(M) 0, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2 y 0.4 esto es equivalente a 0, 0.058, 0.116, 0.584, 1.168 y 2.336 % p/v; por lo tanto, NaCl podría participar en la síntesis de metabolitos secundarios y el crecimiento celular en *M. purpureus*.

Por otro lado, Domínguez-Espinosa & Webb (2003) utilizaron como suplemento otra sal, cloruro de amonio (NH₄Cl), en harina compuesta de una variedad mixta de trigo duro como fuente de nutrientes para producir pigmentos de *M. purpureus* Went (IMI 210765) donde se promovió la biomasa y la formación de colorantes naranjas. Mientras que Virk *et al.* (2020) emplearon acetato de sodio demostrando que su adición en los medios de cultivo afectó a

los caracteres físicos de *M. ruber*, donde las colonias fueron compactas y anaranjadas oscuras con disminución en la producción de hifas a medida que aumentaba la concentración 0.1, 0.25 y 0.5%.

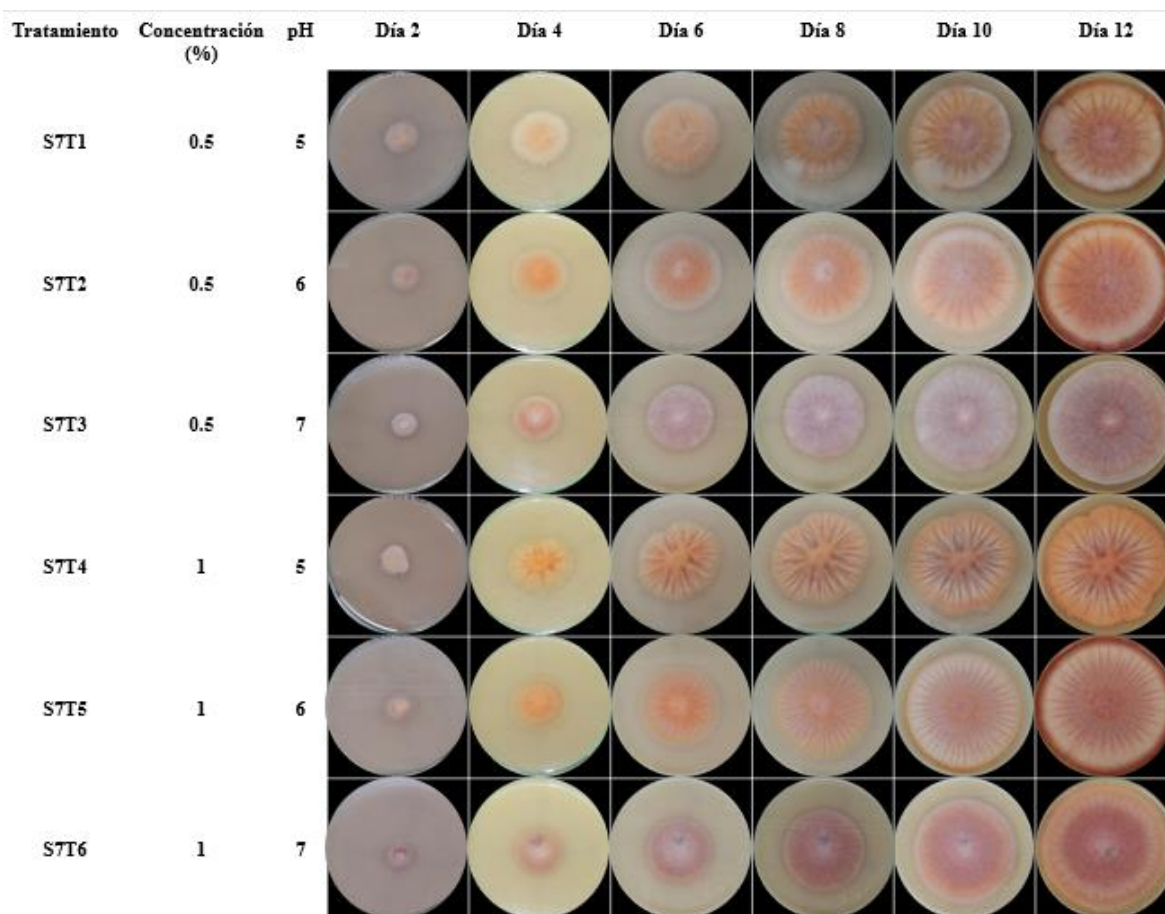


Figura 12. Crecimiento radial de *M. purpureus* en AHQ suplementado con cloruro de sodio al 0.5% y 1% a pH 5, 6 y 7 durante 12 días

4. 1. 8. Comparación de las mayores velocidades de crecimiento de *M. purpureus* en los medios de cultivo suplementados

La taxonomía de *M. purpureus* se basa en características morfológicas, en vez de las características, bioquímicas, fisiológicas o genéticas como es usado frecuentemente en bacterias (Manan *et al.*, 2017). En ese sentido el crecimiento radial de los hongos *Monascus* es un indicador en la síntesis de metabolitos entre ellos los pigmentos (Yongsmith, 2000). Por ello, en esta etapa final del objetivo se compararon los tratamientos que presentaron un mayor crecimiento radial a las 288 h (véase el Anexo 12) elegidos por cada suplemento fueron: S1T6, S2T3, S3T2, S4T2, S5T2, S6T1 y S7T2 como se muestra en la figura 13B, siendo el que presenta el mayor crecimiento radial el tratamiento S7T2 que corresponde al suplemento de cloruro de sodio y el menor corresponde al suplemento glutamato

monosódico S6T1, sus aspectos morfológicos de los micelios corroboran esta diferencia (figura 13A). Por lo tanto, se consideraron ambos tratamientos para los siguientes objetivos de la investigación con el propósito de comparar tanto la cantidad de N-acetilglucosamina (biomasa) y pigmentos.

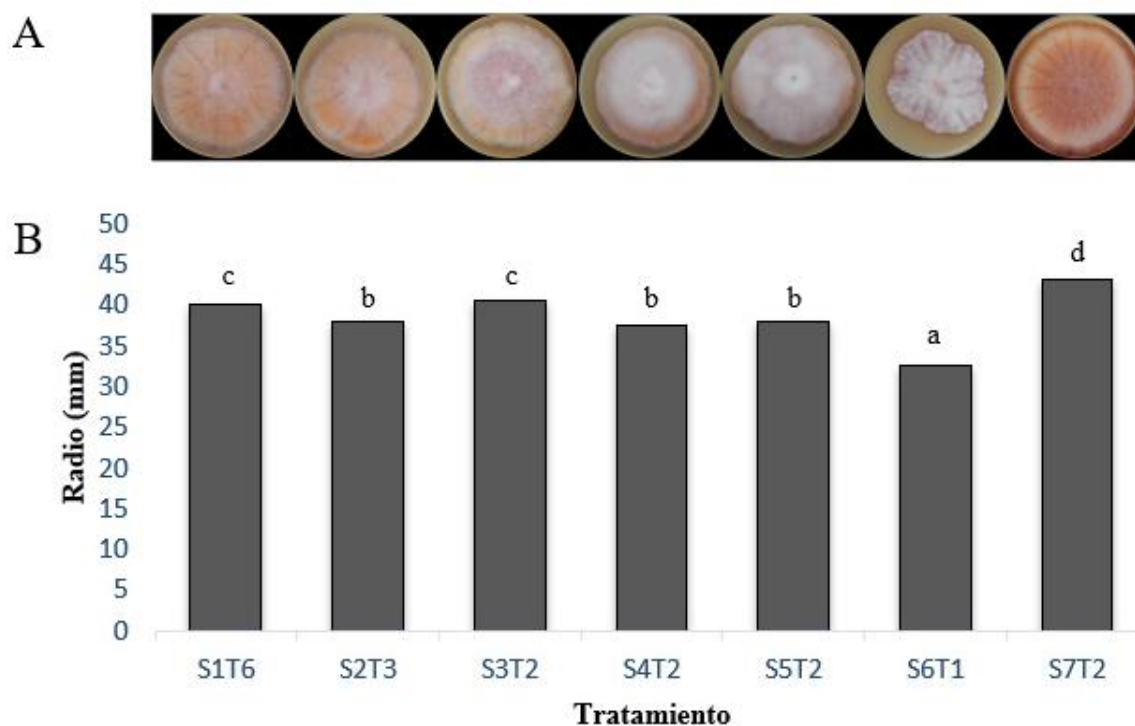


Figura 13. A) Aspecto visual de los micelios de *M. purpureus* comparados a las 288h de los mejores tratamientos por suplemento. B) Gráfica de los mayores radios alcanzados por *M. purpureus* comparando los mejores tratamientos por suplemento a las 288h.

4.2. Cuantificación de biomasa por N-acetilglucosamina y peso seco

En la investigación de Coello-Loor *et al.* (2017) primero determinaron la V_{cr} (mm h^{-1}), luego la producción de biomasa con el propósito de establecer el grado de adaptación y desarrollo de *Pleurotus* spp, fue similar al presente estudio en el propósito de determinar la biomasa seca; ellos llevaron al microondas el medio de cultivo para fundir el agar, luego se filtró, lavó y secó para tomar los pesos con balanza analítica. Por lo mencionado, es que el método fue considerado junto a la metodología de Zhang *et al.* (2013) con modificaciones, quienes desarrollaron un proceso novedoso de fermentación en estado sólido mediante el uso de agar para determinar directamente la biomasa de *M. purpureus*, que puede ser complementaria con otros métodos de determinación indirecta como parte de una investigación básica.

Los métodos de determinación indirecta de biomasa pueden ser densidad de hifas, conteo de

hifas que cruzan determinado limite, diámetro de hifas y de micelio (Reeslev & Kjoller, 1995), cuantificación de la N-acetilglucosamina (Chysirichote *et al.*, 2014).

La glucosamina (GlcN) es un componente importante y valioso en la pared celular de los hongos (Mohammadi *et al.*, 2012); los hongos filamentosos contienen quitina en su pared celular (poli-N-acetil-D glucosamina) a partir de la cual se libera el aminoazúcar N-acetil-D-glucosamina por hidrólisis ácida (Chysirichote *et al.*, 2014) que da como resultado la desacetilación completa y la despolimerización parcial de quitina y quitosano y la formación de ácido acético y oligosacáridos GlcN (Mohammadi *et al.*, 2012).

En esta segunda etapa de la investigación se cuantificó la biomasa fúngica directa e indirectamente por peso seco del micelio y N-acetilglucosamina respectivamente para los tratamientos seleccionados de la primera etapa como son: S6T1 y S7T2 (Anexos 13 y 15 respectivamente) evaluados en el tiempo de 48, 96, 144, 192, 240 y 288 horas.

Los resultados fueron para S6T1 (Anexo 14) la cantidad de biomasa en peso seco (g) los siguientes valores: 0.006 ± 0.001 , 0.018 ± 0.001 , 0.029 ± 0.002 , 0.060 ± 0.002 , 0.077 ± 0.009 y 0.118 ± 0.007 con diferencias significativas durante las 288 h, excepto cuando se comparó a las 48-96 h, así como entre las 96-144 h; mientras que los resultados de N-acetilglucosamina (mg/p.s.b.) fueron 0.0039 ± 0.0001 , 0.0344 ± 0.0016 , 0.0833 ± 0.0169 , 0.1255 ± 0.0331 , 0.1466 ± 0.0304 y 0.2345 ± 0.0249 en los tiempos de fermentación ya mencionados donde no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se compararon en los tiempo 48-96, 96-144, 144-192 y 192-240. La curva de producción de biomasa de *M. purpureus* para ambas determinaciones se observa en la Figura 14.

