



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

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ
2018**



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

**Alison Tatiana Latorre Virviescas
María Ximena Macana Viasus
Laura Marcela Mora Oviedo**

**Asesoras
Ana Graciela Lancheros Díaz
Migdalia Idalmy García Folleco**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ
2018**

DEDICATORIA.

Dedicado a nuestros padres, hermanos, profesores

AGRADECIMIENTOS

Damos gracias en primera instancia a Dios, quien guía cada uno de nuestros pasos con entendimiento y sabiduría a través de nuestros padres: Fernando Latorre y Maryluz Virviescas, Adalber Macana y Raquel Viasus, Luis Carlos Mora y Rosalba Oviedo, por su apoyo, comprensión, dedicación durante estos cinco años de carrera.

A Mauricio Mariño por su ayuda al suministrarnos el insumo más importante y central dentro del proyecto, que fue el Lactosuero.

Agradecemos a Tecnoparque (TP) SENA Nodo Bogotá, por permitirnos desarrollar nuestra investigación en sus instalaciones junto con Migdalia García Folleco - Gestora TP y colaboradores por la asesoría prestada y dedicación a este trabajo.

En especial a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por la formación integral que nos brindó a lo largo de este tiempo, a través de las instalaciones y el valioso conocimiento transmitido por parte de nuestros docentes; y en especial a la docente Marcela Gómez quien nos guió y aportó de sus conocimientos para poder desarrollar el objetivo propuesto.

Finalmente a Nuestra asesora interna Ana Graciela Lancheros y a todas aquellas personas que aportaron su conocimiento y sacrificaron tiempo para ayudarnos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pg.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	12
1. ANTECEDENTES	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo general.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. MARCO REFERENCIAL	19
3.1. Aromas.....	19
3.1.1. Definición.....	19
3.1.2. Tipos de aroma.....	20
3.1.3. Métodos de extracción del aroma.....	22
3.2. Terpenos.....	24
3.2.1. Definición.....	24
3.2.2. Ruta metabólica.....	25
3.2.3. Clasificación de los terpenos.....	26
3.2.4. Mentol.....	27
3.3. Lactosuero.....	27
3.3.1. Definición.....	27
3.3.2. Estadísticas en Colombia.....	28
3.3.3. Tipos de Lactosuero.....	28
3.3.4. Componentes del Lactosuero.....	29
3.3.5. Problema ambiental.....	29
3.3.6. Otros usos del Lactosuero.....	30
3.4. <i>Rhodotorula spp.</i>	31
3.4.1. Definición y características generales.....	31
3.4.2. Características bioquímicas.....	32
4. DISEÑO METODOLÓGICO	33
4.1. Universo, población, muestra.....	33
4.2. Hipótesis, variables, indicadores.....	33
4.3. Técnicas y procedimientos.....	34
4.3.1. Precultivo y mantenimiento de las cepas.....	34
4.3.2. Identificación del microorganismo.....	34
4.3.3. Obtención del sustrato.....	34
4.3.4. Tratamiento del Lactosuero.....	35
4.3.5. Preparación del medio de cultivo.....	35
4.3.6. Preparación y siembra del inóculo.....	37
4.3.7. Recuento de levaduras.....	37
4.3.8. Preparación del principio activo.....	37

4.3.9. Purificación de la muestra.....	38
4.3.10. Identificación de compuestos volátiles.....	38
4.3.11. Extracción del aroma.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. Identificación de la cepa.....	41
5.2. Tratamiento del Lactosuero.....	42
5.3. Condiciones de los medios de cultivo.....	42
5.4. Recuento de levaduras.....	43
5.5. Evaluación sensorial de los medios de cultivo.....	44
5.6. Pruebas químicas para la identificación de compuestos aromáticos.....	47
5.7. Cromatografía de capa fina.....	49
6. DISCUSIÓN.....	52
7. CONCLUSIONES.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
8. ANEXOS	
8.1. Inserto kit REMEL	
8.2. Resultados kit REMEL	
8.3. Ficha técnica mentol cristalizado	

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema cromatógrafo de gases
- Figura 2. Estructura del isopreno
- Figura 3. Conversión del Acetil-CoA a ácido mevalónico
- Figura 4. Colonia característica de *Rhodotorula spp*, agar sabouraud dextrosa
- Figura 5. Dilución 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .
- Figura 6. Muestra sometida en el rotaevaporador
- Figura 7. Ubicación de las muestras en el silica gel.
- Figura 8. Colonias de *Rhodotorula spp* en agar sabouraud dextrosa
- Figura 9. Reporte del software Rapid Yeast plus
- Figura 10. Tratamiento del Lactosuero
- Figura 11. Medios de cultivo
- Figura 12. Evaluación sensorial medio YPD líquido
- Figura 13. Evaluación sensorial medio YPD modificado
- Figura 14. Evaluación sensorial medio lactosuero
- Figura 15. Prueba de aldehídos positiva medio YPD líquido
- Figura 16. Cromatografía de capa fina.
- Figura 17. Rf de las muestras
- Figura 18. Coeficiente de correlación

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subfamilias de tipos de aromas.

Tabla 2. Clasificación de los terpenos

Tabla 3. Componentes del Lactosuero

Tabla 4. Panel sensorial

Tabla 5. Resultados de pruebas químicas realizadas a los medios de cultivo

Tabla 6. Resultados de la cromatografía

RESUMEN

El incremento masivo de desechos o residuos generados por la industria láctea están provocando contaminación ambiental en cuerpos de agua y suelos, debido al manejo y disposición final inadecuado, ya que estos residuos no son tratados previamente, y de los cuales muchos compuestos pueden ser recuperables; con el inconveniente que las técnicas para aprovecharlos y hacerlos útiles son costosas y en ocasiones el balance entre el residuo y el resultado final no compensa el gasto económico. El objetivo de este trabajo es proponer la transformación del residuo lácteo en compuestos volátiles, mediante el uso de microorganismos, para esto se aisló la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*, con el interés de aprovechar algunos metabolitos secundarios sintetizados por esta. Este trabajo de investigación incluyó utilizar el lactosuero como sustrato; buscando su transformación, este es un elemento base para el crecimiento de dicha levadura. Identificar el microorganismo a través de pruebas bioquímicas, establecer los medios de cultivos selectivos aptos para su crecimiento como el YPD según Anna Kot, *et al* 2017 (17), líquido y/o YPD modificado; además de la formulación del medio Lactosuero, seguido de la adición de un principio activo que es el mentol cristalizado como coadyuvante para la generación del aroma y la identificación de compuestos usando cromatografía de capa fina; siendo la más recomendada según bibliografía consultada. El uso de residuos agroindustriales permite minimizar el impacto ambiental y al mismo tiempo se pueden obtener subproductos que aportan a las necesidades de otras industrias, generando innovación y valor agregado.

PALABRAS CLAVES: Lactosuero, *Rhodotorula spp*, cromatografía, mentol, coadyuvante.

INTRODUCCIÓN

La industria láctea es de gran importancia a nivel mundial ya que se encarga de la producción de todos los derivados de la leche. Sin embargo, durante la elaboración de estos subproductos se generan residuos como el Lactosuero rico en proteínas, lípidos, lactosa, calcio, lactato, fosfatos y cloruros, el cual es desechado (2).

El desecho del Lactosuero puede ocasionar múltiples problemas, como el taponamiento de las tuberías por la alta cantidad de lípidos que posee, genera contaminación en los suelos y en el agua aumentando la demanda biológica de oxígeno (DBO); cuando se reconocen los problemas que este desecho está desencadenando, algunas de las industrias toman acciones correctivas e implementan tratamientos del residuo, dividiendo en 4 fases el proceso: pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y terciario, en los cuales se utilizan medios físicos, químicos y biológicos, por lo tanto los costos se incrementan (15).

Este problema ya se encuentra avanzado y pese a los esfuerzos realizados por disminuir el impacto negativo sobre el ambiente que genera el residuo no ha sido suficiente dar una pronta solución. Actualmente el Lactosuero ya presenta otros usos dentro de los cuales podemos encontrar procesos fermentativos, bebidas, producción de biofertilizantes y es utilizado en tecnología de empaques (15), pero no es suficiente ya que la cantidad producida anualmente en el mundo es muy elevada para ser reutilizada por completo; según la revisión de Ricardo Parra (2009) la cantidad anual generada de este residuo en el año 2005 se encontró entre 110 a 115 millones de toneladas cúbicas, provenientes de la producción quesera (2).

El Lactosuero al ser un residuo obtenido a partir de la fabricación de quesos, es rico en alto contenido de lactosa y proteínas (Ricardo Parra, 2009). Sin embargo, no es desechado adecuadamente, los componentes que conforman el Lactosuero se convierten en contaminantes cuando el líquido es arrojado al ambiente sin ningún tipo de

tratamiento, puesto que la carga de materia orgánica genera contaminación especialmente en aguas y la impermeabilización en suelos, afectando su estructura química y física, de esta manera disminuyendo el rendimiento de cultivos agrícolas (2),

Actualmente el Lactosuero se ha empezado a utilizar en diferentes campos, ya sea para producción de etanol, elaboración de bebidas, o extracción de B-galactosidasas, empleando diferentes microorganismos para la producción de dicha biomasa, con el fin de mostrar una alternativa de inversión sostenible para los empresarios, además de una forma de protección al medio ambiente (2).

La generación de aceites esenciales o aromas por medio de procesos químicos es en muchas ocasiones altamente contaminante ya que utiliza muchos productos orgánicos que son difíciles de eliminar, además de esto los elevados costos para la extracción del aceite o aroma y la producción a gran escala se vuelven cada vez más complicados a pesar de los avances tecnológicos (1).

La propuesta de este trabajo de investigación consistió en darle uso al Lactosuero en este caso como sustrato-ayudador en la generación de aromas que sean empleados en la industria cosmética utilizando la cepa *Rhodotorula mucilaginosa*, de modo que contribuya con las necesidades de la sociedad. La función del Lactosuero es suplir un componente necesario para el cultivo del microorganismo, identificando el terpeno producido, empleando un principio activo el mentol cristalizado (39) y posteriormente obtener el aroma.

Para esto se estableció el cultivo del microorganismo, las condiciones bajo las cuales se realizaría el procedimiento fueron fijadas de acuerdo a la revisión literaria, y las recomendaciones de temperatura, y tiempo de crecimiento sugeridas por los autores que realizaron trabajos con la levadura de interés (5,6,8), teniendo en cuenta la ruta metabólica de *Rhodotorula* y conociendo esta, se pudo determinar el momento de la obtención.

Se destaca en este proyecto, el valor agregado que tiene la producción del aroma, ya que se realiza con el empleo de diversos materiales entre los cuales se menciona la reutilización de un producto de desecho, se aprovecha la levadura poco utilizada para la obtención de aromas a nivel industrial, ya que su uso común está enfocado en la producción de carotenoides, lo cual hace que en costos sea más rentable e innovador (8).

Para la universidad es benéfico este proyecto en el sentido de que es una investigación que hace uso de un desecho orgánico como el Lactosuero, convirtiendo este en el producto principal fermentable por la levadura, con el fin de aprovechar el residuo disponible y disminuir el impacto negativo que se genera sobre el ambiente, aporte que se brinda como novedoso en el programa de Bacteriología y laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias de la Salud.

1. ANTECEDENTES

El trabajo de Reyes y Franco (2006), expone cómo a lo largo de la historia la industria ha empleado procesos extenuantes en la producción de sabores, pigmentos y aromas, lo que puede desencadenar en una influyente causa de contaminación ambiental; entre los que destacan la generación de aromas; razón por la cual se ha visto la necesidad de implementar nuevas estrategias de producción con la utilización de la biotecnología a partir de medios biológicos (microorganismos), con el fin de generar un entorno sostenible en el ambiente (1).

Alchihab y colaboradores (2010), proponen la producción de lactonas utilizando levaduras, dichas lactonas tienen la capacidad de generar aromas frutales; dependiendo de la levadura y vía metabólica se pueden obtener distintos tipos de lactonas, produciendo diferentes tipos de aromas y sabores que posteriormente puedan ser utilizados en la industria alimentaria (18).

Siddiquee y colaboradores (2012), en su trabajo desarrollaron un protocolo eficaz para la preparación de muestras basado en gas, cromatografía y espectrometría de masas, desarrollando un análisis de compuestos bioactivos, derivados del hongo filamentoso *Aspergillus niger*, cepa SS10, pretendiendo estudiar los complejos de hidrocarburos y otros compuestos volátiles que fueron separados usando dos columnas capilares diferentes y fases estacionarias no polares y polares medias. Esta es una herramienta de investigación para la determinación de compuestos volátiles de los cultivos de *A. niger* (47).

Liboa y Guérin (2012), determinaron el dominio de las fuentes de nitrógeno, utilizadas por levaduras de la especie *Rhodotorula mucilaginosa* aislada de la materia grasa de productos lácteos. Se definió un medio de cultivo adecuado para su fácil crecimiento y degradación de origen lácteo, realizando diferentes ensayos con réplicas, usando nitrógeno extra urea, sulfato de amonio y cloruro de amonio tomando intervalos de tiempo, sometiendo los resultados a varianzas y análisis de residuos, los análisis microbiológicos se realizaron en los laboratorios de la Universidad Tecnológica Nacional,

Facultad Regional Villa María-Argentina (6).

En el trabajo de investigación de Hernández y colaboradores en el año (2013), dan a conocer que *Rhodotorula glutinis* presenta características en la producción de carotenoides, proteínas unicelulares de etanol, ácido acético y acetaldehído en su fase de crecimiento y a su vez como sistemas de fermentación para la producción de pigmentos en la industria debido a su gran potencial en la industria farmacéutica y tratamiento de aguas. La ventaja que tiene este microorganismo es la capacidad de crecer y sintetizar metabolitos en diferentes sustratos que contienen materias primas de residuos industriales, elevando la rentabilidad de los procesos biotecnológicos. Estos metabolitos son usados en diferentes áreas industriales como componentes cosméticos y aditivos alimentarios (9).

Moyano y colaboradores en el año (2013), definieron la velocidad de crecimiento y desarrollo de la levadura *Rhodotorula spp.* en un efluente de origen lácteo, usando diferentes herramientas informáticas. Las levaduras del género *Rhodotorula spp.* procedentes de este se sometieron a aireación en un reactor biológico permitiendo demostrar su capacidad para degradar la materia orgánica presente. Concluyendo que es importante el uso de herramientas informáticas para llevar a cabo este tipo de análisis y la evaluación del comportamiento de sistemas naturales (22).

Gómez, (2014), en su trabajo sobre los pigmentos de las levaduras explica que estas actúan como precursores de la vitamina A y también tienen colorantes y antioxidantes como propiedades. Estos microorganismos son importantes debido a su producción de carotenoides, con la ventaja de crecimiento en diferentes residuos agroindustriales, suministrando componentes para llevar a cabo el metabolismo microbiano, disminuyendo costos de producción y evitando contaminación de estos residuos agroindustriales en el medio ambiente; siendo significativos para cubrir la demanda en todo el mundo por las aves de corral, cosméticos, alimentos, bebidas y demás industrias (8).

En la investigación de Fadel y colaboradores año (2015), a través del análisis del bagazo de caña de azúcar encontraron que es adecuado para la producción de aromas y crecimiento de las especies de *Trichoderma*, estudiando su capacidad para elaborar aroma de coco en fermentación en estado sólido (SSF). El análisis de cromatografía de gases y de espectrometría de masas (GC-MS) mostró la intensidad de olor más alta y el máximo rendimiento de sustancias volátiles; la lactona insaturada, 6-pentil- α -pirona (6-PP), fue el principal compuesto volátil identificado. Se encontró una correlación alta entre la composición y el perfil olfativo del aroma producido (10).

