



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

INSTITUTO DE POSTGRADO

MAESTRIA EN GESTIÓN SUSTENTABLE DE RECURSOS NATURALES

“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”.

**Trabajo de Investigación previo a la obtención del Título de Magister en Gestión
Sustentable de Recursos Naturales**

Director: Pineda Insuasti, Julio Amílcar, PhD

Autor: Ayala Pastaz, Kléver Bayardo

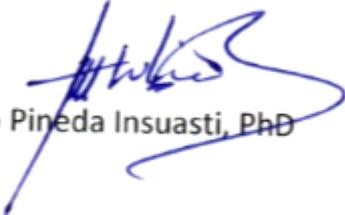
Ibarra - Ecuador

2017

APROBACION DEL TUTOR

En calidad de tutor del Trabajo de Grado, presentado por el Ingeniero Kléver Bayardo Ayala Pastaz, para optar por el grado de Magíster en Gestión Sustentable de los Recursos Naturales, doy fe de que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a presentación (pública o privada) y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

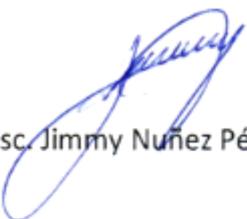
En la ciudad de Ibarra, a 7 días del mes de Julio del 2017.


Ing. Julio Pineda Insuasti, PhD

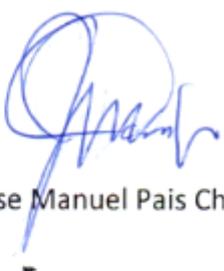
Desarrollo de un proceso a escala de laboratorio para el aislamiento, conservación y producción de cepas nativas de *Monascus spp.* a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana.

Por: Kléver Bayardo Ayala Pastaz

Trabajo de Grado de Maestría aprobado en nombre de la Universidad Técnica del Norte, por el siguiente jurado, a los 4 días del mes agosto del 2017.



Msc. Jimmy Nuñez Pérez



PhD Jose Manuel Pais Chanfrau



Msc. Lennys Berutti

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a todas las personas que representan el espíritu de superación en mi vida: a mi esposa Margoth por el apoyo incondicional durante mis estudios, a mis hijos Jorge y Bryan por ser el incentivo de superación personal, a mis padres Jorge Ayala y Blanca Pastaz por ser mi ejemplo de trabajo y perseverancia, a mis hermanos Willan y Xavier que en su momento supieron brindarme su voz de aliento y a todos mis buenos amigos por augurarme sus deseos éxito.

AGRADECIMIENTO

Dejo constancia de mi sincero agradecimiento a las instituciones que facilitaron el desarrollo del presente trabajo de investigación y la consecución de los objetivos planteados, entre ellas: a la Universidad técnica del norte (UTN), al Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA) y al Ingenio Azucarero del Norte (IANCEM).

De manera muy especial expreso mi agradecimiento al Dr. Julio Pineda Insuasti quien fue tutor del presente trabajo de investigación, brindando todo su apoyo a través del conocimiento transmitido a fin de poder concluir con éxito mi tesis de grado.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

INSTITUTO DE POSTGRADO

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD
TÉCNICA DEL NORTE**

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto Repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	0401290549		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Ayala Pastaz Kléver Bayardo		
DIRECCIÓN:	Narchín Mira 2-073 – Cantón Mira – Provincia del Carchi.		
EMAIL:	kleverbayal@gmail.com		
TELÉFONO FIJO:	062280704	TELÉFONO MÓVIL:	0990209358

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Desarrollo de un proceso a escala de laboratorio para la conservación y producción de cepas nativas de <i>Monascus spp.</i> a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana.
AUTOR (ES):	Ayala Pastaz Kléver Bayardo
FECHA:	4 de Agosto del 2017
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input type="checkbox"/> PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Magíster en Gestión Sustentable de los Recursos Naturales
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Julio Amílcar Pineda Insuasti, (PhD)

2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Yo, Kléver Bayardo Ayala Pastaz, con cédula de ciudadanía Nro. 0401290549, en calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior Artículo 144.

3. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, al 4 de Agosto del 2017

EL AUTOR:



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Kléver Bayardo Ayala Pastaz', is written over a horizontal dotted line.

Kléver Bayardo Ayala Pastaz

C.C.: 0401290549

**CONCESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A
FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

Yo, Ayala Pastaz Kléver Bayardo, con cédula de ciudadanía Nro. 0401290549 manifiesto mi voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autor del trabajo de grado denominado: “Desarrollo de un proceso a escala de laboratorio para la conservación y producción de cepas nativas de *Monascus spp.* a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana”, que ha sido desarrollado para optar por el título de Magíster en Gestión Sustentable de los Recursos Naturales, en la Universidad Técnica del Norte, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.



Kléver Bayardo Ayala Pastaz

0401290549

RESUMEN

Se evidencia un limitado conocimiento en el manejo y aprovechamiento sustentable de la especie *Monascus spp.* nativo ecuatoriano, tanto en su proceso de aislamiento, conservación y producción; así como del ciclo de vida en el medio natural y medios artificiales para su propagación. Se determinó las principales etapas para la obtención de cepas puras del hongo *Monascus spp.* como son: aislamiento, identificación y conservación. El trabajo experimental fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Fúngica del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA) - convenio con el Ingenio Azucarero del Norte (IANCEM), localizado en la Ciudad de Ibarra; empleando una cepa de *Monascus purpureus*, hongo ascomiceto filamentoso perteneciente al género *Monascus*, de la familia Monacaceae, orden eurotiales, del reino Fungi; obtenida a partir de la fermentación de semillas esterilizadas de trigo. La identificación morfológica de la cepa se realizó en el CEBA, identificando que el linaje de microorganismo aislado pertenece a *Monascus purpureus*; la cepa fue liofilizada y depositada en CEBA para su conservación. Para la velocidad de crecimiento se utilizó las cepas de *Monascus purpureus*, liofilizada en el experimento anterior y codificada como CEBA-FSASIIIE-mp-010116; Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con cinco réplicas y completamente aleatorio. El factor de estudio fue el medio de cultivo (AEM y PDA), como variable de respuesta se estableció la velocidad de crecimiento lineal de la cepa liofilizada. Los parámetros de operación como la temperatura y el tiempo se mantuvieron constante a 22°C y 7 días respectivamente, como factor de ruido se identificó el nivel de luz. El mejor medio resultante para la producción de *Monascus purpúreos* fue MEA con 4,3 mm/día de velocidad de crecimiento radial promedio con un nivel de confianza del 95% utilizando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para la discriminación de medias.

SUMMARY

There is evidence of limited knowledge in the management and sustainable use of the species *Monascus* spp. native ecuadorian, both in its process of isolation, conservation and production; As well as the life cycle in the natural environment and artificial means for its propagation. The main stages were determined to obtain pure strains of the fungus *Monascus* spp. such as: isolation, identification and conservation. The experimental work was carried out in the laboratory of Fungal Biotechnology of the Ecuadorian Center for Biotechnology and Environment (CEBA) - an agreement with the Northern sugar mill (IANCEM), located in the city of Ibarra; Using a strain of *Monascus purpureus*, a filamentous ascomycete fungus belonging to the genus *Monascus*, from the Monacaceae family, European order, from the Fungi kingdom; Obtained from the fermentation of sterilized wheat seeds. The morphological identification of the strain was performed in the CEBA, identifying that the lineage of the isolated microorganism belongs to *Monascus purpureus*; The strain was lyophilized and deposited in CEBA for its conservation. For the growth rate, *Monascus purpureus* strains, lyophilized in the above experiment and coded as CEBA-FSASIIE-mp-010116; A completely randomized design (DCA) with five replicates was used and completely randomized. The study factor was the culture medium (AEM and PDA), as the response variable established the linear growth rate of the lyophilized strain. The operating parameters such as temperature and time were kept constant at 22 ° C and 7 days respectively, as noise factor was identified the light level. The best resulting medium for the production of *Monascus purpureus* was MEA at 4.3 mm / day of mean radial growth rate at a 95% confidence level using Fisher's Minimal Difference (LSD) procedure for mean discrimination.

Palabras clave

Agar, aislamiento, biodiversidad, caracterización, colorantes, conservación, cultivo, fúngica, identificación, liofilización, *Monascus*, pigmentos.

ABREVIATURAS

BRGM	Banco de Recursos Genéticos Microbianos
EE	Extracto Etéreo o grasa bruta
ELN	Elementos Libres de Nitrógeno
FEL	Fermentación Estado Líquido
FES	Fermentación Estado Solido
LATAM	Región de Latinoamérica y el Caribe
LSD	Diferencia Mínima Significativa
MAE	Ministerio del Ambiente Ecuador
MAISFCI	Modelo de Atención Integral de Salud Familiar, Comunitario e Intercultural
MEA	Agar Malta Dextrosa
MSP	Ministerio de Salud Pública
ODM	Objetivos de Desarrollo del Milenio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDA	Agar Papa Dextrosa
SEMPLEDES	Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
WFP	Proyecto Mundial de Alimentación

TABLA DE CONTENIDO

1	PROBLEMA	15
1.1	Introducción	15
1.2	Situación problemática	21
1.3	Problema científico	25
1.4	Objetivos	25
	<i>Objetivo general</i>	25
	<i>Objetivos específicos</i>	25
1.5	Hipótesis	26
	<i>Hipótesis alterna</i>	26
	<i>Hipótesis nula</i>	26
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	26
2.1	La crisis de los colorantes sintéticos: desafío mundial	26
	2.1.1 <i>Situación actual</i>	32
	2.1.2 <i>Situación futura</i>	34
	2.1.3 <i>Propuestas al desafío</i>	35
2.2	Género <i>Monascus spp.</i>	41
	2.2.1 <i>Aislamiento de cepas</i>	43
	2.2.2 <i>Identificación de especies</i>	44
	2.2.3 <i>Caracterización</i>	49
	2.2.4 <i>Almacenamiento y conservación</i>	49
	2.2.5 <i>Producción industrial</i>	50
	<i>Parámetros de producción.</i>	56
	<i>Principales limitaciones tecnológicas:</i>	60
3	MARCO METODOLÓGICO	68
3.1	Aislamiento e identificación de la cepa nativa del hongo <i>Monascus purpureus.</i>	68
	3.1.1 <i>Materiales y métodos</i>	68
	3.1.2 <i>Resultados y discusión</i>	71
3.2	Protocolo para la conservación de la especie nativa <i>Monascus spp.</i>	74
	<i>Materiales y métodos</i>	75
	<i>Resultados y discusión</i>	75
3.3	Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa de <i>Monascus spp.</i>	79

	<i>Materiales y métodos</i>	79
	<i>Resultados y discusión</i>	81
	3.4 Propuesta de catálogo de cepas microbianas puras de <i>Monascus spp.</i> para su conservación en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM).....	87
4	CONCLUSIONES	88
5	RECOMENDACIONES	89
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
7	ANEXOS	111
	Anexo 1. Certificación de Identificación – Cepa <i>Monascus Purpureus</i>	111
	Anexo 2. Catálogo de cepas microbianas puras de <i>Monascus spp.</i>	111

ÍNDICE DE TABLAS

	Tabla 1. Colorantes textiles clasificados como alérgenos.	27
	Tabla 2. Colorantes textiles clasificados como carcinógenos.....	28
	Tabla 3. Condiciones de cultivo de <i>Monascus spp.</i> para la producción de pigmentos.....	62
	Tabla 4. Velocidad de crecimiento de <i>Monascus</i> a partir de cepa liofilizada.....	81
	Tabla 5. Resumen estadístico para velocidad	82
	Tabla 6. Análisis de varianza para Velocidad por Medio.....	83
	Tabla 7. Medias para Velocidad por Medio con intervalos de confianza del 95,0%	84
	Tabla 8. Pruebas de Rango Múltiple.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de algunos de los metabolitos secundarios producidos por <i>Monascus spp.</i>	51
Figura 2. Principales problemas del Procedimiento universal de extracción de compuestos intracelulares.	61
Figura 3. Estructura de las principales monacolinas de <i>Monascus purpureus</i>	71
Figura 4. Proceso para el aislamiento, identificación y caracterización de <i>Monascus purpureus</i>	74
Figura 5. Velocidad de crecimiento	79
Figura 6. Gráfico de medias para velocidad	84
Figura 7. Resumen estadístico	85

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Foto 1. Muestra de trigo fermentado con colonización de <i>Monascus spp.</i>	72
Foto 2. Aislamiento y purificación de la cepa de <i>Monascus spp.</i>	73
Foto 3. Cultivo de <i>Monascus spp.</i> en tubos de 15 ml	76
Foto 4. Registro de temperatura en el liofilizador	76
Foto 5. Proceso de liofilización	77
Foto 6. Proceso de liofilización	77
Foto 7. Muestras de <i>Monascus purpureus</i> liofilizada.....	78
Foto 8. Medición de la velocidad de crecimiento del <i>Monascus</i>	86

1 PROBLEMA

1.1 Introducción

Por el limitado conocimiento en el manejo y aprovechamiento sustentable de la especie *Monascus spp.* nativo ecuatoriano, en el Ecuador no se cuenta con protocolos nacionales para el proceso de aislamiento, conservación y producción de ésta especie; en el país se carece de conocimiento sobre su ciclo de vida en el medio natural y medios artificiales para su propagación; así como se desconoce sobre la utilización de los compuestos propios de *Monascus spp.*, los compuestos de *Monascus* en su mayoría son biológicamente activos, presentando aplicaciones potenciales, diversas aplicaciones como aditivos en las industrias cosmética, de alimentos y principalmente de medicamentos, (Pattanagul, Pinthong, & Phianmongkhol, 2007; Pisareva & Kujumdzieva, 2010).

Las monacolinas y los pigmentos son los metabolitos de mayor importancia biotecnológica. Las monacolinas, son un tipo de lovastatina natural, que son capaces de disminuir el colesterol en la sangre, gracias a la inhibición competitiva de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG Co-A) que cataliza la biosíntesis del colesterol. Por tanto se pueden emplear para el tratamiento de la hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares (Endo, 1979; Heber et al., 1999). Por su parte, los pigmentos son los metabolitos de *Monascus spp.* más ampliamente utilizados en la industria alimentaria y biotecnológica como colorantes naturales, saborizantes y conservantes (Pisareva & Kujumdzieva, 2010), y su uso se ha extendido gracias al carácter carcinógeno que se ha reportado de los colorantes sintéticos durante los últimos años. Los pigmentos de coloración roja son los de mayor importancia, ya que pueden ser utilizados como sustitutos de los nitritos y la eritrosina en la elaboración de los cárnicos (Julio Carvalho, Oishi, Pandey, &

Soccol, 2005). Sin embargo, se ha cuestionado su empleo porque *Monascus spp.* produce citrina, anteriormente llamada monascidin A (Pattanagul et al., 2007); la cual es una micotoxina que también es producida por *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.*, y tiene efectos cancerígenos, mutágenos, citotóxicos, hepatóxicos, nefrotóxicos y teratógenos (Chan & Shiao, 2007), lo que pone en juego el reconocimiento de inocuidad GRASS que la FDA ha dado a los pigmentos de *Monascus spp* (Nout, 2007). Para evaluar el riesgo se han realizado exámenes genómicos, encontrándose que sólo las cepas de las especies *M. purpureus* y *M. kaoliang* poseen los genes que expresan citrina (Y.-P. Chen et al., 2008). Además, recientemente, se desarrolló un método que permite separar la citrina de los alimentos mediante su unión a nanopartículas magnéticas de Superficie Activa Maghemita, gracias a los grupos quelantes de hierro que posee, principalmente Ceto-enoles (Magro et al., 2016).

En vista de los altos costos económicos de la nanotecnología, es importante seleccionar empíricamente las cepas de *Monascus spp.* que producen grandes cantidades de biopigmentos con bajo o nulo contenido de citrinina (M.-H. Chen & Johns, 1993). En este contexto, el objetivo del presente trabajo es contar con los insumos necesarios que permita desarrollar un proceso a escala de laboratorio para la conservación y producción de cepas nativas de *Monascus spp.* mediante bioprocesos que permita el máximo aprovechamiento del recurso natural y el manejo sostenible de la biodiversidad con la obtención de cepas puras de *Monascus spp.*, determinando las características propias de la especie para almacenar la cepa pura nativa en el banco de recursos.

Se reportan aislamientos a partir de alimentos como puré de sorgo (T. F. Lin & Demain, 1991), arroz contaminado (Julio Carvalho et al., 2005), aceitunas verdes procesadas térmicamente (Efstathios Z. Panagou, Katsaboxakis, & Nychas, 2002), angkak (Ji Kim, Kim,

Oh, & Lee, 2010), cuajada de soja fermentada (Yongsmith, Tabloka, Yongmanitchai, & Bavavoda, 1993), papas, avena, frutas y forraje ensilado (Samson, Hoekstra, Frisvad, & Filtenborg, 2002); suelo pedregoso-arenoso (Stchigel, Cano, Abdullah, & Guarro, 2004); arena de raíz de pino (Barnard & Cannon, 1987); sedimentos de ríos (Cannon, Abdullah, & Abbas, 1995); ecosistemas marinos (Landy & Jones, 2006); cuerpos de agua dulce (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979) y combustible de aviación (Vasilyeva, Chekunova, Bilanenko, Kachalkin, & Polyakova, 2012). Las muestras se toman con un asa y se depositan en alguno de los medios de cultivo reportados en la literatura para el aislamiento de *Monascus spp.*: Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), Agar Sabouraud, Solución agarosa de Czapek (Palo, Vidal-Adeva, & Maceda, 1960), Agar Batata Dextrosa (BDA, por sus siglas en inglés) (Macario, Palo, Vidal-Adeva, & Maceda, 1960), Agar Rosa Bengala con cloranfenicol (Chairote, Chairote, Wongpornchai, & Lumyong, 2007) y Medio Wong modificado (T. F. Lin & Demain, 1991). Si el material para el aislamiento fueron granos invadidos por el hongo se recomienda esterilizar primero mediante dos inmersiones en etanol al 95 % durante 30 segundos y una lavada intermedia en solución acuosa de hipoclorito de sodio al 0,1 % durante uno a cuatro minutos (Chairote et al., 2007). Para el caso especial de las cepas encontradas en los sedimentos y suelo se aplica el método de aislamiento de placa directa y el medio de cultivo Agar Patata Zanahoria (PCA, por sus siglas en inglés) (Cannon et al., 1995; Stchigel et al., 2004).

Los medios de cultivos inoculados se incuban entre 29 a 32 ° C durante 10 días, o hasta que el micelio se propague por toda la caja de Petri (Julio Carvalho et al., 2005; T. F. Lin & Demain, 1991). También se registran las siguientes condiciones de cultivo: 25 a 30 ° C durante siete días (Park, Stamenova, & Long, 2004), 30±2 ° C durante 3 a 5 días (Chaisrisook, 2002).

En cuanto a la identificación de especies; algunos de los medios reportados en comparación de características de la colonia y tasas de crecimiento, emplean por lo general los siguientes medios de cultivo: Agar autolisado de Levadura Czapek (CYA, por sus siglas en inglés), Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Glicerol 25 N (G25N), Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Harina de Avena (OMA, por sus siglas en inglés), Agar de Harina de Maíz (CMA, por sus siglas en inglés) a 25 °C durante 7 días. Las mediciones y observaciones tanto de los caracteres morfológicos de las colonias (tamaño, color, forma, textura...) como de los caracteres microscópicos del micelio (hifas, conidios, cleistotecios, esporas, ramificaciones...) se hacen con lactofenol como medio de montaje (Shao, Xu, & Chen, 2011; Stchigel et al., 2004).

Monascus spp. Se distingue principalmente por su etapa Basipetospora anamorfa y por su cuerpo fructífero o ascoma, que es un cleistotecio ubicado en los extremos de las hifas ramificadas del micelio vegetativo (ver figura 1). El cleistotecio se conforma de dos capas: la interna está formada por la ampliación de las regiones apicales de las hifas, mientras que la externa consiste de un entretejido de hifas que forman su "envoltura". Los ascos dentro de los cuerpos fructíferos están dispuestos al azar y son degradados en las primeras etapas de formación de esporas sexuales (Vasilyeva et al., 2012). Es un hongo homotálico, es decir su reproducción sexual se da por dos gametos aportados por el mismo talo (Kamolnan Lakrod, Chaisrisook, & Skinner, n.d.). Las esporas sexuales se denominan ascosporas mientras las asexuales se denominan conidiosporas; y entre ambos tipos de esporas se forma los tubos germinativos (Cousin & Blackburn, 2006; Wong & Bau, 1978). Dichas esporas son resistentes al calor y pueden crecer en medios con niveles reducidos de oxígeno, lo que es característico del género (Efstathios Z. Panagou et al., 2002). Las hifas son septadas (tabicadas), pero la forma y textura del micelio depende del tipo de especie. El desarrollo de

las hifas aéreas y la producción de metabolitos secundarios son modulados por la proteína *mrf1bA* (Shao et al., 2011).

Chaisrisook (Chaisrisook, 2002) establece que si dos cepas pertenecen al mismo Grupo de Compatibilidad de Micelio (GCM) si al sembrarlas en el mismo medio de cultivo crecen como una sola colonia, de lo contrario son incompatibles.

Para la caracterización podemos señalar que entre las actividades biológicas de los metabolitos producidos se encuentra: Hipocolesterolémica (Heber et al., 1999), anti-obesidad (Choe, Lee, Woo, & Shin, 2012), anticancerígena (Y.-W. Hsu, Hsu, Liang, Kuo, & Pan, 2011), antiinflamatoria (Cheng, Wu, Yuan, Su, & Yanai, 2012), hipotensora (Kuba, Tanaka, Sesoko, Inoue, & Yasuda, 2009), antifúngica (Tu et al., 2016), antibacteriana (Mukherjee & Singh, 2011), entre otras. Que son otorgadas por los compuestos biológicamente activos que produce.

La cantidad y tono de los pigmentos producidos es influenciado por el tipo de cepa y su perfil metabólico, al igual que por los nutrientes del medio (fósforo y nitrógeno, principalmente), y las condiciones (temperatura, pH y humedad, principalmente) y métodos de cultivo (Julio Carvalho et al., 2005). *Monascus spp.* es un hongo que puede crecer en un rango de temperatura desde los 15-18 °C hasta los 45 °C, aunque su óptimo se encuentra entre 25 a 37 °C. Igualmente, puede crecer en un rango de pH de 2,5 a 8,0; siendo el ideal 4,0-7,0 (Julio Carvalho et al., 2005). Aunque se reportan casos donde *M. ruber* ha crecido en un rango de pH de 1,7 a 2,0 y una temperatura de 80°C (Nout, 2007).

Para el almacenamiento de las cepas se emplea usualmente el medio de cultivo PDA a 4°C (Y.-P. Chen et al., 2008). También se reporta el almacenamiento de cepas en Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés) a 2°C. Para garantizar la viabilidad de las cepas

almacenadas en agar, se debe repicar, es decir, realizar subcultivos mensualmente durante un semestre antes de emplear la cepa.

