



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**"PRODUCCIÓN DE BIOMASA FÚNGICA UTILIZANDO *ASPERGILLUS*  
*ORYZAE*"**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**LUCIA CONTRERAS DUEÑAS**

**TUTOR:**

**Dr. JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dr. NAVARRO OCAÑA ARTURO**

**Dra. RUIZ VILLAFAN BEATRIZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Aguilar Osorio José Guillermo De Jesús

**VOCAL:** Dr. Navarro Ocaña Arturo

**SECRETARIO:** Dra. Ruiz Villafan Beatriz

**1er. SUPLENTE:** M. en C. Sánchez Chinchillas Argelia

**2° SUPLENTE:** Dra. Montiel Pacheco Carmina

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Conjunto E de la Facultad de Química Laboratorio 312

**ASESOR DEL TEMA:**

Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. en C. Michelle Monserrath Camacho Lara

**SUSTENTANTE (S):**

Lucia Contreras Dueñas

## ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS .....	5
LISTADO DE FIGURAS .....	7
LISTADO DE TABLAS .....	10
RESUMEN .....	11
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	12
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES .....	13
2.1 Población en México .....	13
2.2 Biomasa microbiana.....	13
2.3 Tipos de fermentaciones .....	19
2.4 Fermentación sumergida (SmF)/Fermentación líquida (LF).....	20
2.5 Fermentación en estado sólido (SSF) .....	22
2.6 Características del microorganismo seleccionado .....	23
2.7 Nejayote: residuo agroindustrial como medio de cultivo .....	26
2.8 Definición y características de la melaza .....	29
2.9 Productos en el mercado .....	30
2.10 Producción de enzimas .....	34
2.10.1 Enzimas amilolíticas .....	34
2.10.2 Enzimas xilanolíticas .....	36
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	38
3.1 Justificación.....	38
3.2 Hipótesis .....	38
3.3 Objetivos .....	38
CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
4.1 Sustratos utilizados para la elaboración del medio de cultivo. ....	39

4.2	Diseño experimental.....	39
4.3	Material biológico. ....	39
4.4	Curva de crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> . ....	40
4.5	Determinación de azúcares reductores.....	40
4.6	Determinación de azúcares totales. ....	41
4.7	Determinación de actividad amilolítica. ....	41
4.8	Determinación de actividad xilanolítica. ....	41
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		43
5.1	Cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> en medio sólido para propagación y mantenimiento. ....	43
5.2	Fermentación sumergida en matraz.....	43
5.2.1	Variación de pH y fuente de nitrógeno. ....	43
5.2.2	Utilización del nejayote como medio de cultivo .....	48
5.2.3	Adición de una fuente de carbono externa .....	53
5.3	Crecimiento en medio líquido en biorreactor.....	64
5.3.1	Fermentación en un biorreactor BioFlo modelo C-30 con capacidad de 1.5 L. 65	
5.3.2	Fermentación en un biorreactor BioFlo III con capacidad de 5 L.....	68
5.3.3	Fermentación en un biorreactor tipo Air Lift con capacidad de 2.5 L. 80	
5.4	Imágenes obtenidas en diferentes periodos de tiempo .....	84
5.4.1	Fermentación en biorreactor de tanque agitado con capacidad de 5 L. 85	
5.4.2	Fermentación en matraz de 500 mL.....	91
5.5	Análisis químico proximal de la biomasa producida en el biorreactor de tanque agitado de 3 L. ....	94
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....		97



## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<b>GRAS</b>	Generalmente Reconocido como Seguro (Por sus siglas en ingles)
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>INPC</b>	Índice de precios al consumidor
<b>MIT</b>	Instituto de Tecnología de Massachusetts
<b>SCP</b>	Proteína Unicelular (Por sus siglas en ingles)
<b>NA</b>	Ácidos nucleicos (Por sus siglas en ingles)
<b>SMF</b>	Fermentación sumergida (Por sus siglas en ingles)
<b>SSF</b>	Fermentación en estado sólido (Por sus siglas en ingles)
<b>JECFA</b>	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (Por sus siglas en ingles)
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos (Por sus siglas en ingles)
<b>BAUA</b>	Instituto Federal Alemán de Seguridad y Salud en el Trabajo
<b>BVL</b>	Oficina Federal de Protección del Consumidor y Seguridad Alimentaria
<b>GILSP</b>	Buenas prácticas industriales a gran Escala (Por sus siglas en ingles)
<b>OECD</b>	Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (Por sus siglas en ingles)
<b>EEB</b>	Encefalopatía espongiforme bovina
<b>RHM</b>	Rank Hovis McDougall
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>vvm</b>	Volumen de aire por unidad de medio por unidad de tiempo
<b>DNS</b>	Acido 3,5 dinitrosalicílico
<b>LAATS</b>	Sistema de transporte de amonio de baja afinidad (Por sus siglas en ingles)
<b>HAATS</b>	Sistema de transporte de amonio de alta afinidad (Por sus siglas en ingles)

<b>AMT</b>	Transportador de amonio (Por sus siglas en ingles)
<b>MEP</b>	Permeasa de Metilamina (Por sus siglas en ingles)
<b>Rh</b>	Rhesus
<b>GDH</b>	Glutamato deshidrogenasa
<b>GS</b>	Glutamina sintasa
<b>GOGAT</b>	Glutaminaamida: 2-oxoglutarato aminotransferasa
<b>CIAD-</b>	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
<b>CIATEJ</b>	Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco
<b>FAXX</b>	Arabinoxilano ferulolizado (Por sus siglas en ingles)
<b>AmyR</b>	Factor de transcripción para almidón.
<b>MaIR</b>	Factor de transcripción para maltosa.
<b>CreA</b>	Proteína de unión tipo “dedo de zinc” que media la represión de la glucosa a través de un mecanismo aún desconocido.
<b>AQP</b>	Análisis químico proximal



## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. muestra de la proteína unicelular sintética ICI "Pruteen" .....	15
Figura 2. Esquema de una fermentación sumergida.....	20
Figura 3. Esquema de un biorreactor de lecho empacado.....	22
Figura 4. Imagen de la morfología de <i>Aspergillus oryzae</i> en medio agar Papa-Dextrosa.....	25
Figura 5. Tanques para la nixtamalización del maíz .....	27
Figura 6. Proceso de Fermentación de Quorn™.....	31
Figura 7. Diagrama de un biorreactor Airlift de circuito externo.....	33
Figura 8. Producción de biomasa (a) y variación de pH (b) utilizando NaNO <sub>3</sub> como fuente de nitrógeno y fructosa al 1%. .....	44
Figura 9. Producción de biomasa (a) y variación de pH (b) utilizando (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> como fuente de nitrógeno y fructosa al 1%. .....	45
Figura 10. Asimilación de nitrato en hongos filamentosos. ....	46
Figura 11. Curva de utilización de fructosa con respecto al tiempo para las cuatro condiciones examinadas. ....	47
Figura 12. Producción de biomasa (a) y variación de pH (b) utilizando Nejayote a diferentes porcentajes y adicionando (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> como fuente de nitrógeno. ....	50
Figura 13. Curva de utilización de azúcares reductores con respecto al tiempo para las cuatro condiciones examinadas.....	52
Figura 14. Producción de biomasa (a) y variación de pH (b) para la prueba de adición de jarabe de glucosa como fuente de carbono.....	53

Figura 15. Curva de utilización de glucosa con respecto al tiempo para las tres condiciones examinadas. ....	55
Figura 16. Producción de biomasa (a) y variación de pH (b) para la prueba de adición de melaza como fuente de carbono. ....	56
Figura 17. Curva de utilización de la melaza con respecto al tiempo para las dos concentraciones utilizadas en dos medios diferentes. ....	57
Figura 18. Producción de biomasa (a) y variación de pH (b) para la prueba de adición de glucosa como fuente de carbono en diferentes medios y porcentajes. ....	59
Figura 19. Producción de biomasa (a) y variación de pH (b) para la prueba de adición de melaza como fuente de carbono en diferentes medios y porcentajes. ....	61
Figura 20. Curva de utilización de la fuente de carbono (adicionadas a las 0 h) con respecto al tiempo para glucosa (a) y melaza (b) utilizadas en los medios con y sin nejayote. ....	63
Figura 21. Producción de biomasa (a) y variación de pH (b) para el escalamiento a un biorreactor de 1L. ....	65
Figura 22. Curva de utilización de la fuente de carbono con respecto al tiempo para el escalamiento a un biorreactor de 1L. ....	67
Figura 23. Producción de biomasa (a) y variación de pH (b) para el escalamiento a un biorreactor de 3 L. ....	69
Figura 24. Curva de utilización de azúcares reductores con respecto al tiempo para el escalamiento a un biorreactor de 3 L para las tres condiciones analizadas. ....	72
Figura 25. Curva de utilización de azúcares totales con respecto al tiempo para el escalamiento a un biorreactor de 3 L para las tres condiciones analizadas. ....	74
Figura 26. Curva de actividad amilolítica con respecto al tiempo para el escalamiento a un biorreactor de 3 L para las tres condiciones analizadas. ....	77

Figura 27. Curva de oxígeno disuelto en el medio con respecto al tiempo para el escalamiento a un biorreactor de 3 L para las tres condiciones analizadas.....	78
Figura 28. Producción de biomasa (a) y variación de pH (b) para una fermentación en el reactor Air Lift. ....	81
Figura 29. Curva de utilización de azúcares reductores (a) y totales (b) con respecto al tiempo para para una fermentación en el reactor Air Lift. ....	82
Figura 30. Curva de oxígeno disuelto en el medio con respecto al tiempo en una fermentación en el reactor Air Lift.....	83
Figura 31. Imágenes del crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> en el biorreactor de 3 L con el medio H <sub>2</sub> O + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 2% de melaza. ....	86
Figura 32. Imágenes del crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> en el biorreactor de 3 L con el medio Nejayote + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 2% de melaza .....	88
Figura 33. Imágenes del crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> en el biorreactor de 3 L con el medio Nejayote + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	90
Figura 34. Imágenes del crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> en matraz con el medio H <sub>2</sub> O + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 2% de melaza .....	91
Figura 35. Imágenes del crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> en matraz con el medio Nejayote + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 2% de Melaza.....	92
Figura 36. Imágenes del crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> en matraz con el medio nejayote + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ....	93

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	24
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del nejayote.....	28
Tabla 3. Composición general de melazas .....	29
Tabla 4. Composición química del medio mínimo de Pontecorvo*.....	39
Tabla 5. Composición química del Nejayote utilizado .....	49
Tabla 6. Constante específica de velocidades de crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> en los medios utilizados .....	70
Tabla 7. Composición química de la biomasa producida .....	95

## RESUMEN

Los requerimientos de proteína animal para la población mexicana son cada vez más complicados de cumplir para la agricultura tradicional. Con eso en mente se espera producir biomasa con *Aspergillus oryzae* a partir de desechos altamente contaminantes como lo es el nejayote, residuo de la nixtamalización del maíz, y la melaza de caña. Esta biomasa se puede introducir en la dieta humana como micoproteína o proteína unicelular. Actualmente hay productos en el mercado que utilizan la proteína unicelular, como los es la marca Quorn™. Se realizó una fermentación sumergida para producir la biomasa, la composición óptima del medio líquido es Nejayote,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y melaza para una concertación final del 2%, a 31°C, un valor de pH de 6, 300 rpm y un periodo de fermentación de 72h. Se produjeron 10.94 mg de biomasa por mL, el análisis químico proximal de esta biomasa indica que contiene 26.35 g de proteína por cada 100 g de biomasa, este resultado indica un contenido de proteína mayor que el presente en la carne de vacuno o aviar. Se concluyó que este tipo de proteína puede ser un sustituto en la dieta humana para la proteína animal. Además, la producción de la micoproteína puede ayudar a generar una economía circular, ya que el medio líquido resultante presenta actividad amilolítica la cual es de gran importancia industrial y se reducen las descargas de nejayote a los cuerpos de agua.

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La proteína unicelular es la biomasa recolectada de distintos microorganismos como algas, hongos, bacterias y levaduras, además es un producto que ha adquirido un gran valor agregado en la actualidad, ya que esta puede ser utilizada para suplementar la dieta animal o fungir, en la dieta humana, como sustituto de la proteína animal. Esto podría ayudar al medio ambiente debido a que la demanda proteínica mundial no puede ser abastecida por la agricultura convencional. Actualmente existen productos en el mercado basados en biomasa fúngica, un ejemplo es la marca Quorn™ que utiliza a *Fusarium venenatum* para su producción, dicha marca vende productos vegetarianos y veganos tipo alitas, hamburguesas, filetes, jamón, huevos, etc.

El presente trabajo se enfocará en la producción de biomasa fúngica utilizando como recurso biológico a *Aspergillus oryzae*. *A. oryzae* no produce micotoxinas y se le considera un microorganismo GRAS (Generally Recognized as Safe, por sus siglas en inglés). Se utilizó, para la producción de micoproteína, como medio de cultivo al nejayote y la melaza. El nejayote es un residuo de la nixtamalización del maíz y la melaza es el residuo de cristalización final del azúcar, del que no se puede obtener más azúcar.

Se probaron diferentes condiciones para las variables de pH, fuente de nitrógeno y fuente de carbono. A nivel matraz se encontró que el medio de nejayote con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y melaza al 2% fue el que produjo una mayor cantidad de biomasa. Posteriormente se escaló la fermentación a diferentes tipos de biorreactor y en el cual se probó el efecto sinérgico entre el nejayote y la melaza. Una vez obtenida la biomasa se le realizó un análisis químico proximal para conocer los porcentajes de proteína, grasa, fibra, cenizas y carbohidratos del producto obtenido.

## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Población en México

Conforme al Censo de Población y Vivienda de 2020, en México viven **126,014,024** personas, lo que implica que México ocupa el 11° lugar dentro de las naciones más pobladas del mundo. Durante los últimos 70 años, la población en México ha crecido poco más de cuatro veces. En 1950 había 25.8 millones de personas; en 2020 hay 126 millones. De 2010 a 2020, la población se incrementó en 14 millones de habitantes (INEGI, 2020). Tomando esto en cuenta, el abastecimiento de proteína animal para la población es insuficiente, lo cual significa un incremento en los precios haciéndolos menos accesibles para la población. Esto genera que la dieta actual del mexicano tenga insuficiencias en los aminoácidos esenciales, también conocidos como aminoácidos indispensables, los seres humanos y otros vertebrados no los pueden sintetizar a partir de intermediarios metabólicos. Estos aminoácidos deben ser suministrados de una dieta exógena porque el cuerpo humano carece de las vías metabólicas necesarias para sintetizar estos aminoácidos (Hou et al., 2015; Hou & Wu, 2018).

Según las cifras del Coneval, al corte de enero del 2023, para costear los alimentos básicos en zonas rurales de México son necesarios 1,644 pesos mensuales por persona. En las zonas urbanas el monto escala a 2,144 pesos. (García, 2023) Las canastas básicas alimentarias se calculan con ponderaciones del INPC, incluyen alimentos de alta incidencia por su participación en el consumo total. Dentro de estos se encuentran: carnes, leche, quesos, huevo y otros lácteos. (García, 2023) Es por ello por lo que se busca encontrar otras fuentes de proteína que pueda proveer los aminoácidos esenciales a un precio más accesible.

### 2.2 Biomasa microbiana

Los microorganismos son los seres más numerosos y primitivos que existen, logrando colonizar exitosamente cada nicho ecológico del planeta desde el suelo hasta el aire que respiramos, son parte fundamental de los ecosistemas y además tienen una relación estrecha con animales y plantas, incluso de forma simbiótica en

muchos casos. Estos han sido empleados para la obtención de medicamentos (antibióticos, vitaminas, aminoácidos), elaboración de alimentos (pan, queso, leche, bebidas y licores), producción de solventes (acetona) y reactivos, degradación de compuestos tóxicos y residuos industriales (ej. hidrocarburos policíclicos aromáticos), entre otras aplicaciones (Evans & Furlong, 2003). El creciente uso de estos entes biológicos en la biotecnología y para la protección medioambiental ha fortalecido la necesidad de multiplicarlos de manera controlada, y que las propiedades que los hacen útiles permanezcan estables. (Evans & Furlong, 2003) Sin embargo, en México los beneficios de estos seres son poco investigados si se comparan con países con menor diversidad biológica como Estados Unidos, Japón, Corea, Alemania, Dinamarca y Suiza. En estos países el uso de la diversidad microbiana es fuente de nuevos productos y de altas ganancias provenientes de la industria farmacéutica y de otros procesos industriales. (Montaño-Arias et al., 2010)

Entre los diversos productos que se generan con los microorganismos, la bioproteína es uno que no ha sido explotado, como lo han sido los medicamentos o incluso algunos productos alimenticios fermentados. El término 'proteína unicelular' fue acuñado en 1968 en una reunión celebrada en el Instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT) para reemplazar la 'proteína microbiana' menos estética y la 'petroproteína' que eran los términos utilizados originalmente (Mateles & Tannenbaum, 1968; Tannenbaum & Wang, 1975), los microorganismos que se utilizaron fueron principalmente bacterias, levaduras, hongos y algas.

Aunque el hombre ha estado familiarizado con el uso de alimentos y piensos de microorganismos durante siglos, la tecnología SCP (Single Cell Protein por sus siglas en inglés) para la alimentación se desarrolló en los últimos 100 años, mientras que la producción a gran escala se ha desarrollado en el siglo XX y particularmente después de la Primera Guerra Mundial (Israelidis, 2003). Esto fue en Berlín con el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en un nivel de producción para reemplazar hasta el 60% de los alimentos que Alemania había estado importando después de la guerra (Rose, 1981). También el almacenamiento de levadura de *Candida arborea* y *C. utilis* hizo una importante contribución a la dieta en Alemania



en la Segunda Guerra Mundial. Después de la Segunda Guerra Mundial, el crecimiento de hongos en cultivos sumergidos para la producción de antibióticos llevó a una investigación de los hongos filamentosos potenciales como aditivos de sabor para reemplazar a los champiñones.



**FIGURA 1. MUESTRA DE LA PROTEÍNA UNICELULAR SINTÉTICA ICI "PRUTEEN"**

*Nota:* Adaptado de *Pruteen sample* [Fotografía] por The Board of Trustees of the Science Museum, Londres, 2019, Science Museum Group Collection (<https://collection.sciencemuseumgroup.org.uk/objects/co8452715/pruteen-sample-sample-synthetic-protein>)

Imperial Chemical Industries desarrolló un SCP (Pruteen™) para la alimentación animal a partir de metanol, utilizando la bacteria *Methylophilus methylotrophus*. Pruteen™ contenía hasta un 70% de proteína y se utilizó en la alimentación de cerdos (Johnson, 2013). Pruteen™, sin embargo, no podía competir con los piensos más baratos que estaban disponibles a finales de la década de 1970 y la producción se suspendió. Otro ejemplo fue con la compañía British Petroleum la cual fue pionera en la producción de *Yarrowia lipolytica* SCP para alimentación animal a partir de n-parafinas cerosas de una refinería de petróleo en la década de 1970, construyendo una planta piloto con capacidad de producción anual de hasta 100 kton (Groenewald, y otros, 2014). Aunque el producto en sí se consideraba seguro,

la planta no obtuvo los permisos de producción requeridos debido a preocupaciones ambientales (Bamberg, 2000). Combinado con el alto precio del sustrato resultante de las crisis del petróleo de 1973, esto llevó a British Petroleum a abandonar su interés en SCP (Groenewald, y otros, 2014).

En principio SCP es la fabricación de masa celular utilizando microorganismos mediante el cultivo de residuos agrícolas e industriales abundantemente disponibles. La producción de biomasa microbiana se realiza mediante un proceso de fermentación sumergida o en estado sólido. Después de la fermentación, la biomasa se cosecha y se puede someter a pasos de procesamiento posteriores como lavado, interrupción celular, extracción de proteínas y purificación (Faust, 1987). La proteína unicelular se utiliza como complemento proteico en alimentos humanos o piensos animales. La principal ventaja es el alto contenido de proteínas (alrededor del 60-82% del peso de las células secas), pero adicionalmente la proteína unicelular también contiene grasas, carbohidratos, ácidos nucleicos, vitaminas y minerales (Gour et al., 2015).

Otra ventaja con SCP es que es rico en aminoácidos esenciales que son limitantes en alimentos vegetales y animales, tales como la lisina y la metionina. Los microorganismos como bacterias, levaduras, hongos y algas se caracterizan por poder utilizar materia prima barata y residuos para producir biomasa, concentrado de proteínas o aminoácidos. Se han utilizado sustratos convencionales como almidón, melaza, desechos de frutas y verduras para la producción de SCP, así como otros no convencionales como subproductos del petróleo, gas natural, etanol, metanol y biomasa lignocelulósica. (Gour et al., 2015)

La biomasa microbiana se ha considerado una alternativa a las fuentes convencionales de alimentos o piensos. La producción a gran escala para la producción de SCP puede variar debido a la selección de metodologías, materias primas y microorganismos que se pueden utilizar para este propósito; alta eficiencia en la conversión de sustrato; alta productividad, derivada del rápido crecimiento de los microorganismos; independencia de los factores estacionales. (Roth, 1980; Parajó et al., 1995)

En la Primera Guerra Mundial Alemania reemplazó la mitad de las fuentes de proteínas importadas por levadura. Pruteen™ fue la primera proteína unicelular comercial utilizada como aditivo en la alimentación animal. El contenido de ácidos nucleicos (NA) en la bioproteína es uno de los principales factores que dificultan su utilización como alimento, ya que una ingesta excesiva de NA genera una precipitación de ácido úrico, causando enfermedades como gota o formación de cálculos renales. En humanos el contenido de NA debe reducirse por debajo del 2%. Sin embargo, actualmente existen varias tecnologías para reducir el contenido de ácidos nucleicos de las células microbianas, ya sean procedimientos químicos y enzimáticos. (Parajó et al., 1995)

Los microorganismos utilizados para la producción de SCP son bacterias (*Cellulomonas*, *Alcaligenes*, etc.), algas (*Spirulina*, *Chlorella*, etc.), hongos (*Trichoderma*, *Fusarium*, *Rhizopus*, etc.) y levaduras (*Candida*, *Saccharomyces*, etc.). (Rasoul-Amini et al., 2011) Se ha calculado que 100 libras de levadura producirán 250 toneladas de proteínas en 24 h. Las algas cultivadas en estanques pueden producir 20 toneladas (peso seco) de proteína, por acre, por año. Las bacterias son generalmente altas en proteínas (contienen de 50 a 80%) y tienen una tasa de crecimiento rápida. (Rasoul-Amini et al., 2011)

A pesar de las altas tasas de producción, la proteína bacteriana no es adecuada debido a que las células bacterianas tienen un tamaño pequeño y baja densidad, lo que hace que la cosecha del medio fermentado sea difícil y costosa. Además, sus niveles de ácido nucleico son elevados, en comparación con la proteína producida por las levaduras y los hongos, por lo que reducir los niveles de NA hasta que sean aceptables genera un costo adicional. Finalmente, la opinión pública hacia estos microorganismos es que son nocivos para la salud. (Rasoul-Aminu et al., 2011)

Las levaduras tienen ventajas tales como su mayor tamaño (más fácil de cosechar), menor contenido de ácidos nucleicos, alto contenido de lisina y capacidad de crecer a pH ácido. Sin embargo, la ventaja más importante es la familiaridad y aceptabilidad debido a la larga historia de su uso en fermentaciones tradicionales. Las desventajas incluyen tasas de crecimiento más bajas, menor contenido de

proteínas (45 a 65%) y menor contenido de metionina que en las bacterias. Las algas tienen desventajas de tener paredes celulares celulósicas que no son digeridas por los seres humanos. En segundo lugar, también concentran metales pesados. (Rasoul-Amin et al., 2011)

Muchas especies fúngicas se utilizan como fuente de alimentos ricos en proteínas (Bhalla et al., 2007). Muchas otras especies filamentosas también se utilizan como fuente de proteína unicelular. En 1973, en la segunda conferencia internacional convocada en el MIT, se informó que *Actinomicetos* y hongos filamentosos produjeron proteínas a partir de diversos sustratos. Durante la Segunda Guerra Mundial, se realizaron ensayos para utilizar los cultivos de *Fusarium* y *Rhizopus* (Yousuf, 2012) cultivados en fermentación como fuente de alimento proteico. Los inóculos de *A. oryzae* (Ravindra y Anupama, 2000) o *Rhizopus arrhizus* fueron seleccionados debido a su naturaleza no tóxica. Los hongos saprofitos crecen en compuestos orgánicos complejos y los convierten en estructuras simples. Se produce una alta cantidad de biomasa fúngica como resultado del crecimiento. El rendimiento de biomasa varía enormemente, lo que depende de los organismos y sustratos. (Gour et al., 2015)

Hay algunas especies de hongos, por ejemplo, *Aspergillus niger* (Yabaya & Ado, 2008), *A. fumigatus* y *Fusarium graminearum* que son muy peligrosos para el ser humano, por lo tanto, tales hongos, no deben usarse o deben realizarse evaluaciones toxicológicas antes de recomendar su uso como proteína unicelular. Los hongos filamentosos que se han utilizado son *Chaetomium celluloliticum*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Cephalosporium cichorniae*, *Penicillium cyclopium*, *Rhizopus chinensis*, *Scytalidium acidophilum*, *Trichoderma viridae*, y *Trichoderma alba*, *Paecilomyces varioti* (Jaganmohan et al., 2013)

La bioproteína se puede producir por un número de diversos sustratos, a menudo esto se hace para reducir la demanda biológica del oxígeno de las corrientes de efluente que salen de varios tipos de plantas de proceso agrícolas. Muchas materias primas han sido consideradas como sustrato para la producción de SCP (Nasseri et al., 2011). Se han utilizado sustratos convencionales como almidón, melaza,

desechos de frutas y hortalizas para la producción de SCP, así como otros no convencionales como subproductos del petróleo, gas natural, etanol, metanol y biomasa lignocelulósica (Martin, 1991; Bekatorou et al., 2006). Los sustratos que contienen carbohidratos son los más utilizados para la producción de proteína unicelular debido a que los carbohidratos son sustratos microbianos naturales y también porque los carbohidratos constituyen una materia prima renovable (Ugalde & Castrillo, 2002).

### 2.3 Tipos de fermentaciones

Lo más importante en la producción de SCP es la fermentación, para la conversión óptima del sustrato a la masa microbiana. La fermentación tiene diferentes significados según la rama a la que se refiera ya sea bioquímica e industrial. Su significado bioquímico se relaciona con la generación de energía por el catabolismo de compuestos orgánicos, mientras que su significado en microbiología industrial tiende a ser mucho más amplio (Stanbury et al., 2016).

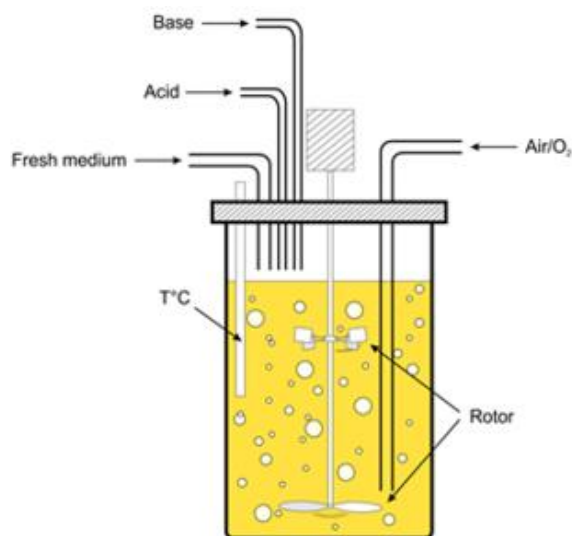
El catabolismo del azúcar es un proceso oxidativo, que resulta en la producción de nucleótidos de piridina reducidos, que deben ser reoxidados para que el proceso continúe. En condiciones aeróbicas, la reoxidación del nucleótido de piridina reducido ocurre por transferencia de electrones, a través del sistema de citocromo, con oxígeno actuando como el aceptor de electrones terminal. Sin embargo, bajo condición anaerobia, la oxidación reducida del nucleótido de la piridina se combina con la reducción de un compuesto orgánico, que es a menudo un producto subsecuente de la vía catabólica (Stanbury et al., 2016). El término fermentación se ha utilizado en un sentido bioquímico estricto para significar un proceso de generación de energía en el que los compuestos orgánicos actúan como donantes de electrones y aceptadores de electrones terminales (Stanbury et al., 2016).

Mientras que, desde el punto de vista industrial la fermentación se refiere a cualquier proceso en el que se cultivan microorganismos a gran escala, sin importar cuál es su aceptor final de electrones (Ezema et al., 2022). Las fermentaciones pueden ser líquidas, también conocidas como sumergidas, en estado sólido, y de superficie.

La mayoría de las fermentaciones utilizadas en la industria son procesos sumergidos, porque los fermentadores usados ahorran espacio y son más susceptibles de control de ingeniería y diseño (Okafor & Okeke, 2018).

#### 2.4 Fermentación sumergida (SmF)/Fermentación líquida (LF)

La gran mayoría de los productos obtenidos por fermentación, provienen de la fermentación sumergida o submerged fermentation (SmF por sus siglas en ingles). En este tipo de fermentaciones los nutrientes y los microorganismos se encuentran en fase acuosa (Ramírez L. , 2009). La producción de enzimas en SmF ha sido preferida por la industria debido a un mejor control de parámetros de todo el proceso. La tecnología se ha desarrollado hasta un punto en el que los parámetros de temperatura, agitación, aireación, espuma y pH, entre otros, pueden controlarse ampliamente, dependiendo del tipo de reactor específico (Vaidyanathan et al., 1999). Todos estos factores son muy importantes para el rendimiento del producto de interés.



**FIGURA 2. ESQUEMA DE UNA FERMENTACIÓN SUMERGIDA**

*Nota:* Adaptado de *Submerged Liquid Fermentations*, por BIOSCIENCE NOTES, 2019, (<https://www.biosciencenotes.com/submerged-liquid-fermentations/>)

Cuando los hongos filamentosos son cultivados en un sistema de fermentación sumergida, pueden presentar dos tipos de morfologías: la filamentosa y la de forma de pellets (Rehm et al., 1993). La morfología fúngica en cultivos sumergidos es muy

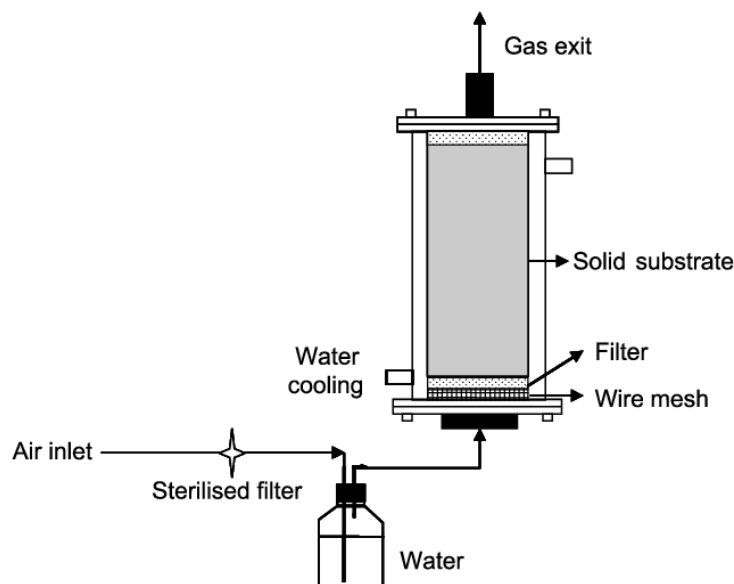
dependiente del nivel de esfuerzo cortante aplicado. Si se utilizan altas tasas de agitación, la morfología será predominantemente hifas dañadas y menos aglomerados (Gustav et al., 2015). A menor agitación predominará la formación de pellets de diferente tamaño. Otros factores que afectan la morfología son las características de transferencia de masa, el valor de pH, la osmolalidad y las partículas micro sólidas en el medio (Krull, y otros, 2013; El-Enshasy, 2007). El fermentador se puede operar en lote, en cultivo alimentado y de modo continuo y la biomasa se cosecha al final de proceso o continuamente según el modo de operación. Posteriormente, el producto se filtra o se centrifuga y luego se seca. La aireación es una operación importante en el cultivo, el calor que se genera durante el cultivo y se elimina mediante un dispositivo de enfriamiento (Hajoori & Shah, 2022).