El trabajo de investigación de los autores Rosca y colaboradores en el (2016) establecieron como objetivo diseñar un medio de cultivo natural, imitando un medio sintético de glucosa de peptona de levadura, capaz de producir un nivel mayor de diacetilo y acetaldehído. La presencia de ciertos componentes como suero en polvo y citrato de sodio en el medio mejoraron las características y desarrollo del aroma. Se hizo un análisis mediante cromatografía de gases para cuantificar la concentración de acetaldehído y diacetilo sintetizados. Se propuso que este sistema sea probado para la transferencia biotecnológica a fermentadores industriales y que se utilice durante la producción de productos fermentados (12).

En el año 2017, los autores Cheng y colaboradores estudiaron la evaluación de los compuestos aromáticos que se producen en la fermentación de las uvas para la elaboración del vino utilizando *Rhodotorula mucilaginosa* y *Saccharomyces cerevisiae* conjuntamente, obteniendo compuestos tales como alcoholes, terpenoles, ésteres, etilos, ácidos grasos, entre otros permitiendo así un mejoramiento en el aroma de los vinos Ecolly, ya que la *Rhodotorula mucilaginosa* género aromas frutales y florales (11).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

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

2.2. Objetivos específicos

1. Establecer el medio de cultivo apropiado para la obtención del metabolito secundario en este caso el mentol.
2. Utilizar el desecho orgánico (lactosuero) en diferentes proporciones en los medios de cultivo como sustrato de la fermentación de la levadura.
3. Identificar los compuestos aromáticos obtenidos a través de pruebas cualitativas.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. Aromas

3.1.1. Definición

Existen gran variedad de aromas en la naturaleza que han generado un impacto importante a nivel biotecnológico; puesto que se han relacionado con microorganismos como bacterias, hongos y levaduras. Su aplicación en la industria ha tenido gran demanda por sus usos como aromatizantes en alimentos, cosméticos, entre otros y con ayuda de procesos como fermentaciones tradicionales, biosíntesis de cepas o bioconversión de compuestos para la producción de los metabolitos volátiles (32).

Los aromas son considerados fisiológicamente en sustancias que se pueden percibir por medio de receptores sensoriales, como el sentido del olfato. *“Uno de los aspectos más importantes de una sustancia fragante o aromática es su volatilidad, ya que es necesario que la sustancia sea lo suficientemente volátil para alcanzar los receptores que se encuentran en la nariz, así que una sustancia aromática debe de tener algún grado de volatilidad para poder ser perceptible para el ser humano”* (31).

La variabilidad del aroma puede cambiar de acuerdo a su intensidad, perdurabilidad, fragancia y componentes; al mismo tiempo su combinación permite crear diversas fragancias agradables o a su vez desagradables para el olfato (31).

En la producción de aromas los aceites esenciales también constituyen una parte importante, debido a que comparten su fracción volátil que es la responsable de generar el aroma; estos son mezclas de diferentes compuestos con variado peso molecular usados a nivel industrial y farmacéutico (23).

Se caracterizan por su consistencia (fluidas, bálsamos y oleorresinas), origen (natural, artificial y sintético) y naturaleza química (monoterpenos, sesquiterpenos o fenilpropanos); estos son aspectos útiles al momento de estudiarlos para obtener el producto deseado (23).

3.1.2. Tipos de aroma

Para poder establecer cuáles son los tipos de aromas existentes, es importante recalcar que esta clasificación proviene de las familias olfativas según lo dicho por Encinas Martínez M. en el año 2012 (29), esto en función de las diferentes notas característica atribuida, entre los cuales se destacan.

- **Hesperidios**

El principio de esta familia se constituye por los cítricos, entre los que se encuentran la mandarina, limón, naranja, pomelo y toronja; se acentúan por presentar características tales como su frescura y ligereza (29).

- **Florales**

Son las fragancias más aceptadas por la mayoría de mujeres en cuanto a demanda industrial, se pueden percibir diferentes notas florales, entre estos encontramos jazmín, rosa y lirio de los valles, teniendo en cuenta que se pueden presentar en dos formas, tenemos el floral sencillo como el aroma de una sola flor o como también se le denomina (mononota) fácilmente identificable, y el bouquet que se define como el acoplamiento de diversas flores (sinergia) ya que se le conoce por no tener relación con los elementos que lo conforman (29).

- **Herbales o verdes**

Es un tipo de aroma poco estudiado, debido a que es muy difícil de definir; corresponde a plantas silvestres o hierbas que son cultivadas en un jardín tales como el romero, la salvia, lavanda, manzanilla y el tomillo, estos se destacan por ser aromas limpios y frescos que aluden al olor percibido en el campo o bosque. La principal sustancia relacionada es el cis-3-hexen-1-ol de los cuales sus derivados se han involucrado en la industria de los sabores y fragancias (29).

- **Maderas**

Son fragancias derivadas de los aceites esenciales de diferentes árboles como el cedro, sándalo y se caracterizan por sus notas cálidas. Son compuestos bicíclicos o tricíclicos de 12 a 17 carbonos y un grupo funcional alcohol o ester (29).

- **Especies**

Se encuentran aromas característicos denominados como candentes, suaves, intensos y hasta picantes; se relacionan con la estimulación de las glándulas prostaglandinas y el desplazamiento de la energía, dentro de estos destacan los aromas como el clavo, nuez, vainilla, canela, cardamomo y entre los conocidos actualmente el chocolate y el café (29).

- **Alcanforado**

Son muy comunes porque están presentes en ungüentos para resfriados o repelentes; obtenidos por medio del aceite de madera usando el pineno. El alcanfor es la molécula responsable de este aroma (29).

- **Musk**

Está relacionado con la perfumería, son aromas cálidos, sensuales y muy naturales, comprendiendo 4 grupos: macrociclos nitrogenados, no nitrogenados, bencenoides y esteroidales (29).

En la siguiente tabla se señalan las subfamilias más importantes:

Tabla 1. Subfamilias de tipos de aromas

Exóticos	Sustancias aromáticas que promueven la sensualidad y seducción, se destacan por poseer características cálidas, fuertes, pero poco comunes.
Orientales	Conjunto de flores y especies, otorgan un equilibrio a las sinergias destacándose por un aire místico y sofisticado, dan la sensación de un olor a incienso.
Frutales	Insinúan olor a comida reconociéndose por ser una subfamilia en la que resaltan las fragancias limpias y refrescantes.
Ambarados	Se constituye por productos artificiales de laboratorio, se destacan los aromas de tipo dulces, sensuales.
Resinosos	Segregados duros y quebradizos de algunas plantas que le dan cierta ligereza a estos aromas a través del calor, se destacan por poseer actividad antiséptica; los aromas encontrados son el incienso, benjuí, copal y mirra.
Mononota	Se destaca por ser un aroma característico, único por decirlo así sin mezclar con otras sustancias.

Fuente: (Encinas Martínez M. 2012)

3.1.3. Métodos de extracción del aroma

Para la identificación de compuestos aromáticos se usan técnicas como la cromatografía que sirven para separar sustancias disueltas u obtener compuestos de una mezcla, entre ellas está la cromatografía de gases, cromatografía en capa delgada y cromatografía líquida de alta eficacia HPLC.

- **Cromatografía de gases**

Es la técnica más utilizada ya que se usa para analizar compuestos volátiles, permite separar en fase gaseosa las mezclas siempre y cuando se tenga en cuenta la

estabilidad térmica de dichos compuestos. Se maneja un peso molecular menor de 1000 y una temperatura máxima aproximada de 400°C (36).

La separación se realiza inyectando una cantidad mínima de la muestra en una corriente de gas inerte a temperatura elevada, la corriente de gas pasa por la columna de cromatografía permitiendo la separación de los componentes de ésta a través de un mecanismo de partición, adsorción o la unión de ambos. Los elementos separados pasan por un sistema de detección adecuado (36).

DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO

- Fuente de gas
- Sistema de inyección
- Horno y columna de cromatografía
- Sistema de detección
- Sistema de registro

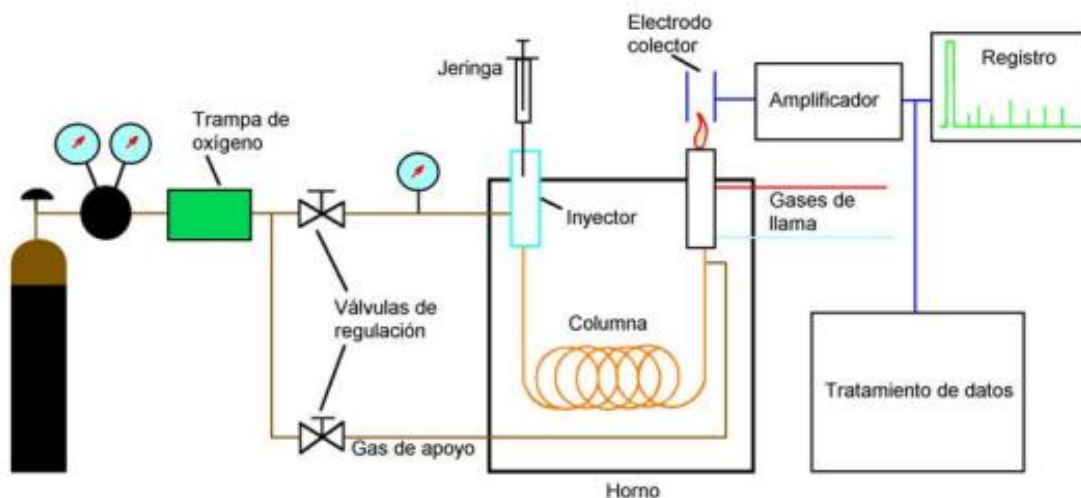


Figura 1: Esquema Cromatógrafo de gases.

Los gases inertes usados en el proceso no afectan la separación, pero en la fase móvil en cuanto a difusión para su velocidad óptima; este si depende del gas portador. *“Como fuentes de gas portador se suelen utilizar cilindros de gas comprimido de elevada pureza, capaces de suministrar una presión de gas adecuada y constante”* (36).

- **Cromatografía en capa delgada**

Proporciona mayor economía y rapidez ya que depende de una mínima cantidad de solvente utilizado y brinda la facilidad de procesar varias muestras en una sola placa; también los componentes obtenidos pueden ser visualizados por tinción. Determina el grado de pureza que contiene un compuesto, comparar muestras, y hacer el correcto seguimiento a una reacción (37).

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

Es una técnica que permite un proceso rápido y la determinación de su fracción individual; siendo el más utilizado en la separación de mezclas complejas, requiere de una fase móvil y una estacionaria y el principio de separación no cambia; donde la muestra se va a adherir en la fase estacionaria o se desplaza con la fase móvil. El parámetro más importante es el factor de retención (R_f), donde no siempre es constante bajo condiciones diferentes (37).

Posee grandes ventajas como el tamaño de partículas que están presentes en la fase estacionaria, la intensidad de los efectos capilares y separaciones más claras; con una disminución en el límite de detección de 10 a 100 (37).

3.2. Terpenos

3.2.1. Definición

Los terpenos son moléculas orgánicas que se hallan en mayor frecuencia en las plantas, aunque se pueden encontrar en animales y hongos, estos se componen de una unidad estructural de isopreno (27), molécula compuesta de 5 carbonos, hidrógeno y oxígeno. Por lo tanto los terpenos se clasifican a su vez por las unidades de isopreno que los conforman (28).

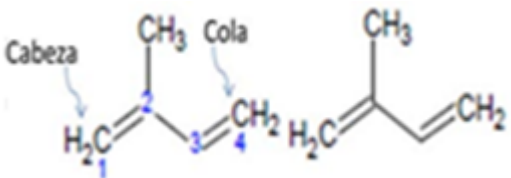


Figura 2. Estructura del isopreno. Fuente: (Negrete E.2012)

Los terpenos denominados también como metabolitos secundarios, son el producto que sintetizan mayoritariamente las plantas, estos tienen gran importancia en industrias tales como la farmacéutica y la cosmética en la producción de fragancias, medicamentos, aditivos alimentarios, entre muchos otros productos (16).

3.2.2. Ruta metabólica

La síntesis de los terpenos se da mayoritariamente por la vía del mevalonato en el citosol, la cual consta en primer lugar de dos moléculas de Acetil-CoA las cuales se originan a partir de la glucosa en la síntesis de diversos productos, que en conjunto van a reaccionar y generar una molécula de Acetatoacetil-CoA que a su vez va a reaccionar con otra molécula de Acetil-CoA dando lugar a Hidroximetilglutaril-CoA o 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA la cual a través de 2 coenzimas de NADPH va a ser reducida formando de esta manera la síntesis del ácido mevalónico (16,34).

Partiendo de la síntesis del ácido mevalónico y a través de la actuación de diversos precursores se obtendrá como producto los diferentes terpenos, para la biosíntesis de estos es necesario llevar a cabo diversos procesos entre los cuales se encuentran las reacciones de condensación del isopentenil bifosfato proveniente de la descarboxilación del ácido mevalónico a través del uso del ATP, y su isómero dimetilalil difosfato que serán catalizados por una enzima denominada penil transferasa para dar origen al prenil difosfato como geranyl difosfato (GPP) precursor de los monoterpenos y así continuará el proceso hasta lograr la conformación de los distintos terpenos a través de sus precursores (16,27).

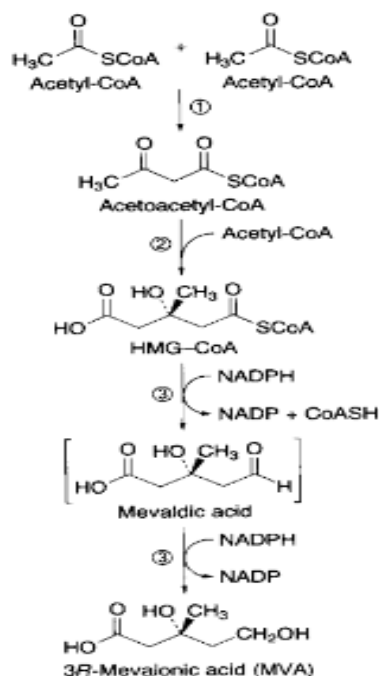


Figura 3: Conversión del Acetil-CoA a ácido mevalónico. Fuente (Bramley 1997)

3.2.3. Clasificación de los terpenos

Los terpenos se clasifican de acuerdo a las unidades de isopreno que los constituyen, de la siguiente manera:

Tabla 2. Clasificación de los terpenos

Número de unidades de isopreno	Número de carbonos	Terpeno
2	10	Monoterpenos
3	15	Sesquiterpenos
4	20	Diterpenos
5	25	Sesterpenos
6	30	Triterpenos
8	40	Tetraterpenos

Fuente: (Negrete E. 2012)

Monoterpenos: Se denominan como isoprenoides de clase simple, constituidos por dos unidades de isopreno y 10 carbonos en su estructura. Tienen gran importancia por ser componentes de los aceites esenciales, su uso en fragancias, y además se le atribuye por poseer propiedades farmacéuticas; lo cual hace que este tipo de terpenoides tengan gran relevancia a nivel industrial. Dentro de ellos se encuentran la familia de los cíclicos que abarca al nerol, geraniol; y los ciclohexonoides como el mentol, isopipterol, carveol, entre otros (34).

3.2.4. Mentol

El mentol pertenece al grupo de los monoterpenos, compuesto por dos unidades de isopreno y 10 carbonos, este se encuentra distribuido en la planta del género *Mentha*, específicamente en la hojas, pues son los aceites esenciales los responsables del aroma, siendo estos un conjunto complejo de elementos característicos de los monoterpenos entre otros compuestos (23), de acuerdo a esto y a lo largo de la historia se le ha atribuido un sin fin de propiedades en varios campos como lo es en la medicina, cosméticos, alimentos, entre otros.

Se caracteriza por poseer un sabor mentolado con una noción refrescante. En cuanto a su composición este tipo de terpeno se caracteriza por poseer isómeros que son elementos que tienen igual constitución de las moléculas de origen pero distinta estructura química; dentro de los que se encuentran: d-mentol, l-mentol (27).

3.3. Lactosuero

3.3.1. Definición

El Lactosuero es una sustancia líquida, de un color amarillo verdoso, obtenido del proceso de la elaboración del queso, se obtiene posterior a la adición del cuajo, siendo este el líquido sobrenadante, que puede poseer cerca del 90% de los nutrientes iniciales de la leche (2).

