

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Monascus purpureus*
EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA USANDO HARINA
DE QUINUA (*Chenopodium quinoa*)”**

Presentado por:

FRANZ DEYVIS TUCTA HUILLCA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2023

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

Tesis Franz Tucta

INFORME DE ORIGINALIDAD

1 %

INDICE DE SIMILITUD

1 %

FUENTES DE INTERNET

0 %

PUBLICACIONES

%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

www.slideshare.net

Fuente de Internet

<1 %

2

repositorio.lamolina.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

3

dspace.esPOCH.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

4

repositorio.unap.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

5

eprints.ucm.es

Fuente de Internet

<1 %

6

repositorio.unal.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

7

es.scribd.com

Fuente de Internet

<1 %

8

Jia-Shiun Li, Yin-Ming Chew, Meng-Chi Lin, Yie-Qie Lau, Chin-Shuh Chen. " Enhanced glucosamine production from NCH-42 via

<1 %

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Monascus purpureus*
EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA USANDO HARINA
DE QUINUA (*Chenopodium quinoa*)”**

Presentado por:

FRANZ DEYVIS TUCTA HUILLCA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

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 padres, Felipe y Gladys por enseñarme que el amor de los padres es único y perdurable en el tiempo.

A mi hermano Alexis, que me dio consejos importantes antes de iniciar mi carrera y enseñarme que siempre estará ahí cuando lo necesite.

A mi tío Andrés, una persona indispensable en mi camino.

A Evelyn, mi compañera de vida y mi sinergismo ideal, que cada día me roba una sonrisa demostrándome que siempre existirá un mañana.

A Dios, porque sus planes son perfectos.

AGRADECIMIENTOS

- A mi mentor en la Ciencia, Juan Gabriel Juscamaita Morales por su dedicación y paciencia en toda mi formación como biólogo.
- Al Dr. Marcial Ibo Silva Jaimes, por darme la oportunidad y la confianza de ser parte del proyecto *Monascus*.
- Al Dr. Christian Encina Zelada por el apoyo en el análisis estadístico e interpretación de los resultados obtenidos en la investigación.
- A Natalia Vega y Michel Tômas por su apoyo y amistad.
- A los miembros de mi jurado: Mg. Sc. Patricia Moreno, Mg. Sc. Beatriz Hatta y Blgo. Roberto Ramos, por las observaciones oportunas y todo el apoyo que me otorgaron para culminar la tesis.
- A la familia de Evelyn: Carmen, Alison, Bill y Pedro que me apoyaron moralmente durante todo este tiempo.
- 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

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2. 1. <i>Monascus purpureus</i>	3
2. 1. 1. Taxonomía	4
2. 1. 2. Reproducción.	5
2. 1. 3. Pigmentos	7
2. 1. 4. Monacolina K.....	10
2. 1. 5. Citrinina	11
2. 1. 6. N-Acetilglucosamina	12
2. 1. 7. Producción de la fermentación por <i>Monascus</i>	13
2. 1. 8. En la antigüedad	13
2. 1. 9. En la actualidad.	14
2. 2. Fermentación sumergida de <i>Monascus</i>	15
2. 2. 1. Factores importantes en la fermentación	16
2. 2. 2. Aplicación en la industria de <i>Monascus</i>	20
2. 3. Quinua (<i>Chenopodium quinoa</i>)	21
2. 3. 1. Cultivo de la quinua	22
2. 3. 2. Grano de quinua	23
2. 3. 3. Valor nutricional	24
III. METODOLOGÍA.....	26
3. 1. Lugar de ejecución	26
3. 2. Materiales, medios y equipos.	26
3. 2. 1. Material Biológico.....	26
3. 2. 2. Materiales	26
3. 2. 3. Equipos	27

3. 3. Métodos.....	28
3. 3. 1. Cepa de interés.....	28
3. 3. 2. Preparación del inóculo.	28
3. 3. 3. Obtención de la cantidad adecuada del sustrato para la producción de biomasa.....	29
3. 3. 4. Evaluación de los parámetros agitación (rpm), pH y concentración de cloruro de sodio (M).....	29
3. 3. 5. Medición de la concentración de N-Acetilglucosamina en un periodo 168 horas.....	29
3. 3. 6. Cuantificación de N-Acetilglucosamina.....	30
3. 3. 7. Determinación de pigmentos mediante espectrofotometría a 400, 470, 500nm.....	31
3. 3. 8. Ensayo de inóculo en fermentación sólida.	31
3. 3. 9. Conteo de UFC del inóculo.	31
3. 3. 10. Diseño experimental.....	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4. 1. Obtención de la cantidad adecuada de harina de quinua como sustrato en la fermentación sumergida	34
4. 2. Obtención de los parámetros adecuados de concentración de cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH en la fermentación sumergida.	38
4. 2. 1. Producción indirecta de biomasa fúngica.	38
4. 2. 2. Producción de pigmentos de <i>Monascus purpureus</i>	44
4. 3. Medición de la concentración de N-Acetilglucosamina y pigmentos del hongo durante un periodo de 168 horas.	52
4. 4. Prueba del inóculo en fermentación sólida.....	55
V. CONCLUSIONES.....	57
VI. RECOMENDACIONES.....	58
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	59
VIII. ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía de <i>Monascus purpureus</i>	5
Tabla 2: Taxonomía de <i>Chenopodium quinoa</i>	22
Tabla 3: Información nutricional.	24
Tabla 4: Especificaciones físicas y organolépticas	25
Tabla 5: Tratamientos analizados en la segunda etapa de la investigación.	33
Tabla 6: Medias para N-Acetilglucosamina (mg/gMS) por harina de quinua (g/100mL) con intervalos de confianza del 95.0%	35
Tabla 7: Promedios obtenidos de las pruebas de comparación múltiple de N- Acetilglucosamina (mg/gMS), 400nm, 470nm y 500nm de los factores cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH.....	39
Tabla 8: Medias obtenidas de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) en diferentes concentraciones de cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH.	40
Tabla 9: Medias obtenidas a 400nm en diferentes concentraciones de cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH.	45
Tabla 10: Medias obtenidas a 470nm en diferentes concentraciones de cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH.	47
Tabla 11: Medias obtenidas a 500nm en diferentes concentraciones de cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH.	49
Tabla 12: Producción de N-Acetilglucosamina y pigmentos durante el periodo de 168h.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de <i>M. purpureus</i> en PDA.....	4
Figura 2. Ciclo de vida de la reproducción sexual y asexual de <i>Monascus</i>	6
Figura 3. Micrografía electrónica de barrido del cleistotecio de <i>M. purpureus</i> FTCC 5391.	7
Figura 4. Pigmentos más conocidos de <i>Monascus</i>	8
Figura 5. Vías biosintéticas predichas de los pigmentos de <i>Monascus</i>	9
Figura 6. Estructura de la estatina Monacolina K.....	11
Figura 7. Estructura de la molécula de citrinina	12
Figura 8. Estructura de la molécula de N-Acetilglucosamina.....	13
Figura 9. Producción del arroz rojo en bandejas de bambú	14
Figura 10. Metodología de fermentación usado en China	15
Figura 11. Sección longitudinal del grano de quinua	23
Figura 12. Metodología de la investigación.	32
Figura 13. Tratamientos obtenidos en fermentación sumergida con sustrato de harina de quinua en gramos.....	36
Figura 14. Comparación de las medias de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) en diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey HSD (95%).	40
Figura 15. Comparación de las medias de 400nm en diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey HSD (95%)	46
Figura 16. Comparación de las medias de 470nm en diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey HSD (95%).	48
Figura 17. Comparación de las medias de 500nm en diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey HSD (95%)	51
Figura 18. Curva de producción de N-Acetilglucosamina y pigmentos durante el periodo de 168h.	54

Figura 19. Determinación de las UFC/mL del inóculo obtenido en la investigación.....	56
Figura 20. Producción de <i>Monascus purpureus</i> en fermentación sumergida utilizando el inóculo de la investigación.....	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Información de las características principales de <i>Chenopodium quinoa</i> Willdenow, utilizada en la investigación	68
Anexo 2: Protocolo de activación de <i>Monascus purpureus</i>	69
Anexo 3: ANOVA para N-Acetilglucosamina por Quinoa (g/100mL).....	71
Anexo 4: Análisis de Rango múltiple de N-Acetilglucosamina en Quinoa (g/100mL).....	71
Anexo 5: Análisis de Varianza para N-Acetilglucosamina (mg/gMS).....	71
Anexo 6: Análisis de Rango múltiple de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) por NaCl (M)	71
Anexo 7: Análisis de Rango múltiple de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) por pH.....	71
Anexo 8: Análisis de Rango múltiple de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) por rpm	72
Anexo 9: Análisis de Varianza para Abs400nm.....	72
Anexo 10: Pruebas de Múltiple Rangos para Abs400nm por NaCl (M)	72
Anexo 11: Análisis de Rango múltiple de Abs400nm por pH.....	72
Anexo 12: Análisis de Rango múltiple de Abs400nm por rpm.....	72
Anexo 13: Análisis de Varianza para Abs470nm.....	73
Anexo 14: Análisis de Rango múltiple de Abs470nm por NaCl (M).....	73
Anexo 15: Análisis de Rango múltiple de Abs470nm por pH.....	73
Anexo 16: Análisis de Rango múltiple de Abs470nm por rpm.....	73
Anexo 17: Análisis de Varianza para Abs500nm.....	74
Anexo 18: Análisis de Rango múltiple de Abs500nm por NaCl (M).....	74
Anexo 19: Análisis de Rango múltiple de Abs500nm por pH.....	74
Anexo 20: Análisis de Rango múltiple de Abs500nm por rpm.....	74
Anexo 21: Tabla ANOVA para N-Acetilglucosamina (mg/gMS)	74
Anexo 22: Análisis de Rango múltiple de N-Acetilglucosamina (mg/gMS).....	75
Anexo 23: Tabla ANOVA para Abs400nm	75
Anexo 24: Análisis de Rango múltiple de Abs400nm.....	76

Anexo 25: Tabla ANOVA para Abs470nm	76
Anexo 26: Análisis de Rango múltiple de Abs470nm.....	77
Anexo 27: Tabla ANOVA para Abs500nm	77
Anexo 28: Análisis de Rango múltiple de Abs500nm.....	78
Anexo 29: Tabla ANOVA para N-Acetilglucosamina (mg/gMS) por horas.....	78
Anexo 30: Análisis de Rango múltiple de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) por horas	78
Anexo 31: Imágenes de la fermentación sumergida utilizando harina de quinua con <i>Monascus purpureus</i> a pH (5, 6, 7) y NaCl (0, 0.01, 0.05, 0.1M) en 100rpm.....	79
Anexo 32: Imágenes de la fermentación sumergida utilizando harina de quinua con <i>Monascus purpureus</i> a pH (5, 6, 7) y NaCl (0, 0.01, 0.05, 0.1M) en 120rpm.....	80
Anexo 33: Imágenes de la fermentación sumergida utilizando harina de quinua con <i>Monascus purpureus</i> a pH (5, 6, 7) y NaCl (0, 0.01, 0.05, 0.1M) en 140rpm.....	81

RESUMEN

En la industria fúngica es importante disponer de un inóculo de buena calidad que sea capaz de colonizar el sustrato con un bajo riesgo de contaminación para la producción de metabolitos de interés. El objetivo de la investigación fue producir un cultivo por fermentación sumergida de *Monascus purpureus* utilizando quinua como sustrato con un volumen final de 100mL a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (M), pH y agitación (rpm). Se midió la biomasa mediante un método indirecto de cuantificación de N-Acetilglucosamina, mientras que los pigmentos fueron analizados por espectrofotometría. Se obtuvo una mayor producción de biomasa a una concentración de 0.01M de cloruro de sodio, pH 6 y agitación de 120rpm resultando 34.231 ± 0.076 mg/g N-Acetilglucosamina en muestra seca y una producción de pigmentos de 0.725 ± 0.023 , 0.381 ± 0.009 y 0.283 ± 0.025 de absorbancia en las longitudes de onda 400, 470 y 500nm respectivamente. También se determinó que la fermentación puede detenerse a las 120h. La biomasa obtenida se utilizó en la fermentación en estado sólido de granos de quinua, dando buenos resultados de invasión y formación de pigmentos, demostrando que es un inóculo rápido, controlado y de fácil manejo para la producción de metabolitos de *Monascus* con interés industrial.

Palabras clave: Fermentación sumergida, quinua, *Monascus purpureus*, biomasa, N-Acetilglucosamina, pigmentos.

ABSTRACT

In the fungal industry it is important to have a good quality inoculum that is able to colonise the substrate with a low risk of contamination for the production of metabolites of interest. The aim of the research was to produce a submerged fermentation culture of *Monascus purpureus* using quinoa as substrate with a final volume of 100mL at different concentrations of sodium chloride (M), pH and agitation (rpm). Biomass was measured by an indirect method of N-acetylglucosamine quantification, while pigments were analysed by spectrophotometry. Higher biomass production was obtained at 0.01M sodium chloride concentration, pH 6 and 120rpm agitation resulting in 34.231 ± 0.076 mg/g N-Acetylglucosamine in dry sample and pigment production of 0.725 ± 0.023 , 0.381 ± 0.009 and 0.283 ± 0.025 absorbance at 400, 470 and 500nm wavelengths respectively. It was also determined that fermentation can be stopped at 120h. The biomass obtained was used in the solid-state fermentation of quinoa grains, giving good results of invasion and pigment formation, demonstrating that it is a fast, controlled and easy to handle inoculum for the production of *Monascus* metabolites of industrial interest.

Keywords: Submerged fermentation, quinoa, *Monascus purpureus*, biomass, N-Acetylglucosamine, pigments.

I. INTRODUCCIÓN

Monascus es un hongo que produce pigmentos naturales reconocido en Asia, los cuales son usados para resaltar la frescura de los alimentos y su seguridad, a diferencia de los pigmentos sintéticos que presentan un riesgo para la salud, por ello existe una preocupación en su uso. Una excelente opción sería el uso de pigmentos naturales que a su vez van ganando popularidad (Davoudi-Moghadam *et al.*, 2019). Un producto muy popular en China producido durante miles de años por el hongo es el arroz rojo, el cual se utiliza para colorear, condimentar y conservar alimentos (Shi y Pan, citado por Saithong *et al.*, 2019).

La obesidad y el sobrepeso son considerados factores de enfermedades no transmisibles que desencadenan enfermedades crónicas, cardiovasculares, cáncer, osteoartritis y diabetes (Wilson *et al.*, 2016). En año 2020 casi el 38% de la población mundial es decir dos mil seiscientos millones de personas tuvieron sobrepeso y se estima que para el año 2035 esta cifra aumentaría a 4 mil millones, llegando a un 50% de población (World Obesity Federation, 2023).

Una de las primeras causas de muerte en el mundo se encuentra relacionadas a enfermedades cardiovasculares, debido a las lipoproteínas en el plasma sanguíneo, el cual se relaciona con el aumento del colesterol (García *et al.*, 2015). La monacolina-K es un metabolito beneficioso sintetizado por *M. purpureus*, que puede inhibir de manera efectiva a la 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima-A-reductasa, que se encuentra presente en la síntesis de colesterol. Es por ello que es un suplemento dietético multifuncional en la reducción de los niveles del colesterol (Endo & Su, citado por Zhen *et al.*, 2019).

Por otro lado, los granos de quinua tienen un aporte esencial en futuras matrices alimentarias porque poseen entre 13.81 a 21.9 por ciento de proteínas, además de contener casi todos los aminoácidos esenciales y un alto estándar en los alimentos para el consumo humano aprobado por la FAO. Conteniendo una mayor cantidad de calcio, magnesio, hierro, zinc, siendo superior en comparación con los valores del trigo, maíz, arroz, cebada, avena y centeno (Mosyakin & Schwartau, 2015). Además, la naturaleza libre de gluten de las semillas de quinua hace del pseudocereal una valiosa fuente dietética de proteínas digeribles

para las personas con sensibilidad al gluten y enfermedad celíaca (Tang *et al.*, citado por Pellegrini *et al.*, 2018). Siendo la quinua una semilla con buena fuente nutricional, se podría potenciar esta característica y sus propiedades mediante la fermentación con *M. purpureus*.

Investigaciones recientes de *M. purpureus* en la búsqueda de nuevos sustratos que potencien sus propiedades en distintas matrices alimentarias, sugieren la producción de inóculos de fácil manejo para poder usarlo en la industria con el fin de producir metabolitos de importancia. Para especies de hongos comestibles como *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus eryngii* y *Hypsizygus marmoreus* sus inóculos son producidos mediante la fermentación sumergida (Leatham & Griffin y Kawai *et al.*, citado por Ma *et al.*, 2016).

Es por ello que el presente trabajo está considerando la fermentación sumergida, dadas las ventajas en producir mayor cantidad de micelio en un espacio reducido y en un menor tiempo de fermentación. En este proceso, el sustrato (harina de quinua) puede dispersarse libremente, generando ventajas frente a un inóculo sólido con un tiempo menor de ejecución en la reproducción del micelio y permitiendo la automatización de la inoculación en una producción industrial.

Objetivo General

- Producir biomasa de *Monascus purpureus* en fermentación sumergida utilizando como sustrato harina de quinua.

Objetivos Específicos

- Obtención de la cantidad adecuada de harina de quinua como sustrato en la fermentación sumergida.
- Estandarizar parámetros de la concentración de cloruro de sodio (M), pH y agitación (rpm) en fermentación sumergida.
- Determinar la concentración de N-Acetilglucosamina del hongo durante un periodo de 168 horas.

II. MARCO TEÓRICO

2. 1. *Monascus purpureus*

La especie de *Monascus* sp. es la segunda especie que fue descubierta por el micólogo Went en 1895, cuyo género contiene alrededor de 39 especies, de las cuales solo cuatro se usan en la gastronomía oriental como *M. ruber*, *M. purpureus*, *M. froridanus* y *M. pilosus*, (Lavalle, 2010).

Las características más importantes del hongo es generar metabolitos secundarios bioactivos como los pigmentos, monacolina K, enzimas alfa-amilasa, beta-amilasa, glucoamilasa, proteasa y lipasa (Zeng *et al.*, 2019). Siendo los metabolitos de mayor importancia dentro de la biotecnología los pigmentos y la monacolina K.

Los pigmentos producidos naturalmente por estos hongos son empleados durante miles de años en la cultura China, teniendo diferentes usos en la industria del país y no solo por las características sensoriales en distintos alimentos, sino también han demostrado tener diferentes actividades fisiológicas para el hombre (Zhang *et al.*, 2017). Los pigmentos producidos son del tipo azafilonas y entre ellas los de mayor importancia son los pigmentos de color anaranjado (rubropunctatina y monascorubina), pigmentos amarillos (monascina y ankaflavina) y pigmentos rojos (rubropunctamina y monascorubramina) (Babitha *et al.*, 2007).

Uno de los metabolitos secundarios más importantes es la monacolina K que es considerado como la lovastatina natural, debido a que es un análogo a ella, siendo su principio activo el regular el colesterol en sangre en modelos animales y humanos inhibiendo a la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG Co-A) encargada de la biosíntesis del colesterol en mamíferos, es por ello que el metabolito es empleado en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y en personas con colesterol alto (Ayala., 2017; Ma *et al.*, 2000).

En la Figura 1, se observa el crecimiento de *M. purpureus* en medio PDA, el hongo tiene un crecimiento de hifas jóvenes en el borde del micelio (blanco) y el medio de cultivo se

encuentra con una coloración amarilla y rojiza por los pigmentos extracelulares del hongo (Figura 1A y B), en la observación del microscopio con luz visible se puede apreciar los conidios piriformes ovalados exógenos con hifas septadas (Figura 1C) mientras que en la observación de micrografías electrónicas de barrido se observan las ascosporas esféricas en los conidios (Figura 1D y E) (Kaur *et al.*, 2023).

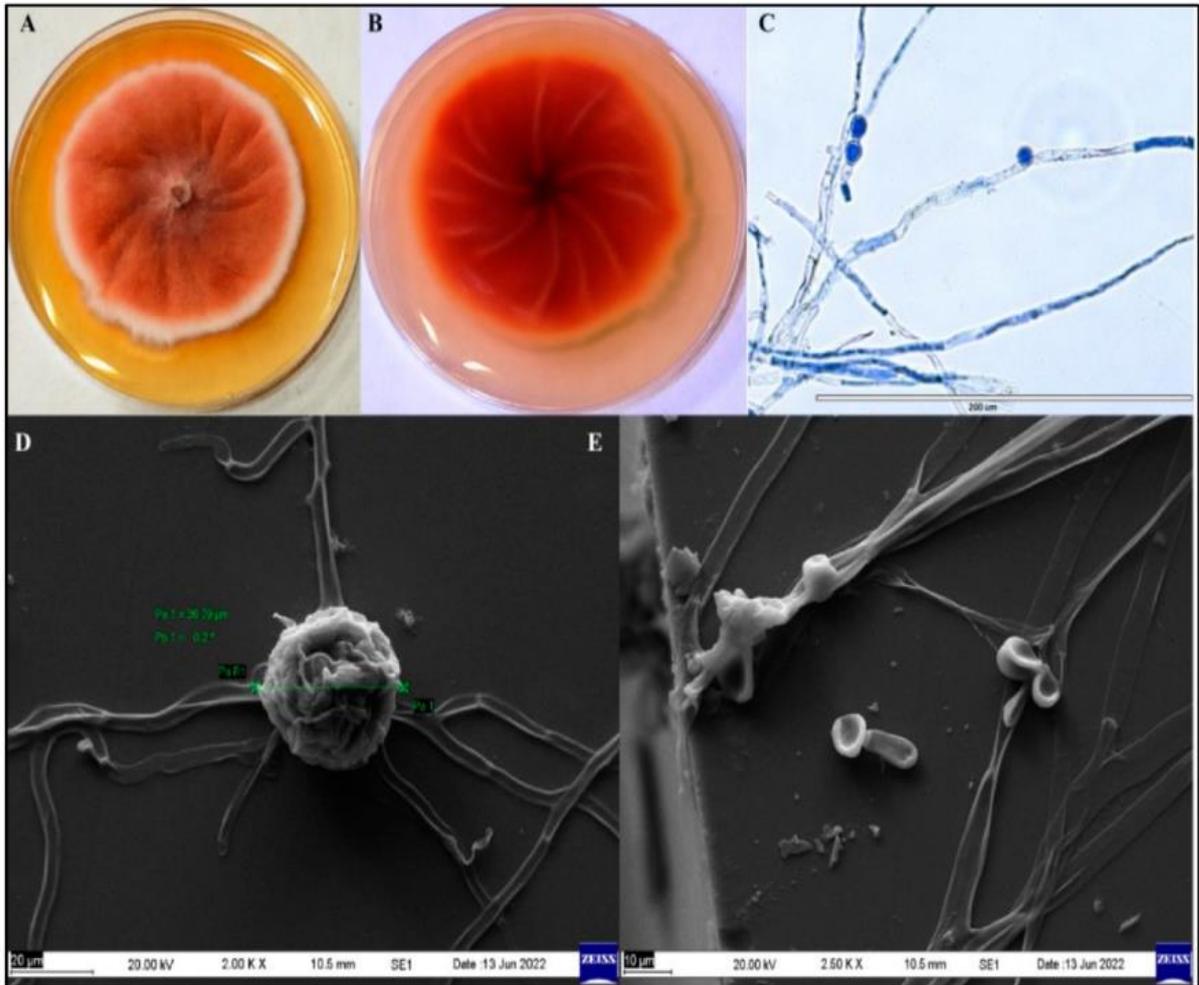


Figura 1. Crecimiento de *M. purpureus* en PDA: micrografías de luz visible de hifas y conidios (A-C); Imagen de micrografías electrónicas de barrido de hifas y conidios (D-E)

FUENTE: Kaur *et al.*, 2023.

