



OBTENCIÓN DE AROMAS A PARTIR DE UN RESIDUO GENERADO POR LA INDUSTRIA LÁCTEA EMPLEANDO *Rhodotorula spp.*

AUTORES

Alison Tatiana Latorre Virviescas
Maria Ximena Macana Viasus
Laura Marcela Mora Oviedo

ASESORAS

Ana Graciela Lancheros Diaz
Migdalia Idalmy García Folleco
Magister en Ciencias y Biotecnología

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

23 Mayo 2018

PROBLEMA



Tomado de: <http://blogecologista.com/wp-content/uploads/2010/09/agua-contaminacion-referendo-agua-mini1.jpg>



Tomado de: <http://www.unionhidalgo.mx/sites/default/files/styles/galeria/public/field/image/lactosueros660.jpg?itok=pKuRXDWF>

INTRODUCCIÓN

LACTOSUERO



Lactosuero. Fuente.
<http://intainforma.inta.gov.ar/?p=39643>

Rico en:

- Proteínas
- Lípidos
- Lactosa
- Calcio
- Lactato
- Fosfatos
- Cloruros

Rhodotorula. spp



Rhodotorula spp. Fuente. Propia

- Familia: Sporidiobolaceae
- División: Basidiomycota
- Aerobia
- Crecimiento 48 - 72 horas

ACEITES ESENCIALES



Aceites esenciales. Fuente. <https://www.psicoactiva.com/blog/aceites-esenciales-para-que-sirven/>

- Alto contenido de productos orgánicos
- Difícil eliminación
- Altos costos.

ANTECEDENTES

REYES Y FRANCO 2006

Implementación de biotecnología a partir de medios biológicos.

ALCHIHAB *et al.* (2010)

Producción de lactonas con levaduras para generar aromas frutales.

LISBOA Y GUERIN (2012)

Dominio de las fuentes de nitrógeno utilizadas por levaduras de la especie *Rhodotorula mucilaginosa*

HERNANDEZ *et al.* (2013)

Rhodotorula glutinis produce carotenoides, ácido acético y acetaldehído con el fin de producción industrial de pigmentos.

MOYANO (2013)

Definió la velocidad de crecimiento y desarrollo de la levadura *Rhodotorula spp.* en un efluente de origen lácteo.

FADEL (2015)

Utilización de *Trichoderma* para producción de aroma de coco utilizando medio de cultivo sólido de bagazo de caña.

CHENG (2017)

Utilización de *Rhodotorula mucilaginosa* y *Saccharomyces cerevisiae* para fermentar uvas obteniendo terpenoles, alcoholes, ésteres.

MARCO REFERENCIAL

AROMAS



Aromas. Fuente. <https://techpress.es/mercado-aromas-continua-tendencia-alcista/>

Sustancias que se pueden percibir por medio de receptores sensoriales, como el sentido del olfato.

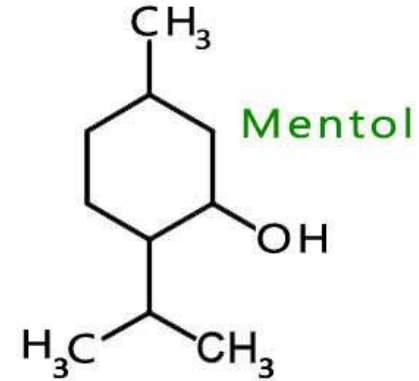
Comparten su fracción volátil que es la responsable de generar el aroma. Se destacan por su consistencia, origen y naturaleza química.



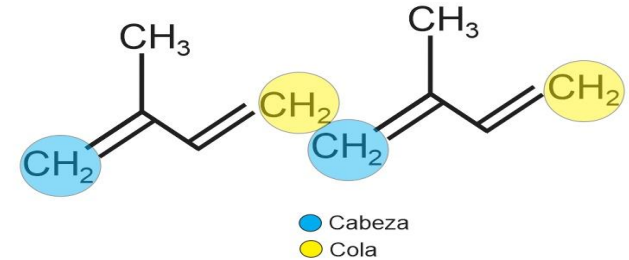
Aceites esenciales. Fuente. <http://www.aceitesesencialesbio.es/blog/aceites-esenciales-botiquin/>

TERPENOS

NÚMERO DE ISOPRENOS	NÚMERO DE CARBONOS	TERPENOS
2	10	Monoterpenos
3	15	Sesquiterpenos
4	20	Diterpenos
5	25	Sesterpenos
6	30	Triterpenos
8	40	Tetraterpenos