3.3.2. Estadísticas

En el 2014 según el Ministerio de agricultura, y el DANE, en los 22 departamentos productores de leche en Colombia, se generan 17.554.680 litros de leche, se estima que el 57% de la leche producida se destina para el sector industrial, lo que equivale a 9.956.773 litros de leche; a partir de esta se produjeron cerca de 55.000.000 kilogramos de queso blando, y una cantidad menor a los 5.000.000 kilogramos en cuajadas, quesos curados y queso crema (35).

“Colombia cuenta con alrededor de 395.215 unidades productoras de leche, de las cuales el 80.7% (319.106) corresponden a pequeños productores de leche, que a su vez generan el 37% de la producción nacional” (35).

3.3.3. Tipos de Lactosuero

Hay 2 tipos de Lactosuero, lo cual depende del tipo de queso que se esté elaborando, así mismo será el Lactosuero que se obtenga.

El Lactosuero ácido se obtiene posterior al proceso de coagulación ácida o láctica de la caseína, su pH puede variar entre 4.0 y 5.8, tiene un alto contenido mineral, este es característico de la elaboración de quesos frescos, por lo tanto es el más abundante en Colombia (15,19).

El Lactosuero dulce es aquel que se obtiene de la precipitación de las proteínas, ocasionada por la hidrólisis de la k-caseína por coagulación enzimática, esta posee un pH entre 6.6 y 8.0 y no varía la composición mineral ya que mantiene muchas de las características que presenta la leche inicial (15,19).

3.3.4. Componentes

Tabla 3. Componentes del Lactosuero

Componente	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero ácido (g/L)
Sólidos totales	63,0- 70,0	63,0- 70,0
Lactosa	46,0- 52,0	44,0- 46,0
Proteínas	6,0- 10,0	6,0- 8,0
Calcio	0,4- 0,6	1,2- 1,6
Fosfatos	1,0- 3,0	2,0- 4,5
Lactato	2,0	6,4
Cloruros	1,1	1,1

Fuente: (Panesar *et al.*, 2007)

En la tabla 3 se puede apreciar no solo los componentes principales que están en el lactosuero, sino las diferencias entre el lactosuero dulce y el ácido; sin embargo, además de esto el 90% de lactosuero es agua, 0.3% de grasas, 0.2% de ácido láctico y el 70% son proteínas crudas, que corresponden a β - lactoglobulina, α - lactoglobulina, inmunoglobulinas, y peptonas (15).

Adicionalmente posee una amplia cantidad de vitaminas tales como: tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, cobalamina y ácido ascórbico (3).

3.3.5. Problema ambiental

El lactosuero se produce en altas cantidades en la industria láctea, este es desechado en las alcantarillas por toneladas diariamente, eliminando de esta manera un producto con un alto valor proteico y con una alta cantidad de sólidos totales, ya que este posee cerca del 55% de los ingredientes totales de la leche (2).

Es un vertimiento altamente contaminante ya que afecta la estructura física y química del suelo disminuyendo el rendimiento de los cultivos agrícolas (2).

Debido a su elevada cantidad de sólidos totales al salir en las aguas residuales aumenta la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda biológica de oxígeno (DBO), disminuyendo de esta manera el oxígeno disuelto (OD) en el agua lo cual causa un impacto negativo en la vida acuática, además la presencia de aceites y grasas puede generar taponamiento en las tuberías a largo plazo (4).

Según las estadísticas a partir de 10 L de leche se produce 1-2 kg de queso, y cerca de 8-9 kg de suero (15).

3.3.6. Otros usos del lactosuero

Otros estudios sugieren que se ha buscado la manera de aprovechar este residuo, sin embargo los usos que se le han dado no son suficientes para el total aprovechamiento de este líquido, por lo tanto no suplen la utilización del mismo, con respecto a la producción anual.

Entre los usos más importantes se han elaborado bebidas fermentadas y alcohólicas, producción de ácidos orgánicos, elaboración de concentrados y proteínas (2), hidrolizados aislados, fórmulas infantiles, producción de etanol, biomasa, levaduras para panificación, producción de exopolisacáridos, ácido acético, propiónico y láctico (3), entre otros.

3.4. *Rhodotorula*

3.4.1. Definición y Características generales



Figura 4. Colonia característica de *Rhodotorula spp.*, agar sabouraud dextrosa.
Fuente (Universidad de Antioquia)

Rhodotorula es un género de levadura perteneciente a la familia Basidiomycota, se puede encontrar comúnmente en aire, suelo, fuentes de agua como lagos u océanos (5), debido a su fácil aislamiento y su alta capacidad de crecimiento, es apta para obtener el resultado esperado, produciendo un alcohol que pueda ser utilizado en un futuro para la industria ya sea cosmética, o de aseo; esta es aerobia y presenta su óptimo crecimiento a 30 grados C, con un pH que puede variar de 4-6 aproximadamente y es de rápido crecimiento a 37 grados C, su tiempo de incubación puede variar de 48 a 72 horas, dependiendo de la cantidad de biomasa que se espera obtener (9).

Microscópicamente se observan blastoconidias, de 2 a 5 micras, se reproducen por gemación; macroscópicamente en agar sabouraud dextrosa cloranfenicol son visibles a las 24 horas del comienzo de su incubación, y presenta colonias mucosas brillantes, que pueden variar de color rosa a salmón (5,7).

Este género de levaduras es altamente conocida por la producción de carotenoides que ha sido ampliamente estudiada para su uso en diversas industrias, además se puede incluir dentro del grupo de los microorganismos biorremediadores por su capacidad para degradar grasas y biodiesel, que es una habilidad característica de *Rhodotorula mucilaginosa* (5).

3.4.2. Características bioquímicas

Rhodotorula presenta gran variedad de especies, dentro de las cuales se puede encontrar *R. mucilaginosa*, *R. rubra*, *R. glutinis* entre otras, que pueden ser utilizadas en la industria, estas a su vez tienen características bioquímicas específicas con lo cual es más sencillo realizar su identificación; para iniciar las levaduras en general son fácilmente identificables por poseer la enzima ureasa, en general las *Rhodotorulas* no son capaces de fermentar el azúcar, sin embargo utilizan este como una fuente de carbono, además tienen la capacidad de producir una alta cantidad de carotenoides que son un mecanismo de defensa contra los rayos UV (5), y otros factores ambientales que pueden afectar su crecimiento.

Rhodotorula glutinis por ejemplo, tiene la capacidad de producir la enzima Q-10, no toleran concentraciones de glucosa mayores al 50%, y crecen a concentraciones del 10% de NaCl (5).

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Universo, población, muestra

- Universo: Desechos agroindustriales
- Población: Desechos extraídos del proceso de elaboración del queso
- Muestra: Lactosuero

El trabajo se desarrolló en los laboratorios de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y los Laboratorios de Tecnoparque – SENA Nodo Bogotá.

El proyecto posee un enfoque ambiental ya que mediante la utilización y aprovechamiento de este desecho generado por la industria láctea (lactosuero), se busca además de generar un producto, disminuir el impacto en el agua y el suelo, haciendo un correcto uso de las herramientas biotecnológicas.

Este estudio puede ser clasificado según Sampieri y colaboradoras en 2010 (38) como una investigación:

- Experimental: Debido a que se están manipulando las variables independientes, con el fin de evidenciar su comportamiento bajo dichas circunstancias.
- Explicativa: Ya que se podrá obtener el metabolito en este caso el terpeno, a partir de la observación del proceso causa y efecto, teniendo en cuenta la manipulación intencional de las variables.

4.2. Hipótesis, variables e indicadores:

Hipótesis: 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.*

Variables:

- **Dependientes:** Síntesis del terpeno
- **Independientes:** Microorganismos, Cantidad de inóculo, Nutrientes, Procesado de la fermentación, Tipo de lactosuero.

Indicadores: Percepción sensorial del aroma, Presencia o ausencia del terpeno, intensidad del terpeno, pH, temperatura, tiempo de agitación.

4.3. Técnicas y procedimientos

4.3.1. Precultivo y mantenimiento de las cepas

El cultivo y proceso experimental se realizó en Tecnoparque- Nodo Bogotá SENA, se utilizó la cepa de *Rhodotorula* spp disponible en el cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca (Bogotá-Colombia), suministrada en Agar sabouraud dextrosa, de la cual se hizo un repique en Agar sabouraud dextrosa cloranfenicol como medio de mantenimiento para posteriormente realizar el proceso.

4.3.2. Identificación del microorganismo

Se observó el crecimiento y las características micro y macroscópicas, para determinar qué tipo de especie se está trabajando, además de esto se contó con la ayuda del kit para levaduras REMEL.

4.3.3. Obtención del sustrato

El sustrato empleado para la producción del terpeno es el lactosuero, como fuente de suplemento nutricional para el medio de cultivo del microorganismo, el lactosuero obtenido a partir de los desechos de la fabricación de quesos de las empresas ubicadas en los alrededores de Cundinamarca.

4.3.4. Tratamiento del lactosuero

El tratamiento por el cual se sometió el lactosuero consiste en la determinación de pH, densidad y acidez con el fin de establecer el tipo de lactosuero, se somete a una filtración manual, shock térmico el cual consiste en una pasteurización a una temperatura de 65°C en 30 minutos posteriormente tratado con agua fría o hielo; eliminando toda la carga microbiana presente.

4.3.5. Preparación del medio de cultivo

De acuerdo a la literatura consultada se formularon 2 medios de cultivo líquido, uno de ellos el medio YPD líquido según Anna Kot y colaboradores (17) y el medio YPD modificado según Claudia Martínez y colaboradores (24), los cuales fueron adaptados para la producción del metabolito; se componen de:

-YPD LÍQUIDO:

Glucosa	2% (5g)
Peptona	2% (5g)
Levadura	1% (2.5g)
Glicerol	5% (12.5g)
Cloranfenicol	(0.0075g)
Agua destilada	125ml
Lactosuero	125ml

-YPD MODIFICADO:

Glucosa	2% (5g)
Peptona	0,5% (1.25g)
Sales:	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3% (0.75g)
KH ₂ PO ₄	0.1% (0.25g)

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05% (0.125g)
Cloranfenicol	0.0075g
Agua destilada	125ml
Lactosuero	125ml

Se formulara además un medio a base del lactosuero, peptona y cloranfenicol.

-MEDIO LACTOSUERO:

Lactosuero	250ml
Peptona	1.25g
Cloranfenicol	0.0075g

Luego de la obtención de estos medios, se llevaron a esterilizar en autoclave durante 20 minutos en 15 libras a 121°C; es importante aclarar que la adición del cloranfenicol se llevó a cabo luego de la esterilización esto con el fin de evitar que se desnaturalice y pierda su acción.

Para validar los resultados de los medios de cultivo se utilizó un control positivo y un control negativo, el control positivo se realizó sin el lactosuero y el control negativo es el medio sin inocular.

Los controles se formularon a partir de un medio líquido compuesto de:

Glucosa	1g
Fosfato hidrogeno dipotasico	0,5g
Peptona	0,7g
Extracto de levadura	0,5 g
Agua destilada	100 ml

NOTA: Los ensayos se realizaron por triplicado

4.3.6. Preparación y siembra del inóculo

A partir del crecimiento obtenido del último repique se realizaron diluciones seriadas, las cuales se preparan con un buffer de agua peptonada 9 ml en cada tubo y una asada de las colonias de la levadura en la primera dilución, teniendo en cuenta la escala de Mcfarland al 0.5; de esta dilución madre se pasa 1 mL a la siguiente y así sucesivamente hasta la dilución 10^{-7} , el recuento se realizó en cámara de Neubauer, hallando cuál de las diluciones se acerca a un recuento aproximado de 1×10^6 células/ml.

Luego de la obtención de los medios de cultivo y del recuento a partir de las diluciones; el inóculo se llevó al 10% teniendo en cuenta que se preparó 250 ml de cada medio de cultivo; por lo tanto el volumen del inóculo será de 25 ml + 225 ml del medio. Los medios se sometieron a agitación constante en un shaker a 150 rpm a una temperatura de 30°C por 48 horas.

4.3.7. Recuento de levaduras

A partir de las diluciones realizadas se hizo recuento en cámara de Neubauer (Figura 11) con ayuda de un microscopio de fluorescencia dando como resultado aproximado de 1×10^6 cel/ml en la dilución 10^{-4} y 10^{-5} empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Células / mL} = \# \text{ Células contadas} \times 10000/4$$

4.3.8. Preparación del principio activo

Para la preparación del principio activo a partir del mentol cristalizado se realizó una mezcla emulsionada utilizando 80% (80 ml) de fase acuosa que en este caso sería agua destilada, 2% (2 ml) de alcohol polivinílico y 20% (20 gr) de mentol cristalizado, procedimiento obtenido de la patente de Tatsuo Moroe y colaboradores en 1971 (39); esta solución se agregó a los medios de cultivo y al control positivo, al 1% (2.5ml) del total del medio del cultivo.

Se sometieron a una agitación constante por 48 horas a 150 rpm a 30°C.

4.3.9. Purificación de la muestra

Al finalizar la etapa de incubación se tomó el medio y se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos, con el fin de descartar el sedimento y guardar el sobrenadante, posteriormente, el sobrenadante se procesó utilizando el rotaevaporador, a unas condiciones de presión de 55 mbar, rotación de 80 rpm y una temperatura de 80 grados centígrados, con el fin de purificar aún más la muestra a analizar por cromatografía de capa fina.



Figura 6: Muestra sometida en el rotaevaporador. Fuente: Propia

4.3.10. Identificación de compuestos volátiles

A través de diversas reacciones químicas se logró evidenciar que compuestos volátiles estaban presentes en los medios de cultivo formulados, entre las reacciones químicas que se llevaron a cabo están: la identificación de alcoholes, fenoles, aldehídos y cetonas (48).

-Alcoholes: Para la identificación de alcoholes, se preparó el reactivo de lucas (ZnCl₂/HCl conc) el cual consta de la disolución de 0,5 gr de cloruro de zinc anhidro en 52.5 ml de HCL concentrado. Se adiciono en tubos de ensayo 2 gotas de la muestra más 10 gotas del reactivo de lucas, la lectura se realizó en el transcurso de 5 minutos.

Interpretación: -Si inmediatamente se forma una solución turbia, estamos ante la presencia de un alcohol terciario.

-Solución turbia al transcurrir de 3-5 minutos, alcohol secundario

-Si no hay evidencia de reacción, alcohol primario

-Fenoles: Se utilizó 1 ml de cada muestra más 5 gotas de FeCl₃.

Interpretación: Reacción positiva: Coloración verdosa, azul o violeta

Reacción negativa: Coloración amarilla

-Aldehídos y cetonas: Se precisó la preparación del reactivo de Tollens:

Solución A: En 30ml de agua destilada se disolvió 3 gr de Nitrato de plata

Solución B: Hidróxido de sodio (NaOH) al 10%

Para reaccionar con las muestras, se utilizó 1 ml de cada solución se mezclaron y reaccionaron con 1ml de muestra; adicional a eso se agregó gota a gota el Amoniaco en cabina de calentamiento, por precaución ya que este genera vapores que pueden llegar a ser tóxicos tras su inhalación.

Interpretación: Formación de un espejo de plata por la evidencia del óxido de plata ya disuelto, para tal efecto se adiciona gota a gota de Amoniaco en cabina de calentamiento.

NOTA: Los ensayos se realizaron por duplicado.

4.3.11. Extracción del aroma

Para la identificación del compuesto aromático se realizó una cromatografía de capa fina en la cual se preparó la solución patrón utilizando 1 gramo de mentol cristalizado disuelto en 1 ml de diclorometano metanol proporción 10:1.

Para las muestras se tomó una alícuota de 5 ml de cada medio de cultivo (medio lactosuero, medio YPD modificado, medio YPD líquido, control positivo, control negativo).