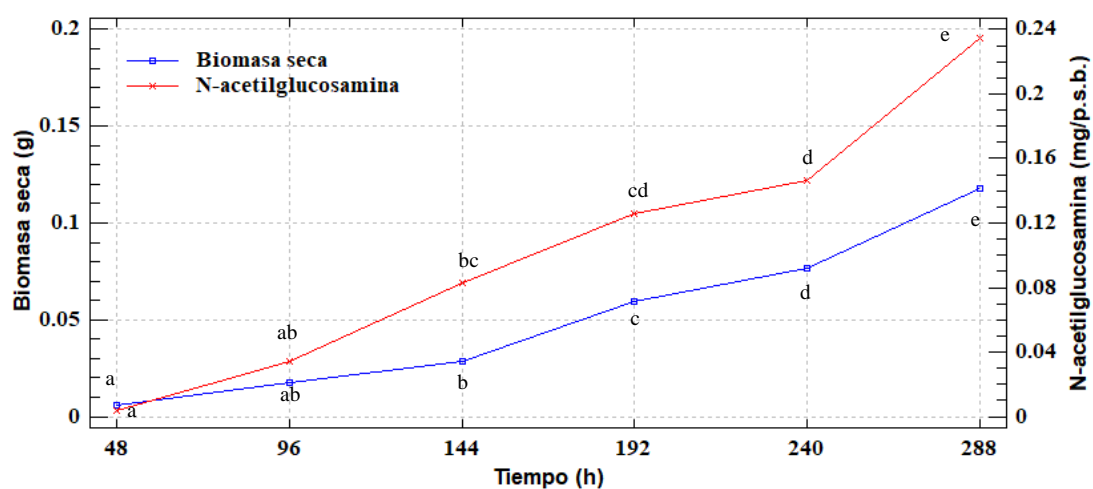


Figura 14. Producción de biomasa fúngica como N-acetilglucoamina y peso seco utilizando el suplemento glutamato monosódico al 0.5% y pH 5 (S6T1) en medio de cultivo a base de harina de quinua.

De igual manera se analizaron los resultados para S7T2 (Anexo 16) donde la cantidad de biomasa en peso seco (g) fueron: 0.006 ± 0.001 , 0.028 ± 0.006 , 0.078 ± 0.004 , 0.130 ± 0.011 , 0.224 ± 0.015 y 0.267 ± 0.01 durante el tiempo de fermentación de 48, 96, 144, 192, 240 y 288 horas respectivamente, con diferencias significativas entre las 96 y 288 h. Por otro lado, los resultados de N-acetilglucosamina (mg/p.s.b.) fueron 0.0079 ± 0.0008 , 0.0440 ± 0.0033 , 0.1099 ± 0.0057 , 0.1542 ± 0.019 , 0.2677 ± 0.0123 y 0.3289 ± 0.0111 en los tiempos de fermentación iguales a los evaluados para el peso seco, donde hubo en todos los tiempos se presentó diferencias significativas ($p < 0.05$). La curva de producción de biomasa de *M. purpureus* para peso seco y N-acetilglucosamina se observa en la Figura 15.

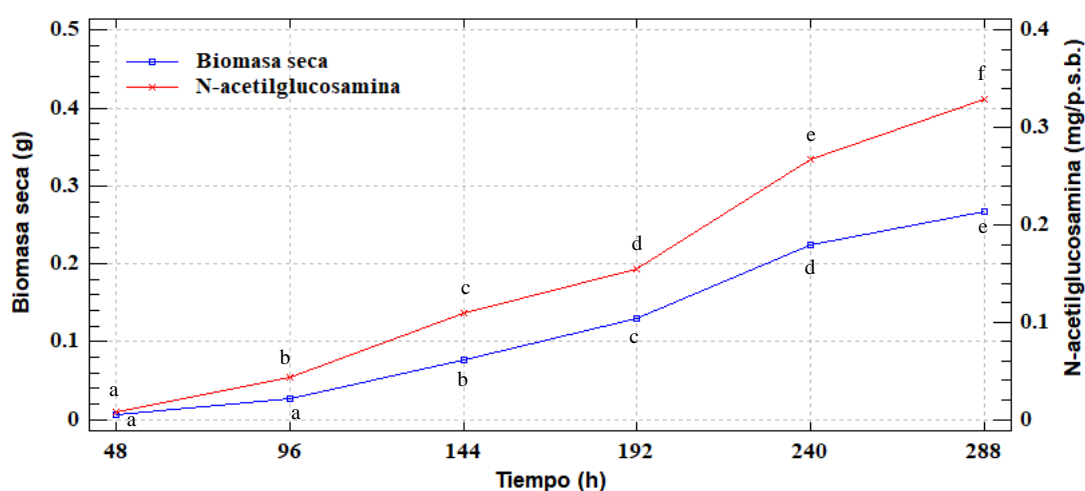


Figura 15. Producción de biomasa fúngica como N-acetilglucosamina y peso seco utilizando el suplemento cloruro de sodio al 0.5% y pH 6 (S7T2) en medio de cultivo a base de harina de quinua.

4.3. Densidad óptica de pigmentos producidos por *M. purpureus*

En la primera etapa del tiempo de fermentación, los hongos utilizan fuentes de carbono, fósforo y nitrógeno del sustrato para sus metabolitos primarios, bioconversión, energía, dióxido de carbono y agua; después los hongos utilizan los productos provenientes de la primera etapa para producir metabolitos secundarios (Yongsmith, 2000) como los pigmentos, por lo tanto para la producción de este metabolito deseado es importante conocer la estructura y morfología de *Monascus* para escalar en un proceso de fermentación industrial (Manan *et al.*, 2017), así como otros factores: temperatura, presencia de oxígeno, aireación, fuente de nitrógeno y medio de cultivo (Bühler *et al.*, 2015).

Como bien se conoce tradicionalmente se han aislado varios metabolitos y pigmentos nuevos del arroz rojo aparte de los mencionados, donde sus estructuras químicas se han caracterizado como ankalactona, monascolidona, monascopiridina, monasfluor, monascusona, pigmento rojo nuevo, monaspurona, y monarubrina y rubrupunctina; además

varios tipos de pigmentos de *Monascus* aún se desconocen (Mukherjee & Singh, 2011) y que pueden provenir de diferentes sustratos en donde se realice la fermentación, como por ejemplo el mijo, un cereal libre de gluten, siendo esta última característica también de la quinua con la diferencia que es un pseudocereal. El mijo fue utilizado para el cultivo de *M. purpureus* con el fin de demostrar que tiene un buen potencial como sustrato alternativo al arroz para producir altos niveles de metabolitos secundarios como los pigmentos (Marič *et al.*, 2019).

En la primera etapa, como era de esperarse, se observaron micelios unos más pigmentados que otros (Figura 6-12), pero para esta tercera etapa se continuó con los tratamientos elegidos ya analizados en la segunda etapa como son S6T1 y S7T2 (Anexos 17 y 19 respectivamente).

El tratamiento S6T1 corresponde al suplemento glutamato monosódico al 0.5% ajustado a un pH de 5 que tiene un aspecto visual blanco algodonoso del lado anverso (Figura 13A) durante todo el tiempo de fermentación (288h) sin embargo del lado reverso (datos no mostrados) se observó un color rojo carmesí, corroborando la información de Manan *et al.* (2017) que señala que al principio la parte joven del micelio de *M. purpureus* es blanca, luego cambia a un naranja, posteriormente a un rojo que se va intensificando a carmesí a medida que el micelio envejece. Entonces se puede afirmar que la parte más joven y envejecida se encuentran principalmente en la superficie y en la base del micelio respectivamente.

De cada micelio (tres repeticiones) se extrajeron los pigmentos con solución hidroetanólica donde los resultados fueron: 0.012 ± 0.003 , 0.02 ± 0.006 , 0.028 ± 0.006 , 0.05 ± 0.002 , 0.078 ± 0.006 y 0.1 ± 0.011 (pigmentos amarillos); 0.013 ± 0.004 , 0.017 ± 0.004 , 0.022 ± 0.005 , 0.04 ± 0.005 , 0.058 ± 0.006 y 0.063 ± 0.004 (pigmentos anaranjados) y 0.026 ± 0.005 , 0.026 ± 0.006 , 0.033 ± 0.004 , 0.057 ± 0.004 , 0.08 ± 0.007 y 0.084 ± 0.004 (pigmentos rojos) evaluados en el tiempo de 48, 96, 144, 192, 240 y 288 horas respectivamente. Las diferencias significativas se dan a partir de las 192 h para los tres tipos de pigmentos (Anexo 18). Las curvas de producción de los tres tipos de pigmentos utilizando el suplemento glutamato monosódico al 0.5% y pH 5 (Figura 16).

Una mayor producción de pigmentos rojos en el presente estudio se confirmó con los resultados de Pineda-Insuasti *et al.* (2016) donde también utilizaron un medio de cultivo con glutamato monosódico para favorecer la producción de pigmentos rojos. Otro ejemplo es el de Kraboun *et al.* (2013) quienes adicionaron GMS al maíz ceroso e investigaron el efecto

como fuente nitrogenada sobre productos de interés, entre los que destacaron fueron: la intensidad de pigmentos y contenido de glucosamina producidos por *M. purpureus* TISTR 3090 a concentraciones de nitrógeno de 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00% equivalente a la adición de GMS de 3.02, 6.04, 9.06 y 12.08% respectivamente, donde la producción máxima al día 12 (288 h) de fermentación fue el contenido de pigmentos y al día 8 (192 h) fue máximo el contenido de glucosamina.

Los pigmentos rojos y amarillos se produjeron se forma similar en el transcurso del tiempo (Figura 16), como fue en el estudio de Ismail *et al.* (2021) quienes investigaron la optimización de la composición de micronutrientes en el medio para producir pigmentos *M. purpureus* por fermentación en sustrato sólido donde se obtuvo que el mejor impacto en el aumento de pigmentos (rojos y amarillos) y biomasa fue con una cantidad de GMS 1.5% y 1.4% respectivamente y de NaCl 1% para los metabolitos mencionados.

Entonces se demostró que el GMS es esencial en la producción de este tipo de pigmentos, a pesar de que Silbir & Goksungur, (2019) mencionaron que tiene un alto costo que puede limitar su uso a nivel industrial, es por ello que en su investigación buscaron alternativas de nitrógeno equivalentes al GMS (0.8% p/v) empleando extracto de levadura, peptona, licor de maíz, urea y brotes de malta, a pesar de ello la mayor formación de pigmentos rojos se logró con GMS posiblemente debido a que las reacciones que ocurren con compuestos que presentan grupos amino promueven la síntesis de estos pigmentos extracelulares solubles en agua. No obstante, el tratamiento S6T1 utilizó muy poca cantidad de GMS (0.5%) para producir pigmentos, haciendo factible su aplicación a nivel industrial.

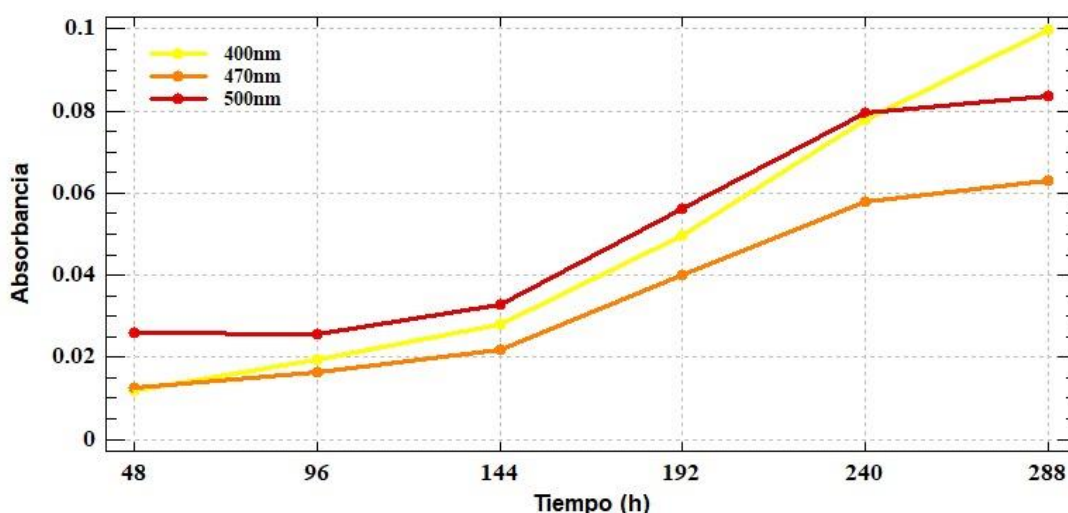


Figura 16. Producción de pigmentos utilizando el suplemento glutamato monosódico al 0.5% y pH 5 (S6T1) en medio de cultivo a base de harina de quinua.