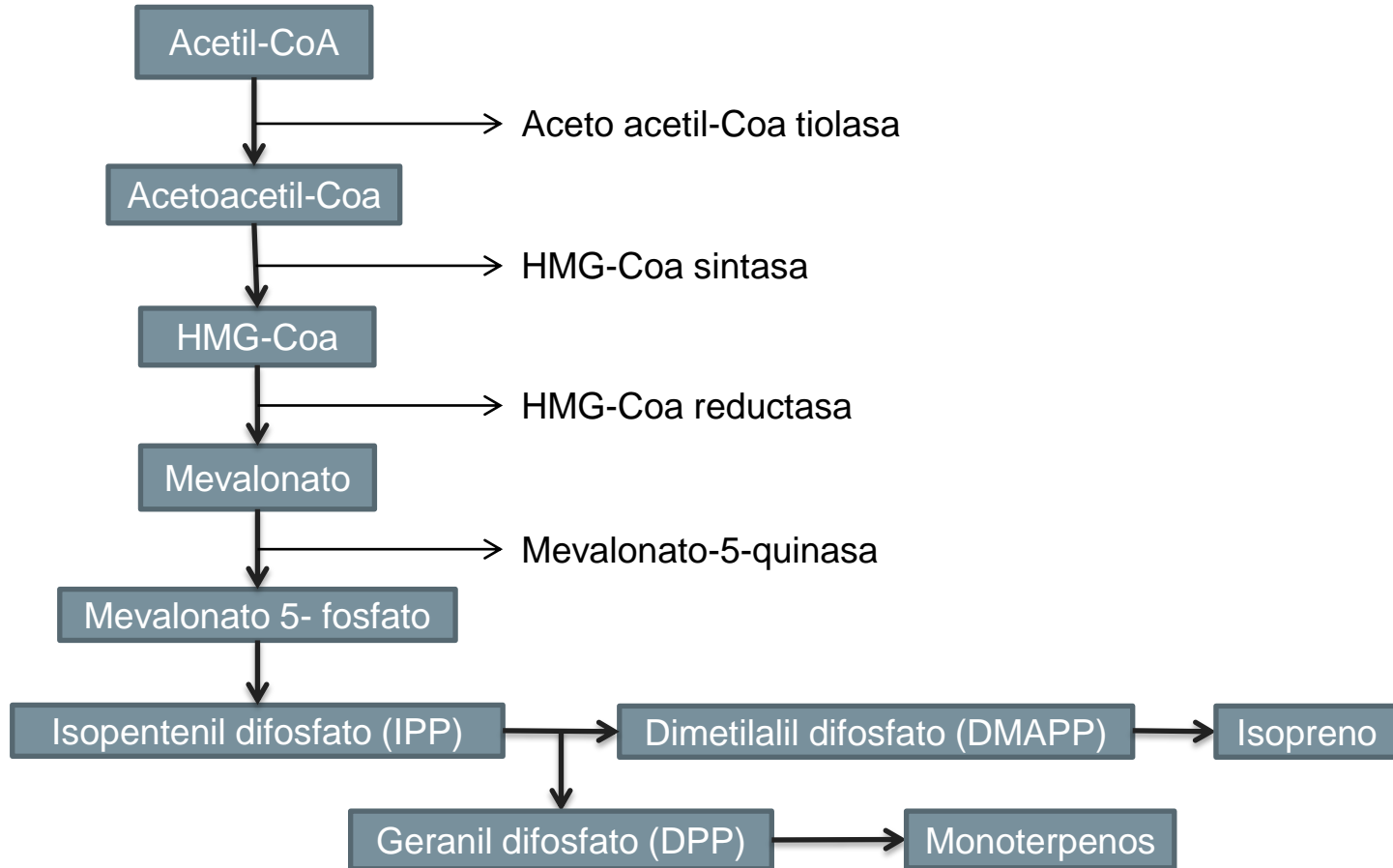


Mentol. Fuente: <https://www.acidohialuronico.org/wp-content/uploads/mentol-formula.jpg>



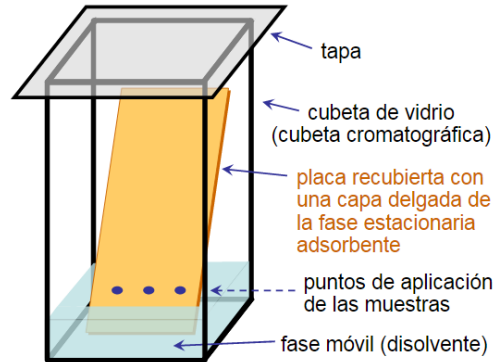
Fuente: (Negrete E. 2012)

ruta metabólica síntesis mentol



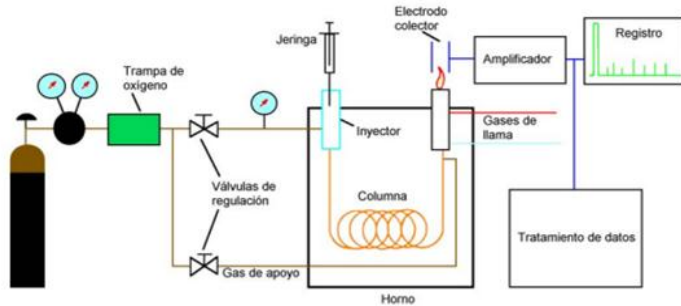
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

- **Cromatografía en capa delgada**



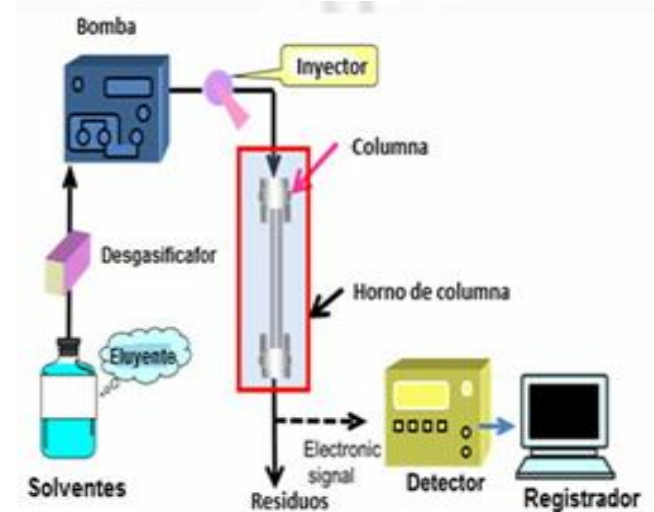
Fuente. lidiakonlaquimica.wordpress.com

- **Cromatografía de gases**



Cromatógrafo de gases

- **Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**



Fuente. <http://slideplayer.es/slide/5439317/>

OBJETIVOS

Obtener aromas a partir del empleo de un residuo generado por la industria láctea con la cepa de *Rhodotorula spp.*

1. Establecer el medio de cultivo apropiado para la obtención del metabolito secundario.

2. Emplear el desecho orgánico (lactosuero) en diferentes proporciones como sustrato de la fermentación de la levadura.

3. Identificar los compuestos aromáticos obtenidos a través de pruebas cualitativas.

DISEÑO METODOLÓGICO

HIPOTESIS:

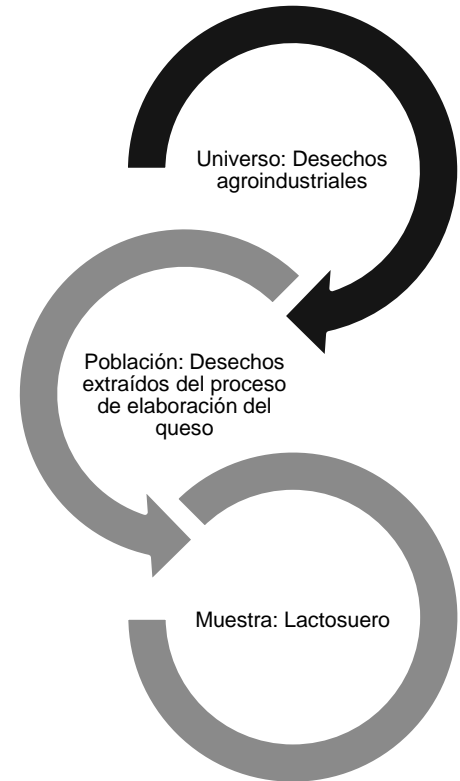
Es posible biosintetizar un terpeno haciendo uso del lactosuero como medio de cultivo fermentable en adición con otros componentes mediados por la levadura *Rhodotorula spp.*

VARIABLE INDEPENDIENTE:

Microorganismos, Cantidad de inóculo, Nutrientes, Procesado de la fermentación, Tipo de lactosuero.