Posteriormente se tomó 25 microlitros de las muestras previamente preparadas y se colocaron por triplicado en la placa de sílica gel como se observa en la figura 7 (Ver figura 16).

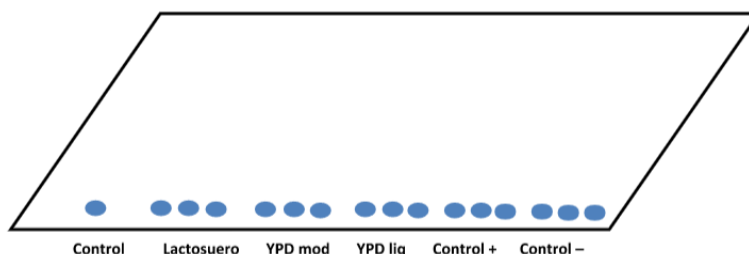


Figura 7. Ubicación de las muestras en el sílica gel. Fuente (propia)

Se dejó secar a temperatura ambiente por un periodo de 5 minutos y se introduce en la cámara cromatográfica, se dejó correr y transcurridos 20 minutos se introdujo en la placa de luz UV, se leyó a 365 nm generando un corrido azul y a 254nm generando luz verde; finalmente se reveló con yodo.

5. RESULTADOS

5.1. Identificación de la cepa



Figura 8: Colonias de *Rhodotorula* spp en Agar sabouraud dextrosa. Fuente (propia)

Los resultados obtenidos del software Rapid Yeast Plus fueron los siguientes: Tiene un 95.18% de probabilidad para *Rhodotorula rubra* que se puede observar en la Figura 9, por lo tanto predice que la caracterización de la cepa suministrada por la Universidad Colegio mayor de Cundinamarca corresponde a *Rhodotorula rubra*, conocida en la actualidad como *Rhodotorula mucilaginosa*.

1	ERIC Web										Identification Report	
2												
3	RapID Yeast Plus											
4											Run Date: 6/9/2017	
5											Facility: UNIVERSIDAD COL	
6	Microcode: 002051										Reference No: CEPA CONSUELO	
7												
8	System Tests	-GLU 09%	-TRE 03%	-NAGA 00%	-ONPG 00%	+PHS 28%	+PRO 99%					
9		-MAL 06%	-RAF 02%	+αGLU 64%	-αGAL 00%	-PCHO 26%	-HIST 71%					
10		-SUC 05%	-LIP 46%	-βGLU 02%	-βFUC 00%	+URE 97%	-LGY 62%					
11												
12												
13	IDENTIFICATION = Rhod. rubra											
14												
15	Choice	Probability		Bioscore		Contraindications						
16	Rhod. rubra	95.18%		1/175		None						
17	Rhod. glutinis	4.47%		1/403		PHS [2]						
18	Rhod. minuta	0.35%		1/1926		βGLU[81] βFUC[88] PHS [23]						
19												
20	Probability Level: Adequate											
21	Biofrequency: Acceptable											
22												

Figura 9: Reporte del software Rapid Yeast Plus. Fuente: (propia)

5.2. Tratamiento del lactosuero



Figura 10. Tratamiento del lactosuero. Fuente (propia)

En la Figura 10 se puede observar el proceso de filtración y calentamiento para la posterior generación del choque térmico con el fin de eliminar microorganismos que puedan ocasionar interferencias; posteriormente se procedió a tomar el pH con el pHmetro el cual arrojó un valor de 6, indicando que el tipo de lactosuero utilizado corresponde ser un lactosuero ácido, este se caracteriza por presentar un alto contenido de minerales, proteínas.

5.3. Condiciones de los medios de cultivo



Figura 11. Medios de cultivo Fuente: (Propia)

Se formularon los medios en base a los artículos elaborados por (Anna Kot, *et al* 2017) y (Claudia Martínez, *et al* 2006) con una ligera modificación que consistió en la adición de lactosuero en una proporción de 1:1 con respecto al total del medio de cultivo.

Para el crecimiento óptimo de la levadura el pH de los medios de cultivo se ajustó alrededor de 5.2. Dependiendo si el pH es ácido o básico las soluciones reguladoras utilizadas son NaOH y HCL.

5.4. Recuento de levaduras

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

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

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

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

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

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

Por lo tanto la dilución 10^{-5} es la que se asemeja a la cantidad de levaduras necesarias para el proceso fermentativo.

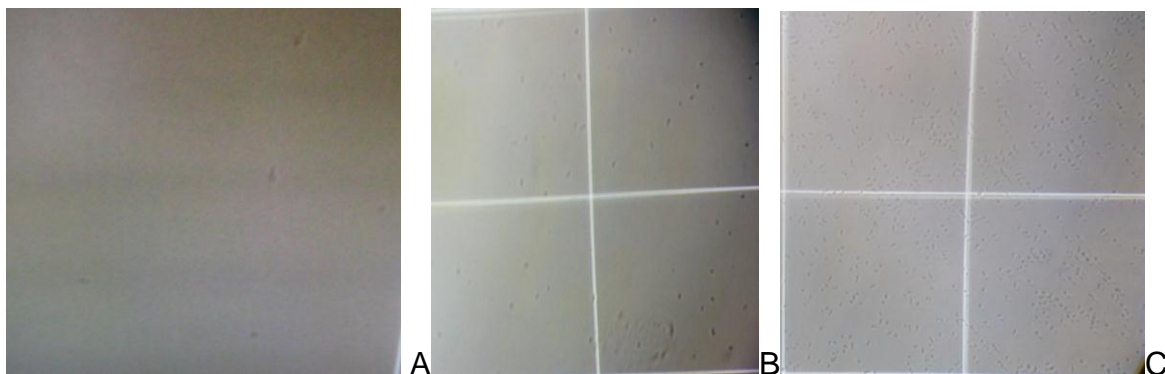




Figura 5: Dilución 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . (Izquierda a derecha y de Arriba hacia abajo.) Fuente: propia

A: Se puede apreciar que en la dilución madre 10^{-1} en un solo cuadrante el recuento es mucho mayor al requerido, aunque en la imagen no se puede estimar claramente.

B: En esta dilución la imagen señala los 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer, se puede establecer que el recuento sigue siendo muy alto.

C: Al igual que en la imagen anterior el recuento de levaduras sigue siendo elevado.

D: A partir de la dilución 10^{-4} el recuento de levaduras se encuentra en aproximación a la cantidad de inóculo debido.

E: El recuento de levaduras en la dilución 10^{-5} es el estimado para el proceso fermentativo, se acerca al valor requerido.

F: En este cuadrante al igual que el anterior no se puede tener una cierta idea del recuento ya que la imagen se tomó de una parte de un cuadrante.

5.5. Evaluación sensorial de los medios de cultivo

Se realizó un análisis sensorial con los funcionarios y estudiantes de Tecnoparque Nodo Bogotá, usando el sentido del olfato con el fin de medir la aceptabilidad e intensidad del aroma a mentol producido por los 3 medios de cultivo formulados.

Olor: Compuestos volátiles que contribuyen al aroma

Se calificó cada ítem en una escala del 1 al 3; siendo:

- 1: Percepción nula
- 2: Percepción moderada
- 3: Percepción fuerte

- 1. Ligeramente intenso
- 2. Moderadamente intenso
- 3. Fuertemente intenso

Tabla 4. Panel sensorial

N° PERSONAS	1		2		3		4		5	
ITEMS	PERCE	INTEN	PERCE	INTEN	PERCE	INTEN	PERCE	INTEN	PERCE	INTEN
MEDIO YPD LÍQUIDO	2	3	1	2	2	2	2	3	1	1
MEDIO YPD MODIFICADO	3	3	2	3	3	3	2	2	2	2
MEDIO LACTOSUERO	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2

N° PERSONAS	6		7		8		9		10	
ITEMS	PERCE	INTEN	PERCE	INTEN	PERCE	INTEN	PERCE	INTEN	PERCE	INTEN
MEDIO YPD LÍQUIDO	2	2	2	2	1	1	2	3	2	3
MEDIO YPD MODIFICADO	3	3	2	3	3	3	2	2	1	2
MEDIO LACTOSUERO	1	1	1	2	2	1	3	2	1	1

PERCEPCIÓN: PERCEPCIÓN DEL AROMA

INTENSIDAD: INTENSIDAD DEL AROMA

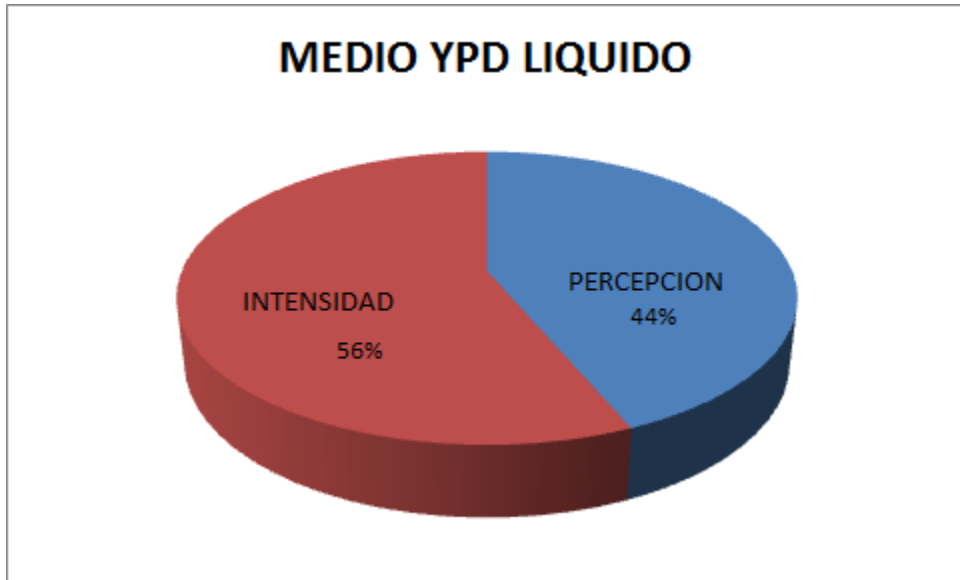


Figura 12. Evaluación sensorial medio YPD líquido. Fuente (Propia)

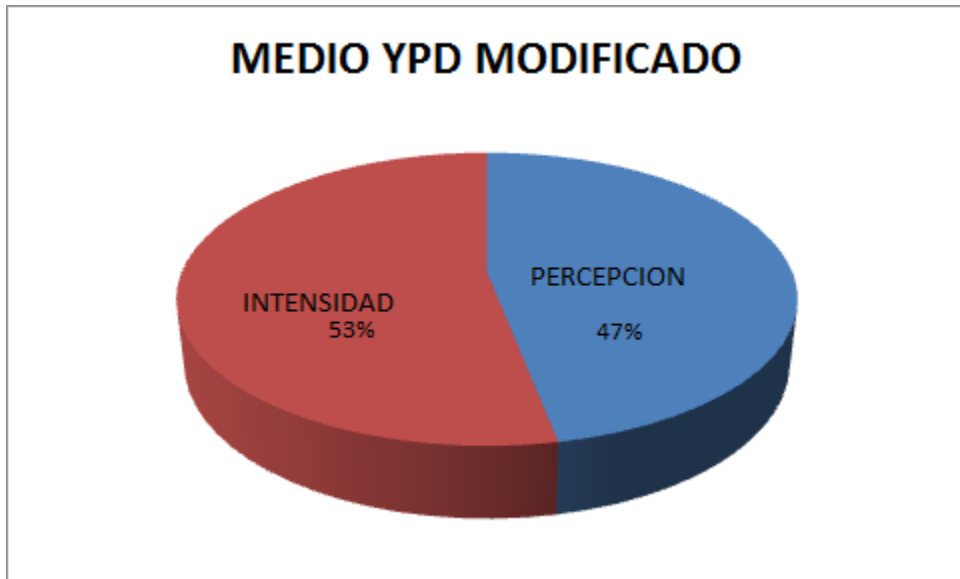


Figura 13. Evaluación sensorial medio YPD modificado. Fuente (Propia)

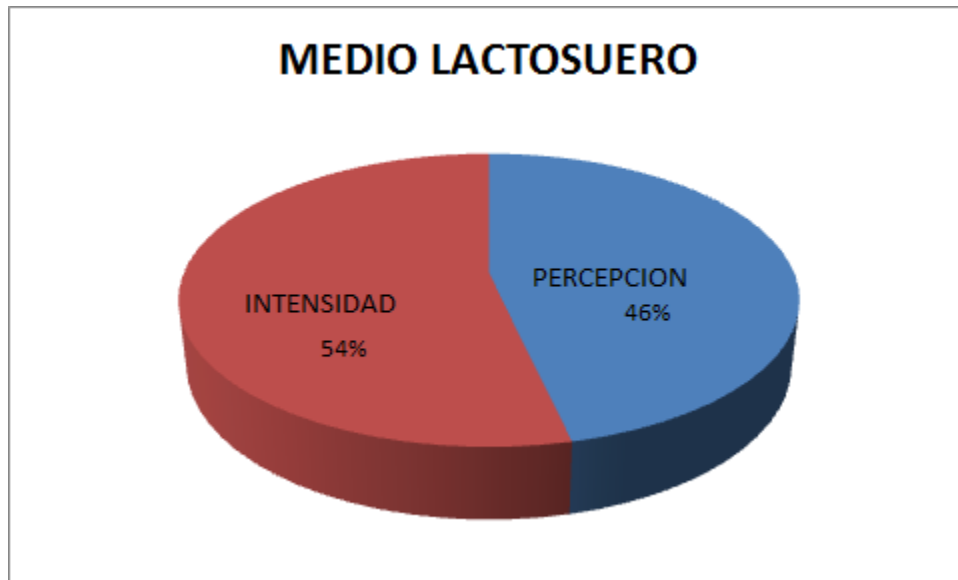


Figura 14. Evaluación sensorial medio lactosuero. Fuente (Propia)

5.6. Pruebas químicas para la identificación de compuestos volátiles

Con el fin de determinar la presencia de compuestos volátiles en las muestras se realizó la identificación cualitativa de fenoles utilizando cloruro férrico, aldehídos y cetonas mediante la utilización del reactivo de Tollens y la identificación de alcoholes con reactivo de Lucas (48).

Esta identificación se realizó en el medio de cultivo posterior a la inoculación y a la adición del principio activo, la cual arrojó los siguientes resultados.

Tabla 5. Resultados de las pruebas químicas realizadas a los medios de cultivo.

COMPUESTO IDENTIFICADO	MEDIO	RESULTADO
FENOLES (Cloruro férrico)	LACTOSUERO	NEGATIVO
	YPD MODIFICADO	NEGATIVO
	YPD LÍQUIDO	NEGATIVO
ALCOHOLES (Reactivo de Lucas)	LACTOSUERO	ALCOHOL 3
	YPD MODIFICADO	ALCOHOL 2
	YPD LÍQUIDO	ALCOHOL 1
ALDEHÍDOS (Reactivo de Tollens)	LACTOSUERO	NEGATIVA
	YPD MODIFICADO	NEGATIVA
	YPD LÍQUIDO	POSITIVA

Fuente: (Propia)



Figura 15. Prueba de aldehídos positiva medio YPD líquido. Fuente: (Propia)

5.7. Cromatografía de capa fina

Se realizó una cromatografía de capa fina con el fin de detectar el mentol presente en las muestras, teniendo en cuenta que el Rf del control del mentol que es 0.78.

