

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Optimización de parámetros para la producción
de aceite unicelular a partir de levaduras
oleaginosas nativas. Ayacucho - Perú**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA, EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Bach. YAURI HUAMAN, YESSENIA

ASESOR:

Blga. GARCÍA GODOS ALCÁZAR, Paula

AYACUCHO - PERÚ

2023

Con todo mi amor a mi familia: mis padres, Nelson Yauri y Olga Huamán quienes con su apoyo incondicional hacen posible día a día el logro de mis metas académicas y personales; a mi hermana Ángela por ser una hermosa compañera de vida.

Con admiración y gratitud a las personas que contribuyeron con palabras de aliento o invirtieron unos minutos de su valioso tiempo en el proceso de la investigación.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por ser partícipe del desarrollo de nuestra región y país formando profesionales altamente competentes.

A la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme las capacidades para mi formación como profesional.

A la especialidad de Biotecnología de la Escuela Profesional de Biología y a todos sus docentes por compartir conmigo sus conocimientos y consejos que me permitieron ampliar mi perspectiva sobre la ciencia de la vida.

A la Mg. Paula García Godos Alcázar mi infinita gratitud por el asesoramiento, respaldo y constante seguimiento que fue imprescindible para el logro de los objetivos establecidos en la investigación.

Al Mg. Reynán Cóndor Alarcón por el apoyo en la parte estadística cuyas observaciones y correcciones contribuyeron en la materialización de la investigación.

A todas aquellas personas que con su inestimable apoyo contribuyeron en forma directa o indirectamente con la investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Aceite unicelular	4
2.3. Parámetros para la optimización de la producción de aceite unicelular	4
2.3.1. Parámetros nutricionales	4
2.3.2. Parámetros físicos	5
2.4. Levaduras	6
2.5. Levaduras oleaginosas	7
2.6. Metabolismo de los ácidos grasos a partir de levaduras oleaginosas	7
2.6.1. Enzimas de importancia para la producción de aceite unicelular	8
2.6.2. Gotas de lípidos asociadas	9
2.6.3. Perfil de aceite unicelular de levaduras oleaginosas	11
2.7. Morfología de levaduras oleaginosas	11
2.8. Capacidad de levaduras oleaginosas para metabolizar biomasa lignocelulósica	12
2.9. Importancia económica de las levaduras oleaginosas	13
2.10. Fuentes de carbono orgánico para la producción de aceite unicelular	14
2.10.1. Chancaca	14
2.10.2. Melaza	14
2.10.3. Lactosuero	15
2.10.4. Cáscara de tuna (<i>Opuntia ficus indica</i>)	16
2.10.5. Cáscara de plátano (<i>Musa paradisiaca</i>)	16
2.10.6. Cascarilla de quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.)	17
2.11. Colorantes para la identificación de aceite unicelular intracelular	18
2.11.1. Rodamina B	18

2.11.2. Sudan Black B	18
III. MATERIALES Y METODOS	19
3.1. Ubicación	19
3.2. Ubicación de sitios de muestreo	19
3.3. Primera etapa: Aislamiento de levaduras oleaginosas nativas	19
3.3.1. Colecta de fuentes de aislamiento	19
3.3.2. Protocolo de aislamiento de levaduras oleaginosas	20
3.4. Segunda etapa: Determinación de la productividad de aceite unicelular en levaduras aisladas	22
3.4.1. Determinación de biomasa seca	22
3.4.2. Determinación de aceite unicelular	22
3.5. Tercera etapa: Optimización de parámetros para producción de aceite unicelular	23
3.6. Cuarta etapa: Formulación de medio de producción orgánico (MPO)	25
3.6.1. Medio de producción orgánico de lactosuero (MPOL)	25
3.6.2. Medio de producción orgánico de melaza (MPOM)	25
3.6.3. Medio de producción orgánico de chancaca (MPOC)	25
3.6.4. Medio de producción orgánico de cascarilla de quinua (MPOQ)	25
3.6.5. Medio de producción orgánico de cáscara de plátano (MPOP) y medio de producción orgánico de cáscara de tuna (MPOT)	26
3.7. Identificación fisiológica y bioquímica de levaduras	26
3.8. Análisis estadístico	28
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES	49
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales ácidos grasos producidos por las levaduras oleaginosas.	11
Tabla 2. Comparación de la composición de la pared celular entre levaduras no oleaginosas (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) y oleaginosas (<i>Yarrowia lipolytica</i> y <i>Trichosporon cutaneum</i>).	12
Tabla 3. Composición química de la chancaca de cabuya (<i>Agave americana</i>).	14
Tabla 4. Composición química de melaza.	15
Tabla 5. Composición química del suero de leche.	16
Tabla 6. Composición químico bromatológico de la cáscara de <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Miller "tuna", en muestra fresca.	16
Tabla 7. Composición química de la cáscara de plátano.	17
Tabla 8. Composición de carbohidratos de las partes no comestibles de la quinua (% en peso) calculada por balance atómico. Todos los valores están en base seca.	17
Tabla 9. Análisis elemental y aproximado, así como poder calorífico de la cáscara <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	18
Tabla 10. Variables de parámetros nutritivos y físicos para la modificación del medio de producción estándar (MPE). Ayacucho, 2021.	23
Tabla 11. Composición y temperatura de incubación de medios de producción modificados (MPM). Ayacucho, 2021.	24
Tabla 12. Características macroscópicas de colonias de levaduras oleaginosas aisladas en agar Sabouraud a 120 horas de incubación a 28 °C. Ayacucho, 2022.	31
Tabla 13. Identificación de especie de la cepa SM11 mediante claves dicotómicas de Hernansaez Meoro, 1962, pruebas de fermentación y asimilación de azúcares a 28 días de incubación en medio basal de fermentación a 28 °C. Ayacucho, 2022.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales rutas bioquímicas de síntesis de lípidos <i>in novo</i> en levaduras oleaginosas.	10
Figura 2. Productividad de aceite unicelular a partir de cepas de levaduras oleaginosas aisladas de fuentes naturales, incubadas en medio de producción estándar (MPE) a 120 horas en 28 °C. Ayacucho, 2022.	32
Figura 3. Productividad de aceite unicelular (%) en la cepa SM11, incubada en diferentes medios de producción modificados (MPM) durante 192 horas a 28 °C y 35 °C. Ayacucho, 2022.	33
Figura 4. Productividad de aceite unicelular (%) de la cepa SM11 en medios de producción modificados usando diferentes relaciones C/N, incubadas durante 192 horas a 28 °C y 35 °C. Ayacucho, 2022.	34
Figura 5. Productividad de aceite unicelular (%) de la cepa SM11, incubada en los medios de producción con suplementos orgánicos (MPO) durante 192 horas a 35 °C. Ayacucho, 2022.	35
Figura 6. Comparación de productividad de aceite unicelular (%) de la cepa SM11 incubada en el MPE, MPM 24 y MPOP durante 192 horas a 35 °C. Ayacucho, 2022.	36
Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SM11. Ayacucho, 2022.	38

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Flujograma de investigación. Ayacucho, 2021.	61
Anexo 2. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas de levaduras oleaginosas aislada incubadas en medio de selección de levaduras oleaginosas, agar Sabouraud y medio de producción estándar, incubadas durante 120 horas a 28 °C. Ayacucho, 2021.	62
Anexo 3. Zona de colecta de suelos de cultivo de palta en el distrito de Luricocha de la provincia de Huanta. Ayacucho, 2021.	78
Anexo 4. Zona de colecta de suelos de mecánicas automotrices distrito de Jesús Nazareno, provincia de Huamanga. Ayacucho, 2021.	79
Anexo 5. Composición del medio enriquecido con glicerol.	80
Anexo 6. Composición de medio limitado en nitrógeno suplementado con Rodamina B y cloranfenicol. Agar de selección de levaduras oleaginosas.	80
Anexo 7. Composición de agar YPD (Yeast Growth Medium). Medio de almacenamiento.	80
Anexo 8. Composición de agar Sabouraud.	80
Anexo 9. Composición de medio de producción estándar (MPE).	80
Anexo 10. Composición de medio de activación.	81
Anexo 11. Composición de agar YM (Yeast Medium).	81
Anexo 12. Composición de medio basal de fermentación	81
Anexo 13. Composición de solución base de azul de bromotimol.	81
Anexo 14. Análisis cualitativo de colonias de levaduras oleaginosas cultivadas en agar de selección de levaduras oleaginosas.	82
Anexo 15. Fases formadas por metanol y cloroformo para la extracción de aceite unicelular. Ayacucho, 2022.	83
Anexo 16. Cálculo de relación carbono/nitrógeno (C/N) de medios de cultivo de acuerdo a su composición.	84
Anexo 17. Preparación y uso del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) para determinación de azúcares reductores totales.	85
Anexo 18. Ensayo de fermentación y asimilación de azúcares con la cepa de levadura oleaginosa SM11 a 28 días de incubación a 20 °C en medio basal de fermentación. Ayacucho, 2022.	86

Anexo 19.	Análisis de varianza y prueba de contraste Tukey del porcentaje de productividad de aceite unicelular de cepas de levaduras oleaginosas aisladas, a 120 horas de incubación a 28 °C. Ayacucho, 2022.	87
Anexo 20.	Análisis de varianza y prueba de contraste Tukey del porcentaje de productividad de aceite unicelular de cepa de levadura oleaginosa SM11, a 192 horas de incubación a 28 °C en diferentes medios de producción optimizado. Ayacucho, 2022.	88
Anexo 21.	Análisis de varianza y prueba de contraste Tukey del porcentaje de productividad de aceite unicelular de cepa de levadura oleaginosa SM11 de acuerdo a la relación C/N, a 192 horas de incubación a 28 °C en diferentes medios de producción optimizado. Ayacucho, 2022.	90
Anexo 22.	Análisis de varianza y prueba de contraste Tukey del porcentaje de productividad de aceite unicelular de cepa de levadura oleaginosa SM11 en medios de producción orgánicos, a 192 horas de incubación a 28 °C. Ayacucho, 2022.	91
Anexo 23.	Características culturales de colonias microbianas.	92
Anexo 24.	Características químicas los medios de producción y porcentaje de productividad de aceite unicelular en la cepa SM11, incubada en los diferentes medios de producción orgánicos durante 192 horas a 28 °C y 35 °C. Ayacucho, 2022.	93
Anexo 25.	Identificación de especies del género <i>Rhodotorula</i> , mediante el método de asimilación de azúcares.	94
Anexo 26.	Identificación de especies del género <i>Rhodotorula</i> .	95
Anexo 27.	Matriz de consistencia	96

RESUMEN

El aceite unicelular sintetizado por levaduras oleaginosas es capaz de sustituir a los aceites vegetales; sin embargo, su producción es muy costosa; por ello, la investigación planteó como objetivo la optimización de los principales parámetros de cultivo para la producción de aceite unicelular en levaduras oleaginosas aisladas de diferentes fuentes de la región de Ayacucho. En la primera etapa se usó agar de selección de levaduras oleaginosas suplementado con Rodamina B y cloranfenicol para el aislamiento. En la segunda etapa se determinó la productividad de aceite unicelular de cada cepa aislada; para ello se cuantificó la biomasa seca y se extrajo el aceite unicelular con el método de Bligh y Dyer. En la tercera etapa se evaluó la productividad de aceite unicelular en medios de cultivo con diferentes parámetros nutritivos y físicos: concentración de glucosa (40 y 75 g/L), fuente de nitrógeno (orgánico e inorgánico), temperatura de incubación (28 y 35 °C) y pH (5,5; 6,0 y 6,5). En la cuarta etapa se evaluaron fuentes orgánicas de carbono: chancaca, melaza, lactosuero, cascarilla de quinua, cáscara de tuna y cáscara de plátano; y se realizó la identificación de la cepa más productiva mediante la prueba de fermentación y asimilación de azúcares. Como resultado se aislaron 15 cepas de levaduras oleaginosas a partir de muestras de suelo de cultivo de palta y mecánicas automotrices, semillas de cacao orgánico y quesos artesanales; se eligió a la cepa SM11 por tener 37,5 % de productividad de aceite unicelular; al optimizar los parámetros se incrementó hasta 73,67 % con el medio de producción modificado 24 y 54,76 % con el medio de producción orgánico de cáscara de plátano. Esta cepa fue identificada como *Rhodotorula mucilaginosa* SM11. Los resultados describen a una cepa de levadura oleaginosa con alto potencial para fines biotecnológicos y los parámetros óptimos para maximizar su productividad.

Palabras clave: aceite unicelular, levadura oleaginosa, optimización, parámetros.

I. INTRODUCCIÓN

El requerimiento de aceite vegetales a nivel global ha ido incrementando año tras año debido a que las aplicaciones de esta materia no se limitan a la industria alimentaria (Vasconcelos et al., 2019). Para satisfacer esta demanda se vienen ocasionando graves problemas ambientales como el perjuicio de la biodiversidad por el incremento de la deforestación de bosques (García Bustamante, 2013) o la disminución de la superficie de campos de cultivo destinados inicialmente para la alimentación (Shaigani et al., 2021).

El aceite unicelular representa una alternativa esperanzadora para satisfacer de forma sostenible y renovable la futura demanda de aceites, destacando el producido por levaduras oleaginosas (Abeln y Chuck, 2021) que se caracterizan por su corto ciclo biológico que no depende de limitaciones geográficas, estacionales o climáticas, su capacidad de convertir sustratos baratos en aceites de alto valor (Shaigani et al., 2021) debido a que se adaptan al uso de diferentes fuentes de carbono y la composición del perfil lipídico es variable en cada especie (Corpas-Rodríguez et al., 2020); por otro lado, la resistencia a bajas condiciones de oxígeno, la capacidad de ser cultivadas a alta densidades sin generar endotoxinas y la información disponible para incrementar su productividad mediante técnicas de ingeniería genética (Gosalawit et al., 2021), las hace candidatas idóneas para la producción a escala industrial.

Sin embargo, el aceite unicelular aún no es una solución tangible debido a que los rendimientos son bajos (Shaigani et al., 2021) y la producción es mucho más costosa que los aceites tradicionales (Ayadi et al., 2018), por lo que es indispensable la identificación de nuevas cepas altamente productivas, resistentes a contaminantes e inhibidores microbianos y que puedan adaptarse a diversos sustratos y condiciones extremas (Ayadi et al., 2018), lo que permitirá la producción en cada lugar del mundo utilizando la especie de levadura más

adecuada para la zona y el uso de la fuente de carbono que más abunde en dicha región (Vasconcelos et al., 2019). Es por ello que la investigación tiene los siguientes objetivos:

Objetivo general

Optimizar parámetros para la producción de aceite unicelular a partir de levaduras oleaginosas nativas de la región de Ayacucho.

Objetivos específicos

1. Aislar cepas de levaduras oleaginosas de diferentes fuentes de la región de Ayacucho.
2. Caracterizar macroscópica y microscópicamente las levaduras oleaginosas aisladas.
3. Determinar la productividad de aceite unicelular de las cepas de levaduras oleaginosas aisladas.
4. Evaluar el efecto de parámetros nutricionales y físicos en la productividad de aceite unicelular de levaduras oleaginosas.
5. Evaluar la productividad de levaduras oleaginosas en condiciones óptimas de cultivo.
6. Evaluar la productividad de levaduras oleaginosas a condiciones óptimas de medio de cultivo con suplementos orgánicos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Gosalawit et al. (2021) aislaron 67 cepas de levaduras oleaginosas a partir de semillas de ricino; mientras que Kunthiphun et al. (2018) lograron aislar un total de 198 levaduras de 140 muestras recolectadas en siete bosques de manglares en cuatro provincias de Tailandia concluyendo que pertenecían a 30 géneros, 45 especies oleaginosas conocidas y al menos 12 especies nuevas.

Para aprovechar la máxima productividad de aceite unicelular de cada cepa de levadura oleaginosa se requiere de la optimización de medios de cultivo, como en la investigación de Kitcha y Cheirsilp (2011) en el que evaluaron diferentes medios de cultivo para inducir la mayor producción de biomasa y aceite unicelular en *Trichosporonoides spathulata* y *Kodamaea ohmeri* al usar fuentes de nitrógeno orgánico con una mezcla de extracto de levadura y peptona (1:1) e inorgánicas con sulfato de amonio, concluyendo que la mejor relación C/N para ambas especies era 17:1 con un medio óptimo que contenía 0,5 % de sulfato de amonio y 10 % de glicerol; por otro lado, Brandenburg et al. (2021) demostraron que siete cepas de *Rhodotorula* estudiadas, a pesar de ser del mismo género tuvieron un comportamiento diverso ya que algunas metabolizaban xilosa mientras que otras no, notándose diferencias en el crecimiento, esto se fundamentó en que no todas las levaduras responden igual a nutrientes limitantes en el medio y se requiere evaluar cada caso (Leveau y Bouix, 2000).

Siguiendo la tendencia de optimización de medios de cultivo, es necesario obtener formulados económicos y son los subproductos biológicos potenciales fuentes de carbono para dichos fines (Shaigani et al., 2021), por ejemplo Pan et al. (2009) proponen como una fuente de carbohidratos económica a los materiales lignocelulósicos, que pueden ser hidrolizados hasta obtener glucosa, xilosa y ácidos orgánicos (Brandenburg et al., 2021); esta idea que es respaldada por

Huang et al. (2013), que proponen el uso de materiales lignocelulósicos como mazorcas de maíz, bagazo de sorgo dulce, almidón de mandioca, paja de arroz y de trigo; en relación con ello, Shaigani et al. (2021) lograron mayores rendimientos de biomasa y lípidos en *Cutaneotrichosporon oleaginous* usando hidrolizados de paja de trigo y algas pardas, generando 7,5 g/L y 3,8 g/L de aceite unicelular respectivamente; mientras que Khot y Ghosh (2017) informaron que a escala de laboratorio, se ha empleado el uso de residuos industriales no pretratados como glicerol crudo, lactosuero, melaza, aguas residuales, entre otros; demostrando la capacidad de las levaduras oleaginosas para adaptarse a diferentes fuentes de carbono sin perder su capacidad productiva de aceite unicelular.

2.2. Aceite unicelular

Los lípidos producidos por microorganismos oleaginosos son denominados como aceites microbianos, lípidos microbianos, aceite unicelular o SCO por las siglas del término en inglés “Single Cell Oil” (Abeln y Chuck, 2021), los cuales han despertado interés desde 1980 con el intento de producir una alternativa para obtener los componentes de la manteca de cacao (Huang et al., 2013) y en la actualidad se ha recobrado el interés por su uso debido que es una materia prima renovable y sostenible (Ayadi et al., 2018).

2.3. Parámetros para la optimización de la producción de aceite unicelular

La productividad depende necesariamente de características del medio de cultivo; como la fuente de nitrógeno y carbono, sales inorgánicas, las correctas concentraciones de cada elemento del medio de cultivo, la relación entre el nitrógeno y oxígeno, la tasa de aireación, la identificación de inhibidores de crecimiento; y además, se debe tener en consideración que el efecto de cada parámetro varía de acuerdo a la fase de crecimiento en el que se encuentre la célula (Fakankun et al., 2019).

2.3.1. Parámetros nutricionales

Fuente de carbono

Aunque las levaduras son microorganismos quimiorganotróficos capaces de metabolizar diferentes fuentes de carbono (Walker, 2009), solo algunas son capaces de asimilar una amplia gama de estos compuestos carbonados mientras que otras son más selectivas (Leveau y Bouix, 2000). Es por ello que la fuente de carbono es un parámetro que influye directamente sobre la síntesis de aceite unicelular en cada especie (Enshaeieh et al., 2012). Los tipos de carbohidratos más usados por las levaduras para el crecimiento celular y la productividad son

las hexosas, los disacáridos y trisacáridos; pero recientes investigaciones están en búsqueda de cepas capaces de metabolizar glúcidos más abundantes y económicos como las pentosas y polisacáridos (Leveau y Bouix, 2000), sin embargo la glucosa es el carbohidrato más comúnmente usado (Fakankun et al., 2019). Debido a que la fuente de carbono es el principal factor de encarecimiento de la producción (Schneider et al., 2013), con la finalidad de optimizar la productividad de aceite unicelular y disminuir costos de producción, se recomienda emplear fuentes de carbono que sean subproductos de la agricultura o industria (Fakankun et al., 2019).

Fuente de nitrógeno

Es el segundo parámetro nutricional más influyente del medio de cultivo, que debe encontrarse en condiciones limitantes cuando la población celular se encuentre en la fase estacionaria (Zweytick et al., 2000), mientras que para el crecimiento óptimo las concentraciones deberán ser adecuadas y suficientes para posibilitar la división celular (Banerjee et al., 2020).

Puede provenir de diferentes fuentes orgánicas o inorgánicas, como por ejemplo cloruro amónico, nitrato amónico, fosfato amónico, sulfato amónico, que pueden ser metabolizadas por la mayoría de levaduras oleaginosas; sin embargo, algunas especies de los géneros *Hansenula*, *Pachysolen*, *Citeromyces*, *Candida* y *Trichosporon* también tienen la capacidad de usar nitritos y nitratos. Cuando en un medio de cultivo se encuentran diferentes fuentes de nitrógeno no todas serán metabolizadas de forma paralela y a la misma velocidad ya que la célula usualmente tiene preferencia por alguna de ellas e irá usando las demás fuentes de nitrógeno a medida que la “preferida” se vaya agotando. Las características que debe tener una adecuada fuente de nitrógeno son la rapidez de penetración en la célula, que no genere algún tipo de toxicidad y la capacidad de la levadura para metabolizarlo en menor número de reacciones químicas (Leveau y Bouix, 2000).

2.3.2. Parámetros físicos

Temperatura de incubación

La temperatura mínima para el cultivo de levaduras es 20 °C y la máxima a 50 °C; pero la mayoría de cepas industriales y de laboratorio se cultivan entre 25 a 30 °C (Walker 2009), pero no significa que sean las temperaturas óptimas de crecimiento (Leveau y Bouix, 2000). Las células son más susceptibles a la termodestrucción cuando el cultivo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento que cuando

se encuentra en la fase estacionaria, por lo que se debe tener cuidado con la elección de la temperatura de incubación ya que la termodestrucción celular inicia a los 52 °C y que al superar los límites aceptados por la célula se pueden generar modificaciones en el proteoma y hasta inclusive mutaciones (Leveau y Bouix, 2000).

pH

La mayoría de levaduras oleaginosas tienen tendencia a ser acidófilas (Abeln y Chuck, 2020); pero teóricamente pueden tolerar valores de pH entre 2,4 y 8,6 sin generar variaciones de pH intracelular en más de 5,8 y 6,8 (Leveau y Bouix, 2000); se reproducen adecuadamente entre pH 4,5 y 6,5 (Walker, 2009), aunque algunas pueden ser cultivada entre pH 3 y 7 sin que su productividad se vea afectada, incluso se ha reportado especies nativas como *Metschnikowia pulcherrima* que tiene la capacidad de continuar produciendo aceite unicelular a un pH inferior a 2 (Abeln y Chuck, 2020).

2.4. Levaduras

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares que pertenecen al Reino Fungi, se caracterizan por reproducirse de forma asexual, aunque algunas forman estructuras sexuales son incapaces de formar cuerpos fructíferos (Hittinger et al., 2015; Kurtzman, 1994); principalmente se reproducen por gemación como células independientes y en ocasiones por fisión; sin embargo, pueden formar filamentos bajo condiciones especiales del medio (Corpas-Rodríguez et al., 2020; Walker, 2009). Son pleomórficas, pudiendo tener forma esférica, elíptica o alargada, miden entre 5 a 10 µm aproximadamente y su estructura intracelular está compuesta por casi todos los orgánulos de una célula eucariota madura, tales como el aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplásmico, vacuolas, citoesqueleto y poseen genomas pequeños de aproximadamente entre 10 a 20 Mpb (Hittinger et al., 2015; Montes de Oca et al., 2016). Al ser cultivadas en medios sintéticos, las colonias tienden a ser húmedas o mucoides (Samanta, 2015). Las tres Divisiones de hongos a los que se incluye a las levaduras son: Ascomycota, Basidiomycota y Deuteromycota (Leveau y Bouix, 2000). Su hábitat es variable, se pueden encontrar en todos los biomas y continentes, por lo que muchas especies aún siguen siendo desconocidas al igual que sus capacidades metabólicas (Hittinger et al., 2015). La forma de poder clasificarlas e identificarlas es mediante métodos que pongan a prueba su fisiología, inmunología, morfología y actualmente mediante técnicas de biología molecular (Montes de Oca et al., 2016).

2.5. Levaduras oleaginosas

El término “oleaginoso” deriva del vocablo en latín *olea* que significa olivo haciendo alusión a la característica aceitosa o productiva de aceite (Chattopadhyay y Maiti, 2021), por ello se consideran como levaduras oleaginosas a aquellas que tienen la capacidad de sintetizar y acumular aceites en una proporción igual o mayor al 20 % de su biomasa celular seca (Khot et al., 2020; Pan et al., 2009). Sin embargo, su característica predominante es que poseen un sistema enzimático especializado que promueve la biosíntesis y la regulación de los ácidos grasos en sus estructuras lipídicas destacando especies como *Rhodotorula toruloides* que posee una enzima sintetasa de ácidos grasos exclusiva de esta especie o *Aureobasidium melanogenum* que posee una enzima policétido sintasa altamente reductora relacionada con la biosíntesis de ácidos grasos hidroxilados (Xue et al., 2018). Los principales géneros de levaduras oleaginosas identificados hasta el momento son *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* y *Lipomyces* (Pan et al., 2009).

2.6. Metabolismo de los ácidos grasos a partir de levaduras oleaginosas

El metabolismo de los ácidos grasos en organismos eucariotas ha ido evolucionando en forma de redes metabólicas complejas dirigidas por enzimas singulares y específicas a cada especie (Sreeharsha y Mohan, 2020). Sin embargo, se describen diferencias metabólicas evidentes entre levaduras oleaginosas y no oleaginosas, principalmente en las rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos y las enzimas asociadas a dichos procesos (Sreeharsha y Mohan, 2020), destacando las levaduras rojas que son consideradas como las mejores productoras de aceite unicelular (Xue et al., 2018). Las levaduras oleaginosas pueden producir ácidos grasos a través de dos vías principales: la vía anabólica *de novo* y *ex novo*. En la primera, la molécula acetil CoA es generada por glucólisis o el metabolismo del piruvato y/o citrato, esta última mediada por la enzima adenosina trifosfato citrato liasa exclusiva de este tipo de levaduras. La ruta *ex novo*, actúa mediante la asimilación de ácidos grasos exógenos disponibles en el medio que pueden ser transportados a través de las membranas celulares, los cuales serán catabolizados en acil CoA y acetil CoA y serán metabolizados por acil CoA oxidasa mediante la vía de beta oxidación, la ruta *ex novo* permite mejorar fuentes de aceites y lípidos de poco valor económico (Abeln y Chuck, 2021).

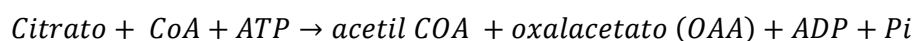
En ambas vías metabólicas, la molécula acetil CoA, actúa como precursora de todas las rutas metabólicas de biosíntesis de lípidos al relacionarlas con el

metabolismo central del carbono (Piškur y Compagno, 2014). Cuando la célula se encuentra en un medio de cultivo con concentraciones bajas de nitrógeno, se genera la disminución o incluso la nulidad de concentración de la nicotinamida adenina dinucleótido isocitrato deshidrogenasa (NAD-IDH), alterando el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), deteniendo la síntesis de proteínas y activando la acumulación de lípidos (Pan et al., 2009).

Existen diversos genes asociados a la síntesis de ácidos grasos que están regulados por el complejo de la enzima málica citosólica (ME), ATP-citrato liasa (ACL), acetil CoA carboxilasa (ACC) y ácido graso sintasa (FAS) (Xue et al., 2018). La biosíntesis de ácidos grasos *in novo* se realiza y en el retículo endoplasmático, en el golgiso y principalmente en las mitocondrias, que son organelas que cuentan con un sistema independiente de síntesis de ácidos grasos (Piškur y Compagno, 2014), produciendo cadenas carbonadas de longitud C18, que son trasladadas al retículo endoplasmático en donde serán alargadas y desaturadas; para ello se requiere como sustrato a moléculas de acetil-CoA, generadas en el ciclo mitocondrial y de los ácidos tricarboxílicos (TCA), teniendo en cuenta que en levaduras no oleaginosas, acetil-CoA es derivada del acetato debido a la acción de la enzima acetil-CoA sintasa (ACS), a la vez que el acetato es producto de la transformación del piruvato, producto final de la glucólisis; mientras que en levaduras oleaginosas se tiene al citrato como precursor adicional que es metabolizado por la enzima ATP-citrato liasa (ACL) (Chattopadhyay y Maiti, 2021).