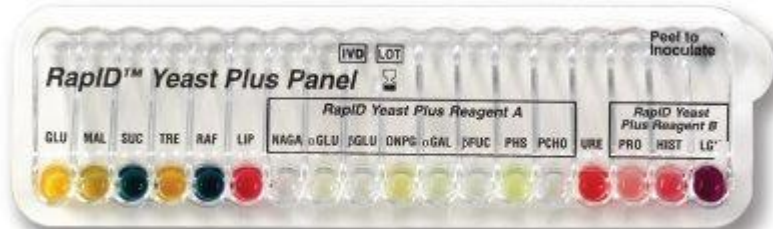
VARIABLE DEPENDIENTE:

Síntesis del terpeno



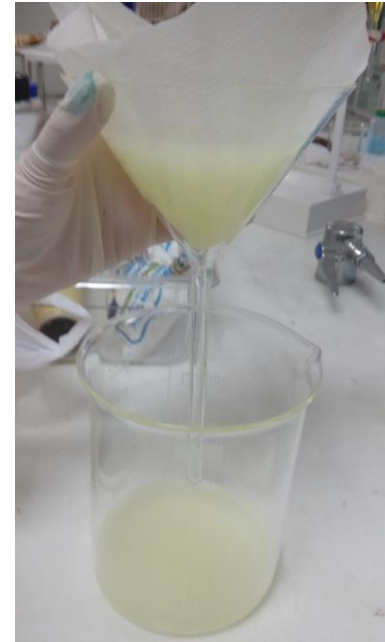
DISEÑO METODOLÓGICO

1. PRECULTIVO E IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO



Tomado de: <http://www.pvequip.cl/wp-content/uploads/2015/03/RapID.jpg>

2. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL LACTOSUERO



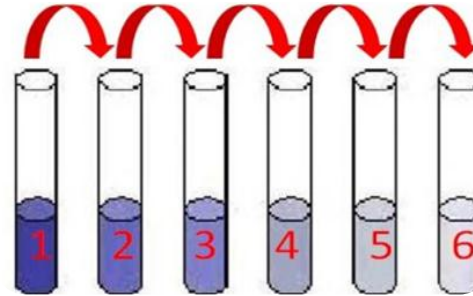
3. MEDIOS DE CULTIVO

YPD LÍQUIDO		YPD MODIFICADO		LACTOSUERO	
Glucosa	2% (5g)	Glucosa	2% (5g)	Lactosuero	250ml
Peptona	2% (5g)	Peptona	0,5% (1.25g)	Peptona	1.25g
Levadura	1% (2.5g)	Sales:		Cloranfenicol	0.0075g
Glicerol	5% (12.5g)	(NH₄)₂SO₄	0.3% (0.75g)		
Cloranfenicol	(0.0075g)	KH₂PO₄	0.1% (0.25g)		
Agua destilada	125ml	MgSO₄x7H₂O	0.05% (0.125g)		
Lactosuero	125ml	Cloranfenicol	0.0075g		
		Agua destilada	125ml		
		Lactosuero	125ml		

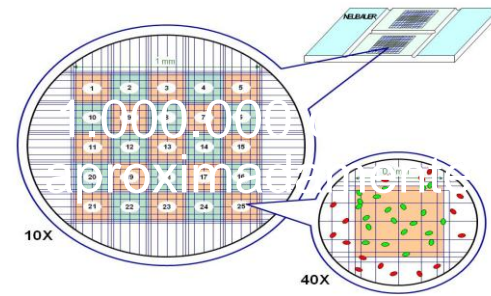
4. PREPARACIÓN Y SIEMBRA DEL INÓCULO



<https://userscontent2.emaze.com/images/6261fc7a-04a7-4a8b-af76-ef6c598ed61e/64cfe1503123169235eb60c66ae93bd7.png>



<https://powerexplosive.com/wp-content/uploads/2017/08/HOMEOPAT%C3%8DA-diluciones-870x430.jpg>