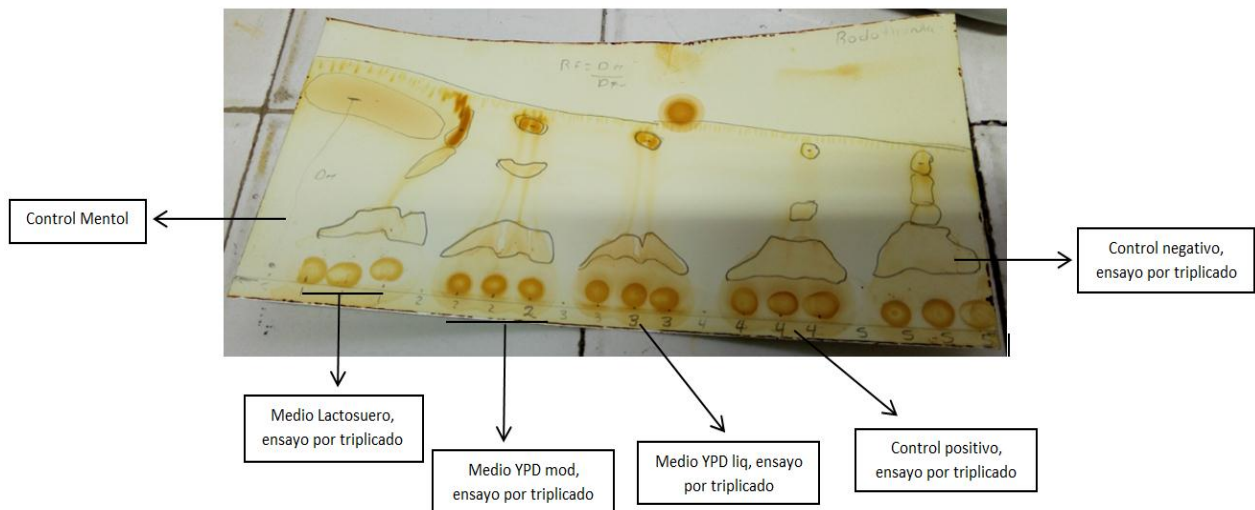


Figura 16. Cromatografía de capa fina. Fuente: (Propia)

Tabla 6. Resultados de la cromatografía

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

Fuente:(Propia)

En la siguiente gráfica se evidencia el comportamiento del recorrido de cada muestra con respecto al control (Mentol), lo que refleja que tanto la muestra número 3 (medio YPD modificado) y la número 5 (Control positivo) tienen cierta aproximación al control, lo cual predice que el medio produjo alcohol. El medio a base de Lactosuero tuvo un comportamiento similar.

Rf: Corresponde a la distancia recorrida por el soluto y el eluyente, teniendo como referencia el punto de partida. Para calcular el Rf se aplica la siguiente fórmula:

$$Rf = \text{distancia recorrida por el compuesto (X)} / \text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}$$

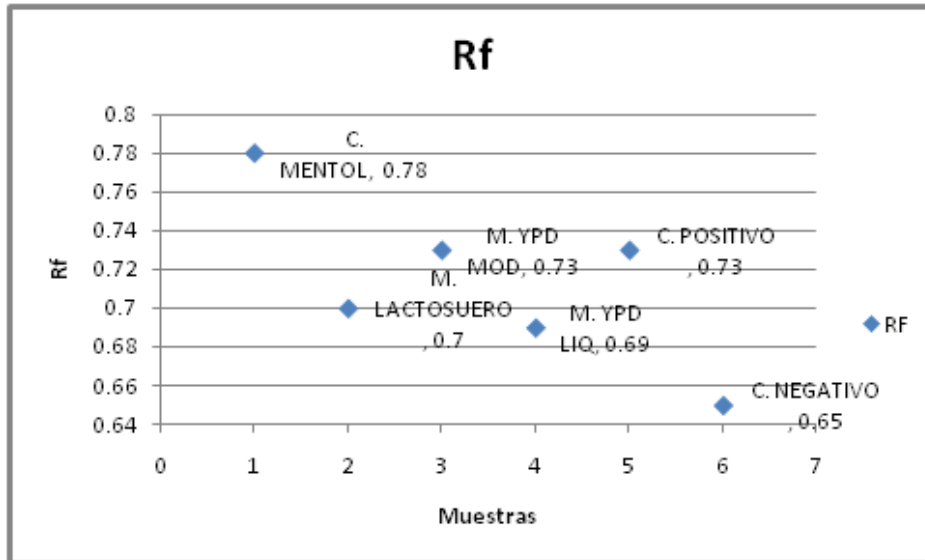


Figura 17. Rf de las muestras

En la siguiente gráfica se muestra la dispersión de los datos con respecto al coeficiente de correlación, existe en los datos una dependencia funcional entre los datos obtenidos en las muestras corridas pero no de tipo lineal, por lo tanto la correlación es muy pequeña.

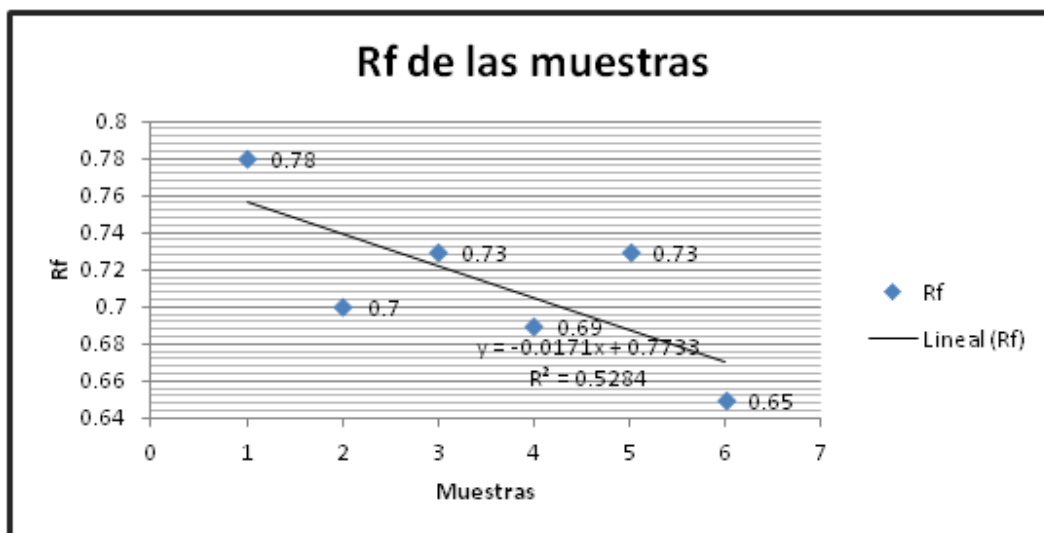


Figura 18. Coeficiente de correlación

6. DISCUSIÓN

La cepa X suministrada por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca no se encontraba caracterizada por especie, por lo tanto fue necesario utilizar el kit REMEL método cualitativo, basado en la degradación enzimática de sustrato visible a través de una reacción colorimétrica; los datos obtenidos fueron analizados con el software RapiD yeast plus (siguiendo la recomendación de la casa comercial), el cual mostró un 95.18% de probabilidad para la especie *Rhodotorula mucilaginosa* (Sinonimia: *Rhodotorula rubra*), la cual según la literatura es apta para la producción del terpeno de interés.

La capacidad enzimática de algunas levaduras no convencionales a nivel industrial para biotransformación de monoterpénoides en compuestos aromáticos derivados, ha redirigido las investigaciones a nivel de producción industrial sobre este grupo de microorganismos donde se encuentran los géneros *Dekkera*, *Eremothecium*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schwanniomyces*, *Sporodiobolus*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, y *Yarrowia* (45). No obstante, los últimos estudios han sido focalizados en la transformación biocatalítica de carvonas y otros grupos cetónicos; basados en esto, Goretti et al., determinaron que estas levaduras pueden reducir enlaces dobles competitivos ($C = C$ y $C = O$) presentes en compuestos precursores de agentes terpenoides utilizados para enriquecer el medio de cultivo propuesto en este estudio (46).

Rhodotorula presentó un crecimiento satisfactorio en los tres medios formulados YPD líquido, YPD modificado y lactosuero, los cuales contienen cuerpos proteicos fermentables, nitrógeno y albúmina contenida en el suero de queso o caseína (producto de desecho intermedio de la industria láctea) constituyente principal de estos sustratos nutricionales. Se evidenció la producción de biomasa microbiana en los tres medios, constatado a través de la formación de un halo anaranjado o salmón, correspondiente a la presencia de la levadura, considerando que para los tratamientos evaluados en este estudio se registró un pH 4.5, que para microorganismos ambientales se considera una limitante para su desarrollo. Esto sugiere que a la demanda nutricional heterogénea y

facultativa que este organismo requiere, además la capacidad de sobrevivir en una amplia gama de ambientes hostiles (Hagler & Ahearn, 1987 ; Walker, 1998 ; Starmer & Lachance, 2011), juega un papel crucial en los procesos adaptativos de *Rhodotorula spp* teniendo en cuenta las condiciones de cultivo *in vitro* propuestos en este trabajo (44).

La adición del lactosuero en el medio YPD líquido, y YPD modificado se realizó a la mitad del total del medio con el fin de mantener las proteínas y en especial la glucosa a una proporción adecuada para no saturar la levadura y permitir un crecimiento óptimo, ya que como lo indica Blazejak y colaboradores en el año 2016 (5) está no tolera una concentración de glucosa superior al 50%. Además de esto como lo dice el estudio de Moyano y colaboradores en 1992 (22) el microorganismo de interés presentó una alta capacidad tanto para crecer como para degradar un efluente lácteo.

Con el fin de obtener el metabolito secundario deseado, sintetizado por *Rhodotorula mucilaginosa* según la investigación de García y colaboradores (26), esta levadura tiene la capacidad de generar un terpeno (mentol) a través de la vía metabólica del mevalonato (26), para esto se necesitó el empleo de un principio activo que le permitiera a la levadura desarrollar el metabolito que tiene un aroma característico mentolado, ya que de lo contrario solo se produciría biomasa; luego de una revisión bibliográfica extensa, en la patente de Tatsue y colaboradores en el año 1971 (39) se evidenció con diferentes metodologías propuestas el uso del acetato de mentilo un precursor del mentol, y con la formulación de varios medios de cultivo se establecieron las condiciones más apropiadas de uno de estos medios que contribuyera a la generación del aroma.

Teniendo en cuenta la metodología propuesta en la patente, no fue posible acceder a tal precursor, por lo cual se estableció con un producto comercial, el mentol cristalizado, el cual se ajustó a las condiciones propuestas y se llevó a cabo el ensayo; al agregar el preparado del principio activo a los medios de cultivo se esperó 20 minutos y posteriormente se realizó una evaluación sensorial de cada uno de los medios de cultivo, utilizando una escala del 1 al 3 en la cual se evalúan 2 parámetros, intensidad y percepción; ligera, moderada y fuerte respectivamente, para cada uno de los ítems

anteriores; esto nos indicaba que estaba en percepción nula; posterior a esto se realizó el análisis olfativo a las 24 horas de incubación, lo cual nos indicó que el único medio que estaba presentando un aroma significativo a mentol era el YPD modificado, lo cual nos sugiere que este es el medio apto para realizar la obtención del metabolito propuesto, sin embargo se deben realizar modificaciones en la formulación del medio con el fin de generar más cantidad del metabolito de interés, buscando un sustrato que la levadura sea capaz de utilizar para activar de una manera más productiva la vía metabólica del mevalonato; en la Figura 12 y 14 correspondiente a los medios YPD líquido y Lactosuero se determinó un nivel de percepción más bajo del esperado.

Posterior al proceso de purificación en el rotaevaporador y a la centrifugación de lo obtenido, se procedió a realizar las pruebas químicas para detección de fenoles, la cual fue negativa; la de alcoholes en el medio YPD líquido se sospecha que podría ser un alcohol primario debido a que no presenta una reacción visible al adicionar el reactivo de Lucas. El medio YPD modificado a los 5 minutos presentó turbiedad después de la adición del reactivo por lo cual se puede sospechar de un alcohol secundario, por lo tanto se correlaciona con el hallazgo sensorial evidenciado anteriormente, teniendo en cuenta que el mentol hace parte de los alcoholes terpénicos secundarios, mientras que el medio lactosuero se puso turbio inmediatamente después de la adición del reactivo debido a la formación de cloruros de alquilo insolubles en agua lo cual indica que es un alcohol terciario (43). Sin embargo el método utilizado es subjetivo ya que se basa en la observación de la producción de burbujas en la muestra de interés posterior a la adición del reactivo, por lo cual se recomienda utilizar otras técnicas para identificación de alcoholes más sensibles, como lo afirma (Martínez, 2001) utilizar la HPLC y la cromatografía de gases que son más eficientes, incluso propone la utilización de RMN (Resonancia magnética nuclear) usando ^{13}C , que es una técnica reciente en la detección de aromas para detección de monoterpenos ya que cuenta con bases de datos de espectros, especialmente para terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos); además de esto se pueden utilizar otros reactivos para el revelado de las muestras en cromatografía de capa fina específicos para monoterpenos, como lo son anisaldehído-ácido sulfúrico, vainillina-ácido sulfúrico y ácido fosfomolibdico.(23)

En el ensayo de la cromatografía de capa fina (Figura 16), las muestras se sometieron por triplicado y un control (mentol), puesto que no se emplearon más controles a excepción del mentol cristalizado, los Rf de cada muestra se compararon con el Rf del mentol, esto con el fin de determinar cuantitativamente si alguno de los medios de cultivo habría sintetizado el aroma en búsqueda. Teniendo en cuenta que el corrido de la cromatografía evidencio la presencia de otros compuestos aromáticos, no se pudieron comparar, ya que no se logró tener acceso a otros controles. Sin embargo se puede observar que el medio YPD modificado tuvo una cercanía del Rf con respecto al control del mentol con lo cual se reafirma la teoría que de los tres medios, el medio YPD modificado es el más apropiado para la producción del metabolito de interés, lo cual también se correlaciona con la similitud con el Rf que presenta el control positivo; sin embargo se recomienda utilizar el mismo procedimiento con un patrón de diferentes terpenos, además de utilizar un fluorocromo específico como la rodamina por la afinidad que este presenta con los terpenos.

Correlacionando los datos obtenidos se puede decir que el único medio apto para la producción del mentol fue el medio YPD modificado, ya que además de ser el único que presentaba un aroma perceptible al olfato, se detectó un alcohol secundario que corresponde a la familia de monoalcoholes, y teniendo en cuenta que el mentol es un monoalcohol se puede corroborar esta información, además de esto la cromatografía arrojó un resultado similar al Rf del control del mentol. Sin embargo es necesario realizar más estudios con el fin de identificar el compuesto por métodos más sensibles, se recomienda hacer una HPLC acoplada a masas para identificar exactamente qué compuestos se generaron posterior a la inoculación del microorganismo y cuales se produjeron después de la adición del precursor para la producción del mentol.

Es posible que el medio YPD modificado fuera el que produjo de manera más significativa el aroma debido a la adición de sales tales como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ KH_2PO_4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ que contribuyeron al desarrollo fisiológico de la levadura y de esta manera mejorar su rendimiento en la vía metabólica, generando así más isoprenos activados que

finalmente van a sintetizar el metabolito; por lo cual para el mejoramiento en la producción del aroma se recomienda mantener la cantidad de sales, además de obtener el precursor propuesto en la patente para incentivar la levadura a tomar la vía metabólica del mevalonato y no otra, adicionalmente realizar ensayos con diferentes tiempos de incubación del precursor para identificar el más óptimo, para la producción del mentol.

7. CONCLUSIONES

El aroma obtenido fue el mentol siendo este el esperado, aunque no en las cantidades deseadas; sin embargo, se observó un crecimiento por parte de la levadura en todos los medios formulados a base de lactosuero, lo cual nos indica que este producto de desecho es un medio de cultivo propicio por su alto contenido nutricional, recalcando además el aprovechamiento a nivel industrial que se le da a este residuo, generando de esta manera un impacto ambiental.

El medio formulado y con mejor aceptabilidad por la levadura fue el YPD Modificado, teniendo entre sus componentes un 50% de lactosuero y algunas sales contribuyendo a su desarrollo fisiológico; mostrando a su vez la capacidad tanto de crecer cómo de degradar este efluente lácteo y al mismo tiempo logrando ser identificado olfativamente el producto volátil generado.

Es posible utilizar el medio de cultivo formulado con unas ligeras modificaciones en el proceso para la producción de terpenos en especial mentol con el fin de generar biotecnología que favorezca el cuidado del planeta.