2.6.1. Enzimas de importancia para la producción de aceite unicelular

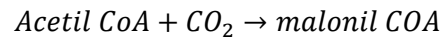
- **ATP-citrato liasa (ACL).** Exclusiva de levaduras oleaginosas y actúa en condiciones de nitrógeno limitado (Xue et al., 2018) generando la siguiente reacción química:



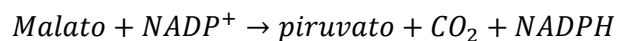
ACL, convierte a las moléculas de citrato en acetil CoA, el citrato se transfiere desde el mitosol donde se realiza el ciclo de Krebs hasta el citosol mediante la lanzadera malato-citrato (Xue et al., 2018), que conjuntamente con proteínas mitocondriales transportadoras de citrato (MC), como por ejemplo YIYHM2 y YICTP1; de esta forma se logra el incremento de la síntesis de acetil CoA generando su abastecimiento continuo para la producción de aceite unicelular (Yuzbasheva et al., 2019)

- **Acetil-CoA carboxilasa (ACC).** Exclusiva de levaduras oleaginosas y que puede limitar la velocidad de síntesis de ácidos grasos; actúa en la conversión una molécula de acetil-CoA, que al unirse con una molécula de dióxido de

carbono da como resultado a una molécula de malonil CoA (Tai y Stephanopoulos, 2013); como se muestra en la siguiente ecuación :



- **Ácido graso sintasa (FAS).** El complejo enzimático FAS, incorpora moléculas de acetil-CoA, malonil-CoA, NADPH (Sreeharsha y Mohan, 2020), acetil-CoA carboxilasa (ACC), malonil-CoA ACP transacilasa (MAT), cetosintasa (KS), b-cetoacetil ACP reductasa (KR), B-hidroxiacil ACP deshidratasa (DH) y enoil ACP reductasa (ER) (Xue et al., 2018); las cuales mediante diferentes vías metabólicas generan acil graso ACP, molécula que será transportada al retículo endoplásmico donde será elongada y desaturada por enzimas específicas de cada especie de levadura oleaginosas (Sreeharsha y Mohan, 2020). FAS requiere de gran concentración de moléculas de NADPH, debido a que utiliza dos moléculas de NADPH en donde una es consumida en cada reacción de desaturación de ácidos grasos y para compensar el requerimiento de NADPH, estos son generados en la vía de las pentosas fosfato (PPP) en donde intervienen las enzimas glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, la 6 fosfogluconato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa (Sreeharsha y Mohan, 2020).
- **Enzima málica citosólica (ME).** Actúa limitando la velocidad involucrada en la transformación de L-malato en ácidos pirúvicos y la liberación de CO₂ a partir de la utilización de NADP⁺, produciendo un flujo continuo de NADPH necesario para la biosíntesis de ácidos grasos (Sreeharsha y Mohan, 2020), como se muestra en la reacción:



2.6.2. Gotas de lípidos asociadas

La excesiva concentración de ácidos grasos intracelulares podría ocasionar citotoxicidad en la célula; para evitarlo, los ácidos grasos neutros producidos, son asociados a moléculas más complejas como los triacilgliceroles (TAG), fosfolípidos o ésteres de esteroides (SE), y son almacenados en forma de gotitas de lípidos (LD), que están protegidas de la acción de las lipasas y a su vez están asociadas a una gran variedad de proteínas específicas de cada especie de levadura oleaginosas, que actúan facilitando la reserva y la liberación gradual y controlada de ácidos grasos; por lo tanto estas proteínas asociadas tienen la capacidad de determinar la capacidad oleaginosas (Sreeharsha y Mohan, 2020). Al ser los triacilgliceroles y esteroides los principales lípidos sintetizados por las levaduras oleaginosas, en su mayoría, son acumulados en los LD (Wang et al., 2015).

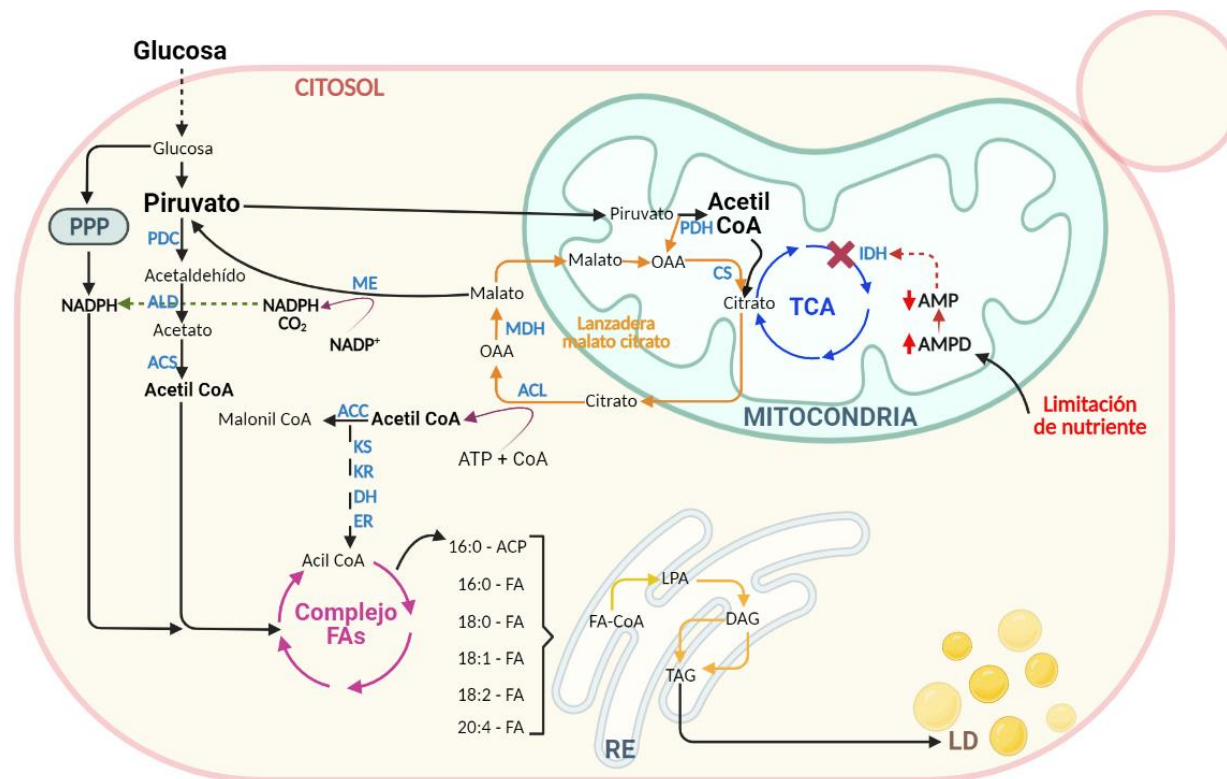


Figura 1. Principales rutas bioquímicas de síntesis de lípidos *in novo* en levaduras oleaginosas.

Acetil CoA es la molécula precursora de las principales rutas metabólicas de síntesis de ácidos grasos en levaduras oleaginosas, se genera por glucólisis o el metabolismo del piruvato y/o citrato. En la mitocondria, en condiciones de limitación de nutrientes se incrementa la actividad de AMPD generando la reducción del nivel de AMP mitocondrial y en consecuencia la disminución de la actividad de IDH lo que induce a la acumulación de citrato, que se transporta al citosol a través de la lanzadera de malato citrato mediada por la enzima ACL y se induce a la síntesis de acetil CoA. Por otro lado, la enzima ACC, convierte la molécula de acetil CoA en malonil CoA para luego ser metabolizada en el complejo FAS que incorpora la acción de las enzimas KS, KR, DH y ER que mediante diferentes vías metabólicas generan acil graso ACP; sin embargo, FAS requiere de alta concentración de NADPH que son generados en la PPP y la enzima ME que limita la velocidad de la transformación de L-malato en ácidos pirúvicos y produce un flujo continuo de NADPH. Los procesos finales de la síntesis de TAG se realizan en el RE y son almacenados en forma LD.

Nota. Adaptado de "Fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications" (p. 4), por Xue, S.J. et al, 2018, *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(7) y "Lipid production by oleaginous yeasts" (p. 14), por Chattopadhyay, A. y Maiti, M. K, 2021, *Advances in Applied Microbiology*.

Abreviaturas → **ACP:** Proteína transportadora de acilo; **AMP:** Adenosín monofosfato; **AMPD:** Adenosina monofosfato desaminasa; **CoA:** Coenzima A; **DAG:** Diacilglicerol; **FA:** Ácidos grasos; **FAS:** Complejo ácido graso sintasa; **LD:** Gotitas de lípidos; **LPA:** Ácido lisofosfatídico; **NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **OAA:** Oxalacetato; **PPP:** Vía de las pentosas fosfato; **RE:** Retículo endoplasmático; **TAG:** Triacilglicerol; **TCA:** Ciclo de los ácidos tricarbóxicos. **Abreviaturas de enzimas** → **ACC:** Acetil-CoA carboxilasa; **ACL:** ATP-citrato liasa; **ACS:** Acetil-CoA sintetasa; **ALD:** Acetaldehído deshidrogenasa; **CS:** Citrato sintasa; **DH:** Deshidratasa; **ER:** Enoil reductasa; **IDH:** Isocitrato deshidrogenasa; **KR:** Cetorreductasa; **KS:** Cetoacil sintasa; **MDH:** Malato deshidrogenasa; **ME:** Enzima málica; **PDC:** Piruvato descarboxilasa; **PDH:** Piruvato deshidrogenasa.

2.6.3. Perfil de aceite unicelular de levaduras oleaginosas

La capacidad oleaginosa varía entre especies y cepas de la misma especie de levaduras (Fakankun et al., 2019); conteniendo en general lípidos C16 como ácido palmítico y C18 como ácido linoleico, oleico o esteárico, con altos porcentajes de ácidos esteáricos y palmíticos (Koutinas y Papanikolaou, 2011) como se presenta en la Tabla 1. Los lípidos almacenados por la célula, comúnmente no son polares, destacando los triacilgliceroles y ésteres de esteroleos; sin embargo el perfil lipídico depende de la especie de levadura oleaginosas, las condiciones del medio de cultivo y el tipo de fuente de carbono (Abeln y Chuck, 2021).

Tabla 1. Principales ácidos grasos producidos por las levaduras oleaginosas.

Ácidos grasos	Estructura química
Palmítico (16:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Esteárico (18:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Oleico (18:1)(n-9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linoleico (18:2)(n-6)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linolénico (18:3)	$(n-3) \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

Fuente: Lin et al. (2011, como se citó en Sha, 2013)

Los perfiles de ácidos grasos de las levaduras oleaginosas son homogéneos al ser producidos en condiciones específicas y controladas; sin embargo, varían de acuerdo a la especie, su ciclo biológico, la fase de crecimiento, los parámetros de cultivo (Khot et al., 2020) y el método de extracción empleado (Khot y Ghosh, 2017). Están compuestos por aproximadamente 150 moléculas diferentes, de los cuales los triacilgliceroles (TAG) son los principales lípidos neutros del aceite unicelular que se encuentran entre el 80 o 90 %, mientras que los ácidos grasos libres (FFA) se encuentran entre el 30 o 40 % (Khot et al., 2020).

2.7. Morfología de levaduras oleaginosas

Por lo general la pared celular de las levaduras está formada por β (1→3)-D-glucano, β (1→6)-D-glucano, manoproteínas y quitina como se conoce en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*; sin embargo, aún no se tiene información detallada sobre la estructura de la pared celular de las levaduras oleaginosas (Khot et al., 2020). La Tabla 2 muestra notables diferencias entre la cantidad de quitina, glucosa y manosa en la composición química de la pared celular de ambos tipos de levaduras. La estructura de la pared celular es variable, dinámica y tiene la capacidad de adaptarse cambios fisiológicos de la célula por lo que el incremento de estos compuestos en las levaduras oleaginosas estaría relacionado con un mecanismo para evitar la lisis celular (Aguilar-Uscanga y

François, 2003). En algunas especies del género *Rhodotorula* (*R. glutinis*, *R. mucilaginosa*, *R. minuta* y *R. pullida*) se ha identificado una cubierta exterior parecida a una cápsula, que rodea a la pared celular con la finalidad de proteger a la célula de la lisis y del estrés ambiental, está formada por ocho compuestos distintos entre los cuales destacan los mananos y fosfomananos; mientras que en levaduras oleaginosas rojas a parte de los componentes generales, contienen también glucomanano (Khot et al., 2020).

Tabla 2. Comparación de la composición de la pared celular entre levaduras no oleaginosas (*Saccharomyces cerevisiae*) y oleaginosas (*Yarrowia lipolytica* y *Trichosporon cutaneum*).

Componente/fracción (% de la masa de la pared)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Y. lipolítica</i>	<i>T. cutaneum</i>
Proteína	13,5	15	11
Carbohidratos neutros (polisacáridos)	85	70	63
Glucosamina (quitina)	3,36	7	9
Fracción soluble en álcali	33,5	38,8	34
Fracción insoluble en álcali	37,3	61,2	44
Composición de monosacáridos (Glucosa + manosa)	80–90+10–20	60+40	32+6

Fuente: Khot et al. (2020)

2.8. Capacidad de levaduras oleaginosas para metabolizar biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es una fuente de carbono renovable, abundante y económica (Grubišić et al., 2022); que estructuralmente es muy compleja ya que está formada por celulosa: 40–80 %, hemicelulosa: 10–40 % y lignina: 5–25 % (Coradini et al., 2015; Qin et al., 2017). Para su uso como sustrato en medios de cultivo requiere de pretratamientos químicos, físicos o biológicos que logren hidrolizar los carbohidratos estructurales y liberar a los azúcares fermentables, sin embargo muchos de esos procesos generan simultáneamente subproductos como la vainillina, siringaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, furfurales, 5-hidroximetilfurfural, 5-hidroxi-metilfurfuraldehído, ácido acético y fórmico que actúan como inhibidores del metabolismo y de la lipogénesis (Grubišić et al., 2022; Valdés et al., 2020). Frente a ello se han identificado especies de levaduras oleaginosas capaces de producir aceite unicelular sin ser afectadas por los inhibidores del medio de cultivo (Coradini et al., 2015).

Otra estrategia para la asimilación de los carbohidratos de biomasa lignocelulósica es el Bioprocésamiento Consolidado (CBP) que consiste en la capacidad de un microorganismo para sintetizar enzimas mientras que paralelamente se realiza la hidrólisis enzimática y la producción de otro compuesto de interés comercial (Guo

et al., 2015); como algunas especies de levaduras oleaginosas que pueden descomponer fracciones celulósicas y hemicelulósicas sintetizando paralelamente productos útiles como aceite unicelular a partir de los azúcares simples liberados (Alahuhta et al., 2021); como se demostró en la investigación de Chaturvedi et al. (2019) que determinaron que las levaduras *Cryptococcus curvatus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces pastorianus*, *Trichosporon cutaneum*, *Lipomyces starkeyi* y *Rhodotorula glutinis* tenían la capacidad de producir celulasas al ser cultivadas en diferentes medios de producción en base a cáscara de papa, cáscara de plátano, cáscara de mandioca, residuos de maíz, cáscara de arroz, salvado de trigo, cáscara de ñame y cáscara de cebada, utilizados sin ningún tratamiento previo. No es común que las levaduras oleaginosas tengan la capacidad de producir aceite unicelular en medios de cultivo con biomasa lignocelulósica por lo que se requiere de la identificación de más cepas con esta característica (Qin et al., 2017).

2.9. Importancia económica de las levaduras oleaginosas

Industria de biocombustibles

La producción y uso de biocombustibles va en incremento año tras año, lo que genera el uso de tierras cultivables con la finalidad de producir materia prima para biodiesel de primera generación compitiendo de forma directa con la seguridad alimentaria (Chattopadhyay y Maiti, 2021; García Bustamante, 2013). Frente a esta problemática, las levaduras oleaginosas son potenciales generadoras de materia prima para la producción de biodiesel, debido a que contienen un perfil lipídico con alto porcentaje de ácido oleico (Vasconcelos et al., 2019); además que su uso disminuye la emisión de gases de efecto invernadero y permite la gestión de subproductos industriales tanto sólidos como acuosos y la producción de aceites novedosos con alto valor económico (Sreeharsha y Mohan, 2020). Sin embargo, la producción de biodiesel a partir de levaduras necesita de la correcta elección de la cepa y condiciones de cultivo óptimas (Chattopadhyay y Maiti, 2021).

Industrias alimentarias

El aceite unicelular contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), que están compuestos principalmente por ácido gamma linolénico (GLA), ácido araquidónico (ARA), ácido docosahexaenoico (DHA) y lípidos semejantes a los encontrados en la manteca de cacao con alto valor económico, indispensables para la nutrición por lo que son usados como

suplementos dietéticos (Ratledge, 2005). Los ácidos grasos poliinsaturados como DHA, ARA y EPA generan interés en la actualidad ya que contribuyen con el desarrollo cerebral en infantes, la biosíntesis de hormonas y sus moléculas dianas, y el adecuado desarrollo de los ojos y el sistema cardiovascular (Huang et al., 2013).

Industria farmacéutica

El aceite unicelular está compuesto por moléculas con alto valor medicinal y nutricional como los PUFA que cumplen un rol importante en la función neurológica, cardiovascular e inmunitario, un ejemplo es el DHA indispensable para el adecuado funcionamiento de la materia gris del cerebro y del ojo humano mientras que GLA tiene propiedades anticancerígenas (Chattopadhyay y Maiti, 2021); además, algunas especies de levaduras oleaginosas rojas tienen la capacidad de sintetizar, toruladina, toruleno, ubiquinona Q10 (Fakankun et al., 2019) y β -carotenos que actúan como antioxidantes (Pi et al., 2018).

2.10. Fuentes de carbono orgánico para la producción de aceite unicelular

2.10.1. Chancaca

Es un producto derivado de la molienda de la caña de azúcar cuyo jugo o zumo se procesa mediante la cristalización y puede llegar a tener una concentración de azúcares entre el 80 y 85 % (Grández Armas, 2003), también podría estar elaborada de otros insumos como jugo de *Agave americana* “cabuya” (Vila Condori, 2017). La composición química de la chancaca de cabuya se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición química de la chancaca de cabuya (*Agave americana*).

Valor nutricional (%)	
Humedad	11,83
Grasa	0,04
Carbohidratos	85,4
Proteínas	0,92
Cenizas	1,64
Fibra	0,17
Solidos solubles (°Bx)	85,00
Acidez total	0,108

Fuente: Gutiérrez y Huaccaycachacc (2006, como se citó en Vila Condori, 2017)

2.10.2. Melaza

Es una sustancia de consistencia espesa que resulta de la producción de azúcar (Mata Arias, 2017) cuya composición química contiene aproximadamente 50 % de su peso en azúcares y el 50 % restante contiene compuestos orgánicos e inorgánicos como Fe, K, Ca, Na, Mg, Zn, As, Cd, Hg, Pb y Cl, NO₃ y SO₄; también

posee otros compuestos como proteínas y lípidos. El interés por su uso es que es que es una fuente de carbono disponible y de bajo costo (Cardozo Guzmán y Moreno Cardozo, 2012). La composición química de la melaza de muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición química de melaza.

Nutriente	Muestra	Máximo	Mínimo	Base seca	Base fresca	cv
Materia seca %	60	87	63,7	100,0	76,6	4,6
Proteína cruda %	23	6,5	1,7	4,0	3,1	35,8
Cenizas%	6	9,7	2,6	9,1	7,0	38,0
Calcio %	9	2,5	0,60	0,98	0,75	63,2
Fósforo %	10	0,61	0,05	0,18	0,14	107,1
Magnesio %	5	0,35	0,18	0,33	0,25	28,0
Potasio %	7	5,2	1,5	3,0	2,3	40,6
Sodio mg/kg	1	993	993	993	760	0
Cobre mg/kg	5	53	20	44	34	44,0
Hierro mg/kg	5	1665	338	1076	825	66,0
Manganeso mg/kg	5	113	43	67	51	41,3
Zinc mg/kg	5	65	39	52	40	22,0
Energía bruta Kcal/kg	3	3784	3459	3623	2779	4,0
Grados Brix %	5	82,1	76,0		79,5	3,0

cv: coeficiente de variación

Fuente: Mata Arias (2017)

2.10.3. Lactosuero

También llamado suero de leche, es un subproducto líquido de la producción de quesos que tiene una coloración verde amarillenta por la precipitación y eliminación de la caseína; para la producción de un kilogramo de queso quedan aproximadamente nueve kilogramos de suero que por lo general es desechado generando graves problemas de contaminación (Aksu y Eren, 2005; Taskin et al., 2015). En cuanto a la producción mundial, anualmente se producen aproximadamente 190 millones de toneladas de lactosuero, sin embargo pueden ser empleadas para el cultivo de levaduras oleaginosas (Abeln y Chuck, 2021). El principal componente del suero de leche es la lactosa que es una fuente de carbono que podría ser aprovechada por cualquier microorganismo, contiene también minerales, vitaminas y lípidos que proporcionarían nutrientes importantes para el crecimiento celular y producción de metabolitos de interés (Aksu y Eren, 2005; Taskin et al., 2015). La Tabla 5 detalla la composición química del suero de leche.

Tabla 5. Composición química del suero de leche.

Valor nutricional	
Agua	92 – 95 % p/p
Materia seca	5 – 8 % p/p
Lactosa	44 – 52 g/L (4,5 %)
Proteínas	6 – 10 g/L (0,8 %)
Ácido láctico	0,1 – 0,8 %
Sal	1 %

Fuente: modificado de Aksu y Eren (2005) y Taskin et al. (2015).

2.10.4. Cáscara de tuna (*Opuntia ficus-indica*)

La tuna es una planta de la familia Cactaceae que produce frutos comestibles, su hábitat está ampliamente distribuido por América Latina, Sudáfrica y el Mediterráneo principalmente en zonas áridas y semiáridas (Ramadan y Mörsel, 2003). El consumo de esta fruta deja dos principales subproductos: las semillas y la cáscara (López Orozco et al., 2011), la cual representa aproximadamente el 40 % del peso total del fruto; sin embargo, es una fuente rica de ácidos grasos esenciales y antioxidantes (Ramadan y Mörsel, 2003). La investigación de este subproducto tiene como propósito extraer sustancias de alto valor o incorporarlas como ingrediente en otros procesos productivos (López Orozco et al., 2011). La Tabla 6 muestra la composición química de la cáscara de tuna.

Tabla 6. Composición químico bromatológico de la cáscara de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller “tuna”, en muestra fresca.

Descripción	Muestra fresca
Humedad (g %)	88,46
pH	5,7
Proteínas totales (g %)	1,08
Grasas (g %)	0,19
Carbohidratos (g %)	9,28
Cenizas (g %)	0,99
Fibra cruda (g %)	0,22
Acidez titulable (forma de ácido cítrico)	0,053
A.R.D. (g % glucosa)	2,40
A.R.T. (g % glucosa)	3,11
Energía total (Kcal/100g de muestra)	43,15

A.R.D.: Azúcares Reductores Directos. **A.R.T.:** Azúcares Reductores Totales

Fuente: Gerencia Regional Agraria La Libertad (2009) citado por Cuellar (2018).

2.10.5. Cáscara de plátano (*Musa paradisiaca*)

La platanera es una herbácea monocotiledónea que pertenece a la Familia Musaceae (Ramírez Sedeño, 2019), los frutos son bayas cilíndricas falsas comestibles de 4 a 7 cm de diámetro que no contienen semillas, pueden medir entre 20 a 40 cm y está distribuidos en racimos de entre 30 a 70 unidades (López y Montaña, 2014).

La cáscara del plátano es el subproducto principal del consumo de este fruto, el 91,50 % de su peso corresponde a materia orgánica y el resto a contenido mineral; cada 100 g de cáscara contiene aproximadamente 78,10 mg de potasio, 19,29 mg de calcio, 24,30 mg de sodio, 0,61 mg de hierro, 76,20 mg de manganeso (Chaturvedi et al., 2018); y altas concentraciones de fibra dietética, proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos poliinsaturados y sustancias antioxidantes y antimicrobianas (López y Montaña, 2014). Es por ello que representa una adecuada fuente de carbono para el cultivo de levaduras oleaginosas. La Tabla 7 muestra la composición química de la cáscara de plátano.

Tabla 7. Composición química de la cáscara de plátano.

Componentes	Cáscara de plátano verde	Cáscara de plátano medio maduro	Cáscara de plátano maduro
% Humedad	91,62	92,38	95,66
% Proteína cruda	5,19	6,61	4,77
% Fibra cruda	11,58	11,1	11,95
Energía bruta, Kcal	4383	4692	4592
% Calcio	0,37	0,36	0,36
% Fósforo	0,28	0,29	0,23
% Ceniza	16,30	14,27	14,58
Relación C/N	---	---	70:1

Fuente: modificado de Tartrakoon et al. (1999, como se citó en Carrión, 2013)

2.10.6. Cascarrilla de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.)

La quinua o quinoa es una planta ginomonoica anual de aproximadamente 1,5 m de altura con tallo recto, con hojas alternas de varios colores, flores femeninas hermafroditas y unisexuales, y semillas que pueden variar en tamaño y color de acuerdo a la variedad (Paniagua Bermejo et al., 2020). Es importante en la alimentación debido a su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales (Meyhuay, s. f.). Solo las semillas son aprovechadas nutricionalmente; por lo que la cáscara del grano y el resto de la planta corresponden a ser subproductos no usados y escasamente estudiados (Paniagua Bermejo et al., 2020), los cuales pueden ser empleados como materia prima renovable para la obtención de lignina, celulosa y/o hemicelulosa para la fabricación de productos de alto valor (Salas-Veizaga et al., 2017). La Tabla 9 y 10 muestra la composición química de los subproductos de la quinua.

Tabla 8. Composición de carbohidratos de las partes no comestibles de la quinua (% en peso) calculada por balance atómico. Todos los valores están en base seca.

	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Biomasa	38,70	35,86	18,51
Cáscara	31,69	32,60	21,52

Fuente: Paniagua Bermejo et al. (2020).

Tabla 9. Análisis elemental y aproximado, así como poder calorífico de la cáscara *Chenopodium quinoa Willd.*

		Cáscara de quinua
Análisis elemental	C ^a	41,1
	H ^a	5,39
	N ^a	2,16
	O ^b	39,43
	S ^a	0,26
	Cl ^a	0,62
Análisis aproximado	Humedad ^a	7,2
	Ceniza ^a	14,08
	Volátiles ^a	71,8
Valor calorífico	HHV ^c (MJ/kg)	16,29

^a En porcentaje. Todos los valores son en base seca excepto la humedad. ^b El contenido de oxígeno se estimó por diferencia O (%)=100 (C + H + N + ceniza). ^c HHV: Alto poder calorífico (High Heating value).

Fuente: modificado de Paniagua Bermejo et al. (2020)

2.11. Colorantes para la identificación de aceite unicelular intracelular

2.11.1. Rodamina B

Es un colorante fluorescente rojo de tipo catiónico de la clase de los xantenos que se disuelve fácilmente en el agua, en su estructura química resalta la presencia de grupos carboxílicos, amino y metilo; es usado comúnmente para teñir medios sólidos en placas Petri en investigaciones que determinan la actividad de lipasas en microorganismos y para teñir lípidos intracelulares (Jiménez Bermúdez, 2013; Niehus et al., 2018). Su estructura química es: C₂₈ H₃₁ N₂ O₃ Cl; peso molecular: 479; nombre IUPAC: N-[9-(orto-carboxifenil)-6-(dietilamino)-3H-xanteno-3-ilideno] cloruro de dietilamonio (Niehus et al., 2018).

2.11.2. Sudan Black B

También llamado Negro de Sudán B, es un colorante de tipo azoico altamente específico para lípidos (Frederiks, 1977), debido a sus propiedades alcalinas, no se disuelve en agua pero si es soluble en aceites, grasas, etanol y acetona. Su estructura química es: C₂₉ H₂₄ N₆; peso molecular. 456,553; nombre IUPAC (2,2-dimetil-1,3-dihidroperimidina-6-il)-(4-fenildiazenilnaftaleno-1-il)diazeno) (*Sudán negro B*, s. f.).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, a una altitud de 2 761 m.s.n.m.

3.2. Ubicación de sitios de muestreo

Se realizó la colecta de las fuentes de aislamiento en el distrito de Luricocha de la provincia de Huanta, en el distrito de Jesús Nazareno, en el mercado de abastos F. Vivanco Amorín y en el centro de producción de la UNSCH de la provincia de Huamanga, todos los lugares ubicados en la región de Ayacucho.

3.3. Primera etapa: Aislamiento de levaduras oleaginosas nativas

3.3.1. Colecta de fuentes de aislamiento

- Los puntos de colecta de suelos de cultivo de palta y de mecánicas automotrices se muestran en el Anexo 3 y 4 respectivamente. Para ello, se delimitó un metro cuadrado de suelo, con una espátula se retiró los residuos superficiales del suelo; se escarbó a 10 cm de profundidad y se recogió aproximadamente 1 kg.
- Para la colecta de semillas de cacao, se compró 1 kg de cacao “chuncho” en tres establecimientos de venta de semillas.
- Para la colecta de quesos, se compró una unidad en tres establecimientos de venta.

Las muestras colectadas se colocaron en bolsas herméticas estériles, se trasladaron en una caja térmica de tecnopor hasta la ubicación de estudio y se preservaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso, sin sobrepasar las 48 h.

3.3.2. Protocolo de aislamiento de levaduras oleaginosas

a. Enriquecimiento de levaduras oleaginosas

Se siguió el protocolo descrito por Mukhtar et al. (2018), Pan et al. (2009) y Olivera León (2020) con modificaciones.

- Se homogenizaron las muestras de suelo de cultivo de palta y de mecánicas automotrices, y se tamizaron gradualmente con mallas metálicas de 2 cm hasta 0,3 cm de abertura; luego se pesó 1 g de suelo tamizado, se agregó a 50 mL de medio enriquecido con glicerol (Anexo 5), se agitó manualmente y se incubó a 30 °C por 24 h.
- Se pesaron 10 g de las muestras de semilla de cacao y 10 g de las muestras de queso; se licuaron por separado con 50 mL de agua destilada estéril y se agregó 10 mL de cada solución en 50 mL de medio enriquecido con glicerol, se agitó manualmente y se incubó a 30 °C por 24 h.

b. Cultivo en agar selectivo

Se siguió el protocolo descrito por Niehus et al. (2018) y Olivera León (2020) con modificaciones.