http://insilico.ehu.es/camara_contaje/neubauer.jpg

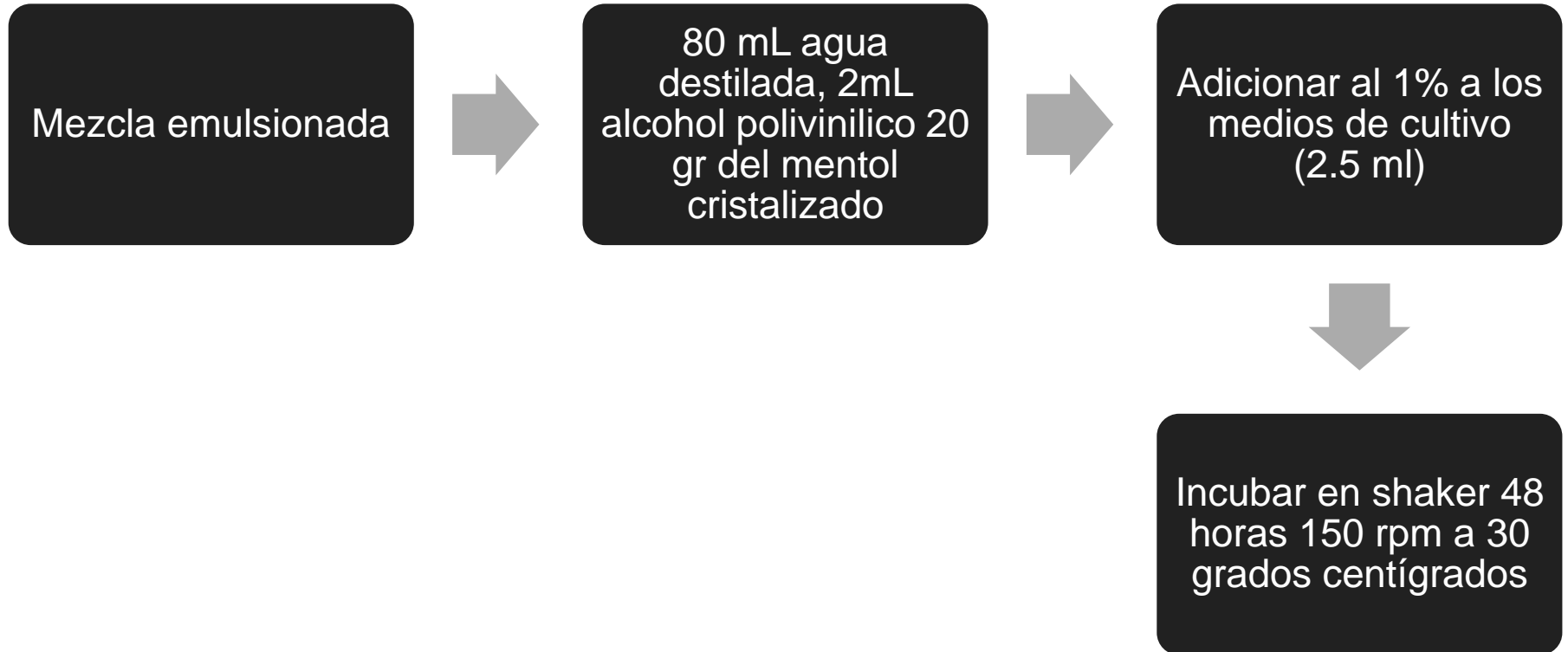


Se incuba en shaker 30 grados centígrados, 150 rpm 48 horas



Se inocula al 10% 25ml de inóculo para 250 de medio total

5. PREPARACIÓN Y ADICIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO



6. PURIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO



ROTOFIX 32 A

http://equipamientocientifico.com/1910-large_default/centrifuga.jpg

3500 rpm 15 minutos



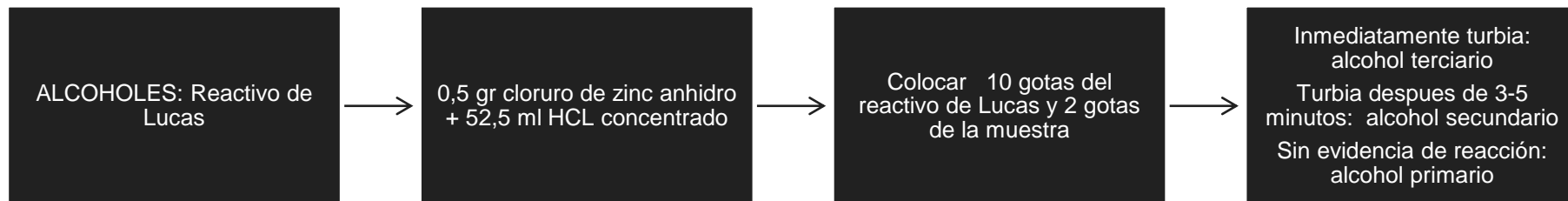
<https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CCG/product-images/F181462~p.eps-650.jpg>

Utilizar sobrenadante



55 mbar, 80 rpm 80°C

7. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES (alcoholes)



7. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES (Fenoles)

FENOLES: Cloruro
férico



1 ml de muestra + 5
gotas de cloruro férrico

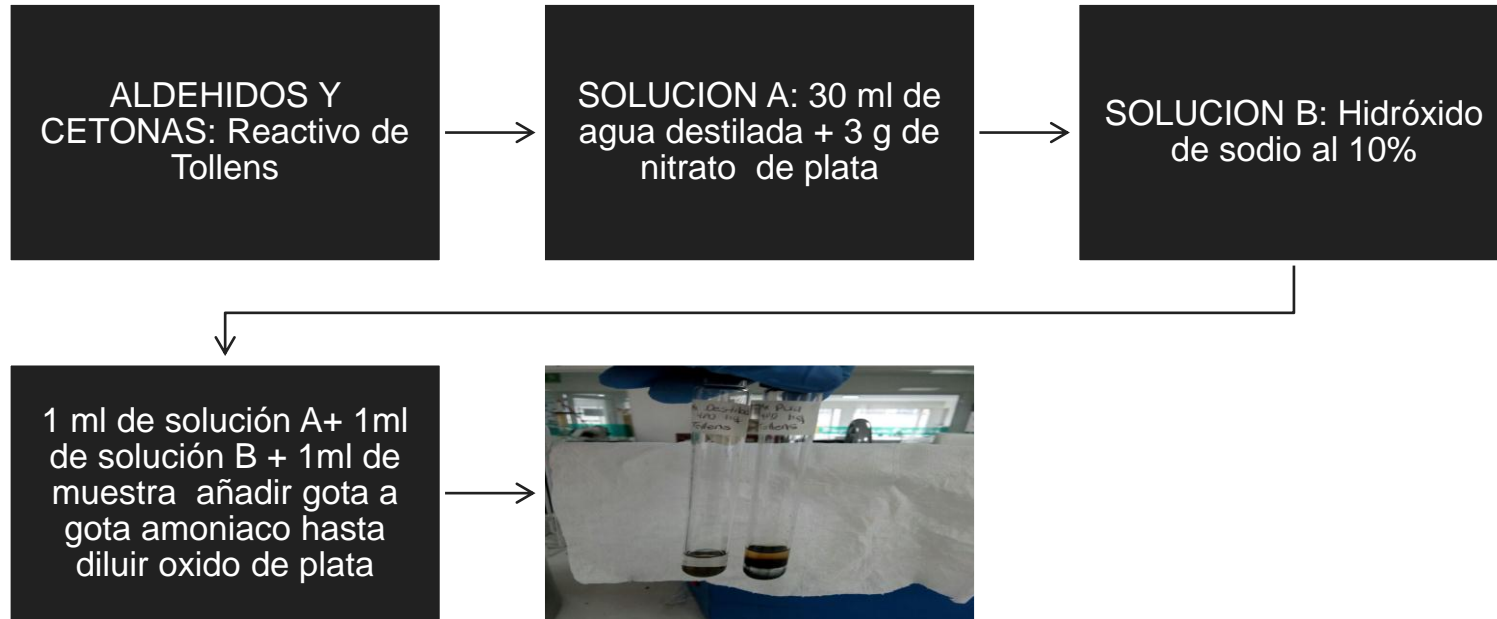


Reacción positiva:
Coloración verdosa,
azul o violeta.