De igual manera se analizó la densidad óptica o absorbancia (UA/ml) de los extractos hidroetanólicos de los pigmentos de los micelios del tratamiento S7T2 (suplemento cloruro de sodio al 0.5% y pH 6) en medio de cultivo a base de harina de quinua, estos resultados corresponden a las 288 h: 0.026 ± 0.006 , 0.056 ± 0.007 , 0.098 ± 0.009 , 0.157 ± 0.009 , 0.181 ± 0.008 y 0.199 ± 0.01 (pigmentos amarillos); 0.03 ± 0.007 , 0.054 ± 0.008 , 0.06 ± 0.007 , 0.054 ± 0.007 , 0.05 ± 0.003 y 0.053 ± 0.005 (pigmentos anaranjados) y 0.018 ± 0.005 , 0.061 ± 0.007 , 0.075 ± 0.006 , 0.069 ± 0.007 , 0.078 ± 0.006 y 0.103 ± 0.008 (pigmentos rojos), los extractos etanólicos a la longitud de onda de 400 nm tuvieron diferencias significativas a un $p < 0.05$ comparadas en el tiempo de 48, 96, 144, 192, 240, solo no hubieron diferencias en las absorbancias comparadas a las 240 y 288h. A 470 nm solo a las 48h hubo diferencias significativas, mientras que los valores correspondientes a las horas 96, 144, 192, 240 y 288 no presentaron diferencias significativas. En el caso de los pigmentos rojos evaluados a 500 nm las diferencias significativas fueron en las horas 48, 96-192, 240 y 288 h (Anexo 20). Las curvas de producción de los tres tipos de pigmentos utilizando el suplemento cloruro de sodio al 0.5% y pH 6 se observa en la Figura 17.

Otra investigación similar, pero con la cepa *M. ruber* M7 fue estudiada por Virk *et al.* (2020) donde evaluaron el efecto de las sales como acetato de sodio (CH_3COONa), y acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) al 0,1%, 0,25% y 0,5% en PDA con el propósito de evaluar las morfologías, biomasa y pigmentos. La evaluación visual de los micelios fue anaranjada en su mayoría como en S7T2 con la diferencia que en este último los micelios de las repeticiones crecieron uniformemente, sin embargo, ello no significó que haya una mayor presencia de pigmentos anaranjados. Los autores mencionaron que los pigmentos anaranjados se forman primero y luego se reducen para formar pigmentos amarillos según la hipótesis donde la producción de estos últimos pigmentos depende del contenido de la esterificación de los productos de una poliacetato sintasa y una sintasa de ácidos grasos. Entonces en S7T2 a partir de las 48 h hasta las 240 h mejoró la producción de pigmentos amarillos, así como su transporte por la solución hidroetanólica resultando no significativo en los tiempos comparados de 240 y 288 h. En caso de los pigmentos rojos los autores afirmaron que se producen por la aminación de pigmentos naranjas. Por lo tanto, en el tratamiento S7T2 no hubo una gran cantidad de aminación de los pigmentos anaranjados, pero aun así fue 1.22 veces más que en el tratamiento S6T1 a las 288 h.

Una investigación con la misma especie de *M. purpureus* fue realizada por Zhen *et al* (2019) donde evaluaron el efecto de NaCl en la producción de pigmentos con la diferencia que ellos

realizaron fermentación sumergida, donde las concentraciones de NaCl(M) fueron 0, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2 y 0.4 equivalente a 0, 0.058, 0.116, 0.584, 1.168 y 2.336 % p/v respectivamente durante 10 días (240h). La mayor producción de pigmentos amarillos, anaranjados y rojos se dio a 0.116 % en comparación con el tratamiento S7T2 que fue a 0.5% (concentración más baja). Por lo tanto, se deduce que disminuyendo la concentración del sustrato NaCl como suplemento en el medio de cultivo harina de quinua daría buenos resultados con respecto a estos metabolitos de interés.

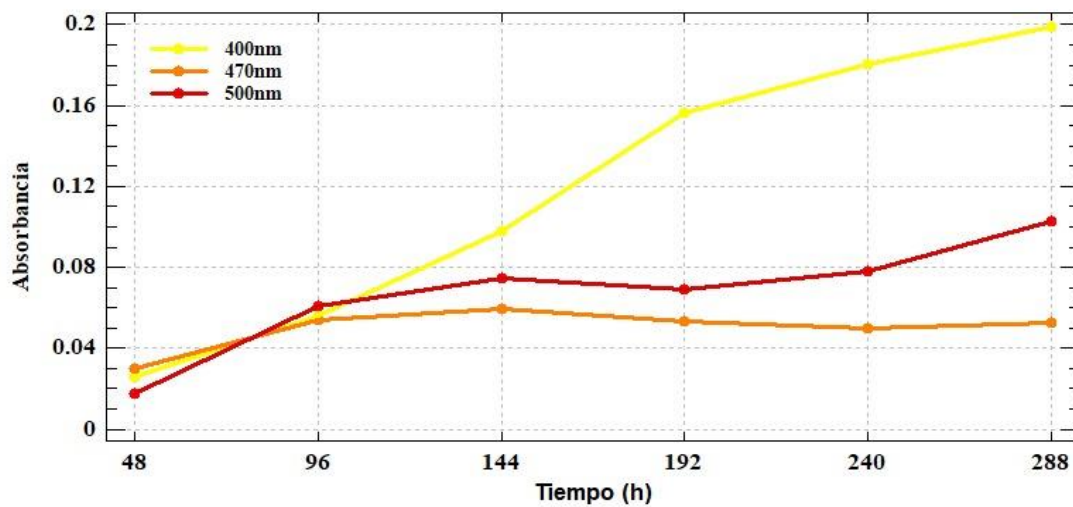


Figura 17. Producción de pigmentos utilizando el suplemento cloruro de sodio al 0.5% y pH 6 (S7T2) en medio de cultivo a base de harina de quinua.

V. CONCLUSIONES

1. El uso de medios de cultivo a base de harina de quinua suplementada ya sea con glucosa, fructosa, melaza, fermentado de pescado, hidrolizado de pescado, glutamato monosódico y cloruro de sodio permitieron el crecimiento de *M. purpureus*, siendo el mejor el cloruro de sodio.
2. Las velocidades de crecimiento de *M. purpureus* en los medios de cultivo a base de harina de quinua con el suplemento cloruro de sodio al 0.5% a pH 6 y con el suplemento glutamato monosódico al 0.5% a pH 5 fueron 0.150mmh^{-1} y 0.108mmh^{-1} respectivamente, siendo ambos tratamientos los que presentaron mayor diferencia significativa.
3. La biomasa fúngica cuantificada a las 288h para los tratamientos con suplemento de cloruro de sodio al 0.5% a pH 6 y el suplemento glutamato monosódico al 0.5% a pH 5 por N-acetilglucosamina fueron 0.3289 ± 0.0111 mg/p.s.b. y 0.2345 ± 0.0249 mg/p.s.b. respectivamente y por peso seco fueron $0.267 \pm 0.01\text{g}$ y 0.118 ± 0.007 g respectivamente.
4. La evaluación de los pigmentos producidos por *M. purpureus* a través de la medición de la densidad óptica a las 288h para los tratamientos con suplemento de cloruro de sodio al 0.5% a pH 6 fueron 0.199 ± 0.01 , 0.053 ± 0.005 y 0.103 ± 0.008 y con el suplemento glutamato monosódico al 0.5% a pH 5 fueron 0.1 ± 0.011 , 0.063 ± 0.004 y 0.084 ± 0.004 para las longitudes de onda de 400, 470 y 500 nm respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar el crecimiento del micelio midiendo el área superficial durante el tiempo, especialmente en el caso de usar el suplemento glutamato monosódico.
2. Analizar la biomasa y pigmentos producidos por *M. purpureus* con los suplementos glucosa, fructosa, melaza, hidrolizado de pescado y fermentado de pescado.
3. Evaluar por microscopía en el transcurso del tiempo al hongo en los medios de cultivo estudiados debido a que la formación de cleistotecios está relacionado con el inicio de la síntesis de pigmentos.
4. Optimizar el medio de cultivo a base de harina de quinua con suplementos dependiendo del interés en producir los metabolitos de *M. purpureus*.
5. Determinar la concentración de metabolitos secundarios como monacolina k, citrinina, caracterización de pigmentos que se producen en fermentación por *M. purpureus*.
6. Continuar la investigación con diferentes niveles de concentración de suplementos y pH en fermentación en estado sólido y sumergido.
7. Optimizar la extracción de los pigmentos con diferentes solventes en sustrato de harina de quinua.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdulghani, M. A., Alshehade, S. A., Kamran, S., & Alshawsh, M. A. (2022). Effect of monosodium glutamate on serum sex hormones and uterine histology in female rats along with its molecular docking and in-silico toxicity. *Heliyon*, 8(10), e10967.
- Adnan, M., Zheng, W., Islam, W., Arif, M., Abubakar, Y. S., Wang, Z., & Lu, G. (2017). Carbon catabolite repression in filamentous fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 48.
- Ajdari, Z., Ebrahimpour, A., Abdul Manan, M., Hamid, M., Mohamad, R., & Ariff, A. B. (2011). Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several strains of *Monascus purpureus* on solid state cultivation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Ukiya, M., Kiyota, A., Sakamoto, N., Suzuki, T., Tanabe, N., & Nishino, H. (2005). Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(3), 562-565.
- Albarracín, S. L., Baldeón, M. E., Sangronis, E., Cucufate Petruschina, A., & Reyes, F. G. (2016). L-Glutamato: un aminoácido clave para las funciones sensoriales y metabólicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(2), 101-112.
- Álvarez, A. M. G., Rosales, L. C., Rodríguez, G. P., & Fernández, M. H. (2012). Consumo elevado de fructosa y su posible influencia sobre el metabolismo lipídico. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 22(2), 287-300.
- Apaza Mamani, V., Cáceres Sanizo, G., Estrada Zuñiga, R., & Pinedo Taco, R. E. (2013). Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú.
- Aspmo, S. I., Horn, S. J., & Eijsink, V. G. (2005). Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. *Process Biochemistry*, 40(12), 3714-3722.

- Atkins, P. W., & Jones, L. (2006). Principios de química: Los caminos del descubrimiento. Ed. Médica Panamericana. Pag f71
- Babitha, S., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006). Jackfruit Seed—a novel substrate for the production of *Monascus* pigments through solid-state fermentation. Food Technology and Biotechnology, 44(4), 465-471.
- Babitha, S., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2007a). Effect of stress on growth, pigment production and morphology of *Monascus* sp. in solid cultures. Journal of Basic Microbiology, 47(2), 118-126.
- Babitha, S., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2007b). Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. Bioresource technology, 98(8), 1554-1560
- Balanta, D., Grande, C. D., & Zuluaga, F. (2010). Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de *Aspergillus niger* y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas. Revista Iberoamericana de Polímeros, 11(5), 297-316.
- Barbosa, R. N., Leong, S. L., Vinnere-Pettersson, O., Chen, A. J., Souza-Motta, C. M., Frisvad, J. C., Samson, R. A., Oliveira, N.T., & Houbraeken, J. (2017). Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees. Studies in mycology, 86(1), 53-97.
- Barzee, T. J., Cao, L., Pan, Z., & Zhang, R. (2021). Fungi for future foods. Journal of Future Foods, 1(1), 25-37.
- Bera, T. K., Kar, S. K., Yadav, P. K., Mukherjee, P., Yadav, S., & Joshi, B. (2017). Effects of monosodium glutamate on human health: A systematic review. World journal of pharmaceutical sciences, 139-144.
- Bogsrud, M. P., Ose, L., Langslet, G., Ottestad, I., Strøm, E. C., Hagve, T. A., & Retterstøl, K. (2010). HypoCol (red yeast rice) lowers plasma cholesterol—a randomized placebo controlled study. Scandinavian Cardiovascular Journal, 44(4), 197-200.
- Bohórquez, S. M. A., & Rico, R. O. G. (2019). Efecto de diferentes condiciones de estrés sobre el crecimiento vegetativo del hongo filamentoso *Acremonium chrysogenum*. BISTUA Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 17(2), 182-195.
- Bühler, R. M. M., Müller, B. L., Moritz, D. E., Vendruscolo, F., de Oliveira, D., & Ninow,

- J. L. (2015). Influence of light intensity on growth and pigment production by *Monascus ruber* in submerged fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176, 1277-1289.
- Cao, W., Wang, Y., Luo, J., Yin, J., Xing, J., & Wan, Y. (2018). Succinic acid biosynthesis from cane molasses under low pH by *Actinobacillus succinogenes* immobilized in luffa sponge matrices. *Bioresource technology*, 268, 45-51.
- Carrillo-Inungaray, M. L., Ramírez-Zapata, M. R., & Martínez-Castilleja, J. C. (2006). Effect of solutes on growth parameters of food spoilage moulds. *CYTA-Journal of Food*, 5(2), 142-146.
- Carvalho, J. C. D., Oishi, B. O., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2005). Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrinin production and color stability. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(6), 885-894.
- Carvalho, J. C., Pandey, A. S. H. O. K., Babitha, S. U. M. A. T. H. Y., & Soccol, C. R. (2003). Production of *Monascus* biopigments: an overview. *Agro Food Industry Hi Tech*, 14(6), 37-43.
- Casas Forero, N., Cote Daza, S., Moncayo Martínez, D., & González Blair, G. (2018). Usos potenciales de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en la industria alimentaria. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/324672750>.
- Cepero de García, M. C. (2012). *Biología de hongos*. Ediciones Uniandes-Universidad de los Andes. pag 50
- Cervantes-Martínez, J., Orihuela-Equihua, R., & Rutiaga-Quiñones, J. G. (2017). Acerca del desarrollo y control de microorganismos en la fabricación de papel. *Conciencia Tecnológica*, (54).
- Chambergo, F. S., Bonaccorsi, E. D., Ferreira, A. J., Ramos, A. S., Ferreira, J. R., Abrahao-Neto, J., Farah, J. P., & El-Dorry, H. (2002). Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13983-13988.
- Chatterjee, S., Maity, S., Chattopadhyay, P., Sarkar, A., Laskar, S., & Sen, S. K. (2009). Characterization of red pigment from *Monascus* in submerged culture red pigment from *Monascus purpureus*. *Journal of Applied Sciences Research*, 5(12), 2102-

2108.