Para lograr una fermentación aeróbica líquida, es necesario suministrar constantemente oxígeno al microorganismo, lo que generalmente se hace agitando los medios de fermentación en el caso de utilizar matraces agitados o mediante agitación y la inyección de aire a los sistemas de fermentación en el caso del uso de fermentadores de laboratorio o industriales (Hajoori & Shah, 2022). Este tipo de fermentación se ha utilizado con una gran variedad de hongos, ofreciendo la posibilidad de una alta producción de biomasa en un espacio compacto, menor tiempo de crecimiento y menores posibilidades de contaminación.

En esta, la producción de biomasa fúngica y de exopolisacáridos depende de las especies utilizadas, las condiciones de crecimiento, el tiempo y sus requerimientos nutricionales (Pérez-Guerra et al., 2003). Tomando todo esto en cuenta para la obtención de biomasa este tipo de fermentación es la ideal, ya que generalmente se utiliza la determinación de peso seco o método gravimétrico para cuantificar la biomasa, el cual presenta importantes limitaciones en su aplicación a la SSF, debido a la íntima relación física existente entre la biomasa microbiana y el sustrato, que hace casi imposible su separación.

## 2.5 Fermentación en estado sólido (SSF)

La fermentación en estado sólido o solid state fermentation (SSF por sus siglas en inglés) se define como la fermentación que involucra sólidos en ausencia (o casi ausencia) de agua libre; sin embargo, el sustrato debe poseer suficiente humedad para apoyar el crecimiento y el metabolismo del microorganismo (Pandey, 1992; Pandey, 1994; Pandey et al., 2001). La fermentación en estado sólido (SSF) utiliza sustratos sólidos que simulan las condiciones de vida de muchos hongos filamentosos superiores, como salvado de trigo, bagazo y pulpa de papel. SSF es el método de cultivo de elección en los casos en que el proceso biotecnológico debe incluir la diferenciación morfológica y metabólica en hifas aéreas y penetrantes del sustrato, como en la producción de conidiosporas. Por ejemplo, se utiliza en la industria alimentaria en la producción de conidiosporas para la producción de queso enmohecido (para las que se necesitan conidiosporas de *Penicillium roquefortii* o *P. camemberti*) o para la mejora del salami (para las que pueden utilizarse conidiosporas de *P. nalgiovensis*) y también en el ámbito de la producción de agentes fitosanitarios (que utilizan *Coniothyrium minitans*). (Hölker & Lenz, 2005)



**FIGURA 3. ESQUEMA DE UN BIORREACTOR DE LECHO EMPACADO**

*Nota:* Adaptado de "Application of solid-state fermentation to food industry—A review" (p. 297), por S. Rodríguez y M. A. Sanromán, 2006, *Journal of Food Engineering*, (<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022>)



La principal ventaja de utilizar estos sustratos es que los materiales de desecho ricos en nutrientes pueden reciclarse fácilmente como sustratos. En esta técnica de fermentación, los sustratos se utilizan muy lenta y constantemente, por lo que el mismo sustrato se puede utilizar durante largos períodos de fermentación. Por lo tanto, esta técnica apoya la liberación controlada de nutrientes. SSF es más adecuado para técnicas de fermentación que involucran hongos y microorganismos que requieren menos contenido de humedad. Sin embargo, no puede ser utilizado en procesos de fermentación que involucren organismos que requieran alta  $a_w$  (actividad del agua) (Babu & Satyanarayana, 1996).

## 2.6 Características del microorganismo seleccionado

Como ya se mencionó uno de los hongos filamentosos utilizados para la producción de proteína unicelular es *A. oryzae* (**Figura 4**). Este es un hongo filamentoso aeróbico y pertenece al subgénero *Aspergillus Circumdati* sección *Flavi*, anteriormente conocido como el grupo *A. flavus*. La sección de *Aspergillus Flavi* contiene especies de importancia industrial, como *A. oryzae*, así como hongos de importancia agronómica y médica, como *A. flavus* y *A. parasiticus*, que producen una potente sustancia carcinógena llamada aflatoxina. Taxonómicamente, *A. oryzae* está estrechamente relacionada con *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. sojae*, que también se ha utilizado para la fermentación shoyu durante mucho tiempo. A pesar de esta estrecha relación, *A. oryzae* y *A. sojae* nunca producen aflatoxinas y se utilizan en la fabricación de alimentos fermentados. (Gomi, *Aspergillus oryzae*, 2014)

**TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *ASPERGILLUS ORYZAE***

<b>Dominio</b>	<b>Eukaryota</b>
<b>Reino</b>	Fungi
<b>Subreino</b>	Dikarya
<b>Filo</b>	Ascomycota
<b>Subfilo</b>	Pezizomycotina
<b>Clase</b>	Eurotiomycetes
<b>Orden</b>	Eurotiales
<b>Familia</b>	Aspergillaceae
<b>Género</b>	<i>Aspergillus</i>
<b>Especie</b>	<i>Oryzae</i>

Adaptado de (NCBI, s.f.)

*A. oryzae* se aísla de suelos y plantas, particularmente arroz. *A. oryzae* lleva el nombre de su aparición en la naturaleza y el cultivo industrial de arroz, *Oryza sativa*. *A. oryzae* tiene una temperatura de crecimiento óptima de 32-36 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) y no puede crecer por encima de 44°C. Tiene un pH de crecimiento óptimo de 5-6 y puede germinar a pH 2-8. Generalmente puede crecer en medios con una actividad de agua ( $a_w$ ) por encima de 0,8, pero rara vez crece por debajo de ese valor (Gomi, *Aspergillus oryzae*, 2014).

Durante mil años, *A. oryzae* se ha utilizado ampliamente en Asia, particularmente en Japón, como iniciador para la preparación de koji, que es un cultivo de estado sólido del moho cultivado en granos de cereales como arroz, trigo o cebada. Por lo tanto, estos hongos se llaman moho koji. (Gomi, *Aspergillus oryzae*, 2014) El papel más importante de *A. oryzae* en la industria alimentaria es como fuente de una variedad de enzimas para hidrolizar las materias primas utilizadas para la fermentación. De las enzimas hidrolíticas producidas por *A. oryzae*, las enzimas más importantes en la fermentación del sake son la  $\alpha$ -amilasa y la glucoamilasa, que desempeñan papeles cruciales en la solubilización y la sacarificación del almidón. (Gomi, *Aspergillus oryzae*, 2014)



**FIGURA 4. IMAGEN DE LA MORFOLOGÍA DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EN MEDIO AGAR PAPA-DEXTROSA**

*Nota:* Fotografía obtenida para el presente trabajo

Además de las enzimas amilolíticas, las enzimas proteolíticas, celulolíticas y xilanolíticas son importantes en la fabricación de *shoyu*. Los genes que codifican estas enzimas han sido aislados y secuenciados. Además, se han clonado varios genes que codifican otras proteínas extracelulares e intracelulares, incluidas enzimas de importancia industrial, y se han investigado sus estructuras y funciones. (Gomi, *Aspergillus oryzae*, 2014) Las enzimas alimentarias, incluidas las derivadas de cepas recombinantes de *A. oryzae*, han sido evaluadas por el JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) y muchos países que regulan el uso de enzimas alimentarias, como los Estados Unidos, Francia, Dinamarca, Australia y Canadá, que da lugar a la aprobación del uso de enzimas alimentarias de *A. oryzae* en la producción de diversos alimentos, como la panadería, la elaboración de cerveza, la producción de zumos, la producción de vino y la producción de productos lácteos (AB Enzymes Inc., 2020).

La biomasa de *A. oryzae*, extractos y productos son ampliamente utilizados en suplementos de alimentación animal. Se presume que las enzimas y otros productos de *A. oryzae* son seguros, sobre la base de un análisis del árbol de decisión y pruebas toxicológicas extensas. (Cura Global Health, Inc., 2018) La larga historia de uso extensivo de *A. oryzae* en las industrias de fermentación de alimentos llevó

a las aplicaciones industriales de *A. oryzae* a ser catalogado como Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos o Food and Drug Administration (FDA por sus siglas en inglés) en los Estados Unidos. (Tailor & Richardson, 1979; Abe et al., 2006) La seguridad de este organismo también es apoyada por la Organización Mundial de la Salud (OMS). (FAO\_WHO, 1987)

En Europa, *A. oryzae* está clasificado como un microorganismo de bajo riesgo, como se ejemplifica en la lista del Grupo de Riesgo 1 en las listas de clasificación de microorganismos del Instituto Federal Alemán de Seguridad y Salud en el Trabajo (BAuA) y la Oficina Federal de Protección del Consumidor y Seguridad Alimentaria (BVL) (AB Enzymes Inc., 2020). Como resultado, *A. oryzae* se puede utilizar bajo el nivel de contención más bajo a gran escala, GILSP, según lo definido por la OECD (Organisation for Economic Co-Operation and Development) (OECD, 1992).

## 2.7 Nejayote: residuo agroindustrial como medio de cultivo

La nixtamalización (**figura 5**) es un proceso térmico que requiere de una combinación de temperatura y tiempo para lograr los cambios adecuados en los granos de maíz para su uso en la elaboración de alimentos (Méndez-Montealvo et al., 2008). El proceso a detalle consiste en:

- a) Calentar el maíz en agua (entre 125 y 160 L por cada 50 kg de maíz) con cal (0.1-5.0 %) a 80 °C por 0.25-3.0 h.
- b) Reposar el licor resultante durante 12-24 h.
- c) Lavar el licor reposado con agua en proporción 1:3 (3 L de agua por kg de maíz).
- d) Escurrir el exceso de agua.
- e) Finalmente, el producto resultante es el nixtamal, el cual se utiliza para la elaboración de masa o harina que pueden ser usadas para la fabricación de tortillas, botanas, panes, tostadas y otros productos (Medina et al., 2009; Rosentrater, 2006).



**FIGURA 5. TANQUES PARA LA NIXTAMALIZACIÓN DEL MAÍZ**

*Nota:* Adaptado de *Tecnologías para producir masa de maíz fresca en la industria de la tortilla y snacks*, por the FOOD TECH, 2022, (<https://thefoodtech.com/maquinaria-para-ensado-y-procesamiento/tecnologias-para-producir-masa-de-maiz-fresca-en-la-industria-de-la-tortilla-y-snacks/>)

De acuerdo con la NMX-FF-034/1-SCFI-2002 el nejayote se define como el subproducto del proceso de nixtamalización del maíz, constituido por agua, cal y sólidos que se desprendieron del maíz durante el cocimiento (Secretaría de Economía, 2002). Se encuentra compuesta por un 92 a 94 % de agua y un 6 a 8 % de residuos de maíz, entre los que figuran las partes del pericarpio, endospermo, germen, carotenoides (pigmentos responsables del color amarillo característico del nejayote), y calcio. (Velazco et al., 1997) Desde hace cuatro décadas se sabe que la calidad del extracto está directamente relacionada con las propiedades iniciales de las materias primas (maíz, agua e hidróxido de calcio) y las condiciones del proceso de nixtamalización (Trejo-González et al., 1982). Sin embargo, el álcali, la temperatura y el tiempo de mezclado son algunos de los parámetros que presentan interacción con los insumos participantes, lo que resulta en extractos con mayor contenido de componentes (Escalante-Aburto et al., 2013; Fernández-Muñoz et al., 2006; Ruiz-Gutiérrez et al., 2010).

Adicionalmente se ha reportado la presencia de compuestos bioactivos en estas aguas residuales como carbohidratos como arabinosilano (Niño-Medina et al., 2009; Ayala-Soto et al., 2014), fibra dietética (Acosta-Estrada et al., 2014) y polifenoles (Gutiérrez-Urbe et al., 2010; Lopez-Martinez et al., 2009) como los ácidos hidroxicinámico, p-cumarínico, felúrico, deshidrogodeferúlico y deshidrotrifílico (Ayala-Soto et al., 2014).

**TABLA 2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL NEJAYOTE**

<b>Propiedad</b>	<b>Parámetro</b>
<b>Cenizas (%)</b>	31.2
<b>Proteína cruda (%)</b>	2.9
<b>Grasa cruda (%)</b>	0.3
<b>Fibra dietética total (%)</b>	41.2
<b>Extracto libre de nitrógeno* (%)</b>	24.4

\*El extracto libre de nitrógeno se cuantifican por diferencia (100-(% cenizas + % grasa + % proteína + % fibra dietética total))

Adaptado de (Carrera et al., 2012)

La producción de nejayote es mayor a 50 millones de m<sup>3</sup> /año (Scheel, 2016) debido a la gran cantidad de nixtamal producido para la elaboración de tortilla de maíz, que es la base de la dieta alimenticia de la población mexicana (aproximadamente 126 millones de habitantes (INEGI, 2020)). Generalmente, el nejayote se vierte en el drenaje municipal o en cuerpos de agua, suscitando un problema de contaminación ambiental. La separación de sólidos suspendidos, sedimentables y coloidales del nejayote se lleva cabo mediante operaciones de filtrado o el proceso físico y químico de coagulación/ floculación (Suárez et al., 2016; Téllez et al., 2016).

Los usos que se le han dado al nejayote están encaminados a la recuperación de componentes de valor agregado alto (González et al., 2003; Niño-Medina et al., 2009; Paz-Samaniego et al., 2015), como fuente de enriquecimiento para alimentos funcionales (Acosta-Estrada et al., 2014) o como medio de cultivo para crecimiento de bacterias (Blanco-Gómez et al., 2008). También se ha indagado cómo tratar el efluente con materiales floculantes (Suarez-Meraz et al., 2016), mediante tecnología de membranas (Castro-Muñoz & Yáñez-Fernández, 2015) o sistemas biológicos (Pulido et al., 1987), para disminuir la acción contaminante que el extracto genera.

## 2.8 Definición y características de la melaza

La melaza se describe como el efluente final adquirido en la preparación de la sacarosa por una evaporación repetida, centrifugación y cristalización a partir de jugos de caña de azúcar. La melaza puede ser de varios tipos y puede denominarse a cualquier ingrediente líquido de la alimentación, que contiene un excedente del 43% de azúcares. (Lemnaro et al., 2021) La composición de las melazas es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de caña de azúcar, suelo, clima, período de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros. (Fernández Méndez, 2018)

Durante la producción de sacarosa a partir de jugo de caña, los inhibidores de la cristalización se acumulan en las jarabes residuales o licores madre; estos jarabes se llaman melaza. (Binkley & Wolform, 1953) Cuando la acumulación de estos inhibidores es tan grande que la recuperación de sacarosa ya no es económicamente viable, esta melaza se conoce como la melaza final o black-strap. El término "black-strap" se originó en la industria azucarera holandesa a partir de "stroop" negro que significa jarabe negro (Deerr, 1945). La melaza obtenida en las primeras etapas de la producción de sacarosa tiene un sabor agradable y se utiliza en la preparación de melaza comestible. (Binkley & Wolform, 1953)

**TABLA 3. COMPOSICIÓN GENERAL DE MELAZAS**

<b>Composición</b>	<b>Intervalo (%)</b>
<b>Sacarosa</b>	29-40
<b>Agua</b>	17-25
<b>Glucosa</b>	4-14
<b>Ceniza</b>	7-15
<b>Potasio</b>	4-50.83
<b>Calcio</b>	0.8-15
<b>Magnesio</b>	1-14
<b>Sodio</b>	0.09-9
<b>Proteína</b>	0.5-4.5
<b>Sulfatos</b>	2.24-9.91
<b>Aminoácidos</b>	0.3-1.5
<b>Ácidos no nitrogenados</b>	1.5-8
<b>Ceras, esteroides y fosfátidos</b>	0.1-1
<b>Biotina</b>	0.1-2 ppm, 0.36 mg/kg
<b>Riboflavina</b>	1-6 ppm, 1.8 mg/kg

Obtenida de (Lemnaro, Vikas, Jasleen, Satish, & Harminder, 2021)

Los principales componentes de la melaza son la sacarosa (30-35%), la fructosa y la glucosa (10-25%), los compuestos no azucarados (2-3%), el contenido de minerales y humedad y alrededor del 45-55% del total de azúcares fermentables (Solomon, 2011). En contraste con los azúcares refinados, pequeñas cantidades de vitaminas y varios minerales se funden en melaza. La melaza como subproducto de la molienda de la caña de azúcar tiene una multitud de usos. No obstante, es la elaboración de alimentos para ganado bovino (carne y leche) donde se usa como insumo. La melaza se adiciona como aditivo para incrementar la palatabilidad o para facilitar la reducción a comprimidos de las raciones convencionales mezcladas en seco. Se utiliza también como medio en varios tipos de alimentos líquidos; como suplemento único para el ganado en pastoreo o adicionado con urea o ácido fosfórico. Es común como ingrediente alimenticio para pollos y cerdos siendo el ingrediente principal al componer hasta el 40% de la ración proporcionada a cada especie, respectivamente (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007).

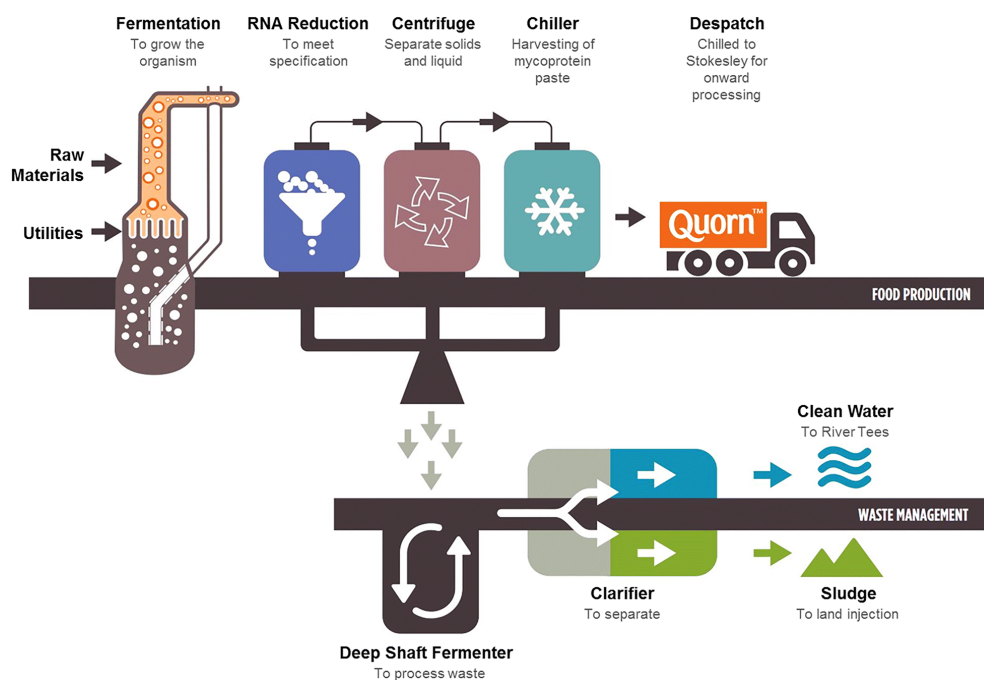
## 2.9 Productos en el mercado

Como ya se ha mencionado la explosión del crecimiento demográfico en el siglo XX ha hecho que sea insostenible que la principal fuente de proteínas en la dieta humana sea el ganado: ganado vacuno, porcino, pollo, etc. La producción y el consumo de productos de origen animal a estos niveles contribuyen a aumentar los riesgos de enfermedades infecciosas. La cría industrial de animales contribuye a la deforestación y la pérdida de biodiversidad asociada con la expansión del uso de la tierra agrícola. También es una incubadora de resistencia a los antimicrobianos, dado que la mayoría de los antibióticos utilizados en todo el mundo son para animales de granja. La agricultura intensiva puede reducir la probabilidad de introducción de patógenos a través de la intervención de bioseguridad, pero aumenta significativamente los riesgos de amplificación, propagación y mutación de patógenos una vez que entran en las instalaciones agrícolas (Espinosa, et al., 2020).

Actualmente la proteína unicelular ya se encuentra de venta para su consumo bajo la marca Quorn™. Quorn™ fue creada como un vehículo para desarrollar y



comercializar alimentos que contienen micoproteína del organismo *Fusarium venenatum*. Los productos Quorn™ aparecieron por primera vez en los supermercados del Reino Unido en 1985 con una gama de pasteles salados lanzada por J. Sainsbury (Whittaker, et al., 2020). Algunos de los productos de venta actual son productos vegetarianos y veganos tipo alitas, hamburguesas, filetes, jamón, huevos, entre otros, cuyo proceso se encuentra descrito en la **figura 6**. En contraste con el producto Pruteen™, Lord Arthur Rank [de Rank Hovis McDougall (RHM)] se enfocó en descubrir y utilizar un microorganismo que convertiría el abundante en biomasa comestible, rica en proteínas y adecuada para el consumo humano. Ya que RHM era un importante productor de cereales y productos derivados, por lo que producía grandes cantidades de almidón que podía explotar (Finnigan, 2012).



**FIGURA 6. PROCESO DE FERMENTACIÓN DE QUORN™**

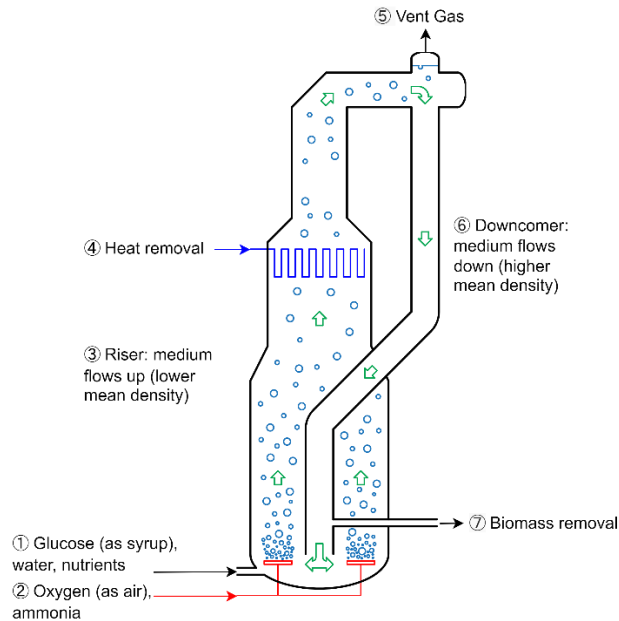
*Nota:* Adaptado de “Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper” (p. 8), por Meyer, V. et al., 2020, *Fungal Biology Biotechnology*, (<https://doi.org/10.1186/s40694-020-00095-z>)

Cuando se seleccionó que los hongos filamentosos para la producción de biomasa se tomaron en cuenta tres razones principales. Primera, el ser humano ha

consumido hongos como alimento por siglos además de crear diferentes alimentos fermentados (oncom, tempe, salsa de soja, etc.). La biomasa producida imita las propiedades organolépticas del músculo animal y, por lo tanto, podría actuar fácilmente como sustituto de los productos cárnicos convencionales en la dieta del consumidor. Por último, la extracción del micelio del caldo de cultivo es relativamente sencilla (Whittaker et al., 2020).

El hongo filamentoso *Fusarium venenatum* se cultiva en fermentadores con sales simples y glucosa como fuente de carbono. Quorn™ utiliza fermentadores Airlift de ciclo de presión (**figura 7**), aunque en un principio se utilizaban reactores de tanques de agitación continua. Estos son de 30 m de altura y tienen un volumen operativo de aproximadamente 150 m<sup>3</sup>, lo que ofrece varios beneficios operativos y de control sobre los fermentadores convencionales, incluido un bajo estrés de corte que permite hifas más largas y, por lo tanto, de mayor calidad (Meyer, y otros, 2020).

Los fermentadores Airlift son generalmente altos y delgados con una relación de aspecto del recipiente de aproximadamente 10:1 (altura-diámetro base). No contiene cuchillas de agitación y a veces puede tener una sección "cónica" en la parte superior del recipiente para facilitar el intercambio de gas eficaz. El fluido de cultivo es aireado, y a su vez mezclado, por una corriente de aire que entra cerca de la base del recipiente (Allman, 2019). Esta fermentación posee una elegante simplicidad que se basa en la introducción de aire en la base de la columna de fermentación creando millones de microburbujas que luego se elevan a toda la altura de la columna de fermentación en cuyo punto el gas se desconecta, causando una diferencia de densidad y la caída del líquido y el proceso para comenzar una vez más (Finnigan et al., 2017)



**FIGURA 7. DIAGRAMA DE UN BIORREACTOR AIRLIFT DE CIRCUITO EXTERNO**

*Nota: Adaptado de Quorn™: a story about Single Cell Protein, por Wong, K., 2022, Controlled Mold, (<https://controlledmold.com/quorn-a-story-about-single-cell-protein/>)*

La fermentación para la producción de este producto utiliza glucosa con control de pH, también se adiciona de oligoelementos y vitaminas para un crecimiento saludable y la presencia de amoníaco como fuente de nitrógeno. Después de la inoculación el organismo entra en su fase de crecimiento con el aire bombeado en la base del fermentador causando la “elevación o lift” y la recirculación característicos al punto donde la pérdida de aire arrastrado hace que el líquido caiga hasta que recoge más aire y el 'ciclo de elevación del aire' es llevado a cabo una vez más. Esto se lleva a cabo hasta alcanzar un nivel adecuado de recirculación de sólidos. En este punto comienza la cosecha de la micoproteína y luego continúa en estado continuo por un periodo hasta seis semanas. (Rodríguez Pérez et al., 2016)

En un cultivo continuo, el crecimiento del hongo puede ser restringido por el suministro de cualquier nutriente, pero generalmente está limitado por la concentración de la fuente de carbono y energía (p. ej., glucosa) con todos los demás nutrientes presentes en exceso. Sin embargo, los cultivos de flujo continuo evitan las condiciones fluctuantes inherentes a los cultivos por lotes (Finnigan, et al., 2017) y permiten mantener el crecimiento exponencial perpetuo del organismo

a una tasa de crecimiento específica que se acerca a su tasa máxima de crecimiento para las condiciones prevalecientes. En la práctica, las fermentaciones de micoproteínas se realizan durante unas seis semanas, lo que produce una productividad cinco veces superior a la que se podría lograr con una serie de fermentaciones por lotes separados (Finnigan, et al., 2017).

## 2.10 Producción de enzimas

De acuerdo con Ramírez y Ayala (2014) las enzimas son proteínas, polímeros formados por aminoácidos covalentemente unidos entre sí, que catalizan en los organismos una gran variedad de reacciones químicas. La actividad catalítica de las enzimas depende de que mantengan su estructura tridimensional o plegamiento. En esta estructura tridimensional se forman cavidades, llamadas “sitio activo”, las cuales muestran afinidad por las moléculas específicas (sustratos) que se convertirán en productos. En este caso *A. oryzae* es un hongo capaz de producir varias enzimas tales como enzimas amilolíticas, las enzimas proteolíticas, celulolíticas y xilanolíticas, entre otras. Sin embargo, en este trabajo nos enfocamos en la cuantificación de enzimas amilolíticas y xilanolíticas por la composición del nejayote correspondiente.

### 2.10.1 Enzimas amilolíticas

Las amilasas son enzimas que catalizan las reacciones hidrolíticas del almidón, dando origen a diversos productos que poseen una gran relevancia para algunas operaciones y procesos industriales. Las amilasas, identificadas en el siglo XVIII, se encuentran en animales, plantas, insectos y microorganismos (Elyasi Far, et al., 2020). Pertenecen a la familia GH<sub>13</sub>, con ocho subfamilias conocidas por hidrolizar almidón en glucosa, maltosa y maltodextrinas (Sudan, et al., 2018). Las amilasas incluyen tres grupos de enzimas, a saber,  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas, y glucoamilasa. Dos métodos de fermentación, como la fermentación en estado sólido (SSF) y la fermentación sumergida (SmF), se están empleando para la producción de  $\alpha$ -amilasa (Balakrishnan, et al., 2021).

Las amilasas son enzimas predominantemente hidrolasas que hidrolizan los enlaces glucosídicos presentes en las moléculas de almidón y producen dextrinas y oligosacáridos. Las enzimas fúngicas son secretadas extracelularmente y los hongos pueden penetrar sustratos duros que facilitan el proceso de hidrólisis. Las especies de hongos eficientes productoras de  $\alpha$ -amilasa incluyen al género *Aspergillus* (*A. oryzae*) (Farooq, y otros, 2021).

La primera amilasa fue aislada, en el año de 1833, por Anselme Payen. Hay dos tipos de amilasas, exo-amilasas (hidrolizan el extremo no reductor del almidón) y endo-amilasas (hidrolizan los enlaces glucosídicos dentro de la molécula de almidón) (Farooq, y otros, 2021). A partir de su descubrimiento han sido utilizadas en diferentes industrias, algunos ejemplos son (Farooq, y otros, 2021):

- Las amilasas se utilizan abundantemente en diversos procesos de fabricación en la industria de alimentos procesados, por ejemplo, en la fabricación de pasteles, diversos auxiliares digestivos, horneado, jarabes de almidón, jugos de frutas y elaboración de cerveza. En el caso específico de la  $\alpha$ -Amilasa mejora la retención de la suavidad del pan, así como aumenta la vida útil de los alimentos, ya que funciona como un agente antienvjecimiento.
- Las industrias textiles están utilizando  $\alpha$ -Amilasa en el proceso de desistimiento. Un agente de dimensionamiento almidón se aplica a hilados antes de la producción de la tela, ya que asegura que el proceso de tejido se considera seguro y rápido al mismo tiempo. Durante el proceso de tejido, el almidón evita la rotura de los hilos de urdimbre por lo que actúa como un agente de fortalecimiento. En el proceso de desecación, la  $\alpha$ -amilasa (agente desincrustante) hidroliza parcialmente el almidón que se utiliza durante el proceso de tejido y lo convierte en un componente soluble en agua sin afectar las fibras.
- En la industria del papel, la  $\alpha$ -amilasa se utiliza para la hidrólisis del almidón de alto peso molecular que está presente en el papel revestido. Se utiliza para reducir la viscosidad. El almidón tiene una viscosidad bastante alta que se

puede reducir utilizando  $\alpha$ -amilasa para la degradación del polímero de almidón en un proceso de fermentación por lotes o un proceso de fermentación continua.

- En las industrias de detergentes, las amilasas enzimáticas son el segundo tipo de enzimas más utilizado. Las propiedades de las amilasas que les permiten ser utilizadas en detergentes incluyen su alta actividad a baja temperatura y alto pH, manteniendo la estabilidad bajo estrés oxidativo en las condiciones requeridas para la acción detergente.

La  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae* es una proteína de  $M_r = 53.662$  Daltons compuesta de 478 aminoácidos, con una proporción inusualmente alta de residuos aromáticos (Gee, et al., 2021). Debido a su carácter de metalo-enzima la  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae* mantiene unidos 10 átomos de calcio por molécula; sin embargo, solo un átomo de calcio se encuentra fuertemente unido y es esencial para la actividad catalítica. La proteína está organizada en dos dominios, un gran  $(\beta/\alpha)_8$ -barril, que es responsable de al menos la mayor parte de su actividad catalítica, y un pequeño ocho antiparalelo  $\beta$ -barril, llamado un dominio de unión de carbohidratos (CBD), que es común a la mayoría de las hidrolasas del polisacárido (Gee, et al., 2021). La  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae* hidroliza completamente la amilosa a maltosa y glucosa. Los sustratos que presentan enlaces  $\alpha$ -1,6 son hidrolizados menos exhaustivamente rindiendo maltosa, glucosa y dextrinas límite que contienen al punto de ramificación y aproximadamente cuatro residuos de glucosa  $\alpha$ -1,4 (Manrique-Hernandez, 2020).