2. 1. 1. Taxonomía

Los hongos del género *Monascus* pertenecen a la división de *Ascomycota* dentro de la familia de la *Monascaceae*, esta referencia se encuentra en la Colección Americana de Cultivos Tipo conocido por sus siglas en inglés ATCC, dentro de esta colección se tiene conocimiento de la existencia de más de treinta cepas del género *Monascus* siendo los más representativos *M. pilosus*, *M. purpureus* y *M. ruber*, que normalmente se encuentran en la producción de

fermentados (Abdollahi *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2000). En la Tabla 1 se encuentra una mayor referencia de la taxonomía de *Monascus purpureus*.

Tabla 1: Taxonomía de *Monascus purpureus*

Dominio	Eukarya
Reino	Fungi
Sub-reino	Dikarya
Filo	Ascomycota
Sub-filo	Pezizomycotina
Clase	Eurotiomycetes
Sub-clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Monascaceae
Género	<i>Monascus</i>
Especie	<i>Monascus purpureus</i>

FUENTE: Velázquez, 2013.

Monascus es un hongo aeróbico, saprofita y mesófilo con un rango de temperatura de crecimiento de 30-35°C, además de poseer un metabolismo respiro-fermentativo que cuando el hongo es sometido a un medio de cultivo en exceso de glucosa puede producir etanol a condiciones aeróbicas es decir que el hongo podría considerarse dentro de la denominación de Cabtree negativo con respiración limitada (Lima *et al.*, 2023).

2. 1. 2. Reproducción.

El género *Monascus* son hongos homotáticos que pueden reproducirse sexualmente (implicando la formación de cleistotecio con ascosporas) además de una reproducción asexual (implicando la formación de conidios), estos tipos de reproducción le dan una estrategia efectiva en su crecimiento y propagación (Manan *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2021).

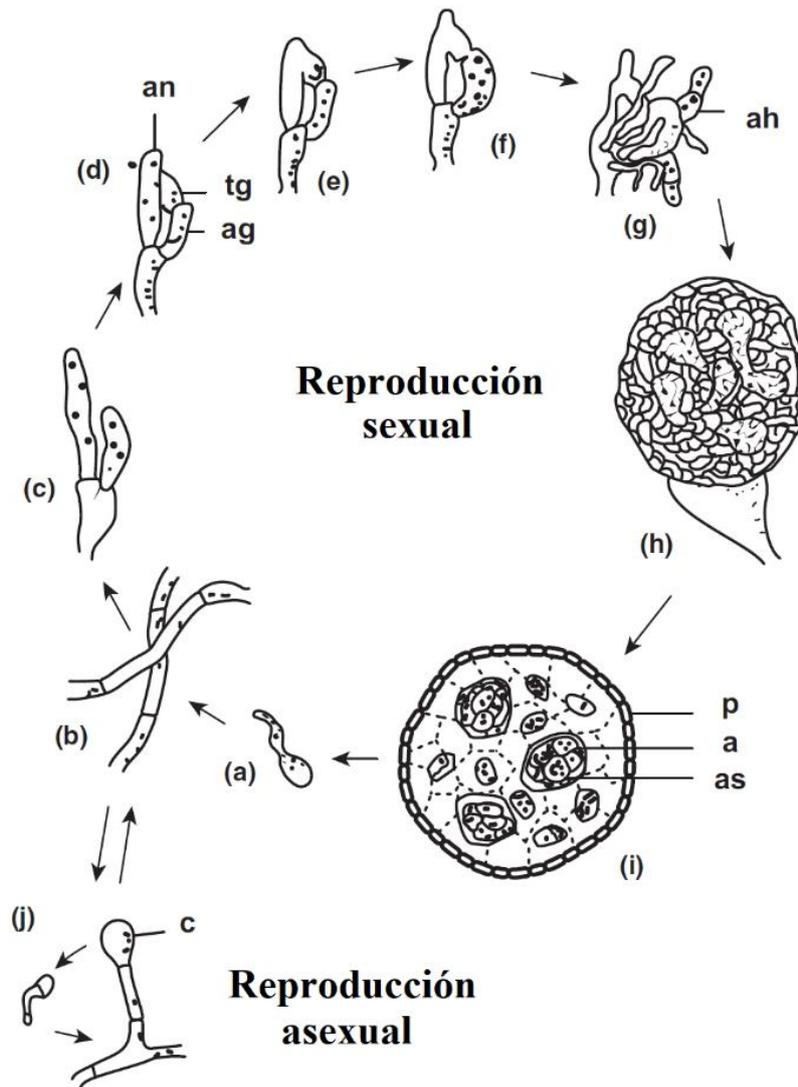


Figura 2. Ciclo de vida de la reproducción sexual y asexual de *Monascus*, Anteridio (an), Ascogonio (ag), Tricogino (tg), Hifas ascógenas (ah), Células de la pared peridial (p), Ascospora (as), Conidios (c); Ascospora forma hifas vegetativas (c-g), Ascogonio maduro (h-i), Reproducción asexual de conidios unicelulares (j)

FUENTE: Pan & Hsu, 2014.

Ambos tipos de reproducción se pueden observar en la Figura 2, la reproducción sexual se observa a los anteridios (an) que son células multinucleadas en forma de tubos alargados, en la parte inferior se forman los ascogonios (ag), estos se van separando formando dos lados (inferior y superior) originando el tricogino el cual se fusionará con el anteridio y los núcleos del tricogino que desaparecen antes del ingreso de los núcleos provenientes del ascogonio, posterior a ello los núcleos del tricogonio migran al ascogonio por diminutos poros comenzando a agrandarse, formando 11 hifas ascógenas (ah) las cuales formarán a los ascos, por debajo se forma la pared peridial (p) las cuales forman las hifas ascógenas de uno o dos capas que forman el asco (a) cerrado, desapareciendo las hifas ascógenas, las ascosporas

formadas se depositan en el ascogonio liberándose mediante la regeneración de las paredes celulares peridiales y formándose un nuevo ciclo (Pan & Hsu, 2014).



Figura 3. Micrografía electrónica de barrido del cleistotecio de *M. purpureus* FTCC 5391.
FUENTE: Manan *et al.*, 2017.

La Figura 2 representa la reproducción asexual, que se da mediante los conidios (c) que van formando las hifas que forman el micelio y las estructuras (Pan & Hsu, 2014). *M. purpureus* mediante un entrecruzamiento de hifas adyacentes forman los ascocarpos (cleistotecio) (Figura 3), los cuales contienen los cuerpos fructíferos denominados ascos que darán origen a las ascosporas donde la producción de ascosporas haploides se da a través de la meiosis de un núcleo diploide en un asca.

2. 1. 3. Pigmentos

Los pigmentos naturales de *Monascus* son metabolitos secundarios producidos por el hongo, estos pigmentos han sido utilizados hace dos mil años por la cultura asiática como colorante natural (Li *et al.*, 2019). Los pigmentos producidos del tipo de azafilonas que están dentro de la categoría de los policétidos, son una mixtura que comprenden pigmentos amarillos, anaranjados y rojos, el color de los pigmentos se puede clasificar en determinadas longitudes de ondas como pigmentos amarillos ($\lambda=330-450$ nm), pigmentos anaranjados ($\lambda= 460-480$ nm) y pigmentos rojos ($\lambda = 490-530$ nm) (Chen *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2019).

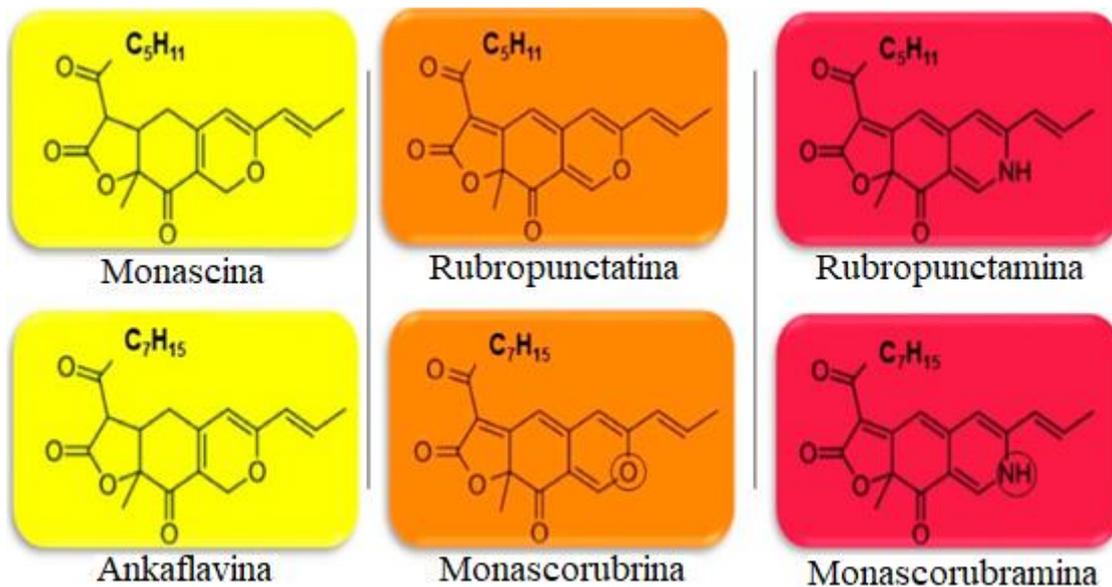


Figura 4. Pigmentos más conocidos de *Monascus*
FUENTE: Traducido de Lima *et al.*, 2023.

Dentro de los grupos de pigmentos más conocidos de este género son los que se encuentran en la Figura 4, donde se pueden observar las estructuras de los pigmentos. Monascina y ankaflavina en la zona amarilla, rubropunctatina y monascorubrina en la zona naranja, rubropunctamina y monascorubramina en la zona roja, cada uno de ellos representado por su color característico, las reacciones bioquímicas y enzimáticas de los pigmentos son complejas de entender, pero se cree que estos pigmentos lipofílicos son derivados de los policétidos (Campoy *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2013).

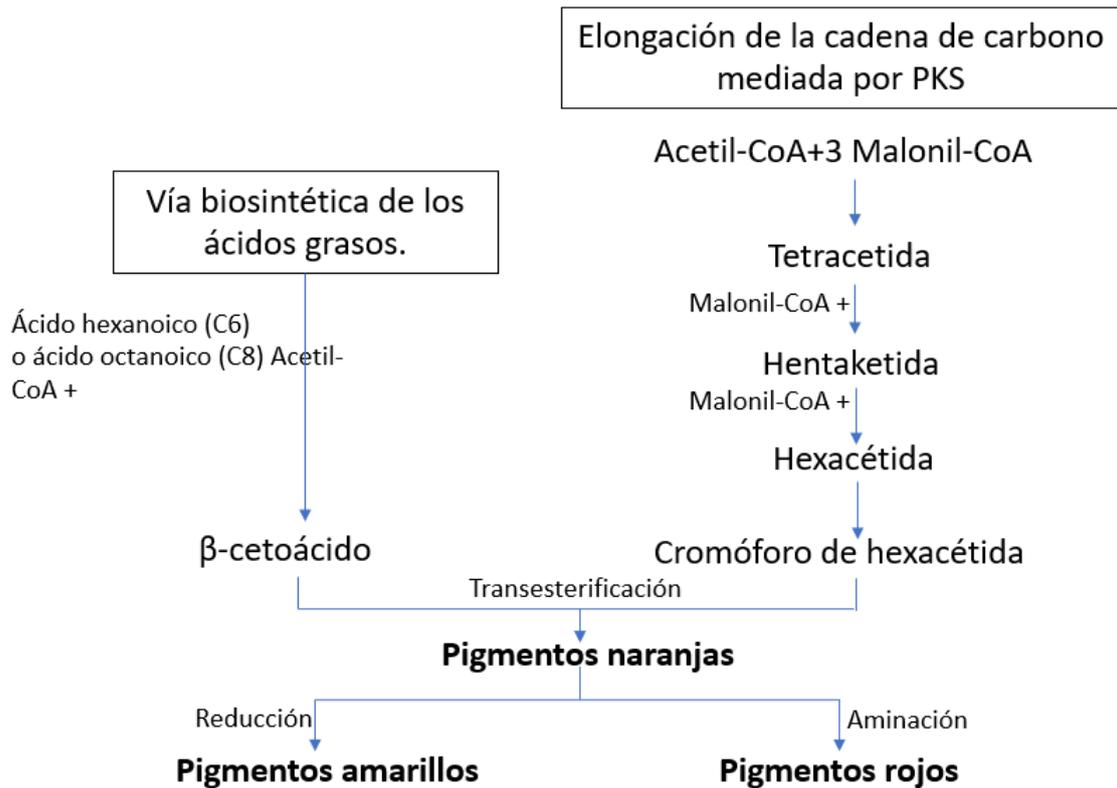


Figura 5. Vías biosintéticas predichas de los pigmentos de *Monascus*.
FUENTE: Traducido de Wang *et al.*, 2017.

Los pigmentos del hongo son solubles en agua y grasas, teniendo una estabilidad a pH ácidos de 2 hasta alcalino de 10, sin embargo, son afectados en los procesos de producción, sobre todo cuando se ajusta a un pH muy bajo y a altas temperaturas que son de uso común en la industria alimentaria como la pasteurización, esterilización y cocción estos procesos afectan a los pigmentos. En algunas investigaciones se observaron que los pigmentos de *Monascus* podrían soportar la pasteurización, sin embargo, se requieren mayores estudios en su estabilidad (Abdollahi *et al.*, 2021).

El aumento de conciencia a nivel mundial sobre el uso de pigmentos sintéticos en la salud humana entre los consumidores, ha permitido la búsqueda de pigmentos de origen natural, para reemplazar a los tradicionales sintéticos en diferentes sectores como alimentario, textil, cosmético, farmacéutico y otros. Los pigmentos han demostrado aceptabilidad al aumentar su demanda en ciertos productos alimenticios. Hoy en día los pigmentos naturales van ganando terreno en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas gracias a sus actividades biológicas como antimicrobiana, antitumorales y antioxidantes (Chen *et al.*, 2020; Kaur *et al.*, 2023).

Las rutas biosintéticas de los pigmentos de *Monascus* son complejas, pero se ha propuesto la ruta de los policétidos como la más común para producir de metabolitos secundarios. En la Figura 5 se observa que la Acetil-CoA y malonil-CoA junto con la enzima sintasa de ácidos grasos forman β -cetoácidos mediante la ruta de los ácidos grasos. Una vez formado el β -cetoácido ocurre la reacción de transesterificación (ácido hexanoico, se une al cromóforo de policetona para formar rubropunctatina o monascorubrina) que formará a los pigmentos anaranjados, estos pigmentos al oxidarse mediante una reacción de hidrogenación formarán los pigmentos amarillos (monascina y ankaflavina), por otro lado, los pigmentos anaranjados y los aminoácidos del medio mediante una reacción de aminación formarán los pigmentos rojos (monascorubramina y rubropunctamina) (Wang *et al.*, 2017).

Los pigmentos que produce el *Monascus* son muy usados en los países asiáticos. Durante el proceso de fermentación los factores de incubación afectan el crecimiento adecuado del hongo, la solubilidad y producción de los metabolitos de interés, como la composición del medio, carbono, nitrógeno, temperatura, oxígeno disuelto, pH, etc. El factor de importancia en la producción de pigmentos es el nitrógeno, donde las investigaciones indican que se producen pigmentos altamente solubles en agua cuando se agregan diferentes tipos de fuentes nitrogenadas al medio, como aminoácidos, peptonas, aminoazúcares, ácidos nucleicos, deduciéndose que los grupos aminos provenientes de las fuentes nitrogenadas sustituyen al grupo oxi en los pigmentos anaranjados de *Monascus*, con ello variando la producción del pigmento a rojo (Zhang *et al.*, 2013).

2. 1. 4. Monacolina K

Uno de los metabolitos secundarios más importante en la fermentación de *Monascus* es la monacolina K (análoga a la lovastatina), inhibidora de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA) que se encarga de la producción de colesterol en mamíferos. La producción de lovastatina es obtenida a partir del hongo *Aspergillus terreus* una cepa no segura para la producción de un metabolito tan importante debido a que se tienen que hacer diferentes purificaciones junto a varios procesos químicos, a diferencia de los producidos por el género *Monascus* (Lee & Pan, 2012; Tu *et al.*, 2016).

La monacolina K (Figura 6) es una estatina que actúa como un inhibidor competitivo a la enzima HMG-CoA reductasa su estructura es análoga al β -hidroxiácido, teniendo una alta afinidad por la enzima HMG-CoA reductasa a diferencia de los otros sustratos intermedios, algunos estudios en animales demostraron efecto hipolipidémico in vivo en la disminución

de triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas de baja densidad y el aumento de la lipoproteína de alta densidad, en otras investigaciones se determinaron que ésta estatina no solo es importante en la regulación de colesterol, también evidenciaron actividades antiinflamatorias, mejora de los vasos sanguíneos, reducción de trombosis y en otros estudios concluyeron que podría reducir el riesgo a padecer Alzheimer (Patakova, 2013; Wu *et al.*, 2021).

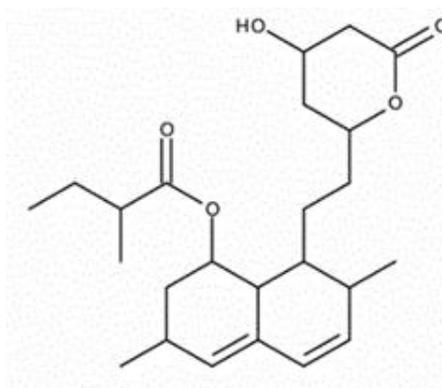


Figura 6. Estructura de la estatina Monacolina K.
FUENTE: Patakova, 2013.

La Unión Europea permite el uso de fermentados de *M. purpureus* cuando es consumido como un complemento alimenticio, garantizando que el producto debe contener al menos 10mg de la estatina monacolina K, siendo la cantidad mínima que otorgaría al producto sus propiedades saludables descritas en la regulación de colesterol de la sangre según lo señala el reglamento de la Unión Europea N°432/2012 de la comisión "Monacolina-K de arroz de levadura roja contribuye al mantenimiento de niveles normales de colesterol en sangre" (Husakova *et al.*, 2021).

2. 1. 5. Citrinina

La estructura de la citrinina se muestra en la Figura 7, es un compuesto policétido producido mediante la fermentación de *M. purpureus*, inicialmente fue descrita su producción en las especies de *M. purpureus* y *M. ruber* en 1995, corrigiéndose en la clasificación de productor a *M. ruber* que no contiene el gen *pksCT* para la síntesis de policétido sintasa de citrinina y que solo se encontraría en *M. purpureus*, sin embargo, en últimas investigaciones demostraron que *M. ruber* si produce análogos a la citrinina (Patakova *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015). El inconveniente con la citrinina es que es una micotoxina producida en la

fermentación del hongo, que tiene efectos genotóxicos y citotóxicos en células de mamíferos, por otro lado, es un buen antimicrobiano (Tu *et al.*, 2016).

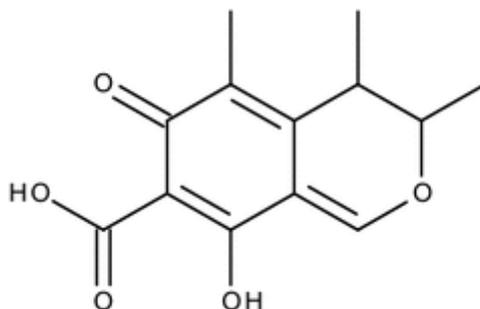


Figura 7. Estructura de la molécula de citrinina
FUENTE: Patakova *et al.*, 2013.

Con el descubrimiento de la de citrinina en los fermentados de *Monascus*, la producción de los pigmentos tuvo un cese en Europa y Estados Unidos, mientras que en los países asiáticos la producción del fermentado del hongo continuó, pero se mantuvo un exhaustivo control en los niveles de citrinina, considerando la concentración máxima tolerada en los alimentos, por ejemplo el límite varía en diferentes países: en Corea del Sur 50 µg/kg y en Japón 200 µg/kg, mientras que en la Unión Europea es de 100 µg/kg de citrinina por Kg de producto (Patakova *et al.*, 2013; Husakova *et al.*, 2021).

2. 1. 6. N-Acetilglucosamina

N-Acetilglucosamina (Figura 8) es un amino-monosacárido que es conocido por su importancia que desempeña en la estructura de la superficie celular. Es un componente importante en la formación del peptidoglucano en pared celular de bacterias, en la quitina de los hongos y en la matriz extracelular de algunos animales. En los hongos la N-Acetilglucosamina es importante para varias funciones, sobre todo como parte de la pared celular, cuya capa más interna está compuesta básicamente por quitina, que es un polímero formado de N-Acetilglucosamina unido por enlaces β -(1,4) (Konopka, 2012). Además, la N-Acetilglucosamina es un candidato en aplicaciones medicinales, previniendo daño articular, la formación de melanina, actúa como un antiinflamatorio y cicatrizante de heridas, se ha informado que también inhibe las células-T anormales en el sistema inmunitario en la función neuronal central (Jamialahmadi *et al.*, 2014).

Se puede considerar que la cuantificación de N-Acetilglucosamina es un método indirecto y confiable para poder estimar la producción de biomasa fúngica, siendo considerado constante según el tipo de cultivo, dependiendo de la naturaleza del carbono, pero no de la fuente nitrogenada (Scotti *et al.*, 2001).

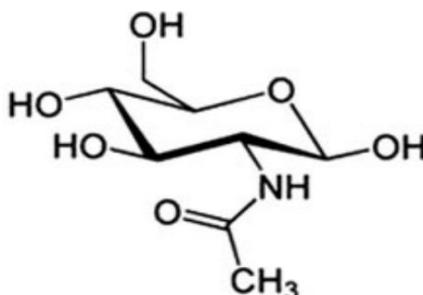


Figura 8. Estructura de la molécula de N-Acetilglucosamina
FUENTE: Jamialahmadi *et al.*, 2014.

2. 1. 7. Producción de la fermentación por *Monascus*.

La producción en Asia del fermentado de arroz rojo por *Monascus* se mantuvo en secreto por mucho tiempo, sobre todo el Koji (cultivo de moho en granos de arroz), el cual se estima que la producción fue desde el año 300 a.C. aunque otros reportes indican que el fermentado se usó a inicios de la dinastía Han en el Siglo I d.C. en China, donde a partir de este periodo se encontraron diferentes registros en la dinastía Ming (1368-1644 d. C.) y Qing (1636-1912 d.C.), la producción del fermentado y sus atributos comenzó a expandirse por la península de Corea aproximadamente hace 500 años donde se ha encontrado su uso en revistas de medicina coreana; en el caso de Japón se llegaron a encontrar manuscritos del siglo VI por sacerdotes budistas, en Taiwán fue introducido por artesanos del vino rojo a mediados de 1661 d.C. (Chen *et al.*, 2015).

2. 1. 8. En la antigüedad

Según Song *et al.* (1997) antiguamente en China se producía el arroz fermentado de la siguiente forma, los granos de arroz tenían que ser machacados y descascarados hasta obtener un arroz blanco y selecto, este arroz se remojava por un periodo de siete días y cuando el olor era insoportable el arroz se llevaba a ríos cercanos para ser enjuagados, de preferencia en arroyos cerca de las montañas, luego de ello el arroz tenía que pasar por una cocción a vapor hasta que se desprenda el aroma, el arroz era sumergido en agua fría y nuevamente a vapor hasta tener una cocción adecuada. Una vez obtenida la cocción deseada se dejaba enfriar al ambiente, después de ello se adiciona al arroz el hongo *Monascus* junto

con agua de alumbre, el cual es mezclado rápidamente hasta que enfríe por completo y se deja en reposo, posteriormente se guarda en bandejas de bambú (Figura 9) en un ambiente con techo alto y que tenga una orientación hacia el sur para evitar de forma directa del sol de la tarde, el arroz debe ser agitado cada dos horas incluyendo las noches, hasta el día de la cosecha.