- Chen, G. C., & Johnson, B. R. (1983). Improved colorimetric determination of cell wall chitin in wood decay fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(1), 13-16.
- Chen, W., Chen, R., Liu, Q., He, Y., He, K., Ding, X., Kang, L., Guo, X., Xie, N., Zhou, Y., Lu, Y., Cox, R., Molnár, I., Li, M., Shao, Y., & Chen, F. (2017). Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi. *Chemical Science*, 8(7), 4917-4925.
- Chen, Y. T., Hsieh, S. L., Gao, W. S., Yin, L. J., Dong, C. D., Chen, C. W., Singhania, R. R., Hsieh, S., & Chen, S. J. (2021). Evaluation of chemical compositions, antioxidant capacity and intracellular antioxidant action in fish bone fermented with *Monascus purpureus*. *Molecules*, 26(17), 5288.
- Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, Z. R., & Luo, H. Y. (2015a). Influence of amino acid compositions and peptide profiles on antioxidant capacities of two protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) dark muscle. *Marine Drugs*, 13(5), 2580-2601.
- Chi, C. F., Wang, B., Hu, F. Y., Wang, Y. M., Zhang, B., Deng, S. G., & Wu, C. W. (2015b). Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin. *Food Research International*, 73, 124-129.
- Chi, C. F., Wang, B., Wang, Y. M., Zhang, B., & Deng, S. G. (2015c). Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. *Journal of functional foods*, 12, 1-10.
- Chysirichote, T., Reiji, T., Asami, K., & Ohtaguchi, K. (2014). Quantification of the glucosamine content in the filamentous fungus *Monascus ruber* cultured on solid surfaces. *Journal of Basic Microbiology*, 54(5), 350-357.
- Coello-Loor, D., Avellaneda-Cevallos, H., Barrera-Álvarez, E., Peña-Galeas, M., Macías, P., & Racines-Macías, R. (2017). Evaluación del crecimiento y producción de biomasa de dos cepas del género *Pleurotus* spp., cultivadas en un medio agar con diferentes sustratos. *Ciencia y Tecnología (1390-4051)*, 10(2).

- Cruz, L. C. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Pontificia Universidad Javeriana.
- Da Costa, J. P. V., & Vendruscolo, F. (2017). Production of red pigments by *Monascus ruber* CCT 3802 using lactose as a substrate. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 11, 50-55.
- Da Silva, V. L., Ienczak, J. L., & Moritz, D. (2021). Agro-industrial residues for the production of red biopigment by *Monascus ruber*: rice flour and sugarcane molasses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(2), 587-596.
- Danilova, O. A., Ianutsevich, E. A., Bondarenko, S. A., Georgieva, M. L., Vikchizhanina, D. A., Groza, N. V., Bilanenko, E. N., & Tereshina, V. M. (2020). Osmolytes and membrane lipids in the adaptation of micromycete *Emericellopsis alkalina* to ambient pH and sodium chloride. *Fungal biology*, 124(10), 884-891.
- de Oliveira Filho, J. W. G., Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., de Oliveira Santos, J. V., de Alencar, M. V. O. B., Júnior, A. L. G., Paz, M. F. C. J., de Brito, M. D. R. M., e Sousa, J. M. D. C., Shaw, S., de Medeiros, M. D. G. F., de Moura Dantas, S. M. M., Rolim, H. M. L., Ferreira, P. M. P., Kamal, M. A., Pieczynska, M. D., Das, N., Gupta, V. K., Mocan, A., Dos Santos Andrade, T. J. A., Singh, B. N., Mishra, S. K., Atanasov, A. G., & de Carvalho Melo-Cavalcante, A. A. (2017). A comprehensive review on biological properties of citrinin. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 130-141.
- Dikshit, R., & Tallapragada, P. (2011). *Monascus purpureus*: A potential source for natural pigment production. *J Microbiol Biotechnol Res*, 1(4), 164-174.
- Dineshbhai, C. K., Basaiawmoit, B., Sakure, A. A., Maurya, R., Bishnoi, M., Kondepudi, K. K., Patil, G. B., Mankad, M., Liu, Z., & Hati, S. (2022). Exploring the potential of *Lactobacillus* and *Saccharomyces* for biofunctionalities and the release of bioactive peptides from whey protein fermentate. *Food Bioscience*, 48, 101758.
- Domínguez-Espinosa, R. M., & Webb, C. (2003). Submerged fermentation in wheat substrates for production of *Monascus* pigments. *World Journal of microbiology and biotechnology*, 19, 329-336.
- Dufossé, L. (2009). Pigments, *Microbial Encyclopedia of Microbiology*. San Diego:

Elsevier.

- Elattar, R. H., Kamal, A. H., Mansour, F. R., & El-Malla, S. F. (2023). Spectrophotometric determination of monosodium glutamate in instant noodles' seasonings and Chinese salt by ligand exchange complexation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105404.
- Fabio, A. D., & Parraga, G. (2017). Origin, production and utilization of pseudocereals. *Pseudocereals: chemistry and technology*, 1-27.
- Galant, A. L., Kaufman, R. C., & Wilson, J. D. (2015). Glucose: Detection and analysis. *Food chemistry*, 188, 149-160.
- García Cortes, V. (2004). *Introducción a la microbiología (2ªed.)*. San José: Universidad Estatal a Distancia EUED.
- Guérard, F., Dufosse, L., De La Broise, D., & Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 1051-1059.
- Hawksworth, D. L., & Pitt, J. I. (1983). A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. *Australian Journal of Botany*, 31(1), 51-61.
- Hepsibha, B. T., & Geetha, A. (2019). Physicochemical characterization of traditionally fermented liquid manure from fish waste (Gunapaselam).
- Herpandi, N. H., Rosma, A., & Wan Nadiah, W. A. (2011). The tuna fishing industry: A new outlook on fish protein hydrolysates. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 195-207.
- Hong, M. Y., Seeram, N. P., Zhang, Y., & Heber, D. (2008). Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 19(7), 448-458.
- Ismail, G. A., Fitriana, A. D., & Sukandar, U. (2021). Medium Optimization for Production of *Monascus purpureus* Pigment through Solid-state Fermentation. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 1143, No. 1, p. 012019)*. IOP Publishing.
- Jia, X. Q., Xu, Z. N., Zhou, L. P., & Sung, C. K. (2010). Elimination of the mycotoxin citrinin production in the industrial important strain *Monascus purpureus*

- SM001. Metabolic engineering, 12(1), 1-7.
- Jůzlová, P., Martinkova, L., & Křen, V. (1996). Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: A review. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(3), 163-170.
- Kang, B., Zhang, X., Wu, Z., Wang, Z., & Park, S. (2014). Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. *Enzyme and microbial technology*, 55, 50-57.
- Kantifedaki, A., Kachrimanidou, V., Mallouchos, A., Papanikolaou, S., & Koutinas, A. A. (2018). Orange processing waste valorisation for the production of bio-based pigments using the fungal strains *Monascus purpureus* and *Penicillium purpurogenum*. *Journal of Cleaner Production*, 185, 882–890. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.03.032>
- Kaprasob, R., Khongdetch, J., Laohakunjit, N., Selamassakul, O., & Kaisangsri, N. (2022). Isolation and characterization, antioxidant, and antihypertensive activity of novel bioactive peptides derived from hydrolysis of King Boletus mushroom. *LWT*, 160, 113287.
- Kolek, J., Driml, M., Kumžák, M., Soukup, P., Szendzielarz, F., Šimera, M., Branská, B., & Patáková, P. (2023). Use of common carp waste for pigment production by *Monascus purpureus*. *Kvasny prumysl*, 69(1), 686-691.
- Kongruang, S. (2011). Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 93-99.
- Kraboun, K., Tochampa, W., Chatdamrong, W., & Kongbangkerd, T. (2013). Effect of monosodium glutamate and peptone on antioxidant activity of monascal waxy corn. *International Food Research Journal*, 20(2).
- Li, L., Chen, S., Gao, M., Ding, B., Zhang, J., Zhou, Y., Liu, Y., Yang, H., Wu, Q., & Chen, F. (2019). Acidic conditions induce the accumulation of orange *Monascus* pigments during liquid-state fermentation of *Monascus ruber* M7. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 8393-8402.
- Lin, T. S., Chiu, S. H., Chen, C. C., & Lin, C. H. (2023). Investigation of monacolin K, yellow pigments, and citrinin production capabilities of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber* (*Monascus pilosus*). *Journal of Food and Drug Analysis*, 31(1), 85.

- Lu, H., Li, R., Yang, P., Luo, W., Chen, S., Bilal, M., Xu, H., Gu, C., Liu, S., Zhao, Y., Geng, C., & Zhao, L. (2021). iTRAQ-BASED proteomic analysis of the mechanism of fructose on improving fengycin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Molecules*, 26(20), 6309.
- Manan, M. A., Mohamad, R., & Ariff, A. (2017). The morphology and structure of red pigment producing fungus: *Monascus purpureus*. *J. Microbiol. Exp*, 5(00138), 10-15406.
- Marič, A., Skočaj, M., Likar, M., Sepčić, K., Cigić, I. K., Grundner, M., & Gregori, A. (2019). Comparison of lovastatin, citrinin and pigment production of different *Monascus purpureus* strains grown on rice and millet. *Journal of food science and technology*, 56(7), 3364-3373.
- Martínková, L., & Patáková, P. (1999). *Monascus*, in *Encyclopedia of Food Microbiology*. New York: Academic Press.
- Martí-Quijal, F. J., Khubber, S., Remize, F., Tomasevic, I., Roselló-Soto, E., & Barba, F. J. (2021). Obtaining antioxidants and natural preservatives from food by-products through fermentation: A review. *Fermentation*, 7(3), 106.
- Martone, C. B., Borla, O. P., & Sánchez, J. J. (2005). Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource technology*, 96(3), 383-387.
- Meena, M., Prasad, V., Zehra, A., Gupta, V. K., & Upadhyay, R. S. (2015). Mannitol metabolism during pathogenic fungal–host interactions under stressed conditions. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1019.
- Mehri, D., Perendeci, N. A., & Goksungur, Y. (2021). Utilization of whey for red pigment production by *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Fermentation*, 7(2), 75.
- Moghadam, H. D., Yazdi, F. T., Shahidi, F., Sarabi-Jamab, M., & Es' hagh, Z. (2022). Co-culture of *Monascus purpureus* with *Saccharomyces cerevisiae*: A strategy for pigments increment and citrinin reduction. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 102501.
- Mohammadi, M., Zamani, A., & Karimi, K. (2012). Determination of glucosamine in fungal cell walls by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(42), 10511-10515.