### 2.10.2 Enzimas xilanolíticas

Las xilanasas catalizan la hidrólisis del xilano, que es el segundo polisacárido más abundante y un componente importante en las paredes celulares de las plantas. Estas enzimas son producidas principalmente por microorganismos: bacterias, hongos, actinomicetos y levaduras. Entre las fuentes microbianas, los hongos filamentosos son especialmente interesantes ya que secretan estas enzimas en el medio y sus niveles de xilanasas son mucho más altos que los que se encuentran en las levaduras y bacterias (Bajpai, 2014).

Las xilanasas se utilizan en el bioblanqueo de la pulpa de madera y en el bioprocesamiento de textiles. De hecho, el tratamiento de pulpas celulósicas con xilanasas elimina selectivamente el xilano residual al disolver la pulpa. Las xilanasas son capaces de degradar la hemicelulosa presente en la pulpa sin afectar a la celulosa (Bajpai, 2014). El tratamiento enzimático ha demostrado mejorar varias propiedades físicas del papel, incluyendo viscosidad, resistencia a la tracción, longitud de rotura y factor de rotura. Además, el bioblanqueo con xilanasas suaviza las fibras, lo que les permite someterse a un blanqueamiento químico adicional (Bajpai, 2014).

Otro uso industrial de las xilanasas es la bioconversión del xilano en productos de mayor valor añadido. Como la hidrólisis enzimática del xilano conduce a la xilosa, pueden ocurrir diferentes fermentaciones y una variedad de compuestos pueden resultar de estas reacciones. Uno de los productos más importantes es el xilitol, que se usa para endulzar productos alimenticios como chicles, dulces, refrescos y helados. El xilitol también se puede utilizar como edulcorante natural en pasta de dientes y diversos productos farmacéuticos (Bajpai, 2014).

## CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 3.1 Justificación

El incremento en la población mundial y la longevidad de esta genera un inconveniente para la agricultura tradicional, por lo que cubrir la demanda de proteína animal se está volviendo insostenible. Actualmente en otros países del mundo se está produciendo otros tipos de proteína, vegetal o microbiana, que ayudan a cubrir esta demanda. Uno de estos ejemplos es la marca Quorn™ de venta en Reino Unido y en Europa, quien vende productos alimenticios a base de micoproteína del microorganismo *Fusarium venenatum*. Sin embargo, no es posible o no es costeable conseguir este tipo de proteína en México, por lo que se espera producir una micoproteína utilizando *A. oryzae*, un microorganismo GRAS (Generally Recognize As Safe), a partir de residuos industriales de bajo costo como la melaza y el nejayote, el cual es altamente contaminante para los cuerpos de agua.

### 3.2 Hipótesis

*A. oryzae* lograra producir biomasa a partir de nejayote y melaza, y la biomasa producida contará con un porcentaje de proteína que la haga viable para un sustituto de proteína animal, lo cual podría ayudar a disminuir el volumen desechado del residuo contaminante y generaría otras alternativas proteínicas para la dieta humana.

### 3.3 Objetivos

El objetivo general de este proyecto es la obtención de biomasa de hongos filamentosos, específicamente de *A. oryzae*, mediante fermentación sumergida, se determinarán las condiciones y los medios de cultivo adecuados para maximizar los niveles de producción. En particular se espera poder utilizar el nejayote, agua residual de la nixtamalización del maíz, como medio para el cultivo de dicho hongo y así poder disminuir el impacto ambiental de este residuo altamente contaminante. Adicionalmente se espera producir una biomasa altamente proteínica que puede fungir como alternativa a la proteína animal.



## CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Sustratos utilizados para la elaboración del medio de cultivo.

Se utilizaron como materias primas dos residuos agroindustriales la melaza de caña, y el nejayote recolectado del molino “El Triunfo” del Sr. Israel Vega ubicado en San Antonio Tecomitl, Alcaldía Milpa Alta, CDMX. La melaza de caña fue almacenada en un frasco de vidrio con tapa y conservada a temperatura ambiente, el nejayote fue almacenado en un envase plástico y conservado en refrigeración.

### 4.2 Diseño experimental.

Los cultivos se incubaron a 31 °C en agitación a 200 o 300 rpm por 72 horas. Las variables fueron fuente de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), adición de fuente de carbono (se reporta en las figuras como concentraciones finales) con glucosa (43°B) o melaza (85°B aproximadamente), pH (intervalo de 5-6 y de 7-8, para el presente trabajo se referirá como pH de 6 y pH de 8) y porcentaje de Nejayote (75 y 100%). Para el ajuste del pH se utilizaron soluciones de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N y  $\text{NaOH}$  1M. Se seleccionaron las combinaciones en las que se obtuvo mayor producción de biomasa.

**TABLA 4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MEDIO MÍNIMO DE PONTECORVO\***

Compuesto	Porcentaje
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.15
KCl	0.05
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{NaNO}_3^{**}$	0.6
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^{**}$	0.47

\*Se utilizaron distintas fuentes de carbono, se indica en la figura la fuente que se utilizó respectivamente. \*\*Se utilizó uno u otro, no de manera simultánea.

### 4.3 Material biológico.

La cepa de *A. oryzae* fue obtenida de la colección microbiológica NRRL (Northern Regional Research Laboratories) de la USDA, USA.

#### 4.4 Curva de crecimiento de *Aspergillus oryzae*.

La cepa *A. oryzae* fue sembrada en agar papa dextrosa, e incubada por 72 horas a 37° C, a partir de este cultivo se obtuvo una suspensión de esporas en solución salina estéril. De dicha suspensión se tomó el volumen necesario para que la fermentación, ya sea a nivel matraz o a nivel reactor, tuviera una concentración final de  $1 \times 10^6$  esporas/mL.

Para la fermentación a nivel matraz se emplearon matraces Erlenmeyer de 500mL con un volumen de operación de 150mL y se esterilizaron durante 15 min a 121°C; las condiciones de crecimiento fueron 200 rpm a 31°C en un periodo de 72h. En el caso de la fermentación en biorreactor BioFlo C-30 con capacidad de 1.5 L se utilizó un volumen de operación de 1L y se esterilizó durante 15 min a 121°C; posteriormente se incubaron a 31°C a 300 rpm con 1vvm durante 72h. Finalmente, en el biorreactor BioFlo III de 5 L se utilizó un volumen de operación de 3L y se esterilizó durante 15 min a 121°C; las condiciones de incubación fueron las mismas que anteriormente, 31°C a 300 rpm con 1vvm durante 72h.

En todas las fermentaciones se tomaron muestras a las 0, 8, 24, 32, 48, 56 y 72h, y los experimentos se realizaron por duplicado, el volumen de muestra fue de 5 mL para matraz y de 10 mL con el biorreactor. La cuantificación del pH se realizó a 25°C utilizando un potenciómetro HANNA previamente calibrado. Para determinar la producción de biomasa se utilizó papel filtro Whatman No.1 previamente secado y pesado, en donde se filtró la muestra obtenida de la fermentación y posteriormente el papel filtro fue secado en un horno a 60°C hasta su peso constante (48h).

#### 4.5 Determinación de azúcares reductores.

La determinación de azúcares reductores se aplicó el método de colorimetría DNS (Acido 3,5 dinitrosalicílico) usando el espectrofotómetro -TECAN- se realizó la cuantificación de los azúcares presentes en cada muestra. La concentración de los azúcares reductores totales liberados en la muestra se determina haciendo una interpolación en la curva patrón del azúcar utilizado, graficando la absorbancia en función de la concentración.

En tubos de cristal de 10 mL se adicionan 50  $\mu\text{L}$  del filtrado de la muestra con 450  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de DNS, para un volumen de reacción de 1 mL. Los tubos se colocan en baño de agua a temperatura de ebullición ( $100^{\circ}\text{C}$ ) por 5 min. Se enfrían hasta temperatura ambiente y se le añade 2.5 mL de agua destilada. Se agita 5 segundos y se realiza la lectura a 575 nm en espectrofotómetro.

#### 4.6 Determinación de azúcares totales.

En tubos de cristal de 10 mL se adicionan 100  $\mu\text{L}$  del filtrado de la muestra con 400  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de una solución de fenol al 5% (p/v), para un volumen de reacción de 1 mL. Posteriormente se añade de un solo golpe 2.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado desde la boquilla del tubo. Los tubos se dejan enfriar por 20 min aproximadamente y se realiza la lectura a 620 nm en espectrofotómetro.

#### 4.7 Determinación de actividad amilolítica.

En tubos de cristal de 10 mL se adicionan 50  $\mu\text{L}$  del filtrado enzimático al medio de reacción el cual consiste en 500  $\mu\text{L}$  de una solución de almidón soluble al 1% (p/v) en buffer de acetatos (100 mM) a pH de 5. Se coloca a incubar en un baño de temperatura controlada a  $40^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, deteniendo la reacción con 50  $\mu\text{L}$  de HCl 1M. El ensayo se realiza por duplicado junto con un blanco que consiste en el medio de reacción incubado sin filtrado enzimático, el cual se agrega después de la adición del HCl. Posteriormente se transfieren 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra a tubos con 2.4 mL de solución de Lugol (0.3% p/v  $\text{I}_2$ /3% p/v KI) diluida al 2%. Se realiza la lectura a 620 nm.

#### 4.8 Determinación de actividad xilanolítica.

En tubos de cristal de 10 mL se adicionan 250  $\mu\text{L}$  de una solución de xilano de abedul al 1% (p/v) y 200  $\mu\text{L}$  de buffer de acetatos (100mM) a pH de 5 durante 3-5 minutos en un en un baño de temperatura controlada a  $50^{\circ}\text{C}$  para homogeneizar la temperatura. Posteriormente se agregan 50  $\mu\text{L}$  del filtrado enzimático a cada tubo de muestra, pero no a los blancos. Se inicia el conteo de 20 min a partir del primer tubo al que se agrega el filtrado. Al término de la incubación se agrega 500  $\mu\text{L}$  del

reactivo de DNS a todos los tubos incluyendo el blanco. Una vez se adiciona el DNS, se agrega el filtrado a los blancos. Se calienta los tubos a temperatura de ebullición durante 5 min. Se enfrían hasta temperatura ambiente y se le añade 2.5 mL de agua destilada. Se agita 5 segundos y se realiza la lectura a 575 nm en espectrofotómetro.

## CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Cultivo de *Aspergillus oryzae* en medio sólido para propagación y mantenimiento.

Como ya se mencionó *A. oryzae* es un hongo que puede ser encontrado en diferentes entornos tales como suelos y plantas, particularmente en el arroz. Para este trabajo se inoculó masivamente en agar Papa-Dextrosa (PDA) por 72 h, del cual se obtuvo la suspensión de esporas. *A. oryzae* tuvo una morfología macroscópica característica en el medio PDA, se evidencia una colonia de color verde, amarillo-verduzco o amarillento, con reverso blanco, de aspecto algodonoso y una superficie lisa (**figura 4**).

### 5.2 Fermentación sumergida en matraz.

La fermentación sumergida (SmF) se realizó en matraces de 500 mL, se variaron las condiciones de pH, fuente de nitrógeno, el uso de nejayote como medio y la concentración de este, el uso de diferentes fuentes de carbono y la concentración final de estos en el medio.

#### 5.2.1 Variación de pH y fuente de nitrógeno.

Para conocer la composición del medio óptimo para la producción de micoproteína se comenzó por crecer a *A. oryzae* en un medio de composición conocida. Se inoculó en un medio Pontecorvo (**tabla 4**) con  $\text{NaNO}_3$  o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno a valores de pH 6 y 8. Los hongos pueden utilizar una amplia variedad de compuestos como fuente de nitrógeno siendo capaces de sintetizar las enzimas necesarias para poder llevar a cabo variadas vías catabólicas (Barraco, 2014).

Como se puede observar en la **figura 8a** la producción de biomasa es mayor cuando se ajusta el pH a un valor de 6, obteniendo como valor máximo 4.19 mg/mL. Mientras que con un pH de 8 el valor máximo obtenido fue de 3.31 mg/mL, ya que hubo una posterior disminución en las 24 h restantes. Estos resultados son congruentes con la literatura la cual indica que este microorganismo puede crecer en un pH de 2 – 8 siendo 6 su pH óptimo (Gomi, *Aspergillus oryzae*, 2014). A pesar

de su posible crecimiento a un pH de 8 el hongo presenta un comportamiento errático en las últimas 24 h del experimento.

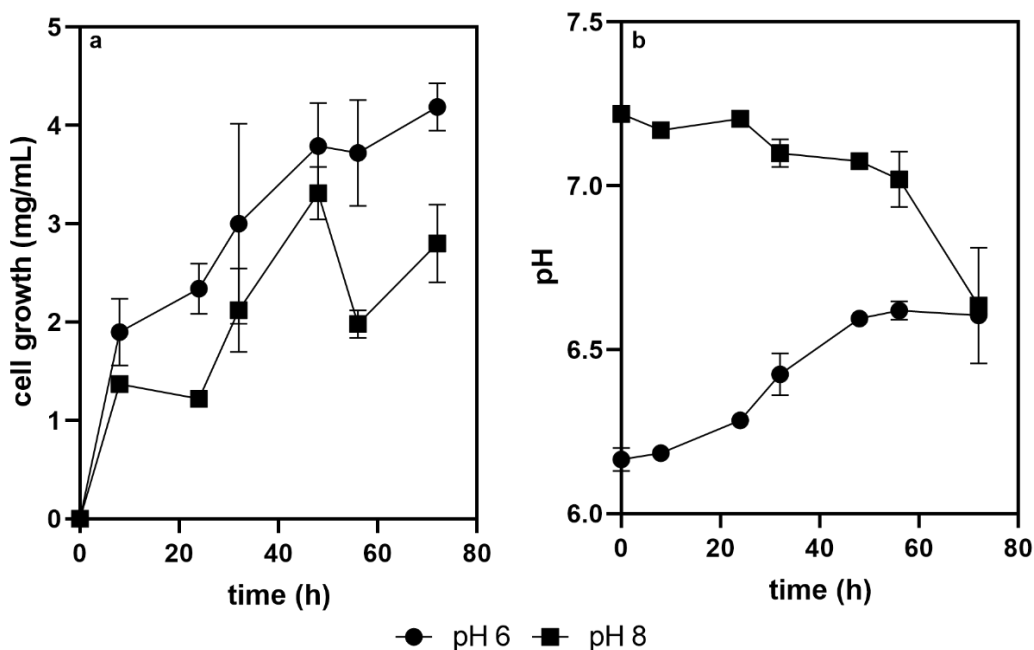


FIGURA 8. PRODUCCIÓN DE BIOMASA (A) Y VARIACIÓN DE pH (B) UTILIZANDO  $\text{NaNO}_3$  COMO FUENTE DE NITRÓGENO Y FRUCTOSA AL 1%.

En la fase estacionaria las condiciones de cultivo son limitantes y existe un equilibrio entre las células viables y no viables, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes (Arredondo Vega, 2007). Este comportamiento se puede deber a diversos factores como la baja concentración de nutrientes, una excreción de productos catabólicos al medio de cultivo o un incremento en el valor de pH, lo cual en este caso es atribuible. En la **figura 8b** se puede apreciar que el pH disminuye, para la condición inicial de pH entre 7 y 8, debido a la actividad metabólica de asimilación del sustrato, principalmente azúcares, y generación de metabolitos de carácter ácido por parte del hongo durante su crecimiento en los medios de cultivo y su relación con la generación de biomasa. En la fase de muerte las células no viables son superiores a las viables (Arredondo Vega, 2007), por lo cual la concentración disminuye, registrando una menor cantidad de biomasa tal es el caso a las 56 h y 72 h en el pH de entre 7 y 8.

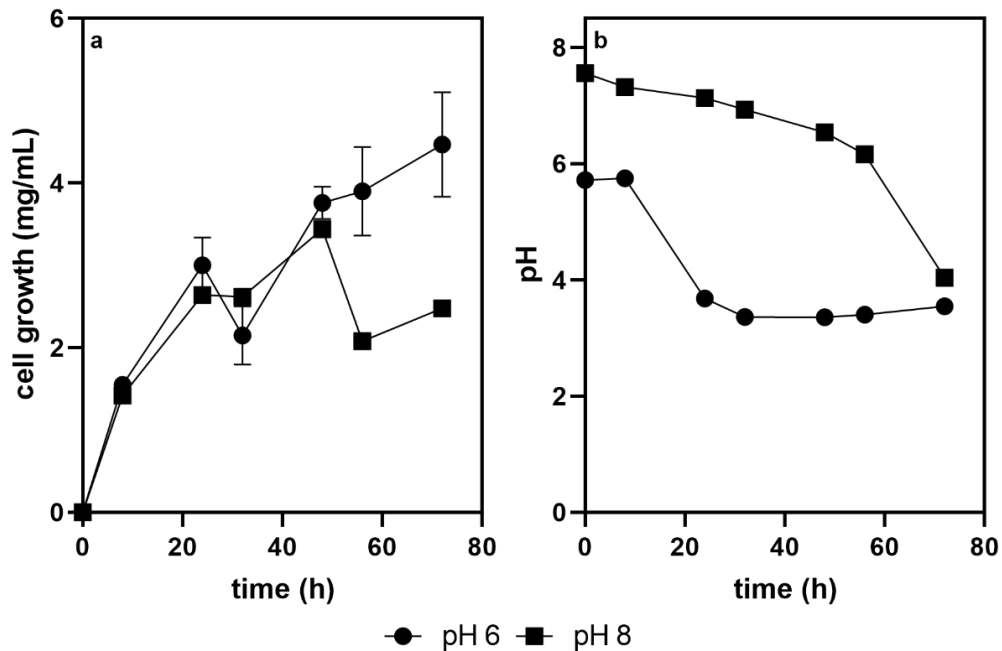


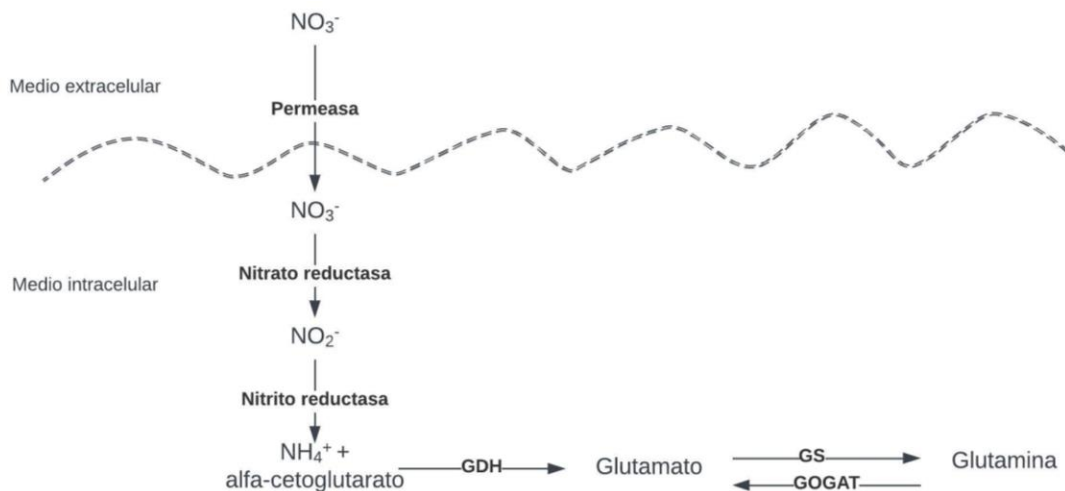
FIGURA 9. PRODUCCIÓN DE BIOMASA (A) Y VARIACIÓN DE PH (B) UTILIZANDO  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  COMO FUENTE DE NITRÓGENO Y FRUCTOSA AL 1%.

La siguiente fuente de nitrógeno probada,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , mostró un comportamiento similar en cuestión de producción de biomasa (**figura 9a**). Cuando se ajusta a un pH de 6 el crecimiento es ascendente durante todo el periodo de crecimiento, produciendo hasta 4.47 mg/mL de biomasa. Mientras que a un pH de 8 el máximo producido es de 3.44 mg/mL de biomasa, y al igual que con la otra fuente de nitrógeno, el microorganismo atraviesa la fase estacionaria y comienza a presentar un comportamiento errático en las últimas 24 h de la fermentación, comportamiento observado en la fuente de nitrógeno anterior.

En la **figura 9b** se aprecia que cuando se utiliza en el medio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  la generación de productos ácidos es mayor en comparación con el  $\text{NaNO}_3$ , puesto que los valores de pH disminuyen poco más de 2 y 4 unidades logarítmicas para los ajustes iniciales de 6 y 8 respectivamente. Esto se debe a que, a nivel fisiológico, se ha detectado una cinética bifásica para el transporte de amonio, que se ha asignado a dos sistemas de transporte diferentes: un sistema de baja afinidad (LAATS) que se ha relacionado con canales de  $\text{K}^+$  de difusión pasiva (Ullrich et al., 1984; Wang et al., 1993; Crawford & Forde, 2002), y otro de alta afinidad (HAATS)

que es responsable del transporte activo de amonio y que parece tener lugar mediante el acoplamiento con un antiporte de H<sup>+</sup> (Howitt & Udvardi , 2000; von Wirén et al., 2000a). Por lo que el sistema HAATS nos explicaría la acidificación del medio con esta fuente de nitrógeno en comparación con el nitrato.

Ya se han descrito los HAATS en diversos organismos como plantas, levaduras, hongos, bacterias y animales. Todos estos se encuadran en la superfamilia AMT/MEP/Rh y se dividen en la familia AMT/MEP, formada por los transportadores de amonio de plantas, algas, hongos, levaduras y bacterias (Marini et al., 1997; von Wirén et al., 2000a; Crawford & Forde , 2002; Loque & von Wiren, 2004) y la familia de glicoproteínas Rh, presente principalmente en animales.



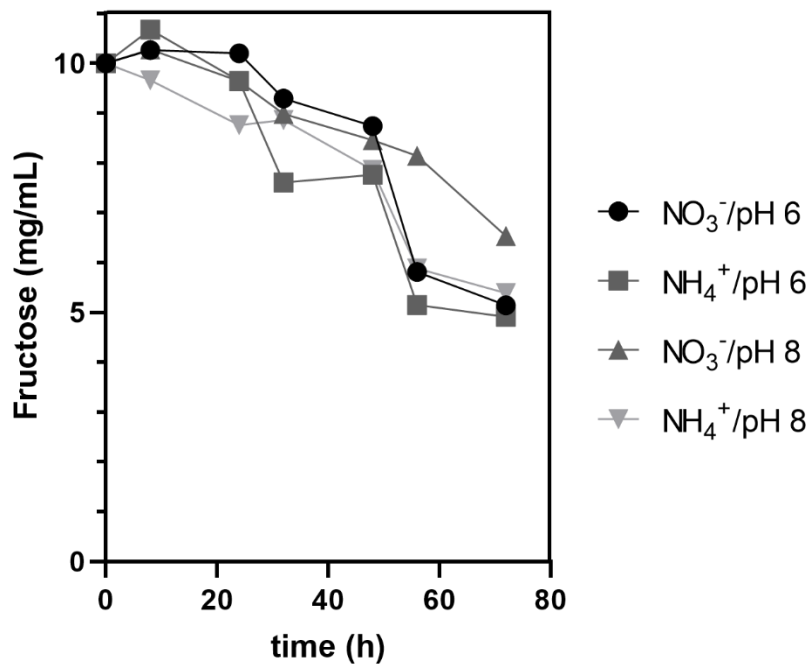
**FIGURA 10. ASIMILACIÓN DE NITRATO EN HONGOS FILAMENTOSOS.**

*Nota:* Adaptado de Pereira, J. F., Lima, J. O., Rocha, R. B., Medina, P. X. L., Araújo, E. F., & Queiroz, M. V. (2003). Nitrato reductase em fungos filamentosos. *Biotechnology, Ciência & Desenvolvimento*.

De acuerdo a lo anterior hay una disminución en el pH cuando se utiliza NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fuente de nitrógeno porque se genera un exceso de poder reductor, NADPH. Asimilando amonio, un organismo ahorra el coste energético de dos etapas de reducción necesarias cuando el nitrato es la única fuente de nitrógeno presente en el medio. El transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> hacia el medio intracelular está mediado por la



permeasa del nitrato, y después de su asimilación, ocurre la reducción secuencial del nitrato a nitrito y del nitrito a amonio, catalizada respectivamente, por las enzimas nitrato y nitrito reductasas (Pereira et al., 2003). El amonio se considera el punto de partida para el metabolismo anabólico del nitrógeno en hongos (**figura 10**) y su incorporación en moléculas orgánicas se lleva a cabo por dos sistemas: glutamato deshidrogenasa (GDH) o glutamina sintasa (GS)/ Glutaminaamida: 2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT), que proporcionan glutamato y glutamina (Griffin, 1994).



**FIGURA 11. CURVA DE UTILIZACIÓN DE FRUCTOSA CON RESPECTO AL TIEMPO PARA LAS CUATRO CONDICIONES EXAMINADAS.**

El consumo de la fuente de carbono nos puede dar indicios del crecimiento de un microorganismo. En este caso la **figura 11** detalla el comportamiento de *A. oryzae* en las cuatro variables probadas. Se observa que cuando el microorganismo se encuentra en un pH inicial de 6 tiene un mejor desempeño pues llegó a consumir el 50% de la concentración inicial del carbohidrato. Adicionalmente el hongo consume más fuente de carbono cuando se encuentra en un medio que contiene NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fuente de nitrógeno, que puede utilizar directamente en la producción de biomasa.

Tomando todo esto en cuenta se determinó que para el ajuste de pH lo ideal es que se ajuste a un valor de 6. En cuanto a la fuente de nitrógeno los valores máximos obtenidos fueron 4.19 mg de biomasa/mL para  $\text{NaNO}_3$  y 4.47 mg de biomasa/mL para  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . La diferencia entre ambas fuentes es de 0.28 mg de biomasa/mL, que favorece al amonio, y en virtud de que el crecimiento sea el máximo posible, la utilización de  $\text{NH}_4^+$  es la más adecuada. Otro factor que incentiva la elección del  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por sobre el  $\text{NaNO}_3$  es el costo, de acuerdo con el proveedor El Crisol S.A. de C.V. el nitrato de sodio es aproximadamente 5 veces más caro que el sulfato de amonio para la misma marca y gramaje (EL CRISOL S.A. DE C.V., 2023). Por lo que consideramos que el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  es la fuente de nitrógeno óptima para esta investigación.

### 5.2.2 Utilización del nejayote como medio de cultivo

El nejayote tiene un intervalo de pH entre 11.3 y 12.45. Para realizar un análisis químico de su composición, el nejayote se liofilizó (**tabla 5**). Por cada 100 mL de nejayote se obtuvieron 2.60 g de nejayote liofilizado, lo que indica que el nejayote contiene aproximadamente 97.52% de humedad (incluyendo lo reportado en la **tabla 5**), esto corresponde con lo reportado en la literatura (Acosta-Estrada et al., 2014). Las características del nejayote son variables por la relación directa con los parámetros del proceso de nixtamalización, tipo de maíz, dureza del endospermo, calidad del grano, tipo y concentración de cal, tiempo y temperatura de cocimiento y remojo, manejo del maíz durante su lavado y transporte, equipo y prácticas de proceso (Rosentrater K. A., 2006).

TABLA 5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL NEJAYOTE UTILIZADO

Componente	Resultado (por cada 100 g)	Resultado (por 1 L)
Humedad (g)	4.72	
Cenizas (g)	20.47	5.3222
Proteína* (g)	3.73	0.9698
Grasa (g) (extracto etéreo)	0.19	0.0494
Fibra dietética (g)	36.14	9.3964
Carbohidratos digeribles totales** (g)	34.75	9.035
Contenido energético (kcal)		155.65

\*Para cuantificar proteína determinada por Kjeldahl se empleó el factor 6.25

\*\*Los carbohidratos digeribles totales se cuantifican por diferencia (100-(%Humedad + %cenizas + %grasa + %proteína + %fibra dietética))

Nutricionalmente el nejayote tiene bajas concentraciones de proteína (3.73 g/100 g) y grasa (0.19 g/100 g), estos valores son similares a los reportados por Carrera et al., (2012), quien obtuvo 2.9% y 0.3% p/p respectivamente. Además, es muy rico en carbohidratos (34.75 g/100 g) y minerales o cenizas (20.47 g/100 g) debido a la composición del maíz y a su proceso de obtención. Se encontraron valores semejantes en la literatura, ya que en el caso de cenizas estas presentan un valor de 31.2%, y en el caso de carbohidratos estos son reportados como extracto libre de nitrógeno con un porcentaje de 24.4 (Carrera, y otros, 2012). Es importante tomar en cuenta que el proceso de nixtamalización es muy variable y no se encuentra estandarizado en la mayoría de los molinos de México, lo que genera una gran variabilidad en la composición del nejayote.

Dicha composición le permite fungir como un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de *A. oryzae*. Considerando los resultados derivados de la fermentación anterior se ajustó el pH del nejayote a 6 utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Una vez ajustado se probó si el microorganismo era capaz de producir biomasa en un medio con nejayote o si era necesario que se diluyera, con el fin de evitar que el microorganismo no se viera afectado por la composición propia del nejayote. Asimismo, se experimentó si era necesario adicionar al medio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para obtener un mayor crecimiento.

Como se mencionó, el nejayote está compuesto principalmente por pericarpio del maíz, sólidos en solución entre los que se incluyen arabinosilanos, almidones, proteínas, dextrinas, calcio y compuestos fenólicos antioxidantes, como el ácido p-cumárico y el ácido ferúlico (Ramírez-Romero et al., 2013). Hay evidencia que los

compuestos fenólicos tienen actividad antifúngica (Silva, et al., 2020). El ácido ferúlico es un ácido fenólico que se encuentra en la pared celular vegetal. Se trata de un ácido hidroxicinámico, formado por un anillo aromático con un grupo metoxilo en orto al hidroxilo y un grupo carboxílico en posición para con el hidroxilo. Este ácido tiene diversas aplicaciones una de ellas es la capacidad de controlar el crecimiento de microbios (Yadav, y otros, 2021). Como consecuencia la presencia de este tipo de compuestos podría inhibir el crecimiento de *A. oryzae* en el nejayote.

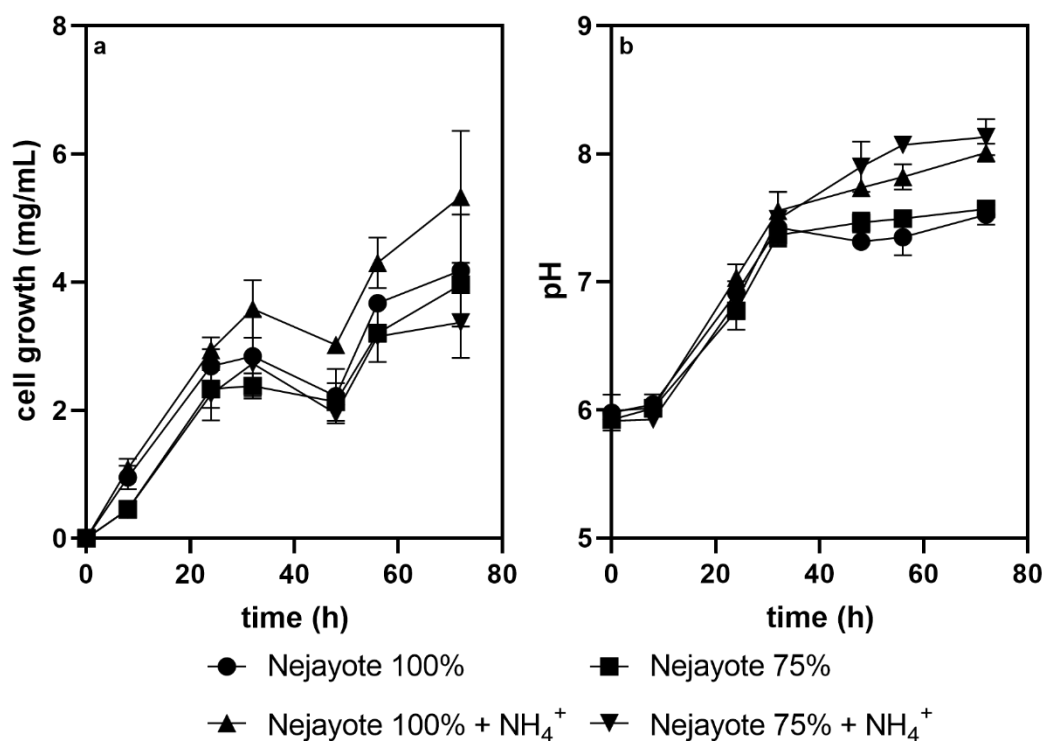


FIGURA 12. PRODUCCIÓN DE BIOMASA (A) Y VARIACIÓN DE PH (B) UTILIZANDO NEJAYOTE A DIFERENTES PORCENTAJES Y ADICIONANDO  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  COMO FUENTE DE NITRÓGENO.