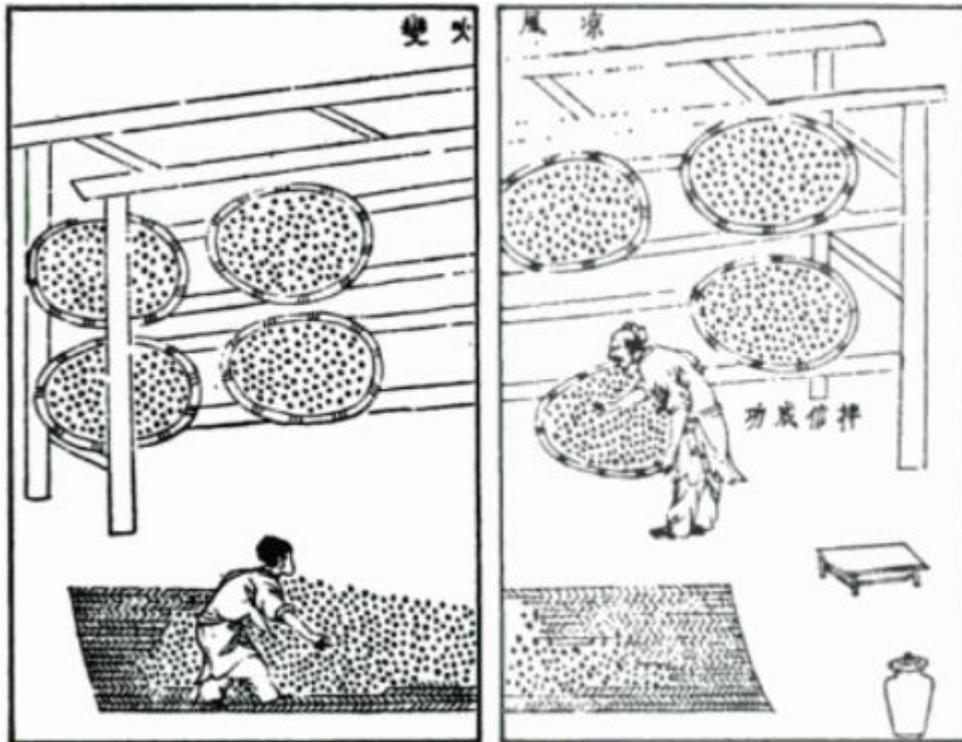


Figura 9. Producción del arroz rojo en bandejas de bambú
FUENTE: Song *et al.*, 1997.

2. 1. 9. En la actualidad.

Según Chen *et al.* (2015) en la producción actual del fermentado de arroz rojo, se utiliza el arroz no glutinoso (*Oryza sativa* L.) como sustrato, que luego de ser lavado es cocido en vapor dentro de los recipientes llamados ZENG, estos recipientes se dejan enfriar y luego de ello es recién inoculado con *Monascus* (este inóculo proviene de un lote de alta calidad) y una vez inoculado el arroz debe ser homogeneizado, luego estos recipientes serán llevados a incubación en un rango de temperatura de 25-28°C por un periodo de 2-4 semanas, durante este tiempo el fermentado tiene que seguir siendo homogeneizado y en caso que falte humedad se le adiciona agua. Una vez que el grano de arroz se encuentre con un color rojo intenso, el proceso de fermentación ha terminado y puede ser llevado a reservorios para optar otros procesos según sea su fin (Figura 10).



Figura 10. Metodología de fermentación usado en China
FUENTE: Traducido de Chen *et al.*, 2015.

2. 2. Fermentación sumergida de *Monascus*.

La producción mediante fermentación en estado sólido y sumergida de *Monascus* ha sido estudiado por mucho tiempo, la fermentación en sustrato sólido ha demostrado tener algunas desventajas frente a la fermentación sumergida. En combinación con las condiciones del medio, el metabolismo del microorganismo puede ser regulado a la producción de algún metabolito de interés, llevando consigo un crecimiento normal o anormal dependiendo de las condiciones. Tener una alta permeabilidad, alta temperatura y altas concentraciones, lo que podría aportar a la producción de metabolitos importantes (Li *et al.*, 2023).

Se tiene una preferencia en la producción de *Monascus* mediante la fermentación sumergida frente a la fermentación sólida, teniendo en consideración que la fermentación sumergida tiene un mejor manejo en el control de los parámetros en el proceso, una mayor productividad, ser escalable a volúmenes más grandes, el tiempo de la fermentación se da en rangos cortos y a un costo menor, además, este método es más apropiado para la producción industrial a gran escala que la producción en estado sólido (Abdel-Raheem *et al.*, 2022).

Durante la fermentación los sustratos complejos se degradan hasta compuestos simples, los cuales pueden ser consumidos por los microorganismos, en el transcurrir de esta

descomposición biológica se van liberando estructuras adicionales en la fermentación denominados compuestos secundarios. Esta técnica de fermentación es usada desde una menor escala hasta los laboratorios de gran escala e industrial, esto trae consigo un buen control en los parámetros adecuados de cultivo y procesos, siendo en consideración que si estos parámetros no son los adecuados pueden generar compuestos que no son de interés en la industria (Subramaniyam & Vimala, 2012).

La producción mediante la fermentación sumergida es una técnica usada para producir micelio del hongo que se extiende a la producción industrial de inóculo del hongo “Mushroom spawn” donde el proceso común es por “semillas” usando granos de cereales que es un método común usado en la primera etapa dentro de la producción de hongos comestibles, pero esta etapa inicial tiene una prolongada incubación que retrasa el avance rápido de la producción y la posibilidad de contaminación en comparación la “semilla” que se produce mediante fermentación sumergida. El micelio producido en la fermentación sumergida es un método alternativo para la generación de “semilla” porque produce una mayor cantidad de biomasa micelial dentro de un corto periodo de tiempo, favoreciendo dispersión del micelio en el recipiente, una mayor adaptación, teniendo en cuenta una buena inoculación y en condiciones estrictas de asepsia (Abdullah *et al.*, 2013).

La fermentación sumergida está dando mayores ventajas en la producción de micelio en espacios compactos y un tiempo menor en la producción evitando la contaminación, el sustrato utilizado tiene una mayor homogeneización que posibilita un adecuado crecimiento del hongo. Lo más interesante de este proceso es el tiempo para la industria y con ello permite una mejor automatización en la producción a gran escala (Ma *et al.*, 2016).

Se debe tener un estricto control en el desarrollo de hongos filamentosos como *Monascus* en la producción de metabolitos, ya que la morfología podría afectar la producción del metabolito de interés dentro de la fermentación sumergida, la producción de hifas puede tener las siguientes características: En formas de hifas libres, agregadas (Pellets), formas artificialmente unidas o atrapadas, estas morfologías están influenciadas significativamente por las condiciones en la fermentación como la fuente de carbono, el pH, velocidad de agitación y la velocidad de aireación (Lv *et al.*, 2017).

2. 2. 1. Factores importantes en la fermentación

Dentro de la naturaleza los microorganismos están expuestos a diferentes entornos físicos y químicos con cambios constantes, es por ello que se han adaptado desarrollando una

variedad de medios para sobrevivir a las condiciones de estrés, el estrés de estos microorganismos está condicionado al favorecimiento de la producción de metabolitos secundarios mediante estrategias bioquímicas, donde las células podrán mantener sus fuentes de energía y metabolismo esenciales para un adecuado crecimiento. Por ejemplo, cuando los microorganismos se exponen a elevadas temperaturas de cultivo, alta presión osmótica, medios de alta concentración o una anormalidad metabólica asociada con la producción de un producto fermentativo, puede ocasionar una inhibición en el crecimiento o inhibir la producción de un producto de interés. Los hongos filamentosos con un potencial bioquímico y su adaptación a condiciones extremas dentro de la fermentación sumergida se utilizan muy a menudo para producir antibióticos (penicilina, cefalosporinas), enzimas (α -amilasa, celulasa), ácidos orgánicos (ácido cítrico), colorantes alimentarios (Babitha *et al.*, 2007).

Distintos parámetros en *Monascus* sp. varían la producción de metabolitos de interés en la industria, es por ello que son objeto de diferentes investigaciones. Siendo una variante en el pH, la temperatura de incubación, la variación en la aireación y en la agitación. (Pineda *et al.*, 2016).

A. Inóculo

El tamaño del inóculo es de gran importancia cuando se quiere formar gránulos fúngicos considerando la interacción de las hifas. Diferentes investigaciones llegaron a la conclusión de que si a una fermentación sumergida se agrega una baja concentración de inóculo se tendrá una mayor cantidad de interacción de hifas. La cantidad de hifas formada es beneficiosa para una mayor producción de gránulos, mientras que otros autores afirman que, si se tiene una menor cantidad de concentración de inóculo inicial, sería beneficioso en la producción de inóculos; es por ello que se debe considerar como un factor importante la cantidad de inóculo inicial porque depende del microorganismo que se esté fermentando. Por ejemplo, en el caso de la producción de *Rhizopus* se considera trabajar con un inóculo de 1.0×10^7 esporas/L y en la producción de *Monascus* se considera 1.0×10^6 (Liao *et al.*, 2007).

B. pH

Los hongos pueden crecer en distintas variaciones de pH entre 2.0 a 9.0, es decir, pueden resistir concentraciones altas de ácidos y medios muy alcalinos; pero en su mayoría tienen como pH óptimo 5.6 (García, 2004). La producción de pigmentos ha sido estudiada a

diferentes pH, de los cuales el color amarillo se produce en mayor cantidad a pH 5.0 y 6.0, rojo a pH 5.0. Cuando se trabaja a pH muy ácido (1.0 y 2.0) y ligeramente básico (7.0 y 8.0) para ambos casos la concentración de los pigmentos tiende a disminuir considerablemente (Velázquez *et al.*, 2016).

En la fermentación sumergida el pH inicial que se usa podría afectar las funciones que tiene la membrana celular, en la solubilidad de las sales, el estado iónico del sustrato, absorción de nutrientes y lo más importante para la industria la biosíntesis de productos deseados. Los microorganismos solo pueden crecer a un rango de pH adecuado y ello dará una producción de metabolitos que a menudo pueden ser afectados por el pH del medio (Fang & Zhong, 2022).

El pH es un parámetro importante en el crecimiento del hongo y los pellets, esto se debe a que los rangos de pH cambian las propiedades de la superficie del hongo y la formación de los gránulos, se debe considerar que cada cepa tiene diferente sensibilidad y rango de pH (Liao *et al.*, 2007).

C. Temperatura

Un gran porcentaje de los hongos son mesófilos, es decir, viven en temperaturas de 22 a 30°C, pero también hay hongos que pueden vivir a temperaturas de 30 a 37°C que son patógenos para el hombre y animales. Además, en el deterioro de alimentos, los hongos pueden vivir a temperaturas bajas (García, 2004). En diferentes estudios se ha determinado que una adecuada producción de pigmentos es a 30°C como temperatura óptima para *Monascus* spp. (Velázquez *et al.* 2016).

Las células procariontas y eucariontas responden a los cambios de temperatura mediante la biosíntesis rápida de proteínas, a estas proteínas se les conoce como proteínas de choque térmico, ellas tienen una importancia en la tolerancia térmica y a las exposiciones que serían letales para el microorganismo (Dikshit & Tallapragada, 2013).

Al igual que los microorganismos extremófilos se observó que *Monascus* puede resistir cambios extremos de temperatura, esto demostraría que la estructura producida por *Monascus* en su micelio puede tener alteraciones en su metabolismo frente al estrés generado, para la producción de los metabolitos que son de interés industrial (Li *et al.*, 2023).

Monascus es capaz de sobrevivir condiciones extremas, como algunos tipos de extremófilos. La morfología del hongo cambia según las condiciones del estrés que puede percibir de su

entorno, como en el caso de contenidos altos de sal y glucosa, produciendo metabolitos como los pigmentos (Thiem *et al.*, 2020).

D. La tasa de aireación y de agitación

La producción de hongos en fermentación sumergida se puede cultivar en diferentes morfologías del micelio suspendido, grupos o gránulos. Cada uno de ellos con ventajas y desventajas por la morfología y la producción de algún metabolito de interés. Se tiene conocimiento sobre el crecimiento del hongo en forma de gránulos que es una buena alternativa en la utilización de la fermentación sumergida, ya que ayuda a la producción en lotes repetidos, además de que también mejora significativamente la reología del cultivo, con ello se tiene una mejor transferencia de masa y oxígeno en la producción, un menor consumo de energía en la aireación y agitación (Liao *et al.*, 2007).

Oxígeno: Los hongos necesitan el oxígeno para vivir, es por ello que son aerobios estrictos. En ello radica el crecimiento en biomasa del hongo (García, 2004). *Monascus* spp. no puede desarrollarse en medios anaerobios, pero si puede crecer en medios limitados de oxígeno. El flujo constante de aire es un factor limitante en la producción de pigmentos, además de citrinina. Con una alta oxigenación la citrinina tiende a aumentar, mientras que la pigmentación se reduce, en oxígeno limitado los pigmentos y la citrinina son producidos en la fase exponencial y no en la estacionaria, como es normal (Pineda *et al.*, 2016).

Agitación: La agitación dentro del cultivo permite que el oxígeno se encuentre homogeneizado en el medio, removiendo el calor y homogeneizando el sustrato. La frecuencia con que es agitado el cultivo líquido tiende a aumentar el rendimiento de la biomasa. Es necesario tener una agitación adecuada (momentum) para minimizar el daño que causa al micelio y con ello mejorar el rendimiento en la producción de pigmento, haciendo factible el escalado a biorreactores para *Monascus* spp (Pineda *et al.*, 2016).

E. Sal

Los factores ambientales como estrés abiótico y biótico afectan el metabolismo de los microorganismos, por ejemplo, algunos de estos microorganismos han desarrollado sistemas para contrarrestar el efecto del estrés osmótico salino producido por cloruro de sodio (NaCl), la respuesta que genera frente al estrés salino es mediante ajustes osmóticos por síntesis de osmolitos propios acompañados de sistemas de transporte de cationes para poder excluir el sodio de su célula. Un ejemplo de hongo es *Saccharomyces cerevisiae*, que en situaciones

de estrés salino produce polioles (glicerol) que son los principales osmolitos producidos y acumulados por las células (Fadaei & Tallapragada, 2013).

La fermentación sumergida logra aumentar la producción de micelio en un medio cuando se somete a *Monascus* con exceso de sal. La adición de osmolitos pueden inhibir fuertemente su crecimiento, es por ello que se debe considerar un porcentaje adecuado de cloruro de sodio dentro de la fermentación (Li *et al.*, 2023).

F. Fuentes de nutrientes (carbono y nitrógeno)

Las fuentes de azúcares como mono, oligo y polisacáridos son necesarios para un adecuado aumento en la biomasa y la producción de metabolitos en *Monascus* spp. Por otra parte, la fuente nitrogenada compleja y de origen natural favorece la producción de pigmentos, a diferencia de las fuentes inorgánicas (Pineda *et al.*, 2016).

La elección de un sustrato adecuado es de suma importancia en la fermentación en la producción de metabolitos de interés u otros metabolitos no favorables. Lo ideal es optimizar cada fermentación para el tipo de sustrato en elección, los sustratos más usados en la fermentación sumergida son la melaza, aguas residuales, azúcares, frutas y vegetales (Subramaniyam & Vimala, 2012).

Para producir un inóculo adecuado en fermentación sumergida se requiere conocer los requerimientos nutricionales del hongo de interés previos al crecimiento micelial, donde generalmente el carbono y nitrógeno juegan un rol importante porque son predominantes en cualquier estructura carbonada o nitrogenada de las moléculas a sintetizar. Un inóculo líquido de buena calidad también mostrará un crecimiento rápido, con alta densidad y confiabilidad en el sustrato donde se esté cultivando (Abdullah *et al.*, 2013).

Las fuentes de carbono son componentes importantes en el citoesqueleto y un requerimiento del crecimiento y desarrollo del hongo, además de ser una fuente esencial en la producción de energía metabólica. La fuente de carbono a una concentración inicial óptima es importante para el desarrollo del micelio en fermentación sumergida, donde se puede obtener un diámetro adecuado de pellets, concentración y producción de biomasa (Ma *et al.*, 2016).

2. 2. 2. Aplicación en la industria de *Monascus*

M. purpureus es una cepa conocida por la producción de metabolitos de importancia comercial, en el uso frecuente de alimentos y bebidas para su conservación, mejorador del

sabor, antimicrobiano, antihipertensivo, anticancerígeno, antioxidante, antiobesidad, promoción de la salud humana y propiedades en la mejora inmunológica (Kaur *et al.*, 2023; Tu *et al.*, 2016).

Los pigmentos del hongo son usados en la coloración de carnes, pescados, salami, ketchup, verduras, pasteles, dulces, productos lácteos y fermentados como yogures frutados para mejorar el color y golosinas. Las investigaciones han demostrado que los pigmentos no solo confieren un color agradable al consumidor, sino que también mejora las propiedades organolépticas de los productos (Abdel-Raheem *et al.*, 2022; Husakova *et al.*, 2021). El fermentado de arroz es muy usado en los países de Asia en la producción de vinos y productos fermentados como el queso rojo de soya (Ma *et al.*, 2000).

Los pigmentos son esenciales en la industria de los alimentos, sin embargo, desde que aparecieron investigaciones recientes sobre el efecto de los pigmentos sintéticos con posibles consecuencias cancerígenas y mutagénicas, es por ello que los pigmentos naturales producidos por microorganismo han tomado un valor importante. Dentro de la producción de pigmentos naturales se encuentran los que produce *Monascus* en su uso tradicional hace miles de años, su valor nutricional y amplia aplicación en diferentes tipos de alimentos incluidos los productos cárnicos, salsa de pescado, fermentados de tofu, vino, etc., gracias a su tolerancia a rangos de pH de 2 a 10 puede usarse en diferentes productos de la industria (Zhang *et al.*, 2013).

Recientes investigaciones demostraron que los pigmentos amarillos tienen buena actividad antibacteriana y antiinflamatoria en cultivos celulares, lo que daría una buena perspectiva en el uso de estos pigmentos en la medicina (Li *et al.*, 2023). Por ejemplo, en aplicaciones antibacterianas con *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* (Husakova *et al.*, 2021). Los pigmentos como monascorubrina y rubropunctatina en diferentes investigaciones demostraron actividad antimicrobiana, pero tuvieron poco efecto frente a levaduras y hongos (Tu *et al.*, 2016).

2.3. Quinoa (*Chenopodium quinoa*)

En los Andes es considerado como un alimento sagrado empleado en el uso medicinal de las poblaciones. Es una planta anual que mide entre 1.0 a 3.5m. La panoja mide entre 15 a 70cm con un rendimiento de 200g de granos. La semilla puede ser de color blanco, café, amarillo, gris, rosado, rojo o negro y se clasifica según su tamaño (Glorio *et al.*, 2003). A lo largo de

los Andes, esta planta se ha adaptado a 5 ecotipos: Valles interandinos (con largos periodos de crecimiento), tierras altas (resistente a las heladas), yunga (común en bosques subtropicales), salar (resistencia a sales), costero (tierras bajas del norte de Chile) (Cancino-Espinoza *et al.*, 2018).

La quinua es considerada un pseudocereal del cual se puede obtener harina. Su composición nutricional es la base por la cual se ha convertido en un interés para el consumidor. Además, esta semilla es libre de gluten con óptimos niveles de proteínas, fibra, vitaminas entre otros.

Tabla 2: Taxonomía de *Chenopodium quinoa*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Amaranthaceae
Subfamilia	Chenopodioideae
Género	<i>Chenopodium</i>
Especie	<i>Chenopodium quinoa</i> .
Nombre común:	Quinoa, quinoa

FUENTE: Campos, 2018.

2. 3. 1. Cultivo de la quinua

La quinua se cultiva en diferentes regiones climáticas alrededor del mundo, pero los principales productores y exportadores en el mundo son Bolivia y Perú, en el caso de Colombia la producción se da en la sabana cerca de las zonas cercanas a Bogotá, en Ecuador las regiones montañosas de la zona central son los principales productores y en Perú se puede cultivar en diferentes regiones agroclimáticas (Medina *et al.*, 2010).

La quinua es una planta nativa de las regiones andinas conocida como un pseudocereal en el mundo, siendo altamente adaptable a diversos ambientes difíciles de cultivar a diferencias de otras plantas, gracias a su amplia diversidad genética, es por ello que pueden crecer en diferentes altitudes desde regiones a nivel del mar hasta las mesetas del Altiplano boliviano (Nowak *et al.*, 2016).

El cultivo del grano de quinua ha sido un sustento en la cultura andina durante muchos ciclos. Se siembra principalmente en Perú, Bolivia, Ecuador, Argentina, Chile y Colombia, pero

durante estos últimos años se ha podido extender la producción a Europa, América del Norte y África obteniendo buenos rendimientos, en estos países el consumo del grano de quinua está cada vez en aumento, pero su producción es menor frente a los primeros países productores del grano (Vilcacundo *et al.*, 2017).

2. 3. 2. Grano de quinua

La quinua tiene un embrión periférico que corresponde al tipo campilótrofo además de un cuerpo basal que es un tejido de almacenamiento o perispermo. Cuando la semilla madura, el endospermo se encuentra en la región micropilar de la semilla, que consta de uno o dos capas de tejido celular (Prego & Otegui., 1998).

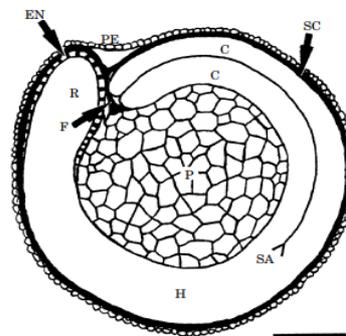


Figura 11. Sección longitudinal del grano de quinua: El pericarpio (PE), hipocótilo (H), cotiledones (C), endospermo (EN), funículo (F), perispermo (P), pericarpio (PE), raíz (R), brote apical (SA). Barra es de 500 μm
FUENTE: Prego & Otegui, 1998.

La semilla de quinua tiene un alto valor nutritivo por ello es considerada un alimento completo por su buena calidad de proteína, además de tener lípidos, almidón, minerales, vitaminas (B, C, E) y valores funcionales y nutricionales. Sin embargo, también contiene un antinutriente como la saponina que debe ser retirado antes del consumo, este antinutriente se localiza en el pericarpio de la semilla. Los biopolímeros de la semilla se hallan en diferentes partes del grano, por ejemplo los gránulos de almidón se encuentran en las células del perispermo, mientras que en el endospermo y en los tejidos del embrión están los cuerpos lipídicos, los cuerpos proteicos (contiene fitina) y los proplastidios (contiene fitoferritina), el embrión que se encuentra rodeando el perispermo es dicotiledóneo conformando la parte del salvado de la semilla, conteniendo un alto valor de proteínas y lípidos y una parte de cenizas, fibra y saponinas. La semilla es de forma aplanada y tiene un diámetro de 1.4 a 1.6mm. Es importante recalcar que los carbohidratos, las proteínas y los lípidos son los nutrientes que dan esta característica tan importante a la semilla de tener propiedades

funcionales, convirtiéndolo en un nuevo ingrediente en el desarrollo de nuevos productos (James, 2009).

2.3.3. Valor nutricional

A pesar de que no pertenece a la familia Gramíneas, es por ello que se le considera un pseudocereal que cuenta con semillas que pueden molerse para producir harina. El interés del consumo de este grano ha comenzado a extenderse por su atractiva composición nutricional (Tabla 3), sus especificaciones físicas y organolépticas (Tabla 4). Estas semillas no contienen gluten. Además de ello, la semilla contiene componentes bioactivos de interés, carotenoides, compuestos fenólicos los cuales son protectores contra diferentes enfermedades como el cáncer, alergias, enfermedades inflamatorias, además puede reducir enfermedades cardiovasculares (Pereira *et al.*, 2019).