- Moharram, A. M., Mostafa M, E., & Ismail, M. A. (2012). Chemical profile of *Monascus ruber* strains. *Food Technology and Biotechnology*, 50(4), 490-499.
- Mukherjee, G., & Singh, S. K. (2011). Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 46(1), 188-192.
- Musaalbakri, A. M., Ariff, A., Rosfarizan, M., & Ismail, A. K. M. (2005). Fermentation conditions affecting growth and red pigment production of *Monascus purpureus* FTC 5391. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 33(2), 261.
- Nickel, J., Spanier, L. P., Botelho, F. T., Gularte, M. A., & Helbig, E. (2016). Effect of different types of processing on the total phenolic compound content, antioxidant capacity, and saponin content of *Chenopodium quinoa* Willd grains. *Food chemistry*, 209, 139-143.
- Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Pourgholam, R., Mohagheghi, E., & Molla, A. E. (2009). Use of hydrolysates from Yellowfin tuna *Thunnus albacares* fisheries by-product as a nitrogen source for bacteria growth media. *International Aquatic Research*, 1(1), 73.
- Pan, T. M., & Hsu, W. H. (2014). *Monascus*-fermented products. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 815-825). Elsevier Inc.
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology advances*, 25(3), 244-263.
- Pei, Y., Wang, Y., Shen, X., Wang, J., Sun, X., & Yuan, Q. (2022). Synergistic utilization of carbon sources for efficient biosynthesis of N-acetylglucosamine. *Green Chemical Engineering*.
- Pérez, S. R., Arone, M. C., Calzadillo, J. S., Rodríguez, I. A., & Díaz, M. S. (2017). Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos. *Afinidad*, 74(577).
- Petrova, I., Tolstorebrov, I., Zhivlyantseva, I., & Eikevik, T. M. (2021). Utilization of fish protein hydrolysates as peptones for microbiological culture medias. *Food Bioscience*, 42, 101063.
- Pineda-Insuasti, J. A., Duarte-Trujillo, A. S., Ayala-Pastaz, K. B., Soto-Arroyave, C. P., &

- Pineda-Soto, C. A. (2016). Producción de metabolitos por *Monascus* spp.: una revisión. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 50(2), 43-52.
- Prego, I., Maldonado, S., & Otegui, M. (1998). Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. Annals of Botany, 82(4), 481-488.
- Qadri, H., Qureshi, M. F., Mir, M. A., & Shah, A. H. (2021). Glucose-The X factor for the survival of human fungal pathogens and disease progression in the host. Microbiological Research, 247, 126725.
- Reesley, M., & Kjoller, A. (1995). Comparison of biomass dry weights and radial growth rates of fungal colonies on media solidified with different gelling compounds. Applied and environmental microbiology, 61(12), 4236-4239.
- Riveros, M. J., Parada, A., & Pettinelli, P. (2014). Fructose consumption and its health implications; fructose malabsorption and nonalcoholic fatty liver disease. Nutricion hospitalaria, 29(3), 491-499.
- Ruiz, K. B., Biondi, S., Oses, R., Acuña-Rodríguez, I. S., Antognoni, F., Martínez-Mosqueira, E. A., Coulibaly, A., Canahua-Murillo, A., Pinto, M., Zurita-Silva, A., Bazile, D., Jacobsen, S. E., & Molina-Montenegro, M. A. (2014). Quinoa biodiversity and sustainability for food security under climate change. A review. Agronomy for sustainable development, 34, 349-359.
- Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. Nutrients, 3(9), 765-791.
- Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J. M., Gildberg, A., & Rasco, B. (2012). Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. Food and Bioprocess Technology, 5, 73-79.
- Sahu, B. B., Barik, N. K., Mohapatra, B. C., Sahu, B. N., Sahu, H., Sahoo, P., Majhi, D., Biswal, N. C., Mohanty, P. K., & Jayasankar, P. (2014). Valorization of fish processing waste through natural fermentation with molasses for preparation of bio fertilizer and bio supplement. Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology, 3, 1849-1856.
- Saisriyoot, M., Thanapimmetha, A., Suwaleerat, T., Chisti, Y., & Srinophakun, P. (2019). Biomass and lipid production by *Rhodococcus opacus* PD630 in molasses-based

- media with and without osmotic-stress. *Journal of biotechnology*, 297, 1-8.
- Salari, M., Khiabani, M. S., Mokarram, R. R., Ghanbarzadeh, B., & Kafil, H. S. (2019). Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 280-288.
- Santoso, S., Soehari, T. D., Aprianto, Y., Andrean, D., & Henny, H. (2020). Value creation in fisheries supply chain as a role model for fish protein hydrolyzate cluster development. *Jurnal Rekayasa Mesin*, 11(3), 401-407.
- Saravanan, A., Yuvaraj, D., Kumar, P. S., Karishma, S., & Rangasamy, G. (2023). Fish processing discards: A plausible resource for valorization to renewable fuels production, optimization, byproducts and challenges. *Fuel*, 335, 127081.
- Silbir, S., & Goksungur, Y. (2019). Natural red pigment production by *Monascus purpureus* in submerged fermentation systems using a food industry waste: Brewer's spent grain. *Foods*, 8(5), 161.
- Silveira, S. T., Daroit, D. J., & Brandelli, A. (2008). Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. *LWT-Food Science and Technology*, 41(1), 170-174.
- Singh, D. (2019). *Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.)*. Jodhpur: Scientific Publishers.
- Thongsepee, N., Martviset, P., Chantree, P., Sornchuer, P., Sangpairoj, K., Prathaphan, P., Ruangtong, J., & Hiranyachattada, S. (2022). Daily consumption of monosodium glutamate pronounced hypertension and altered renal excretory function in normotensive and hypertensive rats. *Heliyon*, 8(10), e10972.
- Thuy, L. N., Salanta, L., Tofana, M., Socaci, S. A., Fărcaș, A. C., & Pop, C. R. (2020). A mini review about monosodium glutamate. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 77(1), 1-12.
- Tong, A., Lu, J., Huang, Z., Huang, Q., Zhang, Y., Farag, M. A., Liu, B., & Zhao, C. (2022). Comparative transcriptomics discloses the regulatory impact of carbon/nitrogen fermentation on the biosynthesis of *Monascus kaoliang* pigments. *Food Chemistry: X*, 13, 100250.
- Valcárcel-Yamani, B., & Lannes, S. D. S. (2012). Applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and amaranth (*Amaranthus* spp.) and their influence in the

- nutritional value of cereal based foods. *Food and Public health*, 2(6), 265-275.
- Valli, V., Gómez-Caravaca, A. M., Di Nunzio, M., Danesi, F., Caboni, M. F., & Bordoni, A. (2012). Sugar cane and sugar beet molasses, antioxidant-rich alternatives to refined sugar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(51), 12508-12515.
- Varaee, M., Honarvar, M., Eikani, M. H., Omidkhah, M. R., & Moraki, N. (2019). Supercritical fluid extraction of free amino acids from sugar beet and sugar cane molasses. *The Journal of Supercritical Fluids*, 144, 48-55.
- Velagapudi, V. R. (2009). Physiological and metabolic flux screening of *Saccharomyces cerevisiae* single knockout mutants on different carbon sources. *Universitat des Saarlandes*.
- Velázquez, M. (2013). Producción de pigmentos fúngicos (*Monascus purpureus* 2955) en residuos agroindustriales por fermentación sólida. *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*.
- Vilcacundo, R., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Nutritional and biological value of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Current Opinion in Food Science*, 14, 1-6.
- Virk, M. S., Ramzan, R., Virk, M. A., Yuan, X., & Chen, F. (2020). Transfigured morphology and ameliorated production of six *Monascus* pigments by acetate species supplementation in *Monascus ruber* M7. *Microorganisms*, 8(1), 81.
- Wan, Y., Zhang, J., Han, H., Li, L., Liu, Y., & Gao, M. (2017). Citrinin-producing capacity of *Monascus purpureus* in response to low-frequency magnetic fields. *Process Biochemistry*, 53, 25-29.
- Xu, K., & Xu, P. (2014). Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. *Bioresource technology*, 153, 23-29.
- Yongsmith, B., Kitprechavanich, V., Chitradon, L., Chaisrisook, C., & Budda, N. (2000). Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(1-3), 263-272.
- Zhang, B. B., Lu, L. P., Xia, Y. jun, Wang, Y. L., & Xu, G. R. (2013). Use of agar as carrier in solid-state fermentation for Monacolin K production by *Monascus*: A novel method for direct determination of biomass and accurate comparison with submerged fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 80, 10-13.

- Zhang, X., Liu, W., Chen, X., Cai, J., Wang, C., & He, W. (2017). Effects and mechanism of blue light on *Monascus* in liquid fermentation. *Molecules*, 22(3), 385.
- Zhen, Z., Xiong, X., Liu, Y., Zhang, J., Wang, S., Li, L., & Gao, M. (2019). NaCl inhibits citrinin and stimulates *Monascus* pigments and monacolin K production. *Toxins*, 11(2), 118.
- Zhou, J., Wang, M., Carrillo, C., Hassoun, A., Collado, M. C., & Barba, F. J. (2022). Application of omics in food color. *Current Opinion in Food Science*, 46, 100848.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Instrucciones para la resuspensión de cultivos liofilizados de CECT.



COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO
Parc Científic Universitat de València
C/ Catedrático Agustín Escardino, 9
46980 Paterna (Valencia), España
www.uv.es/cect



Instrucciones: Apertura de liófilos

Antes de empezar...

1. Las ampollas se deben conservar protegidas de la luz y a temperatura controlada (entre 4 y 24°C, preferiblemente 18°C). No las congele

La CECT garantiza la viabilidad de las cepas durante 1 mes desde su envío. Muchas cepas liofilizadas son viables durante largos periodos de tiempo si se mantienen en condiciones óptimas. Este periodo varía entre las distintas cepas por lo que la CECT no puede asegurar la viabilidad transcurrido el periodo de garantía.

2. Compruebe que dispone del medio de cultivo recomendado para cada cepa y que puede controlar los parámetros fisicoquímicos especificados (temperatura de incubación, condiciones de anaerobiosis...)

Para ello consulte la ficha de la cepa en nuestro catálogo (www.uv.es/cect).

Además del medio líquido necesario para la reconstitución del liófilo, en la mayoría de los casos es conveniente que cuente también con medio sólido.

Los medios a emplear deben estar recién preparados o conservados en buenas condiciones (no resecos ni con humedad excesiva, sin contaminantes ni precipitados, no caducados).

3. Asegúrese de que dispone del material básico apropiado (recipientes para desechar los fragmentos de vidrio, agua estéril, pipetas Pasteur estériles y pinzas metálicas) y de que la infraestructura de su laboratorio le permite trabajar en un entorno de seguridad microbiológica

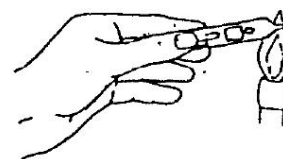
Apertura de la ampolla

1. Calentamiento de la punta a la llama

Dependiendo de la intensidad de la combustión puede requerir entre 5 y 15 segundos (algo más si la llama es muy débil).

Asegúrese que el cono de calor sólo afecta a la punta estrecha de la ampolla para no dañar el liófilo.

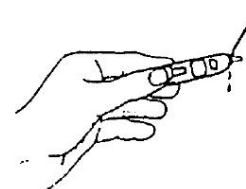
El tapón interior de algodón no debe oscurecerse (pues sería señal de un calentamiento excesivo).



2. Resquebrajado del vidrio con agua estéril

Todas estas operaciones deben hacerse con la debida atención que precisa el manejo de vidrio roto (p. ej. proteja sus ojos, no retire fragmentos con los dedos...).

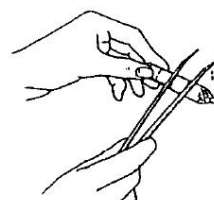
Dejar caer 1-4 gotas (gota a gota, no a chorro) de agua destilada estéril. Si no se produce ningún agrietamiento repita el paso anterior prolongando un poco el tiempo de calentamiento.



Ed_12_20220214



Si en el momento del resquebrajamiento el algodón se dispara hacia adentro es señal de que el calentamiento ha sido excesivo (se desplaza por la entrada violenta de aire). En tal caso, utilizar un asa de picadura para extraerlo hasta el extremo. Para más información recomendamos ver el video con las instrucciones de apertura disponible en nuestra web.



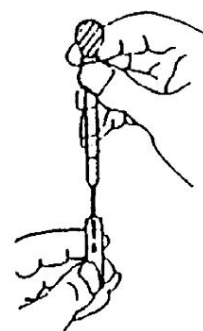
3. Retirada de los fragmentos de vidrio

Si no se hubieran desprendido en el momento de resquebrajarse se pueden retirar con ayuda de unas pinzas previamente flameadas dando un golpe seco como se muestra en la imagen (o con las puntas juntas si queremos que el golpe sea más contundente). Retire el algodón con las pinzas estériles.

Resuspensión del liófilo y siembra

1. Resuspensión

Con ayuda de una pipeta Pasteur añada 0.2-0.3 ml del medio líquido estéril recomendado para el crecimiento del microorganismo a la ampolla de vidrio abierta. Resuspenda cuidadosamente el liófilo ayudándose de la pipeta Pasteur para aspirar y expulsar la suspensión. Hágalo suavemente evitando la formación de burbujas de aire, especialmente si se trata de un microorganismo anaerobio o microaerófilo. Siempre y cuando pueda mantener las condiciones de esterilidad deje la suspensión durante 20-30 minutos hasta conseguir una rehidratación completa.