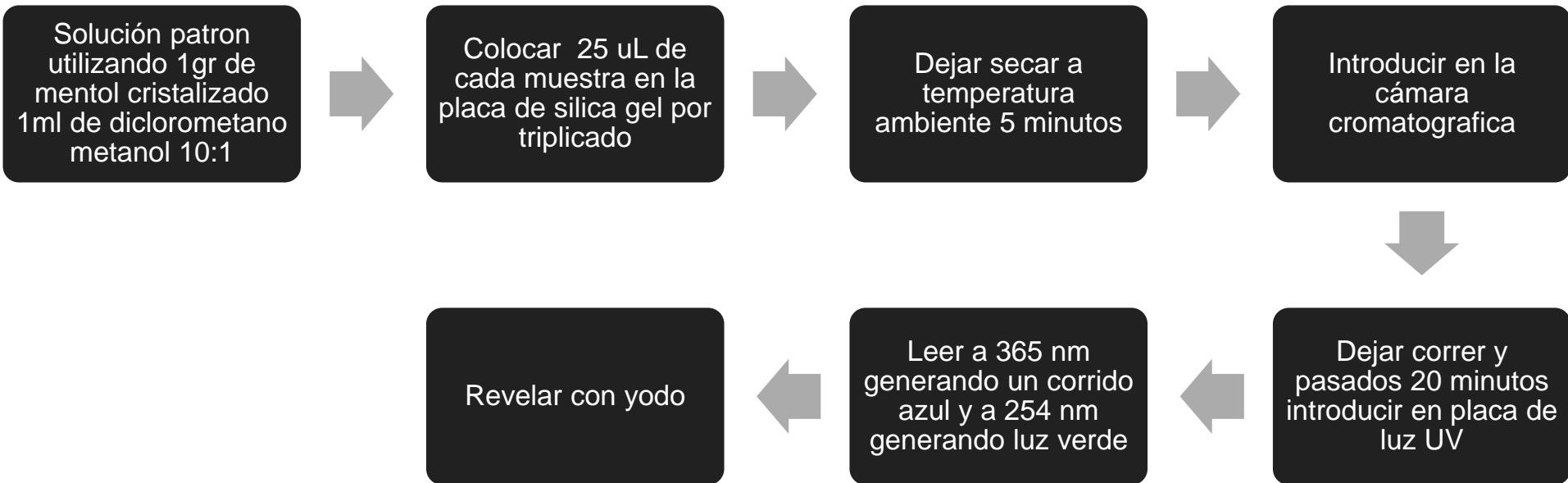
Reacción negativa:
Coloración amarilla

Complejo con Fe(III)

7. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES (Aldehidos y cetonas)



8.CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

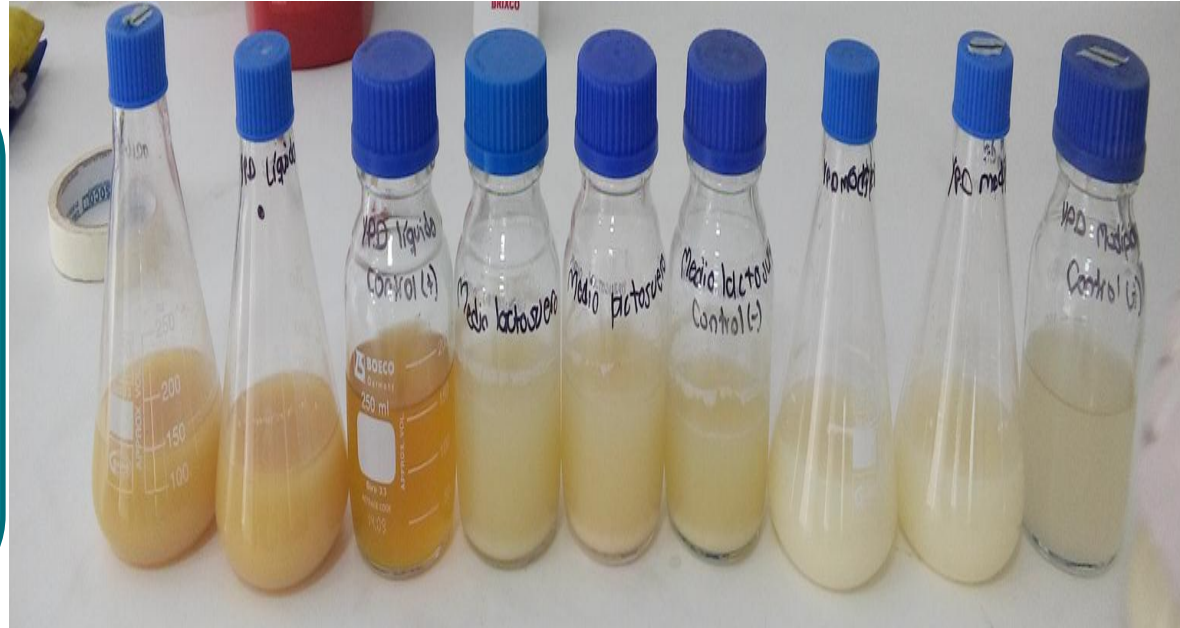
IDENTIFICACIÓN MICROORGANISMO MÉTODO REMEL

ERIC Web										Identification Report									
Rapid Yeast Plus																			
Microcode: 002051										Run Date: 6/9/2017 Facility: UNIVERSIDAD COL Reference No: CEPA CONSUELO									
System Tests																			
-GLU 09% -TRE 03% -NAGA 00% -ONPG 00% +PHS 28% +PRO 99%																			
-MAL 06% -RAF 02% +αGLU 64% -αGAL 00% -PCHO 26% -HIST 71%																			
-SUC 05% -LIP 46% -βGLU 02% -βFUC 00% +URE 97% -LGY 62%																			
IDENTIFICATION = Rhod. rubra																			
Choice					Probability					Bioscore					Contraindications				
Rhod. rubra					95.18%					1/175					None				
Rhod. glutinis					4.47%					1/403					PHS [2]				
Rhod. minuta					0.35%					1/1926					βGLU[81] βFUC[88] PHS [23]				
Probability Level: Adequate																			
Biofrequency: Acceptable																			