- Con 1 mL del medio enriquecido con glicerol previamente incubado, se realizó diluciones sucesivas en agua peptonada al 0,1 % (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}). Las tres últimas diluciones se sembraron por incorporación en agar de selección de levaduras oleaginosas (medio limitado en nitrógeno suplementado con Rodamina B y cloranfenicol, Anexo 6) y se incubaron a 28 °C durante 120 h.
- Se evaluó la coloración de cada colonia teniendo en cuenta el análisis cualitativo de colonias de levaduras oleaginosas (Anexo 15) propuesta por Niehus et al. (2018); en el que colonias de color rosáceo o fucsia fueron consideradas como levaduras oleaginosas mientras que colonias blancas no lo eran. Se repicó cada colonia hasta obtener cepas puras.
- Las cepas determinadas como oleaginosas fueron codificadas de acuerdo a la fuente de aislamiento y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso en agar YPD (Anexo 7).
- Se utilizó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, como estándar de levadura no oleaginosa para la comparación con el resto de cepas.

c. Caracterización morfológica macroscópica de colonias

Se inoculó la cepa estándar y cada cepa aislada en agua peptonada al 0,1% y se realizaron diluciones sucesivas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}); la última dilución se sembró por incorporación agar Sabouraud y se incubó a 28 °C por 120 h y se evaluaron las características de cada colonia (forma, elevación, margen, superficie, pigmentación) de acuerdo a las características culturales presentadas en Brown y Smith (2017) (Anexo 23).

d. Caracterización microscópica de levaduras

- Para la observación directa no se usó colorante, mientras que para la observación de la morfología celular observó con azul de metileno; para ello se extrajo una asada de la colonia y se extendió directamente sobre un portaobjetos en una gota de agua peptonada al 1 % estéril y en caso de usar colorante se agregó con un gotero, luego se colocó el cubreobjetos, se retiró el exceso de agua con un trozo de papel toalla y se observó en un microscopio óptico a un aumento a 400 X.
- Para la observación de lípidos intracelulares se realizó la tinción con Sudan Black B siguiendo el protocolo descrito por Thakur et al. (1988) con modificaciones.
- Se incubaron las cepas aisladas en 15 mL de medio de activación a 28 °C durante 48 h, se inoculó con 1 mL de cepas activadas en 9 mL de medio de producción estándar y se incubó a 28 °C durante 120 h agitando manualmente cada 24 h por 1 min en un vórtex a 1200 RCF.
- Finalizado el tiempo de incubación se homogenizó y se extrajo 3 mL del medio, se centrifugó a 2325 RCF por 15 min y se realizaron entre 3 a 4 lavados con agua destilada estéril; luego se resuspendió el precipitado con el volumen inicial de agua destilada.
- Se separó 1,5 mL de la solución en un tubo de ensayo y se agregó 1,5 mL de HCl 1M y 0,12 mL de etanol al 70 %, luego se colocó en agua hirviendo agitando lentamente por 30 segundos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 2325 RCF por 10 min desechando el sobrenadante, se realizaron entre 3 a 4 lavados con alcohol al 50 % para desechar residuos de colorante; el precipitado se extendió en un portaobjetos y se observó un microscopio óptico a un aumento de 400 X. La coloración negra dentro de las células representa el aceite unicelular de la levadura.

3.4. Segunda etapa: Determinación de la productividad de aceite unicelular en levaduras aisladas

- Se incubaron a las cepas en 50 mL de medio de activación a 28 °C durante 48 h hasta que el medio alcanzó 0,025 de absorbancia.
- Se inoculó con 10 mL del medio de activación en 90 mL de medio de producción estándar y se incubó a 28 °C por 120 h, durante este periodo se agitó cada 24 h manualmente durante 1 min.
- Al finalizar la incubación se realizó la determinación de biomasa seca y la extracción de aceite intracelular. Para el cálculo de la productividad de aceite unicelular se usó la siguiente ecuación:

$$\% P = \frac{\text{Peso de aceite unicelular}}{\text{Peso de biomasa seca}} \times 100$$

% P: Porcentaje de productividad de aceite unicelular

Fuente: Qasim & Sultan (2020)

3.4.1. Determinación de biomasa seca

Se empleó el protocolo descrito por Pan et al. (2009) con modificaciones.

Del medio de producción estándar previamente incubado se extrajo 15 mL en un tubo cónico previamente pesado y se centrifugó a 9302 RCF durante 15 min; se eliminó el sobrenadante, se lavó tres veces con agua destilada estéril, y se eliminó todo el sobrenadante posible; se colocó el tubo en una estufa a 70 °C durante hasta obtener un peso constante. La biomasa seca se determinó gravimétricamente, es decir mediante diferencia de peso inicial y final del tubo.

3.4.2. Determinación de aceite unicelular

Para la determinación de lípidos intracelulares se siguió con el protocolo de Bligh y Dyer (1959) con modificaciones.

- Del medio de producción estándar previamente incubado se extrajo 15 mL en un tubo cónico previamente pesado, se centrifugó a 9302 RCF durante 15 min y se eliminó el sobrenadante.
- Se agregó 2 mL de HCl 4 M, se homogenizó manualmente y se incubó en una estufa a 70 °C en baño María durante 4 h; posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregó 2 mL de metanol absoluto y se homogenizó lentamente; después de 30 segundos se agregó 2 mL de cloroformo generando dos fases. Se dejó reposar en agitación a temperatura ambiente durante 24 h.
- Pasado ese tiempo se centrifugó las muestras a 2325 RCF durante 15 min y con una jeringa de 1 mL se extrajo la fase inferior formada por cloroformo que contenía al aceite unicelular diluido y se colocó en un tubo cónico de 15 mL;

luego se volvió a agregar 2 mL de cloroformo, se homogenizó, se mantuvieron en agitación por 3 h y se repitió el proceso de recuperación del cloroformo.

- El cloroformo recuperado se puso en un tubo cónico y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente, sin taparlo hasta que el cloroformo se evaporó completamente quedando el aceite unicelular.
- El peso del aceite unicelular se determinó gravimétricamente.

Al determinar el porcentaje de productividad del aceite unicelular de las cepas aisladas se eligió la más productiva para las siguientes etapas.

3.5. Tercera etapa: Optimización de parámetros para producción de aceite unicelular

- Para la optimización se plantearon variaciones en el medio de producción estándar como se muestra en la tabla 10:

Tabla 10. Variables de parámetros nutritivos y físicos para la modificación del medio de producción estándar (MPE). Ayacucho, 2021.

Parámetros	Variación	
Nutritivos	Concentración de glucosa	40 g/L 75 g/L
	Tipo de fuente de nitrógeno	Orgánico: Peptona y extracto de levadura Inorgánico: Sulfato de amonio y nitrato de amonio
Físicos	pH	5,5 6,0 6,5
	Temperatura de incubación	28 °C 35 °C

- Se incubó la cepa seleccionada en 300 mL de medio de activación a 28 °C hasta que el medio alcanzó 0,025 de absorbancia.
- Se inoculó con 10 mL del medio de activación en 90 mL de cada medio de producción modificado y se incubó a 28 °C o 35 °C por 192 h, durante el periodo de incubación se agitó manualmente durante 1 min cada 24 h.
- Al finalizar la incubación se realizó la determinación de biomasa seca de levaduras y la extracción de aceite unicelular para el cálculo de la productividad.
- Finalmente se seleccionó al medio de producción modificado que haya generado la máxima productividad de la cepa.

Tabla 11. Composición y temperatura de incubación de medios de producción modificados (MPM). Ayacucho, 2021.

Medio de producción modificado (MPM)	T °C	pH	Glucosa (g/L)	Peptona (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	NaH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	Extracto de levadura (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	NH ₄ NO ₃ (g/L)	C/N
MPM 1	28	5,5	40	2	7	7	1,5	1	---	---	70:1
MPM 2	28	6,0	40	2	7	7	1,5	1	---	---	70:1
MPM 3	28	6,5	40	2	7	7	1,5	1	---	---	70:1
MPM 4	28	5,5	40	---	7	7	1,5	---	2	1	24:1
MPM 5	28	6,0	40	---	7	7	1,5	---	2	1	24:1
MPM 6	28	6,5	40	---	7	7	1,5	---	2	1	24:1
MPM 7	28	5,5	75	2	7	7	1,5	1	---	---	132:1
MPM 8	28	6,0	75	2	7	7	1,5	1	---	---	132:1
MPM 9	28	6,5	75	2	7	7	1,5	1	---	---	132:1
MPM 10	28	5,5	75	---	7	7	1,5	---	2	1	45:1
MPM 11	28	6,0	75	---	7	7	1,5	---	2	1	45:1
MPM 12	28	6,5	75	---	7	7	1,5	---	2	1	45:1
MPM 13	35	5,5	40	2	7	7	1,5	1	---	---	70:1
MPM 14	35	6,0	40	2	7	7	1,5	1	---	---	70:1
MPM 15	35	6,5	40	2	7	7	1,5	1	--	---	70:1
MPM 16	35	5,5	40	---	7	7	1,5	---	2	1	24:1
MPM 17	35	6,0	40	---	7	7	1,5	---	2	1	24:1
MPM 18	35	6,5	40		7	7	1,5	---	2	1	24:1
MPM 19	35	5,5	75	2	7	7	1,5	1	---	---	132:1
MPM 20	35	6,0	75	2	7	7	1,5	1	---	---	132:1
MPM 21	35	6,5	75	2	7	7	1,5	1	---	---	132:1
MPM 22	35	5,5	75	---	7	7	1,5	---	2	1	45:1
MPM 23	35	6,0	75	---	7	7	1,5	---	2	1	45:1
MPM 24	35	6,5	75	---	7	7	1,5	---	2	1	45:1
MPE	28	5,5	40	---	7	7	1,5	1	1	---	35:1

MPM: medio de producción modificado. T: temperatura. KH₂PO₄: fosfato monopotásico. NaH₂PO₄: fosfato monosódico. MgSO₄: sulfato de magnesio. (NH₄)₂SO₄: sulfato de amonio. NH₄NO₃: nitrato de amonio. C/N: relación carbono nitrógeno.

3.6. Cuarta etapa: Formulación de medio de producción orgánico (MPO)

Para la formulación de los Medios de Producción Orgánicos se siguió la metodología propuesta por Serrat-Díaz, M. (2021) con modificaciones. Luego de la selección del medio de producción modificado que generó mayor productividad de la cepa, se reemplazó la glucosa por fuentes de carbono orgánicas; para ello se usó lactosuero, melaza, chancaca, cascarilla de quinua, cáscara de plátano y cáscara de tuna.

3.6.1. Medio de producción orgánico de lactosuero (MPOL)

- Se realizó la desproteínización del lactosuero; para ello se colocó 200 mL de lactosuero en un matraz de 250 mL, se ajustó el pH a 4,6 con ácido láctico y se calentó por 10 min a 100 °C; se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 9302 RCF durante 20 min, se descartó el precipitado, se recuperó el sobrenadante y se filtró.

3.6.2. Medio de producción orgánico de melaza (MPOM)

- Se realizó la clarificación de la melaza; para ello se diluyó 50 mL de melaza y se adicionó agua destilada en proporción 1:3, se calentó a 100 °C durante 20 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 9302 RCF durante 20 min para eliminar los sólidos insolubles presentes, se descartó el precipitado, se recuperó el sobrenadante y se filtró.

3.6.3. Medio de producción orgánico de chancaca (MPOC)

- Se realizó la clarificación de la chancaca; para ello se pesó 100 g de chancaca y se adicionó agua destilada en proporción 1:1; se calentó a 100 °C durante 20 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 9302 RCF durante 20 min para eliminar los sólidos insolubles presentes, se descartó el precipitado, se recuperó el sobrenadante y se filtró.

3.6.4. Medio de producción orgánico de cascarilla de quinua (MPOQ)

- Se realizó el pretratamiento de designificación ácida de cascarilla de quinua; para ello se colocó 100 g de cascarilla de quinua y 200 mL de agua destilada en un matraz de 1000 mL, se añadió 5 mL de ácido clorhídrico 4 M y se incubó a 70 °C durante 3 h, pasado ese tiempo se agregó 400 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 4 con NaOH 4M.
- Se calentó la solución a 100 °C en una campana de extracción durante 20 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró con un colador recuperando el sobrenadante, se ajustó el pH hasta 6,5 con NaOH 4 M y se centrifugó la solución a 9302 RCF durante 20 min para eliminar los sólidos insolubles presentes, se descartó el precipitado, se recuperó el sobrenadante y se filtró.

3.6.5. Medio de producción orgánico de cáscara de plátano (MPOP) y medio de producción orgánico de cáscara de tuna (MPOT)

- Se preparó por separado. Se pesó 200 g de cáscara de plátano o cáscara de tuna, se licuó con agua destilada en proporción 1:1, se agregó la mezcla en un matraz de 500 mL y se calentó por 20 min a 100 °C, se dejó enfriar a temperatura ambiente para luego filtrar la solución con un colador recuperando el sobrenadante. Se centrifugó a 9302 RCF durante 20 min, se recuperó el sobrenadante y se filtró.

Todas las soluciones preparadas fueron almacenadas en refrigeración hasta su uso.

Durante la elaboración de cada medio de producción orgánico, antes de agregar los demás componentes del medio, se midieron los azúcares reductores totales con el método DNS; se midió los grados Brix iniciales y se ajustaron con agua destilada y/o glucosa dependiendo de cada caso hasta obtener los mismos grados Brix que el medio de producción modificado seleccionado de la etapa anterior y también se ajustó al mismo pH.

Al tener todos los medios de producción orgánica preparados, se incubó la cepa seleccionada en 300 mL de medio de activación a 28 °C durante 48 h hasta que el medio alcanzó 0,025 de absorbancia. Seguidamente se inoculó con 10 mL del medio de activación en 90 mL de cada medio de producción orgánico y se incubó a la temperatura óptima establecida en la etapa anterior por 192 h, durante el periodo de incubación se agitó manualmente durante 1 min cada 24 h. Al finalizar el periodo de incubación se realizó la determinación de biomasa seca de levaduras y la extracción de aceite unicelular para el cálculo de la productividad. Finalmente se seleccionó el medio de producción orgánico que haya generado la máxima productividad de la cepa.

3.7. Identificación fisiológica y bioquímica de levaduras

Se siguió el procedimiento descrito por Kurtzman y Fell (2000); Guamán-Burneo y Carvajal-Barriga (2009) y Kurtzman et al. (2011).

- Se activó la cepa seleccionada, luego se inoculó por estrías en 10 mL de agar YM inclinado y se incubó a 28 °C por 48 h.
- Paralelamente se preparó 100 mL del medio basal de fermentación al que se le añadió 4 mL de solución base de azul de bromotimol.
- Se agregaron de 3 mL del medio basal de fermentación en tubos de ensayo de 5 mL de capacidad que contenían campanas de Durham.

- Se preparó tres tubos por cada azúcar utilizada y se adicionó tres tubos para el control al que no se le inoculó ni agregó azúcar y 3 tubos para el blanco al que se inoculó, pero no se le agregó ningún azúcar. Los tubos se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 min antes de agregar los azúcares.
- Los azúcares usados fueron xilosa, sacarosa, rafinosa, fructosa, maltosa, lactosa, glucosa y galactosa.
- Simultáneamente se colocaron 3 mL de agua destilada en tubos de ensayo de 10 mL de capacidad y se esterilizaron en autoclave, luego de la esterilización se agregaron en cada tubo los diferentes azúcares para el ensayo en concentración del 8 % p/v, se homogenizó y finalmente se agregó 1 mL de la solución de azúcares en cada tubo con medio basal de fermentación. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.
- Al finalizar el tiempo de incubación en agar YM se agregó 10 mL de agua peptonada al 0,1 % esterilizada y se agitó manualmente para desprender las colonias de la superficie del agar y se agregó 0,1 mL de esta solución a cada tubo con medio basal de fermentación. Se agitaron suavemente los tubos inoculados y se incubó a 28°C durante 28 días. Los tubos fueron inspeccionados cada 24 h en busca de cambios de coloración del medio de cultivo y acumulación de gas en la campana de Durham.
- Los resultados se interpretaron de la siguiente manera:
 Para el ensayo de asimilación de azúcares, si el medio de cultivo cambia de color verde a amarillo, significa que el azúcar del medio fue consumido, pero si el medio cambia de verde a azul significa que el azúcar del medio no fue consumido y que fueron los aminoácidos presentes los que se utilizaron como fuente de carbono.
 Para el ensayo de fermentación de azúcares se observa el llenado de gas en la campana de Durham interpretándose como capacidad de fermentación de azúcar, mientras que al no presentar gas en la campana se interpreta como incapacidad de fermentación de azúcares.

Para el reporte de los resultados se utilizaron los siguientes símbolos:

- + → fuertemente positivo, cambió de color y/o la campana se llenó en un periodo de 7 días.
- I → positivo tardío (latente), cambió de color y/o la campana se llenó rápidamente (48 h), pero después de más de 7 días.

- S** → lentamente positivo, cambió de color y/o la campana se llenó lentamente (más de 48 h), después de más de 7 días.
- W** → débilmente positivo, cambió de color sutilmente y/o la campana no está completamente llena de gas (menos del tercio de su capacidad).
- → Negativo, sin cambio de color y/o sin acumulación de gas.
- V** → Variable, en las repeticiones, algunas son negativas y otras son positivas.

De acuerdo a los resultados obtenidos de ambas pruebas se realizó un contraste con la bibliografía y tablas encontradas en Kurtzman y Fell, 2000.

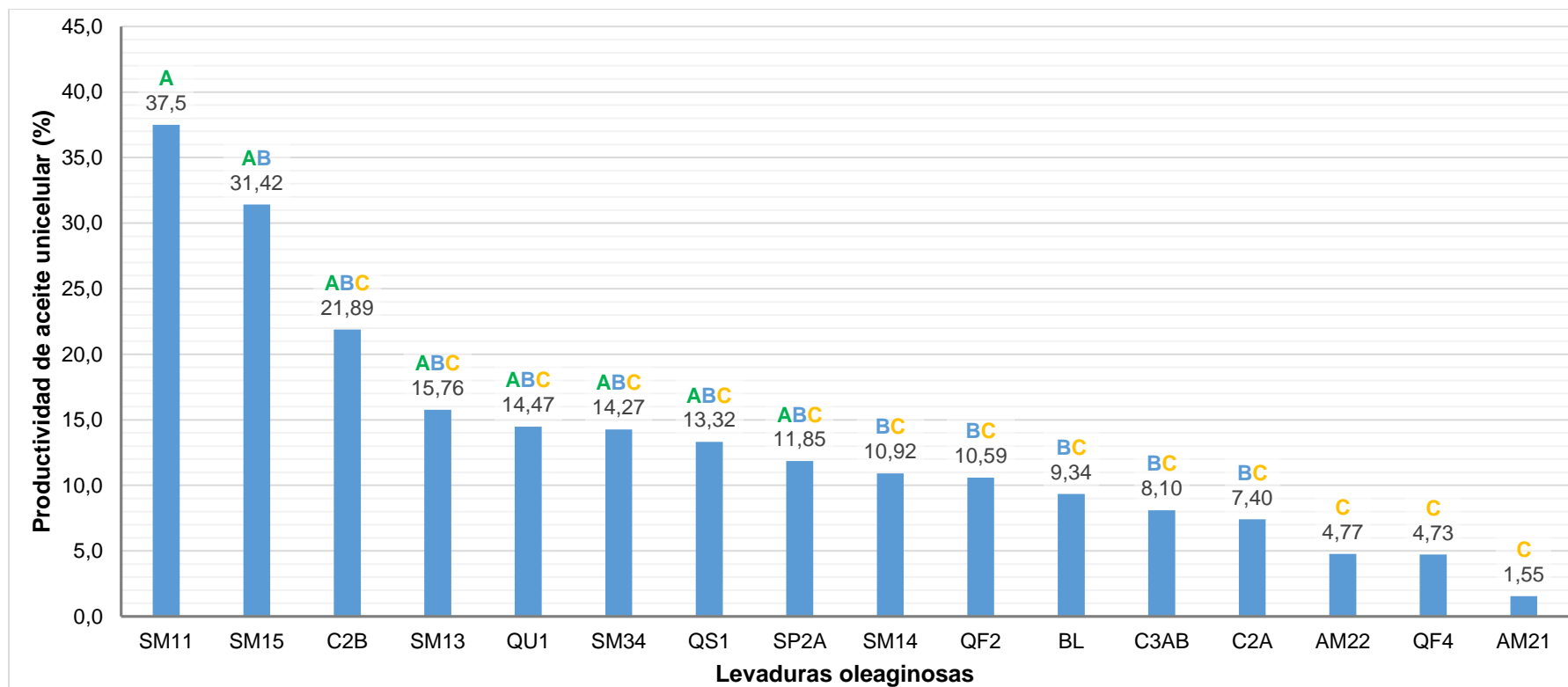
3.8. Análisis estadístico

Para la determinación de productividad de cepas, la evaluación productividad en función a la relación C/N y para de la determinación de la productividad en medios orgánicos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) mientras que para la evaluación de la optimización de los parámetros nutritivos y físicos se empleó la prueba del diseño factorial; todos los casos se evaluaron con nivel de significancia de $\alpha=0,05$ y al presentar diferencias significativas entre grupos ($p<0,05$) se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico Minitab 17.

IV. RESULTADOS

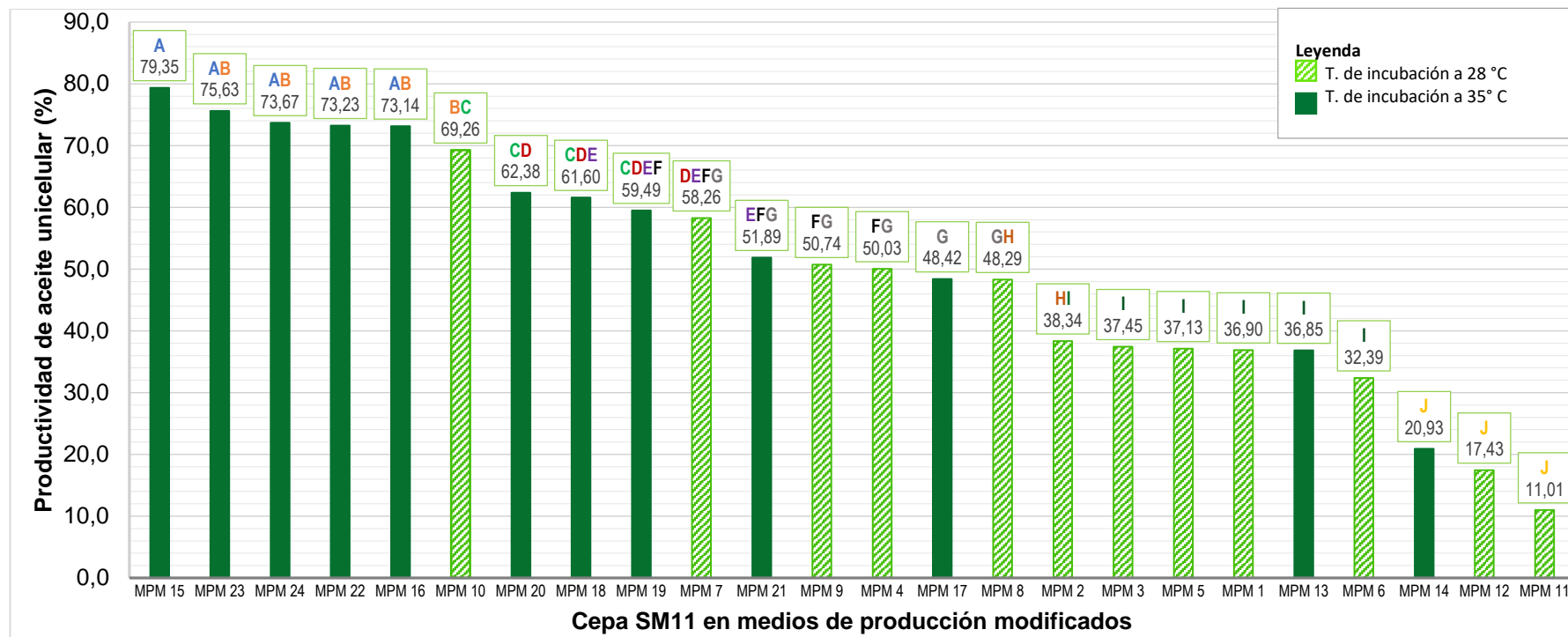
Tabla 12. Características macroscópicas de colonias de levaduras oleaginosas aisladas en agar Sabouraud a 120 horas de incubación a 28 °C. Ayacucho, 2022.

N°	FUENTE DE AISLAMIENTO	CÓDIGO DE CEPA	FORMA	ELEVACIÓN	MARGEN O BORDE	SUPERFICIE	PIGMENTO
1	Otorgado por el Lab. de Biotecnología UNSCH	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4126	Circular	Convexa	Ondulado	Lisa, mate, blanca, superficial	Blanco
2	Cacao	C21	Circular	Plana	Entero	Rugosa, mate, seca, superficial	Blanco
3		C22	Circular	Plana	Entero	Rugosa, mate, seca, invasiva	Blanco
4	Cacao	C312	Circular	Convexa	Entero	Lisa, mate, cremosa, superficial	Crema
5	Queso fresco	QF4	Circular	Convexa	Entero	Lisa, mate, cremosa, superficial	Beige
6		QF2	Circular	Convexa	Entero	Lisa, mate, cremosa, superficial	Beige
7	Queso seco	QS1	Circular	Plana	Ondulado	Rugosa, mate, grumoso, seco	Beige
8	Queso de la UNSCH	QU1	Circular	Plana	Ondulado	Rugosa, mate, seca, superficial	Beige
9	Suelo de mecánica	SM11	Circular	Convexa	Entero	Lisa, mate, cremosa, superficial	Rosado
10		SM13	Circular	Convexa	Ondulado	Lisa, mate, seca, superficial	Crema
11	Suelo de mecánica	SM14	Circular	Convexa	Entero	Lisa, brillante, cremosa, superficial	Crema
12	Sueño de mecánica	SM15	Circular	Convexa	Filamentoso	Plana, brillante, cremosa, superficial	Blanco
13	Suelo de mecánica	AM21	Filamentoso	Plana	Filamentoso	Rugosa, brillante, cremosa, superficial	Crema
14		AM22	Filamentoso	Convexa	Filamentoso	Plana, brillante, cremosa, superficial	Blanco
15	Suelo de mecánica	SM34	Filamentoso	Umbonante	Filamentoso	Rugoso, mate, cremoso, invasiva	Beige
16	Suelo de palta	SP21	Circular	Convexa	Entero	Lisa, mate, cremosa, superficial	Blanco



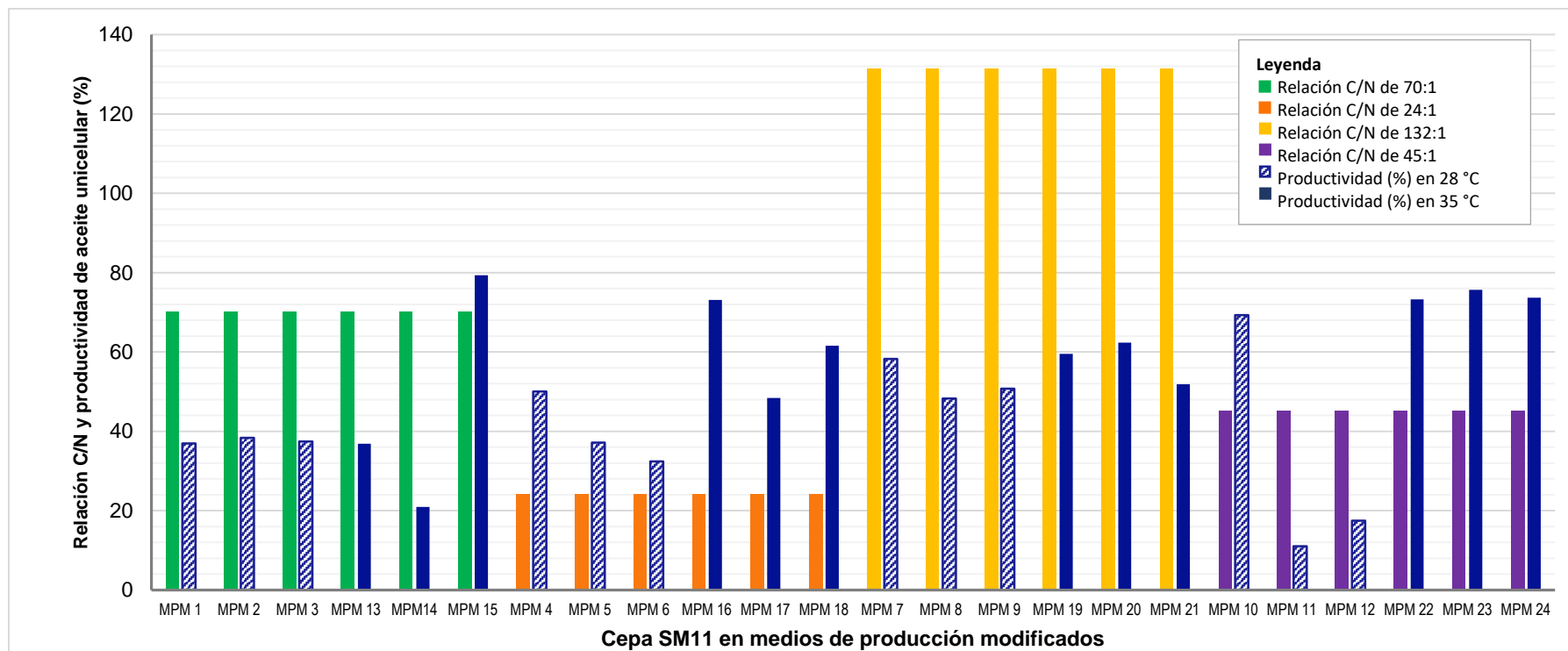
Cepa	SM1 1	SM1 5	C2 B	SM1 3	SM3 4	QU 1	QS 1	SP2 A	SM1 4	QF 2	BL	C3A B	C2 A	AM2 2	QF 4	AM2 1
Biomasa (g/L)	0,955	0,730	0,727	1,997	1,532	2,405	1,518	1,563	1,950	2,345	1,372	2,642	4,382	3,032	3,963	6,697
Aceite unicelular (g/L)	0,358	0,229	0,159	0,315	0,222	0,343	0,202	0,185	0,213	0,248	0,128	0,214	0,324	0,145	0,187	0,104
Productividad (%)	37,5	31,42	21,89	15,76	14,47	14,27	13,32	11,85	10,92	10,59	9,34	8,1	7,4	4,77	4,73	1,55

Figura 2. Productividad de aceite unicelular a partir de cepas de levaduras oleaginosas aisladas de fuentes naturales, incubadas en medio de producción estándar (MPE) a 120 horas en 28 °C. Ayacucho, 2022.