Tabla 3: Información nutricional. (Anexo 1)

Composición en 100g de Producto			
COMPONENTES	BLANCA	ROJA	NEGRA
Energía (Kcal.)	370	380	409
Agua	10.1	10.1	10.1
Proteínas	14.4	15.5	16.4
Grasa	5.2	7.4	7.8
Carbohidratos	67.8	62.5	68.4
Fibra	6.5	3.2	2.9
Cenizas	3.5	2.7	2.7
Minerales (mg)			
Calcio (Ca)	120	125	122
Fósforo (P)	220	210	200
Hierro (Fe)	5	5.6	6.2
Vitaminas (mg)			
Retinol / Vitamina A	-	-	-
Tiamina / Vitamina B1	0.13	0.15	0.13
Riboflavina / Vitamina B2	0.38	0.35	0.38
Niacina / Vitamina B3	1.1	1.3	1.3
Vitamina C	-	-	-

La quinua es un cultivo con muchas propiedades, sobre todo por su alto contenido proteico, siendo cultivado en diferentes agroecosistemas. Este cultivo pudo ser domesticado hace más de 7000 años por las culturas precolombinas en el imperio incaico. Este cultivo ha sido muy aceptado por la comunidad por su alto valor nutricional, además de ser libre de gluten, bajo índice glucémico, un equilibrio de aminoácidos esenciales, fibra, lípidos, carbohidratos,

vitaminas y minerales. En el año 2013 declararon el “Año internacional de la Quinoa” por Naciones Unidas, siendo una de las pocas plantas de recibir esta designación (Jarvis *et al.*, 2017).

Tabla 4: Especificaciones físicas y organolépticas (Anexo 1)

Características Físicas			
PROPIEDADES	BLANCA	ROJA	NEGRA
Variedad	Blanca Junín Kankolla Sajama	Pasancalla	Ccoicco Yana
Apariencia	Grano de forma lenticular		
Color	Crema		
Sabor	Dulce		
Olor	Característico de Producto		
Humedad	12.0 % Max		
Saponina	Ausencia	Ausencia	Ausencia

III. METODOLOGÍA

3. 1. Lugar de ejecución

La presente investigación se realizó en el “Laboratorio de Biotecnología Ambiental-Biorremediación – Luis Basto Acosta” y en el “Laboratorio de Microbiología de Alimentos” que corresponden a la Facultad de Ciencias e Industrias Alimentarias respectivamente, dentro de la Universidad Nacional Agraria La Molina en Lima-Perú.

3. 2. Materiales, medios y equipos.

3. 2. 1. Material Biológico

- *Monascus purpureus*: Se utilizó la cepa de *Monascus purpureus* CECT 2955, el cual fue suministrada por el Proyecto de Investigación “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 IDIBIO-1-P-306-17” ganador del concurso de proyectos I+D+i - Reto Bio de Innóvate Perú.
- Quinoa: En la investigación se utilizaron granos y harina de quinoa “*Chenopodium quinoa* Willdenow” que fueron suministrados por el proyecto mencionado anteriormente, la quinoa procedió de la ciudad de Juliaca, Puno-Perú. Las características más detalladas por la empresa productora se encuentran en el Anexo 1.

3. 2. 2. Materiales

- Agar papa dextrosa (PDA): 20% de infusión de papa, 2% de Dextrosa, 1.5% de agar a pH 5.6 (HIMEDIA)
- Agar Sabouraud: 4% Dextrosa, 1% de peptona, 1.5% de agar a pH 5.6 (HIMEDIA)
- Agar Quinoa: 10% de quinoa, 1.5% de agar a pH inicial 6.5.
- Acetil acetona (EMSURE®)
- Ácido sulfúrico (J.T. BAKER®ACS)
- Agua destilada (ALKOFARMA)
- Carbonato de sodio

- Cloruro de sodio (CDH®)
- Etanol 70% y 96% (Biogenics lab SAC)
- HCl 0.01M, 0.5M 1M (J.T. BAKER®ACS)
- N-Acetilglucosamina (HiMEDIA)
- NaOH 0.01M, 0.5M 1M, 10M (CDH®)
- Reactivo de Ehrlich (SIGMA-ALDRICH)
- Algodón
- Asa de Kölle.
- Beakers de 50, 100,500, 1000 mL.
- Gorra
- Gradilla
- Guantes de nitrilo
- Mascarilla
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Matraz Kitasato de 500 mL.
- Mechero Bunsen
- Micropipeta 10-100, 100-1000µL
- Papel filtro Whatman N°1.
- Parafilm
- Pipetas graduadas de 1 mL, 2 mL, 5 mL y 10 mL.
- Placas Petri 100 x 20mm.
- Probetas de 50, 100, 1000mL
- Puntas de micropipetas de 10-100 µL, 100-1000 µL.
- Rollo de papel aluminio.
- Tubos Corning de 10 y 50 mL.

3. 2. 3. Equipos

- Agitador orbital con incubadora (MRC)
- Agitador magnético
- Agitador vórtex
- Autoclave (RELES)
- Balanza analítica
- Balanza (Digital precisión®)
- Baño María

- Cámara de flujo laminar (BIOBASE BSC-1500IIA2-X)
- Espectrofotómetro t80+ (PG instruments)
- Horno de secado
- Horno microondas
- Incubadora (MMM Group)
- Microcentrífuga
- Microscopio óptico
- Potenciómetro
- Vórtex

3. 3. Métodos

3. 3. 1. Cepa de interés

La cepa de *Monascus purpureus* 2955 de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) fue reactivada en caldo papa dextrosa (PDB) siguiendo los protocolos establecidos en el Anexo 2 por el proveedor. La cepa fue incubada por 3 días a 30°C, una vez obtenido el inóculo se sembró en el medio de cultivo Agar papa dextrosa (PDA) llevándose a incubar por un periodo de 10 días a 30°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizaron estrías en un medio de Agar harina de quinua y se llevó a incubar a 30°C durante 10 días, posteriormente se repitió este último proceso. La placa obtenida se licuó en un vaso de acero, obteniéndose un inóculo previo con el fin de verter 40µL dentro de un pocillo realizado a un medio de cultivo de harina de quinua suplementado con 0.5% de NaCl a un pH ajustado a 6 durante un periodo de incubación de 12 días a 30°C. Una vez invadida la placa se llevó a refrigeración a 4°C para ser utilizada posteriormente en la preparación del inóculo.

3. 3. 2. Preparación del inóculo.

El inóculo producido para los objetivos 1, 2 y 3 se realizó siguiendo el procedimiento del laboratorio de Laboratorio de Biotecnología Ambiental- Biorremediación. El contenido de la placa fue vertido en un envase de acero de licuadora, se adicionaron 50mL de agua destilada estéril y fue licuado durante 15 segundos a una velocidad máxima, el extracto obtenido fue vertido en un frasco estéril. Del inóculo se extrajeron 0.5mL para cada matraz en la investigación.

3. 3. 3. Obtención de la cantidad adecuada del sustrato para la producción de biomasa.

La preparación de los medios de cultivo para el primer objetivo se hizo en matraces de 250mL. Se adicionaron diferentes cantidades de harina de quinua siendo 2, 4, 6, 8g con 100mL de agua destilada, el matraz fue llevado a un agitador para homogeneizar el medio, luego de ello se ajustó a pH 6 utilizando HCl (1N) y NaOH (1N). Una vez terminada la preparación del medio se cerró con un tapón de algodón envuelto previamente con una gasa y se esterilizó a 15lb, 121°C durante 15 min. Una vez esterilizados los medios se dejaron enfriar y se procedió a adicionar 0.5mL de inóculo. Los matraces se agitaron a 100rpm e incubados a 30°C por un periodo de 6 días en total oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se filtró el medio, la biomasa colectada se llevó a secar a 60°C hasta tener un peso constante. Las muestras secas fueron molidas con un molinillo y conservadas a 4°C hasta proceder con los análisis de la determinación de N-Acetilglucosamina y pigmentos a 400, 470, 500nm.

3. 3. 4. Evaluación de los parámetros agitación (rpm), pH y concentración de cloruro de sodio (M).

Los medios de cultivo del segundo objetivo se prepararon en matraces de 250mL con una cantidad de 4g de harina de quinua y 100mL de solución a diferentes concentraciones de cloruro de sodio según corresponda el tratamiento siendo 0, 0.01, 0.05 y 0.1M, los medios se ajustaron a diferentes niveles de pH 5, 6 y 7 con HCl (1N) y NaOH (1N), luego se usó un filtro de algodón esterilizado a 15lb a 121°C por un periodo de 15 min. Luego de esterilizar los medios se dejaron enfriar y se adicionaron 0.5mL del inóculo por matraz, posteriormente los matraces fueron llevados a un agitador orbital a 100, 120, 140rpm dependiendo de los tratamientos. Todos los tratamientos se incubaron a temperatura constante de 30°C por 144 horas en oscuridad total. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los medios fueron filtrados y la parte colectada de biomasa se llevó a secar a 60°C hasta tener un peso constante. Las muestras secas fueron molidas y conservadas a 4°C hasta proceder con los análisis respectivos de concentración de N-Acetilglucosamina y pigmentos a 400, 470, 500nm. Los matraces fueron analizados por triplicado.

3. 3. 5. Medición de la concentración de N-Acetilglucosamina en un periodo 168 horas.

En la preparación para el tercer objetivo se usaron matraces de 250mL, donde por matraz se adicionaron 4g de harina de quinua con 100mL de cloruro de sodio a 0.1M, el medio se ajustó a un pH 6 con HCl (1N) y NaOH (1N), se cerró con un tapón de algodón envuelto en

gasa y se llevó a esterilizar a 15lb a 121°C por un periodo de 15 min. Después de enfriar el medio se adicionaron 0.5mL de inóculo y fue llevado a incubación con agitación constante de 120rpm y a temperatura de 30°C en oscuridad total. Se retiraron 3 matraces cada 24h por un periodo de 168h. Al finalizar el tiempo de incubación se procedió a filtrar los fermentados y la biomasa recolectada se llevó a secar a 60°C hasta obtener un peso constante. Las muestras secadas fueron molidas y conservadas a 4°C hasta los análisis respectivos de concentración de N-Acetilglucosamina y pigmentos a 400, 470, 500nm. Los matraces fueron analizados por triplicado.

3. 3. 6. Cuantificación de N-Acetilglucosamina.

Se siguieron los métodos propuestos por Chen & Johnson, (1983) y Pérez *et al.* (2017), con ciertas modificaciones. Se peso 0.1g de las muestras secas y molidas, se adicionaron 500 µL de H₂SO₄ al 72%, se mantuvo la hidrólisis acida por un periodo de 2h a 40°C, una vez transcurrido el tiempo se procedió a diluir la solución hasta una concentración del 3% de H₂SO₄, se llevó a baño maría a 90°C por un periodo de 2h, se dejó enfriar y se procedió a neutralizar la solución con NaOH 10N, la solución obtenida se filtró y se centrifugó a 5000 RPM durante 15min. Se utilizó del sobrenadante 1000µL y se homogeneizó con 500µL de la Solución A, se llevó a 90°C por un periodo de 1h. Una vez transcurrido el tiempo por muestra fría se adicionaron a la solución 1600µL de etanol 96° y se llevó a agitación por 10min hasta disolver por completo el precipitado formado. Una vez disuelto se agregaron 500µL del reactivo de Ehrlich, se dejó reposar y se llevó al espectrofotómetro UV/VIS para su lectura a 537nm. Solución A (4% de carbonato de sodio 1.25 N).

En la elaboración de la curva estándar de N-Acetilglucosamina se utilizaron 9 concentraciones diferentes de N-acetil-D-glucosamina diluida en agua destilada. Se determinaron las muestras utilizando el procedimiento escrito en el anterior párrafo y se leyó en un espectrofotómetro UV/VIS a 537nm para estimar la ecuación lineal de N-Acetilglucosamina.

$$Y = 8.9775X+0.0202 \text{ con un } R^2=0.98$$

Donde:

- Y=Absorbancia
- x=Concentración de N-Acetilglucosamina.

3. 3. 7. Determinación de pigmentos mediante espectrofotometría a 400, 470, 500nm

La metodología de análisis de pigmentos mediante densidad óptica se siguió según lo propuesto por Kantifedaki *et al.* (2018) con ciertas modificaciones. De las muestras obtenidas que fueron secadas y molidas, se tomó 0.1g y se colocó en un tubo de 30mm de diámetro, se adicionaron 5mL de etanol al 70%, la solución se llevó a baño ultrasónico durante un periodo de 30min a 25°C. Una vez transcurrido el tiempo se llevó la solución a un agitador orbital a 180rpm, a 30°C por un periodo de 1h. Los extractos etanólicos fueron pasados por un papel filtro Whatman N°1 y luego se centrifugaron a 9000rpm durante 20min, se utilizó el sobrenadante para el análisis midiéndolo a 400, 470, 500nm para los pigmentos amarillo, anaranjado y rojo respectivamente. El blanco de la solución fue el etanol al 70%. Todos los resultados obtenidos en el análisis fueron presentados mediante absorbancia por mililitro (AU/mL).

3. 3. 8. Ensayo de inóculo en fermentación sólida.

Se utilizó el inóculo proveniente de la fermentación sumergida utilizando los mejores parámetros obtenidos en los objetivos anteriores (4% de sustrato, NaCl 0.01M, pH 6, agitación de 120rpm e incubado por 120h). La prueba se realizó con un matraz que contenía el inóculo antes mencionado, el contenido se vertió en un vaso de licuadora de acero previamente esterilizado y se licuó por 10 segundos a potencia media para tener una mezcla homogénea. El líquido homogeneizado se llevó a un recipiente estéril hasta su posterior uso. El sustrato de fermentación sólido se realizó autoclavando 30g de granos de quinua, una vez enfriados se adicionó 1mL del inóculo y se incubó por un periodo de 10 días.

3. 3. 9. Conteo de UFC del inóculo.

Para la determinación de UFC/mL se utilizó una micropipeta donde se tomó 1mL del extracto licuado y se llevó a un tubo que contenía 9mL de solución salina y se homogeneizó en vortex, Del tubo homogeneizado se extrajo 1mL y se procedió a realizar diluciones sucesivas hasta 10⁻⁶, de cada una de las diluciones se tomó 1mL y se llevó a placas de Petri, luego se adicionaron 20mL de PDA, se homogeneizó cuidadosamente y se esperó que solidifique, luego se incubó por un periodo de 72 horas a 30°C. Culminado el tiempo establecido se procedió a contar el número de colonias formadas y se multiplicó por el factor de dilución para obtener las UFC/mL.

3. 3. 10. Diseño experimental

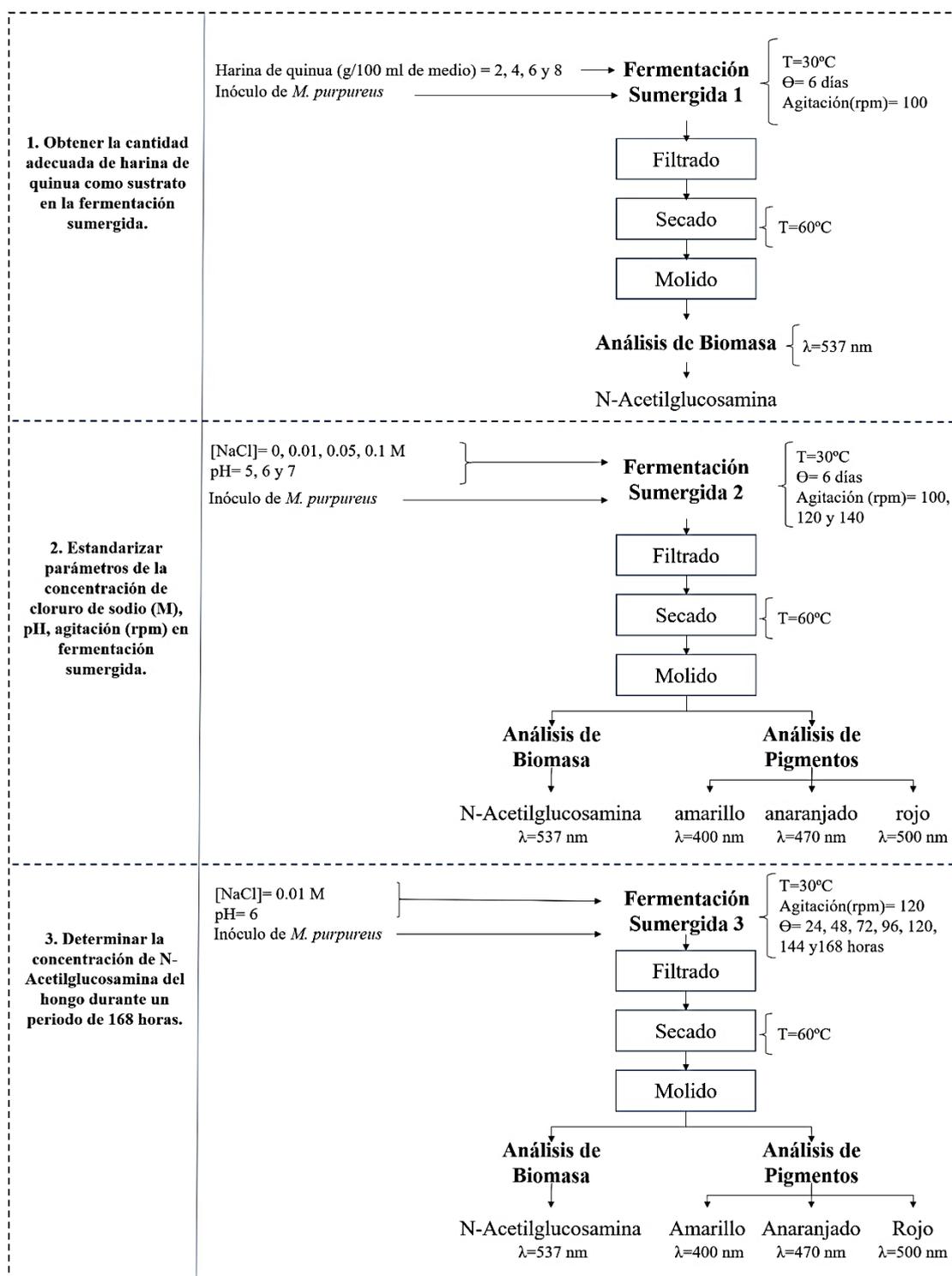


Figura 12. Metodología de la investigación.

Los tres objetivos fueron analizados mediante el programa Statgraphics Centurion XVI, un análisis de ANOVA simple para el objetivo 1 con una comparación de TUKEY HSD para la producción de N-Acetilglucosamina. El objetivo 2 se analizó mediante un ANOVA multifactorial comparándose mediante TUKEY HSD y ANOVA simple agrupando cada uno

de ellos con un tratamiento de forma individual, como se indica en la Tabla 5, tanto para la producción de N-Acetilglucosamina y pigmentos. El objetivo 3 se analizó mediante un ANOVA simple para el factor día con una comparación de TUKEY HSD para la producción de N-Acetilglucosamina y pigmentos (Figura 12).

Tabla 5: Tratamientos analizados en la segunda etapa de la investigación.

Agitación (rpm)	pH	NaCl (M)			
		0	0.01	0.05	0.1
100	5	T1	T2	T3	T4
	6	T5	T6	T7	T8
	7	T9	T10	T11	T12
120	5	T13	T14	T15	T16
	6	T17	T18	T19	T20
	7	T21	T22	T23	T24
140	5	T25	T26	T27	T28
	6	T29	T30	T31	T32
	7	T33	T34	T35	T36

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de la cantidad adecuada de harina de quinua como sustrato en la fermentación sumergida

El análisis de ANOVA (Anexo 3) para los tratamientos de harina de quinua (g/100mL) muestran que las medias de N-Acetilglucosamina de los niveles de harina de quinua (g), con un nivel de confianza de 95.0% existen diferencias significativas.

En la Tabla 6, se tienen los resultados de las medias de N-Acetilglucosamina con su respectiva desviación estándar, además se puede observar tres grupos homogéneos indicados con letras (a-c) analizados con un $\alpha=0.05$ con la prueba de Tukey HSD (Anexo 4).

La cantidad mínima de sustrato 2g/100mL que presenta la menor producción de N-Acetilglucosamina 21.22 ± 0.288 mg/gMS (Tabla 6), ello debido a una limitación del sustrato en el medio. Una cantidad excesiva de sustrato de 6 y 8g/100mL dio un promedio de 30.55 ± 0.393 y 30.24 ± 0.136 mg/gMS respectivamente de N-Acetilglucosamina, además no mostraron diferencias significativas en el análisis de Tukey ($\alpha=0.05$).

Según Scotti *et al.* (2001) señalan que la N-Acetilglucosamina medida en el hongo puede ser considerada como un indicador indirecto de biomasa, como resultado de su investigación en “Medición de N-Acetilglucosamina como un método indirecto para la estimación de biomasa de *Cunninghamella elegans* en condiciones de cultivo en estado sólido”, consideran que es un método indirecto confiable para estimar la biomasa fúngica, sin depender de la edad del cultivo y sus condiciones de fermentación. Otros autores Chysirichote *et al.* (2014) también señalan que la cuantificación de N-Acetilglucosamina es muy utilizada en diferentes investigaciones con el objetivo de medir de forma indirecta la biomasa en hongos, sin embargo, los autores consideran que el contenido de N-Acetilglucosamina si depende de la edad del cultivo, pero las fuentes de nitrógeno y carbono no afectaría en la síntesis de quitina fúngica.

Tabla 6: Medias para N-Acetilglucosamina (mg/gMS) por harina de quinua (g/100mL) con intervalos de confianza del 95.0%

Código	Harina de quinua (g/100mL)	n	N-Acetilglucosamina \pm DS
TC1	2	3	21.22 \pm 0.288 ^a
TC2	4	3	31.17 \pm 0.277 ^c
TC3	6	3	30.55 \pm 0.393 ^{bc}
TC4	8	3	30.24 \pm 0.136 ^b

DS: Desviación Estándar; n: Número de muestras por tratamiento,
a-c: Grupos Homogéneos; $\alpha=0.05$

La concentración alta de sustrato podría estar inhibiendo el crecimiento, volviendo al medio más viscoso y con menor flujo de oxígeno. Por otro lado, con una cantidad de sustrato intermedia de 4 y 6g/100mL se obtuvo 31.17 \pm 0.277 y 30.55 \pm 0.393mg/gMS de N-Acetilglucosamina respectivamente, los cuales no presentaron diferencias significativas en el análisis de Tukey ($\alpha=0.05$).

En la producción de micelio no depende del nitrógeno usado, pero si podría existir una dependencia en la composición del medio de cultivo por la fuente de carbono, en la producción de N-Acetilglucosamina dependerá de la naturaleza del carbono que se utiliza como sustrato en la fermentación y de forma indirecta como un indicador del crecimiento de la biomasa del hongo (Scotti *et al.*, 2001).

Las investigaciones realizadas por Ghaly *et al.* (2005) que se centraron en determinar un modelo cinético de *Kluyveromyces fragilis* en fermentación sumergida utilizando suero de queso, encontraron que a una concentración baja de lactosa de 1,91g/L (0.19g/100mL) limita el crecimiento de la levadura, mientras que cuando trabajaron con concentraciones altas de lactosa 75g/L (7.5g/100mL) se inhibió el crecimiento del hongo.

Las cantidades de sustrato utilizadas por los autores mencionados en el anterior párrafo tienen una semejanza con los tratamientos utilizados dentro de la investigación, las concentraciones de sustrato de 6 y 8g/100mL presentaron una disminución en la producción del N-Acetilglucosamina, por otro lado, los investigadores Ghaly *et al.* (2005) utilizaron en

su estudio 50g/L (5g/100mL) como concentración adecuada para hallar el modelo cinético, siendo una cantidad intermedia de los tratamientos realizados en la presente investigación de sustrato de 4g/100mL y 6g/100mL los que no presentaron diferencias significativas.

Los investigadores Ghosh & Ghosh (2017) indican que la concentración del sustrato es un parámetro importante en la nutrición del microorganismo y su producción de metabolitos de interés, en su investigación realizada lograron optimizar la producción de lacasa por *Aspergillus flavus* PUF5 mediante fermentación sumergida utilizando agroresiduos como sustrato económico, siendo uno de sus parámetros a optimizar la concentración del sustrato (piel de calabaza acanalada), el resultado óptimo que obtuvieron fue de 4% (4g/100mL) para la producción de la enzima de interés (lacasa) además, indicaron que la biomasa fúngica y las proteínas también aumentaron. La cantidad de sustrato optimizado por los autores se encuentra en el rango de la presente investigación de 4g/100mL y 6g/100mL que no presentaron diferencias significativas.