2. Siembra

Utilice toda la suspensión para inocular un medio sólido (tubo con agar inclinado o placa Petri) y un tubo con 5-10 ml de medio líquido que deberán ser incubados hasta observar crecimiento antes de escalar a volúmenes mayores.

No guardar parte de la suspensión en la propia ampolla como reserva.

En la mayoría de nuestros lotes encontrará un rectángulo de filtro de celulosa. Si lo desea puede transferirlo también ya que muchas células se adhieren a él. Sin embargo, es una operación que requiere un poco de destreza (no es fácil de manipular sin contaminarlo), por lo tanto, procure hacerlo sin comprometer el estado axénico de toda la suspensión.

3. Incubación

Incubar a la temperatura óptima para el microorganismo siguiendo estrictamente las indicaciones de la ficha de la cepa en nuestro catálogo, (p.ej. incubación en anaerobiosis, exposición a la luz, etc.).

Algunas cepas tienen un largo período de latencia. Incubar hasta dos semanas antes de considerar como inviable el cultivo.

Importante

Subcultivar al menos una vez después de la activación y antes de su uso como cepa de trabajo.

Anexo 2: Análisis proximal de hidrolizado de pescado: S5 (A), fermentado de pescado: S4 (B) y melaza: S3 (C).



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE ZOOTECNIA - DEPARTAMENTO ACADEMICO DE NUTRICION
LABORATORIO DE EVALUACION NUTRICIONAL DE ALIMENTOS

“Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad”

INFORME DE ENSAYO LENA N° 0810/2019

CLIENTE : FLOR SILEM ALBORNOZ
 NOMBRE DEL PRODUCTO : 03 muestras
 (Denominación responsabilidad del cliente)
 MUESTRA : PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
 FECHA DE RECEPCIÓN : 07-08-2019
 FECHA DE ANÁLISIS : Del 07/08/19 al 23/08/19
 CANTIDAD DE MUESTRA : Indicado en tabla
 PRESENTACION : Muestras en bolsas plásticas
 IDENTIFICACION : AQ19-0810/01-03

RESULTADOS DE ANALISIS QUIMICO

CÓDIGO	AQ19-0810/01	AQ19-0810/02	AQ19-0810/03
MUESTRA	A	B	C
Peso inicial (gramos)	491.3	2298	2612
Peso final (gramos)	156	648.8	2232.8
a.- HUMEDAD, %	71.23	75.54	29.37
b.- PROTEINA TOTAL (N x 6.25), %	20.39	10.85	4.08
c.- GRASA, %	6.71	--	--
d.- FIBRA CRUDA, %	0.17	--	0.00
e.- CENIZA, %	1.21	3.91	9.19
f.- ELN ¹ , %	0.29	--	--

ELN¹ = EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO

Métodos utilizados:

- a.- AOAC (2005), 950.46
- b.- AOAC (2005), 984.13
- c.- AOAC (2005), 2003.05
- d.- AOAC (2005), 962.09
- e.- AOAC (2005), 942.05

Atentamente,

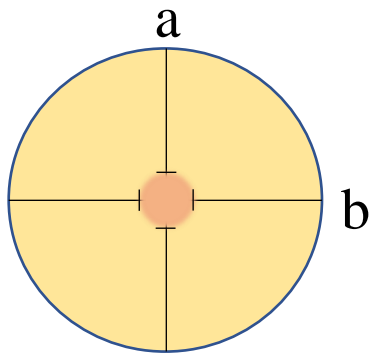
Dr. Carlos Gómez Bravo
 Jefe del Laboratorio de Evaluación
 Nutricional de Alimentos



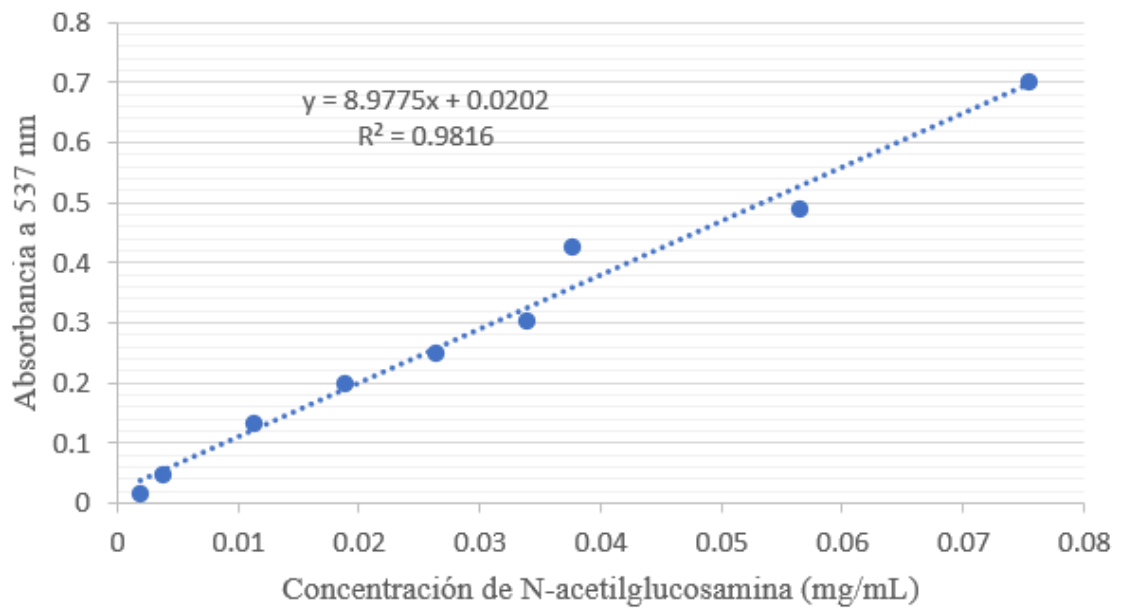
La Molina, 26 de Agosto del 2019

Av. La Molina s/n Lima 12. E-mail: lena@lamolina.edu.pe
 Teléfonos: 614-7800 Anexo: 266 / Directo 348-0830

Anexo 3: Representación gráfica de los trazos perpendiculares en el reverso de las placas Petri para medir el crecimiento micelial durante 12 días.



Anexo 4: Curva estándar de N-acetilglucosamina.



Anexo 5: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento glucosa a las 288 horas.

Variable dependiente: Radio (mm)

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 18

Número de niveles: 6

Resumen Estadístico para Radio (mm)

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo
S1T1	3	32.6367	0.343569	1.05271%	32.35	33.0175
S1T2	3	35.2925	0.357255	1.01227%	35.0825	35.705
S1T3	3	38.7408	0.288404	0.744445%	38.5325	39.07
S1T4	3	32.7233	0.608791	1.86042%	32.1575	33.3675
S1T5	3	36.0042	0.113202	0.314412%	35.905	36.1275
S1T6	3	40.0917	0.305638	0.762348%	39.8075	40.415
Total	18	35.9149	2.88903	8.0441%	32.1575	40.415

Tabla ANOVA para Radio (mm) por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	140.279	5	28.0557	208.93	0.0000
Intra grupos	1.61141	12	0.134284		
Total (Corr.)	141.89	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Radio (mm) por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
S1T1	3	32.6367	A
S1T4	3	32.7233	A
S1T2	3	35.2925	B
S1T5	3	36.0042	B
S1T3	3	38.7408	C
S1T6	3	40.0917	D

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S1T1 - S1T2	*	-2.65583	1.00514
S1T1 - S1T3	*	-6.10417	1.00514
S1T1 - S1T4		-0.0866667	1.00514
S1T1 - S1T5	*	-3.3675	1.00514
S1T1 - S1T6	*	-7.455	1.00514
S1T2 - S1T3	*	-3.44833	1.00514
S1T2 - S1T4	*	2.56917	1.00514
S1T2 - S1T5		-0.711667	1.00514
S1T2 - S1T6	*	-4.79917	1.00514
S1T3 - S1T4	*	6.0175	1.00514
S1T3 - S1T5	*	2.73667	1.00514
S1T3 - S1T6	*	-1.35083	1.00514
S1T4 - S1T5	*	-3.28083	1.00514
S1T4 - S1T6	*	-7.36833	1.00514
S1T5 - S1T6	*	-4.0875	1.00514

* indica una diferencia significativa.

Anexo 6: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento fructosa a las 288 horas.

Variable dependiente: Radio (mm)

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 18

Número de niveles: 6

Resumen Estadístico para Radio (mm)

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo
S2T1	3	31.4742	0.377908	1.20069%	31.0775	31.83
S2T2	3	35.1458	0.599397	1.70546%	34.4875	35.66
S2T3	3	37.8417	0.277875	0.73431%	37.6775	38.1625
S2T4	3	32.1775	0.410815	1.27671%	31.745	32.5625
S2T5	3	36.43	0.811646	2.22796%	35.4975	36.9775
S2T6	3	38.3233	0.483957	1.26283%	38.0025	38.88
Total	18	35.2321	2.73393	7.75976%	31.0775	38.88

Tabla ANOVA para Radio (mm) por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	123.782	5	24.7564	90.51	0.0000
Intra grupos	3.28212	12	0.27351		
Total (Corr.)	127.064	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Radio (mm) por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
S2T1	3	31.4742	A
S2T4	3	32.1775	A
S2T2	3	35.1458	B
S2T5	3	36.43	BC
S2T3	3	37.8417	CD
S2T6	3	38.3233	D

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S2T1 - S2T2	*	-3.67167	1.4345
S2T1 - S2T3	*	-6.3675	1.4345
S2T1 - S2T4		-0.703333	1.4345
S2T1 - S2T5	*	-4.95583	1.4345
S2T1 - S2T6	*	-6.84917	1.4345
S2T2 - S2T3	*	-2.69583	1.4345
S2T2 - S2T4	*	2.96833	1.4345
S2T2 - S2T5		-1.28417	1.4345
S2T2 - S2T6	*	-3.1775	1.4345
S2T3 - S2T4	*	5.66417	1.4345
S2T3 - S2T5		1.41167	1.4345
S2T3 - S2T6		-0.481667	1.4345
S2T4 - S2T5	*	-4.2525	1.4345
S2T4 - S2T6	*	-6.14583	1.4345
S2T5 - S2T6	*	-1.89333	1.4345

* indica una diferencia significativa.

Anexo 7: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento melaza a las 288 horas.

Variable dependiente: Radio (mm)

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 18

Número de niveles: 6

Resumen Estadístico para Radio (mm)

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo
S3T1	3	33.7583	0.829402	2.45688%	32.86	34.495
S3T2	3	40.5983	0.896885	2.20917%	39.64	41.4175
S3T3	3	34.8658	0.420909	1.20723%	34.405	35.23
S3T4	3	36.1417	0.188751	0.522254%	35.93	36.2925
S3T5	3	42.1942	0.050765	0.120313%	42.16	42.2525
S3T6	3	36.84	0.996381	2.70462%	35.69	37.445
Total	18	37.3997	3.16026	8.44996%	32.86	42.2525

Tabla ANOVA para Radio (mm) por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	164.382	5	32.8765	73.05	0.0000
Intra grupos	5.40091	12	0.450076		
Total (Corr.)	169.783	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Radio (mm) por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
S3T1	3	33.7583	A
S3T3	3	34.8658	AB
S3T4	3	36.1417	BC
S3T6	3	36.84	C
S3T2	3	40.5983	D
S3T5	3	42.1942	D

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S3T1 - S3T2	*	-6.84	1.84016
S3T1 - S3T3		-1.1075	1.84016
S3T1 - S3T4	*	-2.38333	1.84016
S3T1 - S3T5	*	-8.43583	1.84016
S3T1 - S3T6	*	-3.08167	1.84016
S3T2 - S3T3	*	5.7325	1.84016
S3T2 - S3T4	*	4.45667	1.84016
S3T2 - S3T5		-1.59583	1.84016
S3T2 - S3T6	*	3.75833	1.84016
S3T3 - S3T4		-1.27583	1.84016
S3T3 - S3T5	*	-7.32833	1.84016
S3T3 - S3T6	*	-1.97417	1.84016
S3T4 - S3T5	*	-6.0525	1.84016
S3T4 - S3T6		-0.698333	1.84016
S3T5 - S3T6	*	5.35417	1.84016

* indica una diferencia significativa.

Anexo 8: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento fermentado de pescado a las 288 horas.