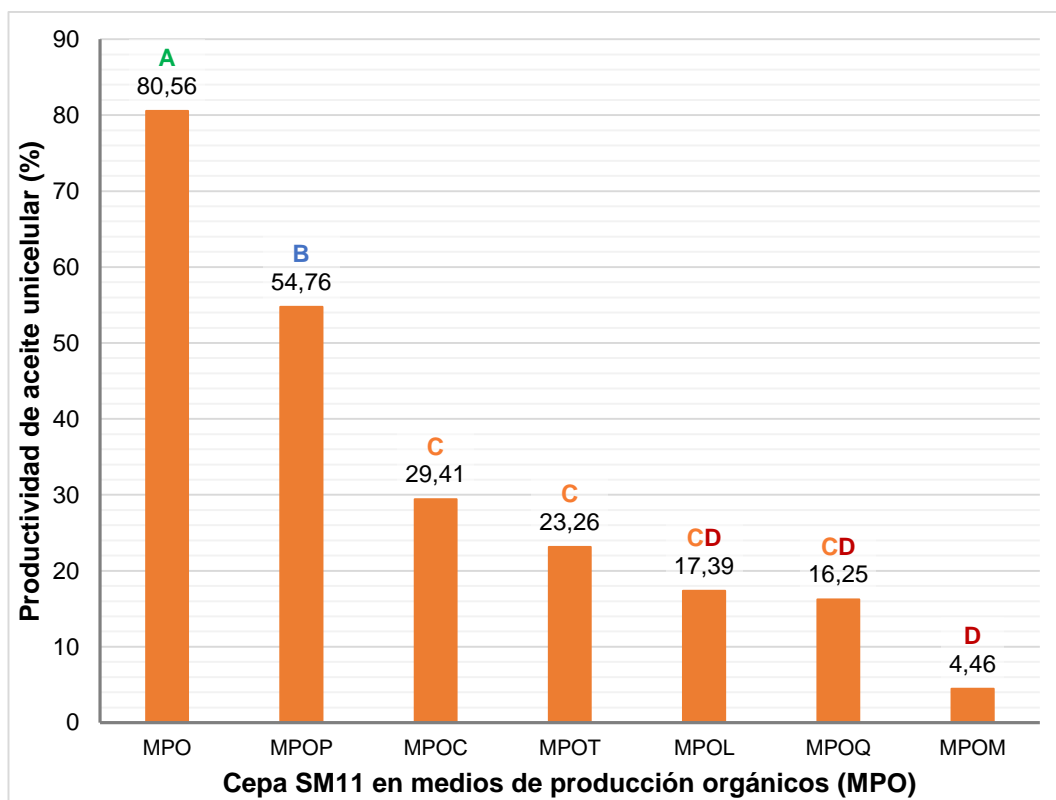
Medio de producción modificado (MPM)	MPM 15	MPM 23	MPM 24	MPM 22	MPM 16	MPM 10	MPM 20	MPM 18	MPM 19	MPM 7	MPM 21	MPM 9	MPM 4	MPM 17	MPM 8	MPM 2	MPM 3	MPM 5	MPM 1	MPM 13	MPM 6	MPM 14	MPM 12	MPM 11
Biomasa (g/L)	0,307	0,372	0,278	0,347	0,317	0,209	0,477	0,423	0,437	0,343	0,527	0,281	0,475	0,500	0,442	0,747	0,512	0,686	0,467	0,618	0,772	1,105	0,924	1,053
Aceite unicelular (g/L)	0,244	0,281	0,205	0,254	0,232	0,145	0,297	0,261	0,260	0,200	0,273	0,143	0,238	0,242	0,213	0,286	0,192	0,255	0,172	0,228	0,250	0,231	0,161	0,116
Productividad (%)	79,35	75,63	73,67	73,23	73,14	69,26	62,38	61,60	59,49	58,26	51,89	50,74	50,03	48,42	48,29	38,34	37,45	37,13	36,90	36,85	32,39	20,93	17,43	11,01

Figura 3. Productividad de aceite unicelular (%) en la cepa SM11, incubada en diferentes medios de producción modificados (MPM) durante 192 horas a 28 °C y 35 °C. Ayacucho, 2022.



Medio de producción modificado (MPM)	MPM 1	MPM 2	MPM 3	MPM 13	MPM 14	MPM 15	MPM 4	MPM 5	MPM 6	MPM 16	MPM 17	MPM 18	MPM 7	MPM 8	MPM 9	MPM 19	MPM 20	MPM 21	MPM 10	MPM 11	MPM 12	MPM 22	MPM 23	MPM 24
Relación C/N	70:1	70:1	70:1	70:1	70:1	70:1	24:1	24:1	24:1	24:1	24:1	24:1	132:1	132:1	132:1	132:1	132:1	132:1	45:1	45:1	45:1	45:1	45:1	45:1
Productividad de aceite unicelular (g/L)	36,90	38,34	37,45	36,85	20,93	79,35	50,03	37,13	32,39	73,14	48,42	61,60	58,26	48,29	50,74	59,49	62,38	51,89	69,26	11,01	17,43	73,23	75,63	73,67

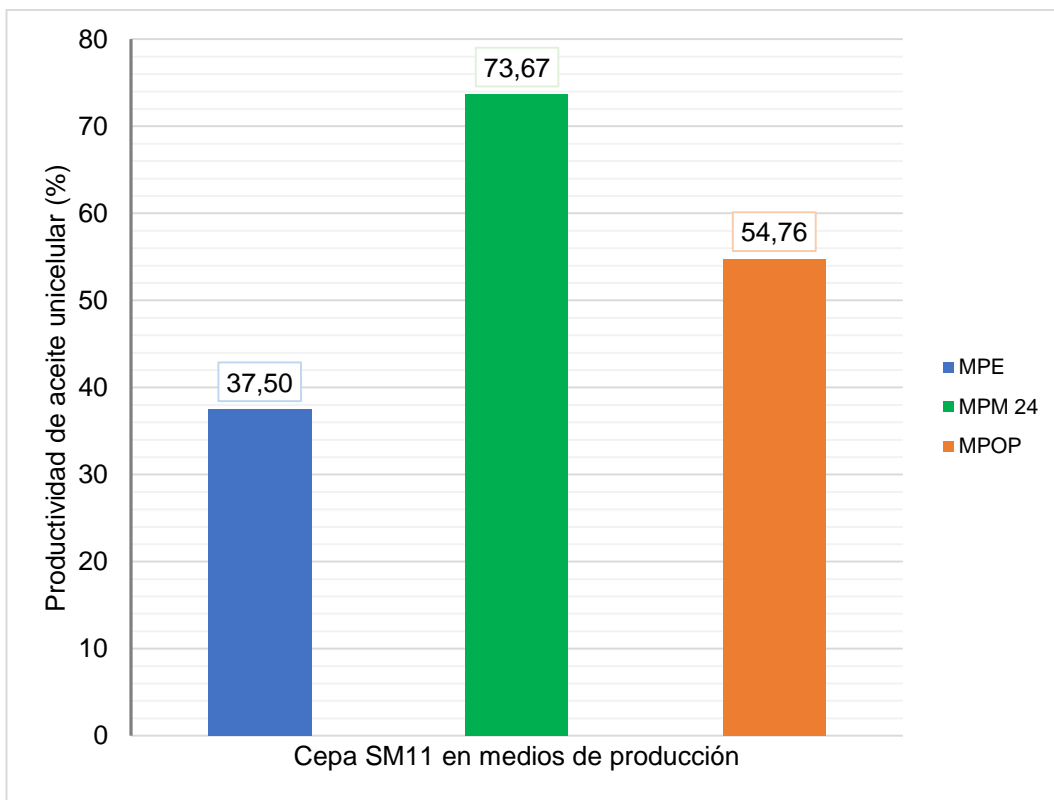
Figura 4. Productividad de aceite unicelular (%) de la cepa SM11 en medios de producción modificados usando diferentes relaciones C/N, incubadas durante 192 horas a 28 °C y 35 °C. Ayacucho, 2022



Medio de producción	MPM 24	MPOP	MPOC	MPOT	MPOL	MPOQ	MPOM
Biomasa (g/L)	0,140	0,241	0,460	0,944	1,256	0,790	2,206
Aceite unicelular (g/L)	0,113	0,132	0,135	0,219	0,218	0,128	0,098
Productividad de aceite unicelular (%)	80,56	54,76	29,41	23,16	17,39	16,25	4,46

MPO: Medio de producción optimizado. **MPOP:** Medio de producción orgánico de cáscara de plátano. **MPOC:** Medio de producción orgánico de chancaca. **MPOT:** Medio de producción orgánico de cáscara de tuna. **MPOL:** Medio de producción orgánico de lactosuero. **MPOQ:** Medio de producción orgánico de cascarilla de quinua. **MPOM:** Medio de producción orgánico de melaza.

Figura 5. Productividad de aceite unicelular (%) de la cepa SM11, incubada en los medios de producción con suplementos orgánicos (MPO) durante 192 horas a 35 °C. Ayacucho, 2022.



Medio de producción	MPE	MPM 24	MPOP
Biomasa (g/L)	0,955	0,278	0,241
Aceite unicelular (g/L)	0,358	0,205	0,132
Productividad de aceite unicelular (%)	37,50	73,67	54,76

MPE: Medio de producción estándar. **MPM 24:** Medio de producción modificado 24. **MPOP:** Medio de producción orgánico de plátano.

Figura 6. Comparación de productividad de aceite unicelular (%) de la cepa SM11 incubada en el MPE, MPM 24 y MPOP durante 192 horas a 35 °C. Ayacucho, 2022.

Tabla 13. Identificación de especie de la cepa SM11 mediante claves dicotómicas de Hernansaez Meoro, 1962, pruebas de fermentación y asimilación de azúcares a 28 días de incubación en medio basal de fermentación a 28 °C. Ayacucho, 2022.

Ensayos (Anexo 18)		
Azúcares	Fermentación de azúcares	Asimilación de azúcares
Blanco	-	-
Fructosa	-	+
Galactosa	-	
Glucosa	-	+
Lactosa	-	-
Maltosa	-	
Rafinosa	-	W
Sacarosa	-	+
Xilosa	-	
Caract. macroscópicas y microscópicas	Con pigmentos, sin conidios y no fermentativas.	
Especie identificada	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	

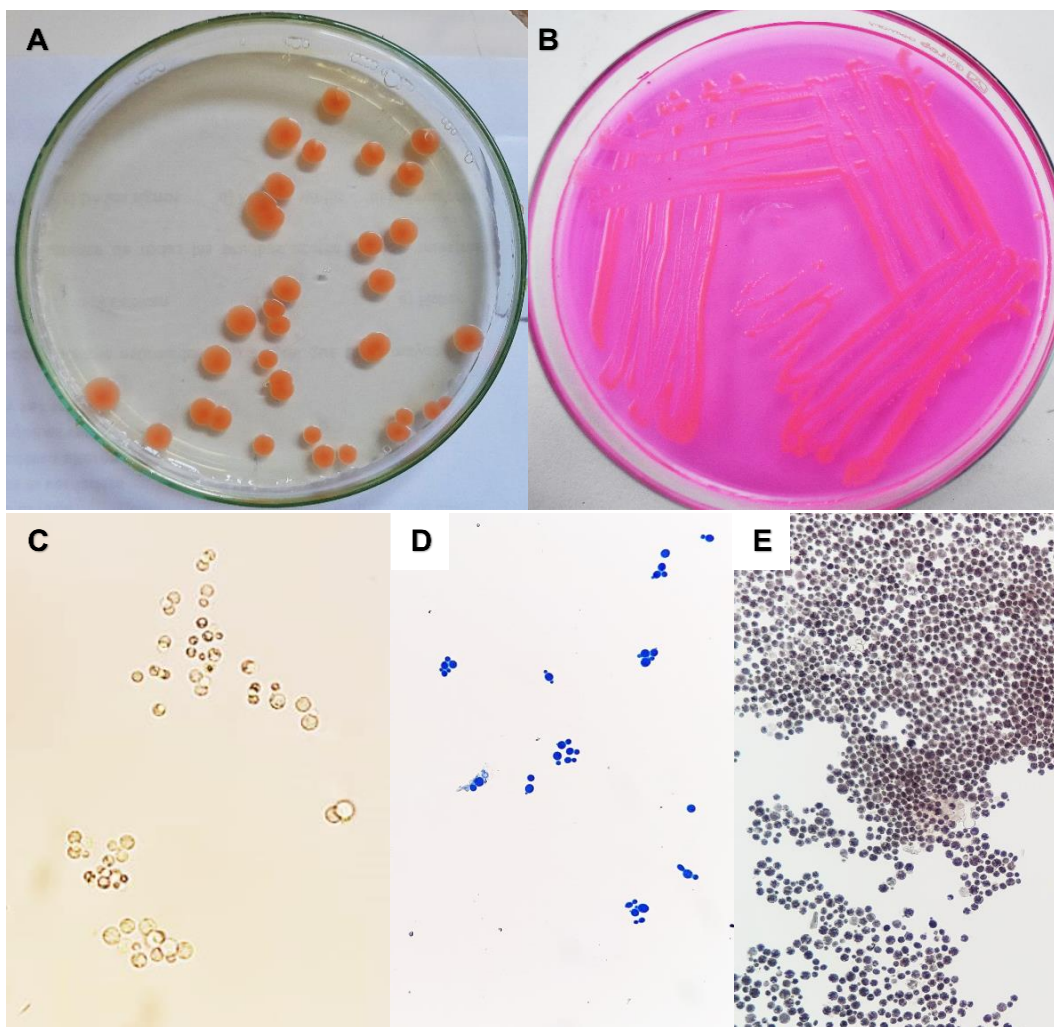


Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas de *Rhodotorula mucilaginosa* SM11. Ayacucho, 2022.

A y B: Colonias de *Rhodotorula mucilaginosa* SM11 incubadas durante 120 h a 28 °C en agar Sabouraud y agar de selección de levaduras oleaginosas respectivamente. **C, D y E:** Células de *Rhodotorula mucilaginosa* SM11 incubadas en medio de producción estándar (MPE) durante 120 h a 28 °C observadas a un aumento de 400 X de forma directa, con azul de metileno y tinción Sudan Black B respectivamente.

V. DISCUSIÓN

En la primera etapa de investigación se aisló 15 cepas de levaduras oleaginosas de las cuales, tres fueron aisladas de semillas de cacao; cuatro de quesos artesanales; siete de suelos de mecánicas y una de suelos de cultivo de palta (Tabla 12); y al evaluar las características macroscópicas de sus colonias se observó que el 80 % tenía forma circular, el 60 % elevación convexa y el 53,3 % margen entero. Estos resultados destacan la factibilidad de aislar levaduras oleaginosas de distintas fuentes, como suelos de cultivo, suelos contaminados por hidrocarburos o productos alimenticios de la región de Ayacucho; por otro lado se demostró que al usar la tinción con Sudan Black B en cultivos líquidos y el tinte Rodamina B en cultivos sólidos se desarrolló un protocolo de aislamiento rápido y eficiente para identificar levaduras oleaginosas sin necesidad del aislamiento total de las cepas presentes en la fuente de aislamiento, con la ventaja de que no se requiere de equipamiento de laboratorio especializado. En la investigación realizada por Ayadi et al. (2018) usaron muestras de frutas podridas, suelos, flores, productos lácteos, aguas residuales y orujo de aceitunas para aislar 205 cepas de levaduras, de las cuales 12 fueron reconocidas como oleaginosas; de igual forma, Méndez Polo (2019), aisló de suelos de cuencas de ríos de diferentes pisos altitudinales en la región La Libertad, Lambayeque y Cajamarca a tres cepas de levaduras oleaginosas identificadas como *Rhodotorula kratochvilova*, *Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula mucilaginosa*; mientras que Viñarta et al. (2016) aislaron 17 levaduras del género *Rhodotorula sp.* de muestras de suelo colectadas en la estación argentina de investigación científica en la Antártida y Kitcha y Cheirsilp (2011), identificaron 23 cepas oleaginosas a partir de 889 cepas de levaduras aisladas de suelos y desechos de molinos de aceite de palma y fábricas de biodiesel del sur de Tailandia, estas investigaciones demuestran la versatilidad de adaptación de este tipo de levaduras a diferentes hábitats y la posibilidad de identificación de nuevas especies de levaduras oleaginosas.

La segunda etapa de la investigación determinó la productividad de aceite unicelular de cada cepa aislada (Figura 2). Estadísticamente se obtuvieron tres grupos diferentes: en el grupo A destacó la cepa SM11 por tener 37,5 % de productividad, en el grupo B se encontró la cepa control BL con productividad de 9,34 % y en el grupo C se encontró la cepa AM21 que tuvo la menor productividad con 1,55 %. De todas las cepas evaluadas, solo tres pasaron el límite del 20 % de productividad de aceite unicelular; sin embargo, se incluyeron en los resultados por su capacidad oleaginosa demostrada en evaluaciones anteriores. Las evidentes diferencias en la capacidad oleaginosa de cada cepa aislada se atribuyen al comportamiento fisiológico individual y a las diferentes condiciones óptimas de cultivo que cada una requiere (Ayadi et al., 2018). Brandenburg et al. (2021) y Nicaud et al. (2014) mencionan que la diversidad metabólica de las levaduras oleaginosas, la acumulación y el perfil de lípidos puede variar entre especies y cepas muy cercanas, por lo que se debe tener en consideración al momento del aislamiento y la optimización de la productividad de cada cepa; tal como lo demuestra Garay et al. (2016), que en su investigación reconocieron la variación del contenido de aceite unicelular de diferentes cepas de la misma especie *Rhodotorula mucilaginosa* y de diferentes especies aisladas de una misma fuente.

En la tercera etapa, se optimizó los parámetros nutricionales y físicos para la producción de aceite unicelular, evaluando únicamente a la cepa SM11 la cual fue cultivada en 24 medios de producción modificados (MPM) (Figura 3). Se identificaron diez grupos estadísticamente diferentes; de los cuales, los grupos A y B presentaron el mayor porcentaje de productividad de aceite unicelular que se encontró entre 69,26 % y 79,35 %; mientras que los grupos menos productivos fueron el grupo I y J con porcentaje de productividad entre 11,01 % y 38,34 %; demostrando que aparte de la especie de la cepa, la síntesis del aceite unicelular depende significativamente de la composición del medio de cultivo y las condiciones de éste (Kolouchová et al., 2016). Entre los medios de producción modificados del grupo A se eligió al MPM 24 que tenía los siguientes parámetros: 75 g/L de concentración de glucosa, nitrógeno inorgánico, pH 6,5; temperatura de incubación a 35 °C y relación C/N de 45:1.

Se eligió la máxima concentración de glucosa debido a que al cultivar a levaduras oleaginosas en condiciones de exceso de la fuente de carbono y un elemento limitado, generalmente nitrógeno; se induce su capacidad de producir aceite

unicelular (Sha, 2013). Teóricamente el metabolismo de 100 g de glucosa que equivale a 0,56 mol (Papanikolaou y Aggelis, 2011), podría generar la síntesis de 1,1 mol de Acetil-CoA, por ende se generarían 0,32 g de aceite unicelular por gramo de glucosa consumido (Shaigani et al., 2021), por lo que medios de cultivo con mayor concentración de glucosa contribuirían a maximizar la productividad de aceite unicelular, esta información se contrasta con la investigación realizada por Tsai et al. (2022) que evaluaron la capacidad de producir aceite unicelular en una cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* al usar glucosa como fuente de carbono en concentraciones de 40, 60, 80 y 100 g/L, concluyendo que el contenido de aceites se incrementó a medida que aumentó la concentración y determinaron que la concentración de 40 g/L era insuficiente y que al agotarse no permitía el crecimiento de la levadura; de igual forma Sha (2013) concluyeron que un medio de cultivo que contenía 70 g/L de glucosa generó la máxima productividad en las levaduras *Lipomyces lipofer*, *Lipomyces starkeyi*, *Yarrowia lipolytica* y *Rhodotorula glutinis*; no obstante, ninguno de estos autores consideraron a la fuente de carbono como único factor influyente en la productividad de aceite unicelular en levaduras oleaginosas ya que consideraron en su estudio a la fuente de nitrógeno y sus condiciones limitantes.

La fuente de nitrógeno elegida en la investigación fue de tipo inorgánico que contenía 1 g/L de nitrato de amonio y 2 g/L de sulfato de amonio; este último, además de aportar nitrógeno, también aportó azufre que actuó también como factor limitante para la producción de aceite unicelular. El sulfato, como factor limitante, es capaz de influir en el crecimiento celular y la producción de aceite unicelular (Sha, 2013); como lo demuestran Kitcha y Cheirsilp (2011) que concluyeron que el sulfato de amonio es la fuente de nitrógeno idónea para la producción de aceite unicelular y biomasa en las especies oleaginosas *T. spathulata* y *K. ohmeri*; mientras que en la investigación de Wu et al (2011) cultivaron *Rhodospiridium toruloides* Y4 en un medio limitado de sulfato logrando obtener alrededor de 57 % de productividad, demostrando que otro factor limitante para inducir la máxima productividad de aceite unicelular esta cepa es el sulfato a pesar de encontrarse en medios de cultivo con alta concentración nitrógeno, por lo que recomiendan tener en consideración al sulfato para explorar fuentes de carbono ricas en nitrógeno.

Durante la preparación de los medios de cultivo se observó que presentaban propiedades amortiguadoras y que el pH inicial oscilaba entre 6,2 y 6,4; lo que

implicó al uso de menor volumen de NaOH para el ajuste a pH 6,5; mientras que realizar cambios más drásticos de pH involucraba influir en el volumen del medio y en la concentración de los nutrientes; se presentó un caso similar en la investigación de Sha (2013) en donde el pH inicial del medio semisintético que empleó era de 5,8 y tuvo dificultad en ajustarlo a un pH más bajo debido a su propiedad amortiguadora. Sin embargo, se ha demostrado que el pH óptimo para la acumulación de lípidos es por lo general más bajo que el del crecimiento óptimo (Sha, 2013) y se debe tener en cuenta que en etapas de crecimiento activo, las células acidifican su medio por secreción directa de ácidos orgánicos, formación de dióxido de carbono, entre otros (Walker, 2009) por lo que elegir pH iniciales más ácidos implicarían la reducción de éste a medida de que la biomasa se incrementa, pudiendo ser perjudicial para el desarrollo de la levadura y la productividad. Se han realizado múltiples investigaciones sobre el efecto del pH inicial de los medios de cultivo, como Corpas-Rodríguez et al. (2020) que concluyeron que se incrementó la productividad de aceite unicelular con valores de pH entre 4,5 y 6,5, destacando el pH 6,5; después del cuál la productividad disminuyó. La mayoría de las levaduras crecen muy bien entre pH 4,5 y 6,5 (Walker, 2009) y algunas investigaciones demostraron que el pH no tiene influencia determinante sobre la producción de aceite unicelular, mientras que la temperatura tendría un efecto más significativo (Leveau y Bouix, 2000). Corroborando esta información Serrat-Díaz (2021) logró el incremento de la productividad en una cepa oleaginosa N° 75, no identificada, al incubarla en medios de cultivo con concentraciones altas de la fuente de carbono (80 g/L) y pH cercano a la neutralidad (6 y 6,5) y concluyeron que el pH no tuvo influencia significativa sobre la productividad de aceite unicelular, mientras que sí en el crecimiento pero sin variaciones notables.

En la investigación la temperatura de incubación elegida fue de 35 °C. Abeln y Chuck (2020) mencionan que temperaturas de incubación superiores a 30 °C conllevan a una reacción cinética avanzada; por otro lado Fakankun et al. (2019), y Lamers et al. (2016) recomiendan que para la producción de aceite unicelular a escala industrial la cepa debe ser capaz de tolerar amplios rangos de pH durante el crecimiento, un amplio rango de temperatura y tener la capacidad tolerar temperaturas altas sin perjudicar su productividad; a su vez Blanco Murillo (1986) demostró que la variación de la temperatura de incubación entre 25 y 35 °C no fue influyente para cambios significativos en el crecimiento de cepas de *Candida sp1.*,

Saccharomyces sp. y *Pichia sp.*, pero sí favoreció el crecimiento de una cepa no identificada de *Candida sp2*.

Se determinó que la relación C/N de 45:1 es óptima para la cepa SM11. En la Figura 4 se muestra la productividad de aceite unicelular de cada medio de cultivo modificado agrupadas de acuerdo a la relación C/N, en donde no se encontró diferencias estadísticas entre grupos. Sin embargo, se observó que con la relación C/N de 76:1 se obtuvo diferencias considerables en la productividad del medio de producción modificado 14 y 15 ya que generaron la menor y mayor productividad, resaltando que el parámetro distinto entre ellos fue el pH 6 y 6,5 respectivamente. Con la relación C/N de 24:1 se observó que los medios de producción modificado 6 y 16, obtuvieron la menor y mayor productividad respectivamente, siendo la temperatura el único parámetro distinto, obteniendo la mayor productividad a 35 °C y la menor a 28 °C. Con la relación C/N de 45:1 se observó que los medios de producción 11 y 12 presentaron baja productividad y ambas coincidían que el parámetro diferente frente los otros medios fue la temperatura de 28 °C. Relaciones de C/N elevadas incrementan el rendimiento de las levaduras oleaginosas, ya que cuando la concentración de nitrógeno disminuye se impide la formación de biomasa, mientras que la fuente de carbono disponible tiende a ser convertida en aceites (Ykema et al., 1986), tal como lo demuestra Kolouchová et al. (2016) que tuvieron como resultado que la relación de C/N de 30:1 fue la mejor para la productividad en las especies oleaginosas *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon cutaneum* y *Candida sp.*; mientras que Banerjee et al. (2020) determinaron que en procesos de escalamiento, la capacidad productiva de *Rhodotorula mucilaginosa* IIPL32 incrementó de 0,4 gr/L a 1,3 gr/L con la relación C/N 40:1. Por otro lado Quiroz Rodríguez (2020) identificó que *Rhodotorula mucilaginosa* cultivada en diferentes medios con relación C/N de 2:1 y 100:1 presentaron 20,15 % y 23,14 % de productividad de aceite unicelular respectivamente, sin embargo no evaluaron relaciones C/N intermedias a los valores evaluados.

En la cuarta etapa de la investigación se elaboraron seis medios de producción con suplementos orgánicos y se compararon con el medio de producción modificado 24 (Figura 5). Los medios de producción orgánicos suplementados con cáscara de plátano, chancaca y cáscara de tuna lograron que el porcentaje de la productividad de aceite unicelular se encuentre entre 23,26 % y 54,76 %, mientras que los medios suplementados con lactosuero, cascarilla de quinua y melaza generaron porcentajes de productividad menores, entre 4,46 % y 17,39%.

A que aparte de la concentración de la fuente de carbono, es indispensable la correcta selección de fuentes de carbono para inducir la máxima productividad de aceite unicelular en las levaduras oleaginosas (Tsai et al., 2022), las cuales son capaces de metabolizar a una diversa gama de fuentes de carbono (Aliyu et al., 2021), lo que permite reducir los costos de producción al reemplazar la fuente de carbono en base a insumos químicos puros por subproductos agroindustriales o alimentarios (Grubišić et al., 2022). El uso de cáscara de plátano como fuente de carbono fue evaluado por Han et al. (2019), quienes la pretrataron con ácido sulfúrico al 1 % en 120 °C por 40 min y molieron hasta obtener harina con la cual suplementaron medios de cultivo para *Cryptococcus sp.* aislado de un pescado fermentado, logrando el 34,0 % de productividad de aceite unicelular de alto grado de monosaturación, idóneo para la producción de biodiesel de calidad; destacaron también que el pretratamiento generó una solución que contenía aproximadamente 4,5 g/L de glucosa y 18,1 g/L de fructosa demostrando el uso potencial de la cáscara de plátano para el cultivo de levaduras oleaginosas. Chaturvedi et al. (2018) incubaron a una cepa de *Rhodotorula glutines* NRRL Y-1091 en fermentación sólida y sumergida durante ocho días en un medio de producción con cáscara de plátano molida no pretratada, induciendo la producción de aceite unicelular cuya composición favorecía la producción de biodiesel de buena calidad y determinaron que paralelamente se generaron amilasas, celulasas e inulinasas que facilitaron la asimilación de polisacáridos presentes en la cáscara de plátano; continuando con esa línea de investigación Chaturvedi et al. (2019) emplearon la cáscara de plátano como fuente de carbono, logrando favorecer el crecimiento microbiano y la productividad de aceite unicelular de *Cryptococcus curvatus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces pastorianus*, *Trichosporon cutaneum*, *Lipomyces starkeyi* y *Rhodotorula glutinis*; y evidenciaron que en todos los casos se observó la actividad de celulasas, amilasas e inulinasas. Por otro lado, el lactosuero no fue una adecuada fuente de nitrógeno debido a que no todas las especies de levaduras oleaginosas tienen la capacidad de asimilar lactosa (Kurtzman y Fell, 2000), como se observa en el resultado obtenido por Serrat-Díaz (2021) que al analizar la productividad de una cepa oleaginosa en un medio suplementado con lactosuero, concluyó que el carbono aportado por esta fuente actuó de forma negativa al disminuir la productividad de aceite unicelular, por lo cual no recomiendan su uso. Para que esta fuente de carbono sea adecuada para medios de cultivos, la cepa deberá ser lactosa positiva con capacidad de

asimilar paralelamente a péptidos y proteínas (Abeln y Chuck, 2021). La cáscara de tuna contiene alta concentración de carbohidratos que podrían ser usados para la producción de medios de cultivo, pero no se encontraron investigaciones que usaran este subproducto para la producción de aceite unicelular; sin embargo Hassan et al. (1994) usó el jugo de este fruto diluido al 25 %, produciendo aceite unicelular con la levadura *Cryptococcus curvatus* al incubarlas en el jugo que inicialmente contenía 10,0 gramos de glucosa y 12,7 gramos de fructosa por litro y relación C/N de 50:1, logrando 11 g/L de biomasa y 46 % (p/p) de aceite unicelular, y observaron que el orden de asimilación de azúcares del medio fue primero la glucosa seguida de la fructosa. Teniendo en cuenta dicha investigación, se observó que la cepa SM11 tiene la capacidad de asimilación de ambos tipos de azúcares; sin embargo, el cambio de tipo de fuente de carbono podría haber repercutido negativamente en la productividad de aceite unicelular y además se debe tener en cuenta que la cáscara de tuna tiene menor contenido de azúcares que el jugo. El medio de cultivo orgánico suplementado con chancaca y melaza no fueron adecuados para la productividad de la cepa SM11, ambas fuentes de carbono contienen alto porcentaje de azúcares; sin embargo, no se han reportado estudios que usen a la chancaca para medios de cultivo. La melaza, a pesar de contener alta concentración de azúcares contiene también factores que inhiben la producción de aceite unicelular como alta concentración de nitrógeno (Bao et al., 2021) e iones metálicos como Mg^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , y Cu^{2+} que tienen la capacidad de actuar como cofactores enzimáticos para la producción de lípidos, sin embargo al encontrarse en concentraciones superiores a valores óptimos actuarían como inhibidores de crecimiento (Corpas-Rodríguez et al., 2020). Esto se demostró en la investigación de Serrat-Díaz (2021), quien observó que medios de cultivos suplementados con melaza generaron la disminución significativa de la productividad de aceite unicelular, debido a que se generó un exceso de nitrógeno en el medio de cultivo y Boviatsi et al. (2020) evaluaron la producción de aceite unicelular por la levadura *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y2701 incubadas en un medio de cultivo con melaza como fuente de carbono suplementado con elementos traza y sales de fosfato, obteniendo como resultado que los suplementos reducen significativamente la velocidad del consumo de los azúcares disponibles en el medio. En la investigación, la cascarilla de quinua pretratada representó a los subproductos lignocelulósicos que abundan en nuestro país, pero no generó una adecuada productividad de aceite unicelular en la cepa SM11.