Biotransformación de
monoterpenoides (Conversion of
Terpenoids. 1988)

MEDIOS DE CULTIVO FORMULADOS

- Capacidad de crecimiento en efluente lácteo. (Moyano et al 1992)
- PH: 4.5 (Hagler & Ahearn, 1987 ; Walker, 1998 ;)
- Concentración de glucosa (Blazejak et al 2016)
- Reducir enlaces dobles competitivos (C = C y C = O) (Goreti et al. 2015)



RECUENTO DE LEVADURAS

$$[10^{-4}] = \# \text{ cel} * 10.000/4$$

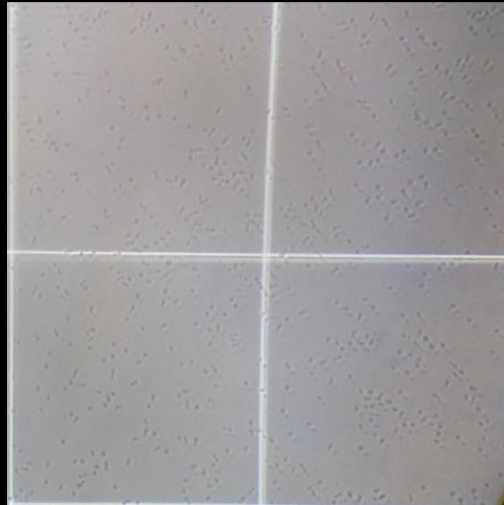
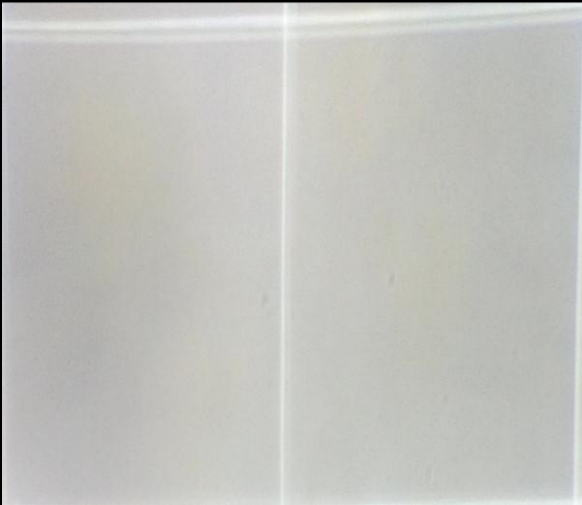
$$[10^{-4}] = 1.344 \text{ cel/ml} * 10.000/4$$

$$[10^{-4}] = 3'360.000 \text{ cel/ml}$$

$$[10^{-5}] = \# \text{ cel} * 10.000/4$$

$$[10^{-5}] = 428 \text{ cel/ml} * 10.000/4$$

$$[10^{-5}] = 1'070.000 \text{ cel/ml}$$



EVALUACIÓN SENSORIAL

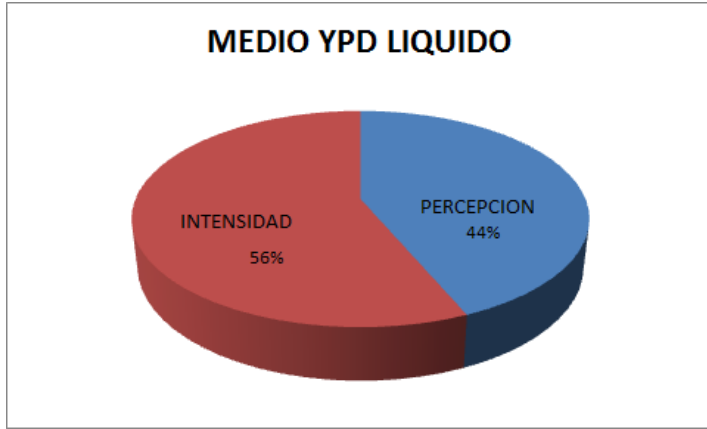


Figura 12. Evaluación sensorial medio YPD líquido. Fuente (Propia)

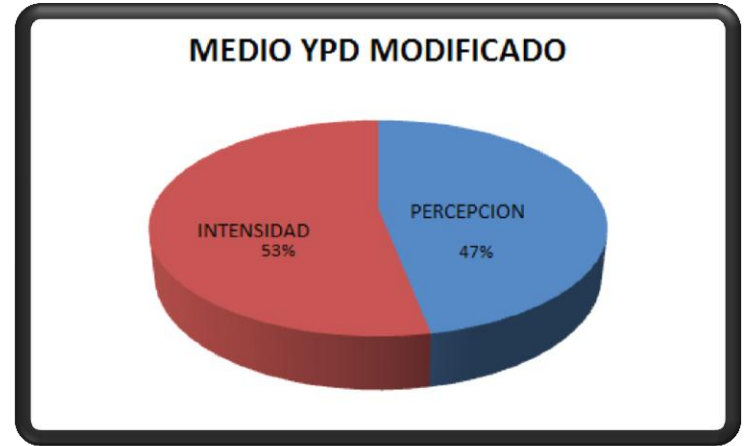


Figura 13. Evaluación sensorial medio YPD modificado. Fuente (Propia)

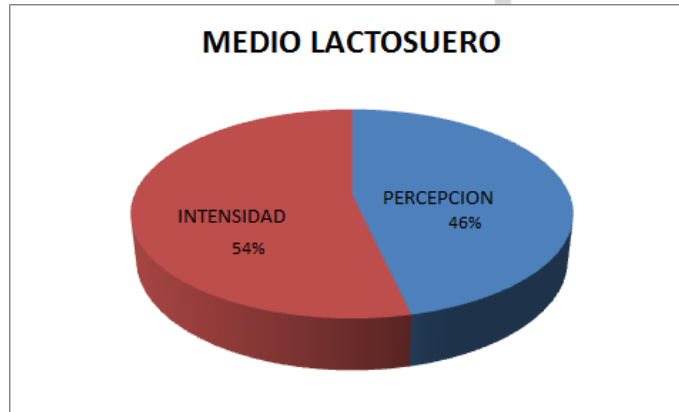


Figura 14. Evaluación sensorial medio lactosuero. Fuente (Propia)