Variable dependiente: Radio (mm)

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 18

Número de niveles: 6

Resumen Estadístico para Radio (mm)

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo
S4T1	3	31.2333	0.0906343	0.290185%	31.1725	31.3375
S4T2	3	37.3733	0.676417	1.80989%	36.5925	37.78
S4T3	3	31.7725	0.771933	2.42956%	30.8825	32.26
S4T4	3	35.1917	0.834601	2.37159%	34.325	35.99
S4T5	3	38.205	0.69014	1.80641%	37.46	38.8225
S4T6	3	30.6983	0.902962	2.9414%	30.0275	31.725
Total	18	34.079	3.14346	9.22404%	30.0275	38.8225

Tabla ANOVA para Radio (mm) por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	161.884	5	32.3767	63.70	0.0000
Intra grupos	6.09965	12	0.508305		
Total (Corr.)	167.983	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Radio (mm) por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
S4T6	3	30.6983	A
S4T1	3	31.2333	A
S4T3	3	31.7725	A
S4T4	3	35.1917	B
S4T2	3	37.3733	C
S4T5	3	38.205	C

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S4T1 - S4T2	*	-6.14	1.95558
S4T1 - S4T3		-0.539167	1.95558
S4T1 - S4T4	*	-3.95833	1.95558
S4T1 - S4T5	*	-6.97167	1.95558
S4T1 - S4T6		0.535	1.95558
S4T2 - S4T3	*	5.60083	1.95558
S4T2 - S4T4	*	2.18167	1.95558
S4T2 - S4T5		-0.831667	1.95558
S4T2 - S4T6	*	6.675	1.95558
S4T3 - S4T4	*	-3.41917	1.95558
S4T3 - S4T5	*	-6.4325	1.95558
S4T3 - S4T6		1.07417	1.95558
S4T4 - S4T5	*	-3.01333	1.95558
S4T4 - S4T6	*	4.49333	1.95558
S4T5 - S4T6	*	7.50667	1.95558

* indica una diferencia significativa.

Anexo 9: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento hidrolizado de pescado a las 288 horas.

Variable dependiente: Radio (mm)

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 18

Número de niveles: 6

Resumen Estadístico para Radio (mm)

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo
S5T1	3	33.0767	0.394749	1.19344%	32.7275	33.505
S5T2	3	37.9842	1.09531	2.88359%	37.1725	39.23
S5T3	3	33.4067	0.569409	1.70448%	32.875	34.0075
S5T4	3	39.1308	0.486456	1.24315%	38.6175	39.585
S5T5	3	36.0033	0.296567	0.823721%	35.8125	36.345
S5T6	3	30.4983	0.62626	2.05342%	29.87	31.1225
Total	18	35.0167	3.11754	8.90302%	29.87	39.585

Tabla ANOVA para Radio (mm) por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	160.431	5	32.0862	80.33	0.0000
Intra grupos	4.7931	12	0.399425		
Total (Corr.)	165.224	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Radio (mm) por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
S5T6	3	30.4983	A
S5T1	3	33.0767	B
S5T3	3	33.4067	B
S5T5	3	36.0033	C
S5T2	3	37.9842	D
S5T4	3	39.1308	D

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S5T1 - S5T2	*	-4.9075	1.73353
S5T1 - S5T3		-0.33	1.73353
S5T1 - S5T4	*	-6.05417	1.73353
S5T1 - S5T5	*	-2.92667	1.73353
S5T1 - S5T6	*	2.57833	1.73353
S5T2 - S5T3	*	4.5775	1.73353
S5T2 - S5T4		-1.14667	1.73353
S5T2 - S5T5	*	1.98083	1.73353
S5T2 - S5T6	*	7.48583	1.73353
S5T3 - S5T4	*	-5.72417	1.73353
S5T3 - S5T5	*	-2.59667	1.73353
S5T3 - S5T6	*	2.90833	1.73353
S5T4 - S5T5	*	3.1275	1.73353
S5T4 - S5T6	*	8.6325	1.73353
S5T5 - S5T6	*	5.505	1.73353

* indica una diferencia significativa.

Anexo 10: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento glutamato monosódico a las 288 horas.

Variable dependiente: Radio (mm)

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 18

Número de niveles: 6

Resumen Estadístico para Radio (mm)

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación
S6T1	3	32.6133	0.102662	0.314787%
S6T2	3	28.3267	0.290972	1.0272%
S6T3	3	26.3183	0.223947	0.850915%
S6T4	3	32.42	1.24668	3.8454%
S6T5	3	28.9575	0.36868	1.27318%
S6T6	3	27.5333	0.290821	1.05625%
Total	18	29.3615	2.48688	8.46987%

Tratamiento	Error Estándar	Mínimo	Máximo	Rango
S6T1	0.0592722	32.5075	32.7125	0.205
S6T2	0.167993	28.15	28.6625	0.5125
S6T3	0.129296	26.06	26.4575	0.3975
S6T4	0.71977	31.5175	33.8425	2.325
S6T5	0.212858	28.6225	29.3525	0.73
S6T6	0.167906	27.3375	27.8675	0.53
Total	0.586164	26.06	33.8425	7.7825

Tabla ANOVA para Radio (mm) por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	101.298	5	20.2596	63.31	0.0000
Intra grupos	3.84013	12	0.320011		
Total (Corr.)	105.138	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Radio (mm) por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
S6T3	3	26.3183	A
S6T6	3	27.5333	AB
S6T2	3	28.3267	B
S6T5	3	28.9575	B
S6T4	3	32.42	C
S6T1	3	32.6133	C

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S6T1 - S6T2	*	4.28667	1.55165
S6T1 - S6T3	*	6.295	1.55165
S6T1 - S6T4		0.193333	1.55165
S6T1 - S6T5	*	3.65583	1.55165
S6T1 - S6T6	*	5.08	1.55165
S6T2 - S6T3	*	2.00833	1.55165
S6T2 - S6T4	*	-4.09333	1.55165
S6T2 - S6T5		-0.630833	1.55165
S6T2 - S6T6		0.793333	1.55165
S6T3 - S6T4	*	-6.10167	1.55165
S6T3 - S6T5	*	-2.63917	1.55165
S6T3 - S6T6		-1.215	1.55165
S6T4 - S6T5	*	3.4625	1.55165
S6T4 - S6T6	*	4.88667	1.55165
S6T5 - S6T6		1.42417	1.55165

* indica una diferencia significativa.

Anexo 11: ANOVA simple de los radios (mm) de micelios con medio AHQ y suplemento cloruro de sodio a las 288 horas.

Variable dependiente: Radio (mm)

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 18

Número de niveles: 6

Resumen Estadístico para Radio (mm)

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo
S7T1	3	38.915	0.35	0.899396%	38.565	39.265
S7T2	3	43.04	0.22951	0.533249%	42.85	43.295
S7T3	3	40.185	1.82935	4.55232%	38.08	41.39
S7T4	3	36.4283	0.414437	1.13768%	35.95	36.68
S7T5	3	42.445	0.568243	1.33877%	41.845	42.975
S7T6	3	38.76	0.214418	0.553194%	38.525	38.945
Total	18	39.9622	2.42869	6.07747%	35.95	43.295

Tabla ANOVA para Radio (mm) por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	92.1507	5	18.4301	27.22	0.0000
Intra grupos	8.12467	12	0.677056		
Total (Corr.)	100.275	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Radio (mm) por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
S7T4	3	36.4283	A
S7T6	3	38.76	B
S7T1	3	38.915	B
S7T3	3	40.185	B
S7T5	3	42.445	C
S7T2	3	43.04	C

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S7T1 - S7T2	*	-4.125	2.25697
S7T1 - S7T3		-1.27	2.25697
S7T1 - S7T4	*	2.48667	2.25697
S7T1 - S7T5	*	-3.53	2.25697
S7T1 - S7T6		0.155	2.25697
S7T2 - S7T3	*	2.855	2.25697
S7T2 - S7T4	*	6.61167	2.25697
S7T2 - S7T5		0.595	2.25697
S7T2 - S7T6	*	4.28	2.25697
S7T3 - S7T4	*	3.75667	2.25697
S7T3 - S7T5	*	-2.26	2.25697
S7T3 - S7T6		1.425	2.25697
S7T4 - S7T5	*	-6.01667	2.25697
S7T4 - S7T6	*	-2.33167	2.25697
S7T5 - S7T6	*	3.685	2.25697

* indica una diferencia significativa.

Anexo 12: ANOVA para los mayores valores de radios (mm) alcanzados por *M. purpureus* comparando los mejores tratamientos por suplemento a las 288 horas.

Tabla ANOVA para Radio (mm) por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	192.508	6	32.0847	83.32	0.0000
Intra grupos	5.39097	14	0.38507		
Total (Corr.)	197.899	20			

Pruebas de Múltiple Rangos para Radio (mm) por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
S6T1	3	32.6133	A
S4T2	3	37.3733	B
S2T3	3	37.8417	B
S5T2	3	37.9842	B
S1T6	3	40.0917	C
S3T2	3	40.5983	C
S7T2	3	43.04	D

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
S1T6 - S2T3	*	2.25	1.73104
S1T6 - S3T2		-0.506667	1.73104
S1T6 - S4T2	*	2.71833	1.73104
S1T6 - S5T2	*	2.1075	1.73104
S1T6 - S6T1	*	7.47833	1.73104
S1T6 - S7T2	*	-2.94833	1.73104
S2T3 - S3T2	*	-2.75667	1.73104
S2T3 - S4T2		0.468333	1.73104
S2T3 - S5T2		-0.1425	1.73104
S2T3 - S6T1	*	5.22833	1.73104
S2T3 - S7T2	*	-5.19833	1.73104
S3T2 - S4T2	*	3.225	1.73104
S3T2 - S5T2	*	2.61417	1.73104
S3T2 - S6T1	*	7.985	1.73104
S3T2 - S7T2	*	-2.44167	1.73104
S4T2 - S5T2		-0.610833	1.73104
S4T2 - S6T1	*	4.76	1.73104
S4T2 - S7T2	*	-5.66667	1.73104
S5T2 - S6T1	*	5.37083	1.73104
S5T2 - S7T2	*	-5.05583	1.73104
S6T1 - S7T2	*	-10.4267	1.73104

* indica una diferencia significativa.

Anexo 13: ANOVA para N acetilglucosamina (mg) y biomasa en peso seco (g) de S6T1.

Tabla ANOVA para N-acetilglucosamina (mg/p.s.b.) por Tiempo (h)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.103785	5	0.0207569	42.70	0.0000
Intra grupos	0.00583357	12	0.000486131		
Total (Corr.)	0.109618	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para N-acetilglucosamina (mg/p.s.b.) por Tiempo (h)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tiempo (h)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
48	3	0.00389529	A
96	3	0.0343436	AB
144	3	0.08326	BC
192	3	0.125489	CD
240	3	0.146576	D
288	3	0.23446	E

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
48 - 96		-0.0304483	0.0604769
48 - 144	*	-0.0793647	0.0604769
48 - 192	*	-0.121594	0.0604769
48 - 240	*	-0.142681	0.0604769
48 - 288	*	-0.230565	0.0604769
96 - 144		-0.0489164	0.0604769
96 - 192	*	-0.0911453	0.0604769
96 - 240	*	-0.112233	0.0604769
96 - 288	*	-0.200117	0.0604769
144 - 192		-0.0422289	0.0604769
144 - 240	*	-0.0633163	0.0604769
144 - 288	*	-0.1512	0.0604769
192 - 240		-0.0210874	0.0604769
192 - 288	*	-0.108972	0.0604769
240 - 288	*	-0.0878841	0.0604769

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Biomasa seca (g) por Tiempo (h)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0265088	5	0.00530175	251.09	0.0000
Intra grupos	0.00025338	12	0.000021115		
Total (Corr.)	0.0267621	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Biomasa seca (g) por Tiempo (h)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tiempo (h)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
48	3	0.0057	A
96	3	0.0177667	AB
144	3	0.0287333	B
192	3	0.0596333	C
240	3	0.0767	D
288	3	0.1177	E

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
48 - 96		-0.0120667	0.012604
48 - 144	*	-0.0230333	0.012604
48 - 192	*	-0.0539333	0.012604
48 - 240	*	-0.071	0.012604
48 - 288	*	-0.112	0.012604
96 - 144		-0.0109667	0.012604
96 - 192	*	-0.0418667	0.012604
96 - 240	*	-0.0589333	0.012604
96 - 288	*	-0.0999333	0.012604
144 - 192	*	-0.0309	0.012604
144 - 240	*	-0.0479667	0.012604
144 - 288	*	-0.0889667	0.012604
192 - 240	*	-0.0170667	0.012604
192 - 288	*	-0.0580667	0.012604
240 - 288	*	-0.041	0.012604

* indica una diferencia significativa.

Anexo 14: Comparación de resultados obtenidos por cuantificación de N-acetilglucosamina (mg) y biomasa en peso seco (g) de S6T1.