Diferentes procedimientos de pretratamiento convierten la materia lignocelulósica compleja en azúcares más simples como C5 o C6 que son fácilmente asimiladas por las levaduras oleaginosas (Sreeharsha y Mohan, 2020); sin embargo, también generan compuestos tóxicos e inhibidores de crecimiento como hidroximetilfurfural (HMF), compuestos fenólicos, furfurales (Chen et al., 2009), vainilla, ácido acético que limitan la producción de aceite unicelular a partir de materia lignocelulósica (Jönsson y Martín, 2016).

La identificación de la cepa SM11 (Tabla 13) concluyó que se trataba de la especie *Rhodotorula mucilaginosa* cuyas características macroscópicas y microscópicas se observan en la figura 7; esta especie pertenece a la división Basidiomycota y tiene una distribución mundial en hábitats terrestres, acuáticos y marinos (Kurtzman y Fell, 2000). El género de esta especie se caracteriza por sus colonias rojas, se ha determinado que las especies de este género acumulan entre 40 y 77 % de aceite unicelular al ser cultivadas en medios con limitación de nitrógeno y además tienen la capacidad de sintetizar compuestos carotenoides, terpenoides y enzimas específicas de alto valor comercial (Chattopadhyay y Maiti, 2021). Así lo demuestran Li et al. (2010), quienes aislaron una cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a a partir de la superficie de peces marinos y Olivera León, 2020, que logró aislarla de suelos de la cuenca baja–media del río Chicama en Perú. En la actualidad, esta levadura roja ha despertado interés debido a su alto potencial biotecnológico ya que tiene la capacidad de asimilar diversas fuentes de carbono, alta tolerancia a condiciones de estrés y colonias con pigmentación roja, considerándola como buena candidata para la refinera de aceite unicelular, productos carotenoides, enzimas y otros productos funcionales que se pueden producir de forma paralela además que su uso es seguro debido a su baja patogenicidad; sin embargo hay diferencias en la productividad entre cepas de la misma especie, por lo que se requiere de la optimización individual (Z. Li et al., 2022).

VI. CONCLUSIONES

1. Se aislaron 15 cepas de levaduras oleaginosas a partir de muestras de suelo de cultivo de palta y mecánicas automotrices, semillas de cacao orgánico y quesos artesanales de la región de Ayacucho.
2. Se observó que las características macroscópicas frecuentes en las cepas aisladas fueron: forma circular: 80 %; elevación convexa: 60 % y margen entero: 53,3 %.
3. Se determinó la capacidad productiva del aceite unicelular de cada cepa de levadura aislada, destacando SM11 con 37,5 % de productividad de aceite unicelular, identificada como *Rhodotorula mucilaginosa* SM11.
4. Se formuló 24 medios de producción modificada (MPM), de los cuales los medios 15, 16, 22, 23 y 24 generaron la máxima productividad entre 73,14 % y 79,35 % en *Rhodotorula mucilaginosa* SM11. El parámetro físico común fue la temperatura de incubación a 35 °C.
5. Se determinó al medio de producción modificado 24 como el óptimo para *Rhodotorula mucilaginosa* SM11 obteniendo un 73,67 % de productividad de aceite unicelular. Los parámetros del medio fueron: temperatura de incubación a 35 °C, concentración de glucosa a 75 g/L, fuente de nitrógeno inorgánico y pH 6,5.
6. Se formuló 6 medios de producción orgánicos, logrando 54,76 % de productividad de aceite unicelular con el medio de producción de cáscara de plátano (MPOP).

VII. RECOMENDACIONES

- Explorar la capacidad de crecimiento a condiciones no estériles de las cepas de levaduras oleaginosas aisladas.
- Evaluar la capacidad de productividad de aceite unicelular de *Rhodotorula mucilaginosa* SM11 usando fuentes de carbono como aceites usados o suelos contaminados con hidrocarburos.
- Evaluar la capacidad de producción de compuesto carotenogénicos de *Rhodotorula mucilaginosa* SM11.
- Evaluar la productividad de aceite unicelular de *Rhodotorula mucilaginosa* SM11 en un cultivo por lotes alimentados.
- Evaluar el perfil lipídico del aceite producido por la cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* SM11.
- Incorporar más parámetros de productividad de aceite unicelular como porcentaje de aireación, cantidad de inóculo y concentración del sulfato de amonio.
- Evaluar la relación C/N de los medios de producción orgánicos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeln, F. y Chuck, C. J. (2020). The role of temperature, pH and nutrition in process development of the unique oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(4), 1163-1172. <https://doi.org/10.1002/jctb.6301>
- Abeln, F. y Chuck, C. J. (2021). The history, state of the art and future prospects for oleaginous yeast research. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01712-1>
- Aguilar-Uscanga, B. y François, J. m. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, 37(3), 268-274. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x>
- Aksu, Z. y Eren, A. T. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 40(9), 2985-2991. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.011>
- Alahuhta, M., Xu, Q., Knoshaug, E. P., Wang, W., Wei, H., Amore, A., Baker, J. O., Vander Wall, T., Himmel, M. E. y Zhang, M. (2021). Chimeric cellobiohydrolase I expression, activity, and biochemical properties in three oleaginous yeast. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01856-z>
- Ayadi, I., Belghith, H., Gargouri, A. y Guerfali, M. (2018). Screening of new oleaginous yeasts for single cell oil production, hydrolytic potential exploitation and agro-industrial by-products valorization. *Process Safety and Environmental Protection*, 119, 104-114. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.07.012>
- Banerjee, A., Sharma, T., Nautiyal, A. K., Dasgupta, D., Hazra, S., Bhaskar, T. y Ghosh, D. (2020). Scale-up strategy for yeast single cell oil production for *Rhodotorula mucilaginosa* IIP32 from corn cob derived pentosan. *Bioresource Technology*, 309, 123329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123329>
- Bao, W., Li, Z., Wang, X., Gao, R., Zhou, X., Cheng, S., Men, Y. y Zheng, L. (2021). Approaches to improve the lipid synthesis of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 149, 111386. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111386>
- Blanco Murillo, M. (1986). *Estudio preliminar de una fermentación oleaginosa de banano* [Pregrado, Universidad de Costa Rica]. <https://kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/77012>
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959). *A rapid method of total lipid extraction and purification*. 37(8), 7.
- Boviatsi, E., Papadaki, A., Efthymiou, M., Nychas, G. E., Papanikolaou, S., Silva, J. A. C., Freire, D. M. G. y Koutinas, A. (2020). Valorisation of sugarcane molasses for the production of microbial lipids via fermentation of two *Rhodospiridium* strains for enzymatic synthesis of polyol esters. *Journal of*

- Chemical Technology & Biotechnology*, 95(2), 402-407.
<https://doi.org/10.1002/jctb.5985>
- Brandenburg, J., Blomqvist, J., Shapaval, V., Kohler, A., Sampels, S., Sandgren, M. y Passoth, V. (2021). Oleaginous yeasts respond differently to carbon sources present in lignocellulose hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01974-2>
- Brown, A. E., y Smith, H. R. (2017). *Benson's Microbiological Applications: Laboratory manual in general microbiology, concise version*. (14.^a ed.). McGraw-Hill Education.
- Cardozo Guzmán, M. C. C. C. y Moreno Cardozo, J. H. M. H. (2012). *Diseño y optimización de un medio de cultivo a base de melaza de caña para la producción de biomasa a partir de Saccharomyces cerevisiae* [Pregrado, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11788/CardozoGuzmanMariaCamila2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carrasco, C., Cuno, D., Carlqvist, K., Galbe, M. y Lidén, G. (2015). SO₂ catalysed steam pretreatment of quinoa stalks. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(1), 64-71. <https://doi.org/10.1002/jctb.4286>
- Carrión, K. M. (2013). *Reutilización de residuos de la cáscara de banano (Musa paradisiaca) y plátanos (Musa sapientum) para la producción de alimentos destinados al consumo humano* [Pregrado]. Universidad de Guayaquil.
- Cerón Montes, G. I. (2007). *Aislamiento, identificación y pruebas de fermentación en cultivo puro y mixto de levaduras del Tepache* [Pregrado, Instituto Politécnico Nacional]. <file:///E:/TESIS/REDACCION/Bibliograf%C3%ADa/Bibliograf%C3%ADa%20revisada/Cer%C3%B3n%20Montes.pdf>
- Chattopadhyay, A. y Maiti, M. K. (2021). Lipid production by oleaginous yeasts. En *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 116, pp. 1-98). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2021.03.003>
- Chaturvedi, S., Bhattacharya, A., Nain, L., Prasanna, R. y Khare, S. K. (2019a). Valorization of agro-starchy wastes as substrates for oleaginous microbes. *Biomass and Bioenergy*, 127, 105294. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105294>
- Chaturvedi, S., Kumari, A., Bhattacharya, A., Sharma, A., Nain, L. y Khare, S. K. (2018). Banana peel waste management for single-cell oil production. *Energy, Ecology and Environment*, 3(5), 296-303. <https://doi.org/10.1007/s40974-018-0101-3>
- Chen, X., Li, Z., Zhang, X., Hu, F., Ryu, D. D. Y. y Bao, J. (2009). Screening of Oleaginous Yeast Strains Tolerant to Lignocellulose Degradation Compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159(3), 591-604. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8491-x>
- Coradini, A. L. V., Anschau, A., Vidotti, A. D. S., Reis, É. M., da Cunha Abreu Xavier, M., Coelho, R. S. y Franco, T. T. (2015). Microorganism for Bioconversion of Sugar Hydrolysates into Lipids. En B. Kamm (Ed.), *Microorganisms in Biorefineries* (Vol. 26, pp. 51-78). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45209-7_3

- Corpas-Rodríguez, N., Gálvez-Cantero, L., Morell-Nápoles, G., López, J. A. C., Ramos-Sánchez, L. B. y Julián-Ricardo, M. C. (2020). Aspectos claves en la producción de aceite microbiano. *Afinidad. Journal of Chemical Engineering Theoretical and Applied Chemistry*, 77(589), Art. 589. <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/367905>
- Cuellar, E. A. (2018). *Caracterización física de películas comestibles obtenidas de mucílago de cáscara de tuna (Opuntia spp) y almidón de cáscara de papa (Solanum tuberosum)* [Pregrado]. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.
- Enshaeieh, M., Abdoli, A., Nahvi, I. y Madani, M. (2012). Bioconversion of different carbon sources into microbial oil and biodiesel using oleaginous yeasts. *Journal of Biology and Today's World*, 1(2). <https://doi.org/10.15412/J.JBTW.01010203>
- Fakankun, I., Mirzaei, M. y Levin, D. B. (2019). Impact of Culture Conditions on Neutral Lipid Production by Oleaginous Yeast. En V. Balan (Ed.), *Microbial Lipid Production* (Vol. 1995, pp. 311-325). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9484-7_18
- Frederiks, W. M. (1977). Some aspects of the value of Sudan Black B in lipid histochemistry. *Histochemistry*, 54(1), 27-37. <https://doi.org/10.1007/BF00493326>
- Garay, L. A., Sitepu, I. R., Cajka, T., Chandra, I., Shi, S., Lin, T., German, J. B., Fiehn, O. y Boundy-Mills, K. L. (2016). Eighteen new oleaginous yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(7), 887-900. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1765-3>
- García Bustamante, H. (2013). *Matriz energética en el Perú y energías renovables: Vol. VIII* (Fundación Friedrich Eber-Derecho, Ambiente y Recursos Naturales).
- Gosalawit, C., Imsoonthornruksa, S., Gilroyed, B. H., Mcnea, L., Boontawan, A. y Ketudat-Cairns, M. (2021). The potential of the oleaginous yeast *Rhodotorula paludigena* CM33 to produce biolipids. *Journal of Biotechnology*, 329, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.01.021>
- Grández Armas, L. (2003). *Mejoramiento tecnológico en la elaboración de chancaca y evaluación de empaques de almacenamiento* [Pregrado]. Universidad Nacional de San Martín.
- Grubišić, M., Galić Perečinec, M., Peremin, I., Mihajlovski, K., Beluhan, S., Šantek, B. y Ivančić Šantek, M. (2022). Optimization of Pretreatment Conditions and Enzymatic Hydrolysis of Corn Cobs for Production of Microbial Lipids by *Trichosporon oleaginosus*. *Energies*, 15(9), Art. 9. <https://doi.org/10.3390/en15093208>
- Guamán-Burneo, C. y Carvajal-Barriga, J. (2009). Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. *Universitas Scientiarum*, 14(2-3), 187. <https://doi.org/10.11144/javeriana.SC14-2-3.ceid>
- Guo, Z., Duquesne, S., Bozonnet, S., Cioci, G., Nicaud, J.-M., Marty, A. y O'Donohue, M. J. (2015). Development of cellobiose-degrading ability in *Yarrowia lipolytica* strain by overexpression of endogenous genes.

- Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0289-9>
- Han, S., Kim, G.-Y. y Han, J.-I. (2019). Biodiesel production from oleaginous yeast, *Cryptococcus* sp. By using banana peel as carbon source. *Energy Reports*, 5, 1077-1081. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2019.07.012>
- Hassan, M., Blanc, P. J., Pareilleux, A. y Goma, G. (1994). Production of single-cell oil from prickly-pear juice fermentation by *Cryptococcus curvatus* grown in batch culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 10(5), 534-537. <https://doi.org/10.1007/BF00367661>
- Hernansaez Meoro, P. (1962). *Clave dicotómica para la determinación de géneros de levaduras*. 74.
- Hittinger, C. T., Rokas, A., Bai, F.-Y., Boekhout, T., Gonçalves, P., Jeffries, T. W., Kominek, J., Lachance, M.-A., Libkind, D., Rosa, C. A., Sampaio, J. P. y Kurtzman, C. P. (2015). Genomics and the making of yeast biodiversity. *Current Opinion in Genetics & Development*, 35, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.10.008>
- Huang, C., Chen, X., Xiong, L., Chen, X., Ma, L. y Chen, Y. (2013). Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology Advances*, 31(2), 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.010>
- Jiménez Bermúdez, L. B. (2013). *Estudio de la melanina como fotocatalizador para la degradación de colorantes: Rodamina B* [MasterThesis]. <https://repositorio.ipicyt.edu.mx//handle/11627/2990>
- Khot, M. y Ghosh, D. (2017). Lipids of *Rhodotorula mucilaginosa* IIP132 with biodiesel potential: Oil yield, fatty acid profile, fuel properties. *Journal of Basic Microbiology*, 57(4), 345-352. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600618>
- Khot, M., Raut, G., Ghosh, D., Alarcón-Vivero, M., Contreras, D. y Ravikumar, A. (2020). Lipid recovery from oleaginous yeasts: Perspectives and challenges for industrial applications. *Fuel*, 259, 116292. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116292>
- Kitcha, S. y Cheirsilp, B. (2011). Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. *Energy Procedia*, 9, 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.09.029>
- Kolouchová, I., Maňátková, O., Sigler, K., Masák, J. y Řezanka, T. (2016). Lipid accumulation by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. *Folia Microbiologica*, 61(5), 431-438. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0454-y>
- Koutinas, A. A. y Papanikolaou, S. (2011). Biodiesel production from microbial oil. En *Handbook of Biofuels Production* (pp. 177-198). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857090492.2.177>
- Kunthiphun, S., Chokreansukchai, P., Hondee, P., Tanasupawat, S. y Savarajara, A. (2018). Diversity and characterization of cultivable oleaginous yeasts isolated from mangrove forests. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 34(9), 125. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2507-7>

- Kurtzman, C. P. (1994). Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, 10(13), 1727-1740. <https://doi.org/10.1002/yea.320101306>
- Kurtzman, C. P. y Fell, J. W. (Eds.). (2000). *The yeasts: A taxonomic study* (4th ed). Elsevier.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. y Robert, V. (2011). Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. En *The Yeasts* (pp. 87-110). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>
- Lamers, D., van Biezen, N., Martens, D., Peters, L., van de Zilver, E., Jacobs-van Dreumel, N., Wijffels, R. H. y Lokman, C. (2016). Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. *BMC Biotechnology*, 16(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0276-7>
- Leveau, J. Y. y Bouix, M. (2000). *Microbiología industrial: Los microorganismos de interés industrial* (ACRIBIA S.A.). Technique & Documentation-Lavoisier.
- Li, M., Liu, G.-L., Chi, Z. y Chi, Z.-M. (2010). Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass and Bioenergy*, 34(1), 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.10.005>
- Li, Z., Li, C., Cheng, P. y Yu, G. (2022). *Rhodotorula mucilaginosa*—Alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon*, 8(11), e11505. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11505>
- López, G. B. y Montaña, F. J. G. (2014). *Propiedades funcionales del plátano (Musa sp)*.
- López Orozco, M., Mercado Flores, J., Martínez Soto, G. y Magaña Ramírez, J. L. (2011). Formulación de una mermelada a partir de pulpa y cáscara de tunas (*Opuntia spp.*) elaborada a nivel planta piloto. *Acta Universitaria*, 21(2), 31-36. <https://doi.org/10.15174/au.2011.33>
- Mata Arias, L. (2017). *Tabla de composición de materias primas usadas en alimentos para animales* (2.ª ed.). Centro de Investigación en Nutrición Animal.
- Méndez Polo, C. A. (2019). *Aislamiento e identificación de cepas de levaduras con elevada capacidad de producción de biodiesel*. Universidad Nacional de Trujillo.
- Meyhuay, M. (s. f.). *Quinua: Operaciones de Poscosecha* (AGSI/FAO). FAO. <https://www.fao.org/3/ar364s/ar364s.pdf>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 3(31), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Montes de Oca, R., Salem, A. Z. M., Kholif, A. E., Monroy, H., Pérez, L. S., Zamora, J. L. y Gutiérrez, A. (2016). *YEAST: DESCRIPTION AND STRUCTURE*. 10.
- Mukhtar, H., Suliman, S. M., Shabbir, A., Mumtaz, M. W., Rashid, U. y Rahimuddin, S. A. (2018). Evaluating the Potential of Oleaginous Yeasts as Feedstock for Biodiesel Production. *Protein & Peptide Letters*, 25(2), 195-201. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180122112805>

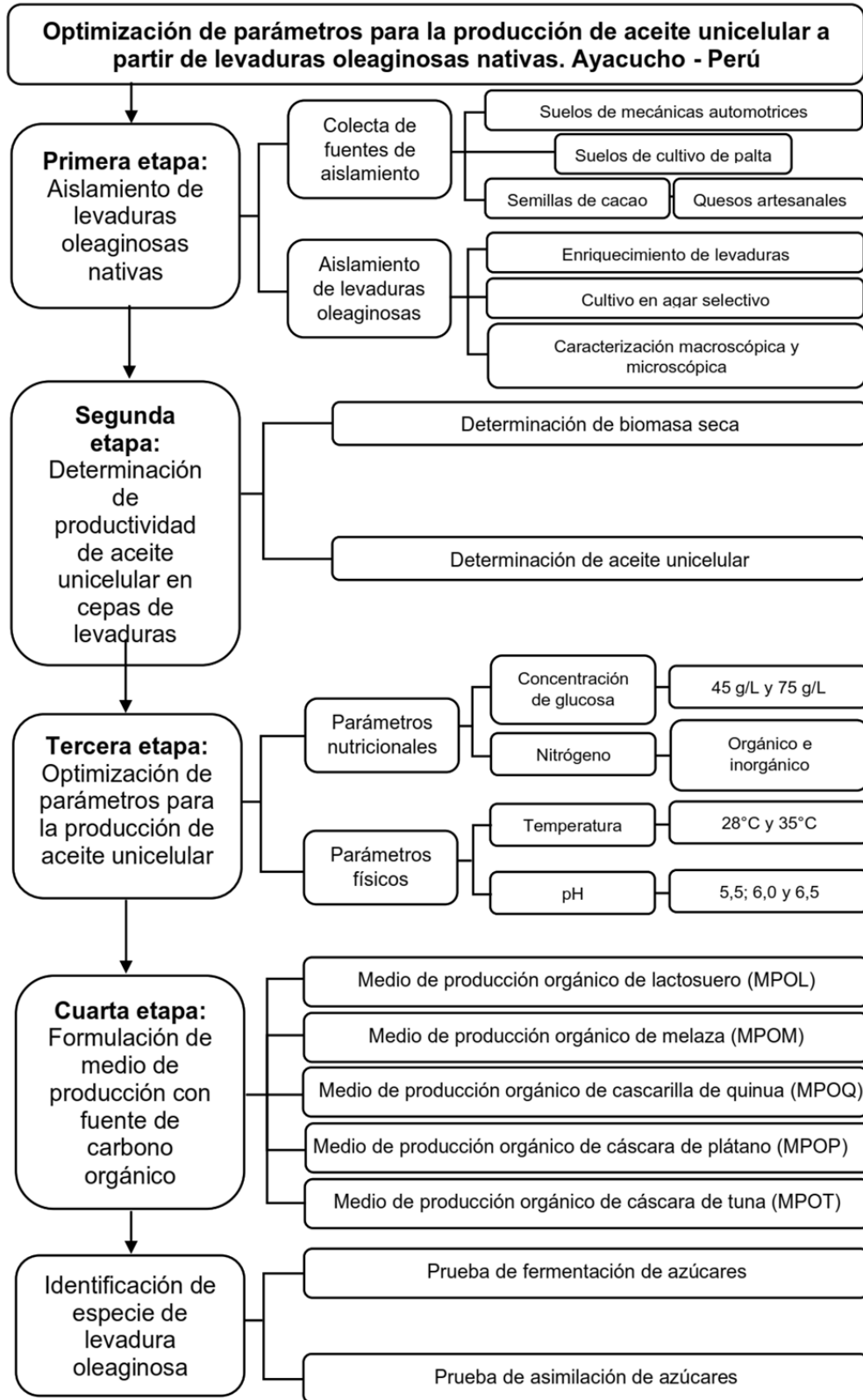
- Niehus, X., Casas-Godoy, L., Vargas-Sánchez, M. y Sandoval, G. (2018). A Fast and Simple Qualitative Method for Screening Oleaginous Yeasts on Agar. *Journal of Lipids*, 2018, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2018/5325804>
- Olivera León, C. F. (2020). *Aislamiento, selección e identificación de cepas de levadura de elevada acumulación de lípidos en el cuenca baja—Media del río Chicama* [Tesis pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]. <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/17035>
- Pan, L.-X., Yang, D.-F., Shao, L., Li, W., Chen, G.-G. y Liang, Z.-Q. (2009). *Isolation of the Oleaginous Yeasts from the Soil and Studies of Their Lipid-Producing Capacities*. 6.
- Paniagua Bermejo, S., Prado-Guerra, A., García Pérez, A. I. y Calvo Prieto, L. F. (2020). Study of quinoa plant residues as a way to produce energy through thermogravimetric analysis and indexes estimation. *Renewable Energy*, 146, 2224-2233. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.056>
- Papanikolaou, S. y Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1052-1073. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100015>
- Pi, H.-W., Anandharaj, M., Kao, Y.-Y., Lin, Y.-J., Chang, J.-J. y Li, W.-H. (2018). Engineering the oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for simultaneous β -carotene and cellulase production. *Scientific Reports*, 8(1), 10850. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29194-z>
- Piškur, J. y Compagno, C. (Eds.). (2014). *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-55013-3>
- Qasim, W. S. y Sultan, R. H. (2020). Production of single cell oil from local isolates of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.10.2.279-283>
- Qin, L., Liu, L., Zeng, A.-P. y Wei, D. (2017). From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology*, 245, 1507-1519. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.163>
- Quiroz Rodríguez, F. J. (2020). *Estudio comparativo de la cinética de crecimiento de tres cepas de Rhodotorula en medios Carbono/Nitrógeno 2:1 y 100:1* [Pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/17203>
- Ramadan, M. F. y Mörsel, J.-T. (2003). Recovered lipids from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peel: A good source of polyunsaturated fatty acids, natural antioxidant vitamins and sterols. *Food Chemistry*, 83(3), 447-456. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00128-6)
- Ramírez Sedeño, K. (2019). *Generación de residuos de plátano y su posible utilización para apoyar la seguridad alimentaria* [Pregrado]. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Ratledge, C. (2005). *Single Cell Oils for the 21st Century*. 20.
- Sabouraud Agar. (2019). Biorad. https://commerce.biorad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/56524_2019_07_ES.pdf

- Salas-Veizaga, D. M., Villagomez, R., Linares-Pastén, J. A., Carrasco, C., Álvarez, M. T., Adlercreutz, P. y Nordberg Karlsson, E. (2017). Extraction of Glucuronoarabinoxylan from Quinoa Stalks (*Chenopodium quinoa* Willd.) and Evaluation of Xylooligosaccharides Produced by GH10 and GH11 Xylanases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(39), 8663-8673. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01737>
- Samanta, I. (2015). General Characteristics of Fungi. En I. Samanta (Ed.), *Veterinary Mycology* (pp. 3-8). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2280-4_2
- Schneider, T., Rempp, T., Graeff-Hönninger, S., French, W. T., Hernandez, R. y Claupein, W. (2013). Utilization of Soluble Starch by Oleaginous Red Yeast; *Rhodotorula glutinis*; *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 03(01), 57-63. <https://doi.org/10.4236/jsbs.2013.31007>
- Serrat-Díaz, M. (2021). *Optimización de la producción de lípidos a partir de lactosuero y melaza por una cepa de levadura oleaginoso*. 33(3), 18.
- Sha, Q. (2013). *A comparative study on four oleaginous yeasts on their lipid accumulating capacity*. 2013:7. <https://stud.epsilon.slu.se/5694/>
- Shaigani, P., Awad, D., Redai, V., Fuchs, M., Haack, M., Mehlmer, N. y Brueck, T. (2021). Oleaginous yeasts- substrate preference and lipid productivity: A view on the performance of microbial lipid producers. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 220. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01710-3>
- Sreeharsha, R. V. y Mohan, S. V. (2020). Obscure yet Promising Oleaginous Yeasts for Fuel and Chemical Production. *Trends in Biotechnology*, 38(8), 873-887. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.02.004>
- Sudán negro B*. (s. f.). Fisher Scientific. Recuperado 24 de enero de 2023, de <https://www.fishersci.es/shop/products/sudan-black-b-9/15494669>
- Tai, M. y Stephanopoulos, G. (2013). Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*, 15, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.08.007>
- Taskin, M., Saghafian, A., Aydogan, M. N. y Arslan, N. P. (2015). Microbial lipid production by cold-adapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9(5), 595-605. <https://doi.org/10.1002/bbb.1560>
- Thakur, M. S., Prapulla, S. G. y Karanth, N. G. (1988). *Estimation of intracellular lipids by the measurement of absorbance of yeast cells stained with Sudan Black B*. 11, 3.
- Tsai, S.-Y., Yu, H.-T. y Lin, C.-P. (2022). The Potential of the Oil-Producing Oleaginous Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* for Sustainable Production of Bio-Oil Energy. *Processes*, 10(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/pr10020336>
- Valdés, G., Mendonça, R. T. y Aggelis, G. (2020). Lignocellulosic Biomass as a Substrate for Oleaginous Microorganisms: A Review. *Applied Sciences*, 10(21), Art. 21. <https://doi.org/10.3390/app10217698>
- Vasconcelos, B., Teixeira, J. C., Dragone, G. y Teixeira, J. A. (2019). Oleaginous yeasts for sustainable lipid production—From biodiesel to surf boards, a

- wide range of “green” applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(9), 3651-3667. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09742-x>
- Vila Condori, N. (2017). *La chancaca de Ágave americana en la alimentación complementaria de colonias de Apis mellifera. Wallapampa, Ayacucho* [Pregrado]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Humanga.
- Viñarta, S. C., Angelicola, M. V., Barros, J. M., Fernández, P. M., Mac Cormak, W., Aybar, M. J. y de Figueroa, L. I. C. (2016). Oleaginous yeasts from Antarctica: Screening and preliminary approach on lipid accumulation: Microbial lipids production by Antarctic yeasts. *Journal of Basic Microbiology*, 56(12), 1360-1368. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600099>
- Walker, G. M. (2009). Yeasts. En M. Schaechter (Ed.), *Desk encyclopedia of microbiology* (pp. 1174-1187). Academic Press/Elsevier.
- Wang, G.-Y., Zhang, Y., Chi, Z., Liu, G.-L., Wang, Z.-P. y Chi, Z.-M. (2015). Role of pyruvate carboxylase in accumulation of intracellular lipid of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1637-1645. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6236-z>
- Xue, S.J., Chi, Z., Zhang, Y., Li, Y.-F., Liu, G.L., Jiang, H., Hu, Z. y Chi, Z.-M. (2018). Fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(7), 1049-1060. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1428167>
- Ykema, A., Verbree, E. C., van Verseveld, H. W. y Smit, H. (1986). Mathematical modelling of lipid production by oleaginous yeasts in continuous cultures. *Antonie van Leeuwenhoek*, 52(6), 491-506. <https://doi.org/10.1007/BF00423410>
- Yuzbasheva, E. Y., Agrimi, G., Yuzbashev, T. V., Scarcia, P., Vinogradova, E. B., Palmieri, L., Shutov, A. V., Kosikhina, I. M., Palmieri, F. y Sineoky, S. P. (2019). The mitochondrial citrate carrier in *Yarrowia lipolytica*: Its identification, characterization and functional significance for the production of citric acid. *Metabolic Engineering*, 54, 264-274. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.05.002>
- Zweytick, D., Athenstaedt, K. y Daum, G. (2000). Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1469(2), 101-120. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00294-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00294-7)

ANEXOS

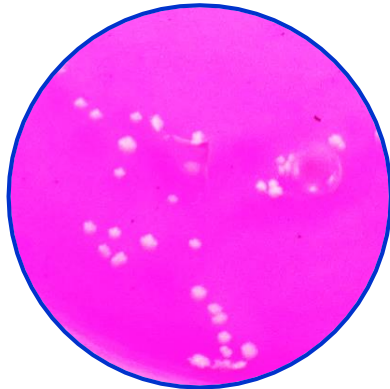
Anexo 1. Flujograma de investigación. Ayacucho, 2021.