Se plantea el confirmar los resultados, con una cromatografía HPLC, técnica que para este estudio por costos, no se realizó, y así obtener datos más precisos sobre todos los compuestos obtenidos diferentes al mentol, y obtener una cuantificación más exacta de los compuestos producidos.

Es posible obtener compuestos aromáticos a partir de desechos industriales (lactosuero), debido a los cuerpos proteicos fermentables, nitrógeno y albúmina contenidos en este producto, convirtiéndose en un precursor apto para la biosíntesis del terpeno (mentol); con ayuda de la levadura *Rhodotorula spp*, debido a su capacidad enzimática.

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

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. Guerín, L. Pegoraro. Influencia de la fuente de Nitrógeno en el medio de cultivo, en el crecimiento de *Rhodotorula spp.* De origen lácteo. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa María-Argentina. [Internet]. [Cited 13 September 2016]. Available from: http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal_frvm/CyTAL_2012/TF/TF021.pdf
7. Práctica 5: Determinación de las características fisiológicas de los hongos. Declive. [Internet]. 2016 [cited 6 October 2016]. Available from: <http://documents.tips/documents/determinacion-de-las-caracteristicas-fisiologicas-de-los-hongos.html>
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.
9. 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.
10. 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.

11. 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;.
12. 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.
13. Ben Akacha N Gargouri 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.
14. 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
15. Valencia Denicia E Ramirez Castillo M. La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos* [Internet]. 2009 [cited 1 February 2017];73:27-31. Available from: <http://www.elementos.buap.mx/num73/pdf/27.pdf>
16. Andreas Raab, Christine Lang. Yeast cell for the production of terpenes and uses thereof. United States Patent Application Publication. [Internet]. 2014 [cited 1 February 2017]. Available from: <https://www.google.com/patents/US9051587>
17. Anna M. Kot , Stanisław B, Agnieszka K, Joanna B, Iwona G, Anna B, Magdalena M, Lidia R. Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis*. *Electronic Journal of Biotechnology*. [Internet].2017 [cited 15 February 2017]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345817300076>

18. 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.
19. 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
20. Hernández, A. (2017). *Microbiología Industrial*. 1st ed. pp.50-57.
21. 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.
22. 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>
23. Martínez A. ACEITES ESENCIALES [Licenciatura]. Universidad de Antioquia; 2003.
24. Martínez, C., Gertosio, C., Labbé, A., Perez, R. and Ganga, M. (2006). Production of *Rhodotorula glutinis*: yeast that secretes α -L-arabinofuranosidase. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4), pp.0-0.
25. Casas Acevedo A, Aguilar González C, de la garza Toledo H, Morlett Chávez J, Rodríguez Herrera R. Importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación de bebidas alcohólicas. *Investigación y ciencia*. 2017;(65):73-79
26. García Garibay, Quintero Ramirez, López Munguia. *Biotecnología alimentaria*. 1st ed. LIMUSA Noriega Editores; 2017
27. 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
28. Primo Yúfera E. *Química orgánica básica y aplicada*. 1st ed. Barcelona: Reverté; 2009.

29. Encinas M. La aromaterapia en mi vida. 1st ed. Estados Unidos. 2012. [Internet]. Cited 10 March 2017. Available from: <http://bookstore.palibrio.com/Products/SKU-000592867/La-Aromaterapia-en-mi-vida.aspx>
30. Ortuño M. La cara oculta de alimentos y cosméticos. 1st ed. Aiyana. 2005. [Internet]. Cited 2 September 2017. Available from: https://books.google.com.co/books?id=D05E519eSDMC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
31. UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA. ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA UNIDAD DE CIENCIAS BÁSICAS. 2012. Industria en la actualidad.[Internet]. Cited 2 September 2017. Available from: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401552/Topico_1/17la_industria_en_la_actualidad.html
32. Christen P. Producción de aromas por fermentación en medio sólido. ORSTOM (Instituto francés de investigación para el desarrollo en cooperación). Volumen IV, número 2; pág. 102-109. [Internet]. 1995 [cited 4 September 2017]. Available from: <file:///D:/Downloads/Producci%C3%B3n%20de%20aromas%20por%20fermentaci%C3%B3n%20en%20medio%20sólido%201995.pdf>
33. Herrera Y, Mendoza R, García O, Cruz S, Muñoz O. REVISTA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA, Volumen XXIII, Número 1. (2010). El Fascinante mundo de los olores. Cited 2 September 2017. Available from: <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol23num1/articulos/olores/index.html>
34. Bramley P. Plant Biochemistry. 11 Isoprenoid Metabolism. San Diego-California: Dey, Harborne; pag 417-418. 1997.
35. [Internet]. 2017 [cited 4 September 2017]. Available from: <https://sioc.minagricultura.gov.co/SICLA/Documentos/002%20-%20Cifras%20Sectoriales/2016%20Abril.pdf>
36. Cromatografía de gases. [Cited 4 September 2017]. Available from: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf

37. Pino F, Rodriguez J. Análisis de Clases de Lípidos por Cromatografía de Capa Fina de Alta Resolución. INVURNUS. Volumen 6; 38-43. [Internet]. 2011 [cited 4 September 2017]. Available from: [http://www.invurnus.uson.mx/revistas/articulos/10-Pino%20Bovey%20y%20Noriega%20R%20\(2011\)%20Invurnus%206%20\(2\)%2038-43.pdf](http://www.invurnus.uson.mx/revistas/articulos/10-Pino%20Bovey%20y%20Noriega%20R%20(2011)%20Invurnus%206%20(2)%2038-43.pdf)
38. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio P. Metodología de la investigación. 4th ed. México: Mc Graw Hill; 2010.
39. Tatsue Moroe T, Satohiko Hattori K, Akira Komatsu T, Yuso Yamaguchi K. Method for the biochemical isolation of l-menthol. Japón; 3620918, 1971.
40. 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.
41. Takasago perfumery Co. Ltd. Method for the biochemical isolation of 1- mentol. Tokyo, Japan; 3.620.918, 1971.
42. Mikami Y. Microbial Conversion of Terpenoids. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1988;6(1):271-320.
43. Ugr.es. 2018 [cited 1 February 2018]. Available from: <http://www.ugr.es/~quiorred/doc/p14.pdf>
44. Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), pp.78-82.
45. 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. 2015.
46. Goretti M, Branda E, Turchetti B, Cramarossa M, Onofri A, Forti L et al. Response surface methodology as optimization strategy for asymmetric bioreduction of (4S)-(+)-carvone by *Cryptococcus gastricus*. *Bioresource Technology*. 2012; 121:290-297.

47. Siddiquee S, Azad S, Abu Bakar F, et al. Separation and identification of hydrocarbons and other volatile compounds from cultures of *Aspergillus niger* by GC–MS using two different capillary columns and solvents. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2015. . [Internet]. Cited 10 Feb. 2017. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610312000373>

48. Identificación de grupos funcionales. 2017.[Internet]. Cited 4 September 2017. Available from: <http://www.ugr.es/~quiorred/doc/p14.pdf>

8. ANEXOS

8.1. INSERTO KIT REMEL

RapID™ Yeast Plus System

USO PREVISTO

El sistema RapID Yeast Plus de Remel es un micrométodo cualitativo que utiliza sustratos convencionales y cromogénicos para la identificación de microorganismos médicamente importantes, como levaduras, micro- organismos levaduriformes y microorganismos relacionados, aislados en muestras clínicas humanas. La relación completa de microorganismos detectados por el sistema RapID Yeast Plus se incluye en el diagrama diferencial RapID Yeast Plus.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El sistema RapID Yeast Plus se compone de (1) paneles RapID Yeast Plus, (2) reactivo RapID Yeast Plus A y (3) reactivo RapID Yeast Plus B. Cada panel RapID Yeast Plus tiene varios pocillos de reacción moldeados en la periferia de una bandeja de plástico desechable. Los pocillos de reacción

contienen reactantes deshidratados y la bandeja permite la inoculación simultánea de cada uno de ellos con una cantidad predeterminada de inóculo. Como inóculo que rehidrata e inicia las reacciones de prueba se usa una suspensión del microorganismo de prueba en el líquido de inoculación RapID. Después de incubar el panel, se examina la reactividad de cada pocillo de prueba observando el desarrollo de un color. En algunos casos, se deben añadir reactivos a los pocillos para obtener el cambio de color.

PRINCIPIO

Las pruebas usadas en el sistema RapID Yeast Plus se basan en la degradación microbiana de sustratos específicos detectados por varios sistemas indicadores. Los reactivos utilizados son una combinación de pruebas convencionales y pruebas cromogénicas de monosustrato, y se describen más adelante en la Tabla 1.

REACTIVOS*

Reactivo RapID Yeast Plus A (se incluye en el estuche) (15 ml/frasco) Ingrediente del reactivo, por litro:

Hidróxido potásico.....16,0 g

Reactivo RapID Yeast Plus B (se incluye en el estuche) (10 ml/frasco) Ingrediente del reactivo, por litro:

p-dimetilaminocinamaldehído0,06 g

Líquido de inoculación RapID (R8325106, se suministra por separado) (2 ml/tubo)

KCl6,0 g

CaCl₂0,5 g Agua

desmineralizada..... 1.000,0 ml

*Ajustado según necesidades para cumplir los estándares de comportamiento.

PRECAUCIONES

Este producto es para uso diagnóstico *in vitro* y debe ser utilizado por personal con la formación adecuada. Se tomarán precauciones frente a los riesgos microbiológicos esterilizando correctamente las muestras, envases, medios y paneles de prueba después de su uso. Se deben leer y seguir atentamente las instrucciones.

¡Precaución!

1. El reactivo RapID Yeast Plus A puede provocar irritación en la piel, ojos y aparato respiratorio.
2. El reactivo RapID Yeast Plus B es tóxico y puede provocar daños al medio ambiente. Peligroso por inhalación, por contacto con la piel o los ojos, o por ingestión. Puede alterar la fertilidad o provocar daños al feto.
3. Consultar una información más detallada en la Hoja de datos de seguridad sobre productos químicos.

ALMACENAMIENTO

El sistema RapID Yeast Plus debe almacenarse en su envase original a una temperatura de 2 a 8°C. Dejar estabilizar el producto a temperatura ambiente antes de su uso. NO intercambiar con reactivos de distintos sistemas RapID. Extraer sólo el número necesario de paneles para el estudio. Volver a sellar la bolsa de plástico y devolverla rápidamente a su almacenamiento a una temperatura de 2 a 8°C. Los paneles deben usarse el mismo día que se retiran del lugar de almacenamiento. El líquido de inoculación RapID debe almacenarse en su envase original a temperatura ambiente (de 20 a 25°C) hasta su uso.

DETERIORO DEL PRODUCTO

Este producto no se debe usar si (1) el color del reactivo ha cambiado, (2) se ha sobrepasado la fecha de caducidad, (3) la bandeja de plástico está rota o la tapa está dañada, o (4) hay otros signos de deterioro.

OBTENCIÓN, ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Las muestras se deben obtener y manipular acorde con las directivas recomendadas^{11,12}.

MATERIALES SUMINISTRADOS

(1) 20 paneles RapID Yeast Plus, (2) 20 formularios de resultados, (3) 1 de cada, reactivos RapID Yeast Plus A y B (frascos cuentagotas de plástico que contienen suficiente reactivo para 20 paneles), (4) 2 bandejas de incubación de cartón, (5) 1 tarjeta de inoculación RapID Yeast Plus, (6) Instrucciones de uso (IFU).

Tabla 1. Principios y componentes del sistema RapID Yeast Plus

Nº de pocillo	Código de la prueba	Ingredientes de los reactivos	Cantidad	Principio	Bibliografía
1	GLU	Glucosa	1,0%		
2	MAL	Maltosa	1,0%		
3	SUC	Sacarosa	1,0%		
4	TRE	Trehalosa	1,0%		
5	RAF	Rafinosa	1,0%		
6	LIP	Éster de ácido graso	1,0%	La hidrólisis del ácido graso da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador.	2
7	NAGA	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-galactosaminida	0,05%		
8	αGLU	p-nitrofenil-α-D-glucósido	0,05%		
9	βGLU	p-nitrofenil-β-D-glucósido	0,05%		
10	ONPG	σ-nitrofenil-β-D-galactósido	0,05%		
11	αGAL	p-nitrofenil-α-D-galactósido	0,05%		
12	βFUC	p-nitrofenil-β-D-fucósido	0,05%		
13	PHS	p-nitrofenil fosfato	0,05%		
14	PCHO	p-nitrofenil fosforilcolina	0,05%		
15	URE	Urea	0,3%	La hidrólisis de la urea da lugar a productos alcalinos que aumentan el pH e inducen el cambio del indicador.	9
16	PRO	Prolina-β-naftilamida	0,01%		
17	HIST	Histidina β-naftilamida	0,01%		
18	LGY	Leucil-glicina β-naftilamida	0,01%		

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

(1) Dispositivo de esterilización en asa, (2) Asa de inoculación, torunda, envases para las muestras, (1) Incubadoras, sistemas ambientales alternativos, (4) Medio suplementario, (5) Microorganismos para control de calidad, (6) Reactivos para la tinción de Gram, (7) Portamuestras para el microscopio, (8) Torundas de algodón, (9) Líquido de inoculación RapID-2 ml (R8325106), (10) Pipetas, (11) ERIC (Compendio electrónico RapID, R8323600).

PROCEDIMIENTO

Preparación del inóculo:

- Los microorganismos en estudio deben cultivarse en un medio de cultivo puro y examinarse con la tinción de Gram o medio húmedo antes de usarlos en el sistema.
Nota: Sólo se debe utilizar el sistema RapID Yeast Plus para pruebas con microorganismos que muestren un aspecto levaduriforme y características de cultivo similares a las de las levaduras.
- Se recomienda utilizar el medio siguiente: Agar Sabouraud dextrosa (SDA) - formulación Emmons
Notas:
 - Las placas usadas para la preparación del inóculo deben incubarse a 30°C y tener 48 horas.
 - El uso de medios distintos de los recomendados puede comprometer el comportamiento de la prueba.
- Con una torunda de algodón o un asa de inoculación, suspender suficiente crecimiento del cultivo en la placa de agar en el líquido de inoculación RapID (2 ml) para conseguir una turbidez visual como la indicada en Notas, con ayuda de la tarjeta de inoculación RapID Yeast Plus.

Notas:

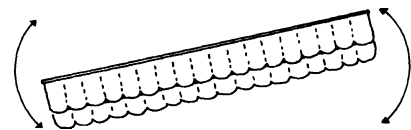
- Seleccionar colonias bien aisladas del aislamiento en estudio y añadir **incrementalmente** al fluido de inoculación RapID para evitar la formación de coágulos y la sobreinoculación. Continuar añadiendo el microorganismo hasta que la turbidez de la suspensión oculte **completamente** las líneas negras de la tarjeta de inoculación. Cuando las líneas negras de la tarjeta de inoculación ya no sean visibles, se ha completado la preparación del inóculo.
 - Las suspensiones con una turbidez significativamente menor que la densidad de inóculo requerida provocarán reacciones anómalas.
 - Las suspensiones **ligeramente** más turbias que la densidad de inóculo requerida no afectarán al comportamiento de la prueba y se recomiendan para los cultivos madre y las cepas de control de calidad. Sin embargo, las suspensiones **significativamente** más turbias comprometerán el comportamiento de la prueba.
 - Las suspensiones se deben mezclar bien, con vortex si es preciso.
 - Las suspensiones se deben usar en los 15 minutos siguientes a su preparación.
4. Puede inocularse otra placa de agar para comprobar la pureza y cualquier otro estudio adicional que pueda ser necesario, usando un asa llena de la suspensión de prueba del tubo de líquido de inoculación. Incubar la placa durante un periodo de 24 a 72 horas a una temperatura de 30°C.

Inoculación de los paneles RapID Yeast Plus:

1. Abrir la tapa del panel sobre el acceso de inoculación, tirando de la pestaña marcada "Peel to Inoculate" hacia arriba y hacia la izquierda.
2. Con una pipeta, transferir suavemente el contenido de todo el tubo de líquido de inoculación a la esquina superior derecha del panel. Volver a sellar el acceso de inoculación del panel, presionando la pestaña de apertura para que vuelva a su posición original.
3. Después de añadir la suspensión de prueba, y mientras se mantiene el panel sobre una superficie nivelada, incline el panel hacia el lado contrario a los pocillos de reacción, aproximadamente en un ángulo de 45° (ver la siguiente imagen).

Pocillos de reacción Cubeta de inoculación
(parte posterior de la bandeja)

4. Mientras se inclina, debe mecerse suavemente el panel de lado a lado para distribuir homogéneamente el inóculo a lo largo de las depresiones posteriores, como se muestra en la imagen.

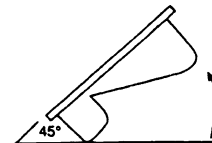


5. Mientras se mantiene en posición horizontal nivelada (que se consigue mejor usando la parte superior de la mesa de trabajo contra el fondo de los pocillos), debe inclinarse lentamente el panel hacia delante, hacia los pocillos de reacción, hasta que el inóculo fluya a lo largo de las depresiones de los pocillos de reacción (ver más adelante). De esta manera, todo el inóculo de la parte posterior del panel será evacuado.

Nota: Si se inclina demasiado el panel, puede quedar aire atrapado en la unión de los

pocillos de prueba y limitar el movimiento del líquido.

Pocillos de reacción _____ (Parte delantera de la bandeja)



- Devolver el panel a su posición nivelada. Si es necesario, dar unos golpes suaves con el panel sobre la mesa para eliminar el aire atrapado en los pocillos.

Notas:

- Examinar los pocillos de prueba. No deben presentar burbujas y deben estar uniformemente llenos. Se aceptan ligeras irregularidades en el llenado de los pocillos de prueba. No afectarán a su comportamiento. Si el panel está claramente mal llenado, se debe inocular un nuevo panel y desecharse el erróneo.
- Completar la inoculación de cada panel que reciba el líquido de inoculación antes de inocular nuevos paneles.
- No dejar que el inóculo repose en la parte posterior del panel durante mucho tiempo sin completar el procedimiento.

Incubación de los paneles RapID Yeast Plus:

Incubar los paneles inoculados a una temperatura de 30°C en una incubadora sin CO₂ durante 4 horas. Para facilitar la manipulación, los paneles se pueden incubar en las bandejas de incubación de cartón que se incluyen en el estuche.

Notas:

- Si no dispone de una incubadora sin CO₂ a 30°C, puede incubar los paneles RapID Yeast Plus a temperatura ambiente.
- La incubación de paneles RapID Yeast Plus a temperaturas de 35 a 37°C puede dar lugar a reacciones anómalas.

Puntuación de los paneles RapID Yeast Plus:

Los paneles RapID Yeast Plus contienen 18 pocillos de reacción que proporcionan 18 puntuaciones de prueba. Las pruebas que requieren un reactivo (pocillos del 7 al 14 y del 16 al 18) aparecen designados mediante un recuadro que los rodea.

- Mientras se sujeta firmemente el panel RapID Yeast Plus sobre la mesa, retirar la tapa que cubre los pocillos de reacción. Para ello, tirar de la pestaña inferior derecha hacia arriba y hacia la izquierda.
- Añadir los reactivos siguientes a los pocillos que se indican:
 - Añadir 1 gota del reactivo RapID Yeast Plus A a los pocillos del 7 (NAGA) al 14 (PCHO).
 - Añadir 1 gota del reactivo RapID Yeast Plus B a los pocillos del 16 (PRO) al 18 (LGY).
- Después de añadir el reactivo RapID Yeast Plus B, esperar al menos 30 segundos pero no más de 1 minuto para que se desarrolle el color.

Nota: Los pocillos que muestren capas de color pueden mezclarse mediante una varilla aplicadora antes de la lectura.

- Leer y puntuar los pocillos de prueba de izquierda a derecha usando la guía de interpretación presentada en la Tabla 2. Anotar las puntuaciones en los recuadros correspondientes del formulario de resultados.
- Consultar el microcódigo obtenido en el formulario de resultados del ERIC para la identificación.

Nº de pocillo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
---------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Código de la prueba	GLU	MAL	SUC	TRE	RAF	LIP	NAGA	GLU	GLU	ONPG	GAL	FUC	PHS	PCHO	URE	PRO	HIST	LGY	
									Reactivo RapID Yeast Plus A								Reactivo RapID Yeast Plus B		

Tabla 2. Interpretación de las pruebas del sistema RapID Yeast Plus*

Cavity #N° de pocillo	Código de la prueba	Reactivo	Reacción		Comentario
			Positivo	Negativo	
1	GLU	Ninguno	Amarillo	Azul, verde-azul, o verde	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color amarillo bien definido.
2	MAL				
3	SUC				
4	TRE				
5	RAF				
6	LIP	Ninguno	Amarillo	Rojo, rosa, naranja o dorado	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color amarillo limón bien definido.
7	NAGA	Reactivo RapID Yeast Plus A	Amarillo	Transparente o botón cremoso	El desarrollo de cualquier tono de amarillo se debe puntuar como positivo.
8	αGLU				
9	βGLU				
10	ONPG				
11	αGAL				
12	βFUC				
13	PHS				
14	PCHO				
15	URE	Ninguno	Rojo o rojo-naranja oscuro	Amarillo, amarillo-naranja o naranja	Sólo se puntuará como positivo el desarrollo de un color rojo o rojo-naranja oscuro. Los demás tonos de naranja se puntuarán como negativo.
16	PRO	Reactivo RapID Yeast Plus B	Morado, rojo o rosa oscuro	Transparente, pajizo, naranja o rosa de pálido a intermedio	Sólo se puntuará como positivo el desarrollo de un color bien definido morado, rojo o rosa oscuro. Los tonos pálidos se puntuarán como negativos.
17	HIST				
18	LGY				

*NOTA: Los paneles se deben leer mirando a través de los pocillos de reacción sobre un fondo blanco.

RESULTADOS E INTERVALO DE VALORES ESPERADOS

El diagrama diferencial RapID Yeast Plus ilustra los resultados esperados con el sistema RapID Yeast Plus. Los resultados del diagrama diferencial se expresan como una serie de porcentajes que indican positivos para cada prueba del sistema. Esta información apoya estadísticamente el uso de cada prueba y proporciona la base del enfoque probabilístico para identificar el aislamiento en estudio, mediante un código numérico de los resultados de la prueba digital.

Las identificaciones se hacen con las puntuaciones individuales de la prueba en los paneles RapID Yeast Plus junto con otra información de laboratorio para producir un patrón que imite estadísticamente la reactividad conocida de los géneros registrados en la base de datos RapID. Estos patrones se comparan mediante el diagrama diferencial RapID Yeast Plus o a partir de un microcódigo y el uso del ERIC.

CONTROL DE CALIDAD

Todos los números de lote del sistema RapID Yeast Plus se han estudiado usando los siguientes microorganismos de control de calidad, y los resultados son aceptables. El estudio de los microorganismos de control se debe realizar de acuerdo con los procedimientos de control de calidad establecidos en el laboratorio. Si se observan resultados anómalos en el control de calidad, no se informará de los resultados de ese paciente. En la Tabla 3 se exponen los resultados de una batería seleccionada de microorganismos de prueba.

Notas:

- El control de calidad del reactivo RapID Yeast Plus se realiza obteniendo las reacciones esperadas en las pruebas que necesitan la adición de los reactivos (pocillos del 7 al 14 en el caso del reactivo A; pocillos del 16 al 18 en el caso del reactivo B).
- Los microorganismos que se han transferido repetidamente a un medio de agar durante periodos prolongados pueden dar resultados anómalos.
- Las cepas de control de calidad deben conservarse congeladas o liofilizadas, o bien en tubos de ensayo inclinados con agar Sabouroud dextrosa (formulación Emmons) a una temperatura de 2 a 8°C. Antes del uso, las cepas de control de calidad deben ser transferidas de 2 a 3 veces del medio de conservación a agar Sabouraud dextrosa (formulación Emmons). El subcultivo final que se desee utilizar en las pruebas de control de calidad deben incubarse a 30°C durante 48 horas.

Las formulaciones, los aditivos y los ingredientes del medio de cultivo varían en el producto de cada fabricante y pueden variar en cada lote. En consecuencia, el medio de cultivo puede influir en la actividad enzimática constitutiva de las cepas de control de calidad designadas. Si los resultados de la cepa de control de calidad difieren de los patrones indicados, un subcultivo en un medio de otro lote o de otro fabricante resolverá a menudo las discrepancias del control de calidad.

Tabla 3. Diagrama de control de calidad para los paneles RapID Yeast Plus

Microorganismo	GLU	MAL	SUC	TRE	RAF	LIP	NAGA	α GLU	β GLU	ONPG	α GAL	β FUC	PHS	PCHO	URE	PRO	HIST	LGY
<i>Candida albicans</i> ² ATCC [®] 14053	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	V	-	-	+	V	V
<i>Candida glabrata</i> ATCC [®] 2001	+	-	-	+	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	V
<i>Candida kefyr</i> ² ATCC [®] 2512	+	V	+	V	+	V	-	-	+	+	-	+	-	-	-	V	V	V
<i>Cryptococcus laurentii</i> ATCC [®] 66036	-	-	-	-	-	V	-	+	+	-	+	V	V	V	+	-	-	-
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC [®] 9773	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	-	-	+	+	-	+	+	+

+, positivo; -, negativo; V, variable

²Las principales cepas indicadoras presentan un rendimiento aceptable del sustrato más lábil en el sistema y reactividad en un número significativo de pocillos, de acuerdo con las recomendaciones para el control de calidad simplificado del Instituto de Normas para Laboratorios Clínicos.¹⁶

LIMITACIONES

1. El uso del sistema RapID Yeast Plus y la interpretación de resultados requiere los conocimientos de un técnico de laboratorio competente, con formación en los métodos de microbiología general y que haga un uso racional de la formación, la experiencia, la información de la muestra y otros procedimientos pertinentes antes de informar de la identificación obtenida con el sistema RapID Yeast Plus.
2. El sistema RapID Yeast Plus debe usarse con cultivos puros de los microorganismos de prueba. El uso de poblaciones microbianas mixtas o el estudio directo del material clínico sin un cultivo previo dará resultados anómalos.
3. El sistema RapID Yeast Plus se ha diseñado para usarse con los géneros que se enumeran en el Diagrama diferencial RapID Yeast Plus. El uso de microorganismos que no se mencionen específicamente puede provocar errores de identificación.
4. Los valores esperados en las pruebas del sistema RapID Yeast Plus pueden diferir de los resultados de pruebas convencionales o de la información obtenida con anterioridad.
5. La exactitud del sistema RapID Yeast Plus se basa en el uso estadístico de varias pruebas diseñadas específicamente y de una base de datos exclusiva registrada. El uso de una sola prueba con el sistema RapID Yeast Plus para establecer la identificación de un aislamiento en estudio está sujeto al error inherente a esa prueba concreta.
6. *Candida dubliniensis*, como *C. albicans*, produce tubos de germinación y clamidiosporas así como reacciones bioquímicas similares a *C. albicans*.²¹ La distinción entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* es importante porque estas últimas especies han demostrado desarrollar resistencia a determinados agentes antifúngicos.¹¹ Se ha descubierto que el crecimiento a 42-45°C (*C. albicans*), la morfología en medios diferenciales, la producción de β -glucosidasa (*C. albicans*) y la clamidoconidia abundante en agar Staib (alpiste) (*C. dubliniensis*) ayudan a diferenciar *C. albicans* y *C. dubliniensis*.^{19,20,22}

CARACTERÍSTICAS DE COMPORTAMIENTO

Las características de comportamiento del sistema RapID Yeast Plus se han establecido mediante pruebas de laboratorio de 500 cultivos tipo, clínicos y de referencia en Remel. En total, el sistema RapID Yeast Plus identificó correctamente 476 (95,2%) de los microorganismos estudiados. Se comparó un total de 378 aislamientos con el sistema RapID Yeast Plus y con API 20C¹³. El sistema RapID Yeast Plus coincidió con el API 20C en 361 (95,5%) de los aislamientos estudiados.

El sistema RapID Yeast Plus ha sido evaluado por un organismo independiente utilizando 185 aislamientos clínicos de levaduras¹⁴. Un total de 181 (97,8%) fueron identificados correctamente por el sistema RapID Yeast Plus sin necesidad de pruebas adicionales y 4 aislamientos (2,2%) fueron identificados correctamente después de pruebas adicionales. No se detectó ningún error de identificación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Balows, A., W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy. 1991. Manual of

- Clinical Microbiology. 5th ed., p. 617-629. ASM, Washington, D.C.
2. Lodder, J. 1970. The Yeasts - A Taxonomic Study. North Holland Publishing Co., Amsterdam - London.
 3. Bobey, D.G., J.J. Bradna, and D.B. Florek-Ebeling. 1980. Abstract C-254. Abstracts of the 80th General Meeting of the American Society for Microbiology. ASM, Washington, D.C.
 4. Bobey, D.G. and G.M. Ederer. 1981. J. Clin. Microbiol. 13:393-394.
 5. David, H.L. and M.T. Jahan. 1977. J. Clin. Microbiol. 5:383-384.
 6. Perry, J.L., G.R. Miller, and D.L. Carr. 1990. J. Clin. Microbiol. 28:614- 615.
 7. Smith, R.F., D. Blasi, and S.L. Dayton. 1973. Appl. Microbiol. 26:364-367.
 8. Smitka, C.M. and S.G. Jackson. 1989. J. Clin. Microbiol. 27:203-206.
 9. Roberts, G.D., C.D. Horstmeier, G.A. Land, and J.H. Foxworth. 1978. J. Clin. Microbiol. 7:584-588.
 10. Norris, J.R. and D.W. Ribbons. 1976. Methods in Microbiology. Vol. 9, p. 1-14. Academic Press, New York, NY.
 11. Versalovic, J., K.C. Carroll, G. Funke, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and D.W. Warnock. 2011. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. ASM Press, Washington, D.C.
 12. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, MO.
 13. Marler, J.K. and L.A. Eriquez. 1995. Abstract C-418. Abstracts of the 95th General Meeting of the American Society for Microbiology. ASM, Washington, D.C.
 14. Kitch, T. and P.C. Appelbaum. 1995. Abstract C-419. Abstracts of the 95th General Meeting of the American Society for Microbiology. ASM, Washington, D.C.
 15. Eriquez, L.A. and J.K. Marler. 1994. Abstract C-490. Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology. ASM, Washington, D.C.
 16. Lee, K.L., M.E. Reza, R.R. Watson, and C.C. Campbell. 1975. Sabouraudia 13:132-141.
 17. Marler, J.K. and L.A. Eriquez. 1994. Abstract C-489. Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology. ASM, Washington, D.C.
 18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Quality Control for Commercial Microbial Identification Systems; Approved Guideline. M50-A. CLSI, Wayne, PA.
 19. Al Mosaid, A., D. Sullivan, I.F. Salkin, D. Shanley, and D.C. Coleman. 2001. J. Clin. Microbiol. 39:323-327.
 20. Wabale, V.R., A.S. Kagal, R.S. Mani, and R. Bharadwaj. 2007. Indian J. Med. Microbiol. 25:304-305. Retrieved October 1, 2008 from: <http://www.ijmm.org/text.asp?2007/25/3/304/34787>.
 21. Sullivan, D.J., T.J. Westerneng, K.A. Haynes, D.E. Bennett, and D.C. Coleman. 1995. Microbiology. 141:1507-1521.
 22. Sullivan, D.J., G. Moran, S. Donnelly, S. Gee, E. Pinjon, B. McCartan, D.B. Shanley, and D.C. Coleman. 1999. Rev. Iberoam. Micol. 16:72-76.

PRESENTACIÓN

REF R8311007, RapID Yeast Plus System20 pruebas/juego

Diagrama diferencial RapID Yeast Plus

Microorganismo	G L U	M A L	S U C	T R E	R A F	L I P	NA GA ^g	α G LU	β G L U	ON PG	α G AL	β F U C	P H S	PC H O	U R E	P R O ^g	H I S T	L G Y
<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 9	4	1 9	5	0	7 4	84	81	80	1	81	7	9 2	78	9 6	95	1 8	9 0
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	1 6	9	8	6	4	7 4	0	21	41	0	0	0	5	2	0	5	9 8	9 6
<i>Candida albicans</i>	9 6	9 4	2	1 4	1	3	90	94	4	0	0	0	7 6	2	1	99	3 6	9
<i>C. apicola</i>	9 8	0	9 4	1	1	0	0	1	1	0	2	7	2	9	0	0	9 6	9 5
<i>C. ciferrii</i>	3	0	2	0	0	5 8	96	79	94	0	11	2	0	86	2	0	5 5	1 1
<i>C. colliculosa</i>	9 8	5	9 8	9 7	1	0	0	95	90	1	0	2	8 9	0	3	99	8 6	6 6
<i>C. famata^a</i>	9 0	0	7 7	4	8	0	0	49	74	7	7	2	7 6	26	0	99	1 8	4
<i>C. glabrata^b</i>	9 8	8	2	9 6	2	2 4	1	4	11	0	1	0	1	1	0	0	2 9	1 3
<i>C. guilliermondii</i>	9 1	0	9 2	4	3 8	3	0	63	40	0	70	1	9 1	88	7	99	7 0	2 9
<i>C. intermedia</i>	9 8	4 4	9 6	7 4	7 2	1	0	33	99	0	0	0	9 6	32	0	96	9 7	2 8
<i>C. kefy^c</i>	9 7	7	9 8	3	9 2	6	0	4	93	73	0	88	0	0	3	1	1 6	4
<i>C. krusei</i>	9 9	1	1	1	0	1	0	0	26	0	0	0	1	0	9	0	6 9	3 5
<i>C. lambica</i>	9 6	0	0	0	0	4	0	0	8	0	0	0	9 0	91	1	92	7 8	8
<i>C. lusitaniae</i>	9 9	0	1 0	8	0	2	0	97	98	0	0	0	9 0	88	6	99	6 6	6
<i>C. marina</i>	9 5	0	0	0	0	0	0	1	98	95	0	92	8 8	90	2	98	9 2	2
<i>C. parapsilosis</i>	9 8	3	4	0	0	2	0	94	9	0	0	1	8 0	77	4	98	1 5	6
<i>C. rugosa</i>	0	0	0	0	0	8 4	14	0	2	60	0	0	1 6	5	2	16	7 7	9
<i>C. stellatoidea</i>	9 8	9 5	1	9	2	9	95	95	6	1	1	1	8 1	2	2	0	4 2	9
<i>C. tropicalis^d</i>	9 8	6 4	8 7	8 4	3	4	14	95	5	0	1	1	6 0	67	2	1	3 1	2 8
<i>C. utilis</i>	9 8	1	9 6	1	9 6	4	0	2	90	0	1	5	8 8	92	2	17	9 0	8 5

<i>C. zeylanoides</i>	7 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 20	0 0 0	1 2 2	98 2 1
<i>Cryptococcus albidus</i>	8 6 1 1	6 9 1 1	1 1 4	0 90 92	0 1 18	9 0 88 9 0	70 6 1 1
<i>Cr. Humicolus</i> ^e	8 3 0	0 2 1	38 86 90	0 98 66	8 8 93 8 1	65 1 7 3 6	
<i>Cr. laurentii</i>	4 0 1	0 0 0	1 81 77	0 91 16	8 8 85 9 8	8 5 4	
<i>Cr. neoformans</i>	6 8 1 4 4	5 1 3 1	15 12 36	0 0 0	1 1 9 8	1 2 2	
<i>Cr. terreus</i>	0 0 0	0 0 0	0 0 19	0 98 0	7 4 70 7 0	98 6 2 6 1	
<i>Cr. uniguttulatus</i>	2 2 2	2 0 2	1 1 96	2 8 13	2 3 19 9 9	95 2 3 5 9	
<i>Geotrichum</i> spp.	2 0 0	0 0 2	0 0 84	0 0 71	1 0 1	0 9 6 0 1	
<i>Hanseniaspora guilliermondii / uvarum</i>	9 8 0 0	0 5 2	0 2 98	0 0 81	0 1 0	1 1 2 6	
<i>Hansenula wingei</i>	9 8 0 0	0 0 2	1 90 97	0 0 90	9 0 93 0	13 9 2 0 4	
<i>Kluyveromyces</i> spp.	9 8 2 9 8	2 9 2 6	0 13 7	0 0 0	6 2 0	55 3 3 7	
<i>Pichia anomala</i> ^f	9 9 2 9 6	1 9 2 4	0 90 98	0 0 82	8 6 88 2	1 3 7 1	
<i>Prototheca wickerhamii</i>	9 8 7 8 6 5	9 2 7 4 6 4	0 1 0	0 0 0	6 6 90 1	90 8 3	
<i>P. zopfii</i>	9 8 7 8 0 0	6 3 7 1 8	0 0 2	0 0 1	9 0 1 0	3 1 5	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1 1 1	1 1 3 3	0 34 0	0 1 33	2 1 9 9	96 5 3	
<i>R. minuta</i>	2 2 2	2 1 3 8	3 90 81	0 2 88	2 3 2 9 8	29 7 2 1	
<i>R. rubra</i>	9 6 5	3 2 4 6	0 64 2	0 0 0	2 8 26 9 7	99 7 6 1 2	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9 8 2 9 6	1 9 2	1 85 82	5 9 1	3 1 1	1 6 4 6 4	
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	0 0 0	0 0 0	11 0 0	0 0 0	0 0 9 7	98 8 9 8 6	
<i>Trichosporon beigellii</i>	5 0 1	1 0 4 7	79 46 93	0 71 58	6 0 64 7 8	43 4 6 7 2	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	0 0 0	0 0 9 5	0 0 32	0 0 1	7 3 61 3	98 9 8 0 6	

^a Denominado anteriormente *Torulopsis candida*

^b Denominado anteriormente *Torulopsis glabrata*

^c Denominado anteriormente *Candida pseudotropicalis*

^d Incluye la especie denominada anteriormente *Candida paratropicalis*

^e Denominado anteriormente *Candida humicola*

^f Denominado anteriormente *Hansenula anomala*

^g Se ha informado que *Candida dubliniensis* produce patrones de reacción bioquímica similares a *C. albicans*. Dado que el diagrama diferencial RapID Yeast Plus no incluye *C. dubliniensis*, es necesario realizar más pruebas para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*. Consulte las referencias correspondientes para obtener más instrucciones.^{11,12,19,20}

8.2. RESULTADOS KIT REMEL

remel		RapID™ Yeast Plus														Report Form				
Reference # / No. de référence / Referenz-Nr. / Riferimento N. / N° de referencia		Cepa Consuelo																		
Date / Date / Datum / Data / Fecha		9 - Junio - 17																		
Tech / Tech / Techn. / Tech / Tec																				
Source / Source / Quelle / Origine / Origen																				
Reagent / Réactif / Reagenz / Reagente / Reactivo	None / Aucun / Keine, Nessuno / Ninguno	RapID Yeast Plus Reagent A / Réactif A RapID Yeast Plus / RapID Yeast Plus Reagents A / RapID Yeast Plus Reagent A / Reactivo RapID Yeast Plus A														None / Aucun / Keine, Nessuno / Ninguno	RapID Yeast Plus Reagent B / Réactif B RapID Yeast Plus / RapID Yeast Plus Reagents B / RapID Yeast Plus Reagent B / Reactivo RapID Yeast Plus B			
Positive Reactions Réactions positives Positive Reaktionen Reazioni positive Reacciones positivas	Yellow Jaune Gelb Giallo Amarillo	Yellow Jaune Gelb Giallo Amarillo														Red or Dark red-orange Rouge ou rouge orangé foncé Rot oder dunkles Rotorange Rosso o rosso-arancione scuro Rojo o rojo-naranja oscuro	Purple, red, or dark pink Violeté, rouge ou rose foncé Purpur, rot oder dunkelrosa Porpora, rosso o rosa scuro Morado, rojo o rosa oscuro			
Cavity #, No. cavité / Kammer-Nr. / Cavità N. / N° de cavidad	1 2 3 4 5 6	7 8 9 10 11 12 13 14	15	16	17	18														
Test Code Code du test Testcode Codice esame Código de prueba	GLU MAL SUC TRE RAF LIP	NAGA aGLU BGLU ONPG aGL BFUC PHS POHO	URE	PRO	HIST	LGY														
Value / Valeur / Wert Valore / Valor	1 2 4 1 2 4	1 2 4 1 2 4 1 2	4	1	2	4														
Result / Résultat Ergebnis / Risultato Resultado	0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0 0 1 0	+	+	0	+														
Value Total Total des valeurs Gesamtwert Valore totale Valor total	0	0	2	0	5	5														
IDENTIFICATION / IDENTIFICATION / IDENTIFIZIERUNG / IDENTIFICAZIONE / IDENTIFICACIÓN																				
Microcode																				

REMEl Inc 800-255-6730 Printed in USA 9/03

8.3. FICHA TÉCNICA MENTOL EN CRISTALES

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA**MENTOL CRISTAL**

Sinónimos:	Levomentol. (-)-Mentol. Hexahidrotimol. 3-Mentanol. 2-Isopropil-5-metilciclohexanol. Alcohol mentólico. Alcánfor de menta.
Formula Molecular:	C ₁₀ H ₂₀ O
Peso Molecular:	156,26
Datos Fisico-Químicos:	Cristales brillantes, prismáticos o aciculares, incoloros. Prácticamente insoluble en agua, muy soluble en etanol al 96%, y petróleo ligero, fácilmente soluble en aceites grasos, y parafina líquida, muy poco soluble en glicerol. Punto de fusión: 41 – 44 °C. Rotación óptica: -50° (c=10, etanol).
Propiedades y usos:	<p>El l-mentol, que es la forma natural, se obtiene de la naturaleza a partir de la esencia de varias especies del género <i>Mentha</i> (fam. Labiadas), principalmente <i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha arvensis</i>, o por síntesis en forma levo o racémico (p. ej. se obtiene di-mentol por hidrogenación del timol).</p> <p>Se trata de un agente con acción antiséptica, analgésica local, antiinflamatoria, y antipruriginosa. Al ser aplicado sobre la piel produce un efecto rubefaciente, dando sensación de frío posterior y manifestándose seguidamente la acción analgésica local. Por este motivo se usa como antiprurítico en diversas dermatitis y eczemas asociados a prurito, totales como urticaria, prurito anal, ictericia, etc., en forma de pomadas, champús, cremas, linimentos, soluciones y polvos.</p> <p>Así mismo se emplea en el tratamiento de la alopecia areata, como irritante.</p> <p>También se utiliza vía inhalatoria en el alivio sintomático de bronquitis, sinusitis, y laringitis, por inhalación en pastillas balsámicas o en pomadas con alcánfor y esencia de eucalipto para aplicar sobre el pecho y las ventanas nasales.</p> <p>Suele asociarse junto con queratoplásticos, queratolíticos, protectores y antisépticos.</p> <p>Por vía oral y en pequeñas dosis posee una acción carminativa. Alivia la flatulencia y los cólicos, relajando la musculatura lisa gastrointestinal.</p> <p>Si se prescribe en cápsulas (p. ej. para los síntomas del colon irritable o para espasmos gastrointestinales), éstas han de ser entéricas, y se han de tomar 30-60 min antes de las comidas.</p> <p>El mentol además se usa como un agente saborizante y odorífero en preparados farmacéuticos.</p> <p>Tras la absorción, el mentol se excreta por la orina y la bilis en forma de glucurónido.</p> <p>En cuanto al mecanismo de acción, se ha sugerido que los beneficios aparentes del mentol en la congestión nasal pueden deberse a un efecto sobre los canales de calcio en los nervios sensitivos. Este mecanismo se ha invocado también para explicar</p>

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

su acción relajante muscular (como aceite de menta) sobre el aparato digestivo. El efecto frío se produce por interacción con los receptores de frío de la piel.

Dosificación:	<p>-Vía tópica al 0,1 – 2 % en dermatitis y eczemas asociados a prurito, picaduras de insectos, etc...; hasta el 10 % en contusiones, torceduras, esguinces, dolores reumáticos, neuralgias, etc...; y hasta el 16% como irritante para el tratamiento alopecia areata. También se ha usado en soluciones oleosas al 20 – 40 %.</p> <p>-Vía inhalatoria en soluciones para inhalaciones o pulverizaciones hasta el 10%.</p> <p>-En preparaciones para vía oral, al 0,003% en suspensiones, al 0,005 – 0,015 % en jarabes, y al 0,2 – 0,4 % en comprimidos.</p> <p>-En productos cosméticos tópicos, al 0,1 – 2,0 %.</p>
Efectos secundarios:	<p>El mentol puede causar reacciones de hipersensibilidad, incluyendo dermatitis de contacto.</p> <p>También se ha observado apnea y colapso instantáneo en niños después de la aplicación sobre las ventanas nasales.</p> <p>La ingestión de mentol causa dolor abdominal grave, náuseas, vómitos, vértigo, ataxia, somnolencia y coma.</p>
Contraindicaciones:	<p>Niños menores de 2 años.</p> <p>Aplicación sobre heridas abiertas y mucosas.</p>
Precauciones:	<p>Es peligroso aplicar pomadas que contengan mentol en las fosas nasales de los niños, puede causar inmediatamente colapso; las gotas nasales que contengan mentol pueden causar el mismo efecto.</p>
Incompatibilidades:	<p>Agentes oxidantes (permanganato potásico, trióxido de cromo ...).</p>
Observaciones:	<p>Produce una mezcla líquida o pastosa (mezclas eutécticas) triturado con alcánfor, fenol, fenacetina, cloral hidratado, betanaftol, resorcinol, timol, pirogalol, pirocatecol, y carbonato de etilo.</p>
Conservación:	<p>En envases bien cerrados. PROTEGER DE LA LUZ.</p>
Ejemplos de formulación:	<p>Solución hidroalcohólica con mentol</p> <p>Mentol 1,5 g Acido salicílico 3 g Resorcina 3 g Agua purificada 140 ml Alcohol 96° 160 ml</p> <p>Modus operandi:</p> <p>Disolver el mentol, el ácido salicílico y la resorcina, cada uno por separado en el alcohol. Mezclar cada una de las disoluciones y</p>

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

añadir el agua destilada. Envasar en frascos de cristal topacio.

Crema con mentol y urea

Mentol	1 g
Urea	5 g
Crema evanescente c.s.p.	100 g

Modus operandi:

Preparar la crema según el procedimiento general de elaboración de emulsiones, disolviendo la urea en el agua. Triturar bien y humectar el mentol con un poco de glicerina, y añadir la crema en pequeñas proporciones homogeneizando bien con el pistilo.

Talco alcanforado y mentolado

Mentol	0,1 g
Alcanfor	0,1 g
Talco	100 g

Modus operandi:

Mezclar el mentol y el alcanfor en mortero hasta que licúen los dos juntos. Poner un poco del talco pesado en el mortero. Añadir unas gotas de alcohol si es necesario. Ir incorporando el talco en pequeñas cantidades y homogeneizar bien con la mano de mortero.

Bibliografía:

- Martindale, *Guía completa de consulta farmacoterapéutica*, 1ª ed. (2003).
- *The Merck Index*, 13ª ed. (2001).
- *Monografías Farmacéuticas*, C.O.F. de Alicante (1998).
- *La Formulación Magistral en la Oficina de Farmacia*, M.ª José Llopis Clavijo y Vicent Baixauli Comes (2007).
- *Formulario Magistral del C.O.F. de Murcia* (1997).
- *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6ª ed., 2009.