**MAYOR
PRODUCTIVIDAD
EN LA VÍA
METABÓLICA
MEVALONATO**

RESULTADOS PRUEBAS QUÍMICAS REALIZADAS A CULTIVOS

COMPUESTO IDENTIFICADO	MEDIO	RESULTADO
FENOLES (FeCl ₃)	LACTOSUERO	NEGATIVO
	YPD MODIFICADO	NEGATIVO
	YPD LÍQUIDO	NEGATIVO
ALCOHOLES (Reactivo de Lucas)	LACTOSUERO	ALCOHOL 3
	YPD MODIFICADO	ALCOHOL 2
	YPD LÍQUIDO	ALCOHOL 1
ALDEHÍDOS Y CETONAS (Reactivo de Tollens)	LACTOSUERO	NEGATIVA
	YPD MODIFICADO	NEGATIVA
	YPD LIQUIDO	POSTIVA

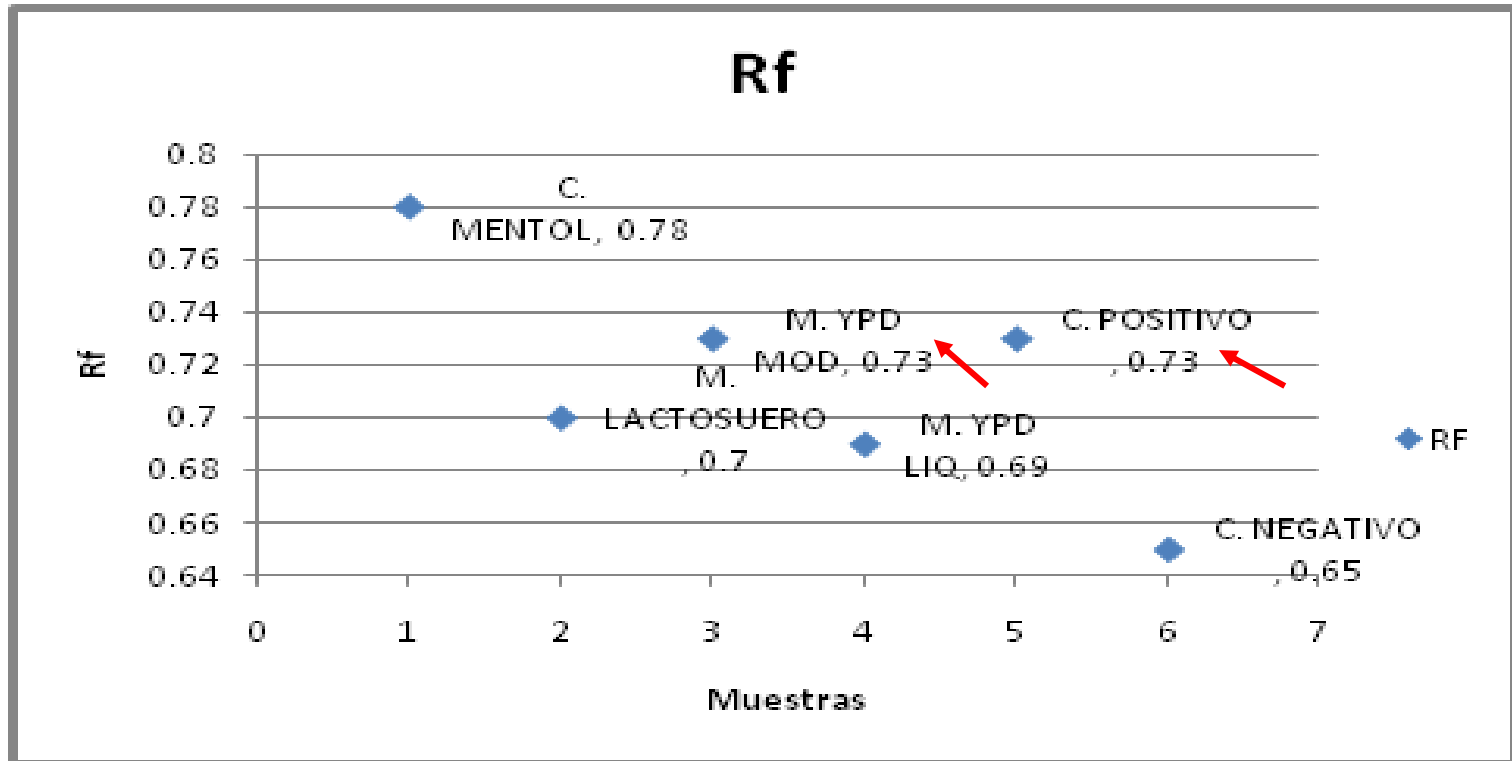
- Mentol alcohol terpénico secundario (Negrete, 2012)
- Generación del mentol por *Rhodotorula* (Biotecnología alimentaria)

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

MUESTRAS	RECORRIDO (mm)	Rf
1. Control mentol	59	0.78
2. Lactosuero	53	0.70
3. YPD modificado	55	0.73
4. YPD líquido	52	0.69
5. Control positivo	55	0.73
6. Control negativo	49	0.65

Anisaldehído-ácido
sulfúrico, vainillina-ácido
sulfúrico y ácido
fosfomolibdico (Martínez,
2001)

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA



CONCLUSIONES

El aroma obtenido fue el mentol siendo este el esperado aunque no en la intensidad deseada.

El medio formulado y con mayor aceptabilidad por la levadura fue el YPD modificado, identificando olfativamente el compuesto volátil generado.

La presencia del terpeno detectado por cromatografía de capa delgada demuestra que *Rhodotorula spp* es el microorganismo apto para la biotransformación de este metabolito.

Es posible obtener compuestos aromáticos a partir de desechos industriales (lactosuero), debido a los cuerpos proteicos fermentables, nitrógeno y albumina contenidos en este.

RECOMENDACIONES

Es necesario realizar mas estudios con el fin de identificar el compuesto aromático a través de métodos mas sensibles (HPLC).

Se recomienda mantener la cantidad de sales en el medio YPD modificado, contribuyendo al desarrollo de la levadura, mejorando su capacidad metabólica.

Realizar ensayos en tiempos diferentes de incubación en la adición del precursor, con el fin de identificar cual es optimo en la generación del terpeno.

Se recomienda utilizar controles con diferentes terpenos, lo cual permitiria poder comparar que otros compuestos aromaticos se generarian.

Empleo de fluorocromos especificos como la Rodamina, por la afinidad que este presenta con los terpenos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reyes González G, Correa M. Producción biotecnológica de sabores, pigmentos y aromas a partir de hongos miceliales y levaduras [Internet]. Revistas.javeriana.edu.co. 2006 [cited 31 August 2016]; 11(2):25-26. Available from: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4967>
2. El lactosuero y su uso como producto | Contexto Ganadero [Internet]. Contextoganadero.com. 2016 [cited 31 August 2016]. Available from: <http://www.contextoganadero.com/blog/el-lactosuero-y-su-uso-como-producto>
3. LACTOSUERO: IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS. Revista Facultad Nacional de Agronomía [Internet]. 2016 [cited 31 August 2016]; 62(1):4967-4978. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a21v62n1.pdf>
4. LOS VERTIDOS DEL SECTOR LÁCTEO. [Internet]. 2008 [cited 31 August 2016]. Available from: http://api.eoi.es/api_v1_dev.php/fedora/asset/eoi:48159/componente48157.pdf
5. Kot Am, Błażej S, Kurcz A, Gientka I, Kieliszek M. Rhodotorula glutinis-potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. Appl Microbiol Biotechnol. [Internet]. 2016 [cited 13 September 2016]; 100(14):6103-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27209039>
6. M. A. G. Liboa, M. E. Guerin, L. Pegoraro. Influencia de la fuente de Nitrógeno en el medio de cultivo, en el crecimiento de *Rhodotorula sp.* De origen lácteo. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa María-Argentina. [Internet]. [Cited 13 September 2016]. Available from: http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytl_frm/CyTAL_2012/TF/TF021.pdf
8. Mata-Gómez L, Montañez J, Méndez-Zavala A, Aguilar C. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. Microbial Cell Factories. 2014; 13(1):12.
7. Hernández-Almanza A, Cesar Montanez J, Aguilar-González M, Martínez-Ávila C, Rodríguez-Herrera R, Aguilar C. Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry. Food Bioscience. 2014;5:64-72.
8. Fadel H, Mahmoud M, Asker M, Lotfy S. Characterization and evaluation of coconut aroma produced by *Trichoderma viride* EMCC-107 in solid state fermentation on sugarcane bagasse. Electronic Journal of Biotechnology. 2015;18(1):5-9.
9. Wang X, Li A, Dzy M, Ullah N, Sun W, Tao Y. Evaluation of Aroma Enhancement for "Ecolly" Dry White Wines by Mixed Inoculation of Selected *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Chemistry. 2017;.
10. Rosca I, Petrovici A, Brebu M, Stoica I, Minea B, Marangoci N. An original method for producing acetaldehyde and diacetyl by yeast fermentation. Brazilian Journal of Microbiology. 2016;47(4):949-954.
11. Ben Akacha NGargouri M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. Food and Bioprocesses Processing. 2015;94:675-706.

12. Camelia Ungureanu, Luc Marchal, Ana Aurelia Chirvase, Alain Foucault. Centrifugal partition extraction, a new method for direct metabolites recovery from culture broth: Case study of torularhodin recovery from *Rhodotorula rubra*. *Bioresource Technology*. [Internet]. 2013 [cited 1 February 2017]; 406-409. Available from: https://www.researchgate.net/publication/233973570_Centrifugal_partition_extraction_a_new_method_for_direct_metabolites_recovery_from_culture_broth_Case_study_of_torularhodin_recovery_from_Rhodotorula_rubra
13. Alchihab M, Destain J, Aguedo M, Thonart P. Production d'arômes de type lactone par des levures. *Biotechnol Agron Soc Environ*. 2010;14(4):681-691.
14. J, Ramirez. Aprovechamiento Industrial de Lactosuero Mediante Procesos Fermentativos. Escuela de Ingeniería de Alimentos, Universidad del Valle, Cali, Colombia. [Internet]. 2011. [cited 15 February 2017]. Available from: https://academia.unad.edu.co/images/investigacion/hemeroteca/Pel/volumen6_2012/Aprovechamiento_Industrial_de_Lactosuero.pdf
15. Escobedo Ibarra Y. Estudio cinético de dos cepas de *Rhodotorula Glutinis* crecidas en tres diferentes fuentes de Carbono: Glucosa, Sacarosa y melaza de caña [Profesional]. Universidad de Guadalajara; 1992.
16. Moyano S, Liboa A, Guerin M, Peralta J, Rosa M, Marín G. Uso de Herramientas Informáticas en el Análisis de la Degradación de un Efluente Lácteo con Levaduras del Género *Rhodotorula*. Universidad Tecnológica Nacional [Internet]. 1992;. Available from: <http://congreso.pucp.edu.pe/caip2013/pdf/ID179-Moyano.pdf>
17. Negrete Soler E. Diseño y elaboración de un objeto virtual de aprendizaje para el conocimiento del mentol, un terpeno presente en la yerbabuena, y sus aplicaciones a la vida diaria [Magister]. Universidad Nacional de Colombia; 2012
18. Bramley P. *Plant Biochemistry*. 11 Isoprenoid Metabolism. San Diego-California: Dey, Harborne; pag 417-418. 1997.
19. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio P. *Metodología de la investigación*. 4th ed. México: Mc graw hill; 2010.
20. Tatsue Moroe T, Satohiko Hattori K, Akira Komatsu T, Yuso Yamaguchi K. Method for the biochemical isolation of l-menthol. Japon; 3620918, 1971.
21. Araujo Guerra Á, Monsalve Castro L, Quintero Tovar A. Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 2013;4(2):55.
22. Forti L, Di Mauro S, Cramarossa M, Filippucci S, Turchetti B, Buzzini P. Non-Conventional Yeasts Whole Cells as Efficient Biocatalysts for the Production of Flavors and Fragrances.



¡Gracias!