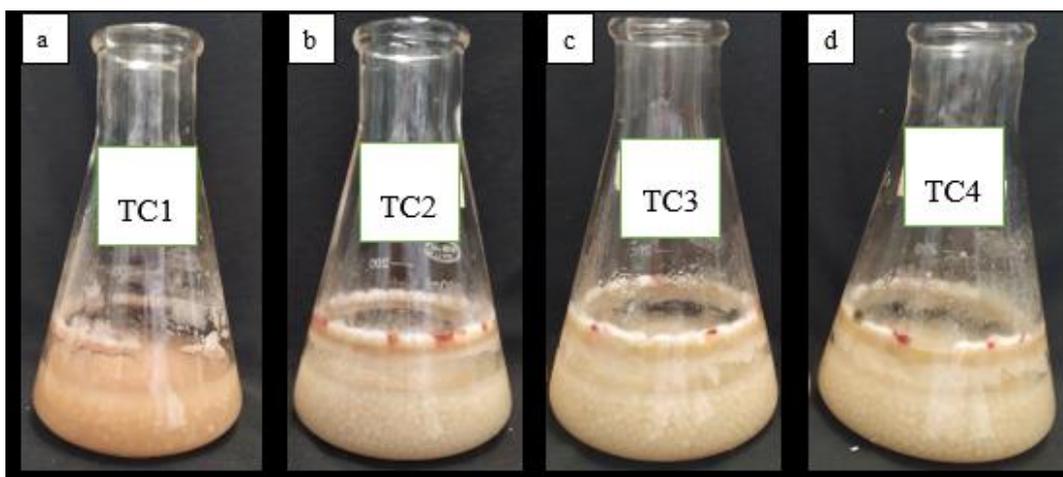


Figura 13. Tratamientos obtenidos en fermentación sumergida con sustrato de harina de quinua en gramos; a: 2g/100mL, b: 4g/100mL, c: 6g/100mL, d: 8g/100mL.

Aunque los anteriores autores tienen valores óptimos cercanos al tratamiento de 4g/100mL que tiene el promedio mayor de N-Acetilglucosamina (40.17mg/gMS), dependerá mucho del sustrato porque los valores obtenidos no son concluyentes para todos los sustratos ni para todos los tipos de cepas.

En la investigación realizada por Mazumder *et al.* (2009) se centraron en la producción de lacasa en fermentación sumergida por *Pleurotus ostreatus* la concentración del sustrato (glucosa) fue de 30 g/L (3g/100mL) ayudó a aumentar la producción de biomasa por el hongo, sin embargo, cuando se siguió adicionando una mayor cantidad de sustrato superior

a los 30 g/L (3g/100mL) no presentaron diferencias significativas para la producción de la enzima analizada y la biomasa.

En la Figura 13 se puede observar los cuatro tratamientos realizados en la investigación, donde en la Figura 13a (2g/100mL) se tiene poca formación de pellets, además de un aumento en la producción de pigmentos posiblemente por el estrés generado por el agotamiento de nutrientes, a diferencia de las demás Figuras donde se observan el aumento de pellets y una pigmentación tenue (Figura 13b-d).

Investigaciones realizadas por Domínguez-Espinosa & Webb (2003) encontraron que en la fermentación sumergida producida por *Monascus* utilizando como fuente de sustrato el trigo, determinaron que la viscosidad producida por el sustrato en el caldo de cultivo tiene un efecto significativo sobre la morfología del hongo. Además, que un rango en la concentración del sustrato adecuado en su investigación fue de 3-5%. En el rango que obtuvieron se encuentra la concentración que presentó la media más alta de la biomasa para el tratamiento de 4% de harina de quinua.

En la investigación desarrollada por Ma *et al.* (2016) produjeron un inóculo líquido a diferentes concentraciones de carbono, ellos encontraron que para un medio con sustrato de harina de maíz al 4% y harina de arroz al 6% se obtuvo un mayor rendimiento en la producción de biomasa, pero en concentraciones superiores a las mencionadas, la biomasa disminuyó, esto debido a la presión osmótica que causa las concentraciones altas de carbono las cuales afectan la producción de biomasa.

El cultivo común de *Monascus* se da en cereales por fermentación sólida, sin embargo, esta fermentación requiere de un sistema complejo en el control de los parámetros, mientras que en la fermentación sumergida es más sencillo de controlar, además los costos de producción pueden disminuir en el tiempo de fermentación (Domínguez-Espinosa & Webb, 2003).

Determinar una concentración adecuada del sustrato es un objetivo importante dentro de la fermentación sumergida, donde se debe considerar que una baja concentración de sustrato en el medio podría limitar el crecimiento del microorganismo mientras que una alta concentración podría inhibir el crecimiento (Ghaly *et al.*, 2005).

Dentro de la primera etapa de la investigación se determinó que el tratamiento que contiene 4g/100mL (4%) obtuvo una mayor producción de N-Acetilglucosamina e indirectamente una mayor producción de biomasa en la fermentación sumergida producida por el hongo

Monascus purpureus, aunque el tratamiento de 6g/100mL (6%) no presentó diferencias significativas, se eligió el primero por tener un menor gasto de sustrato, siendo este un factor importante dentro del escalamiento industrial para la producción del inóculo.

4. 2. Obtención de los parámetros adecuados de concentración de cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH en la fermentación sumergida.

Teniendo en consideración que en el primer objetivo se determinó que una concentración de 4% de sustrato de harina de quinua sería lo ideal para continuar con la investigación. En el presente objetivo se toman en cuenta las variaciones en las condiciones de fermentación como la concentración de cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH. Las imágenes correspondientes a este objetivo se encuentran en los Anexos 31, 32 y 33.

4. 2. 1. Producción indirecta de biomasa fúngica.

Los promedios obtenidos fueron analizados mediante ANOVA y la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey, donde se mostraron las diferencias significativas de los efectos medios y sus interacciones. Los valores-p obtenidos muestran la significancia de cada uno de los factores, se obtuvieron 7 valores-p (< 0.05), esto indicaría que los factores pH, rpm, NaCl, (pH)x(rpm), (pH)x(NaCl), (rpm)x(NaCl), (pH)x(rpm)x(NaCl) tienen un efecto sobre la N-Acetilglucosamina (mg/gMS) con un 95.0% de nivel de confianza (Anexos 5, 6, 7 y 8).

Los procesos fermentativos de cultivo sumergido tienen su eficacia en la determinación adecuada del medio de cultivo según la calidad de las fuentes de carbono y nitrógeno, la temperatura, el pH del medio y la aireación. Los factores mencionados van a influenciar en la solubilidad de las sales, que afectara indirectamente en el comportamiento iónico del sustrato, la morfología del hongo, el transporte de nutrientes, el metabolismo, etc. (Babitskaya *et al.*, 2005).

El rendimiento en la fermentación sumergida dependerá también de la fuente de carbono y nitrógeno, debido a un correcto soporte para la nutrición celular y la biosíntesis para la formación de las estructuras del hongo, los pigmentos por su parte están modulados por la composición de la fermentación y las condiciones de cultivo para poder aumentar la producción de pigmentos amarillo, anaranjado y rojo, siendo las condiciones de la fermentación lo que puede generar una producción adecuada de biomasa y pigmentos (Yang & He, 2008; Shi *et al.*, 2015).

Tabla 7: Promedios obtenidos de las pruebas de comparación múltiple de N-Acetilglucosamina (mg/gMS), 400nm, 470nm y 500nm de los factores cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH

Nº	Factor	Nivel	N-Acetilglucosamina (mg/gMS)	400nm	470nm	500nm
1	NaCl (M)	0	32.26 ± 1.20 ^c	0.650 ± 0.12 ^c	0.456 ± 0.21 ^d	0.402 ± 0.25 ^c
2		0.01	32.80 ± 1.12 ^d	0.653 ± 0.12 ^c	0.435 ± 0.18 ^c	0.397 ± 0.24 ^c
3		0.05	30.54 ± 1.28 ^b	0.611 ± 0.12 ^b	0.388 ± 0.14 ^b	0.312 ± 0.13 ^b
4		0.1	29.77 ± 1.21 ^a	0.571 ± 0.10 ^a	0.315 ± 0.08 ^a	0.241 ± 0.07 ^a
5		100	29.98 ± 1.45 ^a	0.651 ± 0.12 ^b	0.498 ± 0.22 ^c	0.479 ± 0.26 ^c
6	Agitación (rpm)	120	32.08 ± 1.44 ^b	0.707 ± 0.05 ^c	0.412 ± 0.07 ^b	0.321 ± 0.06 ^b
7		140	31.96 ± 1.39 ^b	0.505 ± 0.06 ^a	0.285 ± 0.10 ^a	0.214 ± 0.08 ^a
8	pH	5	31.48b ± 1.74 ^b	0.630 ± 0.15 ^b	0.412 ± 0.21 ^b	0.368 ± 0.25 ^b
9		6	31.51b ± 1.64 ^b	0.646 ± 0.12 ^b	0.431 ± 0.18 ^c	0.372 ± 0.21 ^b
10		7	31.03a ± 1.77 ^a	0.591 ± 0.09 ^a	0.353 ± 0.08 ^a	0.274 ± 0.05 ^a

Medias obtenidas ± Desviación estándar; Las letras iguales representan los grupos homogéneos; α=0.05

El análisis anterior se usó para ver si los factores antes mencionados tienen efecto estadísticamente significativo sobre la producción de pigmentos medidos a 400, 470, 500nm (Anexos 9, 10, 11 y 12), (Anexos 13, 14, 15 y 16) y (Anexos 17, 18, 19 y 20) respectivamente obteniéndose que los 7 valores-p son menores a 0.05 demostrando que cada uno de los factores tiene un efecto para cada una de las variables respuestas analizadas en la investigación.

En la Tabla 7, se observan que los grupos de las medias analizadas de N-Acetilglucosamina (mg/gMS), el factor cloruro de sodio tiene diferencias significativas para cada uno de los niveles, siendo de menor a mayor valor 29.77 ± 1.21, 30.54 ± 1.28, 32.26 ± 1.20 y 32.8 ± 1.12 mg/gMS para los niveles 0.1, 0.05, 0 y 0.01M respectivamente.

Tabla 8: Medias obtenidas de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) en diferentes concentraciones de cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH.

Agitación (rpm)	pH	NaCl (M)			
		0	0.01	0.05	0.1
100	5	31.562 ± 0.229 ^{ijklm}	32.176 ± 0.118 ^{lmnñ}	30.396 ± 0.263 ^{def}	29.199 ± 0.236 ^{bc}
	6	30.703 ± 0.305 ^{efghi}	31.316 ± 0.464 ^{ghijk}	29.107 ± 0.104 ^{bc}	28.862 ± 0.547 ^b
	7	30.186 ± 0.164 ^{de}	30.856 ± 0.090 ^{efghij}	27.910 ± 0.229 ^a	27.433 ± 0.076 ^a
120	5	33.234 ± 0.166 ^{pqr}	33.694 ± 0.284 ^{rs}	30.319 ± 0.305 ^{de}	29.844 ± 0.256 ^{cd}
	6	33.679 ± 0.194 ^{rs}	34.231 ± 0.076 ^s	31.531 ± 0.229 ^{ijkl}	31.132 ± 0.353 ^{fghijk}
	7	32.482 ± 0.194 ^{nñop}	32.806 ± 0.188 ^{nñopq}	31.470 ± 0.076 ^{ijkl}	30.549 ± 0.201 ^{defg}
140	5	33.587 ± 0.256 ^{qrs}	33.863 ± 0.312 ^{rs}	30.589 ± 0.367 ^{defgh}	29.261 ± 0.125 ^{bc}
	6	32.329 ± 0.270 ^{mñño}	33.096 ± 0.132 ^{opqr}	31.899 ± 0.291 ^{klmn}	30.242 ± 0.132 ^{de}
	7	32.574 ± 0.194 ^{nñop}	33.127 ± 0.132 ^{pqr}	31.623 ± 0.146 ^{ijklm}	31.378 ± 0.173 ^{hijk}

Medias obtenidas ± Desviación estándar; Las letras iguales representan los grupos homogéneos; $\alpha=0.05$

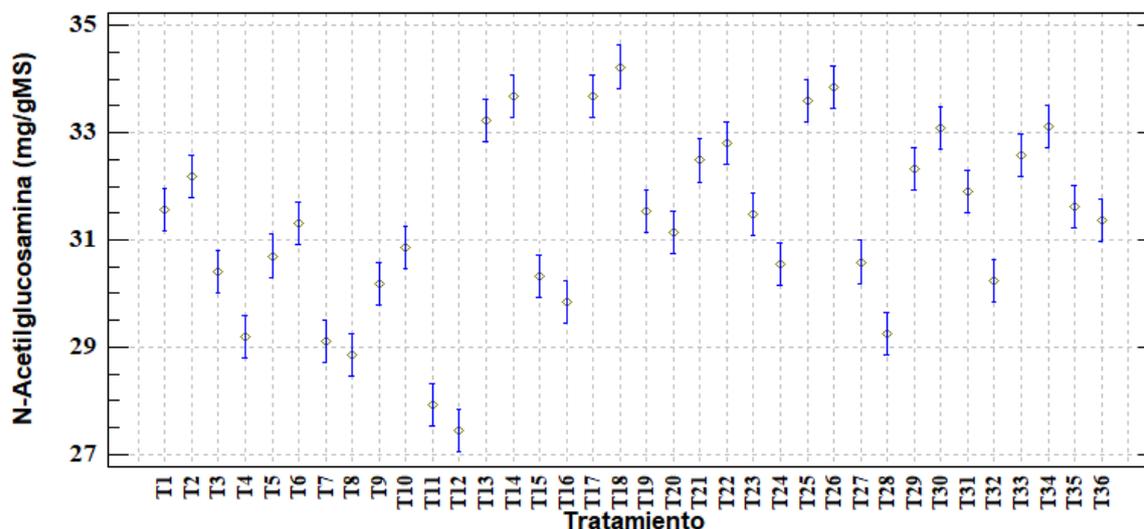


Figura 14. Comparación de las medias de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) en diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey HSD (95%).

Por otro lado, en la Tabla 8 se tiene las medias analizadas para cada uno de los tratamientos diferentes de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) como se indicó en la Tabla 5 donde no hubieron diferencias significativas para 5 tratamientos, siendo los de mayor valor 34.231

± 0.076 (NaCl:0.01M)x(pH6)x(120rpm), 33.863 ± 0.312 (NaCl:0.01M)x(pH5)x(140rpm), 33.694 ± 0.284 (NaCl:0.01M)x(pH5)x(120rpm), 33.679 ± 0.194 (NaCl:0M)x(pH6)x(120rpm) y 33.587 ± 0.256 (NaCl:0M)x(pH5)x(140rpm). El análisis se realizó utilizando un ANOVA con la prueba de Tukey HSD ($\alpha=0.5$) (Anexo 21 y 22).

En la Figura 14 se tiene una comparación de todos los análisis mencionados donde se observan los valores más altos y bajos.

En investigaciones realizadas por Ghosh & Ghosh (2017) en fermentación sumergida para la producción de la enzima lacasa por *Aspergillus flavus*, determinaron que con una concentración de cloruro de sodio de 0.07% favorece la mayor producción de biomasa, además de verse favorecida la producción de la enzima lacasa. En la presente investigación la mayor producción de N-Acetilglucosamina en el estudio se dio a una concentración de 0.01M o 0.06% de cloruro de sodio, siendo este un valor cercano a los que mencionan los autores.

En las investigaciones desarrolladas por Babitha *et al.* (2007) a diferentes concentraciones altas de sales NaCl: 6, 8, 10 y 12% (p/p) para observar el rendimiento de biomasa, encontraron que en las menores concentraciones se promueve la producción de biomasa fúngica en el cultivo sumergido, pero a medida que las concentraciones de sales aumentaban considerablemente la producción de biomasa disminuía.

La mayor concentración realizada en la presente investigación fue de 0.1M o 0.58% (p/v) siendo una concentración muy baja con respecto a la investigación realizada por Babitha y colaboradores mencionados en el párrafo anterior, aun así, se sigue cumpliendo que utilizar concentraciones bajas de NaCl aumenta la producción de biomasa, sin embargo, se demostró que cuando no se agrega NaCl al medio, en concentración más baja de la investigación de 0.01M o 0.58% (p/v) la producción de biomasa comenzó a disminuir.

Venkatachalam *et al.* (2019) determinaron la producción de biomasa a diferentes niveles de salinidad con tratamientos de 0 hasta 9% sobre el crecimiento de *Talaromyces albobiverticillius*, siendo la mayor producción de biomasa a concentraciones más elevadas es decir al 9% ya que el hábitat del hongo es de origen marino es decir se encuentra adaptado a concentraciones de sales altas.

Con respecto al factor de agitación (rpm), se tienen dos grupos homogéneos en el análisis, siendo el nivel de 100rpm con un valor de 29.98 ± 1.45 mg/gMS el de menor valor y los

niveles de agitación de 120 y 140rpm que no mostraron diferencias significativas entre los resultados que fueron 32.08 ± 1.44 y 31.96 ± 1.39 mg/gMS respectivamente como se observan en la Tabla 7.

En la investigación que realizaron Lv *et al.* (2017) determinaron que el aumento de la biomasa se ve afectado por la velocidad de agitación en la mezcla y la transferencia de oxígeno que se da en el medio, los investigadores analizaron distintas velocidades de agitación como 60, 120, 180, 240 y 300 rpm en fermentación sumergida donde obtuvieron un mayor rendimiento en la producción de biomasa al aumentar la velocidad de agitación entre 60 a 180rpm pero a medida que aumentaban la agitación se comenzaba a inhibir la producción de biomasa. En la presente investigación, a una mayor velocidad de agitación la producción de biomasa aumentó, donde valores de 120 a 140rpm produjeron mayores contenidos de biomasa, a agitaciones inferiores a la investigación realizada por Ly y colaboradores.

El factor agitación no solo se utiliza para homogeneizar el cultivo, sino que como indican Babitskaya *et al.* (2005) tiene como propósito utilizar la homogeneización para generar un flujo de aire, aunque este proceso podría ocasionar la formación de espuma, siendo esto indeseable para la fermentación sumergida ya que puede afectar el tamaño de las hifas y el rendimiento del micelio. La espuma dificulta la extracción del micelio en la filtración. Los autores señalaron en su investigación que el crecimiento adecuado en la producción de micelio se logró a una aireación de 1-1.5L/L por minuto y una agitación de 100rpm teniendo una mejor producción de micelio, aunque en la presente investigación no se utilizó aireación adicional se obtuvo que a una mayor velocidad de 120 y 140rpm se produjo un mayor contenido de biomasa.

Yang *et al.* (2015) investigaron como afecta el oxígeno dentro de la fermentación sumergida, ellos indicaron que el volumen que se usa en el matraz afecta el suministro de oxígeno cuando el medio es agitado. En su investigación trabajaron con *Monascus ruber*, a una agitación de 200rpm durante 120h con diferentes contenidos de volúmenes (60, 80, 100 y 120mL) del medio en matraces de 250mL, donde encontraron que la concentración de pigmentos se inhibía a medida que aumentaba el volumen del medio, debido a que los niveles de oxígeno tendían a ser insuficientes.

En el caso del factor pH se tiene dos grupos homogéneos, siendo el mayor el nivel de pH 7 con un valor de 31.03 ± 1.77 mg/gMS de N-Acetilglucosamina y el de menor valores los

niveles de pH 5 y 6 que no mostraron diferencias significativas entre los resultados que fueron 31.48 ± 1.74 y 31.51 ± 1.64 mg/gMS de N-Acetilglucosamina respectivamente (Tabla 7).

Yang & He, (2008) indican que las diferentes especies de hongos crecen normalmente en un amplio rango de pH, siendo favorable para su adecuado desarrollo un rango de pH 5 a 7 en la gran mayoría de hongos, en esta investigación sobre la influencia nutricional de las condiciones en la fermentación sumergida del hongo *Shiraia bambusicola* encontraron que un valor óptimo de pH de 5 a 6.5 siendo sus valores de estudios de pH de 4 hasta 8. En la presente investigación valores cercanos con pH 5 y 6 no mostraron diferencias significativas para la mayor producción de N-Acetilglucosamina.

Ghosh & Ghosh (2017) indicaron que el aumento en el pH afecta de forma negativa la producción de biomasa y a la proteína soluble. Las enzimas que produce el hongo tienen grupos ionizables y estructuras que son afectadas por el pH de medio de cultivo en la degradación del sustrato, los investigadores indicaron que a un pH 5 se obtiene la mayor producción de biomasa de *Aspergillus flavus*. Los resultados de sus investigaciones concuerdan con el pH de la presente investigación, siendo la producción de biomasa de N-Acetilglucosamina que está en el rango de pH 5 y 6, los cuales no mostraron diferencias significativas para la mayor producción, pero si se vio afectada en una menor producción de biomasa a pH 7.

De igual manera Lv *et al.* (2017) determinaron que la producción de biomasa en la fermentación sumergida para *Monascus purpureus* aumentó a medida que el pH subió de 3 a 5, pero por encima del pH 5 la producción se inhibía, siendo un óptimo en la producción un pH 5, ellos indicaron que la producción de biomasa de *Monascus* aumenta debido a pH ácidos que a pH neutros, en el caso de la investigación se obtuvo una mayor producción de biomasa a pH 5 y 6 es decir pH ácidos, mientras que a un pH neutro la producción de biomasa analizada por N-Acetilglucosamina disminuyó.

Investigar los factores importantes en la fermentación sumergida determina la producción correcta en la formación de micelio, grupos o pellets. Por ejemplo, el cambio de pH 4 a 5 en algunos microorganismos forman gránulos uniformes, a un pH 6 se comienzan a volver filamentosos, mientras a pH 8 a 9 se vuelve filamentosos, siendo la morfología del hongo la que desempeña un papel crítico en los requerimientos en la producción de biomasa (Ma *et al.*, 2016).

Fang & Zhong, (2002) observaron el comportamiento en la forma de los gránulos en la fermentación sumergida con variaciones de pH en el medio, indicaron que el tamaño de los gránulos fue similar en los distintos pH, a diferencia de otros autores que trabajaron con el mismo hongo *Ganoderma*, a un pH 6 se inhibía el crecimiento de los gránulos mientras que a pH 6.5 se maximizaba el crecimiento celular.

En el caso de *Monascus* el pH del medio no solo afecta la producción de biomasa, sino también la morfología del crecimiento del hongo que se ve afectado por el cambio de pH. En la investigación desarrollada por Lv, *et al.* (2017) donde señalan que a pH ácidos de 3 a 5, se forman gránulos pequeños que se encuentran dispersos en el medio, a diferencia de pH neutro o básico de 6 a 8 donde se formaron gránulos de mayor tamaño, además la producción de pigmentos amarillos aumentó significativamente.

Los factores utilizados en la producción de biomasa tuvieron importancia dentro de su producción medida indirectamente con la N-Acetilglucosamina, siendo los niveles a una concentración de cloruro de sodio de 0.01M, agitación 120rpm y pH 6 los que mayor producción.

4. 2. 2. Producción de pigmentos de *Monascus purpureus*

Siguiendo los tratamientos de la Tabla 5, se hizo un análisis tomando en cuenta los factores (rpm)x(pH)x(NaCl) para cada uno de los niveles analizados, donde se tienen las medias analizadas para diferentes tratamientos obtenidos en la producción de los pigmentos amarillos para 400nm (Tabla 9) se tiene que no hubo diferencias significativas para 10 tratamientos con mayor producción 0.794 ± 0.021 (NaCl:0.01M)x(pH5)x(100rpm), 0.789 ± 0.019 (NaCl:0M)x(pH6)x(100rpm), 0.784 ± 0.027 (NaCl:0M)x(pH5)x(100rpm), 0.779 ± 0.029 (NaCl:0.01M)x(pH6)x(100rpm), 0.778 ± 0.019 (NaCl:0.01M)x(pH5)x(120rpm), 0.769 ± 0.019 (NaCl:0.05M)x(pH6)x(120rpm), 0.766 ± 0.044 (NaCl:0.05M)x(pH5)x(100rpm), 0.757 ± 0.014 (NaCl:0M)x(pH7)x(120rpm), 0.755 ± 0.018 (NaCl:0M)x(pH6)x(120rpm) y 0.725 ± 0.023 (NaCl:0.01M)x(pH6)x(120rpm), el análisis se realizó utilizando ANOVA con la prueba de Tukey HSD ($\alpha=0.5$) (Anexo 23, 24). En la Figura 15 se detalla la comparación de todos los tratamientos del análisis mencionado, desde el menor valor hasta los valores máximos.