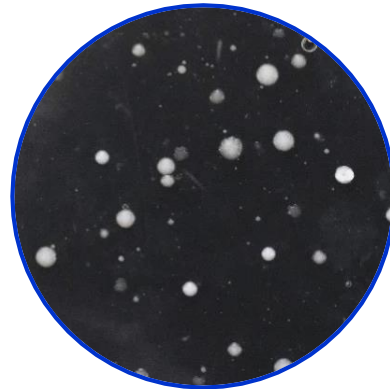
Anexo 2. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas de levaduras oleaginosas aislada incubadas en medio de selección de levaduras oleaginosas, agar Sabouraud y medio de producción estándar, incubadas durante 120 horas a 28 °C. Ayacucho, 2021.

1. Características de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126

Características macroscópicas de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126



A.1. Colonias de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 en medio de selección de levaduras oleaginosas.



B.1. Colonias de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 en agar Sabouraud.

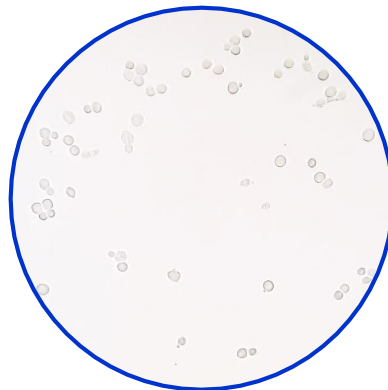
Características microscópicas de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126



C.1. Observación directa de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 a un aumento de 400 X.



D.1. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



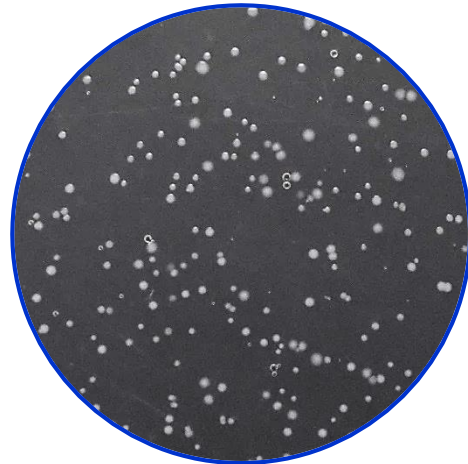
A. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X.

2. Características de cepa de levadura C21

Características macroscópicas de cepa de levadura C21

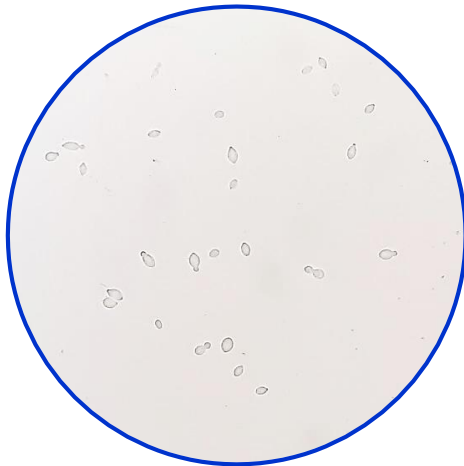


A.2. Colonias de cepa de levadura C21 en medio de selección de levaduras oleaginosas.

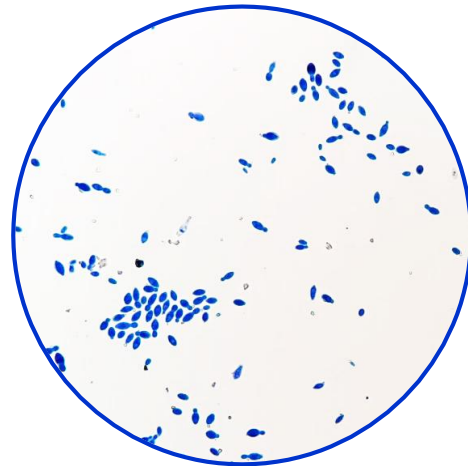


B.2. Colonias de cepa de levadura C21 en agar Sabouraud.

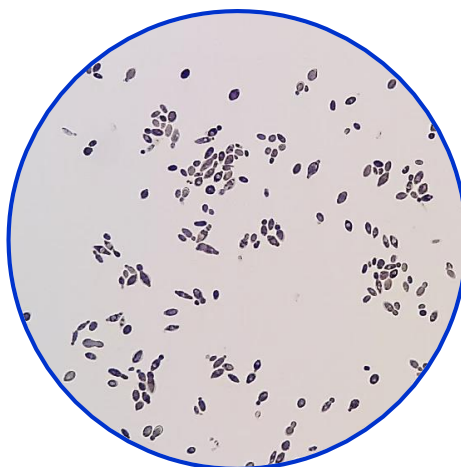
Características microscópicas de cepa de levadura C21



C.2. Observación directa de cepa de levadura C21 a un aumento de 400 X.



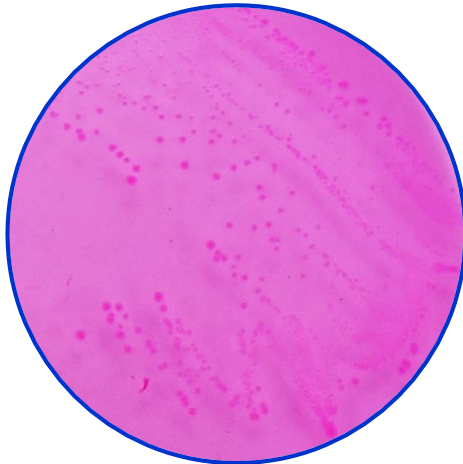
D.2. Cepa de levadura C21 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



E.2. Cepa de levadura C21 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X.

3. Características de cepa de levadura C22

Características macroscópicas de cepa de levadura C22

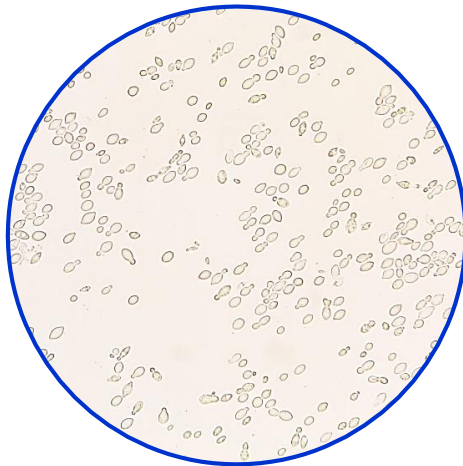


A.3. Colonias de cepa de levadura C22 en medio de selección de levaduras oleaginosas.

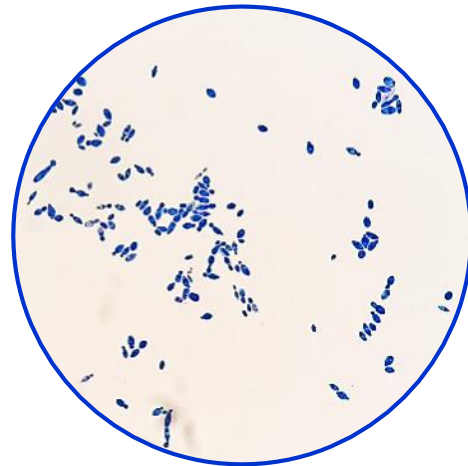


B.3. Colonias de cepa levadura C22 en agar Sabouraud.

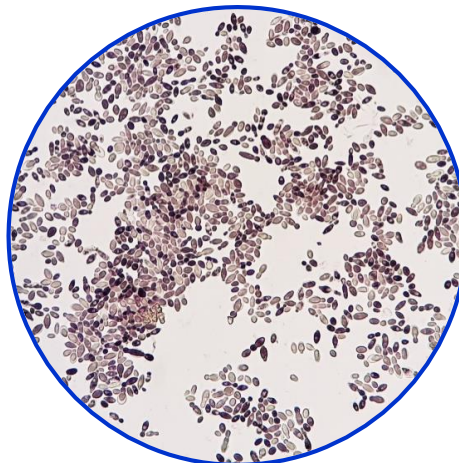
Características microscópicas de cepa de levadura C22



C.3. Observación directa de cepa de levadura C22 a un aumento de 400 X.



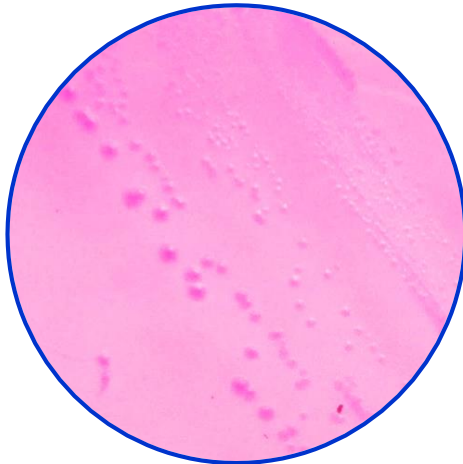
D.3. Cepa de levadura C22 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



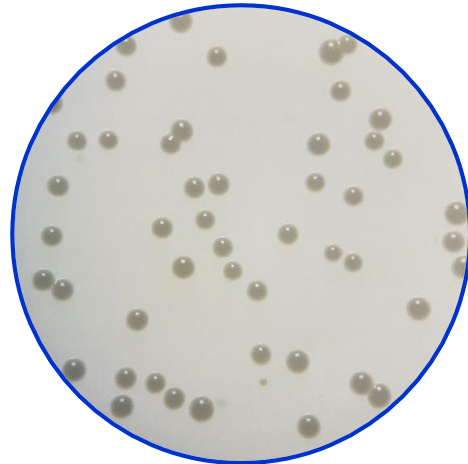
E.3. Cepa levadura C22 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X

4. Características de cepa de levadura C312

Características macroscópicas de cepa de levadura C312



A.4. Colonias de cepa de levadura C312 en medio de selección de levaduras oleaginosas.



B.4. Colonias de cepa de levadura C312 en agar Sabouraud.

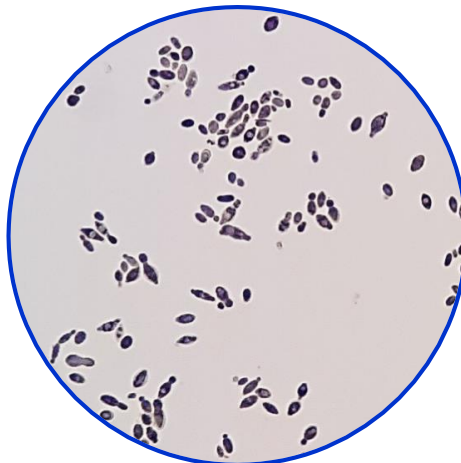
Características microscópicas de cepa de levadura C312



C.4. Observación directa de levadura C312 a un aumento de 400 X



D.4. Cepa de levadura C312 con azul de metileno a un aumento de 400 X



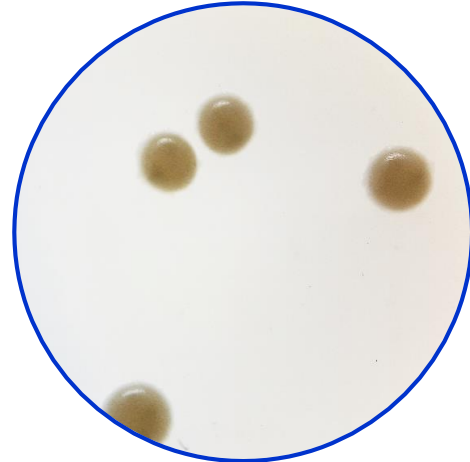
E.4. Cepa de levadura C312 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X

5. Características de cepa de levadura QF4

Características macroscópicas de cepa de levadura QF4



A.5. Colonias de cepa de levadura QF4 en medio de selección de levaduras oleaginosas.

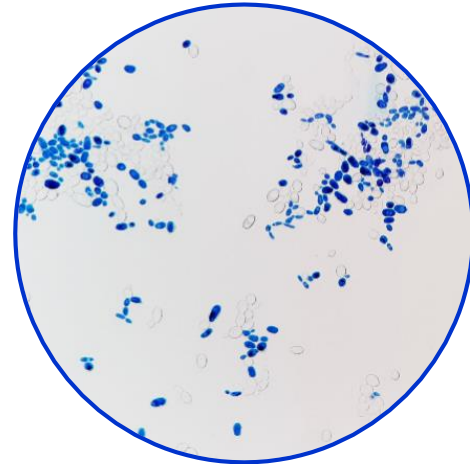


B.5. Colonias de cepa de levadura QF4 en agar Sabouraud.

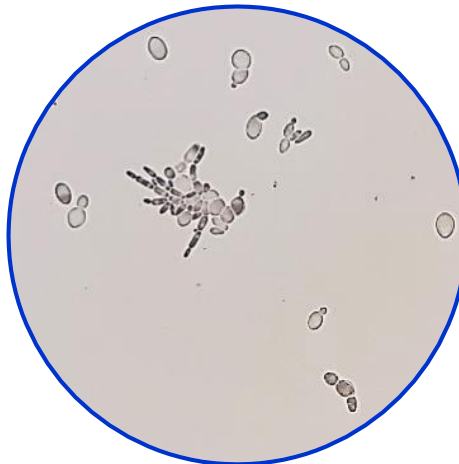
Características microscópicas de cepa de levadura QF4



C.5. Observación directa de levadura QF4 a un aumento de 400 X.



D.5. Cepa de levadura QF4 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



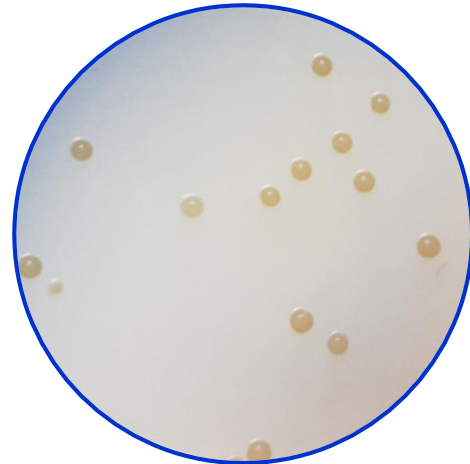
C.5. Cepa de levadura QF4 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X.

6. Características de cepa de levadura QF2

Características macroscópicas de cepa de levadura QF2



A.6. Colonias de cepa de levadura QF2 en medio de selección de levaduras oleaginosas suplementado.



B.6. Colonias de cepa de levadura QF2 en agar Sabouraud.

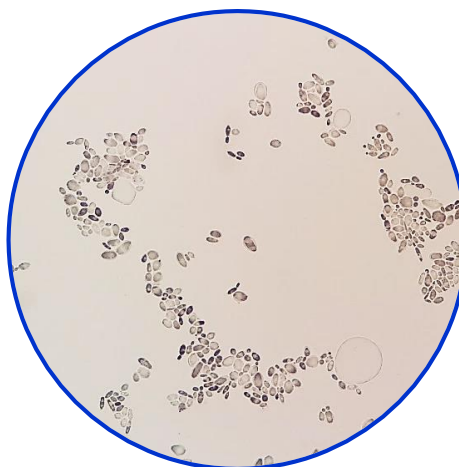
Características microscópicas de cepa de levadura QF2



C.6. Observación directa de cepa de levadura QF2 a un aumento de 400 X.



D.6. Cepa de levadura QF2 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



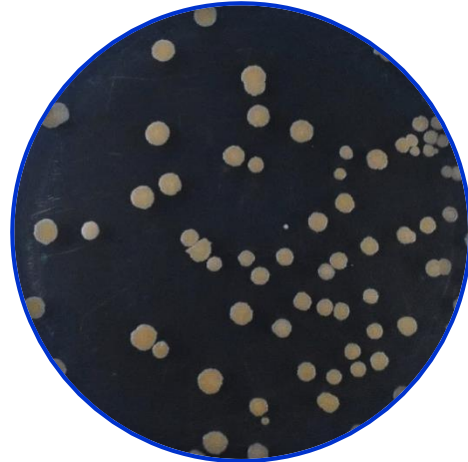
E.6. Cepa de levadura QF2 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X.

7. Características de cepa de levadura QS1

Características macroscópicas de cepa de levadura QS1

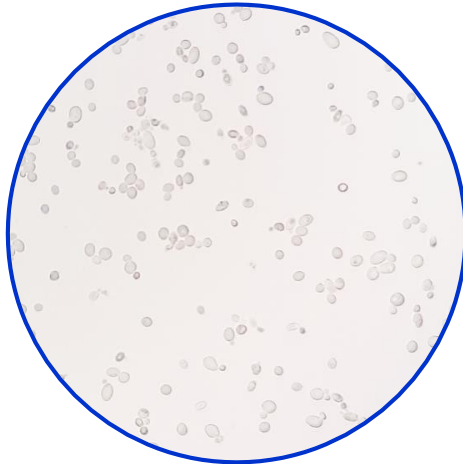


A.7. Colonias de cepa de levadura QS1 en medio de selección de levaduras oleaginosas.

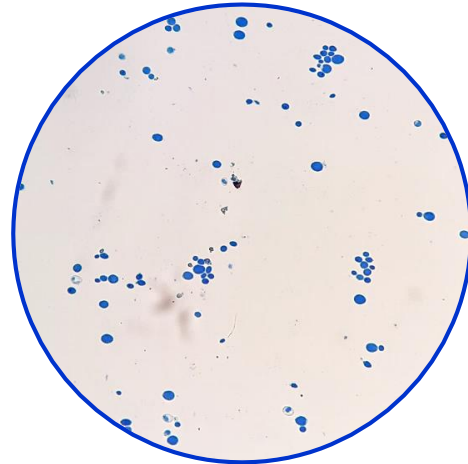


B.7. Colonias de cepa de levadura QS1 en agar Sabouraud.

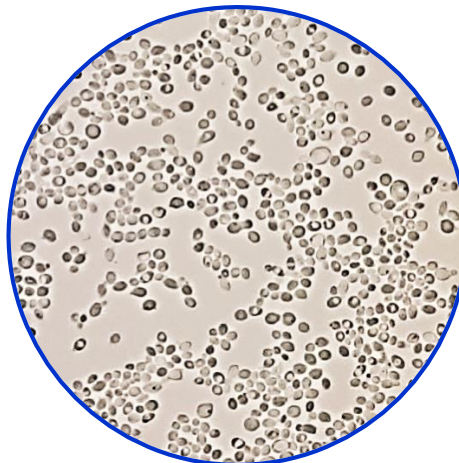
Características microscópicas de cepa de levadura QS1



C.7. Observación directa de cepa de levadura QS1 a un aumento de 400 X.



D.7. Cepa de levadura QS1 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



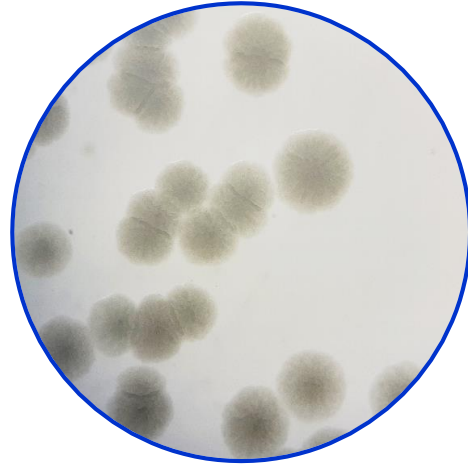
E.7. Cepa de levadura QS1 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X

8. Características de cepa de levadura QU1

Características macroscópicas de cepa de levadura QU1

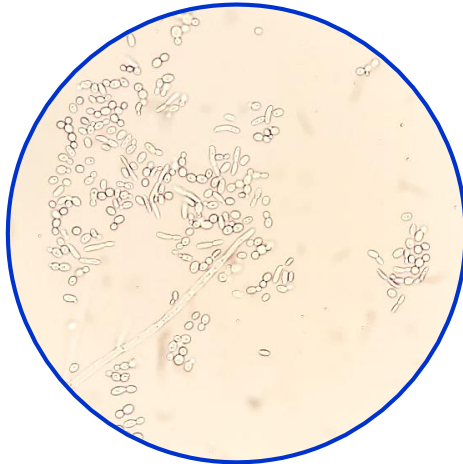


A.8. Colonias de cepa de levadura QU1 en medio de selección de levaduras oleaginosas.

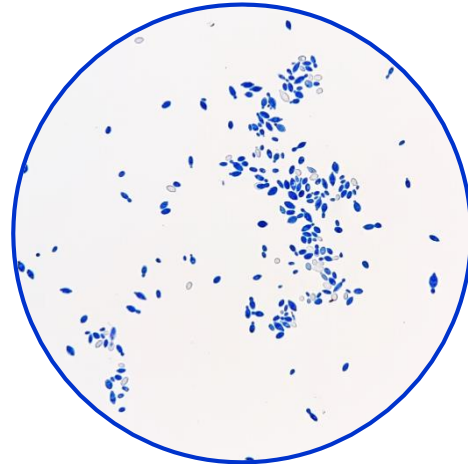


B.8. Colonias de cepa de levadura QU1 en agar Sabouraud.

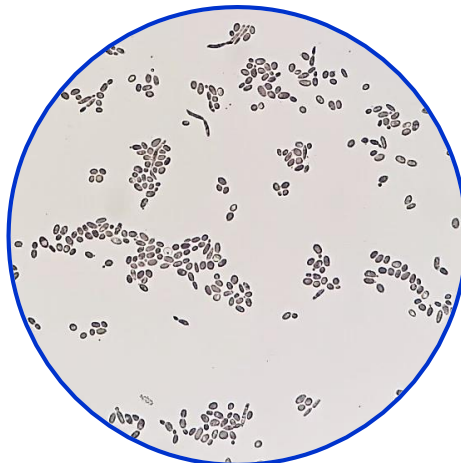
Características microscópicas de cepa de levadura QU1



C.8. Observación directa de levadura QU1 a un aumento de 400 X.



D.8. Cepa de levadura QU1 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



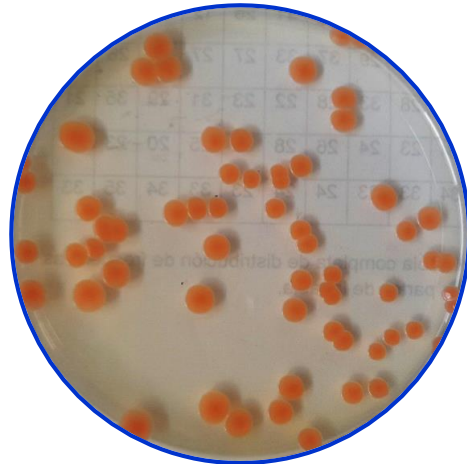
E.8. Cepa de levadura QU1 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X.

9. Características de cepa de levadura SM11

Características macroscópicas de cepa de levadura SM11

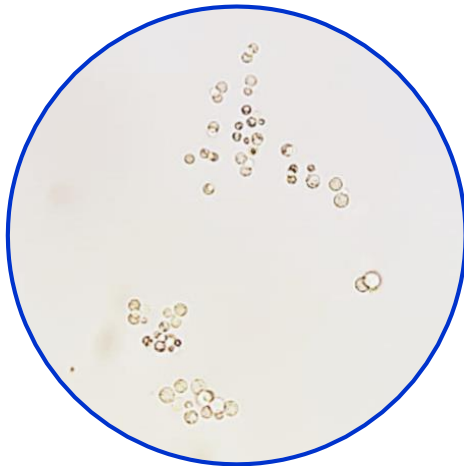


A.9. Colonias de cepa de levadura SM11 en medio de selección de levaduras oleaginosas.

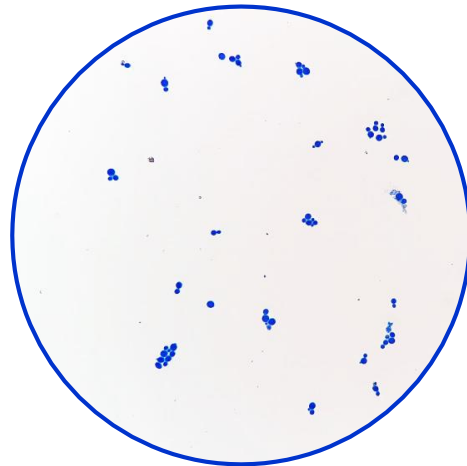


B.9. Colonias de cepa de levadura SM11 en agar Sabouraud.

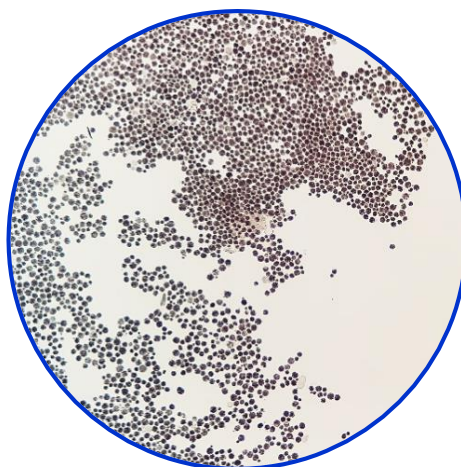
Características microscópicas de cepa de levadura SM11



C.9. Observación directa de cepa de levadura SM11 a un aumento de 400 X.



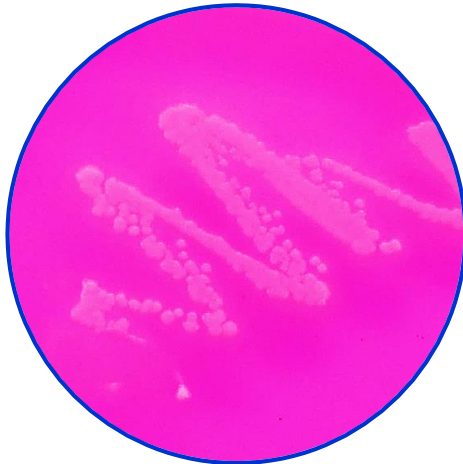
D.9. Cepa de levadura SM11 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



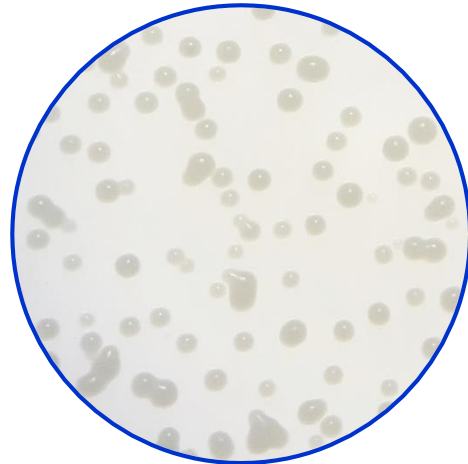
E.9. Cepa de levadura SM11 con Sudán Black B 400 X.

10. Características de cepa de levadura SM13

Características macroscópicas de cepa de levadura SM13

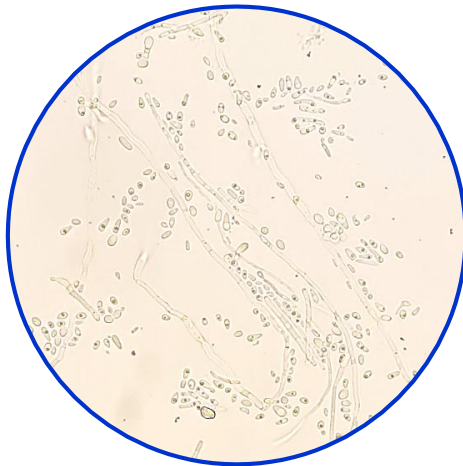


A.10. Colonias de levadura SM13 en medio de selección de levaduras oleaginosas.

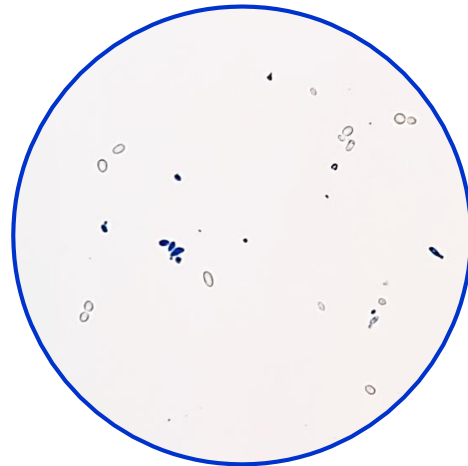


B.10. Colonias de cepa levadura SM13 en agar Sabouraud.

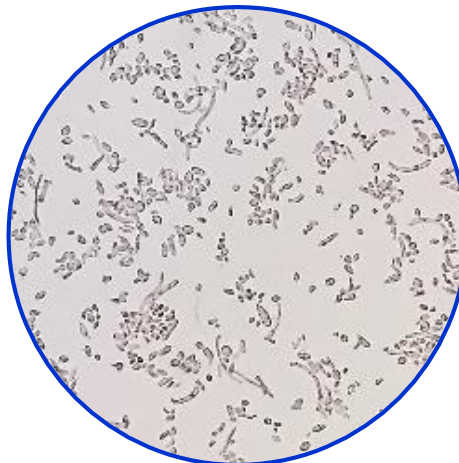
Características microscópicas de cepa de levadura SM13



C.10. Observación directa de cepa de levadura SM13 a un aumento de 400 X



D.10. Cepa de levadura SM13 con azul de metileno a un aumento de 400 X



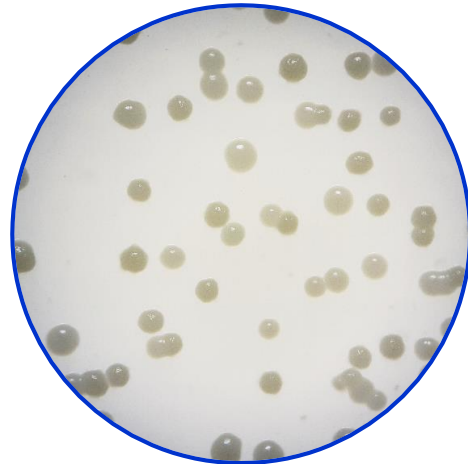
E.10. Cepa de levadura SM13 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X.