Se reporta que los mejores métodos de almacenamiento de cepas para su conservación en BRG son la liofilización y la crio-preservación en nitrógeno líquido, manteniéndose la estabilidad genética durante más de 40 años (Hawksworth, 1985; Nagai et al., 2005) a una temperatura de -70 °C (Ji Kim et al., 2010).

Un colorante es una molécula con dos grupos químicos: el cromóforo, que es causante del color y el auxocromo, que le permite fijarse a una superficie (Jean-Marie, 2016). Los colorantes pueden clasificarse según su fuente de extracción en sintéticos y naturales. Los colorantes sintéticos fueron desarrollados a finales del siglo XIX, reemplazando en su mayor parte a los naturales (Nikfar & Jaberidoost, 2014). Se emplean comúnmente para dar color a los textiles, los alimentos, los tintes de cabello y muchos artículos de uso cotidiano. Se ha reportado que el uso de tintes para cabello y textiles, al igual que el consumo de alimentos elaborados con colorantes sintéticos presenta efectos adversos para la salud, que varían desde una simple alergia a enfermedades crónicas como el cáncer. Pese al conocimiento de dichos efectos, las instituciones reguladoras del uso de dichos colorantes sintéticos, siguen permitiendo algunos, aunque estableciendo dosis máximas. Muchos de los efectos se presentan con el tiempo y no inmediatamente; probablemente sean causantes del auge de enfermedades crónicas que azotan a la población y pasan inadvertidos. Lo mejor para afrontar esta crisis, que asesina lentamente a la humanidad, es girar el rumbo de la industria, de lo sintéticos a lo natura; por lo que los colorantes naturales son una buena alternativa. Bajo este contexto, el objetivo de este trabajo es describir brevemente la crisis de los colorantes sintéticos, mediante una amplia revisión de la literatura, que permita identificar cómo afecta la dinámica mundial al Ecuador.

1.2 Situación problemática

La crisis alimentaria se irá empeorando. De acuerdo a los datos de la FAO, con la cosecha récord en 2007, hay más que suficiente comida en el mundo para alimentar a todos -la producción supera al menos 1.5 veces a la demanda. De hecho, en los últimos 20 años, la producción de alimentos ha aumentado anualmente de manera estable en un 2%, mientras que crecimiento de la población ha disminuido en un 1.14% anual.(GRAIN (www.grain.org), Campaña “No te Comas el Mundo” (www.notecomaselmundo.org), Observatori del Deute en la Globalització (www.odg.cat), & (www.veterinariossinfronteras.org), 2008). El número total de personas subnutridas en el mundo alcanzó los 1 023 millones en 2009 (FAO, 2010). Según la FAO hay en todo el mundo alrededor 852 millones de personas que son crónicamente hambrientas debido a la pobreza extrema.

La severidad y el tipo de impacto dependen del origen de la energía y la tecnología utilizada en producirla. Anualmente, a nivel mundial, se consume el equivalente a 9.000 millones de toneladas de petróleo; las energías fósiles aportan la mayor parte de la energía consumida. Actualmente, en el mundo, representan el 82% del consumo mundial; las reservas de petróleo están muy desigualmente repartidas. (Bordehore, 2013).

Cualquier historia ambiental del mundo muestra que las sociedades menos desarrolladas tecnológicamente sufrieron de crisis ambientales, en la mayoría de los casos por depredar recursos naturales hasta su extinción (Crosby, 1988; Ponting, 1992). Según el reporte del Banco Mundial, cada año, se pierde de 0.5 al 1% anual de la superficie forestal, y se estima que en los próximos 50 años se perderán entre 10 al 40% de las especies por el proceso de urbanización, desarrollo industrial y agrícola; de 30 millones, 1.7 millones de especies han desaparecido de la Tierra porque perdieron su hábitat natural (World Bank, 1997).

Con estos antecedentes podemos mencionar que en la pérdida de biodiversidad se incluyen especies del reino Fungi, especies poco conocidas, que por sus características particulares resultan de interés industrial, como las del género *Monascus spp.*, capaces de producir metabolitos tales como monacolinas, pigmentos naturales importantes en el desarrollo de la industria de alimentos, farmacéutica y textil; en este sentido es de gran importancia desarrollar protocolos que permitan aislar y conservar éste recurso fúngico en nuestro país.

Se estima que se producen anualmente en todo el mundo al menos 10 millones de toneladas de colorante, de las cuales los colorantes azo representan cerca de 70%. Este grupo de colorantes se caracteriza por grupos reactivos que forman enlaces covalentes con grupos hidroxilo, aminas o sulfonatos en las fibras (algodón, lana, seda, naylon. Los colorantes antraquinónicos constituyen la segunda clase más importante de los colorantes textiles, después de los azo. La liberación de efluentes coloreados de las industrias que los utilizan representa un serio problema ambiental y una preocupación para la salud pública. En particular, la descarga de efluentes coloreados al medio ambiente es indeseable no solo debido a su color, sino también porque algunos colorantes de estas aguas residuales y sus productos desgastadores son tóxicos o mutagénicos para la vida. Sin tratamientos adecuados, estos tintes se estabilizan y pueden permanecer en el ambiente durante mucho tiempo; por ejemplo, la vida media del reactivo hidrolizado blue 19 , utilizado en textiles como la mezclilla, es cercana a los 46 años, (García & Solís, 2008).

La mayor parte de lo que nos venden hoy día como alimento, es artificial, sintético, lleno de preservativos, aditivos, colorantes y sabores artificiales, hormonas y antibióticos, (Velázquez, 2011).

Aun cuando los pigmentos extraídos de plantas, animales y minerales han sido utilizados a lo largo de la historia, a nivel industrial poseen desventajas económicas relacionadas con su obtención y procesamiento. Es por ello que el uso de pigmentos sintetizados químicamente se extendió en los últimos años gracias a su fácil producción, bajo costo y bajas cantidades requeridas debido a sus excelentes propiedades de coloración. La creciente utilización de estos materiales para mejorar las características organolépticas de productos alimenticios trajo consigo alteraciones toxicológicas que llevaron al desarrollo de normas regulatorias para el uso de estos aditivos (Downham et al., 2000). Ante esta problemática, actualmente se han desarrollado bioprocesos para la obtención de compuestos de interés industrial (en específico pigmentos), con altos rendimientos, bajo costo y sin implicaciones toxicológicas. Es así como se ha logrado el desarrollo de diversos pigmentos naturales a partir de microorganismos, incluyendo hongos filamentosos, levaduras y algunas microalgas. Estos tipos de pigmentos son sustancias coloridas sintetizadas, acumuladas o excretadas a partir de células, las cuales pueden ser empleadas para colorear los alimentos, evitando las desventajas toxicológicas de los pigmentos sintetizados químicamente. Esta nueva forma de producción de colores nos lleva a pensar en un mundo microscópico como la solución, en donde a partir de microorganismos se obtienen metabolitos secundarios con tonalidades específicas, sin efectos nocivos para la salud y con múltiples ventajas económicas a nivel industrial. Dentro de estos microorganismos productores de pigmentos, los más importantes son los hongos filamentosos, en especial los del género *Monascus spp.* reconocido productor de monacolinas y otros pigmentos amarillos, anaranjados y rojos, utilizados en el continente asiático no sólo para colorear alimentos, sino también en la industria farmacéutica y textil, como conservadores de carne y pescado, como agentes de sabor debido a sus aromas y sabores especiales, y en la producción de vino de arroz rojo. El ritmo de vida actual, la calidad de los alimentos que consumimos y las nuevas enfermedades que han surgido, llevaron a los

investigadores en alimentos a desarrollar nuevos productos que ofrecieran un beneficio extra a la salud y no sólo cumplieran su función nutricional, creando así los llamados nutraceuticos; estos pueden definirse como sustancias que pueden ser consideradas un alimento o parte de él, las cuales pueden proporcionar beneficios médicos y para la salud.

Recientemente se han empleado los pigmentos producidos por *Monascus*; Mejorar las características organolépticas de los alimentos que consumimos y a su vez aportar compuestos con actividad biológica destacada son los beneficios que obtiene el consumidor de los pigmentos microbianos, mientras que para las empresas representa una manera más económica y con mejores rendimientos para la producción de compuestos coloridos (Adriana González, Alejandro Méndez, Raúl Rodríguez, & Aguilar, 2009).

Todo lo antes expuesto genera en la sociedad resistencia en el consumo de alimentos y bebidas que contienen colorantes sintéticos, que en varios casos por prescripción médica restringen al paciente el consumo de alimentos y bebidas que en su preparación u elaboración emplean productos derivados de estos; sin que exista la facilidad de acceder a productos alternativos naturales que a mas de ser parte de un alimento generen beneficios para la salud de los humanos; por otra parte la evidente contaminación de los recursos naturales con residuos de colorantes sintéticos contribuye al deterioro de la calidad ambiental del entorno de la sociedad, resultando una necesidad imperante de generar propuestas que contribuyan a mejorar en parte de los problemas sociales identificados. En este sentido la posibilidad de identificar cepas nativas de *Monascus spp.* y su conservación, que a futuro pueda representar el empleo a escala industrial en la elaboración de productos y subproductos que contribuyan a mejorar el nivel de salud de la sociedad podría constituirse en una de las alternativas que permitan mejorar la problemática social identificada en el proyecto.

En el Ecuador no existe información sobre parámetros de crecimiento de *Monascus purpureus*, así como para la determinación de velocidad de crecimiento; sin embargo como punto de partida para la presente investigación se ha recopilado información de experiencias efectuadas en otros países.

1.3 Problema científico

Se evidencia limitado conocimiento en el manejo y aprovechamiento sustentable de la especie *Monascus purpureus* nativo ecuatoriano, tanto en su proceso de aislamiento, conservación y producción; así como del ciclo de vida en el medio natural y medios artificiales para su propagación.

Objeto de estudio

Proceso de producción y conservación de *Monascus spp.* por fermentación sólida.

Campo de estudio

Conservación de los recursos genéticos microbianos del Ecuador.

1.4 Objetivos

Objetivo general

Desarrollar un proceso a escala de laboratorio para la conservación y producción de cepas nativas de *Monascus purpureus*, mediante bioprocesos que permita el máximo aprovechamiento del recurso natural fúngico y el manejo sostenible de la biodiversidad.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar la especie de *Monascus purpureus* nativa-

- Desarrollar un protocolo para la conservación de *Monascus purpureus*.
- Seleccionar el mejor medio de cultivo para el crecimiento de la cepa aislada de *Monascus purpureus* a través de la velocidad de crecimiento radial.
- Diseñar un catálogo de cepas microbianas puras para su conservación en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM).

1.5 Hipótesis

Hipótesis alterna

Si se desarrolla un bioproceso de conservación y producción de *Monascus purpureus* por fermentación sólida utilizando cepas fúngicas nativas ecuatorianas, entonces se lograría la conservación del recurso natural fúngico y su aprovechamiento de manera sustentable.

Hipótesis nula

Si se desarrolla un bioproceso de conservación y producción de *Monascus purpureus* por fermentación sólida utilizando cepas fúngicas nativas ecuatorianas, no se lograría la conservación del recurso natural fúngico y su aprovechamiento de manera sustentable.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 La crisis de los colorantes sintéticos: desafío mundial

Colorantes textiles: los tintes de las telas pueden degradarse y esparcirse por la piel de la persona provocando dermatitis alérgica de contacto, que presenta un cuadro clínico de eczema, el cual puede progresar y ser grave, generalizado, o incluso eritrodérmico. Las

lesiones se originan principalmente en sitios corporales de transpiración o fricción que tengan contacto directo con la prenda, así como en los pliegues de piel. Los tintes que causan la reacción alérgica pertenecen al grupo de los colorantes dispersos, como Naranja disperso 3, Azul disperso 124, Azul Disperso 106, Amarillo disperso 3, rojo disperso 1, entre otros. Durante la Segunda Guerra Mundial se presentó un problema de dermatitis purpúrica en la armada británica debido al acabado textil de sus uniformes. (Nikfar & Jaberidoost, 2014). Por su parte el índigo a pesar de causar raramente dermatitis alérgica, provoca conjuntivitis, hipertensión, hiperactividad, afecciones gastrointestinales, neurotoxicidad (Additifs, 2015; European Food Safety Authority (EFSA), 2015).

Tabla 1 Colorantes textiles clasificados como alérgenos.

Nombre genérico	No. de Índice de Color (IC)	No. de Registro
Azul Disperso 3	61 505	2475-46-9
Azul Disperso 7	62 500	3179-90-6
Azul Disperso 26	63 305	---
Azul Disperso 35	---	12222-75-2
Azul Disperso 102	---	12222-97-8
Azul Disperso 106	---	12223-01-7
Azul Disperso 124	---	61951-51-7
Naranja Disperso 1	11 080	2581-69-3
Naranja Disperso 3	11 005	730-40-5
Naranja Disperso 37	11 132	---
Naranja Disperso 76	11 132	---
Rojo Disperso 1	11 110	2872-52-8
Rojo Disperso 11	62 015	2872-48-2

Nombre genérico	No. de Índice de Color (IC)	No. de Registro
Rojo Disperso 17	11 210	3179-89-3
Amarillo Disperso 1	10 345	119-15-3
Amarillo Disperso 9	10 375	6373-73-5

Fuente: (Nikfar & Jaberidoost, 2014).

Está demostrada la carcinogenicidad de las arilaminas dicíclicas, las difenilaminas y los derivados de antraquinona. Por otro lado, las monoarilaminas presentan débil potencial cancerígeno tras exposición a largo tiempo, mientras los derivados de bencidina son cancerígenos sospechosos. Los componentes azoicos no son cancerígenos de por sí, pero si son sistemáticamente absorbidos por humanos, pueden ser metabolizados por los microorganismos endógenos vía azoreductasa en aminas aromáticas cancerígenas (Nikfar & Jaberidoost, 2014).

Tabla 2 Colorantes textiles clasificados como carcinógenos.

Nombre genérico	No. de Índice de Color (IC)	No. de Registro
Rojo ácido 26	16 150	3761-53-3
Rojo Básico 9	42 500	569-61-9
Violeta Básico 14	42 510	632-99-5
Negro Directo 38	30 235	1937-37-7
Azul Directo 6	22 610	2602-46-2
Rojo Directo 28	22 120	573-58-0
Azul Disperso 1	64 500	2475-45-8
Naranja Disperso 11	60 700	82-28-0
Amarillo Disperso 3	11 855	2832-40-8

Fuente: (Nikfar & Jaberidoost, 2014).

Adicionalmente, los tintes textiles sintéticos constituyen contaminantes persistentes en los cuerpos hídricos debido a su origen sintético, su estructura compleja de alto peso molecular (Kuhad, Sood, Tripathi, Singh, & Ward, 2004), y su estabilidad tanto a la luz como a la temperatura y al ataque microbiano (Gregory, 2000). Por ende, provocan fluctuaciones en parámetros como demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO), pH, color, salinidad y composición química del agua (Talarposhti, Donnelly, & Anderson, 2001); lo que afecta los procesos fotosintéticos, la estética y vida acuática (Kuhad et al., 2004).

Tintes para cabello: antes de la década de los 80's se empleaban en la industria de los tintes para cabello ingredientes como las aminas aromáticas; muchas de las cuales presentaron más tarde genotoxicidad y carcinogenicidad comprobada. Los estilistas o peluqueros que aplicaron esos productos durante más de 10 años y las personas que tiñeron su cabello por más de 15 años presentaron cáncer de vejiga, principalmente (Gago-Dominguez, Esteban Castelao, Yuan, Yu, & Ross, 2001). Posterior a esa época la mayoría de las industrias de tintes para cabello eliminaron varias aminas aromáticas cancerígenas de la fórmula de sus productos con el fin de responder a las exigencias de organizaciones internacionales que abogaban por la salud de los consumidores. Actualmente, los efectos de los tintes para el cabello en la población general y en los profesionales de la belleza se han estabilizado o disminuido. A pesar de que estos productos se componen de sustancias sintéticas catalogadas como cancerígenas sospechosas, su efecto directo en la salud de los consumidores no ha sido comprobado. Se reporta que dichas aminas aromáticas tienen un potencial genotóxico débil e inducen el cáncer tras suministrarse oralmente a ratas; sin embargo, esta carcinogenicidad in vivo no se ha reportado en humanos, ya que la exposición al producto es tópica y no oral. (Kelsh, Alexander, Kalmes, & Buffler, 2008; Kogevinas et al., 2006; J. Lin, Dinney, Grossman, & Wu, 2006; Nohynek, Fautz, Benech-Kieffer, &

Toutain, 2004). No obstante algunos autores sugieren que estos químicos pueden permanecer en latencia hasta 20 años y pasado este tiempo mostrar sus efectos adversos (Bolt & Golka, 2007). Lo que sí está comprobado es que los tintes para cabello pueden ocasionar reacciones alérgicas como dermatitis eritematosa y papular, debido principalmente a su contenido de iones de cobalto, que pueden actuar como haptenos y unirse a los componentes macromoleculares, produciendo sustancias inmunogénicas (Cámara-Martos & Moreno-Rojas, 2016).

Colorantes alimenticios: el color es uno de los principales criterios de calidad de los alimentos; por ello las industrias alimentarias destinan gran porcentaje de los costos de producción en técnicas de preservación o la adición de color. El color es proporcionado muchas veces por pigmentos naturales en alimentos frescos o sintéticos en productos manufacturados (Villaño, García-Viguera, & Mena, 2016). Los pigmentos son usualmente añadidos para modificar, mejorar o restaurar el atractivo visual de los alimentos, o simplemente para que el consumidor pueda identificarlos (Barrows, Lipman, & Bailey, 2003), y pueden clasificarse por criterios de fuente de obtención, solubilidad en agua y habilidad de cobertura; siendo la segunda categoría la más usual (opaco o transparente) (Amchova, Kotolova, & Ruda-Kucerova, 2015).

Los principales colorantes empleados en la industria alimentaria aceptados por la Unión Europea (UE), pero no por la FDA son: rivoflavinas, ácido carmínico (colchinilla), carbón vegetal y minerales como el dióxido de titanio, el carbonato de calcio, los óxidos de hierro. Por otro lado, algunos aditivos de color como gluconato ferroso y el lactato ferroso son aceptados por los Estados Unidos, pero no por la UE. Tanto la FDA como la UE aceptan el uso de ciertos colorantes azoicos, regulados bajo una legislación que define las dosis y patrones de consumo (Villaño et al., 2016).

Infortunadamente, el ácido carmínico puede causar reacciones alérgicas y choque anafiláctico a un grupo sensible de la población; los colorantes azoicos Tartrazina, Ponceau 4R, Rojo Allura AC, Negro brillante BN y Marrón HT pueden afectar el desarrollo neurológico o ser carcinógenos; el Amarillo Ocaso FCF puede afectar la morfología y movilidad de los espermatozoides; el Amarillo de Quinoleína puede causar reacciones de sensibilidad adversa a largo plazo, como urticaria y rinitis (Villaño et al., 2016); Rojo 40, Amarillo 5 y Amarillo 6 contienen Benzidina, un carcinógeno comprobado (Potera, 2010); la tartrazina puede causar migraña, asma, genotoxicidad, neurotoxicidad, cirrosis y ciertas afecciones cutáneas ; el amarillo de mantequilla es cancerígeno (Nikfar & Jaberidoost, 2014). Un estudio la Universidad de Purdue encontró que el consumo de un contenido de 29 a 33 mg de colorantes sintéticos, principalmente azoicos en los caramelos puede afectar el comportamiento (hiperactividad, inquietud y trastornos del sueño) de un pequeño porcentaje de niños (Godshall, 2016; McCann et al., 2007). En particular, los colorantes que tienen un grupo azo son metabolizados por la microflora intestinal o por las enzimas hepáticas mediante escisión metabólica, la induciendo estrés oxidativo y como consecuencia formación de radicales libres, llegando a afectar órganos encargados de la depuración del cuerpo como el hígado y el sistema urinario (Diacu, 2016; Nikfar & Jaberidoost, 2014).

Muchos de los colorantes sintéticos son testeados en roedores para evaluar el riesgo en humanos, sin embargo el Centro de Ciencia de Interés Público (CSPI, por sus siglas en inglés) afirmó que muchas de las pruebas se monitorean hasta los dos años (alrededor de 65 años humanos), lo cual es un error porque los cánceres pueden aparecer hasta el tercer año de vida del roedor (Potera, 2010).

2.1.1 Situación actual

Debido a la creciente demanda de alimentos procesados acaecida durante las últimas décadas, y con ella un aumento en el uso de los aditivos alimentarios (incluidos los colorantes sintéticos) (Diacu, 2016), se creó en 1963 la primera colección internacional de normas y directrices alimentarias: el Codex Alimentarius (CA), a cargo de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y de la Organización Mundial de la salud (OMS, por sus siglas en inglés). Ya en 1964 se creó el Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (CCFAC, por sus siglas en inglés), que se centra en la regulación de los niveles máximos permitidos para los distintos aditivos alimentarios (Amchova et al., 2015; FAO-OMS, 2016); por lo cual creó un Sistema Internacional de Numeración (INS, por sus siglas en inglés), que permite la identificación de los aditivos alimentarios en la lista de ingredientes por un número de tres dígitos que reemplaza su nombre (Amchova et al., 2015). Posteriormente la FAO desarrolló una base de datos denominada “Normas Generales para los Aditivos Alimentarios”, que recoge las pruebas disponibles de la actividad biológica de los aditivos alimentarios (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2016).

La creciente preocupación acerca de la calidad e inocuidad de los alimentos se ha visto reflejada en nuevas legislaciones reguladoras de dichos aditivos (Diacu, 2016). En 1994 expidió el Decreto del Buen Consumidor Alemán, que restringía el uso de varios colorantes azoicos en los bienes de consumo (Ausfertigungmtum & Verordnung, 1994), varios países de la UE siguieron el ejemplo e introdujeron legislaciones semejantes. En septiembre de 2003 la UE publicó la Directiva del Consejo N° 36 de 1994, una ley que regula el uso de los colorantes alimentarios; por lo cual prohíbe la fabricación y venta de bienes de consumo que tras análisis químico muestren presencia de aminas aromáticas cancerígenas (Diacu, 2016). Luego, en 2011 la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

(FDA, por sus siglas en inglés) clasificó los colorantes en dos categorías: Los exentos, que no requieren aprobación para su uso porque se derivan de fuentes naturales, y los certificados, que requieren aprobación porque su origen es sintético o artificial (U. S. Government Publishong Office, 2016). En la mayoría de los países, el uso de aditivos alimentarios (incluidos colorantes) es regido por una legislación estricta, que especifica qué colorante puede ser utilizado, la fuente, la pureza, y en qué concentración se pueden añadir a los alimentos. Para el caso de la UE, todos los países miembros comparten la misma legislación (Villaño et al., 2016), que actualmente es el reglamento N° 178 de 2002, que establece los principios generales y los requisitos de la legislación alimentaria. El uso específico de aditivos alimentarios en la UE, está regulado por la por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (AESA), perteneciente a la Comisión Europea (CE), con base en recomendaciones del CCFAC; para ello los aditivos se identifican con un código compuesto de la letra inicial E, seguida de tres dígitos (Amchova et al., 2015).