Muestra	Tiempo (h)	N-acetilglucosamina (mg/p.s.b.)	Biomasa en peso seco(g)
S6T1	48	0.0039 ± 0.0001a	0.006 ± 0.001a
S6T1	96	0.0344 ± 0.0016ab	0.018 ± 0.001ab
S6T1	144	0.0833 ± 0.0169bc	0.029 ± 0.002b
S6T1	192	0.1255 ± 0.0331cd	0.06 ± 0.002c
S6T1	240	0.1466 ± 0.0304d	0.077 ± 0.009d
S6T1	288	0.2345 ± 0.0249e	0.1180.007e

Anexo 15: ANOVA para N-acetilglucosamina (mg) y biomasa en peso seco (g) de S7T2.

Tabla ANOVA para N-acetilglucosamina (mg/p.s.b.) por Tiempo (h)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.236658	5	0.0473316	421.16	0.0000
Intra grupos	0.0013486	12	0.000112383		
Total (Corr.)	0.238007	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para N-acetilglucosamina (mg/p.s.b.) por Tiempo (h)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tiempo (h)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
48	3	0.00787081	A
96	3	0.0439729	B
144	3	0.109847	C
192	3	0.154196	D
240	3	0.26767	E
288	3	0.328867	F

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
48 - 96	*	-0.0361021	0.0290779
48 - 144	*	-0.101976	0.0290779
48 - 192	*	-0.146325	0.0290779
48 - 240	*	-0.259799	0.0290779
48 - 288	*	-0.320996	0.0290779
96 - 144	*	-0.0658737	0.0290779
96 - 192	*	-0.110223	0.0290779
96 - 240	*	-0.223697	0.0290779
96 - 288	*	-0.284894	0.0290779
144 - 192	*	-0.0443489	0.0290779
144 - 240	*	-0.157823	0.0290779
144 - 288	*	-0.21902	0.0290779
192 - 240	*	-0.113474	0.0290779
192 - 288	*	-0.174671	0.0290779
240 - 288	*	-0.0611969	0.0290779

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Biomasa seca (g) por Tiempo (h)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.167671	5	0.0335341	434.54	0.0000
Intra grupos	0.000926053	12	0.0000771711		
Total (Corr.)	0.168597	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Biomasa seca (g) por Tiempo (h)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tiempo (h)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
48	3	0.00583333	A
96	3	0.02733333	A
144	3	0.07713333	B
192	3	0.12923333	C
240	3	0.2238	D
288	3	0.26693333	E

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
48 - 96		-0.0215	0.0240957
48 - 144	*	-0.0713	0.0240957
48 - 192	*	-0.1234	0.0240957
48 - 240	*	-0.217967	0.0240957
48 - 288	*	-0.2611	0.0240957
96 - 144	*	-0.0498	0.0240957
96 - 192	*	-0.1019	0.0240957
96 - 240	*	-0.196467	0.0240957
96 - 288	*	-0.2396	0.0240957
144 - 192	*	-0.0521	0.0240957
144 - 240	*	-0.146667	0.0240957
144 - 288	*	-0.1898	0.0240957
192 - 240	*	-0.0945667	0.0240957
192 - 288	*	-0.1377	0.0240957
240 - 288	*	-0.0431333	0.0240957

* indica una diferencia significativa.

Anexo 16: Comparación de resultados obtenidos por cuantificación de N-acetilglucosamina (mg) y biomasa en peso seco (g) de S7T2.

Muestra	Tiempo (h)	N-acetilglucosamina (mg/p.s.b.)	Biomasa en peso seco (g)
S7T2	48	0.0079 ± 0.0008a	0.006 ± 0.001a
S7T2	96	0.0440 ± 0.0033b	0.028 ± 0.006a
S7T2	144	0.1099 ± 0.0057c	0.078 ± 0.004b
S7T2	192	0.1542 ± 0.019d	0.13 ± 0.011c
S7T2	240	0.2677 ± 0.0123e	0.224 ± 0.015d
S7T2	288	0.3289 ± 0.0111f	0.2670.01e

Anexo 17: ANOVA para densidad óptica de pigmentos S6T1.

Tabla ANOVA para Abs 400nm por Tiempo (h)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0182089	5	0.00364179	102.43	0.0000
Intra grupos	0.000426667	12	0.0000355556		
Total (Corr.)	0.0186356	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Abs 400nm por Tiempo (h)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tiempo (h)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
48	3	0.012	A
96	3	0.0193333	A
144	3	0.028	A
192	3	0.0496667	B
240	3	0.0776667	C
288	3	0.0996667	D

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
48 - 96		-0.00733333	0.0163556
48 - 144		-0.016	0.0163556
48 - 192	*	-0.0376667	0.0163556
48 - 240	*	-0.0656667	0.0163556
48 - 288	*	-0.0876667	0.0163556
96 - 144		-0.00866667	0.0163556
96 - 192	*	-0.0303333	0.0163556
96 - 240	*	-0.0583333	0.0163556
96 - 288	*	-0.0803333	0.0163556
144 - 192	*	-0.0216667	0.0163556
144 - 240	*	-0.0496667	0.0163556
144 - 288	*	-0.0716667	0.0163556
192 - 240	*	-0.028	0.0163556
192 - 288	*	-0.05	0.0163556
240 - 288	*	-0.022	0.0163556

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Abs 470nm por Tiempo (h)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00706067	5	0.00141213	80.18	0.0000
Intra grupos	0.000211333	12	0.0000176111		
Total (Corr.)	0.007272	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Abs 470nm por Tiempo (h)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tiempo (h)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
48	3	0.0126667	A
96	3	0.0163333	A
144	3	0.022	A
192	3	0.04	B
240	3	0.058	C
288	3	0.063	C

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
48 - 96		-0.00366667	0.0115108
48 - 144		-0.00933333	0.0115108
48 - 192	*	-0.0273333	0.0115108
48 - 240	*	-0.0453333	0.0115108
48 - 288	*	-0.0503333	0.0115108
96 - 144		-0.00566667	0.0115108
96 - 192	*	-0.0236667	0.0115108
96 - 240	*	-0.0416667	0.0115108
96 - 288	*	-0.0466667	0.0115108
144 - 192	*	-0.018	0.0115108
144 - 240	*	-0.036	0.0115108
144 - 288	*	-0.041	0.0115108
192 - 240	*	-0.018	0.0115108
192 - 288	*	-0.023	0.0115108
240 - 288		-0.005	0.0115108

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Abs 500nm por Tiempo (h)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0105587	5	0.00211173	105.00	0.0000
Intra grupos	0.000241333	12	0.0000201111		
Total (Corr.)	0.0108	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Abs 500nm por Tiempo (h)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tiempo (h)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
96	3	0.0256667	A
48	3	0.026	A
144	3	0.0326667	A
192	3	0.0563333	B
240	3	0.0796667	C
288	3	0.0836667	C

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
48 - 96		0.000333333	0.0123007
48 - 144		-0.00666667	0.0123007
48 - 192	*	-0.0303333	0.0123007
48 - 240	*	-0.0536667	0.0123007
48 - 288	*	-0.0576667	0.0123007
96 - 144		-0.007	0.0123007
96 - 192	*	-0.0306667	0.0123007
96 - 240	*	-0.054	0.0123007
96 - 288	*	-0.058	0.0123007
144 - 192	*	-0.0236667	0.0123007
144 - 240	*	-0.047	0.0123007
144 - 288	*	-0.051	0.0123007
192 - 240	*	-0.0233333	0.0123007
192 - 288	*	-0.0273333	0.0123007
240 - 288		-0.004	0.0123007

* indica una diferencia significativa.

Anexo 18: Comparación de resultados obtenidos por densidad óptica de pigmentos S6T1.

Muestra	Tiempo (h)	400nm	470nm	500nm
S6T1	48	0.012 ± 0.003a	0.013 ± 0.004a	0.026 ± 0.005a
S6T1	96	0.02 ± 0.006a	0.017 ± 0.004a	0.026 ± 0.006a
S6T1	144	0.028 ± 0.006a	0.022 ± 0.005a	0.033 ± 0.004a
S6T1	192	0.05 ± 0.002b	0.04 ± 0.005b	0.057 ± 0.004b
S6T1	240	0.078 ± 0.006c	0.058 ± 0.006c	0.08 ± 0.007c
S6T1	288	0.1 ± 0.011d	0.063 ± 0.004c	0.84 ± 0.004c

Anexo 19: ANOVA para densidad óptica de pigmentos S7T2.

Tabla ANOVA para Abs 400nm por Tiempo (h)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0741516	5	0.0148303	235.40	0.0000
Intra grupos	0.000756	12	0.000063		
Total (Corr.)	0.0749076	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Abs 400nm por Tiempo (h)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tiempo (h)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
48	3	0.0256667	A
96	3	0.056	B
144	3	0.098	C
192	3	0.156333	D
240	3	0.180667	E
288	3	0.199	E

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
48 - 96	*	-0.0303333	0.0217712
48 - 144	*	-0.0723333	0.0217712
48 - 192	*	-0.130667	0.0217712
48 - 240	*	-0.155	0.0217712
48 - 288	*	-0.173333	0.0217712
96 - 144	*	-0.042	0.0217712
96 - 192	*	-0.100333	0.0217712
96 - 240	*	-0.124667	0.0217712
96 - 288	*	-0.143	0.0217712
144 - 192	*	-0.0583333	0.0217712
144 - 240	*	-0.0826667	0.0217712
144 - 288	*	-0.101	0.0217712
192 - 240	*	-0.0243333	0.0217712
192 - 288	*	-0.0426667	0.0217712
240 - 288		-0.0183333	0.0217712

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Abs 470nm por Tiempo (h)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00157783	5	0.000315567	9.74	0.0007
Intra grupos	0.000388667	12	0.0000323889		
Total (Corr.)	0.0019665	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Abs 470nm por Tiempo (h)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tiempo (h)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
48	3	0.03	A
240	3	0.0496667	B
288	3	0.0523333	B
192	3	0.0533333	B
96	3	0.054	B
144	3	0.0596667	B

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
48 - 96	*	-0.024	0.0156103
48 - 144	*	-0.0296667	0.0156103
48 - 192	*	-0.0233333	0.0156103
48 - 240	*	-0.0196667	0.0156103
48 - 288	*	-0.0223333	0.0156103
96 - 144		-0.00566667	0.0156103
96 - 192		0.000666667	0.0156103
96 - 240		0.00433333	0.0156103
96 - 288		0.00166667	0.0156103
144 - 192		0.00633333	0.0156103
144 - 240		0.01	0.0156103
144 - 288		0.00733333	0.0156103
192 - 240		0.00366667	0.0156103
192 - 288		0.001	0.0156103
240 - 288		-0.00266667	0.0156103

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Abs 500nm por Tiempo (h)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0118605	5	0.0023721	64.11	0.0000
Intra grupos	0.000444	12	0.000037		
Total (Corr.)	0.0123045	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Abs 500nm por Tiempo (h)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tiempo (h)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
48	3	0.0176667	A
96	3	0.0606667	B
192	3	0.069	BC
144	3	0.0746667	BC
240	3	0.078	C
288	3	0.103	D

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
48 - 96	*	-0.043	0.0166845
48 - 144	*	-0.057	0.0166845
48 - 192	*	-0.0513333	0.0166845
48 - 240	*	-0.0603333	0.0166845
48 - 288	*	-0.0853333	0.0166845
96 - 144		-0.014	0.0166845
96 - 192		-0.00833333	0.0166845
96 - 240	*	-0.0173333	0.0166845
96 - 288	*	-0.0423333	0.0166845
144 - 192		0.00566667	0.0166845
144 - 240		-0.00333333	0.0166845
144 - 288	*	-0.0283333	0.0166845
192 - 240		-0.009	0.0166845
192 - 288	*	-0.034	0.0166845
240 - 288	*	-0.025	0.0166845

* indica una diferencia significativa.

Anexo 20: Comparación de resultados obtenidos por densidad óptica de pigmentos S7T2.

Muestra	Tiempo (h)	400nm	470nm	500nm
S7T2	48	0.026 ± 0.006a	0.03 ± 0.007a	0.018 ± 0.005a
S7T2	96	0.056 ± 0.007b	0.054 ± 0.008b	0.061 ± 0.007b
S7T2	144	0.098 ± 0.009c	0.06 ± 0.007b	0.075 ± 0.006bc
S7T2	192	0.157 ± 0.009d	0.054 ± 0.007b	0.069 ± 0.007bc
S7T2	240	0.181 ± 0.008e	0.05 ± 0.003b	0.078 ± 0.006c
S7T2	288	0.199 ± 0.01e	0.053 ± 0.005b	0.103 ± 0.008d