En el análisis de los pigmentos anaranjados para 470nm (Tabla 10) se obtuvieron dos tratamientos de mayor valor que no mostraron diferencias significativas 0.848 ± 0.011 (NaCl:0M)x(pH5)x(100rpm) y 0.796 ± 0.006 (NaCl:0M)x(pH6)x(100rpm), el análisis se

realizó utilizando un ANOVA (Anexo 25) y en la comparación de los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey HSD ($\alpha=0.5$) (Anexo 26). De igual manera en la Figura 16 se tienen las comparaciones de los tratamientos desde el menor valor hasta el mayor.

En el análisis de pigmentos rojos para 500nm (Tabla 11) se obtuvieron 3 tratamientos que no mostraron diferencias significativas con el mayor valor de 0.884 ± 0.009 (NaCl:0M)x(pH5)x(100rpm), 0.834 ± 0.006 (NaCl:0.01M)x(pH5)x(100rpm), 0.812 ± 0.008 (NaCl:0.01M)x(pH6)x(100rpm), el análisis se realizó utilizando un ANOVA (Anexo 27) y en la comparación de los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey HSD ($\alpha=0.5$) (Anexo 27 y 28). En la Figura 17 se tiene una comparación de estos análisis mencionados donde se observan los valores más altos y bajos.

Tabla 9: Medias obtenidas a 400nm en diferentes concentraciones de cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH.

Agitación (rpm)	pH	NaCl (M)			
		0	0.01	0.05	0.1
100	5	0.784 ± 0.027^p	0.794 ± 0.021^p	0.766 ± 0.044^p	0.650 ± 0.047^{ijk}
	6	0.789 ± 0.019^p	0.779 ± 0.029^p	0.518 ± 0.027^{cde}	0.527 ± 0.033^{cde}
	7	0.583 ± 0.025^{fg}	0.597 ± 0.014^{gh}	0.578 ± 0.028^{fg}	0.446 ± 0.015^b
120	5	0.642 ± 0.018^{ij}	0.778 ± 0.019^p	0.680 ± 0.025^{jkmn}	$0.687 \pm 0.017^{kmn\bar{n}}$
	6	0.755 ± 0.018^{op}	$0.725 \pm 0.023^{\bar{n}o}$	0.769 ± 0.019^p	$0.695 \pm 0.029^{mn\bar{n}}$
	7	0.757 ± 0.014^{op}	0.635 ± 0.025^{hi}	$0.706 \pm 0.014^{n\bar{n}}$	0.658 ± 0.021^{ijkm}
140	5	0.450 ± 0.013^b	0.518 ± 0.026^{cde}	0.397 ± 0.028^a	0.416 ± 0.029^{ab}
	6	0.581 ± 0.017^{fg}	0.548 ± 0.017^{def}	0.505 ± 0.021^c	0.507 ± 0.025^c
	7	0.509 ± 0.028^{cd}	0.501 ± 0.027^{cd}	0.580 ± 0.023^{fg}	0.550 ± 0.012^{ef}

Medias obtenidas \pm Desviación estándar; Las letras representan los grupos homogéneos; $\alpha=0.05$

La respuesta en la producción de pigmentos por el factor cloruro de sodio (M) con sus niveles 0, 0.01, 0.05 y 0.1M se ve reflejado en la Tabla 7, donde los resultados de las absorbancias de 400nm correspondiente a los pigmentos amarillos, donde se tiene tres grupos homogéneos siendo el de menor valor 0.571 ± 0.10 a un nivel de 0.1M, un valor intermedio de $0.611 \pm$

0.12 para el nivel de 0.05M y los de mayor media con valores de 0.650 ± 0.12 y 0.653 ± 0.12 para los niveles 0 y 0.01M respectivamente no presentaron diferencias significativas.

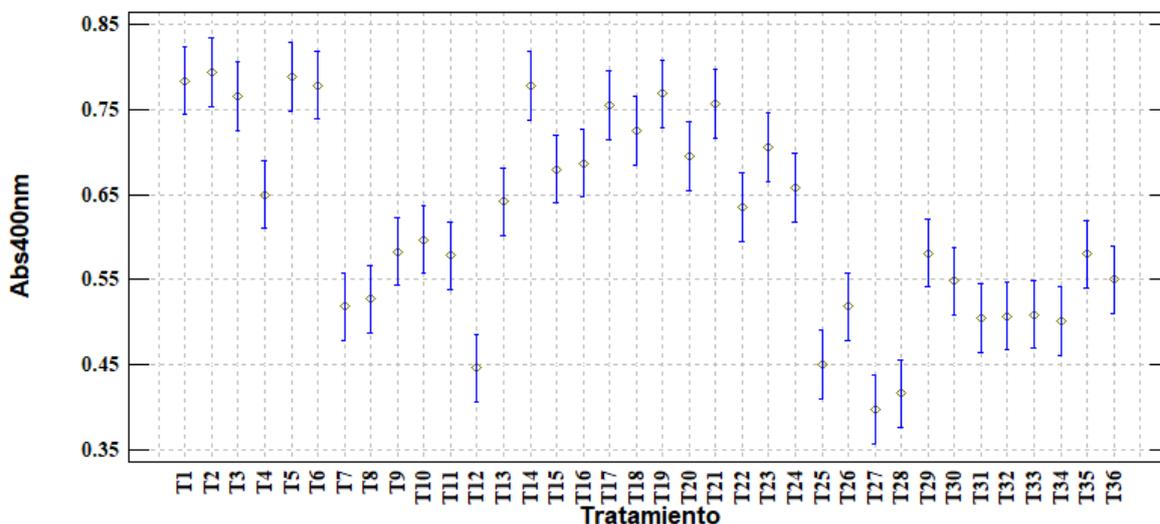


Figura 15. Comparación de las medias de 400nm en diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey HSD (95%)

En la absorbancia de 470nm correspondiente a los pigmentos naranja se observa que el factor cloruro de sodio (M) tiene diferencias significativas para cada uno de los niveles, siendo de menor a mayor valor 0.315 ± 0.08 , 0.388 ± 0.14 , 0.435 ± 0.18 y 0.456 ± 0.21 para los niveles 0.1, 0.05, 0.01 y 0M respectivamente.

En el grupo de 500nm correspondiente a los pigmentos rojos se observa que se forman tres grupos homogéneos, siendo el de menor valor 0.241 ± 0.07 a un nivel de 0.1M, un valor intermedio de 0.312 ± 0.13 para el nivel de 0.05M y los de mayor media con un valor de 0.397 ± 0.24 y 0.402 ± 0.25 para los niveles 0.01 y 0M respectivamente no presentaron diferencias significativas.

Dentro de las investigaciones de Dikshit & Tallapragada (2013) trabajaron con las cepas de *Monascus sanguineus* y *Monascus purpureus* en condiciones de estrés salino, ellos observaron que a concentraciones salinas altas de 3% la producción de pigmentos se ve afectada en un aumento para ambas cepas con respecto al tratamiento control el cual no contenía concentración de sales. A concentraciones superiores de 3% la producción de pigmentos comienza a inhibirse para ambas cepas siendo afectas hasta por las concentraciones superiores del 12% donde la producción de pigmento se inhibió por completo, ello posiblemente a que la concentración de electrolitos inhibe la producción de metabolitos.

Aunque las concentraciones de sal utilizadas en la presente investigación no fueron tan altas como las investigadas por Dikshit & Tallapragada (2013), se presentó semejanza para el factor de concentración de NaCl, de que a una mayor concentración de sales se ve afectada la producción de los pigmentos. La mayor producción de pigmentos se dio a concentraciones de sales menores frente a las de mayor concentración para los pigmentos amarillos (400nm), anaranjado (470nm) y rojos (500nm).

Tabla 10: Medias obtenidas a 470nm en diferentes concentraciones de cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH.

Agitación (rpm)	pH	NaCl (M)			
		0	0.01	0.05	0.1
100	5	0.848 ± 0.011 ^p	0.704 ± 0.016 ^{n̄}	0.594 ± 0.029 ⁿ	0.358 ± 0.043 ^{efghijk}
	6	0.796 ± 0.006 ^{op}	0.762 ± 0.009 ^{n̄o}	0.307 ± 0.029 ^{cdefg}	0.305 ± 0.045 ^{cde}
	7	0.390 ± 0.014 ^{ijkl}	0.340 ± 0.031 ^{efghij}	0.336 ± 0.019 ^{efghij}	0.239 ± 0.034 ^{bc}
120	5	0.342 ± 0.038 ^{efghij}	0.470 ± 0.011 ^m	0.409 ± 0.034 ^{ijklm}	0.382 ± 0.027 ^{ghijkl}
	6	0.469 ± 0.015 ^m	0.381 ± 0.009 ^{fghijkl}	0.555 ± 0.029 ⁿ	0.408 ± 0.019 ^{ijklm}
	7	0.430 ± 0.018 ^{klm}	0.315 ± 0.019 ^{defghi}	0.434 ± 0.012 ^m	0.349 ± 0.018 ^{efghij}
140	5	0.210 ± 0.021 ^{ab}	0.309 ± 0.021 ^{cdefg}	0.157 ± 0.014 ^a	0.157 ± 0.021 ^a
	6	0.312 ± 0.011 ^{cdefgh}	0.408 ± 0.024 ^{ijklm}	0.222 ± 0.016 ^{ab}	0.248 ± 0.017 ^{bcd}
	7	0.306 ± 0.019 ^{cdef}	0.229 ± 0.019 ^{ab}	0.477 ± 0.019 ^m	0.387 ± 0.018 ^{hijkl}

Medias obtenidas ± Desviación estándar; Las letras representan los grupos homogéneos; α=0.05

De igual manera, los investigadores Babitha *et al.* (2007), investigaron los pigmentos de *Monascus* en diferentes concentraciones de sal 6, 8, 10, 12% (p/p) pero en fermentación sólida, ellos observaron que a diferencia de lo mencionado en el párrafo anterior los autores indicaron que las concentraciones de sales más altas aumentaban la producción de pigmentos rojos considerablemente debiéndose a que la producción de pigmentos podría influenciar en un papel osmoprotector para el hongo.

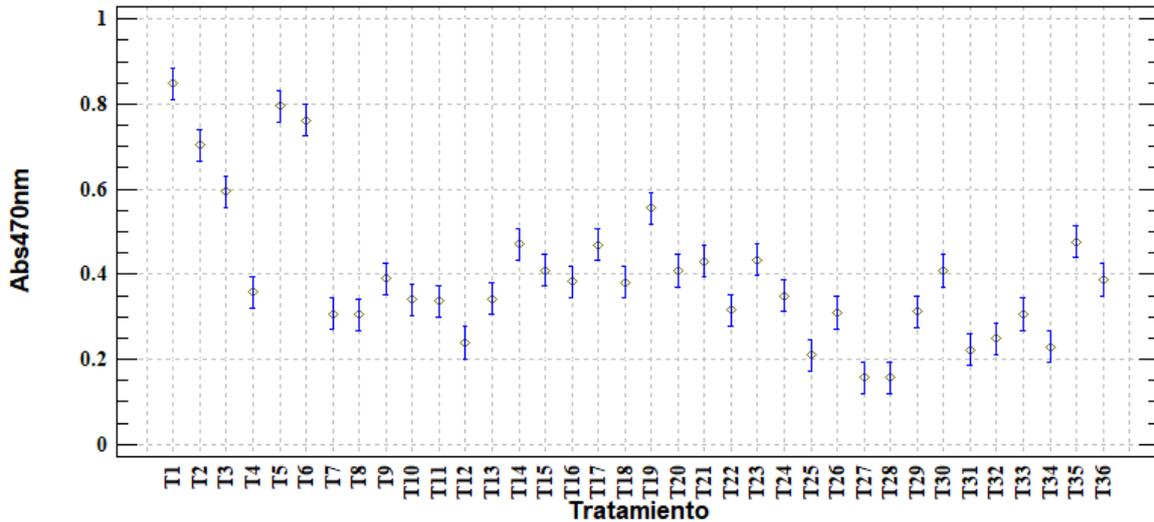


Figura 16. Comparación de las medias de 470nm en diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey HSD (95%).

En las investigaciones realizadas por Venkatachalam *et al.* (2019) analizaron diferentes niveles de salinidad teniendo como tratamientos 0, 3.65, 6 y 9 % (p/v), dentro de sus investigaciones encontraron que la mejor producción de pigmentos se dio a menores concentración de sales teniendo un rendimiento apropiado a concentraciones menores del 6%, siendo considerable destacar que el hongo de la investigación es *Talaromyces albobiverticillius* de origen marino. Los investigadores compararon la mayor producción de los pigmentos con su tratamiento de 0% con los producidos por la fermentación del arroz rojo de *Monascus* indicando su equivalencia. En la presente investigación el porcentaje alto de sal en los tratamientos disminuye la formación de pigmentos.

En la presente investigación también se pudo observar que las concentraciones de sales altas tienden a disminuir los pigmentos formados.

El factor de agitación (rpm) con sus niveles 100, 120 y 140rpm se ve reflejado en la Tabla 7, donde en los resultados de las absorbancias de 400nm correspondiente a los pigmentos amarillos se observa que el factor agitación tiene diferencias significativas para cada uno de los niveles, siendo de menor a mayor valor 0.505 ± 0.06 , 0.651 ± 0.12 y 0.707 ± 0.05 para los niveles 140, 100 y 120rpm respectivamente.

En el grupo de las absorbancias de 470nm correspondiente a los pigmentos anaranjados, se observa que el factor agitación tiene diferencias significativas para cada uno de los niveles, siendo de menor a mayor valor 0.285 ± 0.10 , 0.412 ± 0.07 y 0.498 ± 0.22 para los niveles 140, 120 y 100rpm respectivamente.

En el grupo de las absorbancias de 500nm correspondiente a los pigmentos rojos se observa que el factor agitación tiene diferencias significativas para cada uno de los niveles, obteniéndose de menor a mayor valor 0.214 ± 0.08 , 0.321 ± 0.06 y 0.479 ± 0.26 para los niveles 140, 120 y 100rpm respectivamente.

Tabla 11: Medias obtenidas a 500nm en diferentes concentraciones de cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH.

Agitación (rpm)	pH	NaCl (M)			
		0	0.01	0.05	0.1
100	5	0.884 ± 0.009^o	$0.834 \pm 0.006^{\tilde{n}o}$	0.534 ± 0.044^n	0.306 ± 0.033^{ghijkl}
	6	$0.785 \pm 0.011^{\tilde{n}}$	$0.812 \pm 0.008^{\tilde{n}o}$	$0.263 \pm 0.014^{efghijk}$	0.234 ± 0.036^{defgh}
	7	0.313 ± 0.033^{ijklm}	0.294 ± 0.041^{ghijkl}	0.304 ± 0.034^{ghijkl}	0.188 ± 0.045^{bcde}
120	5	0.267 ± 0.017^{fghijk}	0.385 ± 0.027^m	0.313 ± 0.031^{ijklm}	0.310 ± 0.019^{hijklm}
	6	0.362 ± 0.0111^m	0.283 ± 0.025^{fghijk}	0.470 ± 0.031^n	0.325 ± 0.024^{ijklm}
	7	0.309 ± 0.021^{hijklm}	$0.236 \pm 0.011^{cdefghi}$	0.335 ± 0.019^{klm}	$0.251 \pm 0.014^{defghij}$
140	5	0.162 ± 0.009^{abc}	0.206 ± 0.015^{bcde}	0.106 ± 0.019^a	0.105 ± 0.025^a
	6	0.312 ± 0.022^{ijklm}	0.294 ± 0.007^{ghijkl}	0.147 ± 0.018^{ab}	0.177 ± 0.019^{abcd}
	7	0.216 ± 0.021^{bcdef}	0.229 ± 0.011^{cdefg}	0.340 ± 0.017^{klm}	0.273 ± 0.021^{fghijk}

Medias obtenidas \pm Desviación estándar; Las letras representan los grupos homogéneos; $\alpha=0.05$

Las investigaciones realizadas por Lv *et al.* (2017) en la producción de pigmentos a distintas velocidades de agitación (60, 120, 180, 240 y 300 rpm) en fermentación sumergida para el hongo *Monascus purpureus* obtuvieron que la producción de pigmentos era mayor en la agitación de 180rpm, por encima o por debajo de esta agitación la producción de pigmentos disminuía. En la presente investigación se tiene que hubo una mayor producción de pigmentos a velocidades de agitación más bajas 120, 100 y 100rpm para los pigmentos 400, 470 y 500nm respectivamente. La diferencia presentada en la producción de pigmentos se debe a los días de fermentación.

Las investigaciones de Lv *et al.* (2017) en fermentación se dio por un periodo de 168h. A diferencia de la presente investigación donde el tiempo de incubación fue menor 144h. Los autores mencionados indican que la agitación continua transfiere oxígeno constante a la

fermentación de *Monascus* con ello puede aumentar la producción de pigmentos amarillos, la agitación aumenta la fuerza de cizallamiento en el medio generando que el hongo sufra daño en sus hifas.

La respuesta en la producción de pigmentos por el factor de pH a niveles 5, 6 y 7 se ve reflejado en la Tabla 7, donde los resultados de las absorbancias de 400nm correspondiente a los pigmentos amarillos, se observa que el factor pH tiene dos grupos homogéneos para los 3 niveles siendo el de menor valor 0.591 ± 0.09 para el nivel de pH 7 y los de mayor valor 0.630 ± 0.15 y 0.646 ± 0.12 para los niveles de pH 5 y 6.

En el grupo de las absorbancias de 470nm correspondiente a los pigmentos amarillos se observa que el factor pH tiene diferencias significativas para cada uno de los niveles, siendo de menor a mayor valor 0.353 ± 0.08 , 0.412 ± 0.21 y 0.431 ± 0.18 para los niveles de pH 7, 5 y 6 respectivamente.

En el grupo de las absorbancias de 500nm correspondiente a los pigmentos rojos se observa que el factor pH tiene dos grupos homogéneos para los 3 niveles, siendo el de menor valor 0.274 ± 0.05 para el nivel de pH 7 y los de mayor valor 0.368 ± 0.25 y $0.372 \pm 0.21b$ para los niveles de pH 5 y 6.

En las investigaciones realizadas por Silbir & Goksugur, (2019) en fermentación sumergida de *Monascus purpureus* trabajaron con diferentes pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5) para la producción de pigmentos rojos, ellos encontraron que la mayor producción se dio a un pH 6. Aunque se obtuvo valores ligeramente menores a los pH 6 y 7. A valores inferiores a pH 5.5 y superiores a pH 7.5 la producción de pigmento fue mucho menor.

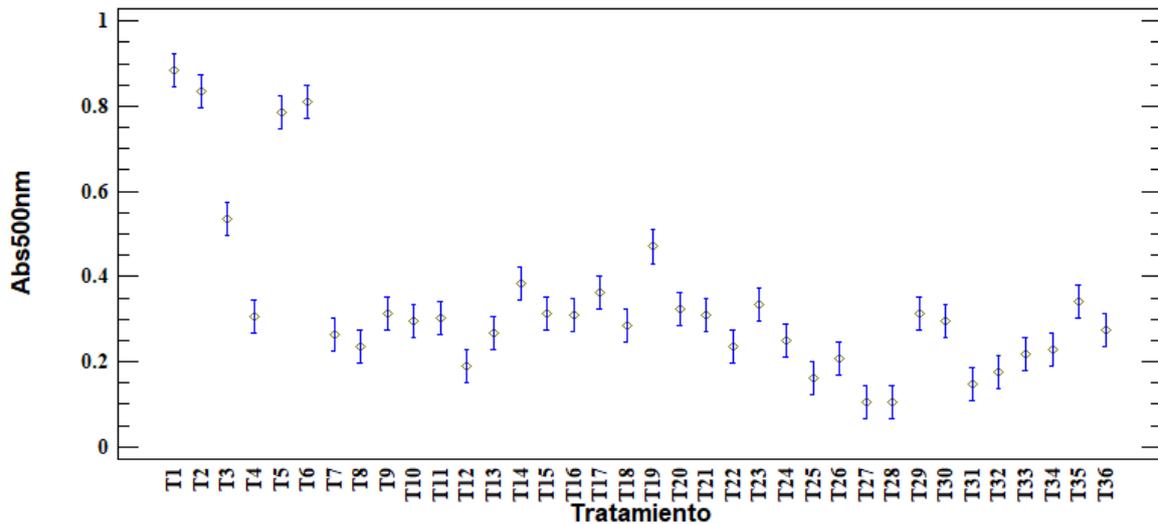


Figura 17. Comparación de las medias de 500nm en diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey HSD (95%)

La producción de pigmentos anaranjados y rojos fue mayor a pH 5 y 6 los cuales, no mostrando diferencias significativas, sin embargo, para los pigmentos amarillos el pH de 5 y 6 dio una mayor producción, en pH 7 para la producción de los tres pigmentos disminuyeron considerablemente de igual manera como señalan los autores mencionados en su investigación.

Los resultados obtenidos indicarían que la producción de *Monascus purpureus* está condicionada al factor pH. El pH dentro del medio utilizado en la fermentación sumergida es muy importante para la síntesis de diferentes compuestos, entre ellos los pigmentos, durante todo el tiempo de fermentación, como lo indican los investigadores Venkatachalam *et al.* (2019).

En las investigaciones realizadas por Lv *et al.* (2017) determinaron que los pigmentos de color amarillo de *Monascus purpureus* en la fermentación sumergida comenzó a aumentar a medida que el pH varió de 3 a 5, pero a valores superiores de pH 5 observaron que comenzaba a inhibirse la producción determinando como pH 5 el óptimo en la fermentación. La mayor producción de pigmentos amarillos en la presente investigación se dio a pH 5 y 6, por encima de ello la producción disminuye.

La producción de biomasa medida de forma indirecta por N-Acetilglucosamina resultó tener diferencias entre los factores de concentraciones de cloruro de sodio (M), agitación (rpm) y pH obteniendo una producción máxima de $34.231 \pm 0.076\text{mg/gMS}$ en los factores pH 6, 120rpm y NaCl 0.01M, además se obtuvo una producción de pigmentos de 0.725 ± 0.023 ,

0.381 ± 0.009 y 0.283 ± 0.025 para las longitudes de onda de 400, 470 y 500nm de los pigmentos amarillos, anaranjados y rojos respectivamente.

4. 3. Medición de la concentración de N-Acetilglucosamina y pigmentos del hongo durante un periodo de 168 horas.

En los objetivos anteriores se determinaron los parámetros de la mejor producción de N-Acetilglucosamina (biomasa), a un 4% de harina de quinua, pH 6 y NaCl 0.01M y una agitación de 120rpm, estos parámetros se usaron para fermentar el hongo por un periodo 0, 24, 48, 72, 96, 120, 148 y 168h a 30°C que fueron analizados mediante ANOVA (Anexo 29 y 30) para cada uno de los tratamientos en el tiempo de fermentación con un nivel de confianza de 95.0% y comparados con la prueba de Tukey HSD (Anexo 30).

Tabla 12: Producción de N-Acetilglucosamina y pigmentos durante el periodo de 168h.

Hora	N-Acetilglucosamina	400nm	470nm	500nm
24	4.087 ± 0.367 ^a	0.254 ± 0.013 ^a	0.185 ± 0.007 ^a	0.156 ± 0.010 ^a
48	15.332 ± 0.852 ^b	0.352 ± 0.010 ^b	0.282 ± 0.016 ^b	0.219 ± 0.012 ^b
72	26.133 ± 1.531 ^c	0.651 ± 0.020 ^c	0.370 ± 0.015 ^c	0.286 ± 0.007 ^c
96	32.365 ± 0.953 ^e	0.755 ± 0.026 ^d	0.466 ± 0.033 ^e	0.382 ± 0.026 ^{de}
120	32.847 ± 0.977 ^e	0.746 ± 0.012 ^d	0.448 ± 0.015 ^{de}	0.411 ± 0.015 ^e
144	33.188 ± 0.586 ^e	0.739 ± 0.045 ^d	0.411 ± 0.019 ^{cd}	0.343 ± 0.011 ^d
168	29.319 ± 1.258 ^d	0.620 ± 0.026 ^c	0.301 ± 0.015 ^b	0.291 ± 0.019 ^c

Medias obtenidas ± Desviación estándar; Las letras representan los grupos homogéneos; α=0.05

El hongo comenzó a crecer de forma exponencial a las 96h, llegando a una fase estacionaria de crecimiento entre las 96 y 144h no mostrando diferencias significativas. La producción máxima de N-Acetilglucosamina fue de 32.365 ± 0.953, 32.847 ± 0.977 y 33.188 ± 0.586mg/gMS para las 96, 120 y 144h respectivamente, no presentándose diferencias significativas, posterior a las 144h la biomasa comenzó a disminuir (Figura 18 y Tabla 12).

El aumento de la producción de pigmentos se da desde las 24 hasta las 96h, entre las 96 y 144h no se presentaron diferencias significativas, posterior a ese tiempo comenzó a disminuir la producción de biomasa.

La producción de pigmentos anaranjados aumentó desde las 24 hasta las 96h obteniendo una producción máxima a las 96h, luego de este tiempo comenzó a disminuir la producción. En el caso de la producción de pigmentos rojos aumentó desde las 24 hasta las 120h siendo el máximo rendimiento a las 120h luego de ello comenzó a disminuir.

Dentro de la fermentación el hongo se aclimata a su nuevo entorno generando un retraso en el crecimiento durante el primer periodo de la fermentación conocido como la fase Lag, posterior a esta fase la biomasa comienza a aumentar considerablemente (fase exponencial), la producción de biomasa se va deteniendo a medida que los nutrientes en el medio se van agotando, la biomasa alcanza un valor constante en la última parte de la fase de fermentación (fase estacionaria) debido al agotamiento de nutrientes y por la competencia de las colonias formadas se da la fase de muerte celular (Mazumder *et al.*, 2009).

Yang *et al.* (2015) trabajaron con *Monascus* en fermentación sumergida donde evaluaron el crecimiento del hongo en un medio que contenía harina de arroz, glucosa y peptona, ellos observaron que la máxima producción de biomasa se dio a las 108h y la producción de pigmentos comenzó desde las 48 hasta las 96h siendo su máxima producción a las 120h. Los resultados obtenidos por los autores anteriores son similares en el presente estudio donde la producción de N-Acetilglucosamina (biomasa) entre las 96 a 144h.

Los pigmentos también mostraron la máxima producción a las 120h como indicaron los autores del anterior párrafo. La investigación realizada por Da Costa & Vendruscolo, (2017) con *Monascus ruber* utilizando lactosa como sustrato, indicaron que la producción de biomasa comienza a disminuir a las 120h y la mayor producción de pigmentos rojos a las 72h, mientras que cuando trabajaron con lactasa hidrolizada la producción de pigmentos se hizo máxima a las 120h y la biomasa a las 168h.

En las investigaciones de Babitha *et al.* (2007) utilizaron concentraciones de sales en la fermentación sumergida con *Monascus*, observando que las altas concentraciones de sal retrasaron la formación de la biomasa y la concentración de pigmentos con respecto al control, obteniendo una producción de biomasa recién a las 72h y la producción de pigmentos a las 120h, a diferencia del control donde el crecimiento se vio reflejado a las 24h y la producción de pigmentos a las 48h.

La concentración alta de sal generó un desequilibrio en el potencial osmótico generando un estrés salino en las células del hongo. En la presente investigación se trabajó con una concentración de sal muy baja 0.01M el cual no afectó el desarrollo exponencial del hongo,

mostrándose en producción de biomasa y pigmentos siendo la menor contracción de sales que uso Babitha y colaboradores de 6%.

En investigaciones de Yang & He. (2008) trabajaron con *Shiraia bambusicola* en fermentación sumergida utilizando como sustrato la maltosa y el extracto de levadura, en sus resultados obtenidos encontraron que la producción de biomasa ocurre después de las 36 hasta las 72h obteniendo un valor máximo a las 84h. Dentro de la investigación presente comenzó la producción de biomasa a partir de las 24h siendo más rápido que la investigación mencionada y la producción de biomasa siguió hasta las 96, 120 y 144h que no presentaron diferencias significativas.

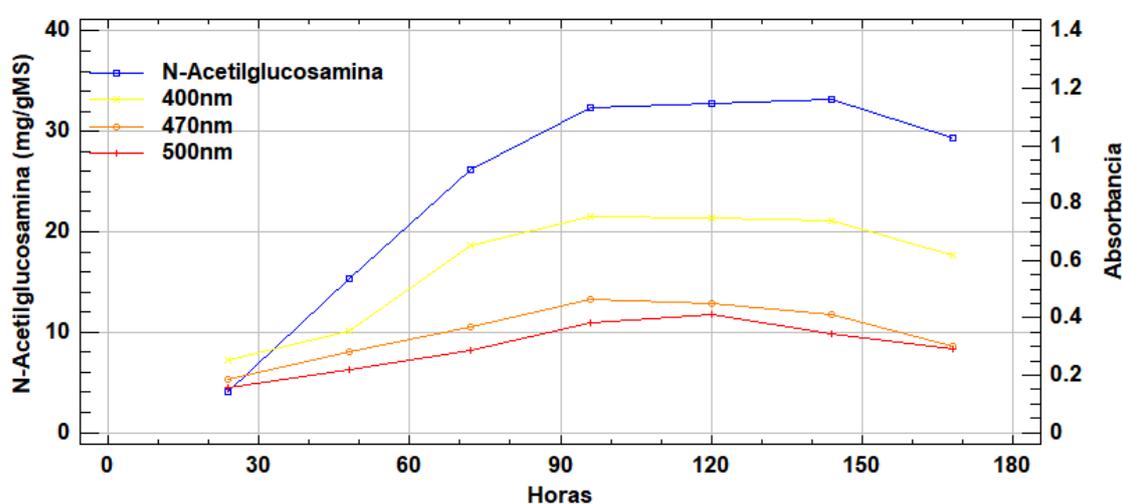


Figura 18. Curva de producción de N-Acetilglucosamina y pigmentos durante el periodo de 168h.

Según Kim *et al.* (2011), determinaron en su investigación que la producción de micelio de *Agaricus bisporus* se da por al menos 48h, pero sugieren que de preferencia sea de 72h para poder obtener una cantidad mayor de biomasa, aunque su investigación de producción de biomasa fue por un periodo de 10 días determinaron que no obtuvieron diferencias en el aumento de la biomasa, teniendo en cuenta que una mayor cantidad de días significaría un aumento en los costos de fermentación.

Venkatachalam *et al.* (2019) indicaron como la concentración de sal afecta a los rendimientos de los pigmentos y biomasa formada de *Talaromyces albobiverticillius*, donde la producción de pigmentos comenzó desde las 48h hasta las 168h en el tratamiento con 0% de sal y a una concentración de 3.65% tubo un retraso hasta las 120h, la biomasa aumentó a medida que el porcentaje de sal era mayor. Como se mencionó anteriormente, el hongo investigado está adaptado a condiciones salinas, es por ello que tienen una resistencia a

concentraciones de sales alta, sin embargo, un aumento de sal puede ayudar a la producción de biomasa.

En la tercera etapa de la investigación se determinó que el crecimiento de biomasa fúngica medida indirectamente por la N-Acetilglucosamina durante la fermentación sumergida por un periodo de 168h, obtuvo la mayor producción de biomasa, sin presentar diferencias significativas durante las 96, 120 y 144h de fermentación y una mayor producción de pigmentos a las 120h. Determinando una producción de 32.847 ± 0.977 mg/gMS de N-Acetilglucosamina y 0.746 ± 0.012 , 0.448 ± 0.015 y 0.411 ± 0.015 para los pigmentos amarillos, anaranjados y rojos respectivamente.

4. 4. Prueba del inóculo en fermentación sólida.

En la presente investigación se determinaron los parámetros para la producción indirecta de biomasa de *Monascus purpureus* usando harina de quinua como única fuente de sustrato en la fermentación sumergida, donde los parámetros adecuados de la investigación fueron de 4g de harina de quinua en 100mL de una solución de cloruro de sodio al 0.01M ajustado a un pH 6 e incubado a agitación constante de 120rpm por un periodo de 120h en total oscuridad.

La cantidad de inóculo formado se halló utilizando el método en el punto 3.3.9 de “conteo de UFC/mL del inóculo obtenido en la presente investigación” mostrándose en la Figura 19. Se pudo determinar una concentración de 5.8×10^4 UFC/mL, el inóculo se utilizó para el ensayo de la fermentación sólida con el procedimiento del acápite 3.3.8 “ensayo de inóculo en fermentación sólida” donde se obtuvo la invasión del hongo en los granos de quinua y la producción de pigmentación como se muestra en la Figura 20.

Según Silbir & Goksungur, (2019) indicaron que la producción de biomasa y pigmentos de *Monascus* es afectado por el inóculo, ellos trabajaron con un contenido de esporas de $0,5 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ y $2,0 \times 10^6$ esporas/50mL de medio de fermentación que sería 1, 2, 3 y 4% respectivamente. La mayor producción de pigmentos en su investigación fue a una concentración de 2% (v/v) y 3%, sus resultados también indicaron que una baja concentración de inóculo reduce la producción de biomasa y con una mayor cantidad del inóculo la biomasa del producto aumente.

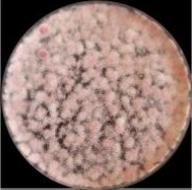
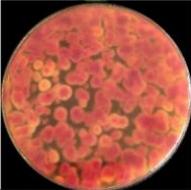
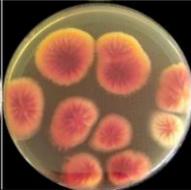
Dilución	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Anverso de la placa					
Reverso de la placa					
UFC/mL	>300	>300	>300	5.8×10^4	<30

Figura 19. Determinación de las UFC/mL del inóculo obtenido en la investigación

Por otro lado, Mazumder *et al.* (2009), en su investigación con *Pleurotus ostreatus* usando fermentación sumergida, demostraron que adicionar el inóculo por encima de los valores críticos causa un agotamiento de nutrientes rápido y con ello una muerte más temprana del hongo, el cual disminuye significativamente la producción de cualquier metabolito de interés



Figura 20. Producción de *Monascus purpureus* en fermentación sumergida utilizando el inóculo de la investigación.

Ma *et al.* (2016) indicaron que el uso de inóculo líquido se podría considerar como rápido y confiable ya que garantiza una distribución equitativa del inóculo usado. En su investigación utilizaron la fermentación sumergida y “semillas” en fermentación sólida, ambos como inóculo en la producción de fermentación sólida para *S. latifolia*, determinando que la fermentación sumergida aumenta el micelio producido significativamente cuando se comparó con el fermentado en sólido usando el inóculo, además el inóculo líquido también promueve un mejor desarrollo al que utilizaron en la fermentación sólida con el hongo.

V. CONCLUSIONES

- La mayor producción de biomasa en la fermentación sumergida con harina de quinua se dio con 4g/100mL obteniendo 40.17 ± 0.277 mg de N-Acetilglucosamina/g de muestra seca.
- La mayor producción de biomasa se obtuvo a una concentración de 0.01M de cloruro de sodio, a una agitación constante de 120rpm y a pH 6, obteniendo una producción de 34.231 ± 0.076 mg/g de N-Acetilglucosamina en muestra seca.
- La producción de pigmentos usando 0.01M de cloruro de sodio, a una agitación constante de 120rpm y a pH 6 fue de 0.725 ± 0.023 , 0.381 ± 0.009 y 0.283 ± 0.025 para las absorbancias de los pigmentos amarillos, anaranjados y rojos respectivamente.
- La mayor producción de biomasa en fermentación se dio a las 120h de incubación con la producción de 33.188 ± 0.586 mg/gMS de N-Acetilglucosamina y una producción de 0.746 ± 0.012 , 0.448 ± 0.015 y 0.411 ± 0.015 para las absorbancias de los pigmentos amarillos, anaranjados y rojos respectivamente.
- La producción de un inóculo de *Monascus purpureus* mediante fermentación sumergida es viable a las condiciones de fermentación mencionadas, siendo probado el inóculo en fermentación sólida con granos de quinua produciendo una correcta propagación del hongo en la producción de biomasa y pigmentos.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos a una escala de 1 y 2L con los parámetros del mejor rendimiento de biomasa analizando su producción en el medio.
- Evaluar diferentes ensayos en concentración de inóculo producidos con los parámetros de la presente investigación, determinando biomasa y concentración de pigmentos en fermentación sólida.
- Caracterizar fisicoquímicamente las muestras obtenidas después de la fermentación sumergida.
- Analizar otras variables respuestas en la fermentación sumergida como la producción de enzimas, azúcares totales, agotamiento de nutrientes, respiración celular, etc.
- Estimar la producción Monacolina-K y Citrinina durante los días en la fermentación sumergida.
- Analizar los pigmentos producidos por *Monascus purpureus* durante la fermentación sumergida mediante equipos cromatográficos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Raheem, H. E., Alrumman, S. A., Gadow, S. I., El-Sayed, M. H., Hikal, D. M., Hesham, A. E. L., & Ali, M. (2022). Optimization of *Monascus purpureus* for Natural Food Pigments Production on Potato Wastes and Their Application in Ice Lolly. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1462.
- Abdollahi, F., Jahadi, M., & Ghavami, M. (2021). Thermal stability of natural pigments produced by *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Food Science & Nutrition*, 9(9), 4855-4862.
- Abdullah, N., Ismail, R., Johari, N. M. K., & Annuar, M. S. M. (2013). Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. *Scientia Horticulturae*, 161, 65-69.
- Ayala Pastaz, K. B. (2017). Desarrollo de un proceso a escala de laboratorio para el aislamiento, conservación y producción de cepas nativas de *Monascus* spp. a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana (Master's thesis).
- Babitha, S., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2007). Effect of stress on growth, pigment production and morphology of *Monascus* sp. in solid cultures. *Journal of Basic Microbiology*, 47(2), 118-126.
- Babitskaya, V. G., Shcherba, V. V., Puchkova, T. A., & Smirnov, D. A. (2005). Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*: factors affecting their production. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 169-173.
- Campos Morales, C. S. (2018). Accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) ecotipo altiplano en condiciones de costa central. UNALM.
- Campoy, S., Rumero, A., Martín, J. F., & Liras, P. (2006). Characterization of an hyperpigmenting mutant of *Monascus purpureus* IB1: identification of two novel pigment chemical structures. *Applied microbiology and biotechnology*, 70(4), 488-496.

- Cancino-Espinoza, EE, Vázquez-Rowe, I, Quispe, I. (2018). Organic quinoa (*Chenopodium quinoa* L.) production in Peru: Environmental hotspots and food safety considerations using Life Cycle Assessment. *Science of The Total Environment*, 637(1): 221-232.
- 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, G., Yang, S., Wang, C., Shi, K., Zhao, X., & Wu, Z. (2020). Investigation of the mycelial morphology of *Monascus* and the expression of pigment biosynthetic genes in high-salt-stress fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 2469-2479.
- Chen, W., He, Y., Zhou, Y., Shao, Y., Feng, Y., Li, M., & Chen, F. (2015). Edible filamentous fungi from the species *Monascus*: early traditional fermentations, modern molecular biology, and future genomics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 555-567.
- 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
- 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.
- Davoudi-moghadam, H., Shahidi, F., Tabatabai, F., Sarabi, J. M., & Eshaghi, Z. (2019). Biological detoxification of *Monascus purpureus* pigments by thermally treated *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 99(9), 4439-4444.
- Dikshit, R., & Tallapragada, P. (2013). Comparative study of *Monascus sanguineus* and *Monascus purpureus* for red pigment production under stress condition. *International Food Research Journal*, 20(3), 1235.
- 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.

- Fadaei Dikshit, R., & Tallapragada, P. (2013). Comparative study of *Monascus sanguineus* and *Monascus purpureus* for red pigment production under stress condition. *International Food Research Journal*, 20(3), 1235.
- Fang, Q. H., & Zhong, J. J. (2002). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 37(7), 769-774.
- García V. (2004). Introduction to Microbiology. 2nd edition. Editorial State University at Distance (EUNED). Costa Rica.
- García, B., Latorre, J. A., Giménez, B. N., Martínez, B. M., Monteagudo, C., Olea, S.F., & Mariscal, A. M. (2015). Intake of cholesterol and fatty acids in Murcian athletes. *Andalusian Journal of Sports Medicine*, 8 (4): 181-182.
- Ghaly, A. E., Kamal, M., & Correia, L. R. (2005). Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Bioresource technology*, 96(10), 1143-1152.
- Ghosh, P., & Ghosh, U. (2017). Statistical optimization of laccase production by *Aspergillus flavus* PUF5 through submerged fermentation using agro-waste as cheap substrate. *Acta Biologica Szegediensis*, 61(1), 25-33
- Glorio, P., Repo, C. R. , & Velezmoro, C. (2003). Starch and dietary fiber in foods. Experience of Peru. Book CYTED Carbohydrates in regional Ibero-American foods, Chapter 25 16.1205. Pag. 607-630.
- Husakova, M., Plechata, M., Branska, B., & Patakova, P. (2021). Effect of a *Monascus* sp. Red Yeast Rice Extract on Germination of Bacterial Spores. *Frontiers in Microbiology*, 12, 686100.
- James, L. E. A. (2009). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Advances in food and nutrition research*, 58, 1-31.
- Jamialahmadi, K., Soltani, F., Nabavi fard, M., Behravan, J., & Mosaffa, F. (2014). Assessment of protective effects of glucosamine and N-acetyl glucosamine against DNA damage induced by hydrogen peroxide in human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 37(4), 427-432.
- Jarvis, D. E., Ho, Y. S., Lightfoot, D. J., Schmöckel, S. M., Li, B., Borm, T. J., ... & Tester,

- M. (2017). The genome of *Chenopodium quinoa*. *Nature*, 542(7641), 307-312.
- 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.
- Kaur, M., Goel, M., Mishra, R. C., Lahane, V., Yadav, A. K., & Barrow, C. J. (2023). Characterization of the Red Biochromes Produced by the Endophytic Fungus *Monascus purpureus* CPEF02 with Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Fermentation*, 9(4), 328.
- Kim, K., Choi, B., Lee, I., Lee, H., Kwon, S., Oh, K., & Kim, A. Y. (2011). Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(9), 1561-1568.
- Konopka, J. B. (2012). N-acetylglucosamine functions in cell signaling. *Scientifica*, 2012.
- Lavalle, R.Á. (2010). Determination of lovastatin by electrochemical impedance spectroscopy in fermentative rice products with the marine fungus *Monascus purpureus* (Doctoral dissertation, NATIONAL POLYTECHNICAL INSTITUTE)Lavalle, R. Á.
- Lee, C. L., & Pan, T. M. (2012). Development of *Monascus* fermentation technology for high hypolipidemic effect. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(6), 1449-1459.
- Li, L., Chen, S., Gao, M., Ding, B., Zhang, J., Zhou, Y., Liu, H., Yang, Q., Wu, F., & 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
- Li, T., Zhao, W., Wang, C., Shi, K., & Chen, G. (2023). Regulated synthesis and metabolism of *Monascus* pigments in a unique environment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(2), 46.
- Liao, W., Liu, Y., Frear, C., & Chen, S. (2007). A new approach of pellet formation of a filamentous fungus–*Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, 98(18), 3415-3423.

- Lima, A. G., Dantas, L. A., & Egea, M. B. (2023). Mannitol-Based Media and Static pH Are Efficient Conditions for Red Pigment Production from *Monascus purpureus* ATCC 36928 in Submerged Culture. *Processes*, 11(2), 633.
- Lv, J., Zhang, B. B., Liu, X. D., Zhang, C., Chen, L., Xu, G. R., & Cheung, P. C. K. (2017). Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: the relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(4), 452-458.
- Ma, J., Li, Y., Ye, Q., Li, J., Hua, Y., Ju, D., Zhang, D., Cooper, R., & Chang, M. (2000). Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(11), 5220-5225.
- Ma, L., Lin, Y. Q., Yang, C., Ying, Z. H., & Jiang, X. L. (2016). Production of liquid spawn of an edible mushroom, *Sparassis latifolia* by submerged fermentation and mycelial growth on pine wood sawdust. *Scientia horticulturae*, 209, 22-30.
- Manan, M. A., Mohamad, R., & Ariff, A. (2017). The morphology and structure of red pigment producing fungus: *Monascus purpureus*. *J Microbiol Exp*, 5(1), 00138.
- Mazumder, S., Basu, S. K., & Mukherjee, M. (2009). Laccase production in solid-state and submerged fermentation by *Pleurotus ostreatus*. *Engineering in life sciences*, 9(1), 45-52.
- Medina, W., Skurtys, O., & Aguilera, J. M. (2010). Study on image analysis application for identification Quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd) geographical provenance. *LWT-Food Science and Technology*, 43(2), 238-246.
- Mosyakin, S. L., and Schwartz, V. V. (2015). Quinoa as a promising pseudocereal crop for Ukraine. *Agricultural science and practice*, (1), 3-11.
- Nowak, V., Du, J., & Charrondière, U. R. (2016). Assessment of the nutritional composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food chemistry*, 193, 47-54.
- Pan, T. M., & Hsu, W. H. (2014). *Monascus*-fermented products. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 815-825). *Elsevier Inc.*
- Patakova, P. (2013). *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(2), 169-181.
- Pellegrini, M., Lucas, G. R., Ricci, A., Fontecha, J., Fernández, L. J., Pérez, J. A., Viuda,

- M. M. (2018). Chemical, fatty acid, polyphenolic profile, techno-functional and antioxidant properties of flours obtained from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds. *Industrial Crops and Products*, 111(1): 38-46.
- Pereira, E., Encina, Z. C., Barros, L., Gonzales, B. U., Cadavez, V., & Ferreira, I. C. (2019). Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa) grains: A good alternative to nutritious food. *Food chemistry*, 280(1): 110-114.
- 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).
- Pineda, J. A., Duarte, A., Ayala, K. B., Soto, C. P., Pineda, 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.
- Saithong, P., Chitisankul, W. T., & Nitipan, S. (2019). Comparative study of red yeast rice with high monacolin K, low citrinin concentration and pigments in white rice and brown rice. *Czech Journal of Food Sciences*, 37 (1): 75-80.
- Scotti, C. T., Vergoignan, C., Feron, G., & Durand, A. (2001). Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 7(1), 1-5.
- Shi, K., Song, D., Chen, G., Pistolozzi, M., Wu, Z., & Quan, L. (2015). Controlling composition and color characteristics of *Monascus* pigments by pH and nitrogen sources in submerged fermentation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120(2), 145-154.
- 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.
- Song, Y., Sun, E. T. Z., & Sun, S. C. (1997). Chinese technology in the seventeenth century. *Courier Corporation*.
- Subramaniam, R., & Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int J Sci Nat*, 3(3),

480-486.

- Thiem, D., Tyburski, J., Golebiewski, M., & Hryniewicz, K. (2020). Halotolerant fungi stimulate growth and mitigate salt stress in *Alnus glutinosa* Gaertn. *Dendrobiology*, 83.
- Tu, C. Y., Chen, Y. P., Yu, M. C., Hwang, E., Wu, D. Y., & Liaw, L. L. (2016). Characterization and expression of the antifungal protein from *Monascus pilosus* and its distribution among various *Monascus* species. *Journal of bioscience and bioengineering*, 122(1), 27-33.
- Velázquez Arellano, M. E. (2013). Producción de pigmentos fúngicos (*Monascus purpureus* 2955) en residuos agroindustriales por fermentación sólida (no. sb608. r5. v44 2013.). UAAAN.
- Velázquez, M. E., Benavente J. R., Morlett, J. A., Aguilar C. N. (2016). Producción de pigmentos por *Monascus* spp. en medio sólido empleando residuos agroindustriales. *Investigación y Ciencia*, 24(69).
- Venkatachalam, M., Gérard, L., Milhau, C., Vinale, F., Dufossé, L., & Fouillaud, M. (2019). Salinity and temperature influence growth and pigment production in the marine-derived fungal strain *Talaromyces albobiverticillius* 30548. *Microorganisms*, 7(1), 10.
- Vilcacundo, R., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Nutritional and biological value of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Current Opinion in Food Science*, 14, 1-6.
- Wang, C., Chen, D., & Qi, J. (2017). Biochemistry and molecular mechanisms of *Monascus* pigments. *Bio-pigmentation and Biotechnological Implementations*, 173-191.
- Wilson, A. L., Buckley, E., Buckley, J. D., & Bogomolova, S. (2016). Pushing healthier food and beverage options through salience and preparation. Evidence of a systematic review. *Quality and preference of foods*, 51(1): 47-64.
- World Obesity Federation. World Obesity Atlas 2023. Recuperado de <https://dataworldobesityorg/publications/?cat=19>.
- Wu, H. C., Chen, Y. F., Cheng, M. J., Wu, M. D., Chen, Y. L., & Chang, H. S. (2021). Investigations into Chemical Components from *Monascus purpureus* with Photoprotective and Anti-Melanogenic Activities. *Journal of Fungi*, 7(8), 619

- Yang, H., & He, G. (2008). Influence of nutritional conditions on exopolysaccharide production by submerged cultivation of the medicinal fungus *Shiraia bambusicola*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2903-2907.
- Yang, J., Chen, Q., Wang, W., Hu, J., & Hu, C. (2015). Effect of oxygen supply on *Monascus* pigments and citrinin production in submerged fermentation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(5), 564-569.
- Zeng, H., Jie, Q., Xin, Z., Dayong, X., Minghua, X., Feng, L., & Chuanyun, D. (2019). Optimization of submerged and solid state culture conditions for *Monascus* pigment production and characterization of its composition and antioxidant activity. *Pigment & Resin Technology*, 48 (2), 108-118.
- Zhang, X. W., Wang, J. H., Chen, M. H., & Wang, C. L. (2013). Effect of nitrogen sources on production and photostability of *Monascus* pigments in liquid fermentation. *IERI Procedia*, 5, 344-350.
- 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.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Información de las características principales de *Chenopodium quinoa* Willdenow, utilizada en la investigación



**QUINUA ORGANICA
EN GRANO**



Nombre Científico: *Chenopodium quinoa* Willdenow
Sinónimos:
Quechua: kiuna, quinua, parca
Aymara: supha, jopa, jupha, juiira, aara, ccallapi
Español: quinua, quinoa, quinqu, kinoa, trigrillo, trigo inca, arrozillo,
Portugués: arroz miúdo do Perú, espinafre do Perú, quinoa
Inglés: quinoa, kinoa
Francés: ansérine quinoa, riz de Pérou
Italiano: quinua, chinua
Aleman: Reisspinat, peruanischer

DESCRIPCION

Grano andino de gran valor nutricional y de gran potencial exportador que se desarrolla principalmente en las zonas alto andinas del sur del país, considerado como uno de los granos andinos más ricos en proteína, obtenida por un proceso de corte, trillado, pulido y clasificado; contiene aminoácidos como la leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. La concentración de la lisina en la proteína de la quinua es casi el doble en relación a otros cereales y gramíneas. No contiene colesterol.

VARIEDADES:

Quinoa Blanca: Blanca de Juli, Kankolla, Salcedo INIA, Quinoa Roja: Pasankalla y Quinoa Negra: Ccoito.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL

Composición en 100 gr. de Producto

COMPONENTES	BLANCA	ROJA	NEGRA
Energía (Kcal.)	370	380	409
Agua	10.1	10.1	10.1
Proteínas	14.4	15.5	16.4
Grasa	5.2	7.4	7.8
Carbohidratos	67.8	62.5	68.4
Fibra	6.5	3.2	2.9
Cenizas	3.5	2.7	2.7
Minerales (mg)			
Calcio (Ca)	120	125	122
Fósforo (P)	220	210	200
Hierro (Fe)	5.0	5.6	6.2
Vitaminas (mg)			
Retinol / Vitamina A	-	-	-
Tiamina / Vitamina B1	0.13	0.15	0.13
Riboflavina/Vitamina B2	0.38	0.35	0.38
Niacina/Vitamina B3	1.1	1.3	1.3
Vitamina C	-	-	-

ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS

MRL'S	UNIDA	BLANCA	ROJA	NEGRA
Aerobios	u/K. /g.	< 1'000,000		
Coliformes	NMP /g.	< 10		
E-coli	NMP /g.	< 10		
Salmonella	m 25 /g.	Negativo		
Levaduras	u/K. /g.	< 10,000		
Mohos	u/K. /g.	< 10,000		

ESPECIFICACIONES FÍSICAS Y ORGANOLEPTICAS

Características Físicas			
PROPIEDAD	BLANCA	ROJA	NEGRA
Variedad	Bianca Jumin Kankolla Sajama	Pasankalla	Ccoicco Yana
Apariencia	Grano de forma lenticular		
Color de	Crema	Rojo	Negro
Sabor	Dulce o	Amargo	Amargo
Olor	Característico del Producto		
Humedad	12.0 % Max		
Saponina	Ausencia	Ausencia	Ausencia

USOS

Se utiliza esencialmente como alimento para consumo humano en sopas, cremas, guisos, torrijas, postres, panadería y bebidas. Existen diferentes formas de consumo de este producto como grano, hojuela, harina y en algunos productos derivados, como en pastas, cereales preparados, barras energéticas, etc. Por su valor nutricional es ideal en la dieta de los bebés, estudiantes, deportistas, personas convalecientes y de la tercera edad.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Ambiente cerrado y ventilado
Temperatura: 18 °C -20 °C
Humedad: 40 %-50%
Flujo de aire: 15 m/s

PRESENTACION

Bolsas de polipropileno de 0.5 a10 kg.
Bolsas de papel triple pliego 25 kg.
Bolsa de papel triple pliego 25 lb.
Envases de 50 kg

PRODUCIDO EN ENVASADO POR

Empromun SCRL - Juliaca

AGENTES CERTIFICADORES

Certificación orgánica; producción, procesamiento y comercialización por Biolatina



"La empresa no es responsable de las mezclas finales que contengan Productos no orgánicos"

EMPRESA DE PRODUCCIÓN ORGANICA Y SERVICIOS MULTIPLES SCRL

Urb. Los Geranios Mz A3 Lt 10 - San Juliaca, San Román, Puno, Perú

Cel. 951064561 | empromun-marcelino@hotmail.com

Anexo 2: Protocolo de activación de *Monascus purpureus*.



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

Continuación...



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



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.



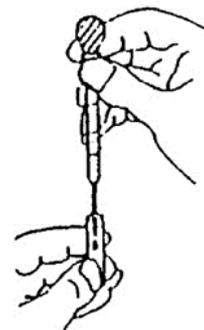
3. Retirada de los fragmentos de vidrio

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.

Ed_12_20220214

Anexo 3: ANOVA para N-Acetilglucosamina por Quinoa (g/100mL)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	201.56	3	67.1868	808.64	0.0000
Intra grupos	0.66469	8	0.0830863		
Total (Corr.)	202.225	11			

Anexo 4: Análisis de Rango múltiple de N-Acetilglucosamina en Quinoa (g/100mL)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2	3	21.2184	a
8	3	30.2419	b
6	3	30.5469	bc
4	3	31.1669	c

Anexo 5: Análisis de Varianza para N-Acetilglucosamina (mg/gMS).

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:NaCl (M)	164.28	3	54.7601	928.97	0.0000
B:pH	5.11936	2	2.55968	43.42	0.0000
C:rpm	100.818	2	50.4088	855.15	0.0000
INTERACCIONES					
AB	7.44554	6	1.24092	21.05	0.0000
AC	1.12085	6	0.186808	3.17	0.0081
BC	19.5292	4	4.88229	82.82	0.0000
ABC	12.0392	12	1.00327	17.02	0.0000
RESIDUOS	4.24419	72	0.0589471		
TOTAL (CORREGIDO)	314.596	107			

Anexo 6: Análisis de Rango múltiple de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) por NaCl (M)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

NaCl (M)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0.1	27	29.7666	0.046725	a
0.05	27	30.5383	0.046725	b
0	27	32.2596	0.046725	c
0.01	27	32.7961	0.046725	d

Anexo 7: Análisis de Rango múltiple de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) por pH

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

pH	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
7	36	31.0329	0.0404651	a
5	36	31.4769	0.0404651	b
6	36	31.5107	0.0404651	b

Anexo 8: Análisis de Rango múltiple de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) por rpm

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

rpm	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
100	36	29.9755	0.0404651	a
140	36	31.964	0.0404651	b
120	36	32.081	0.0404651	b

Anexo 9: Análisis de Varianza para Abs400nm.

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:NaCl (M)	0.121074	3	0.040358	67.36	0.0000
B:pH	0.0491287	2	0.0245643	41.00	0.0000
C:rpm	0.78305	2	0.391525	653.51	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.082134	6	0.013689	22.85	0.0000
AC	0.0996785	6	0.0166131	27.73	0.0000
BC	0.264866	4	0.0662165	110.52	0.0000
ABC	0.102929	12	0.00857746	14.32	0.0000
RESIDUOS	0.043136	72	0.000599111		
TOTAL (CORREGIDO)	1.546	107			

Anexo 10: Pruebas de Múltiple Rangos para Abs400nm por NaCl (M)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

NaCl (M)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0.1	27	0.570667	0.00471055	a
0.05	27	0.611	0.00471055	b
0	27	0.65	0.00471055	c
0.01	27	0.652778	0.00471055	c

Anexo 11: Análisis de Rango múltiple de Abs400nm por pH

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

pH	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
7	36	0.591667	0.00407946	a
5	36	0.630167	0.00407946	b
6	36	0.6415	0.00407946	b

Anexo 12: Análisis de Rango múltiple de Abs400nm por rpm

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

rpm	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
140	36	0.505167	0.00407946	a
100	36	0.650917	0.00407946	b
120	36	0.70725	0.00407946	c

Anexo 13: Análisis de Varianza para Abs470nm.**Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:NaCl (M)	0.31766	3	0.105887	200.61	0.0000
B:pH	0.119995	2	0.0599973	113.67	0.0000
C:rpm	0.826764	2	0.413382	783.18	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.269218	6	0.0448697	85.01	0.0000
AC	0.540784	6	0.0901307	170.76	0.0000
BC	0.609616	4	0.152404	288.74	0.0000
ABC	0.286654	12	0.0238878	45.26	0.0000
RESIDUOS	0.0380033	72	0.000527824		
TOTAL (CORREGIDO)	3.00869	107			

Anexo 14: Análisis de Rango múltiple de Abs470nm por NaCl (M)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

NaCl (M)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0.1	27	0.314778	0.00442143	a
0.05	27	0.387889	0.00442143	b
0.01	27	0.435296	0.00442143	c
0	27	0.455852	0.00442143	d

Anexo 15: Análisis de Rango múltiple de Abs470nm por pH

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

pH	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
7	36	0.352667	0.00382907	a
5	36	0.411639	0.00382907	b
6	36	0.431056	0.00382907	c

Anexo 16: Análisis de Rango múltiple de Abs470nm por rpm

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

rpm	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
140	36	0.285167	0.00382907	a
120	36	0.412	0.00382907	b
100	36	0.498194	0.00382907	c

Anexo 17: Análisis de Varianza para Abs500nm.

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:NaCl (M)	0.473338	3	0.157779	279.43	0.0000
B:pH	0.220823	2	0.110411	195.54	0.0000
C:rpm	1.28384	2	0.641921	1136.87	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.276272	6	0.0460454	81.55	0.0000
AC	0.746556	6	0.124426	220.36	0.0000
BC	0.740883	4	0.185221	328.03	0.0000
ABC	0.315015	12	0.0262512	46.49	0.0000
RESIDUOS	0.040654	72	0.000564639		
TOTAL (CORREGIDO)	4.09738	107			

Anexo 18: Análisis de Rango múltiple de Abs500nm por NaCl (M)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

NaCl (M)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0.1	27	0.241	0.00457302	a
0.05	27	0.312444	0.00457302	b
0.01	27	0.396963	0.00457302	c
0	27	0.401185	0.00457302	c

Anexo 19: Análisis de Rango múltiple de Abs500nm por pH

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

pH	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
7	36	0.274	0.00396036	a
5	36	0.367667	0.00396036	b
6	36	0.372028	0.00396036	b

Anexo 20: Análisis de Rango múltiple de Abs500nm por rpm

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

rpm	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
140	36	0.213917	0.00396036	a
120	36	0.3205	0.00396036	b
100	36	0.479278	0.00396036	c

Anexo 21: Tabla ANOVA para N-Acetilglucosamina (mg/gMS)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	310.352	35	8.8672	150.43	0.0000
Intra grupos	4.24419	72	0.0589471		
Total (Corr.)	314.596	107			

Anexo 22: Análisis de Rango múltiple de N-Acetilglucosamina (mg/gMS)

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T12	3	27.4327	a
T11	3	27.9104	a
T8	3	28.8616	b
T7	3	29.1071	bc
T4	3	29.1991	bc
T28	3	29.2605	bc
T16	3	29.8435	cd
T9	3	30.1863	de
T32	3	30.2424	de
T15	3	30.3191	de
T3	3	30.3958	def
T24	3	30.5492	defg
T27	3	30.5891	defgh
T5	3	30.7027	efghi
T10	3	30.8561	efghij
T20	3	31.1322	fghijk
T6	3	31.3164	ghijk
T36	3	31.3777	hijk
T23	3	31.4698	ijkl
T19	3	31.5311	jkl
T1	3	31.5618	jklm
T35	3	31.6232	jklm
T31	3	31.8994	klmn
T2	3	32.1755	lmnñ
T29	3	32.3289	mnño
T21	3	32.4824	nñoop
T33	3	32.5744	nñoop
T22	3	32.8057	ñoopq
T30	3	33.096	opqr
T34	3	33.1267	pqr
T13	3	33.2341	pqr
T25	3	33.587	qrs
T17	3	33.679	rs
T14	3	33.6944	rs
T26	3	33.8631	rs
T18	3	34.2314	s

Anexo 23: Tabla ANOVA para Abs400nm

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.50286	35	0.0429389	71.67	0.0000
Intra grupos	0.043136	72	0.000599111		
Total (Corr.)	1.546	107			

Anexo 24: Análisis de Rango múltiple de Abs400nm

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T27	3	0.397	a
T28	3	0.416	a
T12	3	0.446	ab
T25	3	0.45	abc
T34	3	0.501	bcd
T31	3	0.505	bcdf
T32	3	0.507	bcdf
T33	3	0.509	bcdf
T7	3	0.518	bcdfg
T26	3	0.518	bcdfg
T8	3	0.527	cdfg
T30	3	0.548	dfg
T36	3	0.55	dfg
T11	3	0.578	dfgh
T35	3	0.58	dfgh
T29	3	0.581	dfgh
T9	3	0.583	fgh
T10	3	0.597	gh
T22	3	0.635	hi
T13	3	0.642	hi
T4	3	0.65	hij
T24	3	0.658	hij
T15	3	0.68	ijk
T16	3	0.687	ijkl
T20	3	0.695	ijklm
T23	3	0.706	ijklmñ
T18	3	0.725	klmño
T17	3	0.755	klmño
T21	3	0.757	klmño
T3	3	0.766	lmño
T19	3	0.769	mño
T14	3	0.778	ño
T6	3	0.779	ño
T1	3	0.784	ño
T5	3	0.789	o
T2	3	0.794	o

Anexo 25: Tabla ANOVA para Abs470nm

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.97069	35	0.0848769	160.81	0.0000
Intra grupos	0.0380033	72	0.000527824		
Total (Corr.)	3.00869	107			

Anexo 26: Análisis de Rango múltiple de Abs470nm

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T28	3	0.157	a
T27	3	0.157	a
T25	3	0.21	ab
T31	3	0.222	ab
T34	3	0.229	ab
T12	3	0.239	bc
T32	3	0.248	bcd
T8	3	0.305	cde
T33	3	0.306	cdef
T7	3	0.307	cdefg
T26	3	0.309	cdefg
T29	3	0.312	cdefgh
T22	3	0.315	defghi
T11	3	0.336	efghij
T10	3	0.34	efghij
T13	3	0.342	efghij
T24	3	0.349	efghij
T4	3	0.358	efghijk
T18	3	0.381	fghijklm
T16	3	0.382	ghijklm
T36	3	0.387	hijklm
T9	3	0.39	ijklm
T20	3	0.408	jklmn
T30	3	0.408	jklmn
T15	3	0.409	jklmn
T21	3	0.43	klmn
T23	3	0.434	mn
T17	3	0.469	n
T14	3	0.47	n
T35	3	0.477	n
T19	3	0.555	ñ
T3	3	0.594	ñ
T2	3	0.703667	o
T6	3	0.762	op
T5	3	0.795667	pq
T1	3	0.848	r

Anexo 27: Tabla ANOVA para Abs500nm

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.05673	35	0.115907	205.28	0.0000
Intra grupos	0.040654	72	0.000564639		
Total (Corr.)	4.09738	107			

Anexo 28: Análisis de Rango múltiple de Abs500nm

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T28	3	0.105	a
T27	3	0.106	a
T31	3	0.147	ab
T25	3	0.162	abc
T32	3	0.177	abcd
T12	3	0.188	bcde
T26	3	0.206	bcdef
T33	3	0.216	bcdef
T34	3	0.229	cdefg
T8	3	0.234	cdefgh
T22	3	0.236	cdefghi
T24	3	0.251	defghij
T7	3	0.263	efghijk
T13	3	0.267	fghijk
T36	3	0.273	fghijk
T18	3	0.283	fghijk
T30	3	0.294	ghijkl
T10	3	0.294	ghijkl
T11	3	0.304	ghijkl
T4	3	0.306	ghijkl
T21	3	0.309	hijklm
T16	3	0.31	hijklm
T29	3	0.312	ijklm
T15	3	0.313	ijklm
T9	3	0.313	ijklm
T20	3	0.325	jklm
T23	3	0.335	klm
T35	3	0.34	klm
T17	3	0.362	lm
T14	3	0.385	m
T19	3	0.47	n
T3	3	0.534	n
T5	3	0.785333	ñ
T6	3	0.812	ño
T2	3	0.833667	ño
T1	3	0.884333	o

Anexo 29: Tabla ANOVA para N-Acetilglucosamina (mg/gMS) por horas

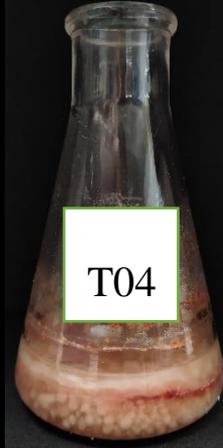
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2199.68	6	366.614	367.46	0.0000
Intra grupos	13.9679	14	0.997709		
Total (Corr.)	2213.65	20			

Anexo 30: Análisis de Rango múltiple de N-Acetilglucosamina (mg/gMS) por horas

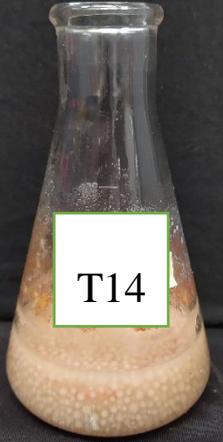
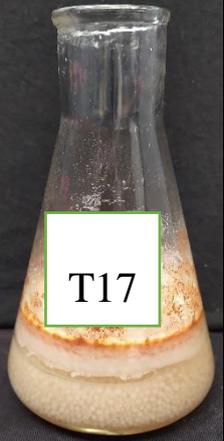
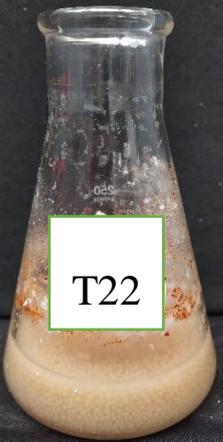
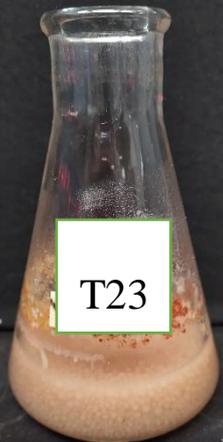
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Horas	Casos	Media	Grupos Homogéneos
24	3	4.08636	a
48	3	15.3311	b
72	3	26.1322	c
168	3	29.3184	d
96	3	32.3649	e
120	3	32.8469	e
144	3	33.1879	e

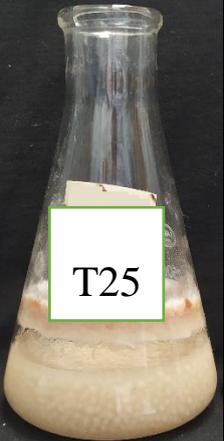
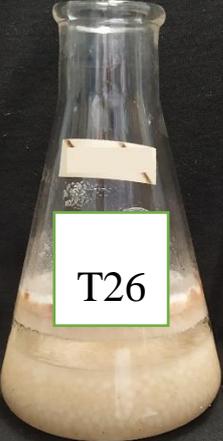
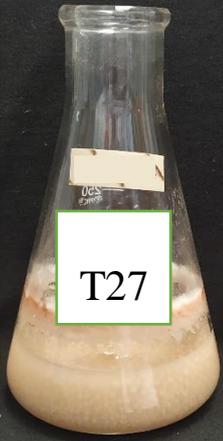
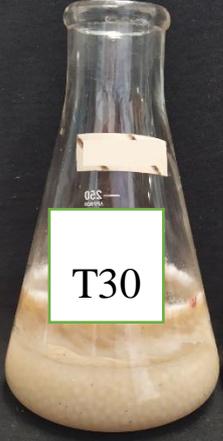
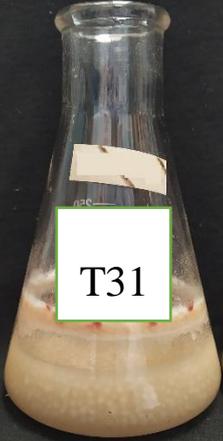
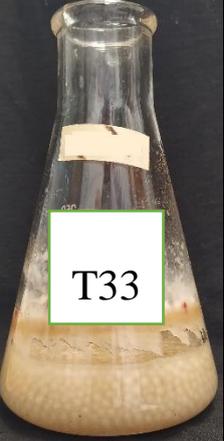
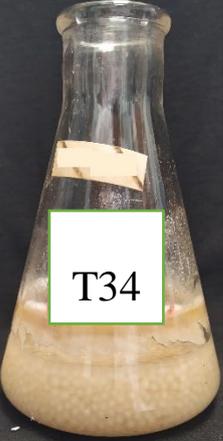
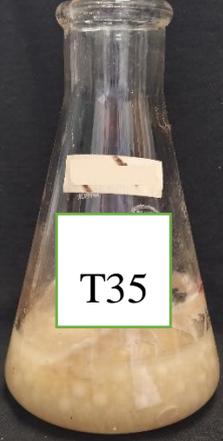
Anexo 31: Imágenes de la fermentación sumergida utilizando harina de quinua con *Monascus purpureus* a pH (5, 6, 7) y NaCl (0, 0.01, 0.05, 0.1M) en 100rpm.

NaCl(M) pH	0	0.01	0.05	0.1
5				
6				
7				

Anexo 32: Imágenes de la fermentación sumergida utilizando harina de quinua con *Monascus purpureus* a pH (5, 6, 7) y NaCl (0, 0.01, 0.05, 0.1M) en 120rpm.

NaCl(M) pH	0	0.01	0.05	0.1
5	 T13	 T14	 T15	 T16
6	 T17	 T18	 T19	 T20
7	 T21	 T22	 T23	 T24

Anexo 33: Imágenes de la fermentación sumergida utilizando harina de quinua con *Monascus purpureus* a pH (5, 6, 7) y NaCl (0, 0.01, 0.05, 0.1M) en 140rpm.

NaCl(M) pH	0	0.01	0.05	0.1
5	 T25	 T26	 T27	 T28
6	 T29	 T30	 T31	 T32
7	 T33	 T34	 T35	 T36