11. Características de cepa de levadura SM14

Características macroscópicas de cepa de levadura SM14



A.11. Colonias de cepa de levadura SM14 en medio de selección de levaduras oleaginosas.

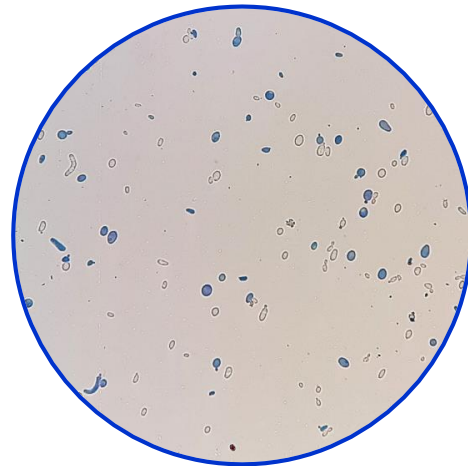


B.11. Colonias de cepa de levadura SM14 en agar Sabouraud.

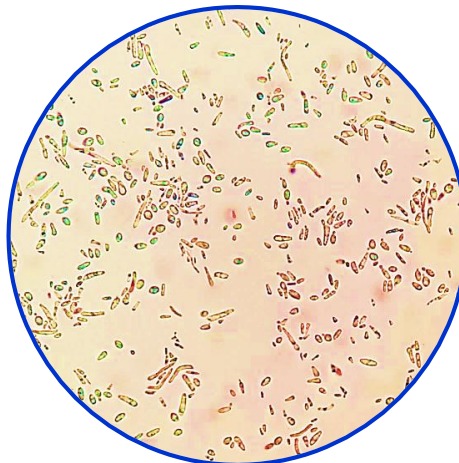
Características microscópicas de cepa de levadura SM14



C.11. Observación directa de cepa de levadura SM14 a un aumento de 400 X.



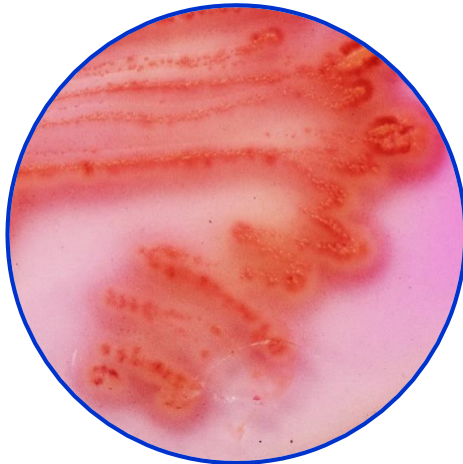
D.11. Cepa de levadura SM14 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



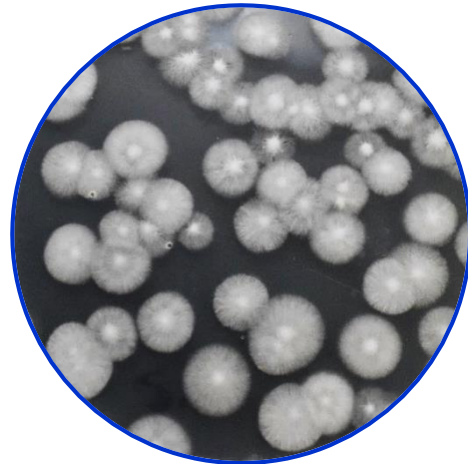
E.11. Cepa de levadura SM14 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X.

12. Características de cepa de levadura SM15

Características macroscópicas de levadura SM15



A.12. Colonias de cepa de levadura SM15 en medio de selección de levaduras oleaginosas.



B.12. Colonias de cepa de levadura SM15 en agar Sabouraud.

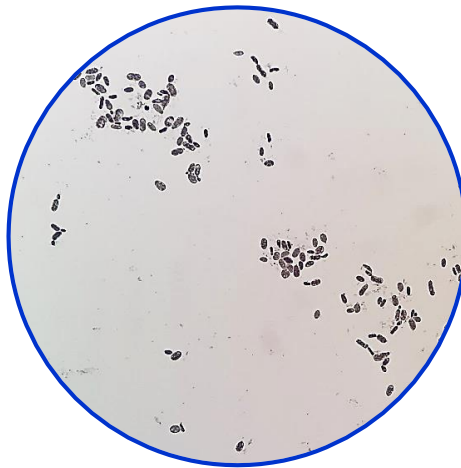
Características microscópicas de levadura SM15



C.12. Observación directa de cepa de levadura SM15 a un aumento de 400 X.



D.12. Cepa de levadura SM15 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



A. Cepa de levadura SM15 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X

13. Características de cepa de levadura AM21

Características macroscópicas de cepas de levadura AM21

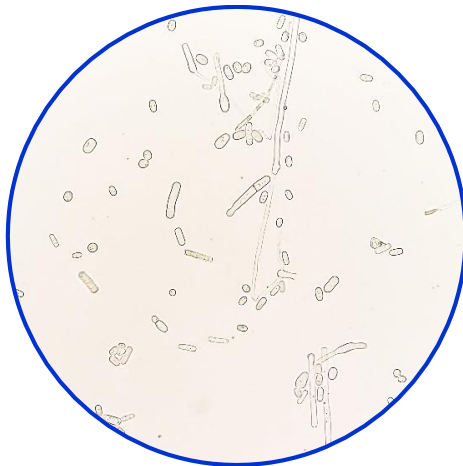


A.13. Colonias de cepa de levadura AM21 en medio de selección de levaduras oleaginosas.

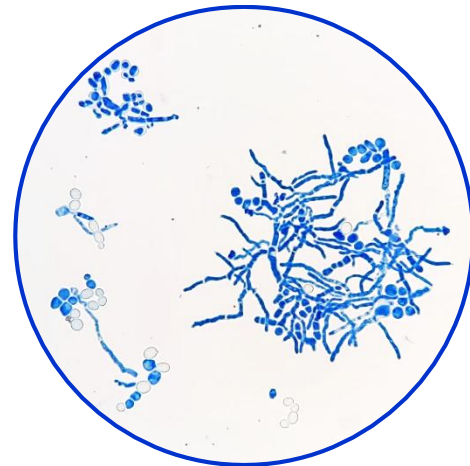


B.13. Colonias de cepa de levadura AM21 en agar Sabouraud.

Características microscópicas de cepas de levadura AM21



C.13. Observación directa de cepa de levadura AM21 a un aumento de 400 X.



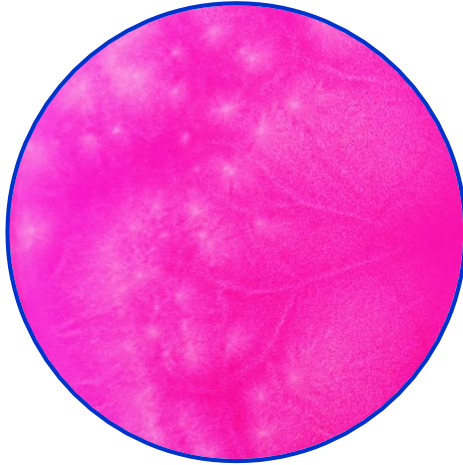
D.14. Cepa de levadura AM21 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



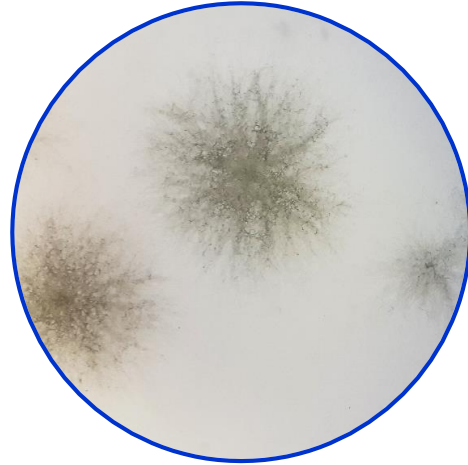
E.14. Cepa de levadura AM21 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X.

14. Características de cepa de levadura AM22

Características macroscópicas de levadura AM22



A.14. Colonias de cepa de levadura AM22 en medio de selección de levaduras oleaginosas.



B.14. Colonias de cepa de levadura AM22 en agar Sabouraud.

Características microscópicas de levadura AM22



C.14. Observación directa de cepa de levadura AM22 a un aumento de 400 X.



D.14. Cepa de levadura AM22 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



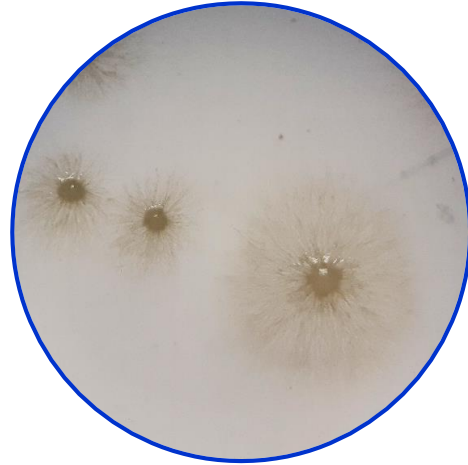
E.14. Cepa de levadura AM22 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X.

15. Características de levadura SM34

Características macroscópicas de cepa de levadura SM34

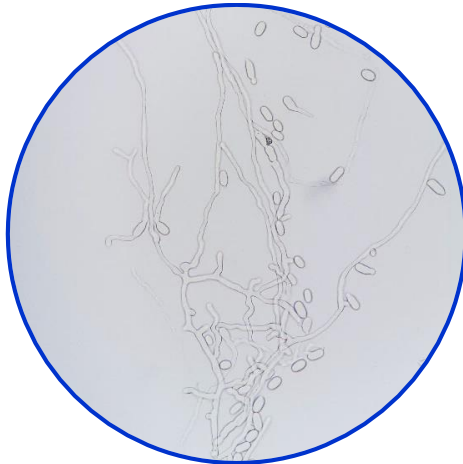


A.15. Colonias de cepa de levadura SM34 en medio de selección de levaduras oleaginosas.

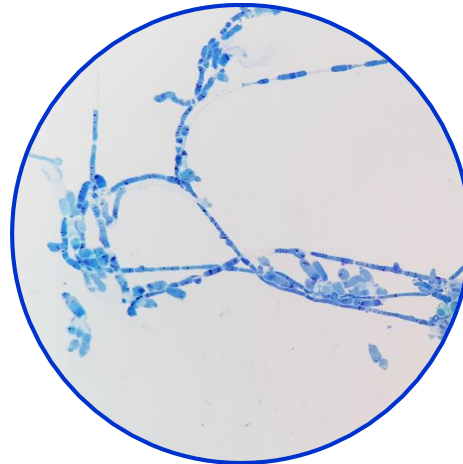


B.15. Colonias de cepa de levadura SM34 en agar Sabouraud.

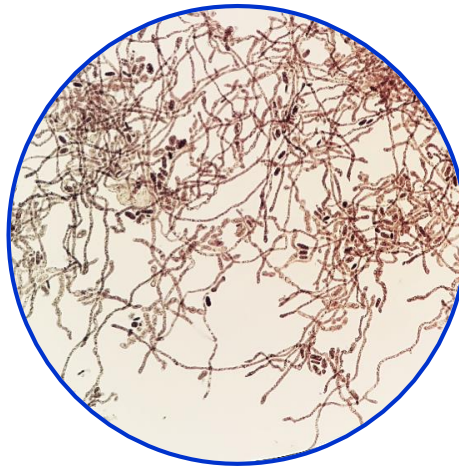
Características microscópicas de cepa de levadura SM34



C.15. Observación directa de cepa de levadura SM34 a un aumento de 400 X.



D.15. Cepa de levadura SM34 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



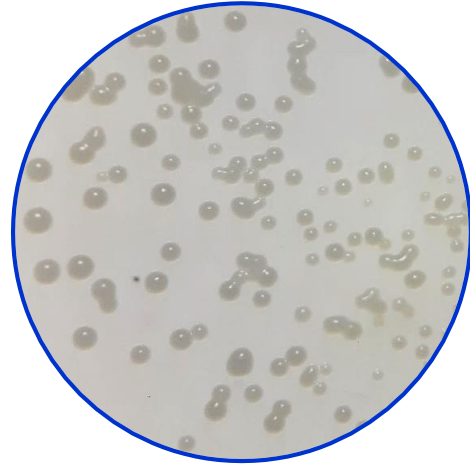
E.15. Cepa de levadura SM34 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X.

16. Características de cepa de levadura SP21

Características macroscópicas de cepa de levadura SP21



A.16. Colonias de cepa de levadura SP21 en medio de selección de levaduras oleaginosas.

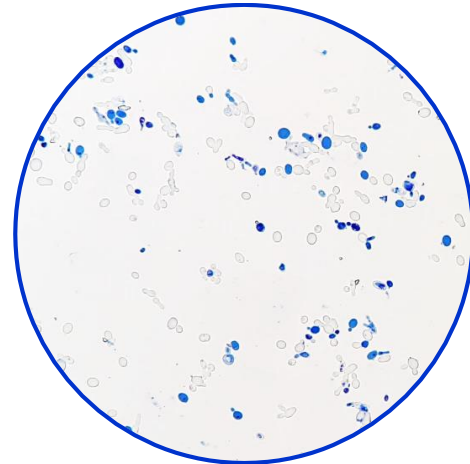


B.16. Colonias de cepa de levadura SP21 en agar Sabouraud.

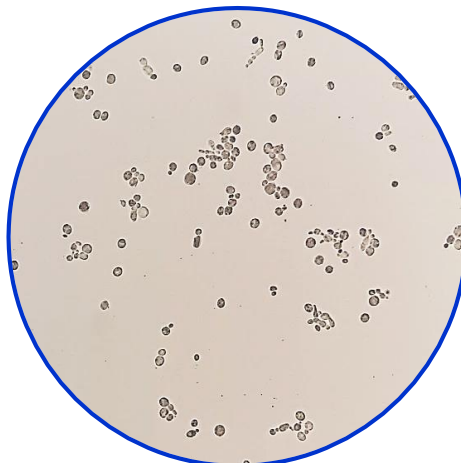
Características microscópicas de cepa de levadura SP21



C.15. Observación directa de cepa de levadura SP21 a un aumento de 400 X.



D.15. Tinción de levadura SP21 con azul de metileno a un aumento de 400 X.



E.15. Cepa de levadura SP21 con tinción de Sudán Black B a un aumento de 400 X.

Anexo 3. Zona de colecta de suelos de cultivo de palta en el distrito de Luricocha de la provincia de Huanta. Ayacucho, 2021.



Código	Coordenadas	Altitud
Huanta M1	12°54'03,80"S y 74°17'17.60"O	2 517 msnm
Huanta M2	12°54'03,18"S y 74°17'16.00"O	2 512 msnm
Huanta M3	12°54'03,50"S y 74°17'16.70"O	2 516 msnm

Anexo 4. Zona de colecta de suelos de mecánicas automotrices distrito de Jesús Nazareno, provincia de Huamanga. Ayacucho, 2021.



Código	Coordenadas	Altitud
Mecánica automotriz 1	13°08'56.49"S y 74°12'55.83"O	2 780 msnm
Mecánica automotriz 2	13°09'25.60"S y 74°12'58.03"O	2 744 msnm
Mecánica automotriz 3	13°08'22.31"S y 74°12'41.93"O	2 636 msnm

Anexo 5. Composición del medio enriquecido con glicerol.

- Glicerol 100 g/L
 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sulfato de amonio) 1 g/L
 - KH_2PO_4 (Fosfato monopotásico) 1 g/L
 - MgSO_4 (Sulfato de magnesio) 0,5 g/L
 - Extracto de levadura 0,2 g/L
- pH $5,5 \pm 0,2$

Fuente: Olivera León (2020).

Anexo 6. Composición de medio limitado en nitrógeno suplementado con Rodamina B y cloranfenicol. Agar de selección de levaduras oleaginosas.

- Glucosa 23 g/L
 - Peptona 0,3 g/L
 - Extracto de levadura 0,5 g/L
 - KH_2PO_4 (Fosfato monopotásico) 7 g/L
 - Na_2HPO_4 (Fosfato di sódico) 2 g/L
 - MgSO_4 (Sulfato de magnesio) 1,5 g/L
 - Cloranfenicol 0,05 g/L*
 - Rodamina B (0,001 % etanol 70°) 10 mL/L
 - Agar 20 g/L
- pH $5,5 \pm 0,2$

*El cloranfenicol se agrega al medio después de la esterilización en autoclave.

Fuente: Niehus et al. (2018), modificado de Olivera León (2020).

Anexo 7. Composición de agar YPD (Yeast Growth Medium). Medio de almacenamiento.

- Glucosa 20 g/L
 - Peptona 20 g/L
 - Extracto de levadura 10 g/L
 - Agar 20 g/L
- pH $5,5 \pm 0,2$

Fuente: Niehus et al. (2018).

Anexo 8. Composición de agar Sabouraud.

- Peptona 10 g/L
 - Glucosa 40 g/L
 - Agar 15 g/L
- pH $5,6 \pm 0,2$

Fuente: Sabouraud Agar (2019).

Anexo 9. Composición de medio de producción estándar (MPE).

- Glucosa 40 g/L
 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sulfato de amonio) 2 g/L
 - KH_2PO_4 (Fosfato monopotásico) 7 g/L
 - NaH_2PO_4 (Fosfato monosódico) 7 g/L
 - MgSO_4 (Sulfato de magnesio) 1,5 g/L
 - Extracto de levadura 1 g/L
- pH $5,5 \pm 0,2$

Fuente: Mukhtar et al. (2018).

Anexo 10. Composición de medio de activación.

- Glucosa 20 g/L
 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sulfato de amonio) 5 g/L
 - KH_2PO_4 (Fosfato monopotásico) 1 g/L
 - MgSO_4 (Sulfato de magnesio) 0,5 g/L
 - Extracto de levadura 0,5 g/L
- pH $5,5 \pm 0,2$

Fuente: Mukhtar et al. (2018).

Anexo 11. Composición de agar YM (Yeast Medium).

- Extracto de levadura 3 g/L
 - Extracto de malta 3 g/L
 - Peptona 5 g/L
 - Glucosa 10 g/L
 - Agar 20 g/L
- pH $5,6 \pm 0,2$

Fuente: Kurtzman et al. (2011).

Anexo 12. Composición de medio basal de fermentación.

- Extracto de levadura 4,5 g/L
 - Peptona 7,5 g/L
- pH $5,6 \pm 0,2$

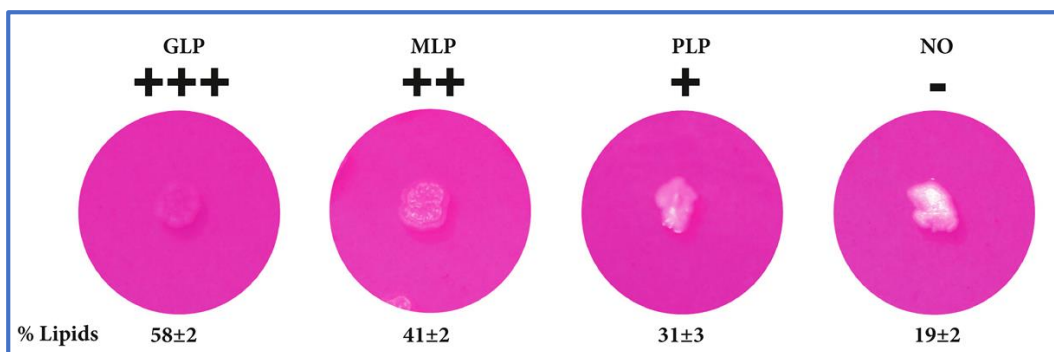
Fuente: Kurtzman et al. (2011).

Anexo 13. Composición de solución base de azul de bromotimol.

- Azul de bromotimol 50 mg
- Agua destilada estéril 75 mL

Fuente: Kurtzman et al. (2011).

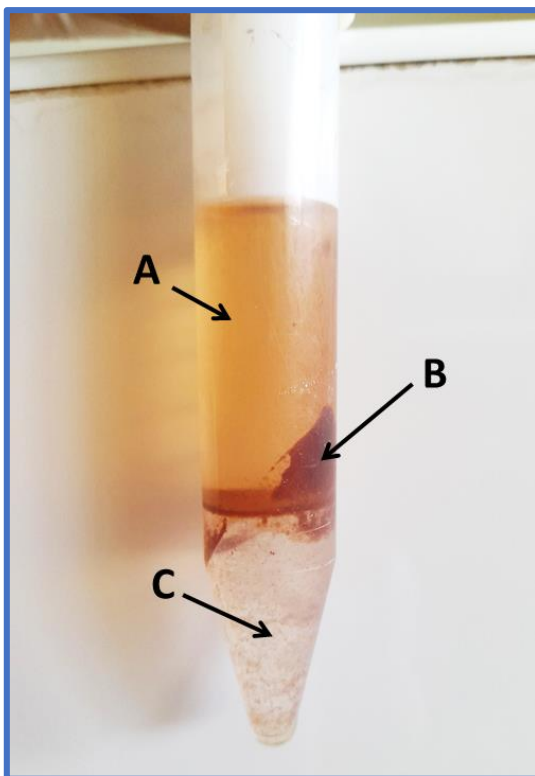
Anexo 14. Análisis cualitativo de colonias de levaduras oleaginosas cultivadas en agar de selección de levaduras oleaginosas.



Niveles de respuesta cualitativa del método de cribado de levaduras oleaginosas. Se muestra un primer plano de colonias individuales. Los niveles se definen de la siguiente manera: **GLP**, buen productor de lípidos; **MLP**, moderado productor de lípidos; **PLP**, pobre productor de lípidos; y **NO**, no oleaginoso. El porcentaje de lípidos se presenta como % de lípidos, y los datos se presentan como medias y desviaciones estándar de muestras por triplicado.

Nota. Obtenido y adaptado de "Simple Qualitative Method for Screening Oleaginous Yeasts on Agar" (p. 5), por Niehus et al., 2018, Journal of Lipids, 2018.

Anexo 15. Fases formadas por metanol y cloroformo para la extracción de aceite unicelular. Ayacucho, 2022.



- A.** Solución de metanol absoluto y biomasa hidrolizada en HCl 4M.
- B.** Restos de biomasa hidrolizada.
- C.** Cloroformo y aceite unicelular diluido.

Anexo 16. Cálculo de relación carbono/nitrógeno (C/N) de medios de cultivo de acuerdo a su composición.

FUENTE DE CARBONO EN EL MEDIO DE CULTIVO

- **Glucosa (C₆H₁₂O₆)**

Calcular el peso molecular de cada elemento de la molécula de glucosa

C: 12,01 x 6= 72,06

H: 1,008x12=12,096

O: 16x6=96

Peso molecular total de C₆H₁₂O₆: 180,156 g/mol

1 mol de C₆H₁₂O₆ → 180,156 g de glucosa

1 mol de C₆H₁₂O₆ → 6 mol de C

1 mol de C → 6,022x10²³ átomos

Por lo tanto

$$40 \text{ g de glucosa} \times \frac{1 \text{ mol de glucosa}}{180,156 \text{ gr de glucosa}} \times \frac{6 \text{ mol de C}}{1 \text{ mol de glucosa}} \times \frac{6,022 \times 10^{23} \text{ átomos}}{1 \text{ mol de C}}$$

→ En 40 g de glucosa hay 8,022 x 10²³ átomos de C

$$75 \text{ g de glucosa} \times \frac{1 \text{ mol de glucosa}}{180,156 \text{ gr de glucosa}} \times \frac{6 \text{ mol de C}}{1 \text{ mol de glucosa}} \times \frac{6,023 \times 10^{23} \text{ átomos}}{1 \text{ mol de C}}$$

→ En 75 g de glucosa hay 1,504 x 10²⁴ átomos de C

FUENTE DE NITRÓGENO EN EL MEDIO DE CULTIVO

Orgánico

- **Nitrato de amonio (NH₄NO₃)**

Peso molecular total de NH₄NO₃: 80,052 g

Por lo tanto:

En un gramo de NH₄NO₃ hay 1, 505 x 10²² átomos de N

- **Sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄**

Peso molecular total de (NH₄)₂SO₄: 132,154 g

Por lo tanto:

En 2 gramos de (NH₄)₂SO₄ hay 1,823 x 10²² átomos de N

Inorgánico

- **Peptona**

Nitrógeno total aproximado: 8 %

Se usa 2 g/L en el medio de cultivo por lo que hay 0,16 g de nitrógeno

1 mol de N → 14,01 g de N

1 mol de N → 6,023x10²³ átomos

$$0,16 \text{ g de N} \times \frac{1 \text{ mol de N}}{14,01 \text{ gr de N}} \times \frac{6,022 \times 10^{23} \text{ átomos}}{1 \text{ mol de N}}$$

En 2 gramos de peptona hay 6,878 x 10²¹ átomos de N

- **Extracto de levadura**

Nitrógeno total aproximado: 10 – 11,8 %

Se usa 1 g/L en el medio de cultivo por lo que hay 0,109 g de nitrógeno

En un gramo de extracto de levadura hay 4,556 x 10²¹ átomos de N

Luego del cálculo del número de átomos de carbono y nitrógeno de un medio de producción se procede a realizar una división entre ambos para determinar la relación carbono/nitrógeno (C/N).

Anexo 17. Preparación y uso del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) para determinación de azúcares reductores totales.

Se empleó el método de Miller (1959).

• **Preparación del reactivo DNS**

Pesar 5 g del reactivo DNS, 150g de tartrato de Na-K y 8 g de NaOH. En un balón aforado de 500 mL disolver NaOH en 200 mL de agua destilada, añadir lentamente y en agitación constante el tartrato de Na-K, completar con agua destilada hasta llegar a aproximadamente 400 mL, agregar DNS y dejar en agitación durante toda la noche (aproximadamente 12 h), finalmente enrazar a 500 mL y filtrar con filtro Millipore con poro de 0,22 µm.

• **Procedimiento de uso del reactivo DNS**

En tubos de ensayo de 10 mL adicionar 0,5 mL de muestra a evaluar y 0,5 mL del reactivo DNS preparado anteriormente, luego colocar el tubo en baño María a 100 °C durante 5 min, dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar 5 mL de agua destilada. Agitar y realizar la lectura en un espectrofotómetro a 540 nm.

• **Elaboración de curva estándar del reactivo DNS**

Preparar soluciones estándares de glucosa con las siguientes concentraciones: 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,3; 1,5; 1,7; 1,9 y 2,1 g/L; y continuar con el procedimiento anterior.

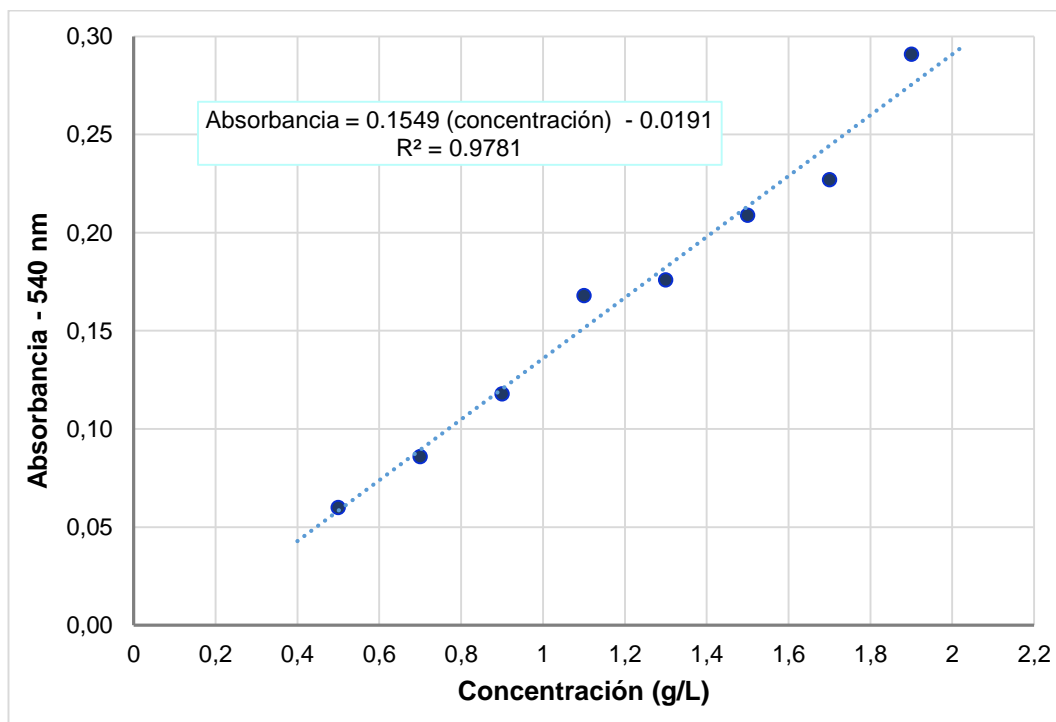
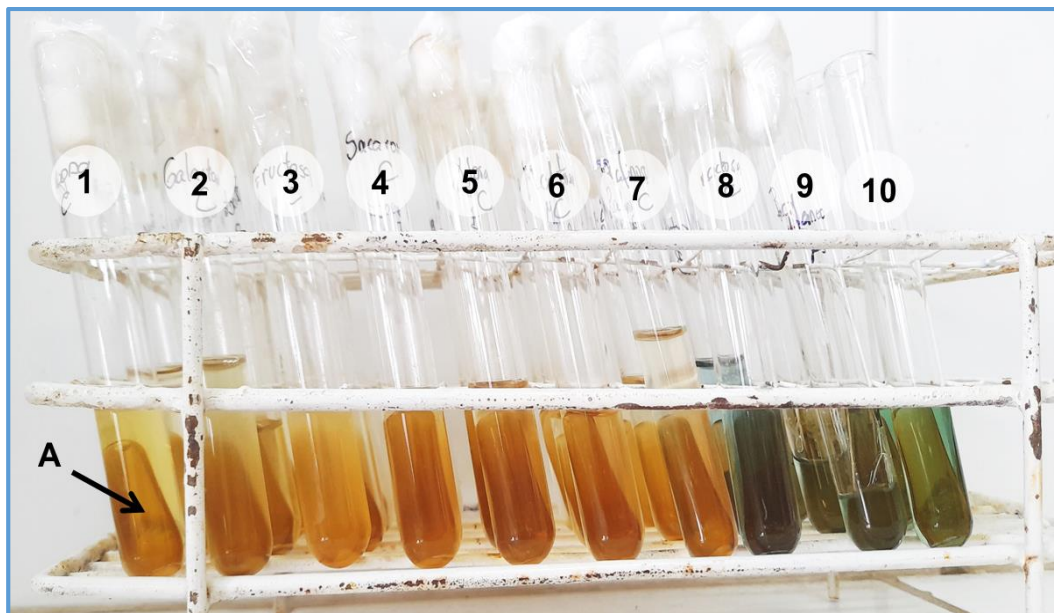


Figura 8. Curva estándar de azúcares reductores con reactivo DNS. Ayacucho, junio 2022.