El crecimiento de *A. oryzae* en un medio complejo es comparable al descrito previamente en el medio Pontecorvo (tabla 4). En la figura 12a se observa que la composición que el microorganismo aprovechó mejor para generar biomasa fue en la que el nejayote se encontraba concentrado (100%) y poseía una fuente de nitrógeno adicional, como lo es el  $\text{NH}_4^+$ . El valor máximo de crecimiento obtenido

para esta composición fue de 5.33 mg de biomasa/mL. Esto quiere decir que el hongo filamentoso es capaz de desarrollarse e incluso hacerlo de una mejor manera en este medio, ya que logro producir casi un 1 mg de biomasa/mL más que en el medio Pontecorvo. Otra composición que favoreció el crecimiento fue el nejayote concentrado sin ninguna fuente de nitrógeno adicional, donde se produjo 4.18 mg de biomasa/mL.

El crecimiento de hongos filamentosos utilizando al nejayote como medio de cultivo líquido aún no se ha probado. Sin embargo, Ruíz (2015) encontró 14 hongos de las colecciones CIAD-CIATEJ, capaces de utilizar a los arabinoxilanos ferulados (FAXX por sus siglas en ingles) de cadena larga obtenidos del nejayote como fuente de carbono. Entre estas cepas se encontraban: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus* sp.

El comportamiento del pH (**figura 12b**) nos describe claramente que todas las composiciones probadas pasaron por una fase de latencia hasta las 8 h. Ya que hubo un crecimiento menor o igual a 1 mg de biomasa/mL y en este periodo el pH no sufrió modificaciones. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo ambiente (Arredondo Vega, 2007). Posterior a este periodo, el pH comienza a incrementar de forma exponencial hasta valores cercanos a 7.5 a las 32 h, para un posterior aplanamiento.

Este incremento del pH se pudo deber a una hidrólisis y asimilación de la proteína presente en el nejayote, cuya liberación de grupos amino alcaliniza el medio de cultivo, originando un incremento de pH. De acuerdo con la literatura los nejayotes se encuentran dentro de los intervalos de proteína de 5.66-12.92 g/L (Ramírez-Romero et al., 2013), mientras que Velasco-Martínez y otros (1997) reportaron una concentración de proteína de 72 g/L en base seca. En el caso del nejayote utilizado se reportó un contenido de proteína de 3.73 % (**tabla 5**), el cual se encuentra por encima de lo reportado por Ramírez-Romero et al., (2013).

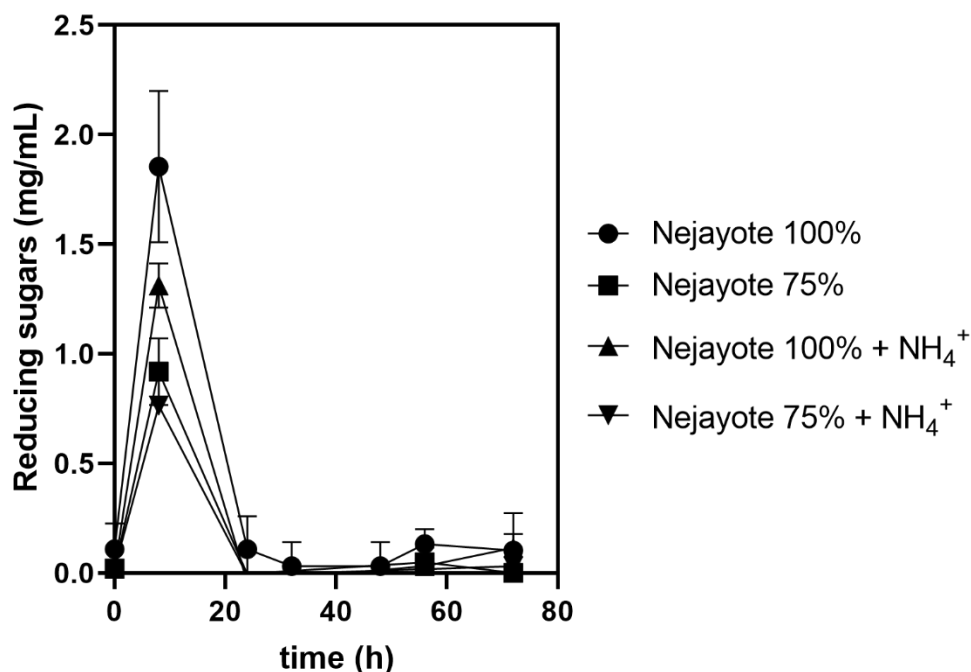


FIGURA 13. CURVA DE UTILIZACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES CON RESPECTO AL TIEMPO PARA LAS CUATRO CONDICIONES EXAMINADAS.

Para la cuantificación de azúcares reductores (**figura 13**) se encontró que el nejayote en el tiempo 0 h tenía una concentración cercana a 0.1 mg/mL, lo cual concuerda con lo reportado en la bibliografía, ya que de acuerdo con Ramírez-Romero et al., (2013) estos se encuentran en concentraciones de 0.166 a 0.818 g/L. A las 8 h se observa un incremento que supera el miligramo por mL para los medios con nejayote al 100%, esto se debe a que, como ya se mencionó, el nejayote contiene sólidos suspendidos y estos contienen 64% de polisacáridos del cual 20% es almidón (Pflugfelder et al., 1988). El género *Aspergillus* es conocido por su capacidad para secretar un alto nivel de enzimas al medioambiente, dentro de las enzimas extracelulares reportadas, se pueden encontrar: tanasa,  $\alpha$ -amilasa, oxidasa, catalasa, deshidrogenasa, hidrolasa, celulasa y pectinasa (Gómez Rojas et al., 2021). Específicamente para *A. oryzae* este libera: hidrolasa, amilasa, tanasa, proteasa, fitasa, lipasa, transferasa, xilanasas, hexosaminidasa, naranginasa y peptidasa (Tang, 2020). Por lo que estas enzimas rompen los polisacáridos presentes, como el almidón liberando glucosa y es por lo que se ven estos incrementos.

### 5.2.3 Adición de una fuente de carbono externa

Como ya se mencionó anteriormente el nejayote cuenta con carbohidratos propios que permiten el crecimiento de microorganismos como bacterias o en este caso hongos filamentosos. Sin embargo, es posible que la concentración en la que se encuentran éstos no sea suficiente. El análisis químico proximal realizado indica que el nejayote tiene 34.75% de carbohidratos digeribles totales. Se experimentó si mejoraba el crecimiento al adicionarle una fuente de carbono conocida como el jarabe de glucosa con 43°Brix.

Los jarabes de glucosa son producto de la hidrólisis del almidón. Los cuales se usan de acuerdo con sus diversas concentraciones en varias industrias tales como: panadería, confitería, procesado de frutas, alimentos compuestos, bebidas alcohólicas, misceláneos, bebidas frías, etc. Las reacciones para obtener jarabe de glucosa a partir del almidón pueden ser: hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática (Schenck & Hebeda, 1992).

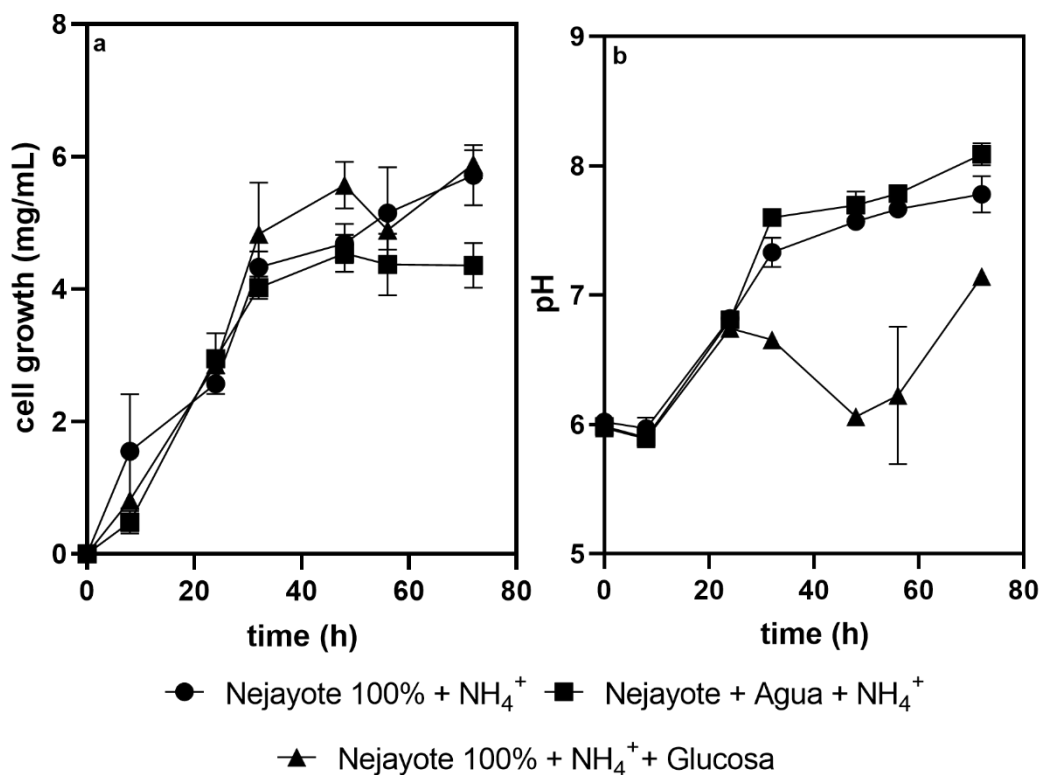


FIGURA 14. PRODUCCIÓN DE BIOMASA (A) Y VARIACIÓN DE PH (B) PARA LA PRUEBA DE ADICIÓN DE JARABE DE GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

En esta fermentación se colocaron 3 condiciones: el control, el cual es el medio en el que anteriormente se encontró un mayor crecimiento, Nejayote con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , la muestra que se encuentra adicionada con agua en el mismo volumen en el que se añadiría la fuente de carbono, pero sin la glucosa; finalmente aquella donde se adicionó la glucosa para una concentración final de 0.2%.

Como se puede observar en la **figura 14a** la condición que tuvo menor crecimiento fue aquella a la que se le adicionó el volumen de agua. Este resultado era predecible ya que en la **figura 12a** se aprecia que esta condición solo produjo 3.37 mg de biomasa por mililitro. En este caso esta condición produjo 4.36 mg/mL, este incremento se debe a que solo se adicionaron 15 mL de agua mientras que anteriormente se adicionó al 25% lo cual es equivalente a 37.5 mL, por lo que la dilución de los componentes del nejayote fue menor, lo que mejoró el crecimiento microbiano.

Los microorganismos en general prefieren fuentes de carbono simples, como la glucosa, sobre los polisacáridos, como el almidón. Sin embargo, al medio al que se le adicionó glucosa produjo una biomasa de 5.89 mg/mL, mientras que el control produjo 5.72 mg/mL (**figura 14a**). Pese a que el hongo prefiere a la glucosa, la diferencia en la producción de biomasa no es importante. Esto indica que los carbohidratos presentes en el nejayote sin diluir son comparables con la concentración a la que se le adicionó la glucosa, ya que solo se pudo observar un incremento en el crecimiento mayor al 10%. Por lo que fue necesario realizar otra fermentación donde se incrementara la concentración del carbohidrato.

En cuanto al monitoreo del pH en la **figura 14b** se observa el mismo comportamiento para las tres condiciones observadas hasta las 24 h. Durante el resto de la fermentación, se aprecia que el comportamiento es el mismo que el notado en la fermentación anterior (**figura 12b**) entre el control y el medio adicionado con agua únicamente, donde el pH alcanzó valores ligeramente mayores para el medio diluido que en el concentrado, pero ambos cercanos a 8. Para el



medio al que se le adicionó a las 24 h la solución de glucosa tuvo un descenso de pH hasta valores cercanos a 6 hasta las 48 h, para un posterior incremento a 7.1 a las 72 h. Esta disminución de pH pudo deberse a la actividad metabólica de asimilación de azúcares, generando un incremento en la producción de metabolitos de carácter ácido. Estos metabolitos por un periodo de 24 h se encontraban en mayor concentración que los grupos amino liberados.

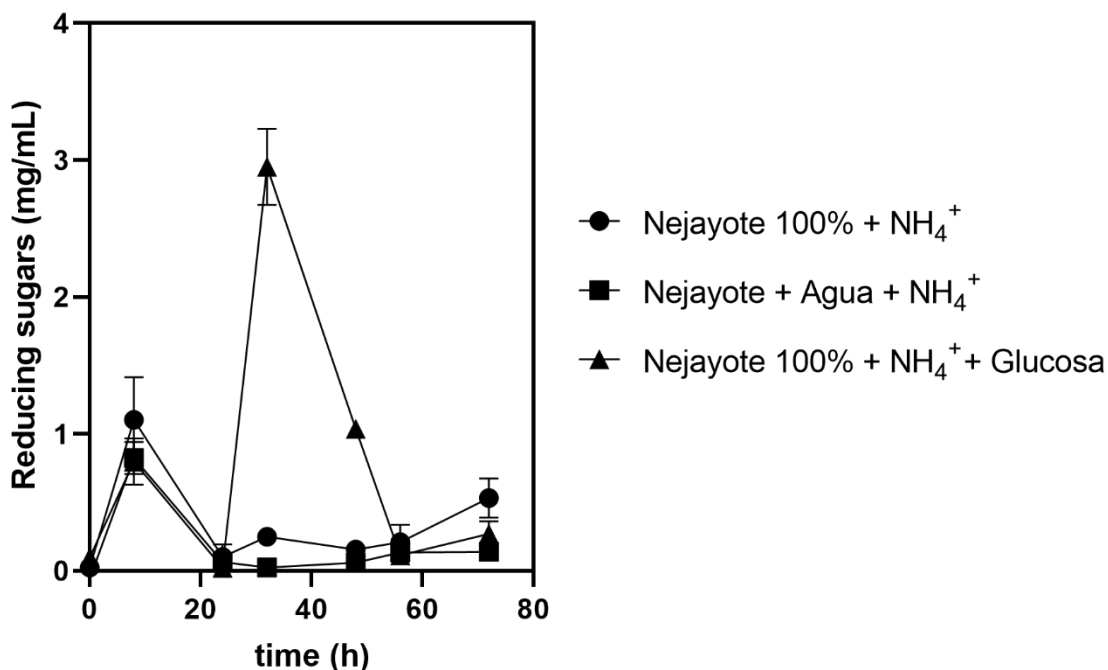


FIGURA 15. CURVA DE UTILIZACIÓN DE GLUCOSA CON RESPECTO AL TIEMPO PARA LAS TRES CONDICIONES EXAMINADAS.

El consumo y adición de azúcares reductores al medio se presenta en la **figura 15**. Como ya se analizó en la **figura 13** el nejayote incrementa el contenido de azúcares reductores las 8 h, lo cual es congruente con lo observado en la **figura 15**. Sin embargo, en este caso a las 24 h se adicionó glucosa al medio, hay que recordar que los azúcares reductores son aquellos que poseen su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto entre estos tenemos la glucosa y la fructosa, y que a través de este pueden reaccionar con otras moléculas (Moreano Pilatasig, 2015). Razón por la cual se observa un pico a las 32 h en el medio suplementado y se obtuvo una lectura equivalente a 2.95 mg de glucosa por mL para posteriormente disminuir esta

concentración, mientras que en los otros dos casos después del pico a las 8 h el comportamiento se mantiene en valores menores a 0.5 mg/mL.

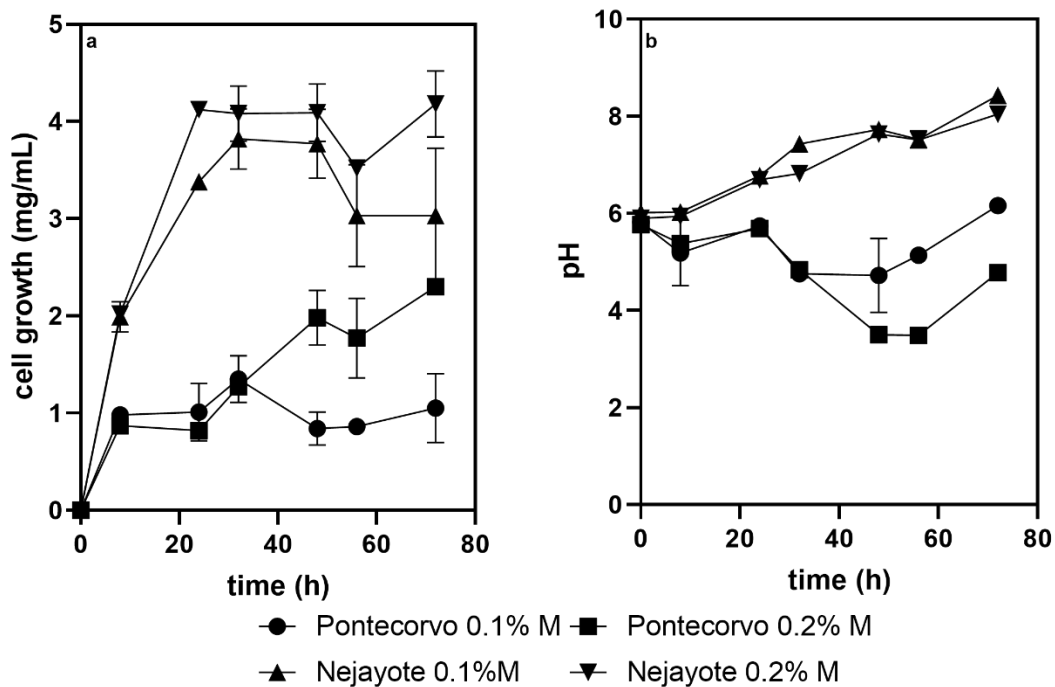


FIGURA 16. PRODUCCIÓN DE BIOMASA (A) Y VARIACIÓN DE PH (B) PARA LA PRUEBA DE ADICIÓN DE MELAZA COMO FUENTE DE CARBONO.

Posteriormente se experimentó con la melaza como fuente de carbono que es considerada como un residuo de la industria azucarera. La melaza es de bajo costo y de alto contenido de azúcares que van por el orden de 40 al 55% entre los cuales están la fructosa, glucosa y sacarosa. Se adicionó de manera que la concentración final fuera de 0.1% y 0.2%, pero también se utilizaron dos medios de cultivo: el nejayote y el medio Pontecorvo, ambos con la fuente de nitrógeno en forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

En cuestión de producción de biomasa como era de esperarse el medio Pontecorvo produjo una cantidad cercana al 50% de la producida con el medio de nejayote (**figura 16a**), para ambas concentraciones de melaza. Esto se debe a que la adición de la melaza fue hasta las 24 h y antes de este momento *A. oryzae* no tenía ninguna

fuentes de carbono que utilizar para su crecimiento, lo que también se puede apreciar por el incremento en el contenido de azúcares reductores en la **figura 17**.

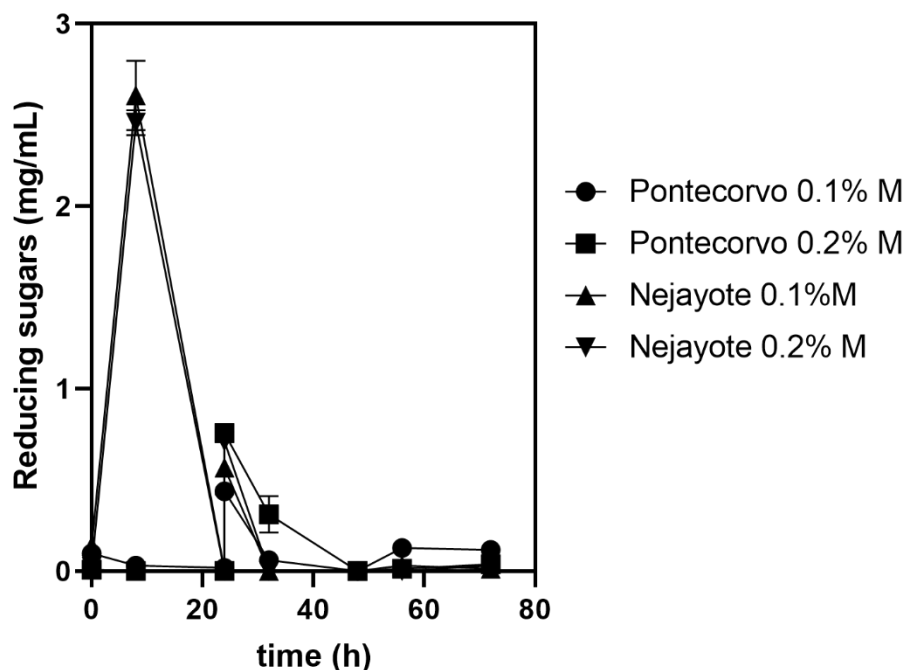


FIGURA 17. CURVA DE UTILIZACIÓN DE LA MELAZA CON RESPECTO AL TIEMPO PARA LAS DOS CONCENTRACIONES UTILIZADAS EN DOS MEDIOS DIFERENTES.

La adición tardía de la fuente de carbono en el medio Pontecorvo hace que *A. oryzae* se encuentre en una situación de estrés y produzca en ambos casos 1 mg de biomasa por mililitro las primeras 24 h. Sin embargo, cuando se adicionó en una concentración de 0.1% esta concentración solo fue capaz de producir un incremento a las 32 h de 0.34 mg de biomasa/mL. Posteriormente se observa un decremento hasta valores cercanos a 1 mg de biomasa/mL a las 48 h, donde se mantiene prácticamente constante hasta el término de la fermentación. En el caso de la adición a 0.2% de melaza la producción de biomasa en este medio se incrementó al doble, obteniendo un valor final de 2.3 mg de biomasa por mililitro a las 72 h.

En los medios con nejayote y amonio se observa que a las 24 h prácticamente ya terminó la fase de crecimiento exponencial, por ello cuando se adiciona la melaza ya no genera un crecimiento adicional (**figura 16a**), sin importar la concentración. Una de las razones para este comportamiento se debe a que el volumen de agua en el que se adicionó la melaza diluyó la composición general del nejayote, por lo

que en vez de incrementar la biomasa hizo que se mantuviera constante y solo produjera 3.82 mg/mL y 4.18 mg/mL para 0.1% y 0.2% de melaza respectivamente.

Otra probable explicación al hecho que no hubo un crecimiento adicional al momento de adicionar la melaza es que en el inicio de la fermentación las esporas comenzaron a germinar y al mismo tiempo a degradar el almidón presente en el nejayote. Conforme se degrada el almidón se acumulan los azúcares producidos y se utilizan en la fase exponencial, como se puede observar en el pico de azúcares reductores en la **figura 17**. Unas horas después la concentración de azúcares producidos inicialmente llegó a un valor prácticamente de 0 mg/mL (**figura 17**). Por lo que la fuente de carbono adicionada a las 24h, 0.1% y 0.2% de melaza. Y como se observa en la **figura 17** en el momento de la adición hay un incremento de azúcares reductores y a las 32 h su concentración llegó a valores cercanos a 0 mg/mL, posiblemente se haya utilizado para generar energía de mantenimiento.

También es importante tomar en cuenta el pH del medio, debido a que en la **figura 16b** se observa que los medios con nejayote a las 24 h se encuentran en un pH prácticamente neutro, punto donde se observa el crecimiento máximo. De las 24 h en adelante comienza una alcalinización del medio llegando a valores cercanos a 8, y como ya se vio anteriormente *A. oryzae* se ve afectado por un pH alcalino.

Para la curva de pH (**figura 16b**) se observa con el medio nejayote el mismo comportamiento visto en las fermentaciones anteriores, mientras que para el medio Pontecorvo tuvo una breve disminución. Esto por los productos generados de la asimilación de azúcares y generación de metabolitos ácidos, pero ya que no contenía alguna fuente de carácter básico que incrementara el pH, como es el caso del nejayote, el valor final de pH fue de 6.16 y 4.78 para 0.1% y 0.2% de melaza respectivamente. Sin embargo, a pesar de los diferentes valores de pH la curva obtenida con Pontecorvo sigue el mismo comportamiento observado en el medio nejayote-amonio con 0.2% de glucosa (**figura 14b**).

En la cuantificación de azúcares (**figura 17**) reductores en el medio Pontecorvo, en ambas concentraciones de melaza, se presentó un consumo más lento. Debido a

que la concentración después de la adición fue de 0.44 y 0.74 mg de glucosa/mL, para 0.1% y 0.2% de la fuente de carbono respectivamente, y para las 32 h solo habían disminuido a valores de 0.25 mg/mL y 0.44 mg/mL. Finalmente, a las 48 h se encontraron en valores similares a los previos a la adición.

Basado en los experimentos anteriores se observa que el adicionar la fuente de carbono a las 24 h no favorece al crecimiento del microorganismo de la manera esperada. Por ello se experimentó adicionando la fuente de carbono desde el tiempo 0 h. Adicionalmente se incrementó la concentración final del carbohidrato para los dos medios de cultivo previamente utilizados, primero se realizó con jarabe de glucosa como control y posteriormente se analizó la melaza.

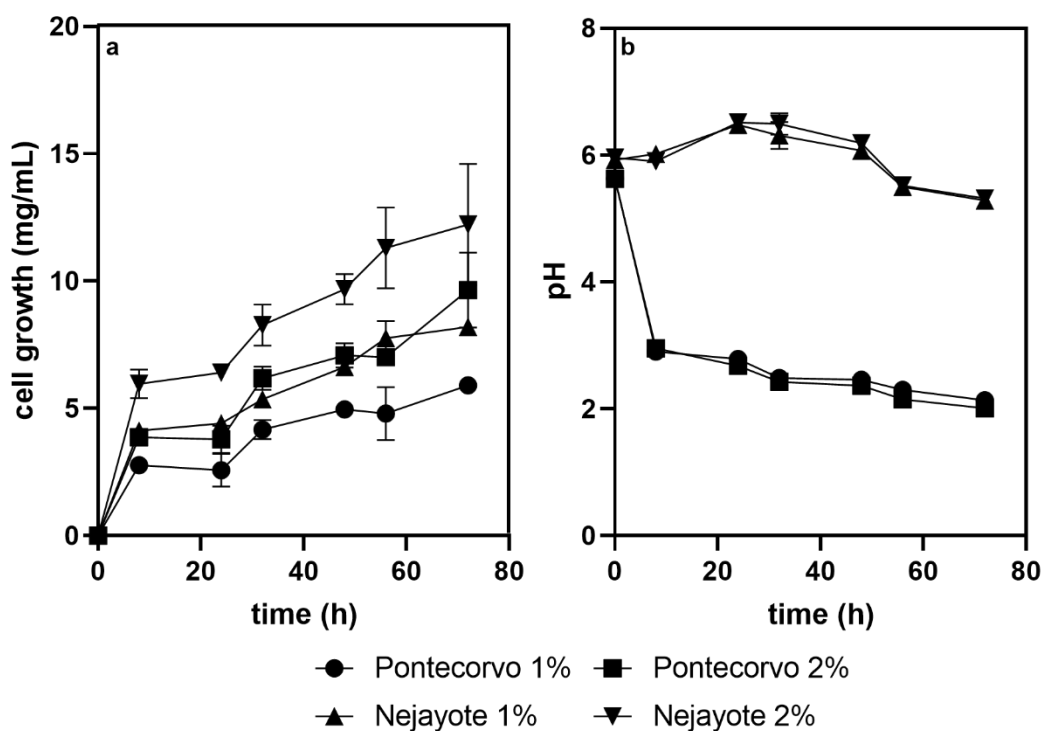


FIGURA 18. PRODUCCIÓN DE BIOMASA (A) Y VARIACIÓN DE PH (B) PARA LA PRUEBA DE ADICIÓN DE GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO EN DIFERENTES MEDIOS Y PORCENTAJES.

La biomasa producida (**figura 18a**) para las concentraciones al 1% de glucosa fue de 5.9 mg/mL y 8.2 mg/mL para el medio Pontecorvo y Nejayote respectivamente.

A pesar de que la adición de glucosa incrementó la producción de biomasa, en el caso del medio Pontecorvo este no pudo producir una mayor cantidad que si se comparara con la fermentación con nejayote descrita en la **figura 14a**, en la cual se le adicionó una concentración de glucosa 5 veces menor que la mencionada. En cuanto al medio con nejayote, este incrementó la producción en 2.31 mg de biomasa/mL, en comparación con la primera fermentación a la que al nejayote se le adicionó una fuente de carbono externa.

De acuerdo con los resultados obtenidos la concentración final de glucosa que genera un mejor crecimiento en el hongo es 2% (**figura 18a**), para el medio Pontecorvo y para el medio Nejayote con amonio. La biomasa máxima producida fue de 9.64 mg/mL y 12.04 mg/mL para el medio Pontecorvo y Nejayote con amonio respectivamente. La producción de biomasa es un poco más del doble que la producida en nejayote con 0.2% final de glucosa, ya que en este caso se produjo 5.89 mg de biomasa/mL (**figura 14a**). Esta producción de biomasa es la máxima obtenida hasta el momento y es lógico que sea con el medio con Nejayote y amonio, ya que este tiene fuentes de carbono adicionales a la glucosa.

En el comportamiento del pH se observa una tendencia diferente a la antes vista. En la **figura 18b** se aprecia que el medio Pontecorvo, sin importar la concentración, disminuye su pH drásticamente hasta valores cercanos a 3 a las 8 h transcurridas en la fermentación y de ahí el descenso del pH fue más lento en las 64 h restantes llegando a un valor de 2. En el caso del Nejayote con amonio este comenzó con el comportamiento esperado, ya que incrementó hasta un valor de 6.5 a las 24 h. Sin embargo, hubo un decremento a un valor de 5.3 en las 48 h restantes.

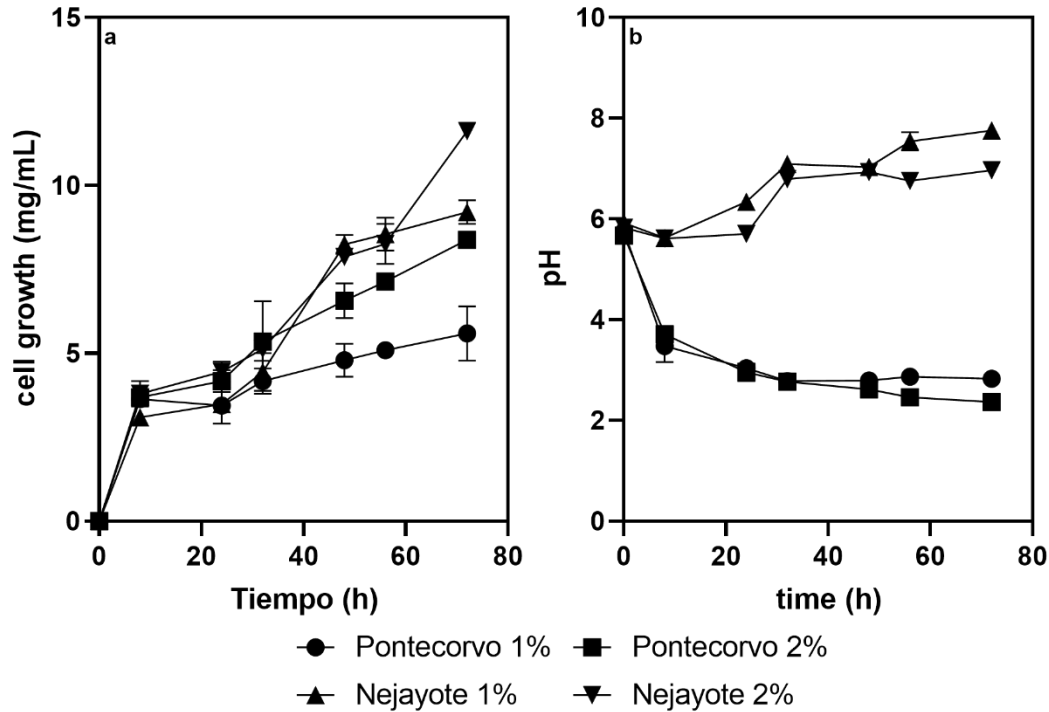


FIGURA 19. PRODUCCIÓN DE BIOMASA (A) Y VARIACIÓN DE PH (B) PARA LA PRUEBA DE ADICIÓN DE MELAZA COMO FUENTE DE CARBONO EN DIFERENTES MEDIOS Y PORCENTAJES.

Al probar la melaza como fuente de carbono a diferentes concentraciones se observa que con el nejayote genera un crecimiento comparable a la glucosa. La biomasa obtenida fue de 9.21 mg/mL y 11.62 mg/mL para el Nejayote con amonio para una concentración final de 1% y 2% respectivamente (**figura 19a**). Sin embargo, a pesar de que la producción de biomasa se incrementó para estas concentraciones, no fue suficiente para superar a la prueba anterior en la que se adicionó glucosa, ya que la producción máxima para el Nejayote con 2% de glucosa fue de 12.04 mg/mL.

La utilización de melaza como fuente de carbono en los medios y en las concentraciones probadas generó un buen crecimiento, (**figura 19a**). La biomasa obtenida fue de 9.21 mg/mL y 11.62 mg/mL para el Nejayote con amonio para una concentración final de 1% y 2% respectivamente (**figura 19a**). A pesar del buen crecimiento del hongo la producción de biomasa con esta fuente de carbono fue menor a cuando se utilizó la glucosa al 2% con nejayote (12.04 mg/mL), esto debido

a que la asimilación de la glucosa (purificada a 43°Brix) es preferible y más fácil para el hongo que una fuente de carbono más compleja como lo es la melaza. Mientras que en el medio Pontecorvo se produjeron 5.59 mg de biomasa/mL y 7.79 mg de biomasa/mL para una concentración del 1% y 2% de melaza respectivamente. Esta producción es entre 30 y 40% menor que la producida con nejayote a las mismas concentraciones de melaza.

La melaza de caña se caracteriza por tener grados Brix o sólidos disueltos de 68-75%. (Fernández Méndez, 2018) Del porcentaje anterior los principales azúcares presentes son la sacarosa (60% - 63% p/v), la glucosa (6% - 9% p/v), y la fructosa (5% - 10% p/v); estas dos últimas constituyen la mayor porción de los azúcares reductores encontrados en los análisis (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007). Tomando esta composición en cuenta, el hongo metabolizaría primero la glucosa y la fructosa, que son de más fácilmente asimilables, pero se encuentran en porcentajes muy bajos y posteriormente utilizaría la sacarosa. Es por lo que el incremento de biomasa es más constante cuando se utiliza jarabe de glucosa que cuando se añade la melaza.

La **figura 19b** expone que el medio Pontecorvo presenta el mismo comportamiento de cambio de pH sin importar la fuente de carbono utilizada, pero esta debe de encontrarse en una concentración final mayor al 1%. Esto debido a que el valor final de pH con melaza fue de 2.83 para 1% y 2.37 para 2%, mientras que con glucosa (**figura 18b**) fue de 2.14 y 2.01 para 1% y 2% respectivamente. En cuanto al nejayote nos indica que la melaza no ayuda a la producción de metabolitos ácidos debido a que el pH incrementa a 7.76 y 6.96 en lugar de disminuir, como sucedió en la fermentación pasada (**figura 18b**).



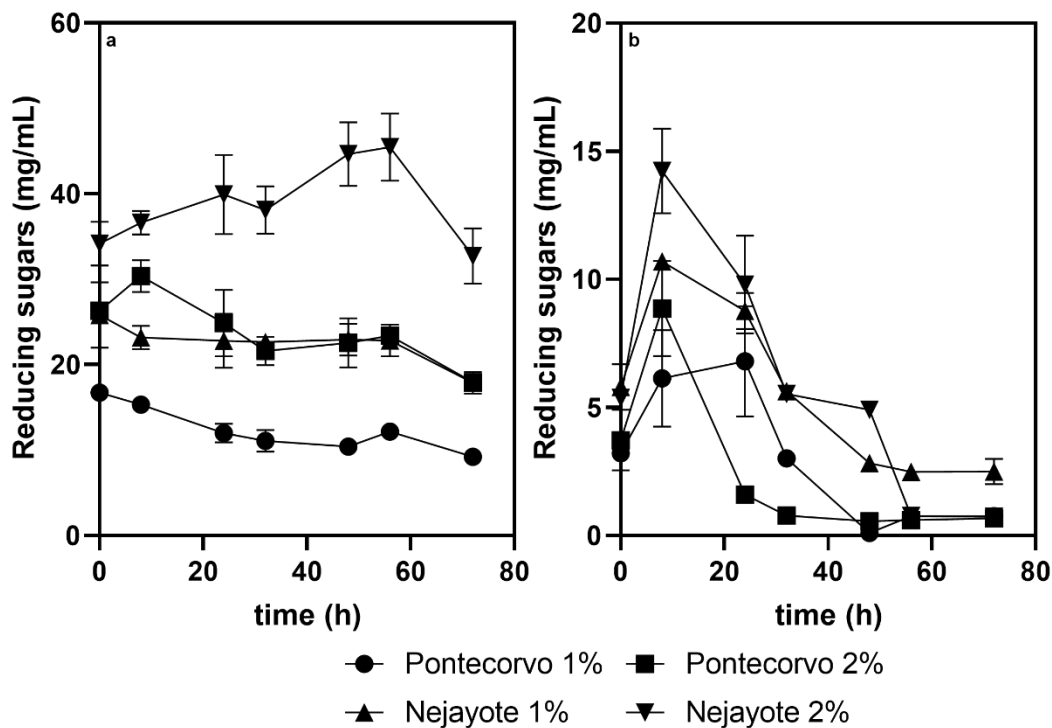


FIGURA 20. CURVA DE UTILIZACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO (ADICIONADAS A LAS 0 H) CON RESPECTO AL TIEMPO PARA GLUCOSA (A) Y MELAZA (B) UTILIZADAS EN LOS MEDIOS CON Y SIN NEJAYOTE.

Para el caso del consumo de azúcares reductores (**figura 20a**) los medios con glucosa tenían una concentración inicial mayor que con la melaza, lo cual es congruente ya que la glucosa es un azúcar reductor mientras que la melaza se compone de azúcares reductores y no reductores. En el caso de los medios a los que se les adicionó glucosa para una concentración final del 1% se observó una disminución de los azúcares de entre 7 y 8 mg de glucosa/mL, esta reducción fue constante a lo largo de toda la fermentación. Ambos medios muestran esta pauta para su crecimiento, ejemplificado en la **figura 18a**, puesto que su pendiente de crecimiento también es poco acentuada.

Sin embargo, para el medio nejayote con 2% de glucosa, al inicio y al final se obtuvieron valores de 34.15 y 32.73 mg de azúcares reductores por mililitro, pero tuvo un incremento a 45.44 mg/mL a las 56 h por lo que pudo deberse a que el hongo utilizó ambas fuentes de carbono, los carbohidratos presentes en el nejayote y el jarabe de glucosa adicionado. Sin embargo, en la concentración de azúcares

disminuye (**figura 20a**) lo que corresponde con el incremento de la producción de biomasa.

Mientras que los que contenían melaza (**figura 20b**) obtuvieron valores máximos de 10.70 mg de azúcares reductores/mL y 14.23 mg de azúcares reductores/mL para nejayote (1% y 2% respectivamente), y 6.80 mg de azúcares reductores/mL y 8.86 mg de azúcares reductores/mL para el medio Pontecorvo (1% y 2% respectivamente). Los valores máximos reportados fueron hasta las 8 h para casi todos, excepto en Pontecorvo al 1% el cual fue hasta las 24 h. Este incremento de azúcares reductores al doble o casi al triple en algunos casos es debido a que la melaza contiene de 26 a 40% de sacarosa, la cual sufre una posterior ruptura liberando glucosa y fructosa, glucosa (6% - 9% p/v), y la fructosa (5% - 10% p/v) como ya se mencionó (Fajardo-Castillo & Sarmiento-Forero, 2007).

La velocidad de consumo de azúcares reductores está relacionada inversamente con la producción de biomasa, por lo que entre mayor velocidad de crecimiento menor concentración de azúcares presentes. Esto se observa en el caso del medio Pontecorvo al 2% de melaza donde se observó un decremento hasta valores cercanos a 0.7 mg/mL a las 32 h, valor en el que se mantuvo constante por las 40 h restantes. Este comportamiento es congruente con lo reportado en la **figura 19a** donde la biomasa generada es 2.2 mg/mL mayor para una concentración final del 2%.

### 5.3 Crecimiento en medio líquido en biorreactor.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las fermentaciones anteriores el medio óptimo para el objetivo de esta investigación fue el que contenía nejayote con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  adicionado con jarabe de glucosa a una concentración final del 2%, que corresponde a una producción de 12.04 mg de biomasa/mL. No obstante, el jarabe de glucosa con 43°Brix no es viable para la fermentación en biorreactor. Esto es debido a los costos que esta fuente supondría en una escala mayor. El precio de la glucosa fue de \$47.56 por kilogramo, mientras que la melaza cuesta \$10 el kilogramo esto es casi la quinta parte del precio de la glucosa. Por lo que el medio

que utilizado fue nejayote con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  adicionado con melaza a una concentración final del 2%.

### 5.3.1 Fermentación en un biorreactor BioFlo modelo C-30 con capacidad de 1.5

L.

La fermentación se llevó a cabo en un volumen de trabajo de 1 L de nejayote con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y melaza al 2%, a 300 rpm y 1 vvm. Esta abreviatura significa en la primera 'v' el volumen de aire (por ejemplo, litro); la segunda 'v' representa por unidad de medio (por ejemplo, litro); 'm' significa por unidad de tiempo (por ejemplo, minuto). Hubo un incremento en las revoluciones por minuto ya que se observó que en la interfase se creaba una acumulación de micelio. Una vez encontrado el medio óptimo el trabajo se enfocó en encontrar un tipo de biorreactor que produjera la mayor cantidad de biomasa fúngica.

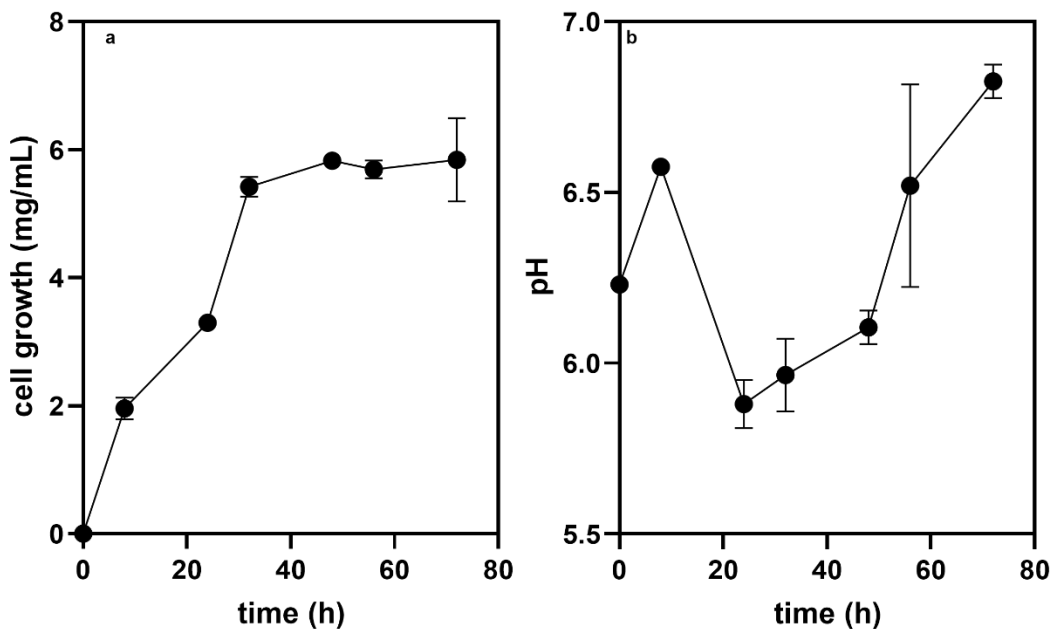


FIGURA 21. PRODUCCIÓN DE BIOMASA (A) Y VARIACIÓN DE PH (B) PARA EL ESCALAMIENTO A UN BIORREACTOR DE 1L.

En el escalamiento de la fermentación con el biorreactor BioFlo modelo C30 se obtuvo una menor producción de biomasa que en las fermentaciones en matraz

(**figura 21a**). La biomasa producida fue de 5.82 mg/mL este valor es el 50% de lo producido a nivel de matraz, en cual se produjeron 11.62 mg de biomasa/mL. Se debe tomar en cuenta que la fermentación en el reactor generaba una considerable cantidad de espuma por la agitación mecánica del nejayote, por lo que se le adicionaron cerca de 12 mL de antiespumante para 1 L de medio. El antiespumante se adiciono con la finalidad de evitar una posible limitación en el crecimiento, ya que la espuma limita el transporte de oxígeno a las células, sin embargo, una concentración inadecuada del antiespumante también evita el crecimiento de la biomasa.

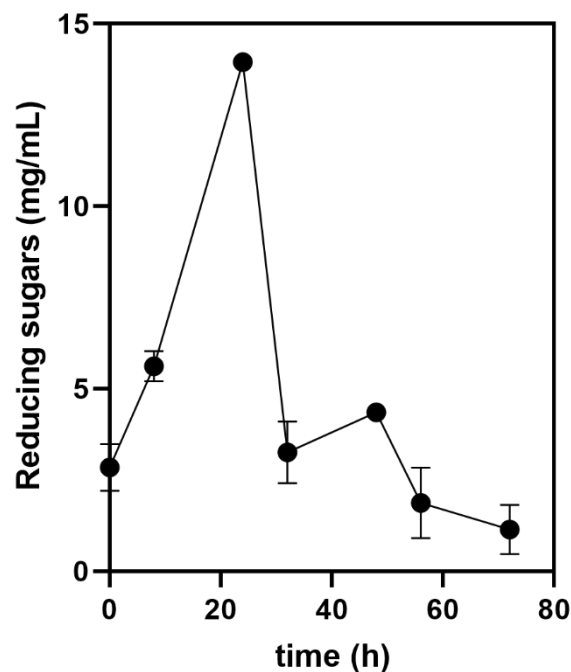
Los métodos químicos son preferidos para el control de la espuma, aunque un interruptor mecánico de la espuma también es incorporado generalmente en los fermentadores. El control de espumas por métodos químicos se basa en el uso de una clase de compuestos conocidos como agentes antiespumantes o antiespumantes (Ghildyal et al., 1988). Es bien sabido que el uso de antiespumantes químicos para el control de la espuma durante la fermentación conduce a muchos efectos adversos. Los cambios en las propiedades físicas del medio de cultivo, el deterioro de las características operativas del fermentador y una marcada disminución del rendimiento del fermentador se asocian al uso de agentes químicos antiespumantes (Ghildyal et al., 1988).

Como ya se mencionó, el antiespumante pudo generar que *A. oryzae* no produjera un contenido de biomasa mayor a la obtenida en matraz. Uno de los efectos adversos del uso de antiespumantes es una disminución en la producción de biomasa, reducción de la tasa de fermentación y retraso en la producción de metabolitos, esto es causado por una alteración de su metabolismo (Ghildyal et al., 1988). Otro efecto negativo de su uso es la resistencia interfacial gas-líquido adicional debido a la naturaleza superficial-activa de antiespumantes y una disminución del contacto efectivo entre el cultivo y el aire atrapado en la espuma (Ghildyal et al., 1988), entre otras.

En cuanto al comportamiento del pH (**figura 21b**) en las primeras 8 h hubo un incremento hasta valores el valor de 6.58 para un posterior decaimiento. A las 24 h

tuvo su punto más bajo con un valor de 5.88, esta disminución se debe a que el metabolismo del hongo se encontraba en su máxima capacidad y producía una concentración de metabolitos ácidos mayor a los grupos amino presentes en el medio. Esta disminución del pH se mantuvo hasta las 32 h para posteriormente incrementar por el periodo de tiempo restante.

La producción de metabolitos ácidos corresponde con la concentración de azúcares reductores presentes en el medio. Ya que cuando el pH se encontraba en su valor más bajo a las 24 h (**figura 21b**), y en este momento el microorganismo contaba con la mayor concentración de azúcares reductores que se puede observar en la **figura 22**. Este incremento es posible ya que como se ha mencionado anteriormente la melaza contiene de 26 a 40% de sacarosa, y al romper el enlace glucosídico  $\alpha(1 \rightarrow 2)$  se libera glucosa y fructosa (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007).



**FIGURA 22. CURVA DE UTILIZACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO CON RESPECTO AL TIEMPO PARA EL ESCALAMIENTO A UN BIORREACTOR DE 1L.**

Las enzimas encargadas de esta ruptura son hidrolasas que se excretan de forma extracelular, en este caso amilasas producidas en el nejayote que se analizarán más adelante. Estas enzimas se ven afectadas por un cambio de pH y son más

activas a su pH óptimo, el pH que mantiene la estructura terciaria adecuada de la proteína (Timberlake, 2013). En la **figura 21b** se observa un incremento de pH a un valor cercano a 7 a las 8 h, y en la **figura 22** en ese momento todavía no habían incrementado los azúcares como lo hicieron a las 24 h. Sin embargo, a las 24 h el pH había disminuido y la concentración de azúcares reductores era la máxima. Por lo que se presume que en ese momento la actividad enzimática era elevada y el microorganismo se encontraba en su fase exponencial de crecimiento.

Esto es congruente con lo reportado en la literatura, ya que la  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae* que se encarga de hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,4 glicosídicos que se encuentran en el almidón del nejayote tiene un pH óptimo ácido o neutro y su síntesis ocurre durante la fase exponencial (Miranda Olarte & Moreno Díaz, 2005). A partir de las 32 h se observa un comportamiento decreciente en la concentración de los azúcares reductores, el cual es congruente con el crecimiento descrito en la **figura 21a**. Ya que a partir de este punto el microorganismo comenzó su fase estacionaria.

### 5.3.2 Fermentación en un biorreactor BioFlo III con capacidad de 5 L.

Se continuo la fermentación en un volumen de trabajo de 3 L en las mismas condiciones, 300 rpm/1vvm/31°C/72 h. El cambio de reactor se debió a que el sistema de agitación en el biorreactor anterior presento fallas, tales como detenerse, otra razón fue que no era posible monitorear la concentración de oxígeno durante la fermentación. Para comprobar el efecto favorable se probaron las tres combinaciones posibles manteniendo la fuente de nitrógeno en todo momento. Las tres condiciones fueron: nejayote +  $\text{NH}_4^+$  + 2% melaza, Nejayote +  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{NH}_4^+$  + 2% melaza. En los tres posibles medios se analizaron nuevas variables como son azúcares totales, actividad enzimática amilolítica y xilanolítica, oxígeno disuelto, además de las realizadas anteriormente.

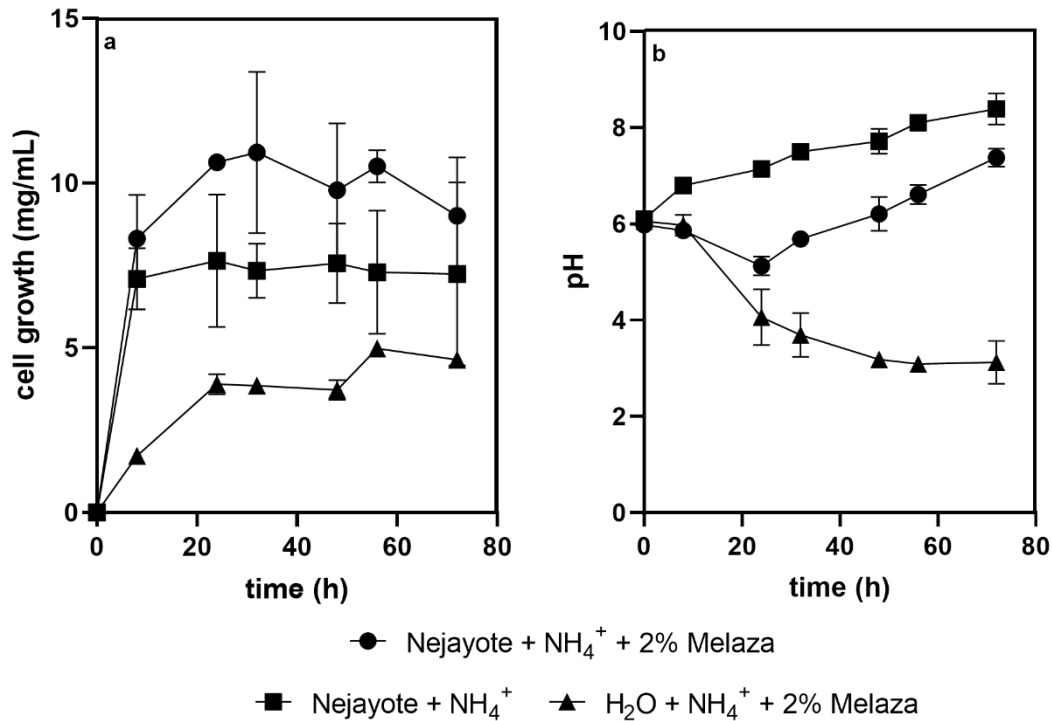


FIGURA 23. PRODUCCIÓN DE BIOMASA (A) Y VARIACIÓN DE PH (B) PARA EL ESCALAMIENTO A UN BIORREACTOR DE 3 L.

Comenzando con la producción de biomasa en la **figura 23a** se percibe que en el medio nejayote + NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + 2% melaza la producción máxima fue a las 32 h con 10.94 mg de biomasa/mL, para posteriormente disminuir y mantenerse. A pesar del valor obtenido, las barras de error indican que los datos tienen una desviación considerable. Esto es debido a un posible factor, el reactor presentó una acumulación de biomasa en la interfase (aire-medio) que iba incrementando su tamaño haciendo inexacta la toma de muestra, ya que se llegó a formar un “tapón”, a pesar de los intentos por eliminar dicha acumulación.

En cuanto a la formación de espuma, en esta fermentación se utilizaron 15 mL de antiespumante para los tres litros. Lo que implica una disminución en el volumen de antiespumante utilizado por litro de medio, ya que en este caso fueron 5 mL por litro mientras que en el anterior fue de 12 mL por litro reduciéndolo a menos del 50%. Por lo que se redujeron los efectos no favorables para la producción de biomasa, que se mencionaron anteriormente.

En cuanto al medio nejayote +  $\text{NH}_4^+$  la producción máxima fue de 7.65 mg de biomasa/mL a las 24 h para mantenerse constante por el resto de la fermentación (**figura 23a**). En este caso a pesar de generar un micelio muy difuso, también se encontró con el inconveniente de la acumulación de micelio en la interfase. Sin embargo, no el suficiente como para formar un tapón. La biomasa máxima obtenida fue aproximadamente la mitad de la producida cuando a este medio se le adiciona melaza. Ahora bien, al comparar el medio de  $\text{H}_2\text{O} + \text{NH}_4^+ + 2\%$  melaza se observa una producción máxima de apenas 4.98 mg de biomasa/mL, pero hasta las 56 h de la fermentación. Por lo que se puede observar que la combinación de nejayote con melaza favorece a *A. oryzae* a producir una mayor cantidad de biomasa que si se inoculara en un medio sin alguno de estos elementos. En las composiciones donde no estaba presente la melaza o el nejayote se observó una disminución del volumen de antiespumante utilizado. En el caso del medio sin melaza se utilizaron únicamente 10 mL mientras que cuando se cambió al nejayote por agua solo se utilizaron 5 mL. Por lo que la producción de biomasa no se vio afectada por la presencia de antiespumante como sucedió en el reactor de 1 L.

**TABLA 6. CONSTANTE ESPECÍFICA DE VELOCIDADES DE CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EN LOS MEDIOS UTILIZADOS**

Medio de cultivo	$\mu \text{ (h}^{-1}) / R^2$	Referencia
<b>Nejayote + <math>\text{NH}_4^+</math> + 2% Melaza</b>	0.0311 / 0.9963	Presente trabajo
<b>Nejayote + <math>\text{NH}_4^+</math></b>	0.0266 / 0.9267	Presente trabajo
<b><math>\text{H}_2\text{O} + \text{NH}_4^+ + 2\%</math> Melaza</b>	0.0240 / 0.9825	Presente trabajo
<b><i>A. oryzae</i> en un medio de referencia con maltodextrina 15:1 (C:N) con <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math> (3 g/L)</b>	0.0352	(Gamarra Castillo, 2021)
<b><i>Fusarium venenatum</i></b>	0.17 – 0.20	(Wiebe, 2002)

Al observar en la **figura 23a** que el hongo producía un gran porcentaje de la biomasa total a las 8 h de la fermentación en dos de los tres medios utilizados, se realizó una fermentación adicional con las mismas condiciones en los tres medios probados. En dicha fermentación se tomaron muestras en la 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h y 8 h, para



conocer el momento en el cual el *A. oryzae* comenzó su crecimiento. A partir de esos datos se calculó la constante específica de velocidad de crecimiento de *A. oryzae*, la cual se reporta en la **tabla 6**. Se puede observar que la velocidad de crecimiento para el medio nejayote +  $\text{NH}_4^+$  + 2% melaza es de  $0.0311 \text{ h}^{-1}$ , valor similar al encontrado en la literatura donde se reporta una velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx.}}$ ) de  $0.0352 \text{ h}^{-1}$  (Gamarra Castillo, 2021). Por lo que Gamarra Castillo (2021) nos puede servir de guía para el valor obtenido en esta fermentación, ya que también utilizó un medio complejo con la misma fuente de nitrógeno,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , en una proporción de 15:1 (C:N) con maltodextrina.

Adicionalmente, el medio formulado únicamente por  $\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{NH}_4^+$  + 2% melaza fue el que obtuvo una velocidad de crecimiento menor ( $0.0240 \text{ h}^{-1}$ ), este resultado era de esperarse puesto que en la **figura 23a** se observa claramente que este medio necesita 56 h para producir su biomasa máxima mientras que los otros dos medios entre las 24 h y 32 h ya habían alcanzado su valor máximo. En cuanto a la composición nejayote +  $\text{NH}_4^+$  el resultado fue menor que el esperado, el cual fue de  $0.0266 \text{ h}^{-1}$ . Esto indica que la presencia de la melaza con el nejayote mejora el crecimiento de *A. oryzae*, también nos indica que la composición nejayote/ $\text{NH}_4^+$ /2% melaza es la más adecuada.

Ahora bien, la constante específica de velocidad de crecimiento de *A. oryzae* fue menor contra *Fusarium venenatum* (Wiebe, 2002), hongo filamentoso utilizado industrialmente por la marca Quorn™. Se observa que *F. venenatum* tiene una velocidad de crecimiento casi 10 veces más rápida que *A. oryzae*, el cual se encuentra en un medio complejo (nejayote/ $\text{NH}_4^+$ /2% melaza). Por lo que nos indica la existencia de un área de oportunidad con el hongo de nuestro interés en la producción de biomasa.

El pH se comportó de diferente manera en las tres condiciones analizadas (**figura 23b**). En el caso de  $\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{NH}_4^+$  + 2% melaza se observó una disminución exponencial a partir de las 8 h, hasta llegar a valores cercanos a 3. Esto se debe a la composición, al no tener nejayote tampoco contiene las proteínas que al sufrir una ruptura se liberan compuestos aminados al medio, dichos compuestos podrían

funcionar como amortiguador del pH. A continuación, el medio compuesto por nejayote y  $\text{NH}_4^+$  no presenta una disminución, al contrario, incrementó su pH de forma continua durante las 72 h de fermentación hasta un valor cercano a 8. Como ya se ha mencionado este valor de pH no es el óptimo para el crecimiento de *A. oryzae* (Gomi, *Aspergillus oryzae*, 2014), a pesar de poder desarrollarse.

Finalmente, el medio compuesto por nejayote/ $\text{NH}_4^+$ /2% melaza tuvo un comportamiento congruente con las fermentaciones vistas anteriormente en matraz y en reactor de 1.5 L, el cual es una disminución a las 24 h para un posterior incremento por el periodo de tiempo restante. Este comportamiento como se ha dicho previamente se debe a la producción de metabolitos ácidos durante las primeras 24 h. Las 24 h son el punto en el cual ya no se puede generar un incremento de la producción de biomasa considerable debido a que se acabó la fuente de carbono preferible (melaza) quedándose únicamente con la proveniente del nejayote.

- Azúcares presentes en los medios (reductores y totales)

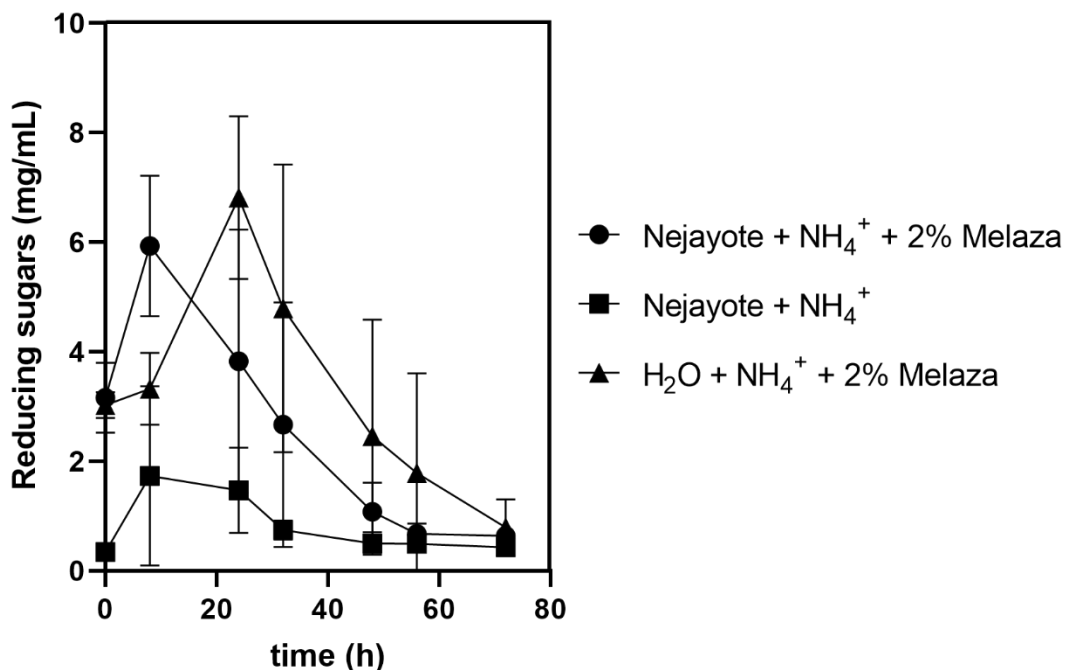


FIGURA 24. CURVA DE UTILIZACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES CON RESPECTO AL TIEMPO PARA EL ESCALAMIENTO A UN BIORREACTOR DE 3 L PARA LAS TRES CONDICIONES ANALIZADAS.

A pesar de obtener una producción de biomasa similar entre los duplicados de los tres medios, la concentración de azúcares reductores presente tuvo una variación importante entre un duplicado y otro para todas las fermentaciones. En la **figura 24** se aprecia un comportamiento esperado, ya que a las 8 h el medio que tenía una mayor concentración de azúcares reductores era el medio con nejayote y melaza, pero para las 24 h esta concentración había disminuido hasta alrededor de 2 mg/mL y continuó con esta tendencia hasta las 56 h donde la concentración de estos azúcares es cercana a 0 mg/mL. Este comportamiento se debe a que en las primeras 24 h el hongo filamentoso se encontraba en su fase de crecimiento exponencial por lo que la liberación de azúcares reductores y su consumo se encontraban a la misma velocidad.

En cuanto al medio con agua,  $\text{NH}_4^+$  y 2% melaza la concentración máxima de azúcares reductores fue hasta las 32 h (**figura 24**), pero es importante resaltar que *A. oryzae* tuvo un crecimiento retardado y mucho menor con este medio que con el antes mencionado (**figura 23a**). En adición a esto, la velocidad a la que la concentración de azúcares disminuyó fue menor que con nejayote y 2% melaza, ya que hasta el término de la fermentación los niveles de azúcares reductores fueron los mismos, mientras con nejayote y 2% melaza para las 48 h del experimento la concentración se encontraba cercana a 1 mg/mL. Posteriormente, el comportamiento con el medio únicamente con nejayote y amonio (**figura 24**) fue el mismo que el observado anteriormente en las **figuras 13** y **15**, donde la concentración máxima es a las 8 h y es menor a 2 mg/mL, y de ahí la concentración decae.

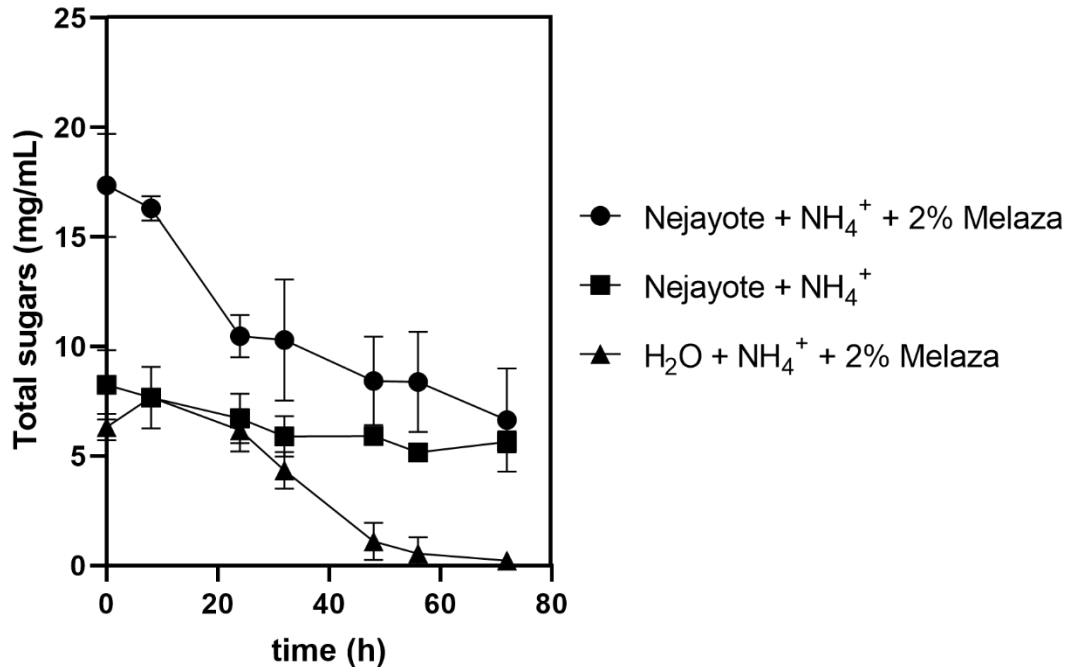


FIGURA 25. CURVA DE UTILIZACIÓN DE AZÚCARES TOTALES CON RESPECTO AL TIEMPO PARA EL ESCALAMIENTO A UN BIORREACTOR DE 3 L PARA LAS TRES CONDICIONES ANALIZADAS.

Al observar que la variación en el análisis de azúcares reductores era considerable se midió la concentración de azúcares totales presentes desde el inicio hasta el final de la fermentación (**figura 25**), esta determinación nos indica la concentración de azúcares en el medio sin importar si son reductores o no. Al comparar las gráficas de azúcares para el medio únicamente con nejayote se puede notar que, a pesar de contar con una concentración de azúcares reductores baja (**figura 24**), la concentración de azúcares totales es de 8.25 mg/mL incluso siendo similar a la obtenida para el medio únicamente con melaza. Sin embargo, a pesar de contar con esa concentración inicial de azúcares totales presentes en el medio, el hongo filamentoso no consume lo suficiente y eso da inicio a la fase estacionaria a las 8 h de la fermentación; por lo que es necesario realizar un análisis de la biomasa obtenida y de la morfología del microorganismo.

En el caso del medio nejayote/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/2% melaza (**figura 25**) la concentración inicial de azúcares totales es de 17.35 mg/mL, para posteriormente tener una disminución de 5 mg/mL entre las 8 h y las 24 h, lo cual es congruente con la pauta descrita y

discutida anteriormente en la producción de biomasa (**figura 23a**). La disminución de carbohidratos a partir de las 24 h hasta el final de la fermentación tuvo una velocidad mucho menor que en el periodo antes mencionado, este decremento ocurrió únicamente porque en la fase estacionaria las condiciones de cultivo son limitantes (Arredondo Vega, 2007). Adicionalmente se aprecia que la concentración final de azúcares totales es similar a la inicial al medio con únicamente nejayote, por lo que se puede suponer que la fuente de carbono presente en el nejayote no sea fácilmente digerible y es por lo que *A. oryzae* prefiera a la melaza por sobre la presente en el nejayote.

Finalmente, en  $H_2O + NH_4^+ + 2\%$  melaza las concentraciones obtenidas tanto en azúcares reductores (**figura 24**) como en azúcares totales (**figura 25**) son muy similares, ya que a las 8 h en azúcares totales se obtuvo el máximo de 7.68 mg/mL y en azúcares reductores el punto máximo fue a las 24 h donde se reportaron 6.81 mg/mL. Se compararon los puntos máximos para saber cómo es que el hongo está consumiendo y liberación los azucares. Es por ello que se puede suponer que la concentración promedio reportada anteriormente de azúcares reductores es confiable y que la variación se debió a un error al momento de realizar la metodología.

- Actividad enzimática

Como ya se ha mencionado anteriormente el nejayote cuenta con el almidón como fuente de carbono. El almidón es el principal constituyente del maíz (*Zea mays* L.) y las propiedades fisicoquímicas y funcionales de este polisacárido están estrechamente relacionadas con su estructura (Agama-Acevedo et al., 2013). El almidón está formado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. Las enzimas que catalizan la hidrólisis de la estructura del almidón se denominan amilasas, dando origen a diversos productos que poseen una gran relevancia para algunas operaciones y procesos industriales (Castro et al., 2006). Es por ello que se evaluó la actividad amilolítica presente en los tres tipos de fermentaciones realizadas en este biorreactor.

La actividad enzimática, descrita en la **figura 26**, presenta resultados esperados en el medio que únicamente contiene agua, melaza y amonio. Esta actividad fue prácticamente nula durante casi todo el periodo que duró la fermentación, excepto a las 32 h donde hubo un incremento cercano a las 75 U/mL. Sin embargo, si se compara contra el resto de las actividades, el valor obtenido a las 32 h es cercano al 10% de la actividad máxima obtenida con nejayote/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/2% melaza por lo que se puede decir que casi no hubo actividad durante toda esta fermentación.

La actividad enzimática se pudo deber a que es posible inducir la actividad amilolítica de *A. oryzae* basada en la forma de fuente de carbono disponible. En la mayoría de los casos la producción de  $\alpha$ -amilasa se induce en presencia de almidón o malto-oligosacáridos, como maltosa o isomaltosa, pero no glucosa. La producción inducible de enzimas amilolíticas en *A. oryzae* está regulada por al menos dos factores de transcripción AmyR y MalR (Gomi, 2019).

No obstante, existen estudios donde se ha demostrado que, aunque se sabe que la glucosa es un represor de la producción de  $\alpha$ -amilasa a través de la proteína CreA, también sirve como un inductor (Carlsen & Nielsen, 2001). Carlsen & Nielsen (2001) también reportan que la fructosa y la sacarosa son fuentes de carbono que inducen la producción de  $\alpha$ -amilasa, produciendo un 25% y 54%, respectivamente, de lo que el hongo produjo con glucosa. Esta es una actividad relativamente pobre si se compara con otras fuentes de carbono, sin embargo, nos explica porque a las 32 h se induce la actividad amilolítica para un medio con melaza como única fuente de carbono (**figura 26**). En adición a lo antes mencionado otra posible explicación es que las amilasas sean constitutivas para el genero *Aspergillus*, ya que se ha reportado en algunas especies la presencia de amilasas. En un estudio se encontró que en *Aspergillus phoenicis* se produjeron niveles amilolíticos significativos en el medio de cultivo con glucosa o cuando este azúcar se agotó, lo que sugiere una enzima en la forma constitutiva (Benassi, y otros, 2012).

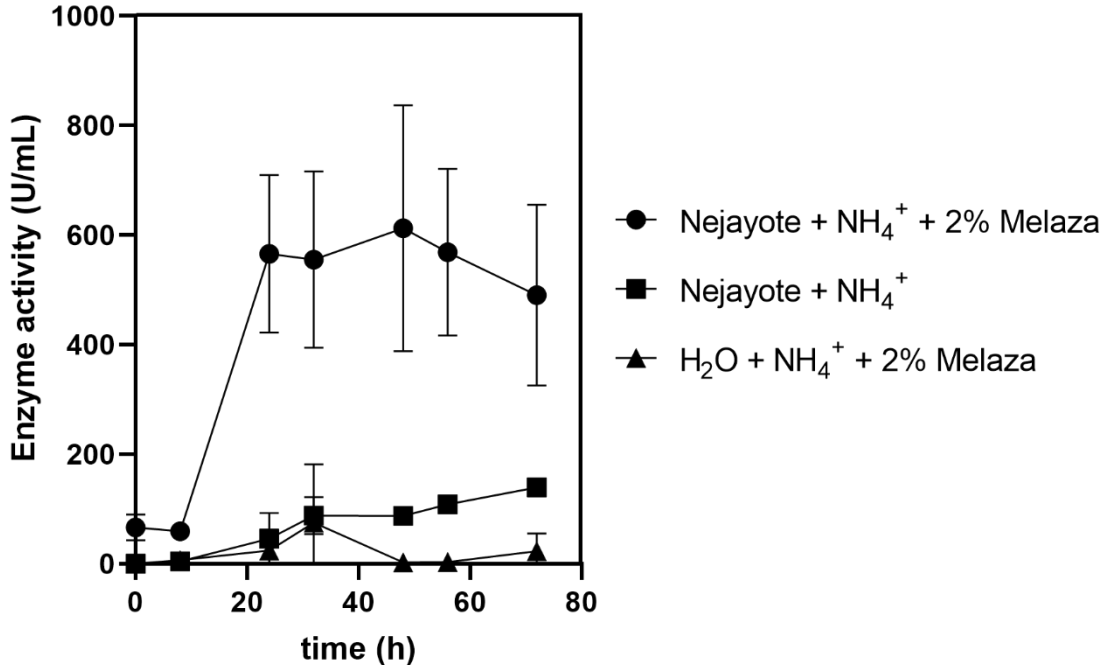


FIGURA 26. CURVA DE ACTIVIDAD AMIOLÍTICA CON RESPECTO AL TIEMPO PARA EL ESCALAMIENTO A UN BIORREACTOR DE 3 L PARA LAS TRES CONDICIONES ANALIZADAS.

En cuanto a los medios con nejayote se observa una gran diferencia entre estos, indicando que la presencia de melaza favorece el crecimiento y eventualmente facilita la producción de amilasas en *A. oryzae*. Cuando el nejayote es la única fuente de carbono presente en el medio la actividad amilolítica es baja, a pesar de que el nejayote cuenta con almidón en su composición, ya que su valor máximo reportado es de 139.62 U/mL y hasta el final del periodo de fermentación. A pesar de no ser la actividad máxima reportada esta es casi el doble de la observada para un medio únicamente con melaza (75 U/mL), y es congruente con lo reportado en la literatura, donde la producción de  $\alpha$ -amilasa se induce en presencia de almidón (Gomi, 2019).

En el medio nejayote con melaza a una concentración final del 2%, la actividad presenta un incremento exponencial de las 8 h a las 24 h incrementando aproximadamente 500 U/mL, para posteriormente presentar su valor máximo de 612.33 U/mL a las 48 h. El incremento exponencial en la actividad se debe a que la  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae*, que se encarga de hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,4 glicosídicos

que se encuentran en el almidón del nejayote, se sintetiza durante la fase exponencial de crecimiento (Miranda Olarte & Moreno Díaz, 2005). En cuanto a la actividad amilolítica se observa un efecto sinérgico cuando ambas fuentes de carbono se encuentran presentes en el medio, la presencia de ambas hace que se produzca aproximadamente 8 y 4 veces la actividad reportada para melaza y nejayote, respectivamente.

En cuanto a la actividad xilanólica los resultados obtenidos para las tres condiciones analizadas fueron negativos para la presencia de estas enzimas. A pesar de que se ha reportado la presencia de arabinoxilano en el nejayote (Niño-Medina et al., 2009; Ayala-Soto et al., 2014), lo cual puede inducir la producción de enzimas xilanólicas, en estas fermentaciones no hubo actividad.

- Oxígeno disuelto

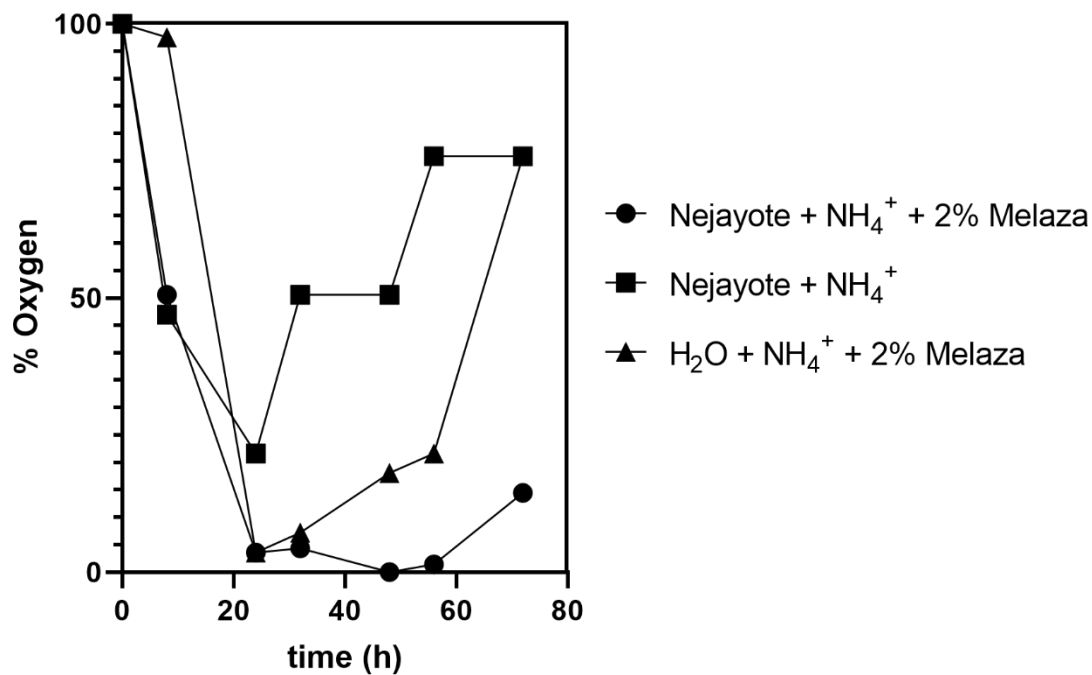


FIGURA 27. CURVA DE OXÍGENO DISUELTTO EN EL MEDIO CON RESPECTO AL TIEMPO PARA EL ESCALAMIENTO A UN BIORREACTOR DE 3 L PARA LAS TRES CONDICIONES ANALIZADAS.

Para finalizar el análisis para el biorreactor de tanque agitado se analizó el comportamiento del oxígeno disuelto en las tres variables observadas (**figura 27**).



El oxígeno disuelto se considera como la cantidad efectiva de oxígeno gaseoso ( $O_2$ ) en el agua, expresada en términos de su presencia en el volumen de agua (miligramos de  $O_2$ , por litro) o de su proporción en el agua saturada (porcentaje de  $O_2$  por 100 mL) (Naciones Unidas, 2005). Asimismo, el oxígeno disuelto nos puede dar una idea del metabolismo del microorganismo, un ejemplo de esto es el momento en el que este ya no presenta un desarrollo.

Se puede contemplar que el crecimiento de *A. oryzae* hasta las 8 h era de la misma manera para los medios que contenían nejayote, no obstante, a las 24 h el medio con melaza disminuyó hasta valores cercanos a 4% y el que no contenía melaza únicamente disminuyó hasta valores de 21.69%. Además, se puede observar que el metabolismo del hongo en nejayote sin melaza llegó a su punto máximo a las 24 h. Por lo que si se contrasta con la gráfica de biomasa (**figura 23a**) el contenido de biomasa real se debe de considerar hasta las 24 h y antes de esto la masa obtenida al realizar la diferencia de peso se puede deber a los sólidos presentes en el nejayote.

En cuanto a los medios a los que se les adicionó melaza, ambos disminuyen hasta valores cercanos a 4% a las 24 h y se mantienen ahí por un periodo de 8h (agua) y 32h (nejayote). Sin embargo, el que no contaba con nejayote a las 32 h volvió a incrementar su concentración de oxígeno señalando el término de su actividad metabólica y por consiguiente su crecimiento. Esto se pudo deber a que las hifas en búsqueda de recursos no encontraron suficientes nutrientes para continuar su crecimiento, solo para su mantenimiento. Al observar las **figuras 24 y 25**, el contenido de azúcares reductores y totales a las 32 h se encontraba en descenso.

Mientras que el medio nejayote/ $NH_4^+$ /2% melaza se mantuvo en una concentración de oxígeno de 4% desde las 24 h hasta las 56 h (**figura 27**), si se contrasta esto con la actividad amilolítica (**figura 26**) se observa que en este el periodo es cuando la actividad se encontraba en su máximo, hasta las 72h comenzó un leve descenso que es correspondiente con un leve incremento en la concentración de oxígeno presente en el medio. Por lo que es probable que *A. oryzae* produjera una

concentración de biomasa mayor a la reportada en la **figura 23a**, solamente no fue posible medir esta diferencia debido al tapón que se formó.

### 5.3.3 Fermentación en un biorreactor tipo Air Lift con capacidad de 2.5 L.

A pesar de que el biorreactor produjo una concentración de biomasa similar a la producida en el matraz, el biorreactor de tanque agitado utilizado puede que no sea el adecuado para la fermentación debido a la acumulación de micelio en la interfase en dos de las tres fermentaciones realizadas en él. Por lo que se realizó una prueba en un biorreactor de tipo Air Lift. En este caso el volumen de trabajo fue de 2.5 L y se realizó la fermentación en el medio óptimo: nejayote +  $\text{NH}_4^+$  + 2% melaza, con las mismas condiciones de crecimiento  $31^\circ\text{C}$  y pH de 6.

Como ya se mencionó en la introducción, en este tipo de biorreactor se introduce aire en la base de la columna de fermentación creando millones de microburbujas que luego se elevan a toda la altura de la columna, causando una diferencia de densidad y la caída del líquido y así vuelve a iniciar el proceso (Finnigan, Needham, & Abbott, 2017). Por lo que supondría una solución al problema acerca de la acumulación de biomasa en la interfase del tanque agitado. Sin embargo, en la **figura 28a** se puede apreciar que el crecimiento de *A. oryzae* en este fermentador no fue el óptimo.

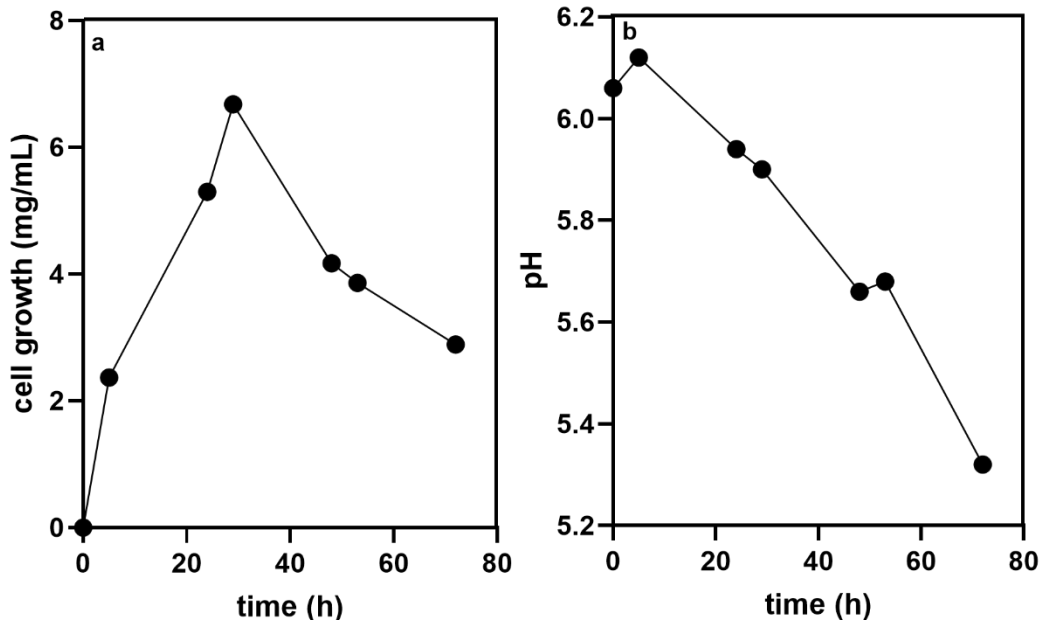


FIGURA 28. PRODUCCIÓN DE BIOMASA (A) Y VARIACIÓN DE PH (B) PARA UNA FERMENTACIÓN EN EL REACTOR AIR LIFT.

En este tipo de fermentador produjo 6.68 mg de biomasa por mililitro, lo cual representa dos terceras partes del crecimiento generado en el biorreactor de tanque agitado con propela. A pesar de esta diferencia, el crecimiento máximo del hongo filamentoso fue en un tiempo aproximadamente similar, ya que en este caso fue a las 29 h y en el biorreactor BioFlo se reportó a las 32 h. Sin embargo, la fase de crecimiento exponencial fue más larga porque duró desde las 0 h hasta el punto máximo a las 29 h, mientras que en el biorreactor de tanque agitado produjo el 76% de la biomasa máxima en las primeras 8 h de la fermentación, para la producción de la biomasa restante la velocidad de crecimiento fue menor.

El comportamiento del pH igualmente se vio modificado (**figura 28b**). En este medio el comportamiento observado, tanto en las fermentaciones en matraz como en los biorreactores anteriores, es una disminución a las 24 h para un posterior incremento en las 48 h restantes. En cambio, con el reactor Air Lift a las 5 h hay un pequeño incremento en el pH seguido de una disminución durante el periodo de fermentación restante.

- Azúcares presentes en el medio (reductores y totales)

Ahora bien, el consumo de azúcares fue similar a los observado anteriormente, en el caso de azúcares reductores (**figura 29a**) la producción máxima fue de 5.23 mg/mL con este reactor y en el previo fue de 5.93 mg/mL. Como ya se mencionó más arriba, la diferencia entre estos puntos máximos es de aproximadamente 24 h, uno de los posibles factores que afectaron en esta fermentación es que no hubo un correcto control de la temperatura. En reactor de tanque agitado se controlaba la temperatura con una bomba de temperatura controlada que circulaba el agua por toda la superficie del tanque, mientras que en este caso se utilizaba un calentador en la corona al centro del tubo interno del reactor por lo que es posible que la temperatura no estuviera distribuida uniformemente por lo que en el fondo del reactor no se pudiera generar una fermentación adecuada.

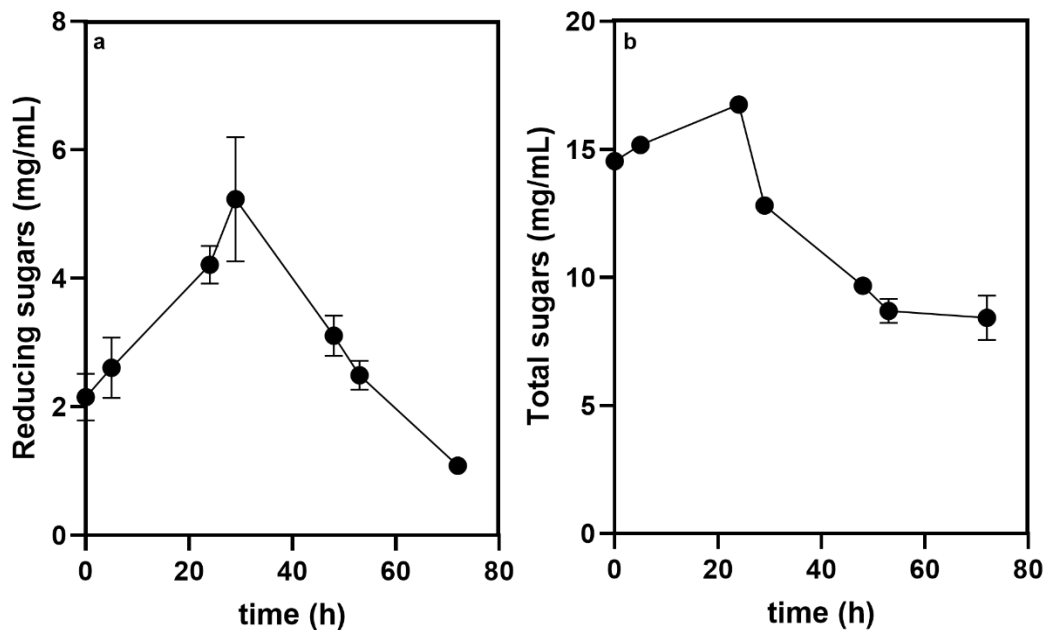


FIGURA 29. CURVA DE UTILIZACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES (A) Y TOTALES (B) CON RESPECTO AL TIEMPO PARA PARA UNA FERMENTACIÓN EN EL REACTOR AIR LIFT.

Con relación a la concentración de azúcares totales (**figura 29b**) esta comenzó en un valor de 14.54 mg/mL para posteriormente incrementar a las 24 h a 16.75 mg/mL. Esta concentración es similar a la obtenida con el reactor de tanque agitado para la

misma composición del medio, la cual fue de 17.35 mg/mL. La diferencia de tiempo se puede deber a que al tomar la muestra del tiempo 0 h no se esperó a que estuviera bien homogeneizado. Esto es posible puesto que en un principio la bomba que introducía el oxígeno al reactor Airlift no era capaz de generar una corriente de aire que mezclara el cultivo debido a la densidad del nejayote. Por lo que hasta que el hongo filamentoso consumió los sólidos presentes, estos ya permitieron el libre movimiento del cultivo.

Adicionalmente a lo antes mencionado la concentración final de azúcares totales fue de 8.43 mg/mL, dicha concentración es similar a la obtenida en la fermentación de tanque agitado para esta composición (**figura 25**), por lo que a pesar de no haber producido la misma concentración de biomasa si se consumió la misma cantidad de azúcares en el medio. Por ende, se puede suponer que la producción se vio afectada por el tipo de reactor utilizado. Sin embargo, no quiere decir que el reactor Airlift no pueda utilizarse para la producción de biomasa, sino que se requiere hacer más pruebas en reactores de este tipo.

- Oxígeno disuelto

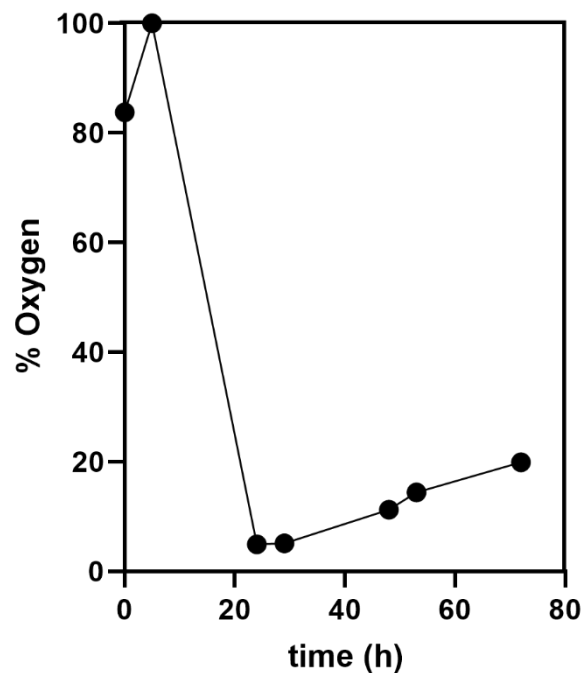


FIGURA 30. CURVA DE OXÍGENO DISUELTO EN EL MEDIO CON RESPECTO AL TIEMPO EN UNA FERMENTACIÓN EN EL REACTOR AIR LIFT.

Para finalizar en la medición del oxígeno disuelto, se puede observar en la **figura 30** que una de las ventajas para utilizar este tipo de reactor es el incremento de oxígeno disuelto en el medio. En un inicio el oxígeno disuelto fue de cercano al 80% para incrementar a las 5 h al 100%, este incremento como ya se mencionó anteriormente se pudo deber a que en un inicio el cultivo no se podía mezclar adecuadamente. A continuación, presentó un decremento al 4% a las 24 h, el cual continuó por 5 h más, para posteriormente incrementar en las 43 h restantes. Esto nos indica que el crecimiento del hongo tuvo un periodo más corto que el reportado anteriormente, que como ya se mencionó la razón más probable es que el hongo no contaba con las mejores condiciones de crecimiento, entre ellas el oxígeno, por lo que no pudo desarrollarse adecuadamente.

- Actividad enzimática

Cuando se analizó la actividad enzimática esta arrojó resultados negativos para la actividad amilolítica y xilanolítica. Por lo que indica que no hubo producción de dichas enzimas. Es probable que se obtengan otro tipo de resultados si se utiliza otro reactor, ya que el diseño ampliado de este se utiliza en la industria para la producción de SCP.

#### 5.4 Imágenes obtenidas en diferentes periodos de tiempo

El estado morfológico de los hongos filamentosos tiene un gran impacto en el rendimiento del proceso en un biorreactor. Morfología, fisiología y productividad de hongos filamentosos están influenciados por parámetros de proceso en muchos niveles (Ehgartner, 2017). La conformación macromolecular de la biomasa de los hongos filamentosos nos indica el estado fisiológico, además de reflejar la influencia de las condiciones de cultivo en los mecanismos de regulación celular (Grube et al., 1999). En cultivos sumergidos, muchos hongos filamentosos aparecen como micelios libremente dispersos (a menudo llamados elementos hifales), agrupados o como pellets, que son aglomerados esféricos de varios elementos hifales (Jin et al., 1999). Por lo antes mencionado, además del procesamiento de las muestras para

las diferentes metodologías antes descritas, se tomaron muestras de la biomasa producida en las tres composiciones del medio utilizadas en el biorreactor de tanque agitado y se realizaron las fermentaciones correspondientes.

#### 5.4.1 Fermentación en biorreactor de tanque agitado con capacidad de 5 L.

Durante las distintas fermentaciones se observó un crecimiento diferente para cada una. Comenzando con el medio  $H_2O + (NH_4)_2SO_4 + 2\%$  de melaza (**figura 31**), este medio generó un crecimiento de *A. oryzae* en forma de pellets, esta morfología no es la deseada para la producción de biomasa que se espera utilizar en la dieta humana. Debido a que la naturaleza filamentosa del hongo da a los productos a base de micoproteína una masticación y succulencia similar a la carne y facilita la fabricación de productos de micoproteína de diferentes texturas y formas; además de facilitar un proceso de texturización si se requiere. Por otro lado, esta morfología puede ser un factor que afectó el crecimiento de *A. oryzae* debido a que ésta presenta una disminución de la tasa de crecimiento microbiano causada por la limitación de oxígeno y/u otros nutrientes transferidos a las partes interiores de los gránulos miceliares (pellets) (Van Suijdam et al., 1980).

Sin embargo, los pellets pueden ser atractivos en el procesamiento industrial como una forma alternativa de crecimiento para el cultivo de hongos filamentosos. Se han favorecido los pellets de micelio para la producción comercial de una serie de compuestos, incluidos ácidos cítricos, micelios de hongos, enzimas y antibióticos (Braus & Vecht-Lifshitz, 1991). Otra aplicación de los pellets miceliales es el uso como materiales portadores de enzimas inmovilizadas, donde pueden proporcionar un mejor material de partida para crear un proceso continuo estable (Van Suijdam & van Metz, 1981). Existen dos tipos de pellets, coagulante y no coagulante, de acuerdo con la literatura *A. oryzae* produce pellets del tipo coagulante (Veiter et al., 2018). En el tipo coagulante, las esporas se agregan rápidamente y posteriormente germinan involucrando el crecimiento de la punta hifal (Zhang & Zhang, 2016). Este comportamiento se observa perfectamente en la **figura 31** a las 24 h con el aumento a 40x.

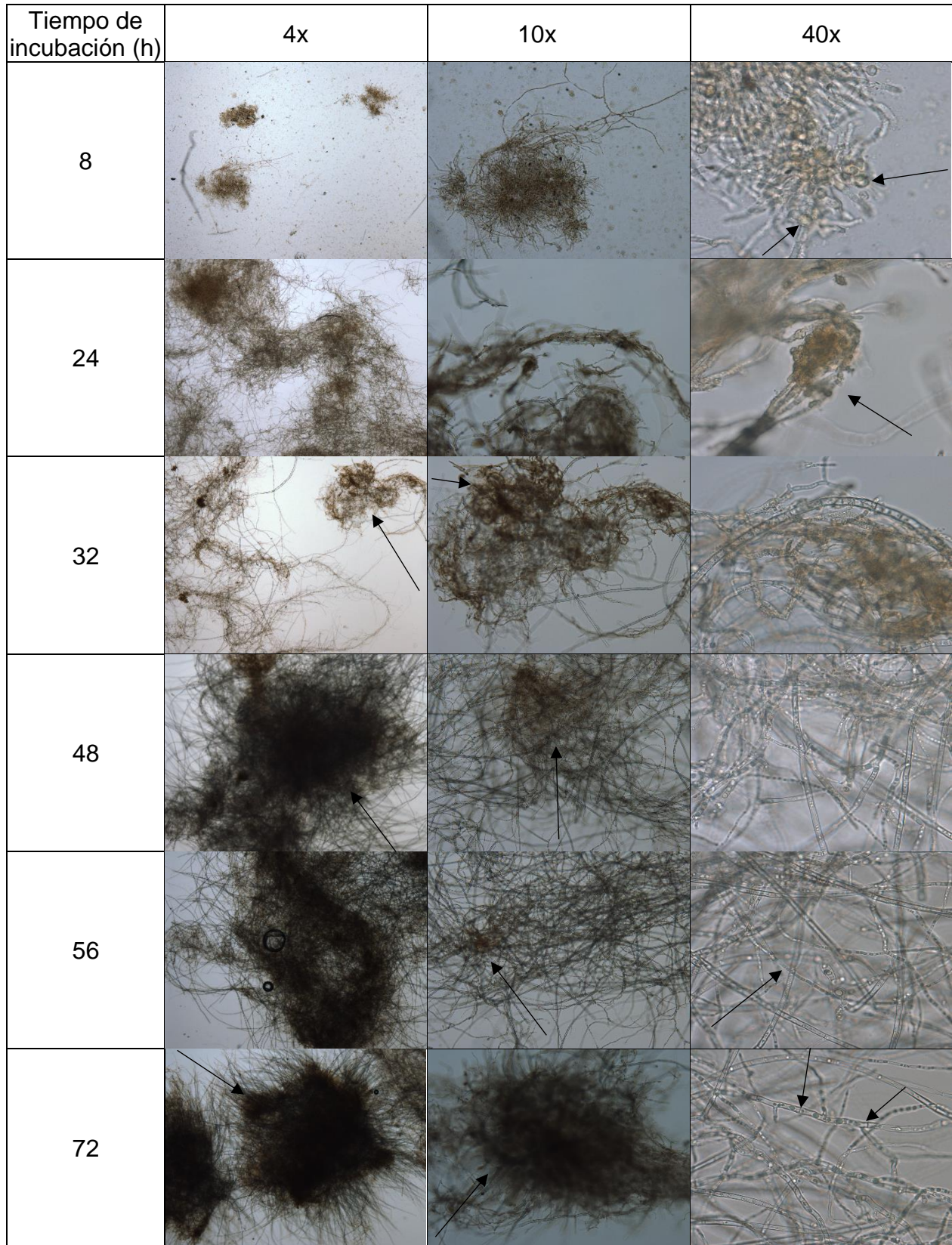


FIGURA 31. IMÁGENES DEL CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EN EL BIORREACTOR DE 3 L CON EL MEDIO H<sub>2</sub>O + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 2% DE MELAZA.



A pesar de observar la morfología macroscópica en forma de pellet para esta composición, en la **figura 31** con un aumento de 4x y 10x se observa cómo con el paso del tiempo los pellets se comienzan a hacer más grandes y densos, esto como ya se mencionó anteriormente resulta en problemas de difusión de sustratos y productos, lo que lleva a un crecimiento lento y baja productividad (Haack et al., 2006). Lo anterior corresponde con la producción de biomasa descrita en la **figura 23a**, en donde indica que, de las tres composiciones analizadas, esta fue la última en alcanzar su concentración máxima y dicha concentración fue la menor de todas. En el aumento de 40x se observó que germinaban las hifas a partir de las esporas inicialmente añadidas y con el paso del tiempo se volvieron hifas con septos.

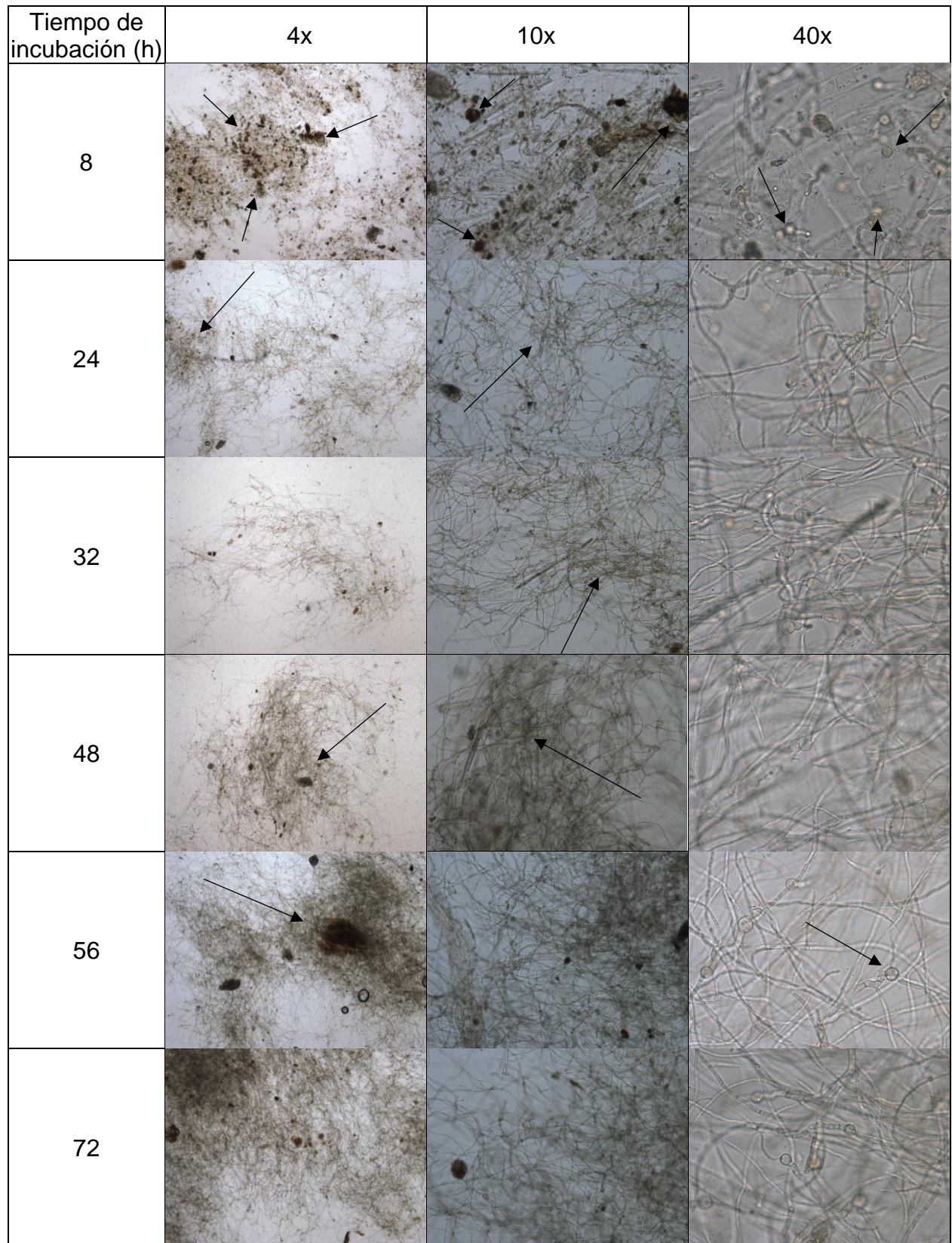


FIGURA 32. IMÁGENES DEL CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EN EL BIORREACTOR DE 3 L CON EL MEDIO NEJAYOTE +  $(NH_4)_2SO_4$  + 2% DE MELAZA

Para el medio con nejayote,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 2% de melaza se observó otro tipo de crecimiento donde las hifas se encontraban agrupadas, pero en forma de micelio difuso. En la **figura 32** a las 8 h en un aumento de 4x y 10x se observan en su mayoría los sólidos inherentes al nejayote, aunque en 40x se observan esporas germinadas con una longitud de la hifa poco considerable. A partir de las 24 h se aprecian las hifas aglomeradas entre sí, formando un tipo red sin restringir la difusión del oxígeno y del sustrato (aumento 4x y 10x).

Este tipo de crecimiento es el deseado para muchos procesos, ya que permite que casi todas las hifas individuales estén en contacto con el medio. Sin embargo, aumenta la viscosidad del medio de cultivo, la cual reduce la transferencia de oxígeno y nutrientes, y se puede envolver alrededor de los impulsores, causar bloqueos y diseminarse en las líneas de muestreo y desbordamiento (Van Metz & Kossen, 1977; Maitard & Riba, 1988), situaciones que como ya mencionamos, sucedieron. Otra diferencia que se observó fue que las hifas se encontraban intactas durante todo el tiempo de fermentación mientras que con los pellets a las 48 h se comenzaron a generar rupturas. Estas imágenes también nos indican el tiempo en que la biomasa reportada en la **figura 23a** corresponde únicamente a la producción de biomasa, ya que como se ha mencionado este resultado se obtuvo por una diferencia de peso.

Finalmente, en el medio con nejayote y amonio *A. oryzae* se desarrolló se forma muy diferente que en los anteriores medios de cultivo (**figura 33**). En este caso el desarrollo de las esporas fue antes de las 8 h y produjeron hifas dispersas, ya que en todas las imágenes a 40x se observan hifas “aisladas” o libremente dispersas, nunca entrelazadas. Además, se contempla en los aumentos a 4x y a 10x cómo disminuyen los sólidos presentes en el medio y cómo se incrementan estas hifas. Sin embargo, hasta las 72 h es cuando los sólidos son casi nulos, por lo que se puede suponer que la biomasa reportada en la **figura 23a** no es constante durante todo el periodo que dura la fermentación. Más bien la masa filtrada se mantiene constante ya que la relación es inversamente proporcional y la biomasa producida incrementa conforme disminuyen los sólidos presentes en el nejayote.

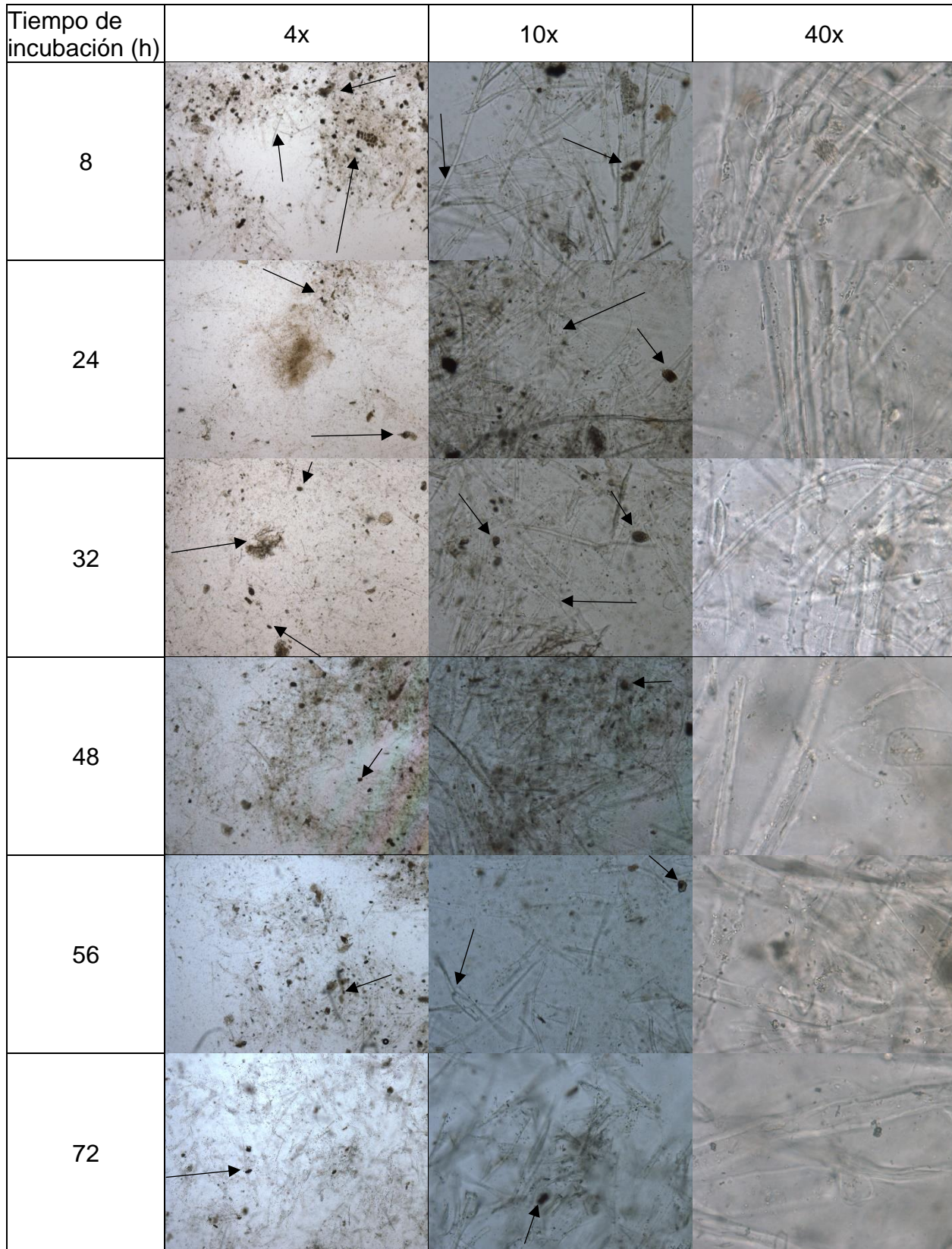


FIGURA 33. IMÁGENES DEL CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EN EL BIORREACTOR DE 3 L CON EL MEDIO NEJAYOTE +  $(NH_4)_2SO_4$

#### 5.4.2 Fermentación en matraz de 500 mL.

Como se mencionó anteriormente la morfología macroscópica de los hongos filamentosos en fermentaciones sumergidas pueden variar entre conglomerados, libremente dispersas o en pellets. No obstante, esta morfología puede variar entre una fermentación en matraz y en un reactor. Al realizar la fermentación en matraz del medio únicamente con melaza y amonio el hongo no produjo pellets (**figura 34**), como se observó en el reactor, pero si se observaron las hifas con septos (aumento 40x).

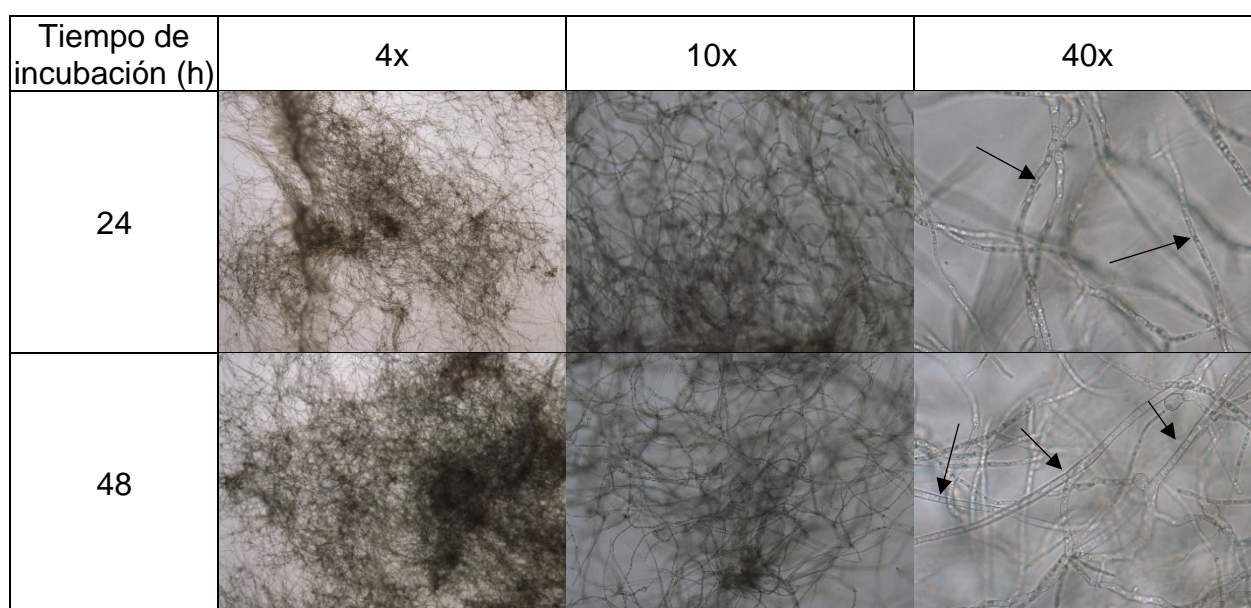
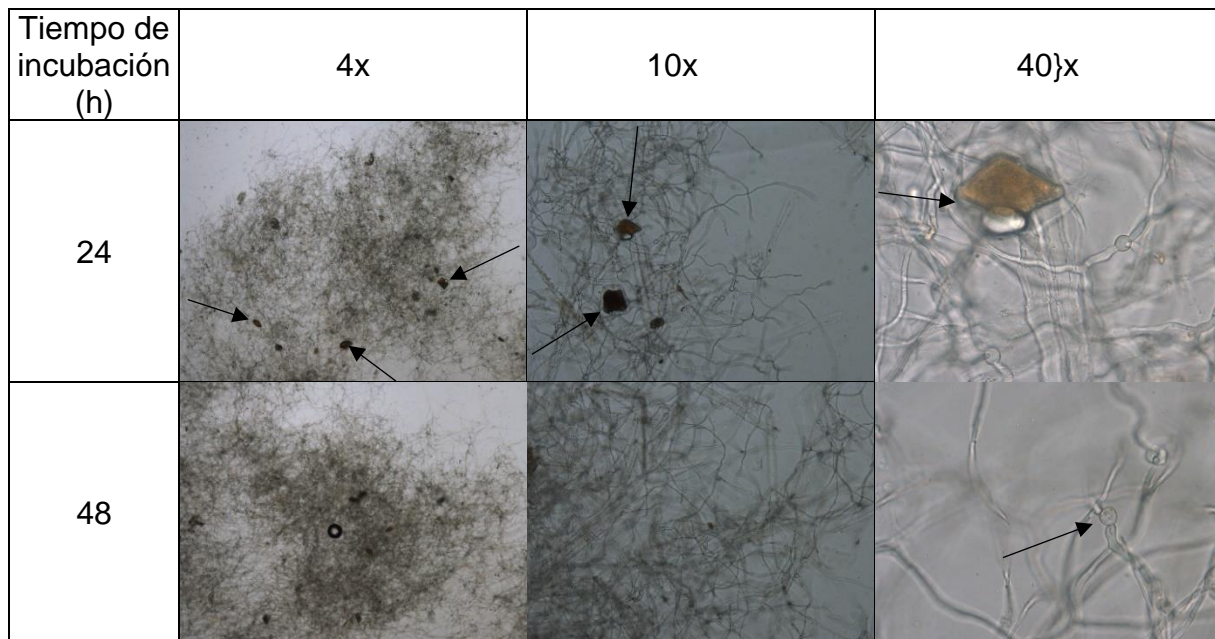


FIGURA 34. IMÁGENES DEL CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EN MATRAZ CON EL MEDIO H<sub>2</sub>O + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 2% DE MELAZA

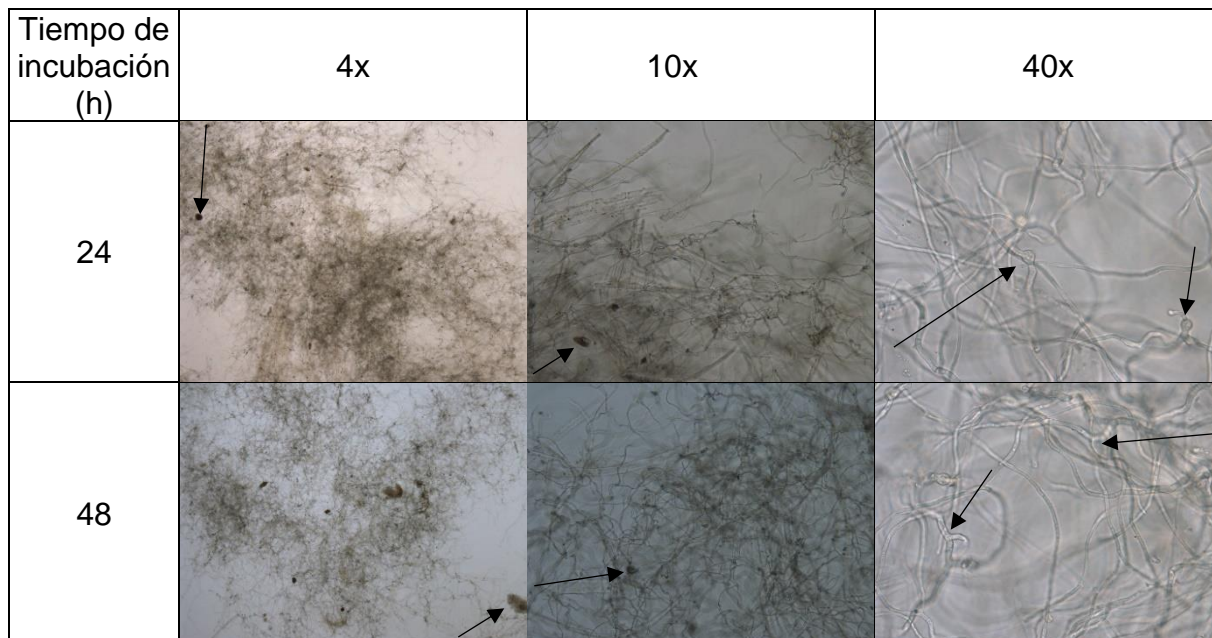
La electrostática, la hidrofobicidad y las interacciones entre los componentes de la pared de esporas son los principales desencadenantes de la formación de pellets (Zhang & Zhang, 2016). Las esporas fúngicas generalmente exhiben cargas superficiales negativas (Douglas et al., 1959) que se ven afectadas por el pH y la fuerza iónica (Akiba et al., 1994). Los valores de pH bajos favorecen la formación de estos pellets, por lo que los valores de pH más altos causan cargas negativas que a su vez disminuyen la agregación de esporas (Zhang & Zhang, 2016). En consecuencia, en la fermentación en matraz el pH no disminuye a valores muy

ácidos mientras que en el reactor el pH disminuyó a valores cercanos a 2 (**figura 23b**).



**FIGURA 35. IMÁGENES DEL CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EN MATRAZ CON EL MEDIO NEJAYOTE +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 2% DE MELAZA**

Para el medio con nejayote,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 2% de melaza el crecimiento fue el mismo que el observado en el reactor donde las hifas se encontraban agrupadas, pero en forma de micelio difuso. En la **figura 35** en un aumento de 4x y 10x se observa que los sólidos del nejayote se quedaron atrapados en la red formada por las hifas, no obstante, en 40x se aprecia que las esporas utilizaron los sólidos inherentes al nejayote como punto de partida para comenzar a desarrollarse. Al comparar el medio anterior y este, se aprecia que en este caso las hifas no presentan septos.



**FIGURA 36. IMÁGENES DEL CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EN MATRAZ CON EL MEDIO NEJAYOTE +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .**

Finalmente, en el medio únicamente con nejayote y amonio se observa que la morfología microscópica es diferente si se utiliza un matraz o un reactor. En el caso de la fermentación en matraz (**figura 36**) la morfología es muy similar al medio donde se le adiciona melaza al nejayote. En este caso se entrelazaron las hifas (aumento 40x) mientras que en el reactor se observaban hifas dispersas libremente. Otra diferencia observada es que en los aumentos a 4x y 10x no se aprecia la misma concentración de sólidos del nejayote que cuando se realiza una fermentación en el reactor de tanque de depósito agitado.

## 5.5 Análisis químico proximal de la biomasa producida en el biorreactor de tanque agitado de 3 L.

Los resultados obtenidos anteriormente indican que la mayor producción de biomasa fue con el medio nejayote +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 2% melaza, como ya se había supuesto, en un biorreactor de depósito agitado continuo con un volumen de trabajo de 3 L. La biomasa producida en el medio mencionado anteriormente se lavó con agua destilada y se liofilizó para posteriormente llevarla a un análisis químico proximal (AQP). El análisis químico de los alimentos comprende métodos de análisis básicos que permiten identificar la cantidad de nutrimentos que lo componen como son humedad, cenizas, proteína y grasa. La práctica de estos métodos varía según el alimento a analizar (Ronald et al., 1996). Para evaluar cada uno de los parámetros se utilizaron las técnicas oficiales de la AOAC, (Asociation of Oficial Analytical Chemists).

El análisis químico de la biomasa producida indica que esta contiene 26.35 g de proteína por cada 100 g de biomasa (**tabla 7**), este valor es mayor que cualquiera de los reportados en la literatura. Un artículo publicado por el Annual Research & Review in Biology (Okuskhanova et al., 2017) realizó un análisis de la composición química de carne de ganado y aves de corral, en el cual indica los siguientes valores para proteína: Cordero  $19.12 \pm 0.25$  %, cabra:  $22.07 \pm 0.36$  %, pavo (rojo):  $24.95 \pm 0.38$ % y pavo (blanco):  $25.84 \pm 0.47$  %. Adicionalmente Mamani-Linares & Gallo, 2011 comparaban otro tipo de carnes entre ellas la de bovino la cual reportó  $22.46 \pm 0.61$ % de proteína.

Otras fuentes de proteína comúnmente consumidas son huevo, cerdo, pollo y leche. En cuanto al contenido de proteína estos contienen 12 g/100g, 22 g/100 g, 22.2 g/100 g (Codony, 2002) respectivamente. De acuerdo con la NOM-155-SCFI-2012 “Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba” la leche debe contener como mínimo 30 g de proteínas propias de la leche por litro de leche y un mínimo de 24 g de caseína por litro (Diario Oficial de la Federación, 2012). Comparando los valores encontrados para las distintas fuentes de proteína comúnmente consumidas se observa que la biomasa producida



en el mejor medio de cultivo presenta una ventaja sobre la casi todas las fuentes de proteína que consume la población normalmente, excepto para la leche.

**TABLA 7. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA BIOMASA PRODUCIDA**

<b>Componente</b>	<b>Resultado (por cada 100g)</b>
<b>Humedad (g)</b>	5.00
<b>Cenizas (g)</b>	12.26
<b>Proteína* (g)</b>	26.35
<b>Grasa (g) (extracto etéreo)</b>	3.42
<b>Fibra dietética (g)</b>	43.59
<b>Carbohidratos digeribles totales** (g)</b>	9.37
<b>Contenido energético (kcal)</b>	173.69

\*Para cuantificar proteína determinada por Kjeldahl se empleó el factor 6.25

\*\*Los carbohidratos digeribles totales se cuantifican por diferencia (100- (%Humedad + %cenizas + %grasa + %proteína + %fibra dietética))

Otro beneficio de la biomasa producida es su alto contenido de fibra dietética, la cual es un elemento importante para una nutrición sana. En la Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2005, Servicios básicos de salud. Promoción y Educación para la Salud en Materia Alimentaria definen la fibra dietética como “la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y la absorción en el intestino humano y que sufren una fermentación total o parcial en el intestino grueso”. La fibra dietética incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y otras sustancias asociadas con las plantas. Se encuentra en leguminosas, cereales integrales, verduras y frutas y se les divide en solubles e insolubles. Epidemiológicamente su consumo insuficiente se ha asociado con la aparición de enfermedades crónicas. (Diario Oficial de la Federación, 2013).

El contenido de fibra dietética es de 43.59 g por cada 100 g de biomasa, dicho valor se encuentra por arriba del consumo recomendado. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), recomiendan una ingesta de 25 gramos de fibra dietética al día. En México, los adultos consumen entre 16 y 18 gramos de fibra al día, una cantidad mucho menor a la recomendada, de ahí la importancia de conocer qué es la fibra dietética (Secretaría de Salud, 2016).

Otra ganancia es su contenido de minerales el cual se mide con el contenido de cenizas, la biomasa cuenta con 12.26 g de ceniza/100 g, el cual es poco más de 10 veces el reportado para la carne de bovino con 1.19% (Mamani-Linares & Gallo, 2011). En cuestión de la grasa el valor obtenido para la biomasa fue de 3.42 %, este valor es ligeramente mayor que el contenido en los bovinos (2.27%) (Mamani-Linares & Gallo, 2011), en la cabra con 1.13% y en el pavo blanco con 2.06% (Okuskhanova et al., 2017), aunque este valor no es comparable con la reportada para cordero (12.79 %)(Okuskhanova et al., 2017), huevo (10.9 g/100 g) (Codony, 2002) y pollo (9.6 g/100 g) (Codony, 2002). Esto nos puede indicar que al momento de someter la biomasa a altas temperaturas puede que no produzca tantos sabores como otro tipo de fuentes.

## CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se logró producir biomasa por fermentación en medio líquido del hongo *A. oryzae* empleando nejayote y melaza de caña como fuentes de carbono. Al evaluar distintas variables (pH, fuente de nitrógeno y fuente de carbono), se concluyó que las mejores condiciones de crecimiento para el hongo son: pH ajustado entre 5-6,  $\text{NH}_4^+$  como fuente de nitrógeno y melaza como fuente de carbono debido a costos de producción. *A. oryzae* puede tener un crecimiento óptimo en un medio con nejayote sin diluir y logra producir una mayor cantidad de biomasa que si se utiliza el medio Pontecorvo.

El reactor que se encontró adecuado para esta fermentación fue el de tanque de agitación continua con capacidad de 5 L y un volumen de trabajo de 3 L. A pesar de la acumulación de micelio en la interfase, este biorreactor de tanque agitado fue en el que se produjo más biomasa. Únicamente el hongo produjo enzimas amilolíticas en el medio óptimo; amilasas que son de gran importancia para la industria alimenticia y otras áreas. Lo cual podría ayudar a comenzar una economía circular a partir de un residuo altamente contaminante que se produce en grandes cantidades en todo el país. Debido a que se generan productos de valor agregado como la micoproteína y las enzimas amilolíticas a partir de este residuo. Se estima una descarga mensual de promedio de 600,000 m<sup>3</sup> de nejayote, cifra equivalente al 15% de las descargas residuales municipales en todo el país (Ríos, 2020).

Es importante mencionar que el medio líquido resultante ya no genera una alta demanda de oxígeno debido a que el hongo utilizó los nutrientes presentes para su crecimiento. Esto podría ayudar a disminuir las descargas altamente contaminantes del nejayote a los cuerpos de agua. Adicionalmente se puede aplicar un tratamiento al medio resultante para limpiar y recuperar el agua y así evitar su desperdicio.

La biomasa producida puede utilizarse como proteína unicelular para consumo humano, por su elevado contenido de proteína. También presenta otros beneficios como su importante contenido de fibra dietética y de minerales. Sin embargo, se

deben realizar los estudios correspondientes para conocer su efecto en el ser humano.

Hasta el momento la producción de biomasa con este hongo en específico se debe de realizar en un reactor de tanque agitado. Sin embargo, se debe realizar otra prueba en otro diseño de Air Lift diseñado específicamente para este propósito, porque actualmente este tipo de reactor se utiliza para la producción de Quorn™ en el mercado. Diseño que ayudaría a evitar las acumulaciones de biomasa en la interfase (aire-medio), además de optimizar el proceso de producción.

## CAPÍTULO 7. REFERENCIAS

- AB Enzymes Inc. (2020). GRAS Notification of a Pectin Esterase from a Genetically Modified *Aspergillus oryzae*. *Pectin esterase (IUBMB 3.1.1.11) from a Genetically modified Aspergillus oryzae* (págs. 54-59). Plantation, Florida: ABF Ingredients company.
- Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F., & Machida, M. (2006). Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia*, 162, 143–153.
- Acosta-Estrada, B., Lazo-Vélez, M., Nava-Valdez, Y., Gutiérrez-Urbe, J., & Serna-Saldívar, S. (2014). Improvement of dietary fiber, ferulic acid and calcium contents in pan bread enriched with nejayote food additive from white maize (*Zea mays*). *J. Cereal Sci.*, 60, 264–269.
- Agama-Acevedo, E., Juárez-García, E., Evangelista-Lozano, S., Rosales-Reynoso, O. L., & Bello-Pérez, L. A. (2013). Características del almidón de maíz y relación con las enzimas de su biosíntesis. *Agrociencia*, 47(1), 01-12.
- Akiba, T., Nishi, A., Takaoki, M., Nagaoka, S., & Tomita, F. (1994). Electrophoretic free mobility and viability of microbial cells: a preliminary study in preparation for space experiments. *Appl Theor Electrophor*, 4(2), 65–69.
- Allman, T. (2019). Bioreactors: Design, Operation, and Applications. En E. M. El-Mansi, J. Nielsen, D. Mousdale, & R. P. Carlson, *Fermentation Microbiology and Biotechnology, Fourth Edition* (págs. 283-308). Boca Ratón, Florida: CRC Press.
- Arredondo Vega, B. O. (2007). CAPÍTULO 2 CONCENTRACIÓN, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO. En D. VOLTOLINA, *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal* (págs. 21-29). La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

- Ayala-Soto, F., Serna-Salivar, S., García-Lara, S., & Pérez-Carrillo, E. (2014). Hydroxycinnamic acids, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources. *Food Hydrocolloids*, 471-475.
- Babu, K., & Satyanarayana, T. (1996). Production of Bacterial Enzymes by Solid State Fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 55, 464-467.
- Bajpai, P. (2014). Chapter 1 - Introduction. En P. Bajpai, *Xylanolytic Enzymes* (págs. 1-7). Academic Press.
- Balakrishnan, M., Jeevarathinam, G., Kumar, S., Muniraj, I., & Uthandi, S. (2021). Optimization and scale-up of  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. *BMC Biotechnology*, 1-11.
- Bamberg, J. (2000). British Petroleum and Global Oil 1950-1975: The Challenge of Nationalism. *Cambridge: Cambridge University Press*.
- Barraco, M. (2014). *Caracterización de transportadores de Basidiomycotas mediante expresión heteróloga en Aspergillus nidulans*. Montevideo, Uruguay: Universidad de la República.
- Bekatorou, A., Psarianos, C., & Koutinas, A. (2006). Production of food grade yeasts. *Food Technol. Biotechnol.*, 44, 407-415.
- Benassi, V., Lucas, R., Michelin, M., Jorge, J., Terenzi, H., & Polizeli, M. (2012). Production and action of an *Aspergillus phoenicis* enzymatic pool using different carbon sources. *Brazilian Journal of food technology*, 15(3), 253-260.
- Bhalla, T., Sharma, N., & Sharma, M. (2007). *Production of Metabolites, Industrial Enzymes, Amino Acid, Organic Acids, Antibiotics, Vitamins and Single Cell Protein*. India: National Science Digital Library.

- Binkley, W., & Wolform, M. (1953). Composition of Cane Juice and Cane Final Molasses. *Academic Press*, 8, 291-314.
- Blanco-Gómez, E., Sánchez-González, E., Valladares, M., & Olvera, C. (2008). Identificación de microorganismos aislados del nejayote. *Revista salud pública y nutrición*, 13, 1-5.
- Braus, S., & Vecht-Lifshitz, S. E. (1991). Mycelial morphology and metabolite production. *TIBTECH*, 9, 63–8.
- Carlsen, M., & Nielsen, J. (2001). Influence of carbon source on  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57, 346–349. doi:10.1007/s002530100772
- Carrera, E., Figueroa, J., Arámbula-Villa, G., Martínez-Flores, H., Jiménez-Sandoval, S., & Luna-Barcenas, G. (2012). New ecological nixtamalisation process for tortilla production and its impact on the chemical properties of whole corn flour and wastewater effluents. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 564-571.
- Castro, C., Navas, C., Caro, O., & Piñeros, Y. (2006). Obtención de amilasas fúngicas a partir de *Aspergillus* sp. aislado de semillas de lentejas. *Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano*, 1-5.
- Castro-Muñoz, R., & Yáñez-Fernández, J. (2015). Valorization of nixtamalization wastewaters (nejayote) by integrated membrane process. *Food and Bioproducts Processing*, 95, 7-18. doi:10.1016/j.fbp.2015.03.006
- Codony, R. (2002). Composición y valor nutritivo del huevo. En .. Consejo asesor del instituto de estudios del huevo, *LECCIONES SOBRE EL HUEVO* (págs. 155-164). Madrid: Instituto de Estudios del Huevo.
- Copetti, M. (2019). Fungi as industrial producers of food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 25, 52–56. doi:https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.006

- Crawford , N. M., & Forde , B. G. (2002). *Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition*. (C. R. Somerville , & E. M. Meyerowitz , Edits.) doi:/10.1199/tab.0011
- Cura Global Health, Inc. (2018). Generally Recognized As Safe (GRAS) Determination for the Intended Use of Koji Fermented Mineral Products (Koji Mineral). *Koji Fermented Mineral Products GRAS* (pág. 33). Port Royal Virginia: JHeimbach LLC.
- Deerr, N. (1945). *Intern. Sugar J.*, 47, 123.
- Diario Oficial de la Federación. (2012). *NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba*. Recuperado el 23 de Junio de 2023, de <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4692/seeco/seeco.htm>
- Diario Oficial de la Federación. (22 de Enero de 2013). *Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación*. Obtenido de Marco normativo, CNDH: <https://www.cndh.org.mx/DocTR/2016/JUR/A70/01/JUR-20170331-NOR37.pdf>
- Douglas, H., Collins, A., & Parkinson, D. (1959). Electric charge and other surface properties of some fungal spores. *Biochim Biophys Acta*, 33(2), 535–538.
- Ehgartner, D. (2017). *A comprehensive analytical and process-technological toolbox for improved penicillin production*. Vienna: Vienna University of Technology.
- EL CRISOL S.A. DE C.V. (2023). *El crisol*. Obtenido de <https://elcrisol.com.mx/>
- EI-Enshasy, H. (2007). Filamentous fungal cultures – process characteristics, products, and applications. Bioprocessing for value-added products from renewable resources new technologies and applications. *Elsevier*, 225-261.



- Elyasi Far, B., Ahmadi, Y., Yari Khosroshahi, A., & Dilmaghani, A. (2020). Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(3), 350-358.
- EPA. (1997). Final risk assessment of *Aspergillus oryzae*.
- Escalante-Aburto, A., Ramírez-Wong, B., Torres-Chávez, P., Barrón-Hoyos, J., Figueroa-Cárdenas, J., & López- Cervantes, J. (2013). The nixtamalization process and its effect on anthocyanin content of pigmented maize, a review. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(4), 429-437.
- Espinosa, R., Tago, D., & Treich, N. (2020). Infectious Diseases and Meat Production. *Environ Resour Econ (Dordr)*, 76(4), 1019-1044. doi:10.1007/s10640-020-00484-3
- Estrada-Salazar, G. I., & Ramírez-Galeano, M. C. (2019). *MICOLOGÍA GENERAL*. Manizales, Caldas · Colombia: Centro Editorial Universidad Católica de Manizales.
- Evans, G., & Furlong, J. (2003). Environmental Biotechnology: Theory and Application. England: John Wiley & Sons Ltd.
- Ezemba, C., Ekwegbalu, E., & Ezemba, A. (2022). FERMENTATION, TYPES OF FERMENTERS, DESIGN & USES OF FERMENTERS AND OPTIMZATION OF FERMENTATION PROCESS. 1-25.
- Fajardo Castillo, E., & Sarmiento Forero, S. (2007). *Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. Bogota, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- FAO\_WHO. (1987). Committee on Food Additives 31. *World Health Organization Technical Report Series*. Ginebra.
- Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of  $\alpha$ -amylase: a review. *Archives of*

*Microbiology*, 203, 1281–1292. doi:<https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y>

Faust, U. (1987). Production of microbial biomass. En P. Prave, U. Faust, W. Sittig, & D. Sukatsch, *Fundamentals of biotechnology* (págs. 601-22). Weinheim: VCH Publishers.

Fernández Méndez, Á. (2018). *Estrategia de Suplementación con Base en el Uso de la Melaza en Ovinos Alimentados con Forraje de Baja Calidad*. Villaflores, Chiapas: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS.

Fernández-Muñoz, J., San Martín-Martínez, E., Díaz- Góngora, J., Calderón, A., Alvarado-Escobar, A., Ortiz-Cárdenas, H., & Leal-Pérez, M. (2006). Steeping time and cooking temperature dependence of calcium ion diffusion during microwave nixtamalization of corn. *Journal of Food Engineering*, 76, 568-572. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.06.004

Finnigan, T. (2012). Mycoprotein: origins, production and properties. *Handbook of food proteins*, 335–352.

Finnigan, T., Needham, L., & Abbott, C. (2017). Mycoprotein: A Healthy New Protein With a Low Environmental Impact. En S. Nadathur, J. Wanasundara, & L. Scanlin, *Sustainable Protein Sources* (págs. 305-325). North Yorkshire, United Kingdom: Academic Press.

Gamarra Castillo, O. J. (2021). *Optimización del proceso de producción de biomasa fúngica para la obtención de micoproteína (Aspergillus oryzae)*. Bogotá, Colombia: Universidad de los Andes.

García, A. (14 de febrero de 2023). *Inflación en México: En enero 2023 la canasta básica alimentaria fue 11% más cara que el enero pasado*. Recuperado el 12 de marzo de 2023, de El Economista Web site: <https://www.economista.com.mx/economia/Inflacion-en-Mexico-En-enero-2023-la-canasta-basica-alimentaria-fue-11-mas-cara-que-el-enero-pasado--20230214-0041.html>

- Gee, C., Holton, J., & McPherson, A. (2021). Structures of two novel crystal forms of *Aspergillus oryzae* alpha amylase (taka-amylase). *J Biosci Bioeng*, 131(6), 605-612.
- Ghildyal, N. P., Lonsane, B. K., & Karanth, N. G. (1988). Foam Control in Submerged Fermentation: State of the Art. *ADVANCES IN APPLIED MICROBIOLOGY*, 173-222.
- Gómez Rojas, M., Arboleda Valencia, J., & Mosquera Martínez, O. (2021). Género *Aspergillus*: fuente potencial de péptidos bioactivos. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 17(1), 73-89.
- Gomi, K. (2014). *Aspergillus oryzae*. Elsevier Ltd., Tohoku University, Sendai, Japan, 92-96.
- Gomi, K. (2019). Regulatory mechanisms for amylolytic gene expression in the koji mold *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(8), 1385-1401. doi:10.1080/09168451.2019.1625265
- González, R., Reguera, E., Figueroa, J., & Martínez, J. (2003). Study of the Influence of nejayote and other additives on the cohesive strength and electric properties of black agglomerates. *Journal of Applied Polymer Science*, 90(14), 3965-3972. doi:10.1002/app.13098
- Gour, S., Mathur, N., Singh, A., & Bhatnagar, P. (2015). Single Cell Protein Production: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(9), 251-262.
- Griffin, D. (1994). *Fungal Physiology*. Nueva York: WILEY-LISS.
- Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C., van Dijck, P. W., & Wyss, M. (2014). *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit. rev. Microbiol.*, 40, 187–206.

- Grube, M., Zagreba, E., Gromozova, E., & Fomina, M. (1999). Comparative investigation of the macromolecular composition of mycelia forms *Thielavia terrestris* by infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 301–306.
- Gustav, H. H., Lübeck, M., Frisvad, J. C., Lübec, P. S., & Andersen, B. (2015). Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 50, 1327–1341.
- Gutiérrez-Urbe, J., Rojas-García, C., García-Lara, S., & Serna-Saldivar, S. (2010). Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize processed into masa for tortillas. *J. Cereal Sci.*, 52, 410–416.
- Haack, M. B., Olsson, L., Hansen, K., & Eliasson Lantz, A. (2006). Change in hyphal morphology of *Aspergillus oryzae* during fed-batch cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70, 482–487.
- Hajoori, M., & Shah, U. (2022). Production of Single Cell Protein from Fruit Waste. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET)*, 1311-1317.
- Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), 301-306.
- Hou, Y., & Wu, G. (2018). Nutritionally Essential Amino Acids. *Adv Nutr*, 9(6), 849-851.
- Hou, Y., Yin, Y., & Wu, G. (2015). Dietary essentiality of "nutritionally non-essential amino acids" for animals and humans. *Exp Biol Med*, 240(8), 997-1007.
- Howitt, S. M., & Udvardi, M. K. (2000). Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1465, 152-170.
- Hüttner, S., Johansson, A., Gonçalves Teixeira, P., Achterberg, P., & Nair, R. (2020). Recent advances in the intellectual property landscape of filamentous fungi.

*Fungal Biology and Biotechnology*, 7(1), 1–17.  
doi:<https://doi.org/10.1186/s40694-020-00106-z>

INEGI. (2020). *Cuéntame de México*. Recuperado el 12 de marzo de 2023, de <https://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/habitantes.aspx?tema=P>

Israelidis, C. J. (2003). Nutrition-Single cell protein, twenty years later. *Proceedings from First Biointernational Conference*.

Jaganmohan, P., Purushottam, B., & Prasad, S. (2013). Production of SCP with *Aspergillus terreus* using Solid State fermentation. *Eur. J. Biol. Sci.*, 5(2), 38-45.

Jin, B., (Hans) van Leeuwen, J., & Patel, B. (1999). Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*, 34(4), 335-340.

Johnson, E. A. (2013). Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts – the ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 503–517.

Krull, R., Wucherpfennig, T., Esfandabadi, M., Walisko, R., Melzer, G., & Hempel, D. (2013). Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J Biotechnol*, 163, 112-123.

Lemnaro, J., Vikas, K., Jasleen, K., Satish, K., & Harminder, S. (2021). Composition, valorization and therapeutical potential of molasses: a critical review. *Environmental Technology Reviews*, 10(1), 131-142.  
doi:10.1080/21622515.2021.1892203

Lopez-Martinez, L., Oliart-Ros, R., Valerio-Alfaro, G., Lee, C., Parkin, K., & Garcia, H. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT – Food Sci. Technol.*, 42, 1187–1192.

Loque, D., & von Wiren, N. (2004). Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J. Exp. Bot.*, 55, 1293-1305.

- Maitard, A., & Riba, J. P. (1988). Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC26036 cultivated at several shear rates. *Biotechnology and Bioengineering*, 32, 835–40.
- Mamani-Linares, L. W., & Gallo, C. (2011). Composición química y calidad instrumental de carne de bovino, llama (lama glama) y caballo bajo un sistema de crianza extensiva. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(4), 301-311.
- Manrique-Hernandez, L. F. (2020). *Sustitución del Aspergillus oryzae por las enzimas alfa amilasa y glucoamilasa en la elaboración de SAKE*. Pamplona: Universidad de Pamplona – Facultad de Ingenieras y Arquitectura.
- Marini, A., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., & Andre, B. (1997). A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 4282-4293.
- Martin, M. (1991). Bioconversion of waste materials to industrial products. *Elsevier Applied science*, 7, 44-190.
- Mateles, R., & Tannenbaum, S. (1968). *Single cell protein*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Medina, N., Millán, C., Lizardi, J., Rascon, C., Marquez, E., & López, M. (2009). Maize Processing Waste Water Arabinoxylans: Gelling Capability And Cross-Linking Content. *Food Chemistry*, 115, 1286-1290.
- Méndez-Montealvo, G., García-Suárez, F., Paredes-López, O., & Bello-Pérez, L. (2008). Effect of nixtamalization on morphological and rheological characteristics of maize starch. *J. Cereal Sci.*, 48, 420-425.
- Meyer, V., Basenko, E., Benz, J., Braus, G., Caddick, M., Csukai, M., & ... & Wösten, H. A. (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biology Biotechnology*, 1-23.

- Miranda Olarte, S. M., & Moreno Díaz, N. M. (2005). *Extracción de la enzima amilasa fúngica a partir del Aspergillus oryzae para aplicarla en harina de procesos de panificación*. Bogotá: Universidad de La Salle. Facultad de Ingeniería.
- Montaño-Arias, N. M., Camargo-Ricalde, S. L., Sánchez-Yáñez, J. M., & Sandoval-Peréz, A. L. (febrero-abril de 2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Elementos: Ciencia y cultura*, 17(77), 15-23.
- Moreano Pilatasig, M. M. (2015). *DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES Y SU RELACIÓN CON CARBOHIDRATOS NO ABSORBIDOS EN NIÑOS (A) DEL CENTRO DE EDUCACIÓN INICIAL "MARÍA MONTESSORI" DEL CANTÓN LATACUNGA EN EL PERÍODO 2014- 2015*. Ambato, Ecuador: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.
- Naciones Unidas, U. (2005). Glosario de Términos Ambientales, citado por COMUNIDAD ANDINA. *Manual de Estadísticas Ambientales*, 31-45.
- Narikawa, T., Shinoyama, H., & Fujii, T. (2009). A b-rutinosidase from *Penicillium rugulosum* IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 1317–1319.
- Nasseri, A., Rasoul-Amini, S., Moromvat, M., & Ghasemi, Y. (2011). Production of single cell protein from fruits waste. *Am. J. Food Technol.*, 6(2), 103-116.
- NCBI. (s.f.). *Aspergillus oryzae*. Recuperado el 17 de abril de 2023, de National Center for Biotechnology Information: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Aspergillus%20oryzae\[Organism\]&cmd=DetailsSearch](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Aspergillus%20oryzae[Organism]&cmd=DetailsSearch)
- Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Lizardi, J., Rascon-Chu, A., Márquez-Escalante, J., Gardea, A., . . . Guerrero, V. (2009). Maize processing waste water arabinoxylans: Gelling capability and cross-linking content. *Food Chemistry*, 115(4), 1286-1290. doi:10.1016/j.foodchem.2009.01.046

- OECD. (1992). *Safety Considerations for Biotechnology*. With assistance of Organisation for Economic Cooperation and Development.
- Okafor, N., & Okeke, B. (2018). *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Okuskhanova, E., Rebezov, M., Yessimbekov, Z., Suychinov, A., Semenova, N., Rebezov, Y., . . . Zinina, O. (2017). Study of Water Binding Capacity, pH, Chemical Composition and Microstructure of Livestock Meat and Poultry. *Annual Research & Review in Biology*, 14(3), 1-7.
- Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochem*, 27(2), 109-117.
- Pandey, A. (1994). *Solid-state fermentation: an overview*. New Delhi, India: Wiley.
- Pandey, A., Soccol, C., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation. *Process Biochem*, 35, 1153-1169.
- Pandey, A., Soccol, C., Leo, J., & Nigam, P. (2001). Solid-state Fermentation in Biotechnology. *Asiatech Publishers, Inc.*, 221.
- Parajó, J., Santos, V., Domínguez, H., & Vázquez, M. (1995). NH<sub>4</sub>OH-based pretreatment for improving the nutritional quality of single cell protein. *Applied Biochem. Biotechnol.*, 55, 133-149.
- Paz-Samaniego, R., Carvajal-Millan, E., Brown-Bojorquez, F., Rascón-Chu, A., López-Franco, Y., Sotelo-Cruz, N., & Mendoza, J. (2015). Gelation of arabinoxylans from maize wastewater-effect of alkaline hydrolysis conditions on the gel rheology and microstructure. *Wastewater Treatment Engineering*, 101-114. doi:10.5772/61022
- Pereira, J. F., Lima, J. O., Rocha, R., Medina, P. X., Araújo, E., & Queiroz, M. (2003). Nitrato redutase em fungos filamentosos. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 74-85.



- Pérez-Guerra, N., Torrado-Agrasar, A., López-Macias, C., & Pastrana, L. (2003). Main characteristics and applications of solid fermentation. *J. Agric. Food Chem*, 2(3), 343-350.
- Pflugfelder, R. L., Rooney, L. W., & Waniska, R. D. (1988). Dry matter losses in commercial corn masa production. *Cereal Chemistry*, 65(2), 127-132.
- Pflugfelder, R. L., Rooney, L. W., & Waniska, R. D. (1988). Fractionation and composition of commercial corn masa. *Cereal Chem*, 65, 262-266.
- Pulido, R., Escárcega, C., & Durán-de Bazúa, C. (1987). Modelo cinético para reactores biológicos rotatorios usados en el tratamiento aerobio de efluentes líquidos de la industria del maíz. *Tecnología, Ciencia y Educación*, 2(1), 15-24.
- Ramírez, J., & Ayala, M. (2014). ENZIMAS: ¿QUÉ SON Y CÓMO FUNCIONAN? *Revista Digital Universitaria*, 15(12), 1-13.
- Ramírez, L. (2009). *CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA CLOROGENATO ESTERASA PRODUCIDA POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO SOBRE RESIDUOS DEL CAFÉ*. Guadalajara, Jal. : Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.
- Ramírez-Romero, G., Reyes-Velázquez, M., & Cruz-Guerrero, A. (2013). Estudio del nejayote como medio de crecimiento de probióticos y producción de bacteriocinas. *Rev. Mex. Ing. Quím.*, 12 (3), 463-471.
- Rasoul-Amini, S., Morowvat, M., Ghasemi, Y., & Nasser, A. (2011). Single Cell Protein: Production and Process. *American Journal of Food Technology*, 1-13.
- Ravindra y Anupama. (2000). Value added Food: single cell protein. *Biotechnol. Adv. J. Microbiol.*, 18, 459-479.
- Rehm, Reeb, y col. (1993). *Biotechnology*.

- Ríos, A. (2020). *Evaluación del nejayote para la obtención de biohidrógeno por fermentación en fase oscura*. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana .
- Rodríguez Pérez, S., Crescencia Arone, M., Soria Calzadillo, J., Aguilera Rodríguez, I., & Serrat Díaz, M. (2016). Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos. *AFINIDAD*, LXXIV, 577, 60-67.
- Ronald, S., Ronald, S., & Harold, E. (1996). *Composición y análisis de alimentos de Pearson*, (2ª ed.). México: Continental.
- Rose, A. (1981). The Microbiological Production of Food and Drink. *Scientific American* , 95-104.
- Rosentrater, K. (2006). A Review Of Corn Masa Processing Residues: Generation, Properties, And Potential Utilization. *Waste Management*, 26, 284-292.
- Rosentrater, K. A. (2006). A review of corn masa processing residues: Generation, properties, and potential utilization. *Waste Management*, 26(3), 284-292.
- Roth, F. (1980). Micro-organisms as a source of protein for animal nutrition. *Anim. Res. Dev.*, 12, 7-19.
- RUIZ, R. (2015). Búsqueda y selección de hongos filamentosos capaces de hidrolizar arabinosilanos presentes en el nejayote. *Memorias del XXXVI Encuentro Nacional de la AMIDIQ*, 1120-1123.
- Ruiz-Gutiérrez, M., Quintero-Ramos, A., Meléndez-Pizarro, C., Lardizábal-Gutiérrez, D., Márquez-Meléndez, R., & Talamás-Abbud, R. (2010). Changes in mass transfer, thermal and physicochemical properties during nixtamalization of corn with and without agitation at different temperatures. *Journal of Food Engineering*, 98(1), 76-83. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.12.010
- Scheel, C. (2016). Beyond sustainability. Transforming industrial zero-valued residues into increasing economic returns. *J. Clean Prod*, 131, 376-386.

Schenck, & Hebeda. (1992). Starch Hydrolysis Products. USA: VCH Publishers Inc.

Secretaría de Economía. (2002). *PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO - CEREALES – PARTE I: MAÍZ BLANCO PARA PROCESO ALCALINO PARA TORTILLAS DE MAÍZ Y PRODUCTOS DE MAÍZ NIXTAMALIZADO - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA*. Obtenido de NMX-FF-034/1-SCFI-2002: [https://sitios1.dif.gob.mx/alimentacion/docs/NMX-FF-034-1-SCFI-2002\\_MAIZ\\_blanco.pdf](https://sitios1.dif.gob.mx/alimentacion/docs/NMX-FF-034-1-SCFI-2002_MAIZ_blanco.pdf)

Secretaria de Salud. (09 de Julio de 2016). *¿Cuánta fibra dietética se debe consumir?* Obtenido de Gobierno de México: <https://www.gob.mx/salud/articulos/cuanta-fibra-dietetica-se-debe-consumir>

Silva, B., Souza, M., & Badiale-Furlong, E. (2020). Antioxidant and antifungal activity of phenolic compounds and their relation to aflatoxin B1 occurrence in soybeans (*Glycine max L.*). *J Sci Food Agric*, 1256-1264.

Solomon, S. (2011). Sugarcane by-products based industries in India. *Sugar Tech*, 13(4), 408-416.

Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2016). *Principles of fermentation technology*. Oxford, United Kingdom: Butterworth-Heinemann.

Suárez, K., Ponce, S., López, J., Cornejo, J., Oropeza, M., & López, E. (2016). Eco-friendly innovation for nejayote coagulation-flocculation process using chitosan: evaluation through zeta potential measurements. *Chem. Eng. J.*, 284(15), 536-542.

Suarez-Meraz, K., Ponce-Vargas, S., López-Maldonado, J., Cornejo-Bravo, J., Oropeza-Guzmán, M., & López-Maldonado, E. (2016). Eco-friendly innovation for nejayote coagulation-flocculation process using chitosan: Evaluation through zeta potential measurements. *Chemical Engineering Journal*, 284, 536-542. doi:10.1016/J.CEJ.2015.09.026

- Subramaniyam, R., & Vimala, R. (2012). Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances: A comparative Study. *Int. J. S. N.*, 3(3), 480-486.
- Sudan, S., Kumar, N., Kaur, I., & Sahni, G. (2018). Production, purification and characterization of raw starch hydrolyzing thermostable acidic alpha-amylase from hot springs. *Int J Biol Macromol*, 117, 831–9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.231>
- Taylor, M., & Richardson, T. (1979). Applications of microbial enzymes in food systems and in biotechnology. *Adv. Appl. Microbiol.*, 25, 7–35.
- Tang, J. (2020). Improved protease activity of pixian broad bean paste with cocultivation of *Aspergillus oryzae* QM-6 and *Aspergillus niger* QH-3. *Electron. J. Biotechnol*, 44, 33-40.
- Tannenbaum, S., & Wang, D. (1975). *Single cell protein, vol. II*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Téllez, V., López, J., Aragón, A., & Zayas, T. (2016). Application of nejayote as a foliar and edaphic fertiliser to native blue maize (*Zea mays* L.) crops. *American Journal of Plant Sciences*, 7, 2221-2238. doi:[10.4236/ajps.2016.715196](https://doi.org/10.4236/ajps.2016.715196)
- Thomas, G. H., Mullins, J. G., & Merrick, M. (2000a). Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Mol. Microbiol.*, 37, 331-344.
- Timberlake, K. (2013). *Química general orgánica y biológica : estructuras de la vida*. México: Pearson.
- Trejo-González, A., Feria-Morales, A., & Wild-Altamirano, C. (1982). The role of lime in the alkaline treatment of corn of tortilla preparation. *Advances in Chemistry*, 198, 245-263. doi:[10.1021/ba-1982-0198.ch009](https://doi.org/10.1021/ba-1982-0198.ch009)
- Ugalde, U., & Castrillo, J. (2002). Single cell proteins from fungi and yeasts. *Appl. Mycol. Biotechnol.*, 2, 123-149.

- Ullrich, W. R., Larsson, M., Larsson, C. M., Lesch, S., & Novacky, A. (1984). Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential change and inhibition of anion uptake. *Physiol. Plant*, 369-376.
- Vaidyanathan, S., Macaloney, G., Vaughan, J., McNeil, B., & Harvey, L. (1999). Monitoring of submerged bioprocesses. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 19, 277-316.
- Van Metz, B., & Kossen, N. W. (1977). Biotechnology Review: the growth of molds in the form of pellets—a literature review. *Biotechnology and Bioengineering*, 16, 781–99.
- Van Suijdam, J. C., & van Metz, B. (1981). Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 111–48.
- Van Suijdam, J. C., Kossen, N. W., & Paul, P. G. (1980). An inoculum technique for the production of fungal pellet. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 10, 211–21.
- Veiter, L., Rajamanickam, V., & Herwig, C. (2018). The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102, 2997–3006.
- Velazco, M., Angulo, O., Vazquez, C., Arroyo, L., & Monroy, R. (1997). Effect Of Dried Solids Of Nejayote Of Broiler Growth. *Poultry Science*, 76(11), 1531-1534.
- von Wirén, N., Gazzarrini, S., Gojon, A., & Frommer, W. B. (2000a). The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 254-261.
- Wang, M., Siddiqi, M., Ruth, T., & Glass, A. (1993). Ammonium uptake by rice roots. (II. Kinetics of  $^{13}\text{NH}_4$  influx across the plasmalemma). *Plant Physiol.*, 103, 1259-1267.

- Whittaker, J. A., Johnson, R. I., Finnigan, T. J., Avery, S. V., & Dyer, P. S. (2020). The Biotechnology of Quorn Mycoprotein: Past, Present and Future Challenges. En H. Nevalainen, *Grand Challenges in Biology and Biotechnology* (págs. 59-79). Sydney, New South Wales, Australia: Springer Nature Switzerland AG.
- Wiebe, M. (2002). Myco-protein from fusarium venenatum: A well-established product for human consumption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58(4), 421- 427.
- Yabaya, A., & Ado, S. (2008). Mycelial protein production by *Aspergillus niger* using banana peel. *Sci. World J.*, 3(4), 9-12.
- Yadav, A., Kaur, T., Devi, R., Kour, D., Yadav, N., Abdel-Azeem, A. M., . . . Ahluwalia, A. S. (2021). Bioprospecting for Biomolecules from Industrially Important Fungi: Current Research and Future Prospects. En A. Abdel-Azeem, A. Yadav, N. Yadav, & M. Sharma, *Industrially Important Fungi for Sustainable Development*. (págs. 767-791). Cham: Springer International Publishing.
- Yousuf, M. (2012). To determine protein content of single cell protein produced by using various combinations of fruit wastes in the production of SCP by using two standard food fungi *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oligospora*. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.*, 3(1), 533-536.
- Zhang, J., & Zhang, J. (2016). The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. *Crit Rev Biotechnol*, 36(6), 1066–1077.