El uso de aditivos nocivos en la industria, sumado a la contaminación ambiental y gestión inadecuada de agroquímicos, que transmiten trazas tóxicas al ser humano, provocan el envejecimiento acelerado de la población, así como el aumento de las patologías cancerígenas. Por ello, se ha hecho necesaria la adopción de medidas de salud pública adaptables a países de todos los niveles de desarrollo económico. Con ello surge el término “envejecimiento saludable” como algo más que la ausencia de enfermedad (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2015b). Se reporta que alrededor de un tercio de las muertes por cáncer en países desarrollados podrían evitarse si se aumenta el consumo de productos naturales y orgánicos (Terry et al., 2001).

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; durante el año 2012 hubo 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes provocadas

por él. Más del 60% de los nuevos casos y el 70 % de las muertes anuales por cáncer a nivel mundial se produjeron en países en desarrollo, pertenecientes a África, Asia, Latinoamérica y el Caribe. Los países con más altos índices de mortalidad fueron Zimbabwe, Armenia y Mongolia; con 223, 220 y 194 muertes por cada 100 mil habitantes, respectivamente. Los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial en el hombre fueron los de próstata, pulmón, hígado, estómago, colon y recto; mientras que en la mujer predominaron los de mama, colon, recto, pulmón, cuello uterino y estómago (International Agency for Research on Cancer [IARC], 2014; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2015a).

A raíz de esto, en el 2013 la OMS puso en marcha el Plan de Acción Global para la Prevención y el Control de las Enfermedades No Transmisibles 2013-2020 que tiene como objetivo reducir la mortalidad prematura por enfermedades crónicas: cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y respiratorias crónicas. La OMS trabaja junto con la IARC (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2015a).

2.1.2 Situación futura

Stewart (2015) afirma que el cáncer es causado por el envejecimiento prematuro y la prevalencia de enfermedades crónicas, asociadas principalmente a países de bajos y medianos ingresos (International Agency for Research on Cancer [IARC], 2014). El envejecimiento prematuro favorece la aparición del cáncer debido a la acumulación en el tiempo de factores de riesgo, que pueden ser químicos, físicos y biológicos. Alrededor del 30% de las muertes por cáncer se deben a los factores de riesgo conductuales y dietéticos, principalmente: obesidad, ingesta reducida de frutas y verduras, consumo de alimentos con químicos nocivos, poca actividad física, consumo de tabaco y de alcohol (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2015a). Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas (International Agency for Research on

Cancer [IARC], 2014; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2015a). Si la humanidad continúa al ritmo que va, sin tomar medidas correctivas, su calidad de vida se verá afectada por la prevalencia de enfermedades crónicas que harán que el “envejecimiento saludable” sea sólo un mito.

2.1.3 Propuestas al desafío

Una mala alimentación influye mucho en la calidad de la salud de la población, pues está demostrado que puede reducir la inmunidad y aumentar la vulnerabilidad a las enfermedades (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2016). Por tanto, se propone basar las dietas en productos naturales; ya que está comprobado por estudios realizados durante más de 50 años que disminuyen el riesgo de sufrir enfermedades crónicas (diabetes, enfermedades cardiovasculares, obesidad...) y cáncer (Terry et al., 2001). Algunos fabricantes de alimentos ya emplean colorantes de origen natural entre sus aditivos alimentarios, mientras otros todavía no han accedido al cambio. Por ejemplo; el refresco naranja de Fanta en Reino Unido es coloreado con extractos de calabaza y zanahoria mientras la versión estadounidense es coloreada con Rojo 40 y Amarillo 6; el helado rosado de McDonald’s en Reino Unido es coloreado con fresas mientras el de Estados Unidos es coloreado con Rojo 40 (Potera, 2010).

Los pigmentos naturales presentan por lo general propiedades bioactivas y un menor riesgo para la salud de los consumidores, por eso son de interés reciente en la industria alimentaria y farmacéutica. Se pueden clasificar en: Antocianinas, betalaínas, carotenoides, clorofilas, curcumina, mioglobina y hemoglobina, y los formados tras procesamiento de los alimentos (melanoidinas, pigmentos de *Monascus*) (Villaño et al., 2016). A continuación se describe brevemente cada uno.

Antocianinas: son compuestos vegetales pertenecientes al grupo de los flavonoides, que constan de dos anillos aromáticos complementados con una o más moléculas de azúcar.

Proporcionan un color entre rojo y púrpura a azul, sin embargo esta forma coloreada se ve afectada por el pH, tendiendo a incoloro a medida que este aumenta. Se ha comprobado actividad biológica antioxidante, anti-inflamatoria, antimicrobiana y anticancerígena. Las antocianinas más comunes en la naturaleza son: pelargonidina, peonidina, petunidina, malvidina, cianidina y delphinidina (Pascual, Moreno, & García, 2010).

Betalainas: son pigmentos nitrogenados solubles en agua, que proporcionan los colores rojo-violeta (betacianinas) y los amarillos (betaxantinas) a algunas frutas y verduras, de acuerdo con su pH, que puede variar de 3,0 a 7,0. A pesar de que pocos alimentos le contienen, principalmente la remolacha, acelgas, Amaranto, nopal, pitahaya, y algunos tubérculos; sólo se ha estudiado su actividad antioxidante, mientras su relevancia fisiológica no ha sido completamente abarcada mediante casos clínicos en humanos. Por tanto no se sabe qué implicaciones secundarias puedan presentar en la salud humana (Moreno, García-Viguera, Gil, & Gil-Izquierdo, 2008).

Carotenoides: Molecularmente son isoprenoides, responsables de las coloraciones rojo, naranja y amarillo de muchas verduras y frutas; y constituyen el grupo más amplio de pigmentos en naturaleza. Se han identificado alrededor de 60 diferentes carotenoides, distribuidos en dos grupos: carotenos y xantofilas. En el primer grupo se destacan el β -caroteno y el licopeno; mientras en el segundo grupo se destacan la luteína y zeaxantina. Su bioaccesibilidad se ve limitada y condicionada a Bioaccesibilidad de carotenoides es limitado y condicionado a los métodos de procesamiento de los alimentos. Se reportan actividades hipocolesterolémicas, antioxidantes, anticancerígenas e inmunomoduladoras (Fernández-García et al., 2012).

Clorofilas: se encuentran en el pigmento verde de las cianobacterias y en los cloroplastos de algas y células vegetales. Su estructura es tetra-pirrólica con un centro activo de magnesio

y un grupo fitol, con naturaleza hidrófila, lo que favorece su bioactividad. Son abundantes en los vegetales de hojas verdes, sin embargo su bioaccesibilidad está condicionada al procesamiento; donde por lo general pierde los iones de Mg en condiciones de alta temperatura, formándose feofitina (de color verde oliva), lo que el consumidor percibe como pérdida de la calidad. Se ha reportado actividad antioxidante, anti-mutagénica y quimiopreventiva; su absorción intestinal se ve limitada por su inestabilidad (Villaño et al., 2016).

Curcuminoides: son extraídos de los rizomas de la planta *Cúrcuma longa*; se destacan: la curcumina, la demetoxicurcumina y la bisdemetoxicurcumina. Se consumen por lo general en forma de polvo y constituyen el principal ingrediente del curry. Presentan amplia actividad biológica hipoglucémica, hipolipidémica, anticancerígena y antiinflamatoria. No obstante, exhiben escasa biodisponibilidad, debido a la mala absorción, insolubilidad en agua, metabolismo rápido, extensa recirculación enterohepática, y eliminación sistémica rápida en la bilis y la orina, alrededor del 40 % (Shehzad, Ha, Subhan, & Lee, 2011).

Hemoglobina y la mioglobina: son metaloproteínas con núcleos de hierro, responsables del color de la carne. La principal función biológica de estas sustancias está relacionada con la administración de oxígeno en el cuerpo. La mioglobina es susceptible a la tensión de oxígeno, sufriendo cambios en su estructura; si la tensión es baja la carne se torna de un color rojo-púrpura; en caso contrario se torna de color rosa brillante o rojo. Una mayor degradación de mioglobina por presencia interacción con el oxígeno genera en la carne pigmentación marrón a verde oscuro (Ordway & Garry, 2004).

Melanoidinas: son compuestos de estructura polimérica heterogénea que se forman a través de la reacción de Maillard e imparten un color marrón a los alimentos. Están presentes en una amplia gama de productos, tales como malta de cebada, corteza de pan, vinagre

balsámico, salsa de tomate, y café tostado. Se reporta actividad antioxidante, prebiótica, antitumoral y antibacteriana. No obstante, son difíciles de aislar y su digestión en el tracto gastrointestinal humano es difícil, por lo que suelen salir en la orina alrededor del 30 % de la ingesta (Villaño et al., 2016).

Microbianos: el arroz de levadura roja o angkak, es un producto alimenticio fabricado tras la fermentación de arroz cocido al vapor con hongos del género *Monascus spp.*, se producen principalmente: colorantes rojos (rubropunctamina y monascorubramina), anaranjados (rubropunctatina y monascorubrina) y amarillentos (monascina y ankaflavina). El polvo de angkak ha usado durante siglos en Asia oriental como colorante y saborizante de vinos, vinagre, queso de soja, pasteles, entre otros productos, y como conservante de alimentos, principalmente de carne y pescado, en los cuales actúan como sustitutos de los nitritos y la eritrosina, cuyo carácter cancerígeno ya ha sido comprobado (Pattanagul et al., 2007; Pattanagul, Pinthong, Phianmongkhol, & Tharatha, 2008). Los pigmentos de *Monascus spp.* han mostrado actividad hipocolesterolémica (Heber et al., 1999), anti-obesidad (Choe et al., 2012), anticancerígena (Y.-W. Hsu et al., 2011), antiinflamatoria (Cheng et al., 2012), hipotensora (Kuba et al., 2009), antifúngica (Tu et al., 2016), antibacteriana (Mukherjee & Singh, 2011), osteo-protectora (Villaño et al., 2016), entre otras. Sin embargo, se ha cuestionado su uso porque *Monascus spp.* produce citrina (Pattanagul et al., 2007), una micotoxina que ha mostrado efectos cancerígenos, mutágenos, citotóxicos, hepatóxicos, nefrotóxicos y teratógenos en ciertos estudios (Chan & Shiao, 2007), lo que pone en juego el reconocimiento de inocuidad GRASS dado por la FDA (Nout, 2007). Para evaluar el riesgo se han realizado exámenes genómicos, encontrándose que sólo las cepas de las especies *M. purpureus* y *M. kaoliang* poseen los genes que expresan citrina (Y.-P. Chen et al., 2008), lo cual es bueno pues se han identificado al menos 20 especies del género *Monascus spp.*, de las cuales varias también expresan la producción de pigmentos (Species Fungorum, 2016).

Además, recientemente, se desarrolló un método que permite separar la citrina de los alimentos mediante su unión a nanopartículas magnéticas de Superficie Activa Maghemita (Magro et al., 2016). Los pigmentos ankaflavina, monascolubrina y xantomonacinas ya han sido aprobados por la U.S. Food and Drug Administration (FDA, 2013) para su adición a los alimentos; al igual que la Monacolina de *M. pilosus* como suplemento nutricional para el tratamiento de la hipercolesterolemia (FDA, 2016).

Otros pigmentos de origen microbiano también han sido avalados para su uso en la industria alimentaria, estos son: astaxantinas del hongo *Phaffia spp.* y del alga *Haematococcus spp.*; ficocianinas del alga *Spirulina spp.* (FDA, 2013); y rivo flavinas del hongo *Eremothecium ashbyii*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria *Bacillus subtilis* (Villaño et al., 2016). Las ventajas de la producción de pigmentos de origen microbiano incluyen: la rápida producción del pigmento, el fácil crecimiento del microorganismo en un medio de cultivo barato, la independencia de la producción con respecto a las condiciones climáticas y la posibilidad de producir diferentes tonalidades de pigmentos dependiendo del medio de cultivo empleado (Venil, 2009). Por lo tanto, la producción de pigmentos de origen microbiano es un área de investigación emergente con gran potencial para diversas aplicaciones industriales; gracias a sus altos rendimientos y rápida velocidad de producción, podría plantearse como una alternativa tanto para la industria alimentaria, como para la textil y la de tintes para cabello.

Desafío local

Latinoamérica

Hasta hace poco, se consideraba que la carga de enfermedad por padecimientos transmisibles predominaba en los países en vías de desarrollo mientras la carga de enfermedad por padecimientos crónicos (obesidad, hipertensión, diabetes e hiperlipidemia)

predominaba en los países desarrollados. No obstante, en la región de Latinoamérica y del Caribe (LATAM) está aumentando significativamente la carga de enfermedad por causas crónicas, que generan el 60 % de las muertes en la región (Mitra & Rodríguez-Fernandez, 2010; Terry et al., 2001). La gestión de las enfermedades crónicas y del envejecimiento acelerado de la población es una preocupación tanto de la OMS como de los gobiernos locales; ya que esto conlleva a un aumento de los costos y demanda de los servicios de salud (Dmytraczenko & Almeida, 2015).

Ecuador

El Ecuador, a pesar de contar todavía con zonas agrícolas libres de transgénicos y agroquímicos, no se escapa del auge de los aditivos alimentarios en la comida procesada. Por ello se creó en 1970 el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) mediante Decreto Supremo No. 357, que expidió la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 074:2012, que habla de los Aditivos Alimentarios Permitidos Para Consumo Humano: Listas Positivas y Requisitos (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2016). En dicha norma se aprueba el uso de los siguientes colorantes alimenticios sintéticos, con base en una dosis máxima: Amarillo Ocaso FCF, Azul Brillante FCF, Cantaxantina, Caramelo III o Caramelo al Amoniaco, Caramelo IV o Caramelo al Sulfato Amónico, Carbonato de Calcio, Carmín, Carotenoides, Clorofilinas, Eritrosina, Extracto de piel de uva, Extractos de Annato, Indigotina, Óxidos de Hierro, Ponceau 4R o Rojo de Colchinilla A, Riboflavinas, Rojo Allura AC y Verde Sólido FCF. Existen otros colorantes que no presentan restricciones de este tipo, como: Caramelo I o Caramelo Puro, Carbonato de Calcio, Clorofilas, Dióxido de Titanio y Rojo de Remolacha (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2012). En contraste, algunas comunidades indígenas ecuatorianas emplean todavía colorantes de origen natural, principalmente: marrón oscuro de las nueces negras, naranja del achiote y rojo a rosado de la

colchinilla. Los emplean principalmente para la alimentación, la cosmética y los textiles (Pro-Ecuador, 2014).

Varios los colorantes permitidos a nivel nacional como Rojo de Allura AC, Indigotina, Eritrosina y Ponceau 4R tienen efectos cancerígenos y neurodegenerativos, mientras el amarillo Ocaso afecta la salud reproductiva. Según los datos de la OMS correspondientes a los años 2012-2014, la población ecuatoriana tiene el 12 % de probabilidades de morir por enfermedades crónicas entre los 30 a 70 años. Las muertes provocadas por enfermedades crónicas ascienden a 409 por cada 100 000 habitantes, de las cuales el 26 % corresponde a fallecimientos por cáncer (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2012). En el artículo 23 de la Constitución Pública de la República del Ecuador se establece la salud como un derecho civil que el Estado reconocerá y garantizará a las personas en condiciones de igualdad (Asamblea Nacional, 2008). Por ello, es responsabilidad del estado incursionar alternativas favorables para la salud de la población, como es el cambio rotundo de los aditivos empleados en la industria.

2.2 Género *Monascus* spp.

Monascus spp. es un género de hongo ascomiceto filamentoso descrito desde 1884; pertenece a la familia Monascaceae, usualmente es conocido como moho rojo (Vidyalakshmi, Paranthaman, Muruges, & Singaravadivel, 2009). Se reportan en la literatura alrededor de 20 especies (Species Fungorum, 2016), de las cuales *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber* y *M. floridanus* son las de mayor importancia biotecnológica, por su uso tradicional en la comida oriental (Sabater-Vilar, Maas, & Fink-Gremmels, 1999), donde es muy empleado como colorante y/o conservante del vino, el pescado, las carnes, el queso, el arroz, entre otros

productos (Julio Carvalho et al., 2005; Pattanagul et al., 2007). Sus compuestos son en su mayoría biológicamente activos, presentando aplicaciones potenciales y presentan diversas aplicaciones como aditivos en las industrias cosmética, de alimentos y de medicamentos, principalmente (Pattanagul et al., 2007; Pisareva & Kujumdzieva, 2010).

Las monacolinas y los pigmentos son los metabolitos de mayor importancia biotecnológica. Las monacolinas, son un tipo de lovastatina natural, que son capaces de disminuir el colesterol en la sangre, gracias a la inhibición competitiva de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG Co-A) que cataliza la biosíntesis del colesterol. Por tanto se pueden emplear para el tratamiento de la hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares (Endo, 1979; Heber et al., 1999). Por su parte, los pigmentos son los metabolitos de *Monascus spp.* más ampliamente utilizados en la industria alimentaria y biotecnológica como colorantes naturales, saborizantes y conservantes (Pisareva & Kujumdzieva, 2010), y su uso se ha extendido gracias al carácter carcinógeno que se ha reportado de los colorantes sintéticos durante los últimos años. Los pigmentos de coloración roja son los de mayor importancia, ya que pueden ser utilizados como sustitutos de los nitritos y la eritrosina en la elaboración de los cárnicos (Julio Carvalho et al., 2005). Sin embargo, se ha cuestionado su empleo porque *Monascus spp.* produce citrina, anteriormente llamada monascidin A (Pattanagul et al., 2007); la cual es una micotoxina que también es producida por *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* y tiene efectos cancerígenos, mutágenos, citotóxicos, hepatóxicos, nefrotóxicos y teratógenos (Chan & Shiao, 2007), lo que pone en juego el reconocimiento de inocuidad GRASS que la FDA ha dado a los pigmentos de *Monascus spp.* (Nout, 2007). Para evaluar el riesgo se han realizado exámenes genómicos, encontrándose que sólo las cepas de las especies *M. purpureus* y *M. kaoliang* poseen los genes que expresan citrina (Y.-P. Chen et al., 2008). Además, recientemente, se desarrolló un método que permite separar la citrina de los alimentos mediante su unión a nanopartículas

magnéticas de Superficie Activa Maghemita, gracias a los grupos quelantes de hierro que posee, principalmente Ceto-enoles (Magro et al., 2016).

En vista de los altos costos económicos de la nanotecnología, es importante seleccionar empíricamente las cepas de *Monascus spp.* que producen grandes cantidades de biopigmentos con bajo o nulo contenido de citrinina (M.-H. Chen & Johns, 1993). En este contexto, es necesario describir aspectos claves para la obtención de cepas puras de *Monascus spp.* mediante una amplia revisión de la literatura que permita la óptima elección de las cepas con fines industriales.

2.2.1 Aislamiento de cepas

Se reportan aislamientos a partir de alimentos como puré de sorgo (T. F. Lin & Demain, 1991), arroz contaminado (Julio Carvalho et al., 2005), aceitunas verdes procesadas térmicamente (Efstathios Z. Panagou et al., 2002), angkak (Ji Kim et al., 2010), cuajada de soja fermentada (Yongsmith et al., 1993), papas, avena, frutas y forraje ensilado (Samson et al., 2002); suelo pedregoso-arenoso (Stchigel et al., 2004); arena de raíz de pino (Barnard & Cannon, 1987); sedimentos de ríos (Cannon et al., 1995); ecosistemas marinos (Landy & Jones, 2006); cuerpos de agua dulce (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979) y combustible de aviación (Vasilyeva et al., 2012). Las muestras se toman con un asa y se depositan en alguno de los medios de cultivo reportados en la literatura para el aislamiento de *Monascus spp.*: Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), Agar Sabouraud, Solución agarosa de Czapek (Palo et al., 1960), Agar Batata Dextrosa (BDA, por sus siglas en inglés) (Macario et al., 1960), Agar Rosa Bengala con cloranfenicol (Chairote et al., 2007) y Medio Wong modificado (T. F. Lin & Demain, 1991). Si el material para el aislamiento fueron granos invadidos por el hongo se recomienda esterilizar primero mediante dos inmersiones en etanol al 95 % durante 30 segundos y una lavada intermedia en solución acuosa de hipoclorito de

sodio al 0,1 % durante uno a cuatro minutos (Chairote et al., 2007). Para el caso especial de las cepas encontradas en los sedimentos y suelo se aplica el método de aislamiento de placa directa y el medio de cultivo Agar Patata Zanahoria (PCA, por sus siglas en inglés) (Cannon et al., 1995; Stchigel et al., 2004).

Los medios de cultivos inoculados se incuban entre 29 a 32 ° C durante 10 días, o hasta que el micelio se propague por toda la caja de Petri (Julio Carvalho et al., 2005; T. F. Lin & Demain, 1991). También se registran las siguientes condiciones de cultivo: 25 a 30 ° C durante siete días (Park et al., 2004), 30±2 °C durante 3 a 5 días (Chaisrisook, 2002).

2.2.2 Identificación de especies

Algunos de los medios reportados comparación de características de la colonia y tasas de crecimiento se emplean por lo general los siguientes medio de cultivo: Agar autolisado de Levadura Czapek (CYA, por sus siglas en inglés), Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Glicerol 25 N (G25N), Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Harina de Avena (OMA, por sus siglas en inglés), Agar de Harina de Maíz (CMA, por sus siglas en inglés) a 25 °C durante 7 días. Las mediciones y observaciones tanto de los caracteres morfológicos de las colonias (tamaño, color, forma, textura...) como de los caracteres microscópicos del micelio (hifas, conidios, cleistotecios, esporas, ramificaciones...) se hacen con lactofenol como medio de montaje (Shao et al., 2011; Stchigel et al., 2004).

Monascus spp. se distingue principalmente por su etapa Basipetospora anamorfa y por su cuerpo fructífero o ascoma, que es un cleistotecio ubicado en los extremos de las hifas ramificadas del micelio vegetativo. El cleistotecio se conforma de dos capas: la interna está formada por la ampliación de las regiones apicales de las hifas, mientras que la externa consiste de un entretejido de hifas que forman su "envoltura". Los ascos dentro de los cuerpos fructíferos están dispuestos al azar y son degradados en las primeras etapas de formación de

esporas sexuales (Vasilyeva et al., 2012). Es un hongo homotálico, es decir su reproducción sexual se da por dos gametos aportados por el mismo talo (Kamolnan Lakrod et al., n.d.). Las esporas sexuales se denominan ascosporas mientras las asexuales se denominan conidiosporas; y entre ambos tipos de esporas se forma los tubos germinativos (Cousin & Blackburn, 2006; Wong & Bau, 1978). Dichas esporas son resistentes al calor y pueden crecer en medios con niveles reducidos de oxígeno, lo que es característico del género (Efsthios Z. Panagou et al., 2002). Las hifas son septadas (tabicadas), pero la forma y textura del micelio depende del tipo de especie. El desarrollo de las hifas aéreas y la producción de metabolitos secundarios son modulados por la proteína *mrflbA* (Shao et al., 2011).

Se establece que si dos cepas pertenecen al mismo Grupo de Compatibilidad de Micelio (GCM) al sembrarlas en el mismo medio de cultivo crecen como una sola colonia, de lo contrario son incompatibles (Chaisrisook, 2002). A continuación se listan algunas características de especies reportadas en la literatura:

M. purpureus: su micelio es blanco en los primeros estados de crecimiento, luego vira al color rosa por la producción de pigmentos, posteriormente se torna de color anaranjado-amarillento característico, con un consecuente aumento de la acidez del medio, y finalmente toma color rojo intenso. Sus ascosporas son esféricas o ligeramente ovoides, con un diámetro de 5 micras o 6x5 micras, respectivamente. Sus conidios son abundantes, germinan más rápido y requieren más nutrientes exógenos que las ascosporas, sin embargo son menos resistentes al calor. Es la especie más común porque a partir de él se produce el arroz rojo o angkak (Pattanagul et al., 2007; Wong & Bau, 1978).

M. pallens: la colonia crece circular, su micelio aéreo es casi ausente y sin pigmentación (al igual que *M. floricidans*). Las hifas son hialinas, tabicadas, de pared delgada, piriformes,

escasamente ramificadas, sin incrustaciones cristalinas, y ocasionalmente anastomosan; producen conidios abundantemente. Presenta ascosporas elipsoidales de pared gruesa y ascomas parduzcos compuestos por células angulares. Los ascos son difíciles de observar y es probable que sus paredes se descomponen antes de que se formen las paredes de ascosporas. El perfil enzimático es similar al de *M. pilosus* y *M. purpureus*, a diferencia de que no tiene actividad α -galactosidasa y β -galactosidasa como el primero, ni cisteína arilamidasa como el segundo (Cannon et al., 1995).

M. sanguineus: la colonia es de forma irregular, plana y varía de flocosa a algodonosa. Su micelio es inicialmente blanco y luego vira entre rosado a rojo grisáceo. Las hifas tienen paredes lisas, son irregularmente ramificadas, varían de hialinas a marrón pálido. Produce ascomas abundantemente, los cuales tienen forma más o menos globosa y coloración marrón pálida, con ascosporas elipsoidales y gruesas, pero sin presencia de ascos. Morfológicamente es similar a *M. ruber*, pero sin actividad leucina arilamidasa y α -galactosidasa. De *M. pilosus* y *M. purpureus* se diferencia en que estos tienen ascomas carentes de color; además no produce las enzimas leucina arilamidasa, α -galactosidasa y β -galactosidasa que produce el primer, como la leucina arilamidasa y cisteína arilamidasa que produce el segundo (Cannon et al., 1995).

M. argentinensis: su micelio es abundante, delicadamente algodonoso, de color hialino a marrón pálido o gris con márgenes blancos, sin pigmentos solubles. Las hifas son tabicadas, de paredes delgadas, hialinas o de color ligeramente marrón y ramificadas, que anastomosan a veces en fascículos. Produce copiosamente artroconidias o clamidosporas esféricas con forma de barril, intercaladas o laterales, solas o en cadena. Los conidióforos son erectos con conidiosporas simples o formadas en cadenas cortas de basipétalos, generalmente transmitidas terminal. Las conidiosporas son hialinas a café oliváceo pálido, de pared gruesa

cuya forma varía de la globosa a la piriforme, con una base aplanada. Los ascomas son abundantes, no tienen ostiolo, son globosos, de color café oliváceo oscuro, con la cavidad llena de ascosporas hialinas y elipsoidales a globosas (Stchigel et al., 2004).

M. ruber: Presentan numerosos ascomas circulares y lisos; llenos de ascosporas incoloras, lisas y ovoides de base achatada. Las conidiosporas pueden estar aisladas o ligadas formando cadenas; generalmente son más grandes que las ascosporas, pero su tamaño puede variar hasta alcanzar dimensiones demasiado pequeñas, donde reciben el nombre de microconídios. Las colonias presentan un crecimiento muy rápido, con una morfología algodonosa, circular, rugosa y de coloración rojo-púrpura opaco (Macario et al., 1960).

M. floridanus: tiene mucho menos ascosporas que *M. sanguineus*, carece de pigmentos rojos y carece de actividad valina arilamidasa; no obstante presenta actividad cisteína arilamidasa (Cannon et al., 1995).

Existen nueve especies del género *Monascus spp.* aceptadas internacionalmente con base en caracteres de cultivo, sin embargo se reportan en la literatura más de 20 especies (Species Fungorum, 2016), de las cuales muchas son sinónimo; de modo que las identidades genéticas de este género están todavía en debate. Tradicionalmente, la identificación microbiana se basa en caracteres fenotípicos, incluyendo propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Shao et al., 2011). Pero esta forma de identificación aplicada a los mohos está cada vez más en desuso, cobrando mayor importancia los métodos de detección de compuestos volátiles, los inmunoensayos, las técnicas moleculares y la espectroscopía de infrarrojo (Cousin & Blackburn, 2006).

Los marcadores moleculares, independientemente de las condiciones culturales proporcionan una herramienta viable para la discriminación de genotipos estrechamente relacionados y la determinación de relaciones genéticas entre diferentes cepas de *Monascus*

spp. (Shao et al., 2011). Se han empleado varios marcadores moleculares como Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) (K. Lakrod, Chaisridook, Yongsmith, & Skinner, 2000; Shinzato, Namihira, Tamaki, Tsukahara, & Matsui, 2009), el gen de β -tubulina, el Espaciador Transcribible Interno (ITS, por sus siglas en inglés) del ADNr (Park et al., 2004) y *Monascus* Retro-Transposón (MRT) (Y.-P. Chen, Tseng, Liaw, Wang, & Yuan, 2007). Estos métodos tienen sus propias ventajas y desventajas. Por ejemplo, RAPD e ITS son fáciles de manejar, pero el primero tiene baja reproducibilidad mientras el segundo presenta dificultad en la alineación todos los taxones. Por su parte, el análisis filogenético basado en el gen β -tubulina es consistente con las alineaciones pero no alcanza a diferenciar entre *M. ruber* y *M. pilosus*. MRT es dependiente del Southern blotting, por ende, un proceso muy demorado (Shao et al., 2011). Shao y colaboradores (Shao et al., 2011) proponen los marcadores de Repetición Inter-Simple de Secuencias (RISS) y Polimorfismos Amplificados de Secuencias relacionadas (PAS) como alternativas moleculares para la clasificación e identificación de cepas de *Monascus spp.* a gran escala o como complementos de los métodos tradicionales, gracias a su simplicidad, reproducibilidad y polimorfismo. El RISS utiliza sólo un cebador para amplificar fragmentos de ADN entre dos microsatélites de repetición idénticos (Zietkiewicz, Rafalski, & Labuda, 1994), mientras el PAS marca objetivos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés) en el genoma utilizando un diseño único de los pares de cebadores (Li & Quiros, 2001). PAS es más informativo que RISS, ya que produce bandas más polimórficas; sin embargo, los dendogramas son muy parecidos pese a las inconsistencias menores en la posición de algunos subgrupos, debido a que amplifican en una región diferente del genoma (Shao et al., 2011).

2.2.3 Caracterización

Entre las actividades biológicas de los metabolitos producidos se encuentra: Hipocolesterolemia (Heber et al., 1999), anti-obesidad (Choe et al., 2012), anticancerígena (Y.-W. Hsu et al., 2011), antiinflamatoria (Cheng et al., 2012), hipotensora (Kuba et al., 2009), antifúngica (Tu et al., 2016), antibacteriana (Mukherjee & Singh, 2011), entre otras. Que son otorgadas por los compuestos biológicamente activos que produce.

La cantidad y tono de los pigmentos producidos es influenciado por el tipo de cepa y su perfil metabólico, al igual que por los nutrientes del medio (fósforo y nitrógeno, principalmente), y las condiciones (temperatura, pH y humedad,) y métodos de cultivo (Julio Carvalho et al., 2005). *Monascus spp.* es un hongo que puede crecer en un rango de temperatura desde los 15-18 °C hasta los 45 °C, aunque su óptimo se encuentra entre 25 a 37 °C. Igualmente, puede crecer en un rango de pH de 2,5 a 8,0; siendo el ideal 4,0-7,0 (Julio Carvalho et al., 2005). Aunque se reportan casos donde *M. ruber* ha crecido en un rango de pH de 1,7 a 2,0 y una temperatura de 80°C (Nout, 2007).

2.2.4 Almacenamiento y conservación

Para el almacenamiento de las cepas se emplea usualmente el medio de cultivo PDA a 4°C (Y.-P. Chen et al., 2008). También se reporta el almacenamiento de cepas en Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés) a 2°C. Para garantizar la viabilidad de las cepas almacenadas en agar, se debe repicar, es decir, realizar subcultivos mensualmente durante un semestre antes de emplear la cepa.

Se reporta que los mejores métodos de almacenamiento de cepas para su conservación en BRG son la liofilización y la crio-preservación en nitrógeno líquido, manteniéndose la estabilidad genética durante más de 40 años (Hawksworth, 1985; Nagai et al., 2005) a una temperatura de -70 °C (Ji Kim et al., 2010).

2.2.5 Producción industrial

Actualmente, muchas investigaciones han declarado que los cambios en algunos parámetros de cultivo de estos microorganismos pueden desencadenar en cambios metabólicos, lo que conlleva a uno de los principales problemas del escalado industrial, que es la reproducibilidad. Además, la cantidad y tipo de metabolitos producidos por Fermentación en Estado Sumergido o Líquido (FEL) difieren con los producidos por Fermentación en Estado Sólido (FES); fenómeno que siempre ha limitado la innovación de nuevos sistemas de cultivo (H. Kim, Kim, Oh, & Shin, 2002), por lo que se sigue generando investigaciones para determinar el método más apropiado para el cultivo de *Monascus spp.* Zhang y colaboradores (Zhang, Lu, Jun Xia, Wang, & Xu, 2013), en varios de sus trabajos han comparado estos métodos mediante modelación matemática, evaluando diferentes parámetros y su influencia en el crecimiento celular de *Monascus spp.* y su producción de metabolitos secundarios (Zhang, Lu, & Xu, 2015).

Durante la primera etapa del período de fermentación, el hongo utiliza el carbono y el nitrógeno para la síntesis de sus metabolitos primarios, energía, CO² y agua; luego utiliza los dichos productos para producir sus metabolitos secundarios. Por esa razón los metabolitos secundarios sólo pueden ser detectados después de que haya culminado la etapa de crecimiento (Ghorai, Banik, & College, 2011). En la figura 1 se representan las estructuras de algunos de los metabolitos producidos por este hongo.

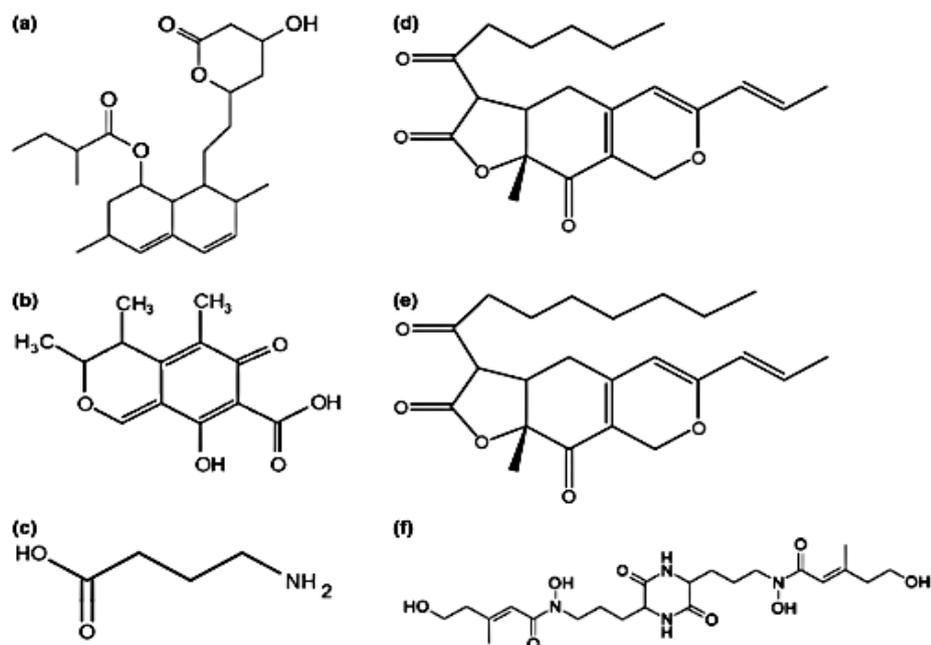


Figura 1. Estructura química de algunos de los metabolitos secundarios producidos por *Monascus spp.* a) *monacolina K*, b) *citrinina*, c) *Ácido Gama-Amino Butírico (GABA)*, d) *monascina*, e) *Ankafalvina*, y f) *ácido dimerómico*. Fuente: (Mukherjee & Singh, 2011; Pan & Hsu, 2014).

Se han hecho diversas evaluaciones de la eficiencia de producción de pigmentos de *Monascus spp.* mediante Fermentación en Estado Sólido (FES) o Fermentación en Estado Líquido (FEL), con el objetivo de intentar cerrar las brechas de escalado; es decir, que los rendimientos se puedan mantener aun cuando se pase de la escala laboratorio a la industrial. Debido a los bajos rendimientos obtenidos mediante FES, se han enfocado las investigaciones hacia la FEL, que presenta mayores rendimientos; sin embargo, se buscan bajos costos de producción, ámbito en el cual la FES es fuerte (Pineda-insuasti, Ramos-sánchez, & Soto-arroyave, 2014; Suárez Arango & Nieto, 2013). Para facilitar las previsiones de producción en *Monascus spp.* se propone el método de redes neuronales que explica mucho mejor los fenómenos de síntesis de metabolitos en contraste con los tradicionales modelos polinómicos, sobre todo con respecto a la dinámica de los parámetros de operación:

temperatura, pH, humedad y concentración de sustrato (E Z Panagou, Kodogiannis, & Nychas, 2007; Singh, Goel, Singh, Pathak, & Kaushik, 2015). En la tabla 3 se relacionan algunas condiciones de fermentación reportados en la literatura para la producción de pigmentos.

Múltiples técnicas de cultivo se han experimentado para aumentar los rendimientos de producción. Algunos investigadores emplean la ingeniería genética para hacer híbridos con mejores cualidades industriales. Se han producido cepas de *Monascus spp.* productoras de pigmentos amarillos con potencial industrial mediante la unión de los protoplastos de dos cepas con cualidades deseadas; una cepa productora de pigmento amarillo, pero de lento crecimiento, y una cepa acromática de rápido crecimiento. Lo más conveniente para este tipo de técnicas es elegir dos líneas celulares parentales con diferente requerimiento de aminoácidos análogos (Klinsupa, Phansiri, Thongpradis, Yongsmith, & Pothiratana, 2016). De igual manera, otros investigadores han optado por los sistemas en cocultivo de *Monascus spp.* con otros hongos como *Saccharomyces cerevisiae* o *Aspergillus orizae*, lo que ha dado muy buenos resultados en la mejora de la eficiencia de producción de pigmentos, entre 20 a 40 superior en contraste con el monocultivo de *Monascus spp.*; sin embargo se ve afectada de manera drástica la morfología del moho por la secreción de enzimas hidrolíticas. Se desconoce qué consecuencias pueda traer este cambio morfológico en la inocuidad del pigmento (Shin, Kim, Kim, & Ju, 1998).

Algunas investigaciones han enfatizado en la eficiencia de extracción de dichos metabolitos. Por ejemplo, se han probado un conjunto de biosurfactantes no iónicos como el Triton X-100 para aumentar la eficiencia de extracción de los metabolitos, al liberar los pigmentos producidos intracelularmente, lo que se ve reflejado en un aumento de la concentración de pigmentos a nivel extracelular (Hu, Zhang, Wu, Qi, & Wang, 2012b). Así

mismo, se reportan nuevos procedimientos como el “milking”, que permite drenar productos intracelulares a través de la membrana celular y aumentar de manera mucho más sencilla la eficiencia de extracción de los componentes de interés. Una limitante de este nuevo procedimiento es que el drenaje cesa cuando las concentraciones de productos intracelulares equiparan las concentraciones de productos extracelulares. En contraste, los biosurfactantes no iónicos generan un gradiente de concentración que permite el traspaso de sustancias a través de la membrana celular, gracias a las discrepancias de pH y de potencial eléctrico, lo que se conoce como proceso de micro-emulsión (Kang, Zhang, Wu, Qi, & Wang, 2013; Shen, Zhang, Liu, & Wang, 2014). Xiong y colaboradores (Xiong, Zhang, Wu, & Wang, 2014), lograron producir intracelularmente pigmentos anaranjados de *Monascus anka*, y luego los exportaron a través de la membrana celular al medio extracelular, de este modo mejoraron la producción de pigmentos rojos por gradiente de concentración.

También se ha incursionado en la biología molecular como una forma de regular la producción de metabolitos de interés. Por ejemplo, la Proteína LaeA es una metiltransferasa capaz de regular la síntesis de diferentes metabolitos secundarios en *Aspergillus spp.* incluyendo aflatoxinas, esterigmatocistina, penicilina, emericelamida, terrequinona, gliotoxina y lovastatina (Liu et al., 2016). Su influencia se evaluó en *Monascus ruber*, comprobándose que en esta especie modifica y regula la actividad sexual y asexual del microorganismo, lo que influye en la eficiencia de producción de biomasa fúngica (Liu et al., 2016). De igual forma, se han estudiado las similitudes en los precursores de los diferentes pigmentos, que en alguna etapa de la fermentación o en respuesta a las variaciones de los parámetros de operación vayan cambiando su estructura hasta formar el pigmento determinado. La necesidad de conocer la bioquímica y biosíntesis de los metabolitos ha sido tan importante para la expresión de compuestos de interés. Se han supuesto que algunos ácidos grasos como el octanóico y el hexanóico, son posibles precursores de pigmentos

(Campoy, Rumbero, Mart'in, & Liras, 2006). Dichos ácidos no interfieren directamente en la producción de pigmentos, pero son capaces de degradar la acetil-coenzima A (CoA), lo cual es bueno para los pigmentos sintetizados a partir de la policétido sintasa, mejorando indirectamente los niveles de producción de pigmentos (Campoy et al., 2006; Hassan Hajjaj et al., 2000). La interacción del complejo de policétido sintasa y el acetil coenzima A, lleva a la producción de pigmentos naranjas, mientras la producción de pigmentos amarillos no está del todo clara cómo se origina.

Fermentación en estado sólido (FES)

La Fermentación en Estado de Sólido se caracteriza por ser uno de los métodos más utilizados a escala de laboratorio, por su fácil manejo y bajo costo. Además, muchos reportes han evidenciado un muy buen comportamiento de *Monascus spp.* en este tipo de fermentación. Algunos estudios han revelado que las mejores condiciones para la producción de *Monascus spp.* las brinda la FES, con la cual se obtienen buenas proporciones de producto y bajos costos de producción, al emplear residuos agroindustriales como materia prima (Velmurugan et al., 2011). Emplear sustrato sólido no solo genera bajos costos de producción, sino que también favorece el anclaje o agarre de los microorganismos al medio. Se han empleado residuos agroindustriales como granos de sorgo, salvado de sorgo, de arroz o de trigo, yuca, casabe, papa en polvo, entre muchos otros, previamente remojados (Babitha, Soccol, & Pandey, 2007; Sharmila, Nidhi, & Muthukumar, 2013; Srianta & Harijono, 2015). La diferencia entre emplear el grano entero o el salvado como sustrato radica en la inducción de la producción de cierto tipo de pigmentos; para el primer caso se favorece la producción de pigmentos solubles en etanol mientras para el segundo caso se favorece la producción de pigmentos solubles en agua (Srianta & Harijono, 2015). El producto final normalmente puede ser secado al sol o deshidratado en un horno a 45°C por un periodo de

24-48 horas, hasta alcanzar un contenido de humedad de aproximadamente el 10 % (Pan & Hsu, 2014).

Fermentación en estado líquido o sumergida (FEL)

A escala de laboratorio ha sido muy satisfactorio el empleo de medios de cultivo líquidos debido al fácil control de los parámetros de operación, el cual se ve limitado por su alto costo de operación (Babitha et al., 2007). Para minimizar los costos de producción se recomienda emplear el glicerol como sustrato, ya que este es un residuo de la producción de biodiesel (Meinicke et al., 2012). También se reporta el uso de residuos agroindustriales, como las vinazas residuales, que suplementadas con glutamato monosódico y peptona han mostrado buenos resultados (Silveira, Daroit, & Brandelli, 2008).

Se han obtenido altos rendimientos en cultivos líquidos con 5 % de sustrato de arroz como fuente de carbono, 0,5% de nitrato de sodio o nitrato de potasio como fuente de nitrógeno y un pH inicial de 6,0, a una temperatura de incubación de 32 °C (Pan & Hsu, 2014). Con germen de yaca en polvo se han logrado obtener hasta 25 unidades de Densidad óptica de pigmento /g de sustrato seco fermentado, con alta estabilidad a diferentes rangos de pH (Babitha et al., 2007).

Se ha reportado que minimizando el daño en los micelios de ramificaciones cortas, se obtienen mejores rendimientos en la producción pigmentos porque disminuye la viscosidad de los cultivos y se favorece el control de los niveles de oxígeno total mediante aireación y agitación. Para ello se debe controlar el momentum de velocidad de rotación; lo que hace hace factible el escalado de producción de *Monascus spp.* de jarras fermentadoras de 5 litros a bioreactores de 300 litros en plantas piloto (H. Kim et al., 2002).

Actualmente, el rendimiento de los cultivos ha sido mejorado gracias prácticas de mutación genética de las cepas, variaciones en la composición del medio de cultivo y pruebas con

diferentes tipos de bioreactores; continuos, discontinuos o semicontinuos (Meinicke et al., 2012; Mukherjee & Singh, 2011). Matsui y colaboradores (Matsui, Shinzato, Yokota, Takahashi, & Sato, 2006) emplearon bioreactores de columnas, de cama empacada y de tambor, y variaron tanto la aireación como el movimiento de rotación. Concluyeron que el flujo de aire suministrado puede alterar la concentración de pigmentos y de proteínas producidas por *Monascus spp.* Se han empleado algunos métodos mecánicos como el de ultrasonido para la aireación de los medios de cultivo con el objetivo de aumentar la eficiencia de producción (S. Yang, Zhang, Li, Qian, & Wang, 2005).

Parámetros de producción.

Muchos de los parámetros que se mencionan en los trabajos tienen una fuerte relación con la producción de los compuestos de interés industrial, cada uno ha sido abordado de alguna manera en las diferentes investigaciones. Algunos de estos parámetros son: el nivel de pH, la temperatura, la aireación, la agitación, entre otros, que en conjunto determinan la producción de metabolitos secundarios de *Monascus spp.*, a continuación se exponen los principales:

Fuente de carbono: Los sustratos incluyen principalmente almidón y azúcares como mono, oligo y polisacáridos, los cuales tienen diferentes efectos en el crecimiento y la producción de metabolitos de *Monascus spp.*, por ejemplo la glucosa y sus homopolímeros generan una mayor producción de pigmentos y biomasa fúngica en comparación con los heteropolisacáridos maltosa y fructosa (T. F. Lin & Demain, 1991). La fuente de carbono también influye en la tonalidad de los pigmentos; por ejemplo, cuando se utiliza maltosa y glucosa como fuentes de carbono, se producen pigmentos de color café oscuro; cuando se usa sólo sacarosa los pigmentos originados son más claros (Joshi, Attri, BaJa, & Bhushan, 2003); y cuando se usa sólo maltosa se induce la producción de pigmentos rojos (Tseng, Chen, & Lin, 2000).

Fuente de nitrógeno: Las fuentes de nitrógeno complejas y de naturaleza orgánicas favorecen la producción de pigmentos en contraste con las fuentes inorgánicas. Está reportado que concentraciones de 5 g/L de glutamato monosódico y 20 g/L de glicerol favorecen a la producción de pigmentos rojos (Meinicke et al., 2012).

Humedad del sustrato: Es necesario controlar la humedad del sustrato en FES. Debe oscilar aproximadamente entre el 50 -60 %, ya que un alto contenido provoca que *Monascus spp.* produzca gran cantidad de azúcares, inhibiendo así la producción de pigmentos (21,22).

Minerales: La formación de estructuras de apoyo y la reproducción se ve inducido por nutrientes tales como el zinc, manganeso y hierro (Esteves, 2005). Sin embargo estos metales son inhibitorios cuando superan la concentración molar de 5×10^{-5} en medio sólido y de 2×10^{-3} en medio líquido (BAU & WONG, 1979).

Temperatura: *Monascus spp.* es un hongo que puede crecer en un rango de temperatura desde los 15-18 °C hasta los 45 °C, aunque su óptimo se encuentra entre 25 a 37 °C (Julio Carvalho et al., 2005; Pan & Hsu, 2014). Aunque se reportan casos donde *M. ruber* ha crecido a una temperatura de 80°C (Nout, 2007). Para el caso especial de la producción de pigmentos el óptimo está entre 25 a 32 °C (Joshi et al., 2003). Está reportado que la producción de pigmentos por FEL a 25 °C puede ser hasta 10 veces mayor que a 30 °C, ya que al disminuir la temperatura de operación se está disminuyendo indirectamente la viscosidad, causante de la heterogeneidad del medio y de la mala transferencia, tanto de temperatura como de gases (Ahn, Jung, Hyung, Haam, & Shin, 2006).

pH: *Monascus spp.* puede crecer en un amplio rango de pH, desde 2,5 a 8,0, aunque se reportan casos donde *M. ruber* ha crecido en un rango de pH de 1,7 a 2,0 (Julio Carvalho et al., 2005). No obstante, para la producción de pigmentos debe estar en un rango más reducido, de 4,0 a 7,0 (Pan & Hsu, 2014). El pH inicial influye significativamente en el

consumo de las fuentes de nitrógeno ionizable y en la exportación de derivados intracelulares ionizables al medio extracelular, durante la fermentación de *Monascus spp.* (Kang et al., 2013). Por su parte, el pH final está directamente relacionado con la producción tanto de pigmentos como de citrinina, ya que a niveles bajos de pH se pueden producir pigmentos libres de dicha toxina. El pH se puede controlar mediante la elección de la fuente de nitrógeno adecuada (Kang, Zhang, Wu, Wang, & Park, 2014). Hay que tener presente que el moho es susceptible a condiciones de pH extremas (Meinicke et al., 2012) y que la producción de pigmentos óptima se realiza a un pH con tendencia neutra, por tanto hay que lograr un equilibrio entre ambos datos para encontrar el punto donde se produzca menos citrina sin afectar demasiado los rendimientos de producción de colorantes.

Aireación: *Monascus spp.* es incapaz de crecer en medios anaerobios, sin embargo puede hacerlo con oxígeno limitado. Por tanto, el flujo de aire influyen significativamente en la producción de los pigmentos y la producción de citrinina (J. Yang, Chen, Wang, Hu, & Hu, 2015). Con alta aireación, la producción de citrina incrementa, mientras la de pigmentos y metabolitos secundarios se ve drásticamente disminuida debido a la producción de ácidos orgánicos inhibitorios. Con oxígeno limitado, los pigmentos y la citrina se producen en la fase de crecimiento exponencial junto con los metabolitos primarios y no en la estacionaria, como es normal (Hassan Hajjaj et al., 2000). La aireación está directamente influenciada por la agitación, que controla la tasa de oxígeno transferido a los microorganismos; adicionalmente mantiene la humedad y remueve el calor. Debido a la difícil aireación de los sustratos sólidos, se ha diseñado un bioreactor de tambor con aire forzado, que permite la inyección de 1ml de aire/(g de sustrato húmedo* minuto) al medio de cultivo (Júlio Carvalho et al., 2006). La aireación debe balancear la presión parcial de gases en el medio. El balance de gases en el medio es bien influyente en la producción de pigmentos. Por ejemplo, el máximo rendimiento de producción de pigmentos por *M. purpureus* se obtuvo a una presión

parcial de oxígeno de 0.5 atm mientras que fue completamente inhibida a 1.0 atm de presión parcial de dióxido de carbono (Han & Mudgett, 1992). Sin embargo, una presión parcial de oxígeno demasiado alta es tóxica para el moho debido a la inhibición de enzimas vitales, y a la producción de radicales libres y compuestos reactivos (Onken & Liefke, 1989).

Rendimientos de producción: el cálculo de los rendimientos de producción en términos de biomasa depende del tipo de fermentación efectuada. Para FEL, la biomasa se calcula mediante el peso del micelio seco luego de la filtración, lo que no se puede hacer para FES debido a la dificultad de separar la biomasa de la matriz sólida. Para este caso se puede medir la biomasa indirectamente, mediante medición de componentes celulares como glucosamina, ergosterol o ácidos nucleicos. El ergosterol es un compuesto celular, de fácil extracción y análisis, usualmente cuantificado (J. Yang et al., 2015), prácticamente ausente en planta y animales (Mattila, Lampi, Ronkainen, Toivo, & Piironen, 2002). También se ha encontrado que la producción de pigmentos es directamente proporcional a la de biomasa, por tanto, permite medirla indirectamente (Júlio Carvalho et al., 2006).

Experimentos que se realizaron en la " División de Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología " (Debb) en la UFPR. Utilizaron cuatro cepas de *Monascus* en este trabajo: dos cepas del Departamento de Agricultura, NRRL Unidos 1991 (*Monascus spp.*) y NRRL 2897 (*M. purpureus*), una cepa de la Fundación André Tosello (Brasil), CCT 3802 (*M. purpureus*), y LPB 31, una cepa aislada en LPB a partir de arroz contaminado con micelio de color rojo. Las cepas se conservan mediante la inoculación de rutina y la incubación en PDA a 30-32 ° C durante 10 días, y luego conservados por refrigeración durante 3 a 4 meses. Para la determinación del crecimiento radial de las cepas se midió mediante la inoculación de PDA en placas Petri con cada cepa, en un punto en el centro del plato, por duplicado (8 platos). Los cultivos se incubaron a continuación a 30 ° C durante 12 días. El radio de las colonias se

midió con una regla, desde el centro del plato, a lo largo de 2 ejes perpendiculares (4 medidas por plato) a intervalos de aproximadamente 24 h. Los valores obtenidos se utilizaron para calcular los valores promedio (media aritmética) de tiempo de radio x incubación, (Carvalho et al., 2005).

Otro trabajo realizado por Velázquez (2013), señala que la cepa de *Monascus purpureus* presentó una mayor velocidad de crecimiento radial a las 240 h en el medio SDA (1.00 ± 0.009 mm h⁻¹), seguido de los medios MEA, PDA y YM (0.083 ± 0.001 , 0.085 ± 0.04 y 0.086 ± 0.002 mm h⁻¹, respectivamente), no habiendo diferencia significativa entre ellos. El medio que presentó la velocidad de crecimiento radial más baja fue el medio de Arroz con 0.044 ± 0.002 mm h⁻¹. Estos resultados son muy similares a los reportados por Ajdari y col. (2011), en donde se estudiaron los requerimientos nutrimentales para el mejoramiento del crecimiento y esporulación de cepas de *Monascus* utilizando diferentes medios de cultivo reportando una velocidad máxima de crecimiento radial de 0.12 mm h⁻¹ para *Monascus purpureus* FTC5391 en el medio MEA y una velocidad de crecimiento menor de 0.069 mm h⁻¹ para *Monascus purpureus* DSM1379 en el medio PDA; señala además que la mayor capacidad de invasión se obtuvo en el medio SDA (34.66 ± 3.21 mm) mientras que en el CYA se presentó el menor crecimiento (23.00 ± 0.01 mm) después de 336 h de cultivo. Carvalho y col. (2007) evaluaron la velocidad de crecimiento radial a las 264 horas de 4 cepas diferentes de *Monascus* en caja de Petri utilizando como medio PDA, observando que la cepa LPB31 mostró un crecimiento de 35 mm de radio mientras que la cepa 3802 al mismo tiempo de incubación presentó un crecimiento de 20 mm. Estos resultados nos sugieren que el crecimiento del microorganismo es dependiente de la cepa y del medio de cultivo evaluado, (Velazquez, 2013).

Principales limitaciones tecnológicas: De acuerdo con la figura 2, los tipos de problemas del proceso productivo son tres: del cultivo, de extracción y de purificación.

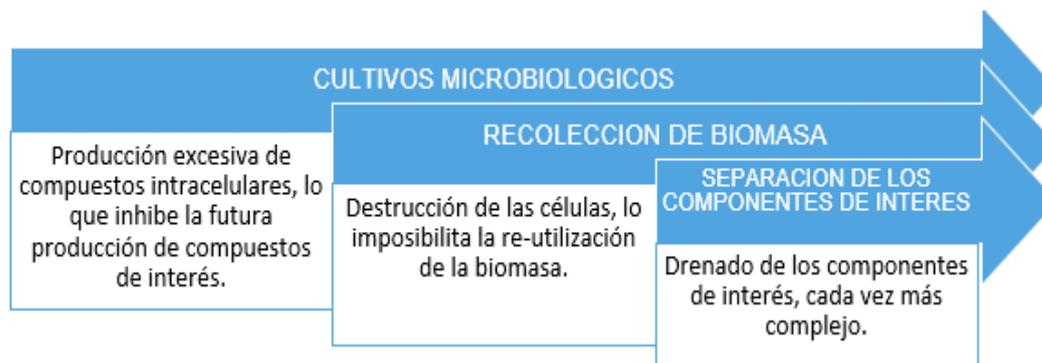


Figura 2. Principales problemas del Procedimiento universal de extracción de compuestos intracelulares.

Por ello se resalta el valor del “milking”, una técnica que implica un crecimiento microbiano en dos fases, donde se mantiene el crecimiento normal del hongo pero en constante contacto con un solvente orgánico bio-compatible; y a medida que crece el microorganismo, se van drenando de una forma no agresiva el medio de cultivo para la recuperación de los productos metabólicos (Hu, Zhang, Wu, Qi, & Wang, 2012a).

Metabolitos

Algunos de los metabolitos secundarios producidos por *Monascus spp.* son principalmente: pigmentos, maltosas, invertasas, pectinasas, α -amilasas, β -galactosidasas, amilogucosidasas, celulasas, hemicelulasas, proteasas ácidas y alcalinas, lipasas, alcoholes, ácidos orgánicos, agentes antimicrobianos, entre otros (Khachatourians, 2014). Se pueden identificar mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-VIS) o de Infrarrojos (IR), fluometría, espectrometría de masas, espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, por sus siglas en inglés), cromatografía de gases, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) y/o la Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) (Feng, Shao, & Chen, 2012). Dado que las muestras deben ser diluidas la mayoría de las veces para la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro, los valores pueden no ser directamente comparables y deben ser convertidos a una "absorbancia

específica" representada por el factor de dilución de la de la muestra (Chiu & Poon, 1993). Por ello es más aconsejable la cromatografía líquida para el análisis de los metabolitos producidos, que aunque es un procedimiento más extenso permite la separación y cuantificación de los compuestos por separado (Júlio Carvalho et al., 2006).

Está reportado que dichos metabolitos tienen actividad biológica y varía de acuerdo al tipo de especie y de cepa que se esté empleando. Algunas de las enfermedades que se pueden tratar son las siguientes: cardiovasculares, diabetes, obesidad, cáncer, alzhéimer, entre otras (L. C. Hsu, Hsu, Hong, & Pan, 2014; Jeun et al., 2008; Pan & Hsu, 2014).

Tabla 3 Condiciones de cultivo de *Monascus* spp. para la producción de pigmentos

Cepa	Condiciones de cultivo	Tipo de pigmento		Referencias
		rojos	Amarillos naranjas	
FEL				
<i>Monascus purpureus</i>	Concentración de inóculo de 9×10^4 esporas/g de sustrato seco. 30°C, 7 días.	X	X	(Babitha et al., 2007)
<i>Monascus</i> spp.	Cepa a 4°C, transferida al inóculo a 30°C en un periodo de 12-14 días. Residuos de industrias vinícolas, salvado de soya y las semillas de piñón. En mezcla con peptona o el cloruro de amonio. El pH inicial de 6 En un shaker a 100 rpm por 9 días			(Daroit, Silveira, Hertz, & Brandelli, 2007) X
<i>Monascus</i> spp.	Cultivado en medio agar Hiroi, luego 5% glucosa, 0.3% NH ₄ NO ₃ , 0.1% KH ₂ PO ₄ , 0.05% MgSO ₄ , 05% KCl, and 0.001% FeSO ₄ 7H ₂ O en agua destilada, con un pH ajustado de 6,6. En un shaker a 30°C y 180 RPM.		X	(Jia, Xu, Zhou, & Sung, 2010; Kang et al., 2013)
<i>Monascus purpureus</i>	Concentración de inóculo de 1.38×10^5 esporas/mL, shaker a 250 rpm y dejado por 7 días. El rango de humedades			(Haque, Kachrimanidou, Koutinas, & Lin, 2016) X

Cepa	Condiciones de cultivo	Tipo de pigmento	N.E	Referencias
	estuvo entre un 55%y 60% a 30°C.			
FES				
<i>Monascus spp.</i>	Cultivo a 4°C, con extracto de peptona-glucosa, e inoculado de 6 a 8 días, concentración de 1,5x10 ⁵ esporas/mL. Usando 5 g del germen de yaca. 30°C, 7 días.			(Babitha et al., 2007)
<i>M. purpureus</i>	. Cultivado en medio agar Hiroi, luego 5% glucosa, 0.3% NH ₄ NO ₃ , 0.1% KH ₂ PO ₄ , 0.05% MgSO ₄ , 05% KCl, and 0.001% FeSO ₄ 7H ₂ O en agua destilada, con un pH ajustado de 6,6. En un shaker a 30°C y 180 RPM.	X		(Velmurugan et al., 2011)
Mixto				
<i>Monascus spp.</i>	Sustrato el almidón de la cebada	X	X	(Chauvatcharin & Yoshida, 1995)
<i>Monascus spp.</i>	5 g de sustrato hidrolizado por hongos de tipo <i>Aspergillus</i> spp., con una concentración de inóculo de 2x10 ⁶ esporas/mL, 30°C, 7 días.	X	X	(Shin et al., 1998).
<i>Monascus</i>	almidón de casabe (3%); harina de soya (5%), pH inicial			(Busaba Yongsmith, Krairak, & Bavavoda, 1994)
<i>Kaoliang</i>	neutro, 168 h, 30°C	X		

A continuación se describen parámetros de producción importantes en la producción de *Monascus spp.*:

Biomasa: Como cualquier tipo de hongo *Monascus spp.* produce micelio vegetativo en medios ricos y micelio reproductivo en escasez de nutrientes. El hongo asimila bien la glucosa pero tiene un mayor crecimiento cuando crece con galactosa (Erdogrul & Azirak, 2004). Se ha reportado que variando el tiempo y la frecuencia de agitación del medio de cultivo líquido se pueden aumentar los rendimientos de producción de proteínas (Júlio Carvalho et al., 2006; Mitchell, Von Meien, & Krieger, 2003).

Pigmentos: Los pigmentos de *Monascus spp.* se dividen en tres grupos de acuerdo con su coloración. Los principales pigmentos producidos son: los amarillos, ankaflavina ($C_{23}H_{30}O_5$) y monascina ($C_{21}H_{26}O_5$); los naranjas monascorubrina ($C_{23}H_{26}O_5$) y rubropunctamina ($C_{21}H_{22}O_5$); y los rojos rubropuctamina ($C_{21}H_{23}NO_4$) y monascorubramina ($C_{23}H_{27}NO_4$) (Blanc et al., 1994; Wong & Koehler, 1983). Los pigmentos extraídos de los micelios pueden ser disueltos en etanol, propilenglicol o en solución de gelatina y liofilizarse; luego de esto ya pueden adicionarse a los alimentos (Wong & Koehler, 1983). Chauvatcharin y colaboradores (Chauvatcharin & Yoshida, 1995) demuestran que la producción de pigmentos se puede dar tanto por FES como por FEL. Su eficiencia está relacionado con la formación de cleistotécios, que indican el inicio de la síntesis de pigmentos. Los principales factores que influyen en su producción son: composición del medio, temperatura, presencia de oxígeno y de aire, pH, fuente de nitrógeno y humedad (Ma et al., 2000). Por lo general se producen en medio semisólido, empleando arroz como sustrato principal, aunque la mayor producción se da empleando glucosa como fuente de carbono (Hassan Hajjaj et al., 2000). Se ha encontrado que la adición de un 1 a 2% de alcohol en la etapa de incubación induce la producción de pigmentos en general y la adición de una fuente apropiada de nitrógeno facilita su liberación

y solubilidad en medios de cultivo sumergidos (Pastrana, Blanc, Santerre, Loret, & Goma, 1995). La combinación de varios factores específicos da como resultado una tonalidad diferente; por ejemplo, si se adiciona al medio de cultivo glucosa como fuente de carbono, y glutamato (H Hajjaj et al., 2000; Pastrana et al., 1995) o nitratos como fuente de nitrógeno, con pH circundante a 6.5 se favorece la producción de pigmentos rojos, mientras que si se adiciona nitrato de amonio o amonio a un pH inferior de 2,5 se induce la producción de pigmentos naranjas (Pan & Hsu, 2014). Otros autores sostienen que con pH inicial de 7,0 se obtienen pigmentos naranja-rojos, mientras que si se emplea un pH inferior a 4,0 se obtienen pigmentos amarillo-dorado (Yongsmith et al., 1993). Hay que tener precaución ya que los pigmentos son estables sólo en pH ligeramente ácido a neutro y una temperatura inferior a 60 °C (Julio Carvalho et al., 2005).

Citrina: si bien se mencionó en la introducción, la citrina es un metabolito indeseado por su nefrotoxicidad y hepatotoxicidad en humanos; pero según estudios moleculares, sólo se expresa en las especies *M. ruber* y *M. purpureus* (Jia, Xu, Zhou, & Sung, 2010), y su producción depende en gran parte de las condiciones de cultivo. Dicha toxina es inducida cuando se usan sustratos como trigo, avena, cebada, maíz, centeno y arroz (Húngaro et al., 2014; Jeun et al., 2008; Jong Kim et al., 2007), y suplementos como glucosa y glutamato (H Hajjaj et al., 2000). Se ha reportado que *Monascus spp.* puede llegar a producir más de 2,5g/Kg de materia seca por FES y tan sólo 56 mg/Kg de materia seca por FEL, lo cual constituye una desventaja para el primer método mencionado (Mohan Kumari, Akhilender Naidu, Vishwanatha, Narasimhamurthy, & Vijayalakshmi, 2009). Adicionalmente, por medio de la mutagénesis e ingeniería genética se ha logrado disminuir las proporciones de la micotoxina, logrando la obtención de productos inocuos sin que se afecten los rendimientos de producción (Jia et al., 2010; Jongrungruangchok et al., 2004). Para su extracción selectiva

a partir de biomasa fúngica se utiliza por lo general cloroformo como solvente a temperatura ambiente, que luego se retira por evaporación (Ji Kim et al., 2010).

Estatinas: *Monascus spp.* ha sido explorada por su producción de estatinas por FES (Dikshit & Tallapragada, 2016). La monacolina K, es una estatina análoga de la lovastatina, que presenta actividad hipocolesterolémica, pues inhibe la actividad de 3-hidroxil-3-metil glutaril coenzyma A reductasa, encargada de la síntesis del colesterol en el humano. Además influye en la producción de pigmentos de *Monascus spp.* (Jeun et al., 2008; Jia et al., 2010). La especie *Monascus pilosus* NBRC4520, fue seleccionada por Velasco y colaboradores (Velasco-Bedran, 2009), por su alta producción de lovastatina y su baja producción de citrinina. Reportan que se puede lograr un incremento de la producción en casi de 20 veces si se varía la temperatura de 30 hasta 23°C para la producción de pigmentos. Para su extracción selectiva a partir de biomasa fúngica se utiliza por lo general acetato de etilo como solvente a 60 °C, y luego se retira por evaporación (Ji Kim et al., 2010).

Otros: También se producen otros metabolitos secundarios bioactivos como el ácido amino-butírico, un hipotensivo (Jia et al., 2010), y una gran cantidad de antioxidantes, como el ácido dimerúmico y el ácido diferricoprogeno. Algunos compuestos bioactivos encontrados en los pigmentos de tipo naranja se encuentran en mayor proporción en *M. purpureus* (L. C. Hsu et al., 2014; Pastrana et al., 1995).

Los hongos filamentosos son buenos candidatos para la producción de proteínas heterólogas, ácidos orgánicos y otros. Sin embargo, poco conocimiento de la actividad metabólica, las condiciones de cultivo y los metabolitos intermedios de estos organismos impide la utilización de una estrategia bioquímica para aumentar su rendimiento (Esteves, 2005).

El Ecuador ha iniciado la transición hacia una sociedad basada en el conocimiento, la ciencia y la innovación, promoviendo el manejo sustentable y corresponsable de sus recursos finitos. Por ello, la ejecución de estrategias orientadas a la concienciación de los ecuatorianos y ecuatorianas frente a la naturaleza es un eje central. Para apuntalar el bioconocimiento como catalizador de la producción nacional, se requiere aún identificar las actividades productivas estratégicas que deberán derivarse de aquel y articular los sectores educativo, productivo y comercial para planificar la generación de talento humano, productos, servicios, mercados y canales de comercialización. Así se insertará el bioconocimiento aplicado en la matriz productiva, y en la economía nacional y mundial, mejorando la conservación y sustentabilidad del uso de los bienes naturales.(SENPLADES, 2013).

3 MARCO METODOLÓGICO

3.1 Aislamiento e identificación de la cepa nativa del hongo *Monascus purpureus*.

El objetivo específico del presente trabajo de investigación es aislar e identificar la cepa nativa ecuatoriana.

3.1.1 Materiales y métodos

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biotecnología Fúngica del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA) en convenio con el Ingenio Azucarero del Norte (IANCEM), clasificado como laboratorio básico – nivel de bioseguridad 1, localizado en la Ciudad de Ibarra a 2241 msnm (UTM WGS84: 17 N 816705 Este 36766 Norte) y una temperatura promedio de 18 °C.

Aislamiento

La cepa de *Monascus spp.* se aisló de una muestra de trigo en fermentación en estado sólido (Fotografía 1) se utilizó el método de placa directa, en medios de cultivo preparados con Agar Papa Dextrosa (PDA) como lo refiere (Palo et al., 1960), y Agar Extracto de Malta (MEA). Se preparó el medio siguiendo la técnica descrita por Pineda (2014), se esterilizó y se inoculó el micelio aislado de la muestra de trigo y luego se incubó a 23 °C.

Identificación

La identificación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Fúngica del CEBA, utilizando la cepa aislada previamente. Para la identificación de hongos se utiliza la técnica de cinta pegante, es una de las más usadas, debido a que se conserva la posición original de las esporas y segmentos de hifas. Además de permitir observar las estructuras fúngicas casi sin alteración. Para su realización, se toma una tira de cinta adhesiva de 4 cm, con el lado adhesivo hacia fuera, sosteniéndose con pinzas y presionando firmemente contra la superficie de la colonia del hongo que se desea estudiar. Posteriormente, la tira de cinta se coloca en un portaobjetos, se la cubre y se procede a la observación en el microscopio. Aislamiento colonias por estriado Por: Piña López (2011).

En *Monascus purpureus* se ha descrito la presencia de sustancias de diversos grupos químicos, tanto primarios como secundarios: Entre los primarios, destacan los lípidos, con gran cantidad de ácidos grasos mono y polinsaturados (>125mg/g), sobre todo ácidos palmítico, oleico, linoleico y linolénico. Contiene también almidón, proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales Entre los compuestos secundarios, destacan los policétidos, que van acompañados de fitoesteroles (β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, etc.), isoflavonoides, saponinas y varios pigmentos (entre los cuales destacan algunas micotoxinas como la citrina, que deben ser eliminadas). Los principales compuestos policétidos (Figura 3) son las

monacolinas, que generalmente oscilan entre un 0,4-0,8%. La monacolina más abundante es la monacolina K (mevinolina o lovastatina), que se encuentra también en su forma dihidro, dehidro e hidroxilada, acompañada de la monacolina L. En 1979 el Prof. Akira Endo en Japón, aisló la monacolina K de cultivos de *M. purpureus*, y demostró que ésta era capaz de inhibir la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), un enzima que regula la síntesis del colesterol. La monacolina K (o lovastatina) ha sido la cabeza de serie de una serie de fármacos, las estatinas, consideradas actualmente el tratamiento de elección de las dislipemias. Durante muchos años *M. purpureus* fue una de las principales fuentes para la obtención de las estatinas y para ello se desarrolló una tecnología de cultivo in vitro todavía hoy en uso. Las técnicas de cultivo in vitro han permitido, mediante la selección de cepas y la modificación de las condiciones de cultivo y la composición del medio donde se cultiva el hongo, aumentando la presencia o modificando las relaciones de diferentes nutrientes, variar la composición del hongo y obtener cepas ricas en monacolina K y otros compuestos, como GABA (ácido γ -aminobutírico) o acetilcolina. De esta forma se han ido seleccionado cepas con mayor actividad hipoglicemiante o hipotensora. Por tanto, no se puede hablar de una única composición química del *M. purpureus*, ya que dependerá de las condiciones específicas de cultivo. Será necesario establecer parámetros de normalización de los preparados obtenidos de este hongo para poder usarlos en terapéutica, (Bianchi, 2004).

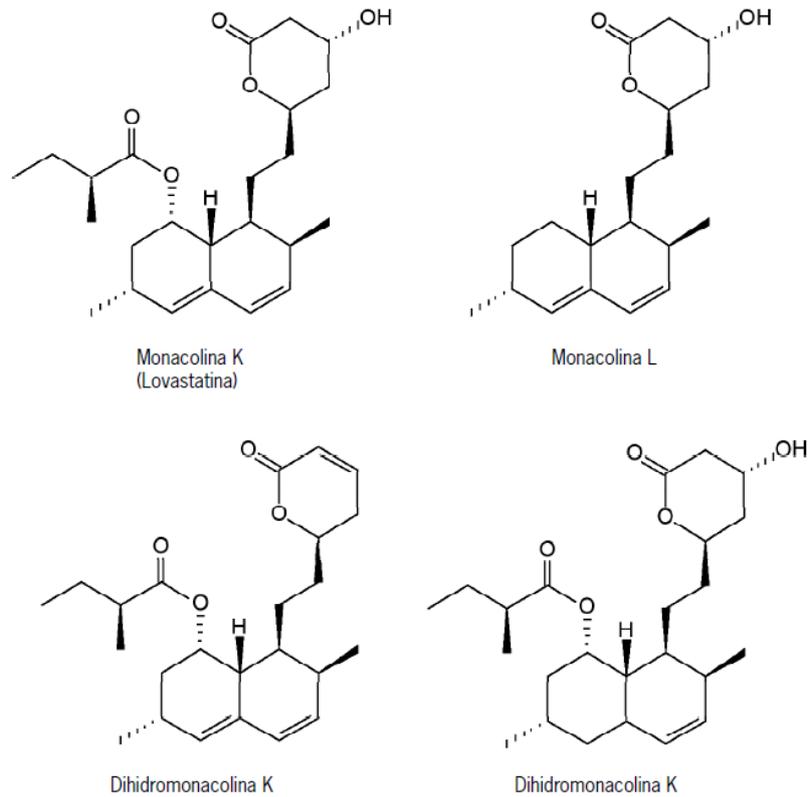


Figura 3. Estructura de las principales monacolinas de *Monascus purpureus*.

3.1.2 Resultados y discusión

Aislamiento

En la fotografía 1 se presenta la muestra de trigo fermentado de la cual se aisló la cepa de *Monascus spp.* dicha muestra fue fermentada naturalmente en estado sólido en bolsa con 400 g de trigo a temperatura ambiente.



Foto 1. Muestra de trigo fermentado con colonización de Monascus spp. Cortesía Pineda (2017)

A diferencia de la literatura descrita en la revisión bibliográfica, la cepa de *Monascus spp.* aislada en este trabajo de investigación, se realizó a partir de la fermentación sólida de granos esterilizados de trigo, gramínea que aún no ha sido reportada como una especie para el desarrollo de *Monascus* en el Ecuador; de igual manera la presente investigación reporta una temperatura de incubación exitosa de 23°C inferior a la menor temperatura reportada por (Park et al., 2004)

En la fotografía 2 se presenta el proceso de inoculación y purificación de la cepa de *Monascus spp.* como se observa la purificación se realiza por la técnica de repique hasta lograr un cultivo puro.

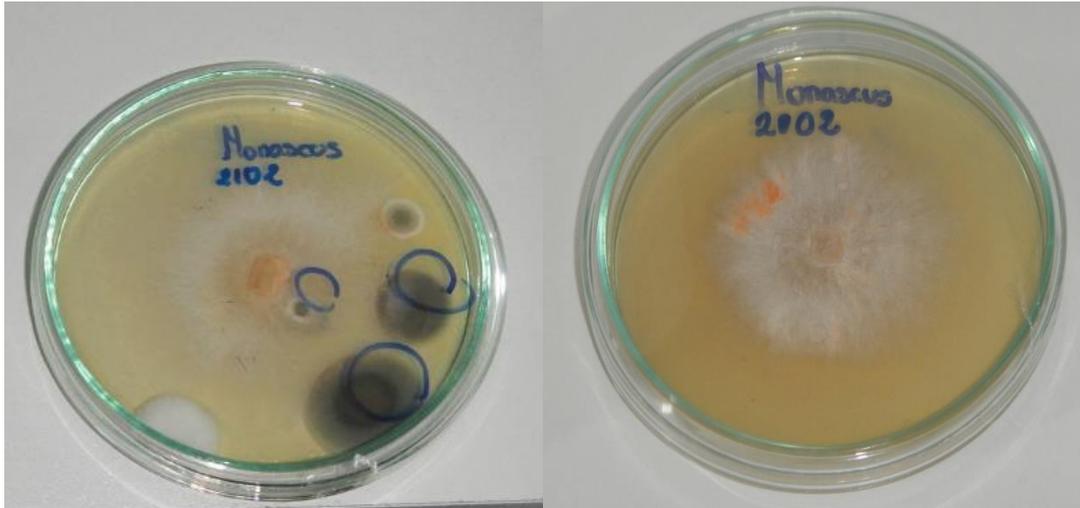


Foto 2. Aislamiento y purificación de la cepa de *Monascus spp.*

El micelio es blanco en etapas tempranas y cambia rápidamente a rosado y posteriormente, reflejo del incremento de la acidez del medio, cambia a un color amarillo-naranja distintivo. Un profundo color rojo se forma conforme envejece el cultivo (INPR, 2006). La parte del micelio donde se realiza la producción de esporas es llamado micelio reproductivo o micelio aéreo. Dependiendo de la especie la reproducción puede ser sexual o asexual (Pelczar y col., 1977; Tortora y col., 1992).

Identificación

La identificación morfológica de la cepa se realizó en el Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), identificando que el linaje de microorganismo aislado pertenece a *Monascus purpureus*.

Taxonomía:

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota -

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Monascaceae

Género: *Monascus*

Especie: *purpureus*

La cepa fue codificada como CEBA-FSASIIE-mp-010116, e ingresada al banco de recursos genéticos microbianos del CEBA.

3.2 Protocolo para la conservación de la especie nativa *Monascus spp.*

El objetivo específico del presente trabajo de investigación es desarrollar un protocolo para la conservación y almacenamiento de *Monascus purpureus*.



Figura 4 Proceso para el aislamiento, identificación y caracterización de *Monascus purpureus*.

Materiales y métodos

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biotecnología Fúngica del Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente (CEBA). El proceso de liofilización se realizó en la Universidad Técnica del Norte, localizada en la ciudad de Ibarra.

Cepa

Se utilizó las cepas del género *Monascus purpureus*, del banco de recursos genéticos microbianos del CEBA, la cual fue aislada e identificada en el experimento anterior y codificada como CEBA-FSASIIIE-Mp-010116.

Procedimiento

Se preparó el medio de cultivo agar extracto de malta (MEA) siguiendo la técnica descrita por Pineda (2014), se esterilizó en esterilizador de presión a 121 °C y 15 PSI por un tiempo de 15 minutos y se sirvió en tubos de ensayo de 15 ml. Los medios se inocularon con la cepa nativa seleccionada y se incubaron por 7 días a 22 °C. Los tubos colonizados fueron liofilizados en un equipo liofilizador de bandejas marca VirTiswizard 2.0, a una temperatura de -40°C por 26 horas a una presión de vacío de 300 atm. La cepa liofilizada fue depositada en el banco de recursos genéticos microbianos del CEBA para su conservación.

Resultados y discusión

En la Fotografía 3 se presenta el procedimiento para el cultivo de *Monascus spp.* en tubos DE ENSAYO, se observa el crecimiento del micelio en los dos medios de cultivo (MEA y PDA) a una temperatura de 22 °C durante 6 días.

En las fotografías 4 y 5 se presenta el procedimiento para la liofilización de las muestras de *Monascus spp.*, para su efecto luego que los tubos estuvieron completamente colonizados se colocaron en la bandeja del liofilizador y luego se carga liofilizador el cual el cual arranca su operación con una temperatura de 15 °C, disminuyendo la temperatura durante 7 horas

hasta llegar $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, disminuyendo $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ cada hora durante 7 horas hasta llegar a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ luego empieza el proceso de secado en el cual se aumenta la temperatura $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas hasta llegar a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a un presión de vacío de menos 300 atm.

En la foto 3 se presenta el procedimiento para el cultivo de *Monascus spp.* en tubos, se observa el crecimiento del micelio en los dos medios de cultivo (MEA y PDA) a una temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 días.



Foto 3. Cultivo de *Monascus spp.* en tubos de 15 ml

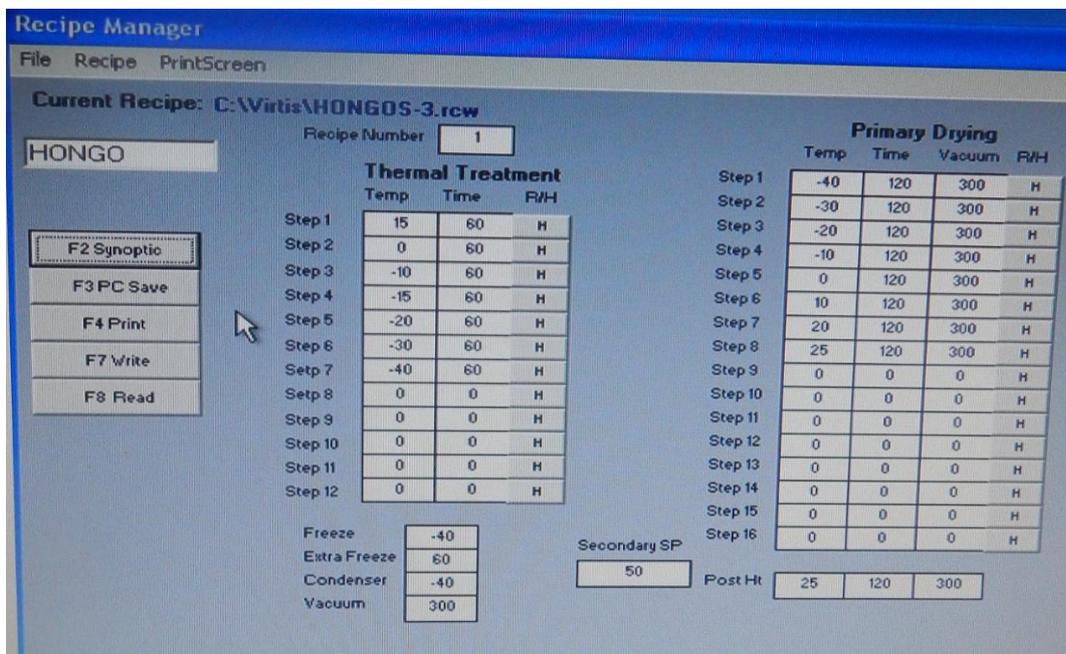


Foto 4. Registro de temperatura en el liofilizador

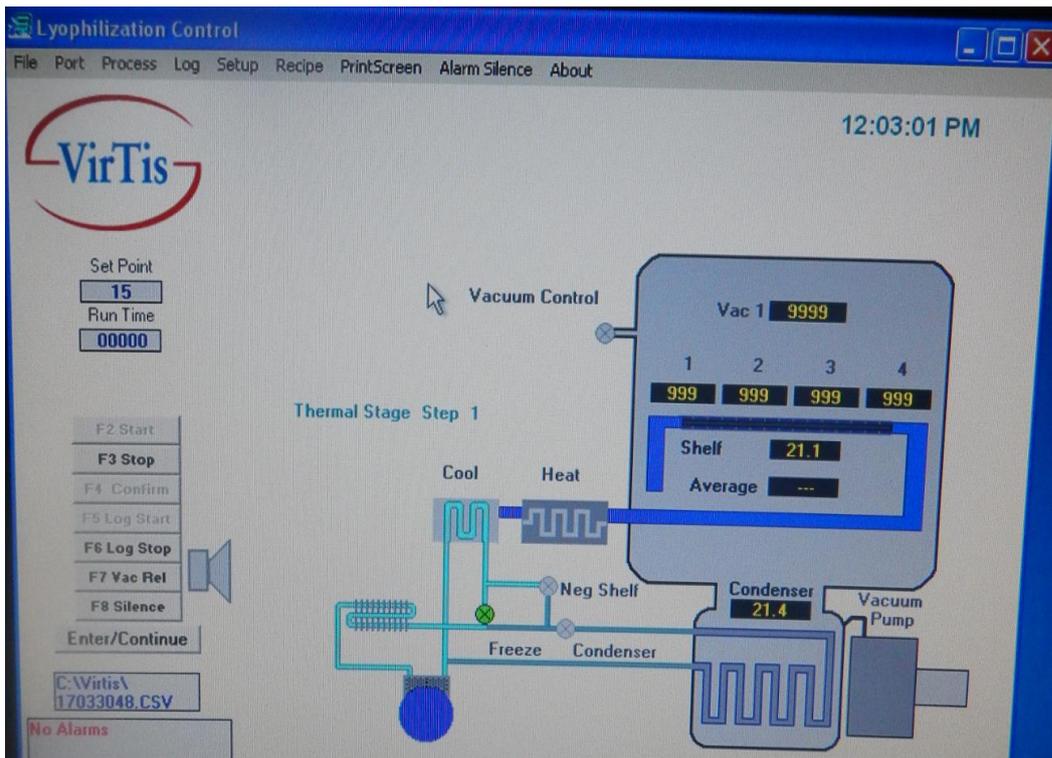


Foto 5. Proceso de liofilización



Foto 6. Tubos de ensayo colonizados con cepas de *Monascus purpureus* – Liofilizador.



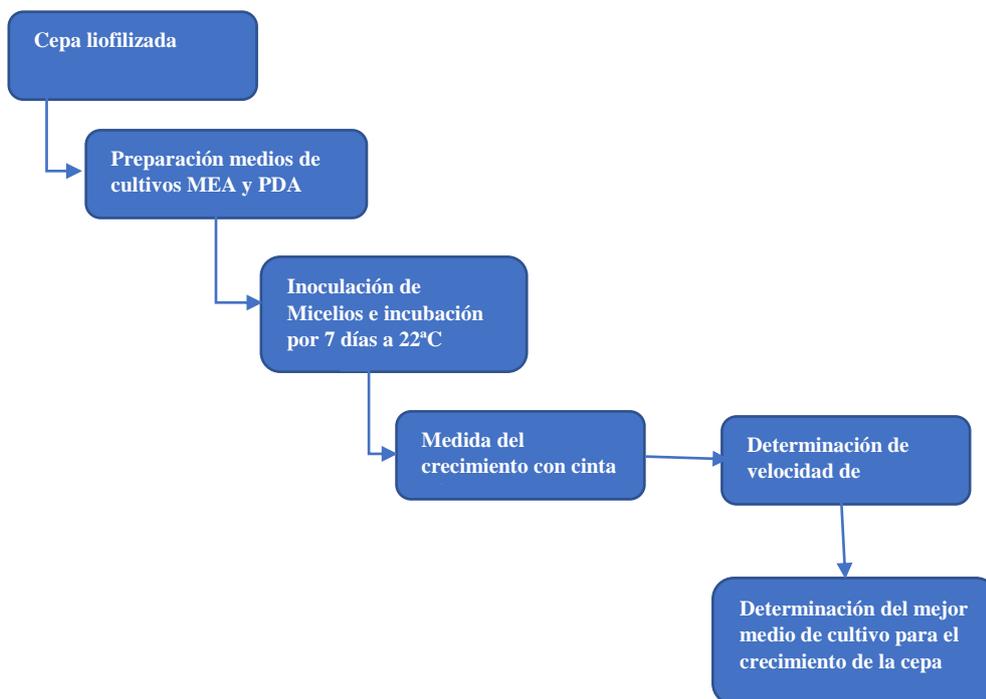
Foto 7. Muestras de *Monascus purpureus* liofilizada

Como se observa en la Foto 7, se logró liofilizar la cepa nativa de hongo *Monascus purpureus*, libre de contaminación para su conservación clave para la gestión sustentable de dicho recursos natural. Se reporta que los mejores métodos de almacenamiento de cepas para su conservación en BRG son la liofilización y la crio-preservación en nitrógeno líquido, manteniéndose la estabilidad genética durante más de 40 años (Hawksworth, 1985; Nagai et al., 2005) a una temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ji Kim et al., 2010); sin embargo, no se establece un procedimiento para realizar esta técnica, no encontró información sobre el proceso de liofilización para la especie *Monascus*, en la presente investigación queda establecido el procedimiento a seguir para conservar por esta técnica la especie estudiada.

3.3 Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa de *Monascus* spp.

El objetivo específico del presente trabajo de investigación es “Seleccionar el mejor medio de cultivo para el crecimiento de la cepa *Monascus purpureus* a través de la velocidad de crecimiento radial promedio” a partir de la cepa liofilizada.

Figura 5. Velocidad de crecimiento



H₀: μ medio 1 = μ medio 2

H_a: μ medio 1 \neq μ medio 2

Materiales y métodos.

El crecimiento y la producción de metabolitos de los hongos del género *Monascus* se llevan a cabo bajo una serie de condiciones. Hay varios medios de cultivo adecuados, pero los más comunes son PDA y la malta-extracto-agar (MEA) (ATCC, 2004). El extracto de malta debido a su elevado contenido en diversos carbohidratos, sobre todo en maltosa y

dextrosa son la base para el crecimiento de mohos y levaduras (DIBICO, 1984). El crecimiento es posible desde los 15-18 ° C (mínimo) a alrededor de 45 ° C (máximo) (Pitt, 1997), con la producción de pigmento que varía en gran medida con las especies y las condiciones de cultivo.

Placas inoculadas con *Monascus purpureus* que se incubaron en la oscuridad a 30 ° C durante 7 días; en medio PDA que es un medio utilizado habitualmente para el mantenimiento de las especies *Monascus* (ATCC 2007), la tasa de crecimiento radial en medio PDA (2,90 mm día⁻¹) fue comparable a los valores reportados para *Monascus purpureus* NRRL 2897 (3,0 mm día⁻¹) y *Monascus purpureus* LPB 31 (3,1 mm día⁻¹) cultivado en PDA (Carvalho et al ., 2005), (Farhan, 2010).

Cepa: se utilizó las cepas de *Monascus purpureus*, del banco de recursos genéticos microbianos del CEBA la cual fue liofilizada en el experimento anterior y codificada como CEBA-FSASIIIE-Mp-010116.

Diseño experimental: la experimentación se planificó con un diseño completamente al azar (DCA) con cinco réplicas y completamente aleatorio. El factor de estudio fue el medio de cultivo (AEM y PDA), como variable de respuesta se estableció la velocidad de crecimiento lineal de la cepa liofilizada. Los parámetros de operación como la temperatura y el tiempo se mantuvieron constante a 22°C y siete días respectivamente, como factor de ruido se identificó el nivel de luz.

Procedimiento: se preparó los medios de cultivo MEA y PDA siguiendo la técnica descrita por Pineda (2014), se esterilizó y se sirvió en cajas petri y luego se inocularon con cepa nativa de *Monascus purpureus*, y se incubaron por 7 días a 22 °C, se tomó las medidas de crecimiento (Pineda, 2014).

Resultados y discusión

En la tabla 4 se presenta los resultados experimentales, como se puede observar los bloques correspondientes al medio de cultivo MEA presentan la mayor velocidad de crecimiento, con un promedio de 4,3mm/día superior a lo reportado por Ajdari y col. (2011) de 2,88 mm/dí para MEA. Mientras que para PDA se obtuvo un promedio de 3,72 mm/ día, superior a lo reportado por Farhan, 2010 de 2,90 mm/día a 3,0 mm/día a una temperatura de 30°C y 7 días de incubación; y superior a lo reportado por Ajdari y col. (2011), de 1,66 mm/día.

Existen publicaciones que demuestran una generalidad que para la producción de *Monascus* se ha venido empleando sustratos que contienen almidones; sin embargo por los resultados presentados en éste trabajo se presume que este hongo prefiere el azúcar para producir metabolitos, resultando en nuestro caso un mejor desarrollo de la cepa en el medio de cultivo preparada a base de agar extracto de malta.

La velocidad de crecimiento radial promedio se calculó con la siguiente fórmula:

$$V \text{ (mm/día)} = \text{radio promedio} / 7 \text{ días.}$$

Tabla 4 Velocidad de crecimiento de Monascus a partir de cepa liofilizada

BLOQUE	Medio	Crecimiento radial mm	Velocidad radial promedio (mm/día)
1	PDA	27	3,8
1	MEA	29	4,1
1	MEA	30	4,3
1	MEA	30	4,3
1	MEA	31	4,4

1 MEA	31	4,4
1 PDA	26	3,7
1 PDA	25	3,6
1 PDA	26	3,7
1 PDA	27	3,8

Resumen Estadístico para Velocidad

En la tabla 5 se presenta el resumen estadístico, como se observa esta tabla muestra diferentes estadísticos de crecimiento radial promedio en milímetros, a partir del cual se calcula la velocidad de crecimiento radial promedio para cada uno de los 2 niveles de Medio.

. La intención principal del análisis de varianza de un factor es la de comparar las medias de los diferentes niveles enlistados aquí, bajo la columna de Promedio.

Tabla 5. Resumen estadístico para velocidad

	<i>Medio</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación</i>	<i>Coeficiente</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>	<i>Sesgo</i>
			<i>Estándar</i>	<i>de</i>	<i>Variación</i>				<i>Estandarizado</i>
MEA	5	4,3	0,12	2,85%	4,1	4,4	0,3	-1,24	
PDA	5	3,72	0,08	2,25%	3,6	3,8	0,2	-0,47	
Total	10	4,01	0,32	8,01%	3,6	4,4	0,8	0,11	

Medio Curtosis Estandarizada

MEA	0,91
PDA	-0,28
Total	-1,33

Análisis de varianza (ANOVA)

En la tabla 6 se presenta el análisis de varianza para la velocidad por medio, como se observa existe una diferencia significativa para medios de cultivo.

La tabla ANOVA descompone la varianza de Velocidad en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 76,45, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Velocidad entre un nivel de Medio y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se selecciono Pruebas de Rango Múltiple.

Tabla 6. Análisis de varianza para Velocidad por Medio

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,84	1	0,84	76,45	0,0000
Intra grupos	0,09	8	0,01		

Tabla de Medias

En la tabla 7 se presenta las medias para velocidad, esta tabla muestra la media de Velocidad para cada nivel de Medio. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se

traslaparán un 95,0% de las veces. En las Pruebas de Rangos Múltiples, estos intervalos se usan para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Tabla 7. Medias para Velocidad por Medio con intervalos de confianza del 95,0%

<i>Error Est.</i>					
<i>Medio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
MEA	5	4,3	0,05	4,22	4,38
PDA	5	3,72	0,05	3,64	3,80

Gráfico de medias

En la figura 6 se presenta el gráfico de medias, se observa que no existe solapamiento entre los intervalos de las medias, por lo que evidencia una diferencia significativa en velocidad de crecimiento para los medios de cultivo; la media más alta presenta el medio MEA.

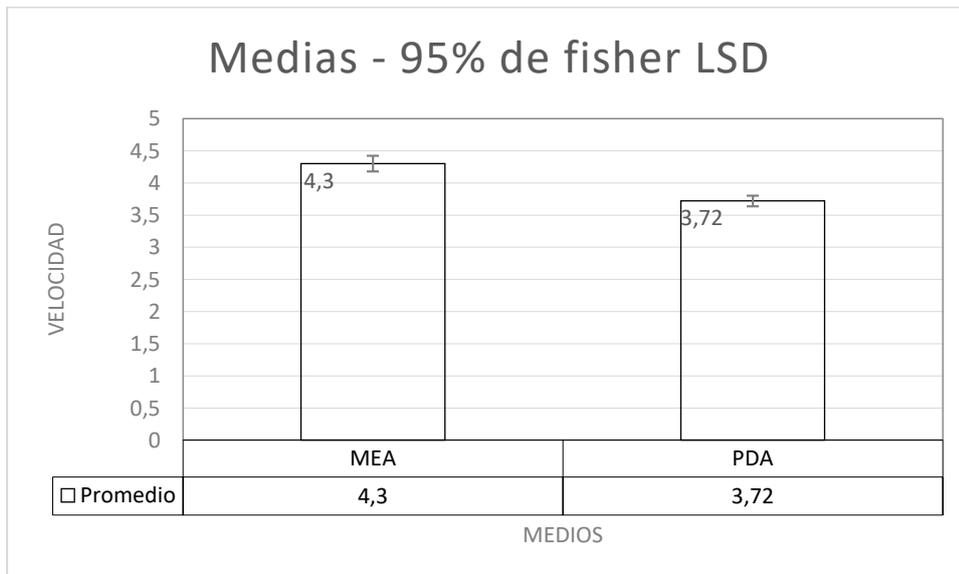


Figura 6. Gráfico de medias para velocidad

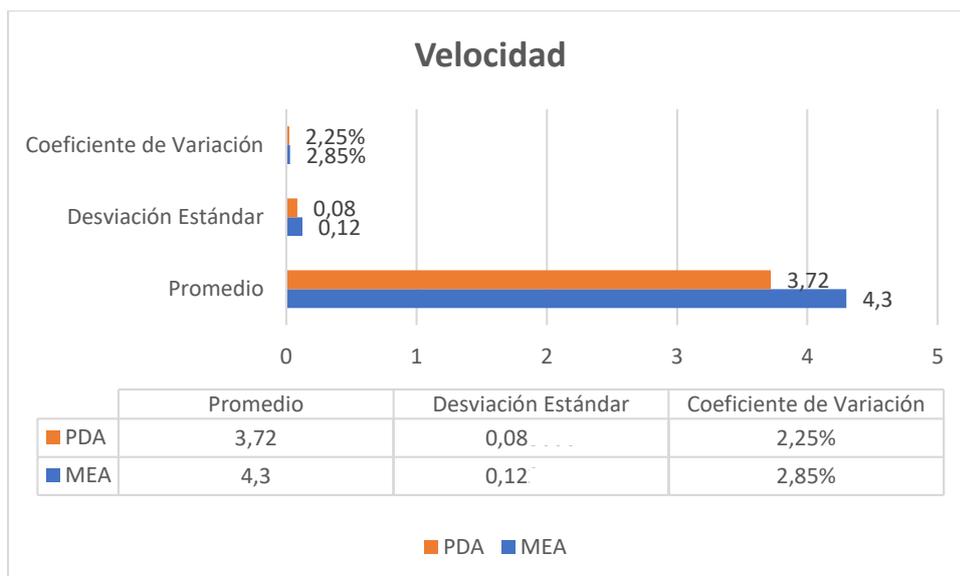


Figura 7. Resumen estadístico

Pruebas de Múltiple Rangos para Velocidad por Medio (Método: 95,0 porcentaje LSD)

En la tabla 8 se presenta las pruebas de rango múltiple, esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a un par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla 8. Pruebas de Rango Múltiple

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PDA	5	3,72	X
MEA	5	4,3	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MEA – PDA	*	0,58	0,15

* indica una diferencia significativa.

En la fotografía 8, se presenta la técnica de medición de la velocidad de crecimiento del *Monascus*, la cual fue realizada utilizando una cinta métrica.

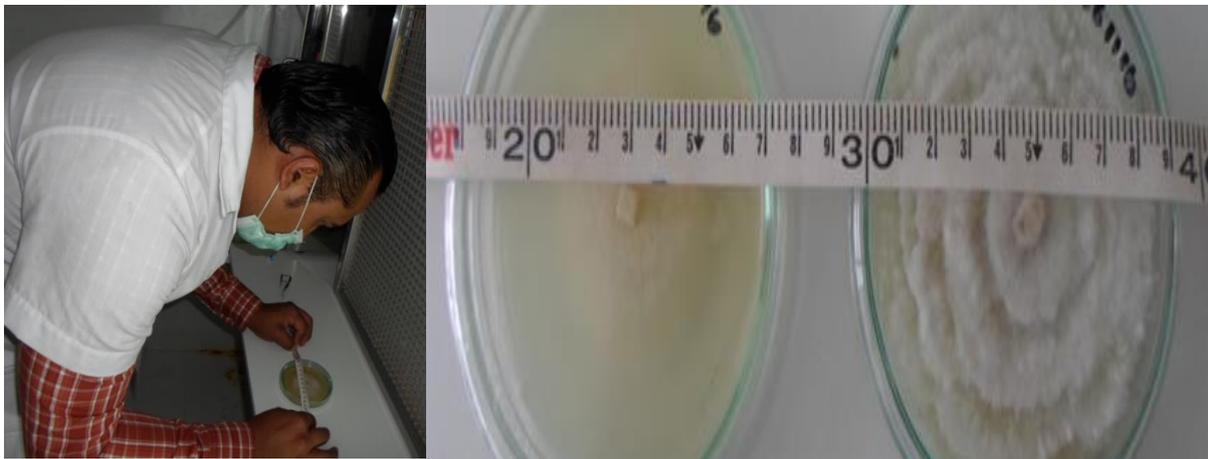


Foto 8. Medición de la velocidad de crecimiento del *Monascus*

Conclusiones

El mejor medio para la producción de *Monascus* purpúreos es agar extracto de malta (MEA) con 4,3 mm/día de velocidad de crecimiento lineal promedio; coincidiendo de esta manera con lo expuesto por Velázquez (2013), Ajdari y col. (2011); en que el mejor medio de cultivo es MEA en relación a PDA, para favorecer el crecimiento celular de *Monascus spp.*

3.4 Propuesta de catálogo de cepas microbianas puras de *Monascus spp.* para su conservación en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM).

El objetivo específico del presente acápite es “Diseñar un catálogo de cepas microbianas puras para su conservación en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM), y de esta manera contribuir con la conservación del recurso fúngico ecuatoriano.

Es importante contar con un formato de registro que facilite sistematizar los mejores resultados en la reproducción y conservación de cepas de *Monascus spp.* ecuatorianas, y su inclusión en el manejo del banco de recursos genéticos microbianos, garantizando de esta manera la operatividad en el futuro aprovechamiento del recurso fúngico de manera sustentable.

De ésta manera solventamos información y herramientas técnicas que viabilizan la implementación del banco de recursos genéticos microbianos, en el manejo sustentable de especies fúngicas cuyas características son potenciales para el desarrollo de la Biorefinería en el Ecuador; para esto es importante el trabajo mancomunado en la generación de información tanto del aislamiento, identificación, caracterización, producción y conservación de cepas puras de especies que permitan producir materias primas de importancia industrial a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana.

Con estos antecedentes se propone el catálogo de cepas microbianas puras de *Monascus* spp. como se aprecia en el Anexo 2, presentando la siguiente estructura:

Generalidades

- Taxonomía.
- Especies – Sinónimos.
- Descripción macroscópica.
- Hábitat.
- Usos.

Ficha técnica

- Medios y condiciones de cultivo.
- Condiciones para conservación.
- Registro de la muestra.

4 CONCLUSIONES

- La revisión bibliográfica y su experimentación aplicada en cepas nativas de *Monascus Purpureus* aisladas e identificadas a partir de la fermentación sólida de trigo, determinaron el desarrollo de protocolos para el crecimiento y conservación de esta especie en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos, generando conocimiento científico que puede aportar al desarrollo biotecnológico del país.
- La persistencia de la viabilidad presentada por la cepa nativa de *Monascus purpureus* luego de proceso de liofilización, garantiza la conservación de la especie y el aprovechamiento sustentable de este recurso fúngico en el tiempo, abriendo la

posibilidad de generar estudios de laboratorio que permitan producir metabolitos de interés comercial a partir de la cepa conservada.

- El catálogo específico de la cepa nativa de *Monascus purpureus* elaborado en el presente trabajo de investigación, representa una herramienta técnica de capacitación para la población interesada en el conocimiento de ésta especie.

5 RECOMENDACIONES

- Aislar, identificar y caracterizar nuevas especies nativas del género *Monascus spp.* que permita incrementar el patrimonio del banco de recursos genéticos microbianos (BRGM) del país.
- Desarrollar nuevos estudios sobre tecnologías de producción aplicadas a la cepa nativa de *Monascus purpureus* a escala de laboratorio, que permitan producir metabolitos de interés industrial.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Additifs. (2015). Indigotine, Carmin(e) d'indigo. Toxicite.

Ahn, J., Jung, J., Hyung, W., Haam, S., & Shin, C. (2006). Enhancement of *Monascus* Pigment Production by the Culture of *Monascus* sp. J101 at Low Temperature. *Biotechnology Progress*, 22(1), 338–340. <http://doi.org/10.1021/bp050275o>

Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 914–922. <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>

- Asamblea Nacional. Constitución de la República del Ecuador, Pub. L. No. Registro Oficial 449 (2008). Quito-Ecuador.
- Ausfertigungsdatum, B., & Verordnung, D. Bedarfsgegenständeverordnung (1994). Germany.
- Babitha, S., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2007). Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology*, 98(8), 1554–1560. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.005>
- Barnard, E., & Cannon, P. (1987). A new species of *Monascus* from pine tissues in Florida. *Mycology*, 79(3), 479–484.
- Barrows, J., Lipman, A., & Bailey, C. (2003). Color Additives: FDA's Regulatory Process and Historical Perspectives Food Safety Magazine. *U.S. Food and Drug Administration*.
- BAU, Y. -S, & WONG, H. -C. (1979). Zinc Effects on Growth, Pigmentation and Antibacterial Activity of *Monascus purpureus*. *Physiologia Plantarum*, 46(1), 63–67. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1979.tb03187.x>
- Bianchi, A. (2004). Los extractos de *Monascus purpureus* en la prevención y tratamiento de la aterosclerosis. *Revista de Fitoterapia*.
- Blanc, P. J., Loret, M. O., Santerre, A. L., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J. C., ... Goma, G. (1994). Pigments of *monascus*. *Journal of Food Science*, 59(4), 862–865. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08145.x>View/save citation
- Bolt, H. M., & Golka, K. (2007). The debate on carcinogenicity of permanent hair dyes: new insights. *Critical Reviews in Toxicology*, 37(6), 521–536. <http://doi.org/10.1080/10408440701385671>

- Bordehore, C. (2013). Problemas ambientales, problemas humanos, 41. Retrieved from <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/2725/8/cap8.pdf>
- Cámara-Martos, F., & Moreno-Rojas, R. (2016). Cobalt: Toxicology. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of food and health* (p. 174). Oxford: Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Campoy, S., Rumbero, 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. <http://doi.org/10.1007/s00253-005-0090-y>
- Cannon, P. F., Abdullah, S. K., & Abbas, B. A. (1995). Two new species of *Monascus* from Iraq, with a key to known species of the genus. *Mycological Research*, 99(6), 659–662. [http://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80523-6](http://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80523-6)
- Carvalho, J., Oishi, B., Pandey, A., & Soccol, C. (2005). Biopigments from *Monascus*: Strains selection, citrinin production and color stability. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(6), 885–894. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132005000800004>
- Carvalho, J., Pandey, A., Oishi, B., Brand, D., Rodriguez, J., & Soccol, C. (2006). Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 29(3), 262–269. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2006.01.008>
- Chairote, E., Chairote, G., Wongpornchai, S., & Lumyong, S. (2007). Preparation of red yeast rice using various Thai glutinous rice and *Monascus purpureus* CMU001 isolated from commercial Chinese red yeast rice sample. *KMITL Science Journal*, 7, 28–37. Retrieved from

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.499.7883{&}rep=rep1{&}type=pdf>

Chaisrisook, C. (2002). Mycelial reactions and mycelial compatibility groups of red rice mould (*Monascus purpureus*). *Mycological Research*, 106(3), 298–304.

<http://doi.org/10.1017/S0953756202005580>

Chan, W.-H., & Shiao, N.-H. (2007). Effect of citrinin on mouse embryonic development in vitro and in vivo. *Reproductive Toxicology*, 24(1), 120–125.

<http://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.04.070>

Chauvatcharin, S., & Yoshida, T. (1995). of *Monascus* Pigments by a Solid-Liquid Culture Method. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79(5), 516–518.

Chen, M.-H., & Johns, M. R. (1993). Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 40(1), 132–138.

<http://doi.org/10.1007/BF00170441>

Chen, Y.-P., Tseng, C.-P., Chien, I.-L., Wang, W.-Y., Liaw, L.-L., & Yuan, G.-F. (2008). Exploring the Distribution of Citrinin Biosynthesis Related Genes among *Monascus* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11767–11772.

<http://doi.org/10.1021/jf802371b>

Chen, Y.-P., Tseng, C.-P., Liaw, L.-L., Wang, C.-L., & Yuan, G.-F. (2007). Characterization of MRT, a new non-LTR retrotransposon in *Monascus* spp. *Botanical Studies*, 48, 377–385.

Cheng, M.-J., Wu, M.-D., Yuan, G.-F., Su, Y.-S., & Yanai, H. (2012). Secondary metabolites produced by the fungus *Monascus pilosus* and their anti-inflammatory activity.

Phytochemistry Letters, 5(3), 567–571. <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.05.015>

- Chiu, S.-W., & Poon, Y.-K. (1993). Submerged Production of Monascus Pigments. *Mycologia*, 85(2), 214–218. <http://doi.org/10.2307/3760459>
- Choe, D., Lee, J., Woo, S., & Shin, C. S. (2012). Evaluation of the amine derivatives of Monascus pigment with anti-obesity activities. *Food Chemistry*, 134(1), 315–323. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.149>
- Cousin, M. A., & Blackburn, C. D. W. (2006). Detection, enumeration and identification methods for spoilage molds. In *Food spoilage microorganisms* (pp. 55–85). Cambridge: Woodhead Publishing. <http://doi.org/10.1533/9781845691417.1.55>
- Diacu, E. (2016). Colors: Properties and Determination of Synthetic Pigments. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of food and health* (pp. 284–290). Oxford: Academic Press is an imprint of Elsevier.
- DIBICO. (1984). *Bacteriología General*, 1118.
- Dikshit, R., & Tallapragada, P. (2016). Statistical optimization of lovastatin and confirmation of nonexistence of citrinin under solid-state fermentation by *Monascus sanguineus*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(2), 433–440. <http://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.11.008>
- Dmytraczenko, T., & Almeida, G. (2015). *Toward Universal Health Coverage and Equity in Latin America and the Caribbean: Evidence from Selected Countries*. Washington D. C.
- Endo, A. (1979). Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J Antibiot (Tokyo)*, 32(8), 852–854.
- Erdogrul, O., & Azirak, S. (2004). Review of the studies on the red yeast rice (*Monascus purpureus*). *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, 2, 37–49.

- Esteves, D. (2005). *Produção do pigmento Monascus por Monascus ruber cct 3802 em cultivo submerso*. Universidade Federal de Santa Catarina.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2015). Scientific Opinion on the safety and efficacy of indigo carmine (E 132) for cats and dogs and ornamental fish. *EFSA Journal*, 13(5), 4108–4123. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4108>
- FAO. (2010). *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo*. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/013/i1683s/i1683s.pdf>
- FAO-OMS. (2016). Codex Alimentarius: international food standars.
- Farhan, S. (2010). Monascus ruber ICMP 15220 fermentation for the production of pigments, 270. Retrieved from http://mro.massey.ac.nz/xmlui/bitstream/handle/10179/2654/02_whole.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Feng, Y., Shao, Y., & Chen, F. (2012). Monascus pigments. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 96(6), 1421–1440. <http://doi.org/10.1007/s00253-012-4504-3>
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46(2), 438–450. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.007>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2016). Componentes de la Norma General para los Aditivos Alimentarios (NGAA).
- Gago-Dominguez, M., Esteban Castelao, J., Yuan, J. M., Yu, M. C., & Ross, R. K. (2001). Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk. *International Journal of Cancer*, 91(4), 575–579. [http://doi.org/10.1002/1097-0215\(200002\)9999:9999<::AID-](http://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::AID-)

- Ghorai, S., Banik, S. P., & College, M. A. (2011). Fungal Biotechnology in Food and Feed Processing. In *Comprehensive Biotechnology* (Second Edi, Vol. 1, pp. 603–615). Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00543-2>
- Godshall, M. A. (2016). Candies and Sweets: Sugar and Chocolate Confectionery. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of food and health* (p. 625). Oxford: Academic Press is an imprint of Elsevier.
- GRAIN (www.grain.org), E. (www.pangea.org/epueblos/). y la, Campaña “No te Comas el Mundo” (www.notecomaselmundo.org), conformada por el, Observatori del Deute en la Globalització (www.odg.cat), la X. de C. S., & (www.veterinariossinfronteras.org), (www.xarxaconsum.net) y Veterinarios Sin Fronteras. (2008). Introducción a la Crisis Alimentaria Global Introducción a la Crisis Alimentaria Global, 34. Retrieved from http://www.noetmengiselmon.org/IMG/pdf/Introduccion_Crisis_Alimentaria_Global.pdf
- Gregory, P. (2000). Dyes and Dye Intermediates. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (pp. 1–66). John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/0471238961.0425051907180507.a01.pub2>
- Hajjaj, H., Klaebe, A., Goma, G., Blanc, P. J., Barbier, E., & Francois, J. (2000). Medium-Chain Fatty Acids Affect Citrinin Production in the Filamentous Fungus *Monascus ruber*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 1120–1125. Retrieved from <http://aem.asm.org/cgi/content/long/66/3/1120>
- Hajjaj, H., Klaébé, A., Goma, G., Philippe, J., Barbier, E., & François, J. (2000). Medium-Chain Fatty Acids Affect Citrinin Production in the Filamentous Fungus *Monascus*

- ruber Medium-Chain Fatty Acids Affect Citrinin Production in the Filamentous Fungus *Monascus ruber*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 1120–1125.
<http://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1120-1125.2000>.Updated
- Han, O., & Mudgett, R. E. (1992). Effects of Oxygen and Carbon Dioxide Partial Pressures on *Monascus* Growth and Pigment Production in Solid-State Fermentations. *Biotechnology Progress*, 8(1), 5–10. <http://doi.org/10.1021/bp00013a002>
- Hawksworth, D. L. (1985). Fungus Culture Collections as a Biotechnological Resource. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3(1), 417–453.
<http://doi.org/10.1080/02648725.1985.10647820>
- Heber, D., Yip, I., Ashley, J., Elashoff, D., Elashoff, R., Ir, V., & Autor, I. del. (1999). Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am J Clin Nutr*, 69(2), 231–6.
- Hsu, L. C., Hsu, Y. W., Hong, C. C., & Pan, T. M. (2014). Safety and mutagenicity evaluation of red mold dioscorea fermented from *Monascus purpureus* NTU 568. *Food and Chemical Toxicology*, 67, 161–168. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.033>
- Hsu, Y.-W., Hsu, L.-C., Liang, Y.-H., Kuo, Y.-H., & Pan, T.-M. (2011). New Bioactive Orange Pigments with Yellow Fluorescence from *Monascus*-Fermented Dioscorea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4512–4518.
<http://doi.org/10.1021/jf1045987>
- Hu, Z., Zhang, X., Wu, Z., Qi, H., & Wang, Z. (2012a). Export of intracellular *Monascus* pigments by two-stage microbial fermentation in nonionic surfactant micelle aqueous solution. *Journal of Biotechnology*, 162(2), 202–209.
<http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.004>

- Hu, Z., Zhang, X., Wu, Z., Qi, H., & Wang, Z. (2012b). Perstraction of intracellular pigments by submerged cultivation of *Monascus* in nonionic surfactant micelle aqueous solution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *94*(1), 81–89. <http://doi.org/10.1007/s00253-011-3851-9>
- Húngaro, H. M., Peña, W. E. L., Silva, N. B. M., Carvalho, R. V, Alvarenga, V. O., & Sant'Ana, A. S. (2014). Food Microbiology. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, *3*, 213–231. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00059-0>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. Aditivos Alimentarios Permitidos Para Consumo Humano. Listas Positivas. Requisitos., Pub. L. No. NTE INEN 2 074:2012 (2012). Ecuador.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (2016). La institución.
- International Agency for Research on Cancer [IARC]. (2014). *World Cancer Report 2014*. (B. W. Stewart & C. P. Wild, Eds.). WHO Press.
- Jean-Marie, E. (2016). Microscopy: Light Microscopy and Histochemical Methods. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of food and health* (p. 717). Oxford: Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Jeun, J., Jung, H., Kim, J. H., Kim, Y. O., Youn, S. H., & Shin, C. S. (2008). Effect of the monascus pigment threonine derivative on regulation of the cholesterol level in mice. *Food Chemistry*, *107*(3), 1078–1085. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.021>
- Jia, X. Q., Xu, Z. N., Zhou, L. P., & Sung, C. K. (2010). Elimination of the mycotoxin citrinin production in the industrial important strain *Monascus purpureus* SM001. *Metabolic Engineering*, *12*(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.08.003>
- Jongrungruangchok, S., Kittakoop, P., Yongsmith, B., Bavovada, R., Tanasupawat, S.,

- Lartpornmatulee, N., & Thebtaranonth, Y. (2004). Azaphilone pigments from a yellow mutant of the fungus *Monascus kaoliang*. *Phytochemistry*, *65*(18), 2569–2575.
<http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.032>
- Joshi, V. K., Attri, D., BaJa, A., & Bhushan, S. (2003). Microbial Pigments. *Indian Journal of Biotechnology*, *2*, 362–369.
- Kang, B., Zhang, X., Wu, Z., Qi, H., & Wang, Z. (2013). Effect of pH and nonionic surfactant on profile of intracellular and extracellular *Monascus* pigments. *Process Biochemistry*, *48*(5-6), 759–767. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.020>
- Kang, B., Zhang, X., Wu, Z., Wang, Z., & Park, S. (2014). Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. *Enzyme and Microbial Technology*, *55*, 50–57. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.12.007>
- Kelsh, M. A., Alexander, D. D., Kalmes, R. M., & Buffler, P. A. (2008). Personal use of hair dyes and risk of bladder cancer: a meta-analysis of epidemiologic data. *Cancer Causes Control* (2008), *19*, 549–558. <http://doi.org/10.1007/s10552-008-9123-z>
- Khachatourians, G. G. (2014). *BIOCHEMICAL AND MODERN IDENTIFICATION TECHNIQUES / Food Spoilage Flora. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (Second Edi, Vol. 1). Elsevier. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00035-5>
- Kim, H., Kim, J., Oh, H., & Shin, C. (2002). Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. *Process Biochemistry*, *38*(5), 649–655.
[http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00095-X](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00095-X)
- Kim, J., Kim, H., Oh, J.-H., & Lee, I. (2010). Characteristics of *Monascus* sp. isolated from *Monascus* fermentation products. *Food Science and Biotechnology*, *19*(5), 1151–1157.

<http://doi.org/10.1007/s10068-010-0164-1>

Kim, J., Kim, H., Park, H., Youn, S., Choi, D., & Shin, C. (2007). Development of inhibitors against lipase and α -glucosidase from derivatives of monascus pigment. *FEMS Microbiology Letters*, 276(1), 93–98. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00917.x>

Klinsupa, W., Phansiri, S., Thongpradis, P., Yongsmith, B., & Pothiratana, C. (2016). Enhancement of yellow pigment production by intraspecific protoplast fusion of *Monascus* spp. yellow mutant (ade-) and white mutant (prototroph). *Journal of Biotechnology*, 217, 62–71. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.11.002>

Kogevinas, M., Fernandez, F., Garcia-Closas, M., Tardon, A., Garcia-Closas, R., Serra, C., ... Silverman, D. (2006). Hair dye use is not associated with risk for bladder cancer: Evidence from a case-control study in Spain. *European Journal of Cancer*, 42(10), 1448–1454. <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.02.009>

Kohlmeyer, J., & Kohlmeyer, E. (1979). *Marine Mycology: The Higher Fungi*. New York: Academic Press.

Kuba, M., Tanaka, K., Sesoko, M., Inoue, F., & Yasuda, M. (2009). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in red-mold rice made by *Monascus purpureus*. *Process Biochemistry*, 44(10), 1139–1143. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.007>

Kuhad, R. C., Sood, N., Tripathi, K. K., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. *Advances in Applied Microbiology*, 56, 185–213.

Lakrod, K., Chaisridook, C., Yongsmith, B., & Skinner, D. Z. (2000). RAPD analysis of genetic variation within a collection of *Monascus* spp. isolated from red rice (ang-kak) and sofú. *Mycological Research*, 104(4), 403–408. <http://doi.org/10.1017/>

S0953756299001434

- Lakrod, K., Chaisrisook, C., & Skinner, D. Z. (n.d.). Transformation of *Monascus purpureus* to hygromycin B resistance with cosmid pMOcosX reduces fertility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(2), 143–147.
- Landy, E. T., & Jones, G. M. (2006). What is the Fungal Diversity of Marine Ecosystems in Europe? *Mycologist*, 20(1), 15–21. <http://doi.org/10.1016/j.mycol.2005.11.010>
- Li, G., & Quiros, C. F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor Appl Genet*, 103, 455–461.
- Lin, J., Dinney, C. P., Grossman, H. B., & Wu, X. (2006). Personal permanent hair dye use is not associated with bladder cancer risk: Evidence from a case-control study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 15(9), 1746–1749. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0156>
- Lin, T. F., & Demain, A. L. (1991). Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 70–75. <http://doi.org/10.1007/BF00164701>
- Liu, Q., Cai, L., Shao, Y., Zhou, Y., Li, M., Wang, X., & Chen, F. (2016). Inactivation of the global regulator LaeA in *Monascus ruber* results in a species-dependent response in sporulation and secondary metabolism. *Fungal Biology*, 120(3), 297–305. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.008>
- Ma, J., Li, Y., Ye, Q., Li, J., Hua, Y., Ju, D., ... Chang, M. (2000). Constituents of Red Yeast Rice, a Traditional Chinese Food and Medicine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5220–5225. <http://doi.org/10.1021/jf000338c>

- Macario, A. L., Palo, M. A., Vidal-Adeva, L., & Maceda, L. M. (1960). A study on ang-kak and its production. *Philippine J Sci.*, 89(1), 1–19.
- Magro, M., Moritz, D. E., Bonaiuto, E., Baratella, D., Terzo, M., Jakubec, P., ... Vianello, F. (2016). Citrinin mycotoxin recognition and removal by naked magnetic nanoparticles. *Food Chemistry*, 203, 505–512. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.147>
- Matsui, T., Shinzato, N., Yokota, H., Takahashi, J., & Sato, S. (2006). High cell density cultivation of recombinant E. coli with a pressurized culture. *Process Biochemistry*, 41(4), 920–924. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.10.004>
- Mattila, P., Lampi, A.-M., Ronkainen, R., Toivo, J., & Piironen, V. (2002). Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 76(3), 293–298. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00275-8](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00275-8)
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., ... Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370(9598), 1560–1567. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61306-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61306-3)
- Meinicke, R. M., Vendruscolo, F., Esteves Moritz, D., de Oliveira, D., Schmidell, W., Samohyl, R. W., & Ninow, J. L. (2012). Potential use of glycerol as substrate for the production of red pigments by *Monascus ruber* in submerged fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(3), 238–242. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.03.001>
- Mitchell, D. A., Von Meien, O. F., & Krieger, N. (2003). Recent developments in modeling of solid-state fermentation: Heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 137–147. [http://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00126-2](http://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00126-2)

- Mitra, A. K., & Rodríguez-Fernandez, G. (2010). Latin America and the Caribbean: assessment of the advances in public health for the achievement of the Millennium Development Goals. *Int J Environ Res Public Health*, 7(5), 2238–2255.
<http://doi.org/10.3390/ijerph7052238>
- Mohan Kumari, H. P., Akhilender Naidu, K., Vishwanatha, S., Narasimhamurthy, K., & Vijayalakshmi, G. (2009). Safety evaluation of *Monascus purpureus* red mould rice in albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 1739–1746.
<http://doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.038>
- Moreno, D. A., García-Viguera, C., Gil, J. I., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 261–280. <http://doi.org/10.1007/s11101-007-9084-y>
- Mukherjee, G., & Singh, S. K. (2011). Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 46(1), 188–192. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.006>
- Nagai, T., Tomioka, K., Takeuchi, K., Iida, M., Kawada, M., & Sato, T. (2005). Evaluation of Preservation Techniques of Microorganism Resources in the MAFF Genebank. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 39(1), 19–27. <http://doi.org/10.6090/jarq.39.19>
- Nikfar, S., & Jaberidoost, M. (2014). *Dyes and Colorants*. *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edit, Vol. 2). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00602-3>
- Nohynek, G. J., Fautz, R., Benech-Kieffer, F., & Toutain, H. (2004). Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food and Chemical Toxicology*, 42(4), 517–543.
<http://doi.org/10.1016/j.fct.2003.11.003>
- Nout, R. (2007). The Colonizing Fungus as a Food Provider. In R. A. Samson & J.

- Dijksterhuis (Eds.), *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food* (pp. 343–344). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Onken, U., & Liefke, E. (1989). Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. *Bioprocesses and Engineering*, 4, 137–169.
<http://doi.org/10.1007/BFb0009830>
- Ordway, G. a, & Garry, D. J. (2004). Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *The Journal of Experimental Biology*, 207(Pt 20), 3441–3446.
<http://doi.org/10.1242/jeb.01172>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Acceso a la salud.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2012). Base de datos.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015a). Cáncer. Nota descriptiva N°297.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015b). *Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud*. New York.
- Palo, M. A., Vidal-Adeva, L., & Maceda, L. (1960). Study on ang-kak and its production. *Philipp. J. Sci. Soc.*, 89, 1–22.
- Pan, T.-M., & Hsu, W.-H. (2014). *Monascus-Fermented Products*. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00226-3>
- Panagou, E. Z., Katsaboxakis, C. Z., & Nychas, G.-J. E. (2002). Heat resistance of *Monascus ruber* ascospores isolated from thermally processed green olives of the Conservolea variety. *International Journal of Food Microbiology*, 76(1), 11–18.
[http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00748-6](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00748-6)

- Panagou, E. Z., Kodogiannis, V., & Nychas, G. J. E. (2007). Modelling fungal growth using radial basis function neural networks: The case of the ascomycetous fungus *Monascus ruber* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology*, *117*(3), 276–286. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.010>
- Park, H. G., Stamenova, E. K., & Long, S.-C. (2004). Phylogenetic relationships of *Monascus* species inferred from the ITS and the partial p-tubulin gene. *Bot. Bull. Acad. Sin*, *46*, 225–230.
- Pascual, S., Moreno, D., & García, C. (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(4), 1679–1703. <http://doi.org/10.3390/ijms11041679>
- Pastrana, L., Blanc, P. J., Santerre, A. L., Loret, M. O., & Goma, G. (1995). Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. *Process Biochemistry*, *30*(4), 333–341. [http://doi.org/10.1016/0032-9592\(95\)87042-3](http://doi.org/10.1016/0032-9592(95)87042-3)
- Pattanagul, P., Pinthong, R., & Phianmongkhol, A. (2007). Review of Angkak Production (*Monascus purpureus*). *Chiang Mai J. Sci.*, *34*(3), 319–328.
- Pattanagul, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A., & Tharatha, S. (2008). Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. *International Journal of Food Microbiology*, *126*(1), 20–23. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.019>
- Pineda-insuasti, J. A., Ramos-sánchez, L. B., & Soto-arroyave, C. P. (2014). Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido : una revisión. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, *48*(2), 13–23.
- Pisareva, E. I., & Kujumdzieva, A. V. (2010). Influence of Carbon and Nitrogen Sources on

- Growth and Pigment Production by *Monascus Pilosus* C1 Strain. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(sup1), 501–506.
<http://doi.org/10.1080/13102818.2010.10817890>
- Potera, C. (2010). Diet and nutrition: The Artificial Food Dye Blues. *Environmental Health Perspectives*, 108(10), A428. <http://doi.org/10.1289/ehp.10716.6>.
- Pro-Ecuador. (2014). Peguche Weavers of Ecuador Use Natural Dyes to Produce Bright Wool Textiles.
- Sabater-Vilar, M., Maas, R. F. ., & Fink-Gremmels, J. (1999). Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 444(1), 7–16.
[http://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00095-9](http://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00095-9)
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., & Filtenborg, O. (2002). *Introduction to food and airborne fungi* (6th ed.). Netherland: Centraalbureau Voor Schimmelcultures-Utrecht.
- Shao, Y., Xu, L., & Chen, F. (2011). Genetic diversity analysis of *Monascus* strains using SRAP and ISSR markers. *Mycoscience*, 52(4), 224–233. <http://doi.org/10.1007/S10267-010-0087-Y>
- Sharmila, G., Nidhi, B., & Muthukumaran, C. (2013). Sequential statistical optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* (MTCC 369) using potato powder. *Industrial Crops and Products*, 44, 158–164.
<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.007>
- Shehzad, A., Ha, T., Subhan, F., & Lee, Y. S. (2011). New mechanisms and the anti-inflammatory role of curcumin in obesity and obesity-related metabolic diseases.

European Journal of Nutrition, 50(3), 151–161. <http://doi.org/10.1007/s00394-011-0188-1>

Shen, L., Zhang, X., Liu, M., & Wang, Z. (2014). Transferring of red *Monascus* pigments from nonionic surfactant to hydrophobic ionic liquid by novel microemulsion extraction. *Separation and Purification Technology*, 138, 34–40.
<http://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.09.035>

Shin, C. S., Kim, H. J., Kim, M. J., & Ju, J. Y. (1998). Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when cocultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 59(5), 576–581.
[http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980905\)59:5<576::AID-BIT7>3.0.CO;2-7](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980905)59:5<576::AID-BIT7>3.0.CO;2-7)

Shinzato, N., Namihira, T., Tamaki, Y., Tsukahara, M., & Matsui, T. (2009). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis coupled with microchip electrophoresis for high-resolution identification of *Monascus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82, 1187–. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-1937-4>

Silveira, S. T., Daroit, D. J., & Brandelli, A. (2008). Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. *LWT - Food Science and Technology*, 41(1), 170–174. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.01.013>

Singh, N., Goel, G., Singh, N., Pathak, B. K., & Kaushik, D. (2015). Modeling the red pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 by Artificial Neural Network using rice water based medium. *Food Bioscience*, 11, 17–22.
<http://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.04.001>

Species Fungorum. (2016). Species Fungorum.

Srianta, I., & Harijono, A. (2015). *Monascus*-fermented sorghum: pigments and monacolin K

- produced by *Monascus purpureus* on whole grain, dehulled grain and bran substrates. *Int Food Res J*, 22, 377–382. Retrieved from <http://www.ifrj.upm.edu.my/22>
- Stchigel, A. M., Cano, J. F., Abdullah, S. K., & Guarro, J. (2004). No New and interesting species of *Monascus* from soil, with a key to the known species. *Studies in Mycology*, 50, 299–306.
- Suárez Arango, C., & Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: Una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.011>
- Talarposhti, A. M., Donnelly, T., & Anderson, G. K. (2001). Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase Anaerobic packed bed reactor. *Water Research*, 35(2), 425–432. [http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00280-3](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00280-3)
- Terry, P., Giovannucci, E., Michels, K. B., Bergkvist, L., Hansen, H., Holmberg, L., & Wolk, A. (2001). Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(7), 525–533. <http://doi.org/10.1093/jnci/93.7.525>
- Tseng, Y. Y., Chen, M. T., & Lin, C. F. (2000). Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars. *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 31–37.
- Tu, C.-Y., Chen, Y.-P., Yu, M.-C., Hwang, I.-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. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.12.009>
- U. S. Government Publishing Office. Electronic Code Federal of Regulations [e-CFR], Pub. L. No. Title 21 → Chapter I → Subchapter A. Parts 73, 74, 81 and 82 (2016). Estados

Unidos.

U.S. Food and Drug Administration [FDA]. (2013). Appendix 5B-3 — List of Existing Food Additives in Japan for the Japan Food Chemical Research Foundation. FDA.

U.S. Food and Drug Administration [FDA]. (2016). New Dietary Ingredients in Dietary Supplements - Background for Industry.

Vasilyeva, A. A., Chekunova, L. N., Bilanenko, E. N., Kachalkin, A. V., & Polyakova, A. V. (2012). Characterization of the strain *Monascus floricidus* P. F. Cannon & E. L. Barnard, isolated from aviation fuel. *Microbiology*, *81*(4), 244–250.
<http://doi.org/10.1134/S0026261712010158>

Velasco-Bedran, H. (2009). An airlift continuous biorreactor for high-rate treatment of domestic sewage. *New Biotechnology*, *25*(September), S197–S198.
<http://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.128>

Velazquez, M. (2013). *Producción de pigmentos fúngicos (Monascus purpureus 2955) en residuos agroindustriales por fermentación sólida*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL. Retrieved from <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/542/62759s.pdf?sequence=1>

Velmurugan, P., Hur, H., Balachandar, V., Kamala-Kannan, S., Lee, K. J., Lee, S. M., ... Oh, B. T. (2011). *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *112*(6), 590–594.
<http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.08.009>

Venil, C. K. (2009). An Insightful Overview on Microbial Pigment , Prodigiosin. *Electronic Journal of Biotology*, *5*(3), 49–61.

- Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R., Muruges, S., & Singaravadivel, K. (2009). Stimulation of Monascus Pigments by Intervention of Different Nitrogen Sources. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4(1), 25–28.
- Villaño, D., García-Viguera, C., & Mena, P. (2016). Colors: Health Effects. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of food and health* (pp. 265–272). Oxford: Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Wong, H.-C., & Bau, Y.-S. (1978). A comparison of conidial and ascospore germination of *Monascus purpureus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 70(2), 277–282. [http://doi.org/10.1016/S0007-1536\(78\)80042-4](http://doi.org/10.1016/S0007-1536(78)80042-4)
- Wong, H.-C., & Koehler, P. E. (1983). Production of Red Water Soluble Monascus Pigments. *Journal of Food Science*, 48(4), 1200–1203. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb09191.x>View/save citation
- Xiong, X., Zhang, X., Wu, Z., & Wang, Z. (2014). Accumulation of yellow Monascus pigments by extractive fermentation in nonionic surfactant micelle aqueous solution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1173–1180. <http://doi.org/10.1007/s00253-014-6227-0>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.10.014>
- Yang, S., Zhang, H., Li, Y., Qian, J., & Wang, W. (2005). The ultrasonic effect on biological characteristics of *Monascus* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(1), 139–144. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.02.005>
- Yongsmith, B., Tabloka, W., Yongmanitchai, W., & Bavavoda, R. (1993). Culture conditions

- for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB 10 grown on cassava medium. *World J Microbiol Biotechnol*, 9(1), 85–90. <http://doi.org/10.1007/BF00656524>
- Zhang, B. B., Lu, L. P., Jun Xia, Y., Wang, Y. L., & Xu, G. R. (2013). Use of agar as carrier in solid-state fermentation for Monacolin K production by *Monascus*: A novel method for direct determination of biomass and accurate comparison with submerged fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 80, 10–13. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2013.09.007>
- Zhang, B. B., Lu, L. P., & Xu, G. R. (2015). Why solid-state fermentation is more advantageous over submerged fermentation for converting high concentration of glycerol into Monacolin K by *Monascus purpureus* 9901: A mechanistic study. *Journal of Biotechnology*, 206, 60–65. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.011>
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176–183. <http://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>
- Adriana González, Alejandro Méndez, Raúl Rodríguez, & Aguilar, C. (2009, Julio - Septiembre, 2009). Pigmentos Microbianos. *Cienciacierta*, 3.
- Velázquez, J. (2011, 11 de abril de 2011). [Problemas de salud ocasionados por los aditivos, preservativos, colorantes y sabores artificiales, hormonas y antibióticos en la alimentación industrial del mundo moderno].

7 ANEXOS

Anexo 1. Certificación de Identificación – Cepa *Monascus Purpureus*.



Acuerdo Ministerial: 026 (17-03-2009)
Registro Oficial: 579 (28-04-2009)
RUC: 1091728237001

Ibarra, 19 de mayo de 2016

Detalle de Resultados

Ingreso: CEBA /Klever Ayala

Muestra: CEBA-FSASIII-mp-010116

Actividad: Aislamiento e identificación a nivel de especie del Bioproducto *Monascus spp.*

Técnico Responsable: Dr. Gualberto León, PhD

Fecha: 19/05/2016

1. Estudio: Aislamiento e inspección microbiológica de *Monascus spp.*

2. Detalles técnicos:

2. Muestras usadas: Muestra de *Monascus* en bolsa de polietileno con trigo denominado:

Micelio de *Monascus spp.*

Método de determinación: aislamiento microbiológico.

Procedimiento: Se recolectó una porción homogénea de Bioproducto, se sembraron por duplicado tres repeticiones en medio nutriente, adicional se utilizó un control negativo (sin cepa) y un Control positivo (cepa de referencia aislada CEBA).

- Se documentó el crecimiento tras 1, 2, 3, 4, 5, 6 y días 30° C.
- Se observó e inspeccionó la colonia mediante microscopia.

Resultados:

Se aislaron colonias aparentemente iguales al testigo que mediante inspección microscópica se identificaron como *Monascus spp.* debido a su semejanza tanto el cultivo y en estructuras sexuales (esporas).

Se identifica como:

Reino: Fungi
Filo: Ascomycota
Clase: Eurotiomycetes
Orden: Eurotiales
Familia: Monascaceae
Género: *Monascus*
Especie: *purpureus*

Calle Bolívar 13-118 (of. 11) y Av. Teodoro Gómez de la Torre, Cel. 0995797813,
www.ceba.org.ec, cebaecuador@gmail.com, Ibarra-Ecuador

Anexo 2. Catálogo de cepas microbianas puras de *Monascus spp.*