Anexo 18. Ensayo de fermentación y asimilación de azúcares con la cepa de levadura oleaginoso SM11 a 28 días de incubación a 20 °C en medio basal de fermentación. Ayacucho, 2022.



Prueba de fermentación de azúcares			
A		Campana de Durham sin gas en todos los tubos (fermentación negativa)	
	1	Glucosa	+
	2	Galactosa	L
	3	Fructosa	+
	4	Sacarosa	+
Prueba de asimilación de azúcares	5	Xilosa	L
	6	Maltosa	I
	7	Rafinosa	w
	8	Lactosa	-
	9	Blanco	-
	10	Control	-

Anexo 19. Análisis de varianza y prueba de contraste Tukey del porcentaje de productividad de aceite unicelular de cepas de levaduras oleaginosas aisladas, a 120 horas de incubación a 28 °C. Ayacucho, 2022.

Método	
Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Muestra	15	2743,4	182,89	4,22	0,003
Error	16	693,4	43,34		
Total	31	3436,8			

Des. Est. agrupada = 6,58308

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

Muestra	N	Media	Agrupación		
SM11	2	37,50	A		
SM15	2	31,4	A	B	
C22	2	21,89	A	B	C
SM13	2	15,76	A	B	C
QU1	2	14,47	A	B	C
SM34	2	14,27	A	B	C
QS1	2	13,32	A	B	C
SP2A	2	11,85	A	B	C
SM14	2	10,92		B	C
QF2	2	10,59		B	C
BL	2	9,34		B	C
C3AB	2	8,10		B	C
C2A	2	7,40		B	C
AM22	2	4,77			C
QF4	2	4,73			C
AM21	2	1,545			C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 20. Análisis de varianza y prueba de contraste Tukey del porcentaje de productividad de aceite unicelular de cepa de levadura oleaginoso SM11, a 192 horas de incubación a 28 °C en diferentes medios de producción optimizado. Ayacucho, 2022.

Método

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Glucosa	Fijo	2	40; 75
Nitrógeno	Fijo	2	INORGÁNICO; ORGÁNICO
pH	Fijo	3	5,5; 6,0; 6,5
Temperatura	Fijo	2	28; 35

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Glucosa	1	812,5	812,50	135,55	0,000
Nitrógeno	1	147,3	147,35	24,58	0,000
pH	2	1658,5	829,26	138,34	0,000
Temperatura	1	4383,9	4383,89	731,34	0,000
Glucosa*Nitrógeno	1	338,2	338,23	56,42	0,000
Glucosa*pH	2	950,9	475,43	79,31	0,000
Glucosa*Temperatura	1	236,2	236,25	39,41	0,000
Nitrógeno*pH	2	1522,7	761,33	127,01	0,000
Nitrógeno*Temperatura	1	1813,5	1813,49	302,54	0,000
pH*Temperatura	2	1261,5	630,77	105,23	0,000
Glucosa*Nitrógeno*pH	2	478,6	239,29	39,92	0,000
Glucosa*Nitrógeno*Temperatura	1	398,9	398,92	66,55	0,000
Glucosa*pH*Temperatura	2	1689,2	844,61	140,90	0,000
Nitrógeno*pH*Temperatura	2	372,7	186,37	31,09	0,000
Glucosa*Nitrógeno*pH*Temperatura	2	973,2	486,58	81,17	0,000
Error	24	143,9	5,99		
Total	47	17181,8			

Comparaciones por parejas de Tukey:

Respuesta = Porcentaje de productividad de aceite unicelular

Término = Glucosa*Nitrógeno*pH*Temperatura

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

Glucosa*Nitrógeno*pH* Temperatura	MPM	N	Media	Agrupación
40 orgánico 6,5 35	MPM 15	2	79,3454	A
75 inorgánico 6,0 35	MPM 23	2	75,6253	A B
75 inorgánico 6,5 35	MPM 24	2	73,6704	A B
75 inorgánico 5,5 35	MPM 22	2	73,2259	A B
40 inorgánico 5,5 35	MPM 16	2	73,1357	A B
75 inorgánico 5,5 28	MPM 10	2	69,2582	B C
75 orgánico 6,0 35	MPM 20	2	62,3792	C D
40 inorgánico 6,5 35	MPM 18	2	61,5998	C D E
75 orgánico 5,5 35	MPM 19	2	59,4943	C D E F
75 orgánico 5,5 28	MPM 7	2	58,2579	D E F G
75 orgánico 6,5 35	MPM 21	2	51,8858	E F G
75 orgánico 6,5 28	MPM 9	2	50,7407	F G
40 inorgánico 5,5 28	MPM 4	2	50,0297	F G
40 inorgánico 6,0 35	MPM 17	2	48,4194	G
75 orgánico 6,0 28	MPM 8	2	48,2861	G H
40 orgánico 6,0 28	MPM 2	2	38,3358	H I
40 orgánico 6,5 28	MPM 3	2	37,4455	I
40 inorgánico 6,0 28	MPM 5	2	37,1259	I
40 orgánico 5,5 28	MPM 1	2	36,9049	I
40 orgánico 5,5 35	MPM 13	2	36,8541	I
40 inorgánico 6,5 28	MPM 6	2	32,3873	I
40 orgánico 6,0 35	MPM 14	2	20,9332	J
75 inorgánico 6,5 28	MPM 12	2	17,4297	J
75 inorgánico 6,0 28	MPM 11	2	11,0053	J

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 21. Análisis de varianza y prueba de contraste Tukey del porcentaje de productividad de aceite unicelular de cepa de levadura oleaginosa SM11 de acuerdo a la relación C/N, a 192 horas de incubación a 28 °C en diferentes medios de producción optimizado. Ayacucho, 2022.

Método	
Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Información del factor		
Factor	Niveles	Valores
Relación C/N	4	24:1; 45:1; 70:1; 132:1

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Relación C/N	3	649.2	216.4	0.55	0.654
Error	20	7870.3	393.5		
Total	23	8519.5			

Desv.Est. agrupada = 19.8372

Valor p > Valor F

0.654 > 0.55

No hay diferencias significativas

Anexo 22. Análisis de varianza y prueba de contraste Tukey del porcentaje de productividad de aceite unicelular de cepa de levadura oleaginosa SM11 en medios de producción orgánicos, a 192 horas de incubación a 28 °C. Ayacucho, 2022.

Método	
Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Análisis de Varianza

Fuente	GL	Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Muestra	6	8362,4	1393,73	82,78	0,000
Error	7	117,8	16,84		
Total	13	8480,2			

Des. Est. agrupada = 4,10313.

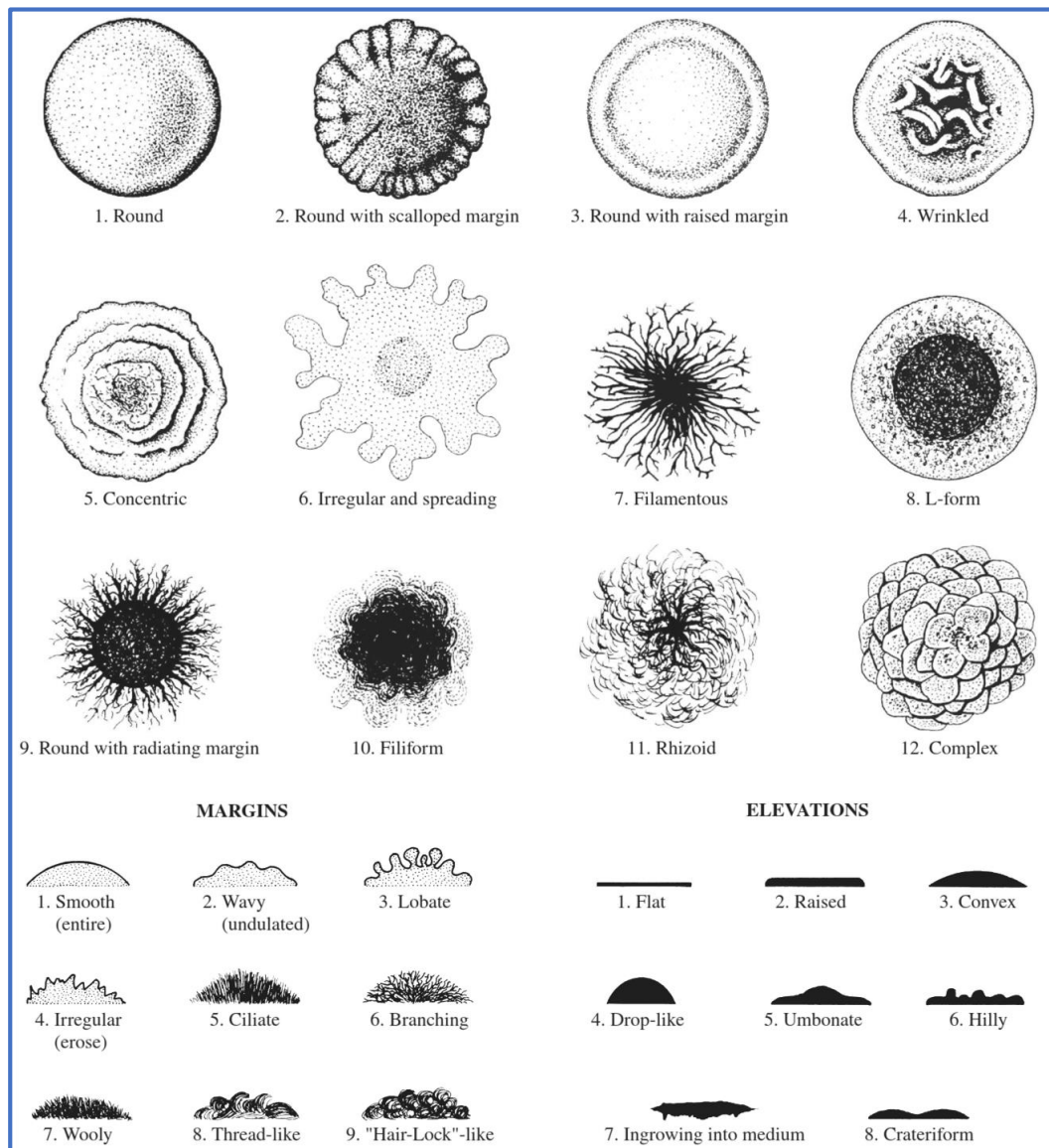
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

Muestra	N	Media	Agrupación		
MO	2	80,56	A		
Plátano	2	54,76		B	
Chancaca	2	29,408			C
Tuna	2	23,16			C
Lactosuero	2	17,39			C D
Quinoa	2	16,2472			C D
Melaza	2	4,46			D

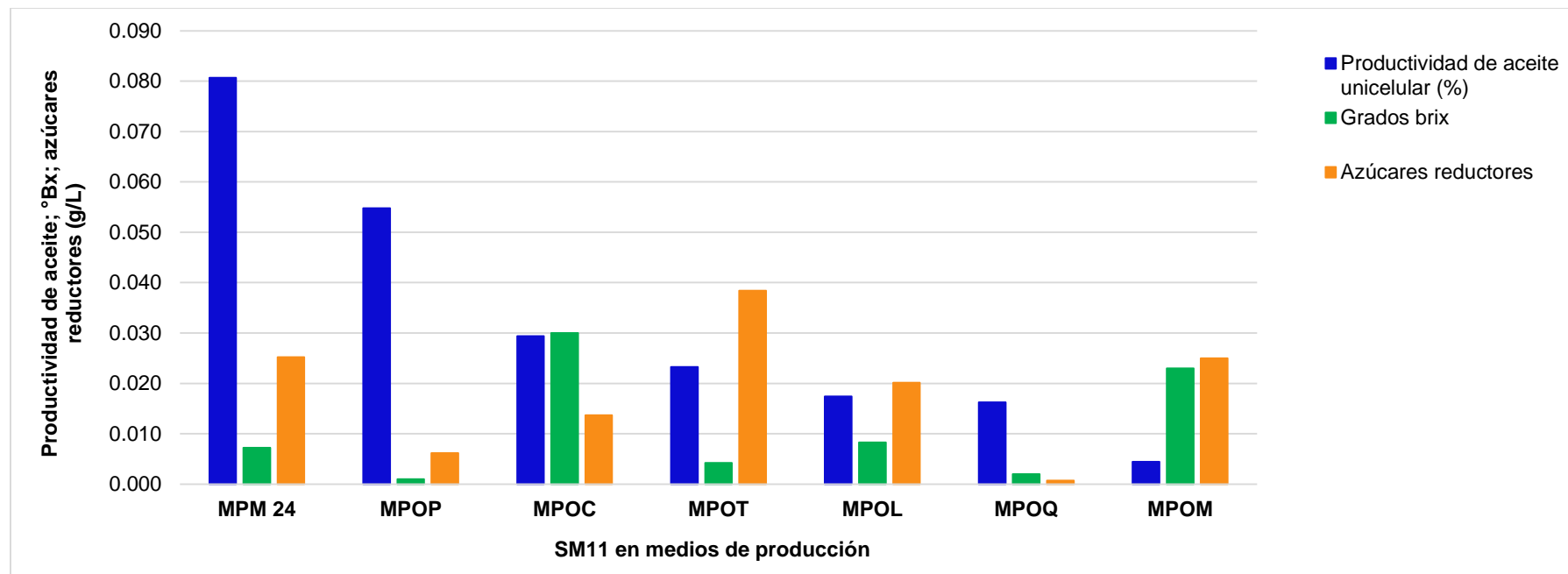
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 23. Características culturales de colonias microbianas.



Nota: Adaptado de *Benson's Microbiological Applications: Laboratory manual in general microbiology, concise versión* (p. 252), por Brown, A. E. y Smith, H. R., 2017, (14.^a ed.). McGraw-Hill Education.

Anexo 24. Características químicas los medios de producción y porcentaje de productividad de aceite unicelular en la cepa SM11, incubada en los diferentes medios de producción orgánicos durante 192 horas a 28 °C y 35 °C. Ayacucho, 2022.



Características	MPM 24	MPOP	MPOC	MPOT	MPOL	MPOQ	MPOM
Productividad de aceite unicelular (%)	80,650	54,760	29,410	23,260	17,390	16,250	4,460
Grados Brix (°Br)	7,20	1,00	30,00	4,20	8,30	2,00	23,00
Azúcares reductores	25,21	6,19	13,66	38,43	20,16	0,72	24,98

MPM 24: Medio de producción modificado 24. **MPOP:** Medio de producción orgánico de cáscara de plátano. **MPOC:** Medio de producción orgánico de chancaca. **MPOT:** Medio de producción orgánico de cáscara de tuna. **MPOL:** Medio de producción orgánico de lactosuero. **MPOQ:** Medio de producción orgánico de cascarilla de quinua. **MPOM:** Medio de producción orgánico de melaza.

Anexo 25. Identificación de especies del género *Rhodotorula*, mediante el método de asimilación de azúcares.

TABLE 25
Key characteristics of species in the genus *Rhodotorula*

Species	Color ^a	Pseudo-hyphae ^b	Sta ^c	Growth ^d		Assimilation ^e																
				37°C	VF	Suc	Mal	Cel	Tre	Mel	Raf	Mlz	Rha	D-G	N-A	Ery	Sal	Ino	Hex	Nit	Sac	Glc
<i>Rhodotorula acheniorum</i>	y-p	rud	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>R. acuta</i>	c	rud	-	+	w/-	+	-	+	s	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. araucariae</i>	y-p	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>R. armeniaca</i>	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. aurantiaca</i>	ro/y	rud	-	-	-	+	s	v	v	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>R. auriculariae</i>	c	-	-	-	-	+	s	-	s	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>R. bacarum</i>	b/c	rud	-	-	-	+	+	s	+	-	+	+	-	-	-	+	s	-	-	+	-	-
<i>R. bogoriensis</i>	c-yb	rud	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	s	+	-	s	-	-	-	w	+
<i>R. buffonii</i>	gb	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	s	s	-	s/-	-	-	+	-	+
<i>R. diffluens</i>	bc	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	s	-	-	+	-	+	+
<i>R. ferulica</i>	c	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>R. foliorum</i>	y	+	-	-	-	-	-	s	+	-	-	-	-	s	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>R. fragaria</i>	be	rud	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	s	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>R. fujisanensis</i>	gy	rud	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>R. futronensis</i>	bu	rud	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>R. glutinis</i>	r/o	rud	-	+	v	+	v	+	+	-	v	+	v	-	-	-	w/+	-	+	+	-	-
<i>R. graminis</i>	r	v	-	-	+	+	v	v	+	-	+	-	v	-	-	-	v	-	-	+	+	-
<i>R. hinnulea</i>	c-bu	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>R. hordea</i>	be	rud	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>R. hylophila</i>	bc	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. ingensiosa</i>	y	-	-	v	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>R. javanica</i>	y	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
<i>R. lactosa</i>	p	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	s	-	+	-	-	+	+
<i>R. lignophila</i>	wc	-	-	-	-	-	-	+	s	-	-	-	-	-	-	s	-	-	-	-	s	+
<i>R. marina</i>	op	-	-	-	-	+	v	+	s	-	w	+	+	-	-	-	w	-	-	-	-	+
<i>R. minuta</i>	p	-	-	v	-	+	-	v	+	-	+	-	-	-	-	+	-	v	-	-	-	+
<i>R. mucilaginoso</i>	r	rud	-	+	v	+	v	v	+	-	+	v	v	v	v	-	v	-	-	-	-	v
<i>R. muscorum</i>	yc	+	-	-	s	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>R. nothofagi</i>	y-p	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>R. philyla</i>	c	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. phylloplana</i>	bu	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	s	-	+	-	-
<i>R. pilati</i>	c	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>R. pustula</i>	w-t	rud	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
<i>R. sonckii</i>	c	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

^a Color of culture. Abbreviations: y-p, yellowish-pink; c, cream; b/c, brown or cream; o, orange;

b, brown; g, gray; be, beige; bu, buff; r, red; ro, reddish-orange; y, yellow; p, pink.

^b Presence of pseudohyphae. Abbreviation: rud, rudimentary.

^c Starch formation.

^d Growth at 37°C; growth in vitamin-free medium.

^e Abbreviations: Suc, sucrose; Mal, maltose; Cel, cellobiose; Tre, trehalose; Mel, melibiose;

Raf, raffinose; Mlz, melezitose; Rha, L-rhamnose; D-G, D-glucosamine,

N-A, N-acetyl-D-glucosamine; Ery, erythritol; Sal, salicin; Ino, inositol; Hex, hexadecane;

Nit, nitrate; Sac, saccharate; Glc, D-glucuronate.

Nota. Adaptado de *The yeasts: A taxonomic study* (p. 802), por Kurtzman y Fell, 2000, (4th ed), Elsevier.

Anexo 26. Identificación de especies del género *Rhodotorula*.

Tabla 3. Asimilación de azúcares

Especie	Código	Glucosa	Fructosa	Maltosa	Galactosa	Lactosa	Sacarosa	Rafinosa	Xilosa
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-10-005	+	L/D	D	L/D	D	L	D	D
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-10-009	+	L	L	L	L/D	+	D	L/D
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-10-024	+/L	L	L/D	+/L	D	+	L	L/D
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-10-033	+	L	D	D	L/D	+/L	L	L/D
<i>Rhodotorula sp.</i>	CLQCA-10-166	+/L	+	L	L	L	L/D	L	L/D
<i>Rhodospordium babjevae</i>	CLQCA-10-183	+/L	+/L	L/D	L	D	L	D	D/-
<i>Rhodotorula slooffiae</i>	CLQCA-10-184	L/D	+/L	L/D	L/D	L/D	L/D	D	D
<i>Rhodotorula glutinis</i>	CLQCA-10-185	+	L	L/D	L/D	D	L	L/D	D
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-10-186	+/L	L	L/D	L	L/D	+	D	D/-
<i>Rhodospordium babjevae</i>	CLQCA-10-188	+/L	+/L	L	L	L	+	L/D	L/D
<i>Rhodospordium babjevae</i>	CLQCA-10-191	+	+/L	L/D	L	L/D	+/L	D	D/-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-10-192	+	L	L/D	L	L/D	+/L	L/D	L/D
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-10-195	+/L	L	L/D	L/D	D	L	D	L/-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-10-196	+/L	+/L	-/D	L	L/D	+	L	L/D
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-10-208	+	+	D	L/D	D	+	L/D	L/D
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-10-213	L	L	-	L	L/D	+/L	L	L/D
<i>Rhodospordium babjevae</i>	CLQCA-10-224	+	+/L	L/D	L/D	D/-	L	D	D
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-10-225	+/L	L	D	L	D	+/L	L	L/D
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-12-008	+/L	+/L	D	L/-	D/-	L	D	L/D
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-12-011	+	L	L/D	L/D	D	+	L	L/D
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-12-013	+	+	L/D	L	D	+	L	L
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-17-005	+	L	L/D	L	D	+	L	L/D
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	CLQCA-17-046	+	L/D	L	L	L	+	L	L
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	CLQCA-17-057	+	+/L	L/D	L	L	+	D/-	L
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLQCA-17-058	L	+/L	D	L	L/D	+/L	L	L/D
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	CLQCA-20-015	+	L/D	L/D	+/D	D	L	D	L/D

+, asimilación positiva; L, asimilación lenta; D, asimilación débil; - asimilación negativa

Nota. Adaptado de "Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador" (p. 193), por Guamán-Burneo y Carvajal-Barriga, 2009, *Universitas Scientiarum* (14)2-3.

Anexo 27. Matriz de consistencia.

Título: Optimización de parámetros para la producción de aceite unicelular a partir de levaduras oleaginosas nativas. Ayacucho - Perú

Autora: YAURI HUAMÁN, Yessenia

Asesora: GARCÍA-GODOS ALCÁZAR, Paula

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Se logrará optimizar los parámetros de producción para inducir la mayor productividad de aceite unicelular a partir de levaduras oleaginosas nativas?	<p>Objetivo General Optimizar parámetros para la producción de aceite unicelular a partir de levaduras oleaginosas nativas de la región de Ayacucho.</p> <p>Objetivos Específicos 1. Aislar cepas de levaduras oleaginosas de diferentes fuentes de la región de Ayacucho. 2. Caracterizar macroscópicamente y microscópicamente las levaduras oleaginosas aisladas. 3. Determinar la productividad de aceite unicelular de las cepas de levaduras oleaginosas aisladas. 4. Evaluar el efecto de parámetros nutricionales y físicos en la productividad de aceite unicelular de levaduras oleaginosas. 5. Evaluar la productividad de levaduras oleaginosas en condiciones óptimas de cultivo. 6. Evaluar la productividad de levaduras oleaginosas a condiciones óptimas de medio de cultivo con suplementos orgánicos.</p>	<p>Antecedentes Aceite unicelular Parámetros de la optimización de producción de aceite unicelular Levaduras oleaginosas Metabolismo de los ácidos grasos partir de levaduras oleaginosas Morfología de levaduras oleaginosas Capacidad de levaduras oleaginosas para metabolizar biomasa lignocelulósica Importancia económica de las levaduras Fuentes de carbono orgánico para producción de aceite unicelular Colorantes para la identificación de aceite unicelular intracelular</p>	<p>La optimización de parámetros para lograr inducir la mayor producción de aceite unicelular a partir de levaduras oleaginosas aisladas Ayacucho - Perú.</p>	<p>Variables Variable independiente Parámetros para la producción de aceite unicelular.</p> <p>Variable dependiente Porcentaje en productividad de aceite unicelular.</p> <p>Indicadores de variable independiente - Concentración de glucosa - Tipo de fuente de nitrógeno - Temperatura - pH</p> <p>Indicadores de variable dependiente Productividad de aceite unicelular</p>	<p>Diseño de experimentación Aplicada</p> <p>Tipo de investigación Descriptivo y experimental</p> <p>Población Fuentes de aislamiento de levaduras oleaginosas</p> <p>Muestra Suelos de cultivo de palta, suelos de mecánicas de automotrices, semillas de cacao y quesos de artesanales.</p> <p>Metodología Primera etapa: Aislamiento de levaduras oleaginosas nativas Segunda etapa: Determinación de la productividad de aceite unicelular Tercera etapa: Optimización de parámetros para producción de aceite unicelular Cuarta etapa: Formulación de medio de producción orgánico Identificación fisiológica y bioquímica de levaduras</p> <p>Análisis estadístico Para la segunda etapa, y cuarta etapa se realizó el análisis de varianza (ANOVA) mientras que para la tercera etapa se empleó la prueba del diseño factorial; todos los casos se evaluaron con nivel de significancia de $\alpha=0,05$ y la prueba de comparación de medias de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico Minitab 17.</p>

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. Yessenia YAURI HUAMÁN
R.D. N° 063-2023-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cinco de la tarde del tres de marzo del año dos mil veintitrés; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, presidido por el Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA, encargado con Memorando N° 033-2023-UNSCH (IN)-FCB; quien a su vez es Miembro – Jurado; Mg. Sonia Haydeé PALOMINO FELICES (Miembro – Jurado); Dr. Raúl Antonio MAMANI AYCACHI (Miembro – 4to Jurado); Mg. Paula GARCÍA GODOS ALCAZAR (Miembro – Asesor); actuando como secretario docente el Mg. Percy COLOS GALINDO; para presenciar la sustentación de tesis titulada: “**Optimización de parámetros para la producción de aceite unicelular a partir de levaduras oleaginosas nativas. Ayacucho-Perú 2021**”, presentado por la Bach. **Yessenia YAURI HUAMÁN**; el Presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio al acto de sustentación, indicando a la sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología. Culminada la exposición, el Presidente invitó a cada uno de los Miembros Jurado, a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas a la sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó a la sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR	EXPOSICIÓN	RESPUESTA A PREGUNTAS	PROMEDIO
Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA	18	18	18
Mg. Sonia Haydeé PALOMINO FELICES	20	20	20
Dr. Raúl Antonio MAMANI AYCACHI	18	18	18
		Promedio final	19

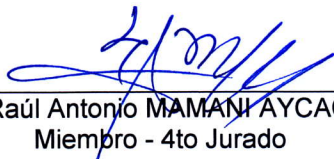
La sustentante alcanzó el promedio de 19 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso de la sustentante y el público al Auditorio dando a conocer los resultados, e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las seis y cuarenta de la tarde; firmando al pie del presente en señal de conformidad.



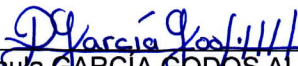
Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA
Presidente (e) Miembro - Jurado



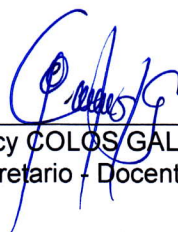
Mg. Sonia Haydeé PALOMINO FELICES
Miembro - Jurado



Dr. Raúl Antonio MAMANI AYCACHI
Miembro - 4to Jurado



Mg. Paula GARCÍA GODOS ALCÁZAR
Miembro - Asesor



Mg. Percy COLOS GALINDO
Secretario - Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA


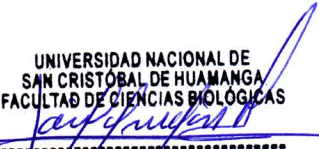
DECANATURA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS N° 12-
2023-FCB-D

Yo, SAÚL ALONSO CHUCHÓN MARTÍNEZ, Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **“Optimización de parámetros para la producción de aceite unicelular a partir de levaduras oleaginosas nativas. Ayacucho – Perú”** presentado por la Bach. YESSENIA YAURI HUAMÁN; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 4%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario N° 039-2021-UNSCH-C.

En tal sentido, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 21 de junio de 2023.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez
DECANO

Optimización de parámetros para la producción de aceite unicelular a partir de levaduras oleaginosas nativas. Ayacucho – Perú

por Yessenia Yauri Huamán

Fecha de entrega: 21-jun-2023 05:22p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2120535845

Nombre del archivo: 1C_-_YAURI-HUAM_N-Yessenia-pregrado_tesis-2023-TURNITIN.docx (6.51M)

Total de palabras: 14296

Total de caracteres: 74659

Optimización de parámetros para la producción de aceite unicelular a partir de levaduras oleaginosas nativas. Ayacucho – Perú

INFORME DE ORIGINALIDAD

4%

INDICE DE SIMILITUD

4%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unamba.edu.pe Fuente de Internet	1%
2	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	www.themasterswoodshop.com Fuente de Internet	1%
4	es.scribd.com Fuente de Internet	<1%
5	trustconverter.com Fuente de Internet	<1%
6	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
7	stud.epsilon.slu.se Fuente de Internet	<1%
8	patents.google.com Fuente de Internet	<1%

9

tip.zaragoza.unam.mx

Fuente de Internet

<1 %

10

doku.pub

Fuente de Internet

<1 %

11

Mejía Martínez Fanny. "El factor transcripcional MXL-3/MAX regula el metabolismo de lípidos en respuesta a una dieta hipercalórica en *C. elegans*", TESIUNAM, 2017

Publicación

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo