

**Universidad Nacional**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Escuela de Ciencias Biológicas**

**Informe Final**  
**(PASANTÍA)**

**Unidad de Bioprocesos- Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM)**

**Estudiante:**  
**Rachel Ardón Rivera (117070103)**


**Tutor:**  
**MBA & MPM. Jorengeth Abad Rodríguez Rodríguez**

**Supervisor o guía:**  
**Dr. Adán Chávez Castillo**

**Campus Omar Dengo (Sede Central)**  
**Heredia, Costa Rica**

**Mayo, 2025**


Este trabajo de graduación fue **Aprobado** por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.



---

Dra. Stefany Solano González

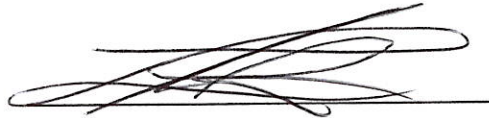
Representante, Decano



---

Dra. Silvia Mau Incháustegui

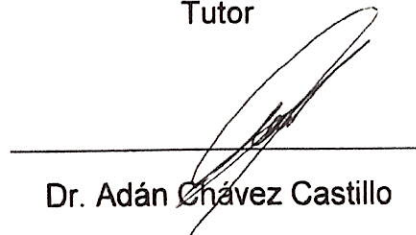
Representante de la Dirección de la (ECB)



---

Máster. Abad Rodríguez Rodríguez

Tutor



---

Dr. Adán Chávez Castillo

Supervisor

---

Dr. Esteban Durán Herrera

Invitado especial

# Índice

Índice general .....	II
Índice de anexos .....	III
1. Introducción .....	1
1.1. Historia de la empresa o institución y actividad económica a la que se dedica .....	1
1.2. Ubicación en el país de la empresa o institución.....	2
1.3. Visión.....	2
1.4. Misión.....	2
1.5. Justificación de la pasantía.....	3
1.6. Aportes a la institución y relevancia científico-tecnológica.....	5
2. Objetivos de la pasantía .....	6
2.1 Objetivo general.....	6
2.2 Objetivos Específicos.....	7
3. Actividades realizadas o metodología de trabajo.....	7
4. Resultados obtenidos de la pasantía en la institución.....	14
5. Discusión de resultados.....	23
6. Relevancia de la pasantía en su perfil profesional y conocimientos adquiridos de la experiencia.....	28
7. Conclusiones y recomendaciones.....	29
8. Referencias bibliográficas.....	31
9. Anexos .....	37

## Índice de anexos

Anexo 1. Protocolo de elaboración del reactivo DNS .....	37
Anexo 2. Cálculo de parámetros estequiométrico y volumétrico.....	37
Anexo 3. Preparación buffer de acetatos.....	38

## **Introducción**

### **Historia de la empresa o institución y actividad económica a la que se dedica**

El Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBO) cuenta con siete unidades de servicio, incluyendo la Unidad de Bioprocesos (UBP). Esta unidad tiene una amplia experiencia en la producción de vacunas, proteínas recombinantes, enzimas, antibióticos, colorantes microbianos, probióticos y prebióticos, entre otros productos biotecnológicos (Instituto De Investigaciones Biomédicas, 2016). El instituto posee colaboraciones con empresas del sector industrial, entre las que se incluyen Domecq, Agroindustrias Faroc, Visión Integral del Sur de Sinaloa y Robertet de México (Sánchez, S. Comunicación personal, 27 de mayo de 2024).

La UBP fue fundada en 1975 como planta piloto teniendo una ampliación de 1977 a 1979, donde se construyó un total de 480 m<sup>2</sup> que incluían un cuarto frío, un laboratorio de control, una unidad de fermentaciones, un cuarto de máquinas y un almacén. Posteriormente se adquirieron un fermentador de 1000 litros, un secador por aspersion, un evaporador y un fermentador de 14 litros. En 2005, se diseñó y construyó la Nueva Unidad de Escalamiento en la actual sede del IIBO, ubicada en el tercer Circuito Escolar de Ciudad Universitaria. Desde entonces, esta unidad ha cambiado su nombre a Unidad de Bioprocesos (UBP) (Sánchez, S. Comunicación personal, 27 de mayo de 2024).

Con su enfoque multidisciplinario y su capacidad para escalar procesos biotecnológicos, la UBP del IIBO se posiciona como un líder en el campo de la biotecnología aplicada, impulsando la innovación en diversas industrias y contribuyendo al desarrollo sostenible y a la mejora de la salud pública (Instituto De Investigaciones Biomédicas, 2016).

El coordinador de la Investigación Científica, William Lee Alardín, destacó que el trabajo del IIBO es fundamental para diversas áreas como la salud, la agricultura, el aprovechamiento de tecnologías, la biología y otras disciplinas. "Refleja la importancia de la investigación básica, sus aplicaciones y su aprovechamiento", comentó. Con 78 años de tradición, el IIBO es una gran fuerza del Subsistema de Investigación y mantiene una relación sólida con la sociedad mexicana (Fundación UNAM & Gaceta UNAM, 2019).

### **Ubicación en el país de la empresa o institución**

La Unidad de Bioprocesos del IIBO se encuentra en la Planta Baja del Edificio "C" de la Sede Tercer Circuito Exterior. Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México CDMX.

Esta localización estratégica dentro del IIBO permite acceder a una amplia gama de recursos y colaborar estrechamente con otras unidades de servicio, potenciando así la capacidad de investigación y desarrollo en bioprocesos.

### **Visión**

Lograr que la UBP se posicione, con base al valor que aporta a los usuarios mediante estrategias de innovación en servicios, enfoque organizacional y de trabajo, como la planta piloto más competitiva de su tipo a nivel nacional.

### **Misión**

El estudio, implementación y desarrollo de procesos de fermentación; separación y purificación de productos biotecnológicos, como vacunas, proteínas recombinantes, enzimas, antibióticos, pigmentos, biofertilizantes, probióticos y biomasa microbiana.

## **Justificación de la pasantía**

En los últimos años, el interés por soluciones ambientales para el manejo de residuos ha crecido considerablemente, impulsando el desarrollo de estrategias basadas en el uso de recursos renovables como materia prima para la industria de biomateriales y bioinsumos (Rodrigues et al., 2024). Entre estas estrategias, destaca el aprovechamiento de residuos orgánicos como sustrato para el crecimiento microbiano, debido a su riqueza en compuestos bioactivos que favorecen diversos procesos biológicos (Xu & Geelen, 2018).

En este contexto, la cerveza se ha convertido en una de las bebidas alcohólicas más populares globalmente, esto después del agua y el té (Conway, 2024). Con el incremento en el consumo, ha crecido la producción, aumentando la generación de residuos del proceso (Bachmann et al., 2022). Durante la producción de cerveza, la generación de residuos de grano gastado de malta (GGM) es de aproximadamente el 85% de los residuos totales, el cual es el resultado de la operación de filtrado en la etapa de maceración (Suasty, 2022).

La constante disponibilidad, bajo costo y valiosa composición química rica en fibras como celulosa, hemicelulosa y lignina, convierten al grano gastado de malta en un residuo de alto potencial para su valorización (Aquilani et al., 2015; Jacometti et al., 2015; Reis & Menezes, 2017). Además, conserva cerca del 30 % de las propiedades del grano original y presenta un alto contenido de humedad y residuos glucoproteicos, lo cual lo convierte en un sustrato ideal para el cultivo de diversos microorganismos (Nigam, 2017).

Sin embargo, su manejo inadecuado en la industria representa un problema ambiental, ya que su rápida descomposición promueve la proliferación de microorganismos no deseados, generando malos olores y lixiviados contaminantes; por lo que su utilización como alimento animal es una de las alternativas más comunes (Suasty, 2022).

Ante este panorama, se ha investigado el uso del GGM como materia prima en procesos de fermentación microbiana para la producción de bioproductos de alto valor agregado, como ácidos grasos, carotenoides, enzimas, alcoholes, biopolímeros, proteínas enriquecidas y azúcares fermentables (Bachmann et al., 2022). Para optimizar estos procesos, el pretratamiento del residuo ha sido una estrategia clave, ya que permite modificar su estructura para facilitar la liberación y aprovechamiento de sus componentes, aumentando así su potencial de valorización (Ravindran et al., 2018).

En este contexto, estudios anteriores han demostrado que este residuo promueve el crecimiento de hongos y bacterias productoras de celulasas, aminoácidos y vitaminas (Emmanuel et al., 2022). Por ejemplo, Bernal-Ruiz et al., (2021) indicaron que el uso de GGM es un sustrato de bajo costo para la obtención de xilanasa, celobiohidrolasa y  $\beta$ -glucosidasa por el hongo *Penicillium sp.*

Así mismo, *Aspergillus oryzae* después de fermentar el grano gastado de cervecería fue capaz de liberar compuestos antioxidantes bioactivos, los cuales son capaces de eliminar radicales libres en sistemas alimentarios (da Costa Maia et al., 2020). Mediante la fermentación de este residuo, las bacterias *Priestia megaterium* y *Propionibacterium freudenreichii* lograron aumentar la producción de vitamina B12, en consecuencia, este producto podría servir como una fuente vegetal económica para aplicaciones alimentarias (van Bokhorst-van de Veen et al., 2024).

Recientemente, este residuo ha sido empleado en la formulación de medios de cultivo líquidos para la producción de ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA) y poliinsaturados (PUFA), compuestos de alto valor comercial (Serra et al., 2023). En paralelo, el uso de hongos

filamentosos como *Rhizopus oryzae* ha ganado relevancia en la industria debido a su capacidad para producir ácido láctico L(+) de alta pureza sin requerimientos nutricionales estrictos ni control riguroso del pH (Maneeboon et al., 2010). La fermentación en estado sólido del GGM con *R. oryzae* también ha demostrado aumentar la concentración de compuestos fenólicos como ácido gálico, ácido trans-cinámico, ácido cafeico, kaempferol y catequina (de Azevedo Silva et al., 2021).

La optimización del medio de cultivo, basada en el conocimiento de las necesidades nutricionales del microorganismo, ha representado una herramienta clave para mejorar la eficiencia de los procesos de producción microbiana, ya sea orientados a la generación de biomasa o aumento de la actividad enzimática (Ojha et al., 2017; Senthivelan et al., 2019).

En este marco, los conceptos teóricos y procedimentales aplicados por el estudiante como el aprovechamiento de residuos agroindustriales, el diseño de medios de cultivo alternativos, el uso de hongos filamentosos para la producción de metabolitos de interés y la implementación de estrategias de pretratamiento han sido fundamentales para explorar nuevas formas de valorización del GGM.

### **Aportes a la institución y relevancia científico-tecnológica**

La realización de esta pasantía representó una oportunidad valiosa para la institución anfitriona, al promover el intercambio de conocimientos y metodologías vinculadas al desarrollo de procesos fermentativos y la valorización de residuos agroindustriales. Uno de los principales aportes consistió en la diversificación de las estrategias fermentativas empleadas, mediante el aprovechamiento de residuos como sustrato y la optimización de medios de cultivo, lo que fortaleció las capacidades técnicas y amplió las posibilidades de innovación en el área de bioprocesos.

Asimismo, esta colaboración permitió establecer vínculos estratégicos entre instituciones de ambos países, facilitando gestiones conjuntas orientadas a la obtención de financiamiento competitivo y al desarrollo de proyectos científicos en el campo de la biotecnología aplicada. Estos esfuerzos contribuyeron a la internacionalización de la investigación y al fortalecimiento de redes de cooperación académica y técnica.

Desde la experiencia previa adquirida, como pasante se aportó conocimiento al trabajo con la cepa fúngica que se trabajó previamente caracterizada en cuanto a su cinética de crecimiento, junto con datos experimentales que facilitaron su evaluación en nuevos residuos agroindustriales. Esta contribución permitió desarrollar una línea de investigación exploratoria con potencial de aplicación productiva, agregando valor al proceso de investigación y desarrollo.

Finalmente, la investigación desarrollada se enmarcó dentro de los principios de la economía circular, al promover la revalorización de residuos como una estrategia para reducir el impacto ambiental. La transformación de biomasa residual en productos de alto valor no solo favoreció la sostenibilidad ambiental, sino que también presentó ventajas económicas al convertir desechos en recursos útiles para procesos fermentativos. Este enfoque contribuyó a consolidar modelos de producción más sostenibles, eficientes y económicamente viables, en concordancia con las tendencias actuales del sector biotecnológico y agroindustrial.

## **Objetivos de la pasantía**

### **Objetivo general**

Evaluar la producción de biomasa de *R. oryzae* utilizando extracto de grano gastado de malta como sustrato en un sistema de cultivo sumergido para la revalorización de este residuo.

## Objetivos Específicos

1. Determinar la eficiencia del pretratamiento fisicoquímico del grano gastado de malta para obtener un extracto como medio de cultivo mediante la cuantificación de azúcares reductores.
2. Calcular el crecimiento de *R. oryzae* mediante la medición de la producción de biomasa a nivel de matraz utilizando el hidrolizado de GGM como medio de cultivo, suplementado con una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y la combinación de ambas.
3. Validar las condiciones del proceso en biorreactor de columna de burbujas, mediante la producción de biomasa *R. oryzae*.

## Actividades realizadas o metodología de trabajo

El desarrollo de esta pasantía como trabajo final de graduación de licenciatura se realizó bajo la supervisión de técnicos académicos de la unidad de Bioprocesos (UBP-IIBO), utilizando los protocolos establecidos por la unidad. Las actividades realizadas fueron estrictamente presenciales para el desarrollo de los diferentes experimentos asociados a los objetivos de la pasantía, los cuales se desarrollaron en la UBP-IIBO, Ciudad Universitaria, México.

Se realizó una evaluación del crecimiento de *R. oryzae*, en un extracto obtenido de GGM. Para lograrlo, se realizó un pretratamiento de la biomasa para obtener un extracto rico en nutrientes y fuentes de carbono esenciales para el crecimiento microbiano, evaluado en un cultivo con *R. oryzae*, en un sistema de biorreactor de columna de burbujas.

Este pretratamiento del sustrato consistió en un tratamiento térmico al que se somete el GGM, junto con un tratamiento químico con ácidos. Esta metodología fue estandarizada en la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas basados en el trabajo de White et al. (2008),

únicamente fue utilizada para el desarrollo de la pasantía, sin dar detalles ya que existe el interés de publicarse. Para la separación de la biomasa pretratada y el hidrolizado, se utilizaron principalmente estrategias como la precipitación por gravedad y la extracción mediante bombeo. Adicionalmente, se evaluó una alternativa basada en el prensado manual de la biomasa utilizando tela filtrante.

A partir del extracto de GGM obtenido, se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos para determinar el contenido de azúcares disponibles para el microorganismo, el cual se determinó mediante la técnica de DNS (Miller, 1959), una técnica colorimétrica basada en una reacción redox entre el DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra, seguida de una determinación espectrofotométrica a 540 nm. Este método se desarrolló mediante la siguiente metodología:

#### **Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores**

Para la determinación espectrofotométrica de azúcares reductores, se construyó una curva de calibración utilizando soluciones patrón de D-glucosa. En primer lugar, se preparó una solución madre de glucosa con una concentración de 1 g/ L, disolviendo la cantidad correspondiente del azúcar en agua destilada y llevando el volumen total a 100 mL en un balón aforado.

A partir de esta solución madre, se prepararon seis estándares con concentraciones finales de 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 g/ L, según se detalla en el Cuadro 1. Las diluciones se realizaron en tubos de ensayo, combinando diferentes volúmenes de la solución patrón con agua destilada, hasta completar 1 mL en cada caso.

Cuadro 1. Diluciones de la solución patrón de glucosa (1 g/ L) para la construcción de la curva de calibración.

<b>Glucosa (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Solución patrón (mL)</b>	<b>Agua destilada (mL)</b>
<b>0.0</b>	0.0	1.0
<b>0.2</b>	0.2	0.8
<b>0.4</b>	0.4	0.6

<b>0.6</b>	0.6	0.4
<b>0.8</b>	0.8	0.2
<b>1.0</b>	1.0	0.0

Posteriormente, se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones estándar a tubos de ensayo individuales, incluyendo un tubo con 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada como blanco. A cada tubo se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo DNS, y las mezclas fueron agitadas suavemente utilizando un vórtex a intensidad media. Se evitó la exposición directa a la luz para preservar la estabilidad del reactivo.

Las muestras fueron sometidas a una incubación en baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Luego del calentamiento, los tubos fueron enfriados inmediatamente en hielo. A continuación, se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de agua destilada a cada tubo, se agitaron nuevamente, y la absorbancia se midió a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Visible. Con los valores obtenidos, se graficó una curva de calibración, considerando en el eje X la concentración de glucosa (g/ L) y en el eje Y la absorbancia a 540 nm.

### **Determinación de azúcares reductores en muestras de fermentación**

Para cuantificar los azúcares reductores presentes en los extractos de fermentación, se aplicó el mismo procedimiento descrito para la curva de calibración. En tubos de ensayo, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la muestra centrifugadas previamente como método de separación con la biomasa, y en un tubo separado se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada como blanco. En la mayoría de los casos, debido a la alta concentración de azúcares en las muestras de fermentación, fue necesario realizar diluciones previas para ubicarlas dentro del rango de sensibilidad del método.

A cada muestra y al blanco se le agregaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo DNS, y las mezclas se agitaron en vórtex. Posteriormente, los tubos fueron llevados a un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y luego enfriados en hielo. Se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de agua destilada a cada tubo y se mezclaron nuevamente. Finalmente, la absorbancia fue leída a 540 nm. La concentración de azúcares reductores

fue determinada interpolando los valores de absorbancia en la curva de calibración previamente obtenida.

### **Cuantificación de biomasa por peso seco**

La determinación de la biomasa microbiana se realizó mediante el método de peso seco. Para ello, se utilizaron filtros de tela tipo rayón, los cuales fueron previamente secados en estufa a 80 °C y almacenados en desecador durante al menos 2 horas para alcanzar temperatura ambiente y eliminar cualquier traza de humedad. Una vez estabilizado el peso, se registró el peso inicial de cada filtro en una balanza analítica.

El contenido total del matraz Erlenmeyer (caldo de fermentación con biomasa) se filtró mediante un sistema de vacío, utilizando un embudo Büchner acoplado a un matraz Kitasato conectado a una línea de vacío. Tras completar la filtración, los filtros con la biomasa retenida fueron retirados cuidadosamente y secados nuevamente en estufa a 80 °C durante 72 horas, con el fin de asegurar la completa eliminación de humedad. Finalizado el secado, los filtros se trasladaron a un desecador durante al menos 2 horas antes de proceder al pesaje final.

La cantidad de biomasa seca fue calculada como la diferencia entre el peso del filtro con biomasa y el peso inicial del filtro (Jenkinson, 1966), aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Biomasa (g)} = \text{Peso del filtro con biomasa seca (g)} - \text{Peso inicial del filtro (g)}$$

Posteriormente, se evaluó el crecimiento del hongo bajo diferentes formulaciones del medio hidrolizado, inoculando con una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  esporas/mL tomando de referencia el trabajo de Bai et al. (2003) & Du et al. (1998). Se realizaron ensayos comparativos para determinar el efecto de la suplementación del hidrolizado, considerando formulaciones diseñadas originalmente para favorecer la producción de ácido láctico; sin embargo, dicha variable no pudo ser cuantificada por limitaciones experimentales (Mussatto et al., 2008): glucosa (3 g/ L), extracto de

levadura (5 g/ L) la fuente de carbono y nitrógeno fueron seleccionadas por referencia a diferentes autores (Abedi & Hashemi, 2020; Chotisubha-Anandha et al., 2011; Taskin et al., 2012), y la combinación de ambos suplementos en las mismas concentraciones que se agregaron individualmente. Se incluyeron como controles el hidrolizado sin suplementar y medio PDB de composición dextrosa, 20 g/ L e infusión papa de 4 g/ L (Sigma-Aldrich) como control positivo. El experimento se desarrolló mediante un ensayo con tres réplicas por tratamiento en un sistema de pequeña escala (matraz 500 mL) con 100 mL de volumen de trabajo, donde se evaluaron las diferentes variaciones de fuente de glucosa y nitrógeno individualmente o combinándose en el medio de cultivo. Las condiciones de operación fueron de 200 rpm, a 28°C tomando una muestra de 1 mL cada 24 horas por 3 o 4 días. Las variables de respuesta que se midieron fueron:

- Producción de biomasa: Medida basada en la metodología de peso seco, tomando en consideración solo el peso final alcanzado al concluir el ensayo. Esta decisión respondió tanto a la disponibilidad de espacio y material, como a la necesidad de contar con un parámetro comparable en todos los casos, independientemente de la morfología presentada en cada tratamiento.
- Consumo específico de sustrato: Determinando el consumo de azúcares reductores (D-glucosa) mediante análisis químicos (DNS), para evaluar la eficiencia de metabolización de los azúcares presentes en el medio.

Como parte del proceso de validación en el biorreactor de columna de burbujas, se realizó una evaluación del crecimiento del hongo en matraz, comparando condiciones con y sin control de pH. Para el control de pH, se utilizó una solución amortiguadora de acetato ajustada a pH 5.5 (ver Anexo 3). Además, se evaluaron tres concentraciones iniciales de esporas:  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$  esporas/ mL.

El experimento se llevó a cabo mediante un diseño con tres réplicas por tratamiento con una repetición del ensayo, en un sistema a pequeña escala utilizando matraces de 500 mL con un volumen de trabajo de 100 mL de medio PDB. Las condiciones de operación fueron: agitación a 200 rpm, temperatura constante de 28 °C, y muestreo de 1 mL cada 24 horas durante 3 días. Las variables

de respuesta analizadas fueron producción de biomasa (peso seco final) y consumo de sustrato (concentración de azúcares reductores).

Como parte de realizar ensayos preliminares de la validación en columna de burbujas, se realizó un segundo ensayo con el objetivo de evaluar el efecto de una mayor aireación en el crecimiento del hongo (Puligundla & Mok, 2021), mediante el uso de matraces bafleados. Estos fueron comparados con matraces convencionales que actuaron como grupo control. Se utilizaron dos tipos de medio de cultivo: medio PDB y un hidrolizado suplementado con glucosa (3 g/ L) y extracto de levadura (3 g/ L), con el fin de comparar el rendimiento bajo diferentes condiciones nutricionales. Las variables de respuesta analizadas fueron producción de biomasa (peso seco final) y consumo de sustrato (concentración de azúcares reductores).

Para la evaluación preliminar de las condiciones del proceso en biorreactor de columna de burbujas, se realizaron dos ensayos con un volumen de trabajo de 5 L. En ambos casos se utilizó un inóculo correspondiente al 6% del volumen de trabajo y como medio de cultivo se empleó hidrolizado de GGM suplementado con glucosa (3 g/L) y extracto de levadura (5 g/L).

Por problemas técnicos en el sistema, no fue posible realizar la validación planteada en el tercer objetivo. En su lugar, se llevaron a cabo los siguientes ensayos:

- Ensayo CB7\_01: sin control de temperatura, con una aireación de 1 vvm, de acuerdo con lo reportado por (Chotisubha-Anandha et al., 2011), y sin control de pH.
- Ensayo CB7\_02: con control de temperatura a 28 °C, manteniendo la aireación en 1 vvm y sin control de pH.

Con estos resultados, se calcularon parámetros cinéticos y estequiométricos (ver anexo 1) para evaluar el crecimiento del microorganismo y determinar el rendimiento de la producción de biomasa, comparando los resultados con los obtenidos entre ambos ensayos con y sin control de temperatura. Las variables de respuesta analizadas fueron producción de biomasa (peso seco final) y consumo de sustrato (concentración de azúcares reductores).

## **Determinación de la concentración relativa de azúcares reductores**

Para comparar entre tratamientos y corregir posibles variaciones iniciales en la concentración de azúcares reductores se expresó de forma relativa, normalizada respecto al valor inicial ( $t = 0$  h) de cada réplica.

La fracción relativa de azúcares se calculó mediante la ecuación: (Kaschuk et al., 2020):

$$C_{\text{relativa}} = C/C_0$$

En donde:

- a.  $C_0$  corresponde a la concentración medida al inicio del ensayo.
- b.  $C$  corresponde a la concentración medida en el tiempo específico

Valores de 1 indican que no hay cambio neto en la concentración de azúcares reductores respecto al tiempo inicial, mientras que valores  $<1$  indican consumo.

### **Análisis estadístico**

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la evolución de la concentración  $C/C_0$  a lo largo del tiempo, se realizó un análisis de varianza de dos vías con interacción ( $C/C_0 \sim$  Tiempo  $\times$  Tratamiento). Se verificó el supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Dado el diseño experimental balanceado, el ANOVA es robusto a desviaciones del supuesto de homogeneidad de varianzas. Los análisis se realizaron en R con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Utilizando el software R (versión 2025.05.1).

Para el análisis de los parámetros cinéticos y estequiométricos del ensayo de suplementación del hidrolizado fue evaluado en tres ensayos independientes, con tres réplicas técnicas por tratamiento en cada ensayo. Los valores de cada ensayo corresponden al promedio de las tres réplicas técnicas. Uno de los ensayos fue excluido del análisis debido a valores anómalos que se atribuyeron a problemas experimentales. El análisis estadístico final se realizó con  $n=6$  por tratamiento mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey HSD para comparaciones múltiples ( $p < 0.05$ ), utilizando el software R (versión 2025.05.1).

## **Resultados obtenidos de la pasantía en la institución**

### **Pretratamiento fisicoquímico del grano gastado de malta para obtener un extracto como medio de cultivo**

El tratamiento fisicoquímico (térmico y ácido) aplicado al GGM permitió obtener un extracto líquido (hidrolizado) con una concentración promedio de azúcares reductores de  $15.63 \pm 3.01$  g/ L. La variabilidad observada entre lotes constituye un factor relevante a considerar en la estandarización del proceso. Por otro lado, el método alternativo de separación, basado en el prensado manual de la biomasa con tela filtrante, permitió obtener un hidrolizado con una concentración significativamente mayor de azúcares reductores, alcanzando un promedio de  $40.40 \pm 5.13$  g/ L. Esta alternativa no fue utilizada en los ensayos, con el fin de no alterar la metodología ya implementada por el laboratorio.

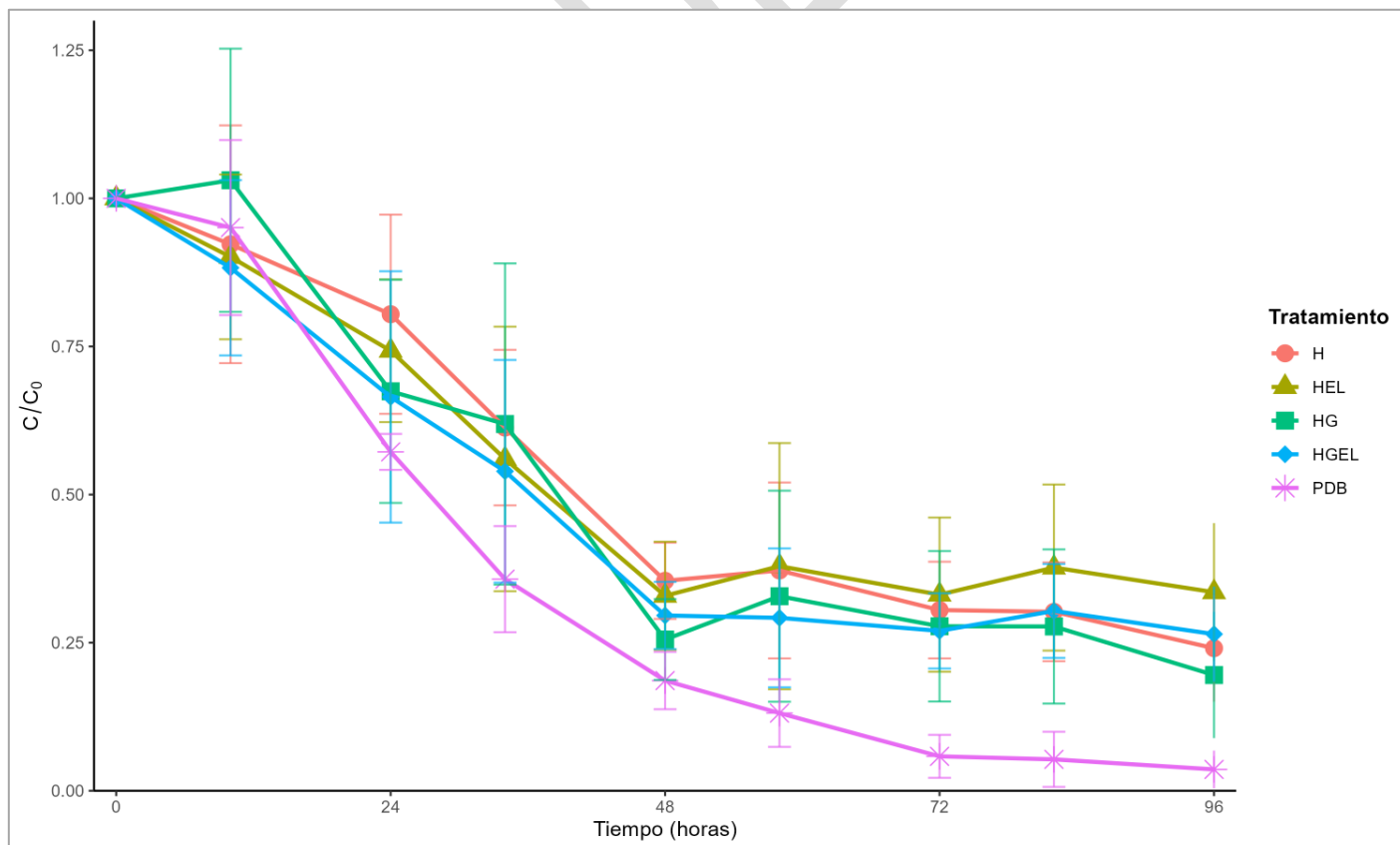
### **Crecimiento de *R. oryzae* a nivel de matraz utilizando el hidrolizado de grano gastado de malta como medio de cultivo suplementado con fuentes de carbono, nitrógeno y combinación de ambas.**

En los ensayos preliminares, utilizando el hidrolizado sin suplementar, se alcanzó una producción de biomasa de  $10.66 \pm 0.09$  g/ L. Los resultados mostraron que el tratamiento con hidrolizado suplementado con extracto de levadura (HEL) presenta un rendimiento biomasa/sustrato significativamente mayor a los demás tratamientos ( $0.94 \pm 0.07$  g/g) (Cuadro 2).

La cinética de consumo de azúcares mediante una concentración relativa (Figura 1) mostró que la fase más activa de consumo del sustrato de la fermentación comienza aproximadamente hasta las 50 horas y la concentración no varía hasta las 72 horas, evidenciado por la estabilización en la concentración relativa de azúcares reductores. Este comportamiento se observó consistentemente en todos los tratamientos, proporcionando un parámetro importante de tiempo necesario para el escalamiento a biorreactor para determinar la duración de la fermentación.

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk sobre los residuos del modelo mostró una desviación leve de la distribución normal ( $W = 0.957$ ,  $p = 0.009$ ). El análisis de varianza de dos vías un efecto significativo del tiempo ( $F= 18.78$ ,  $p = 8.08 \times 10^{-11}$ , grados de libertad= 7) y del tratamiento ( $F= 2.96$ ,  $p = 0.0314$ , grados de libertad= 4) sobre la variable respuesta. No se observó interacción significativa entre el tiempo y el tratamiento ( $F= 0.17$ ,  $p = 1.00$ , grados de libertad= 28), lo que indica que el efecto del tiempo sobre  $C/C_0$  es consistente entre todos los tratamientos evaluados. La prueba post-hoc de Tukey HSD no identificó diferencias significativas entre pares específicos de tratamientos (Figura 1).

Adicionalmente, con respecto a las morfologías observadas el tratamiento HGEL produjo una morfología de micelio disperso en la fermentación desarrollada en matraz. El medio PDB, presentó una morfología de pellets a las 24 horas de crecimiento, sin embargo, a las 72 horas su morfología resultó en una masa aglomerada. Además, el medio PDB presentó significativamente el menor rendimiento biomasa/sustrato ( $Y_{x/s} = 0.14 \pm 0.03$  g/g) (Cuadro 2), evidenciando las ventajas del hidrolizado de GGM como medio de cultivo alternativo para el crecimiento de *R. oryzae*.



**Figura 1.** Cinética de concentración relativa de azúcares reductores ( $C/C_0$ ) durante la fermentación de *R. oryzae* en hidrolizado de grano gastado de malta con diferentes condiciones de suplementación. Tratamientos: H: Hidrolizado; HEL: Hidrolizado + extracto de levadura; HG: Hidrolizado + glucosa; HGEL: Hidrolizado + glucosa + extracto de levadura y PDB: caldo papa dextrosa. Las barras verticales representan el error estándar.

Los resultados del cuadro 2, presentaron en las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk sobre los residuos de los modelos el cumplimiento de la distribución normal para todas las variables analizadas: biomasa final ( $W = 0.980$ ,  $p = 0.965$ ), rendimiento ( $W = 0.949$ ,  $p = 0.662$ ), tasa específica ( $W = 0.933$ ,  $p = 0.476$ ) y delta sustrato ( $W = 0.969$ ,  $p = 0.877$ ). Asimismo, las pruebas de homocedasticidad de Bartlett confirmaron varianzas homogéneas entre tratamientos para todas las variables: biomasa final ( $K^2 = 2.95$ ,  $p = 0.566$ ), rendimiento ( $K^2 = 4.50$ ,  $p = 0.343$ ), tasa específica ( $K^2 = 5.43$ ,  $p = 0.246$ ) y delta sustrato ( $K^2 = 3.44$ ,  $p = 0.487$ ).

El análisis de varianza de una vía mostró efecto significativo del tratamiento únicamente sobre rendimiento ( $F = 7.38$ ,  $p = 0.025$ , grados de libertad = 4), mientras que no se observaron efectos significativos para biomasa final ( $F = 4.87$ ,  $p = 0.056$ ), tasa ( $F = 1.61$ ,  $p = 0.304$ ) ni delta sustrato ( $F = 3.03$ ,  $p = 0.128$ ). La prueba post-hoc de Tukey HSD identificó diferencias significativas entre hidrolizado + extracto de levadura y PDB para rendimiento ( $p = 0.019$ ) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de *R. oryzae* en hidrolizado de grano gastado de malta bajo diferentes condiciones de suplementación.

Tratamiento	$\Delta$ Sustrato	Biomasa final (g/ L)	Y x/s (g/g)	rs (g/L*h)
Hidrolizado	-15.63 $\pm$ 3.84	11.49 $\pm$ 1.26	0.75 $\pm$ 0.10	0.12 $\pm$ 0.08
Hidrolizado + Glu	-22.56 $\pm$ 1.10	11.74 $\pm$ 2.05	0.52 $\pm$ 0.07	0.14 $\pm$ 0.06
Hidrolizado + EL	-15.78 $\pm$ 5.08	14.62 $\pm$ 3.72	0.94 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.09
Hidrolizado + Glu + EL	-21.42 $\pm$ 3.07	14.22 $\pm$ 4.73	0.75 $\pm$ 0.32	0.16 $\pm$ 0.01
PDB	-24.10 $\pm$ 0.46	3.39 $\pm$ 0.58	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.04 $\pm$ 0.01

Abreviaturas: Glu: glucosa; EL: extracto de levadura, Y s/x: rendimiento biomasa/sustrato, rs: tasa específica de consumo de sustrato. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar. Superíndices distintos (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con prueba post-hoc de Tukey HSD.

## **Evaluación en matraz del preinóculo para la posterior inoculación del biorreactor de columna de burbujas.**

Como parte de la evaluación exploratorio del proceso fermentativo, se escaló el cultivo de *R. oryzae* desde matraces a un biorreactor de columna de burbujas con capacidad de 7 litros. El medio utilizado fue hidrolizado de GGM suplementado con glucosa (3 g/ L) y extracto de levadura (5 g/ L). Este escalamiento requirió etapas preparatorias fundamentales, incluyendo: (1) la caracterización detallada del pre-inóculo, particularmente su morfología de crecimiento; y (2) la determinación de la curva de crecimiento específica, lo que permitió identificar tanto las fases de desarrollo del hongo como el momento óptimo para realizar la transferencia del inóculo al biorreactor.

El medio PDB no mostró ser la condición más eficiente en términos de rendimiento biomasa/sustrato; sin embargo, su utilización en la etapa de inóculo se justificó por la morfología obtenida. A las 24 horas de cultivo favoreció la formación de pellets, mientras que en el hidrolizado se observó principalmente micelio disperso o masas aglomeradas. Según lo señalado por Veiter et al., (2018), aunque los pellets pequeños y compactos suelen ser preferidos por facilitar el control del proceso y las propiedades reológicas del cultivo, las morfologías más grandes o menos densas pueden asociarse con una mayor productividad. Por ello, la selección del medio de inóculo puede priorizar la obtención de una morfología específica antes que el rendimiento inmediato.

Los resultados de la Figura 3, respecto a la morfología, se observaron diferencias visibles entre los tratamientos, el B1 produjo pellets de mayor tamaño, lo que podría complicar su transferencia a un biorreactor. En contraste, A2 generó pellets de tamaño reducido, más apropiados para la inoculación en biorreactor, mientras que A3 y B3 produjeron los pellets más pequeños de todos los tratamientos evaluados.

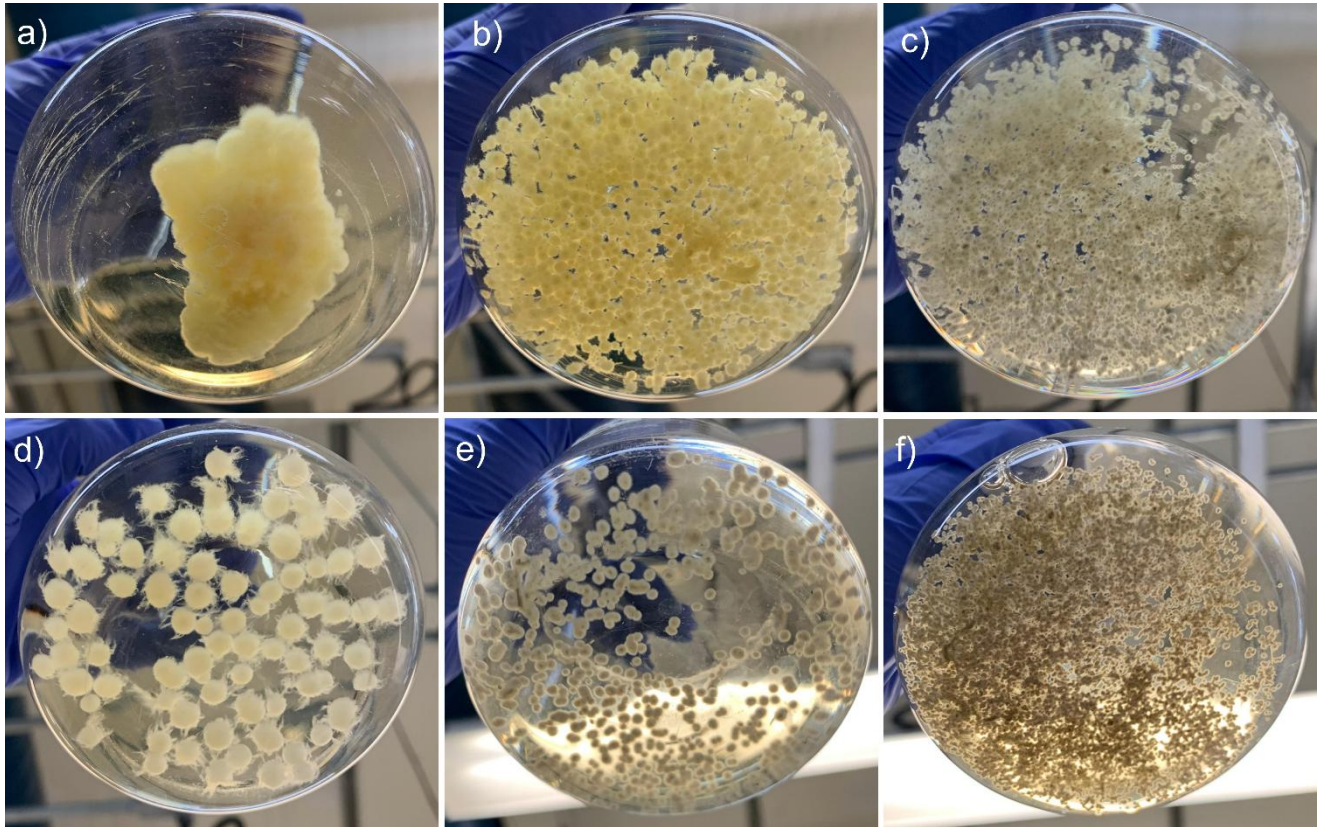


Figura 3. Morfología del crecimiento de *R. oryzae* bajo diferentes concentraciones de esporas en medio PDB con y sin solución amortiguadora de acetatos (pH 5.5) a las 96 horas de cultivo. Tratamientos: a) A1= Sin control pH ( $1 \times 10^5$  esporas/mL); b) A2=Sin control pH ( $1 \times 10^6$  esporas/mL); c) A3=Sin control pH ( $5 \times 10^6$  esporas/mL); d) B1= Con control pH ( $1 \times 10^5$  esporas/mL); e) B2= Con control pH ( $1 \times 10^6$  esporas/mL) y f) B3 = Con control pH ( $5 \times 10^6$  esporas/mL).

En el segundo ensayo se evaluó el efecto de una mayor aireación mediante el uso de matraces triple bafleados, comparados con matraces convencionales utilizados como control. El objetivo fue analizar de manera preliminar el desempeño del medio de cultivo seleccionado bajo una condición con mayor transferencia de oxígeno, considerando que en el primer ensayo en columna de burbujas se había favorecido la formación de pellets. Por esta razón, se utilizaron dos medios de cultivo: PDB e hidrolizado suplementado con glucosa (3 g/L) y extracto de levadura (5 g/L). En todos los tratamientos se monitoreó la producción de biomasa y el consumo de azúcares.

Los resultados de la Figura 4 muestran que el tratamiento 4 (hidrolizado suplementado en matraz triple bafleado) alcanzó un mayor consumo de azúcares (azúcares reductores restantes  $1.52 \pm 0.114$  g/ L) a las 72 horas de crecimiento. En contraste, los tratamientos 1 y 2 (PDB en matraz convencional y triple bafleado, respectivamente) mostraron un menor consumo de azúcares (azúcares reductores residuales  $6.29 \pm 1.92$  g/ L y  $7.66 \pm 0.10$  g/ L respectivamente), esto como una evaluación exploratoria ya que solo se cuenta con un ensayo.

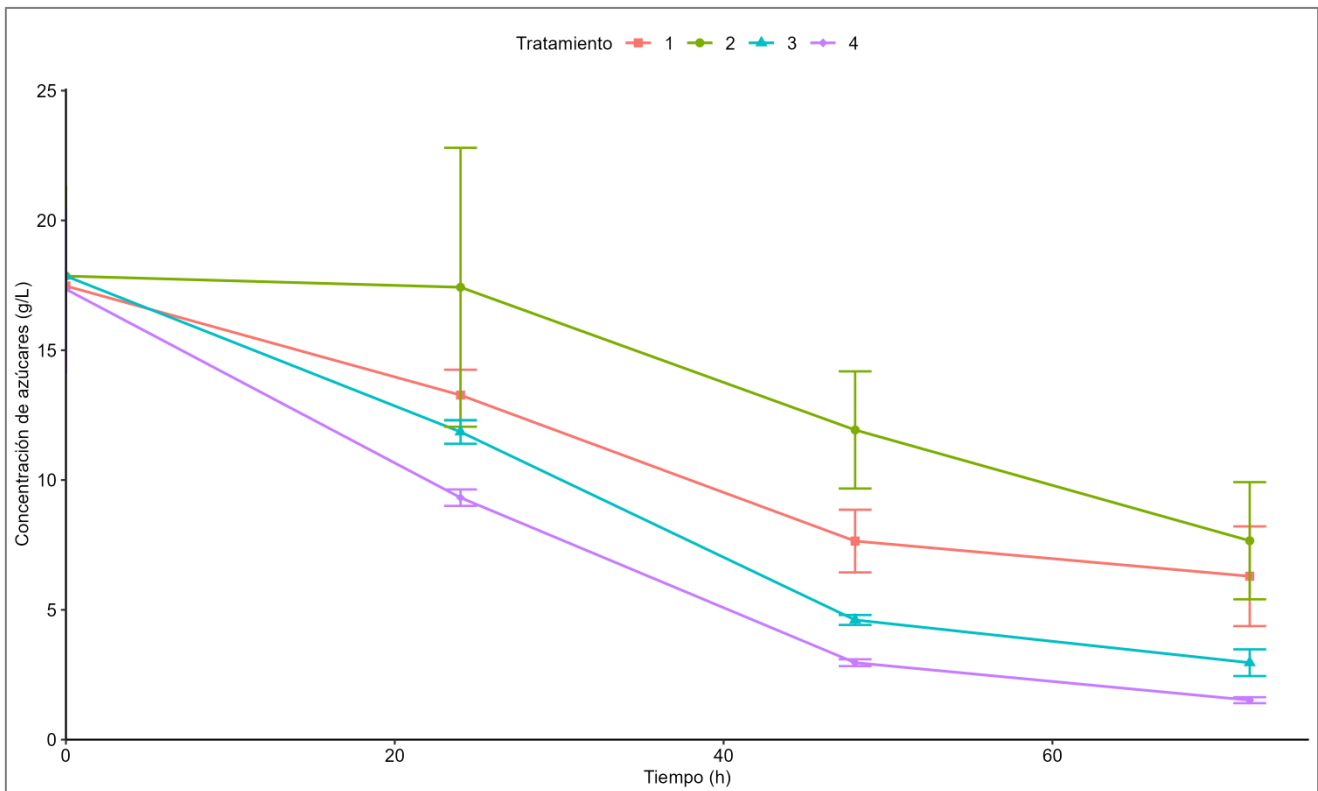


Figura 4. Cinética de consumo de azúcares durante el cultivo de *R. oryzae* bajo diferentes tratamientos: 1) PDB en matraz convencional, 2) PDB en matraz triple bafleado, 3) Hidrolizado suplementado en matraz convencional y 4) Hidrolizado suplementado en matraz triple bafleado, durante 72 horas de crecimiento. Las barras verticales representan el error estándar.

En cuanto a la morfología, se observaron diferencias notables entre los tratamientos. El tratamiento 4 desarrolló micelio disperso, una característica deseable para su uso como inóculo en biorreactor, mientras que el tratamiento 3 presentó aglomeración micelial. A pesar de que el tratamiento 4 en hidrolizado suplementado mostró resultados prometedores, se optó por utilizar el medio PDB como medio de inóculo para los ensayos posteriores en biorreactor de columna de burbujas. Esta decisión se basó en la mayor seguridad de que dicho medio favorece la formación de pellets, lo cual facilita la transferencia del cultivo desde matraz al biorreactor.

## **Evaluación exploratoria de las condiciones del proceso en biorreactor de columna de burbujas**

Se realizaron dos ensayos en biorreactor neumático de columna de burbujas, ambos utilizando medio hidrolizado suplementado con glucosa (3 g/ L) y extracto de levadura (5 g/ L). Los ensayos se diferenciaron principalmente en sus condiciones operativas y en la preparación del inóculo. Las variables constantes en ambas fermentaciones fueron la formulación del medio, el volumen de trabajo (5 L) y la tasa de aireación de 1 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto).

El primer ensayo (CB7\_01) se realizó sin control de temperatura debido a limitaciones operativas, y sin control de pH evaluando así las condiciones de un proceso con menor grado de control. Durante este experimento surgieron complicaciones con el inóculo, ya que el medio hidrolizado suplementado seleccionado provocó la formación de aglomeraciones miceliales, lo que implicó utilizar un 6% de inóculo a una concentración inferior a la inicialmente planificada ( $1 \times 10^6$  esporas / mL). La fermentación comenzó con un pH de 5.37 y finalizó en 4.04, desarrollando una morfología de pellets heterogéneos tanto en tamaño como en forma (Figura 5).



Figura 5. Fermentación (CB7\_01) en columna de burbujas en medio de hidrolizado suplementado con glucosa y extracto de levadura a las 72 horas de fermentación, se observa la formación de pellets a lo largo de toda la columna.

Para el segundo ensayo (CB7\_02), se implementó control de temperatura a 28°C y se modificó la estrategia de preparación del inóculo, utilizando medio PDB que favoreció el crecimiento en forma de pellets pequeños. Adicionalmente, a diferencia de CB7\_01, el ensayo CB7\_02 se logró inocular con la concentración estándar ( $1 \times 10^6$  esporas/ mL) y un volumen de inóculo del 6%. Adicionalmente, esta fermentación inició con un pH de 5.04 y finalizó con un pH de 4.52, desarrollando una morfología de micelio disperso y pellets en su mayoría heterogéneos tanto en tamaño como en forma (Figura 6).

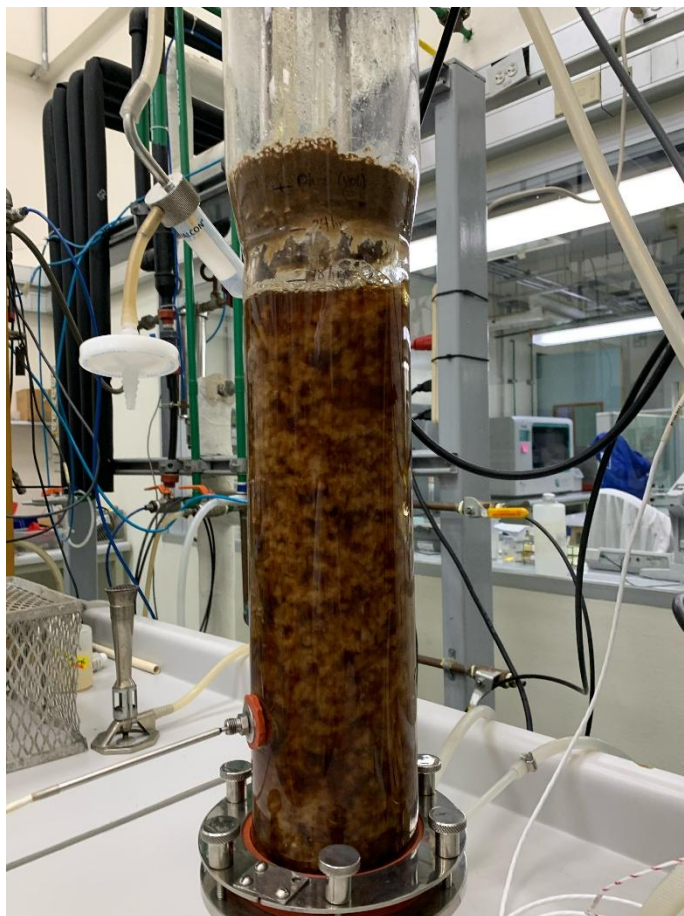


Figura 6. Fermentación (CB7\_02) en columna de burbujas en medio de hidrolizado suplementado con glucosa y extracto de levadura a las 48 horas de fermentación.

Cuadro 3. Parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de *R. oryzae* en hidrolizado de grano gastado de malta en columna de burbujas.

<b>Ensayo</b>	<b>Biomasa final (g/ L)</b>	<b>Y x/s (g/ g)</b>	<b>rs (g/L*h)</b>
CB7_01	5.76	0.69	0.04
CB7_02	12.08	0.58	0.29

Nota: Y x/s: rendimiento biomasa/sustrato, rs: velocidad de consumo de sustrato.

Los resultados del Cuadro 2 muestran que el ensayo CB7\_01 alcanzó un mayor rendimiento de biomasa por sustrato consumido (0.69 g/ g) en comparación con el ensayo CB7\_02 (0.58 g/ g). Sin embargo, el ensayo CB7\_02 presentó una tasa de consumo de sustrato mayor (0.29 g/L·h frente a 0.04 g/L·h), lo que se correlaciona con su mayor producción final de biomasa (12.08 g/ L frente a 5.76 g/ L).

## Discusión de resultados

La biomasa lignocelulósica del GGM lo convierte en un candidato ideal para su valorización mediante pretratamientos adecuados. El elemento esencial de estos pretratamientos consiste en hidrolizar los polisacáridos que componen la estructura de la biomasa para obtener monosacáridos fermentables (Olvera Barranco, 2024).

Siguiendo este principio, en el presente trabajo se implementó un proceso fisicoquímico (térmico/ácido) que permitió obtener un hidrolizado con una concentración promedio de azúcares reductores de  $15.63 \pm 3.01$  g/ L. La variabilidad observada entre diferentes lotes puede atribuirse principalmente a la degradación del reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), cuya oxidación compromete la estabilidad de las mediciones y reduce la precisión de los resultados analíticos (Essawy & Abdel-Mottaleb, 2003).

Para minimizar este efecto, se recomienda preparar el reactivo DNS siguiendo el método de Miller, pero excluyendo el sulfito de sodio durante la preparación del lote, ya que su presencia puede inducir oxidación con el tiempo; por lo que, el sulfito de sodio debe añadirse justo antes de cada ensayo experimental (Ismail, 2011).

Si bien la concentración de  $15.63 \pm 3.01$  g/ L de azúcares reductores promedio obtenida a partir del hidrolizado en este estudio, es inferior a la reportada por Olvera Barranco (2024) de 49.5 g/ L, cabe destacar que dicha autora empleó un pretratamiento térmico/químico similar al nuestro, pero complementado con una hidrólisis enzimática adicional, lo que explica su mayor rendimiento en contenido de azúcares fermentables.

No obstante, es importante destacar que, mediante una optimización metodológica en el proceso de separación, sustituyendo la separación del sobrenadante por gravedad por un sistema de extrusión (prensado) con tela filtrante, logramos incrementar significativamente el rendimiento hasta

alcanzar  $40.40 \pm 5.13$  g/ L de azúcares reductores. Este hallazgo resulta particularmente relevante desde una perspectiva técnica y económica, ya que evidencia cómo una modificación relativamente sencilla en el método de separación puede aproximar los rendimientos a los reportados por Olvera Barranco (2024), pero sin incluir etapas enzimáticas adicionales.

Considerando la concentración de azúcares reductores obtenida en el hidrolizado, se decidió suplementarlo con extracto de levadura como fuente de nitrógeno, decisión fundamentada en el estudio de Mussatto et al., (2008), quienes demostraron que el rendimiento de bioconversión en hidrolizados celulósicos derivados de bagazo cervecero se ve significativamente influenciado por la suplementación del hidrolizado con extracto de levadura. Asimismo, se incorporó glucosa como fuente de carbono, con base en diversos estudios donde *R. oryzae* fue cultivado para la producción de ácido láctico (Du, Cao, Gong, & Tsao, 1998; Du, Cao, Gong, Tsao, et al., 1998; Maneeboon et al., 2010; Park et al., 1998) . Aunque la cuantificación del ácido láctico no pudo realizarse por limitaciones de tiempo, la elección de la suplementación respondió al objetivo de favorecer su producción. En conjunto, esta estrategia resalta la importancia de complementar fuentes complejas con nutrientes de fácil asimilación para optimizar el crecimiento microbiano y la síntesis de metabolitos de interés.

Desde una perspectiva de viabilidad industrial, la suplementación se considera una alternativa rentable cuando se utiliza de forma estratégica. El uso exclusivo de glucosa como fuente de carbono, aunque eficiente para la acumulación de biomasa y metabolitos, no resulta sostenible a gran escala debido a su costo y a la competencia con su aplicación en la industria alimentaria. En este contexto, los hidrolizados lignocelulósicos representan una materia prima económica, renovable y disponible en grandes volúmenes, capaz de sustituir parcialmente la glucosa o, mediante su suplementación controlada, alcanzar rendimientos comparables a los obtenidos con sustratos puros (Zhang et al., 2022).

Los resultados obtenidos al evaluar la cinética de crecimiento en los diferentes tratamientos y la producción de biomasa evidencian el efecto de la suplementación del hidrolizado con glucosa. En particular, se observó una mayor producción de biomasa en los tratamientos donde el hidrolizado fue suplementado con ambas fuentes de carbono y nitrógeno. Esto concuerda con lo reportado por Ferrero et al., (2024) quienes señalan que el contenido de carbono y nitrógeno presente en medios de

cultivo derivados de biomazas como las melazas obtenidas a partir de vinazas de cereales utilizadas en su estudio, puede favorecer el crecimiento fúngico.

Además, la adición o supresión de nitrógeno en el medio de cultivo es un factor clave en la formulación de medios de cultivo, ya que puede afectar significativamente la producción de biomasa y metabolitos, así como influir en los costos de producción (Premalatha et al., 2023). Estos resultados resaltan la importancia de considerar tanto las fuentes como las concentraciones de carbono y nitrógeno al diseñar experimentos en esta área (Ferrero et al., 2024).

El medio PDB (control positivo) muestra una menor biomasa a pesar de presentar una mayor tasa de crecimiento. Este bajo rendimiento en PDB puede explicarse por la capacidad de *R. oryzae* de desviar parte de la glucosa hacia la producción de ácidos orgánicos, donde se ha documentado que este hongo puede alcanzar rendimientos de 60–80% en ácido láctico a partir de glucosa, mientras que la glucosa remanente se canaliza mayoritariamente hacia la fermentación etanólica (Skory, 2004).

Según Liao, Liu, & Chen (2007), *R. oryzae* utiliza la energía tres veces más eficientemente en presencia de iones metálicos, propiciando un crecimiento fúngico más abundante. En contraste, el hidrolizado de GGM posee una composición compleja donde, como reporta Gmoser et al. (2020), existe presencia de estos minerales esenciales como cobre, hierro y zinc, lo que favorece una mayor producción de biomasa.

Como parte de la validación del crecimiento de *R. oryzae* en el hidrolizado suplementado, se evaluó la formación de pellets en matraz y se analizaron los patrones de crecimiento bajo distintas condiciones, incluyendo el uso de solución amortiguadora y diferentes concentraciones de esporas. En los tratamientos con solución amortiguadora (pH 5.5), se observó un incremento transitorio en la concentración de azúcares reductores durante las primeras 24 horas

Esto se podría responder por la interacción de *R. oryzae* con el sustrato, donde a un pH de 5.5 proporciona una actividad óptima de enzimas hidrolíticas fúngicas que degradan los polisacáridos

liberando azúcares al medio de cultivo (Cruz et al., 2019). Aunque se evidenció un aumento en la concentración de estos azúcares, este fenómeno solo se observó durante las primeras 24 horas, a diferencia de lo reportado por Cruz et al., (2019) donde el aumento persistió hasta 15 días y posteriormente la concentración disminuyó, probablemente debido al consumo de estos azúcares para el crecimiento y mantenimiento del hongo.

Los resultados obtenidos respaldan que el control del pH mediante una solución amortiguadora de acetatos tiene un efecto positivo en la formación de pellets, lo cual coincide con lo reportado en la literatura, donde se señala que variaciones en el pH modifican las propiedades de la superficie celular de los hongos e influyen significativamente en la morfología fúngica (Liao, Liu, Frear, et al., 2007). En este sentido, se observó una clara relación entre la concentración de esporas y el pH con la formación de pellets, lo que refuerza la relevancia de estos factores como variables críticas para dirigir la fermentación hacia una morfología deseada.

Este aspecto representa una oportunidad relevante para futuros trabajos, ya que, por limitaciones de tiempo, en la presente investigación únicamente se simuló las condiciones sin control de pH que se aplicaron en los ensayos con hidrolizado en matraz.

La formación de pellets en hongos filamentosos es un aspecto fundamental en procesos fermentativos, ya que impacta directamente el rendimiento del cultivo. En el caso de *R. oryzae*, se ha reportado que esta morfología influye en la producción de metabolitos como el ácido láctico o fumárico, y puede ser modulada por diversas condiciones como el tamaño del inóculo, la concentración de nitrógeno y la presencia de metales pesados (Liao, Liu, & Chen, 2007).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que una oxigenación eficiente tuvo un efecto positivo en el crecimiento de *R. oryzae* y en la producción de biomasa, especialmente en sistemas como los matraces bafleados y el biorreactor de columna de burbujas, los cuales proporcionan una mayor disponibilidad de oxígeno. Este comportamiento resalta la importancia de la tasa de transferencia de oxígeno (OTR) como un factor físico determinante en los procesos fermentativos, que resulta de relevancia para ser estandarizado como continuación de esta

colaboración internacional. Según Rodríguez-Torres et al., (2022), un aumento en la OTR impacta significativamente la biomasa final de *R. oryzae* NRRL 395 en sistemas de tanque agitado. Este efecto se atribuye a la relación lineal entre la tasa media de consumo de oxígeno y la tasa media de crecimiento, lo cual indica un uso eficiente del oxígeno durante el desarrollo celular (Ponte et al., 2016). Por tanto, el uso de sistemas con una mejor transferencia de oxígeno representa una estrategia efectiva para optimizar el rendimiento del cultivo.

Particularmente en fermentaciones donde predomina la morfología de aglomerado, la difusión de oxígeno se ve limitada, lo que puede reducir significativamente la producción de biomasa. Este fenómeno ha sido reportado también por Wainaina et al. (2020), quienes destacan la relevancia de adaptar las condiciones de oxigenación según la morfología del hongo y el tipo de sistema utilizado.

Sin embargo, en las fermentaciones realizadas en la columna de burbujas se presentaron inconsistencias tanto en el tipo como en la concentración del inóculo que requirió fraccionamiento manual para lograr dispersar el micelio en el medio, lo cual afectó significativamente la producción final de biomasa. Tal como concluyeron Fu et al. (2014) la formación de pellets y su diámetro dependen en mayor medida del tamaño del inóculo que de la concentración de componentes en el medio, con incrementos adicionales en el tamaño del inóculo, puede observarse una transición morfológica de la forma de pellets a micelio disperso. Trakarnpaiboon et al., (2018) reportaron que, si bien la fermentación con inóculo de esporas favorece una mayor producción de ácido láctico, la formación de masas aglomeradas de micelio genera un caldo de fermentación altamente viscoso, afectando la transferencia de masa gas-líquido y reduciendo la homogeneidad dentro del fermentador tipo airlift.

Además, conociendo que las especies del género *Rhizopus* son productoras de ácido láctico (Millati et al., 2005), la adición de un agente neutralizante o la dilución del medio de cultivo son estrategias necesarias para evitar la inhibición causada por la acumulación de este ácido. Asimismo, el pH inicial es un factor clave en la producción de biomasa. En un estudio con *R. oryzae var. delemar* CBS 145940 cultivado en un residuo de papa diluido (1:10), la producción de biomasa alcanzó su máximo (4 g/ L de biomasa seca) a un pH inicial de 3, observándose una tendencia general de mayor

crecimiento bajo condiciones ácidas iniciales, ya que el pH durante el cultivo se ajustó manualmente para que estuviera entre 4,5 y 5,0 de pH (Sar et al., 2022).

Otro factor determinante en el proceso fue la temperatura, tal como lo reportan en el estudio *R. oryzae* DMKU 12, aunque su crecimiento fue óptimo en un amplio rango de temperaturas (22 a 38 °C hasta 40 °C), la producción de ácido láctico fue altamente dependiente de esta variable, alcanzando su mayor concentración a 30 °C (Trakarnpaiboon et al., 2018).

En conjunto, estos resultados demuestran que factores como el pH inicial, la temperatura del proceso y el tipo de inóculo tienen un impacto significativo en las variables medidas en ambas fermentaciones. No obstante, es importante destacar que, en procesos industriales, prescindir del control de pH representa un ahorro económico considerable y ha sido una estrategia utilizada en estudios a escala piloto para la revalorización de residuos (Rousta et al., 2022).

## **Relevancia de la pasantía en su perfil profesional y conocimientos adquiridos de la experiencia**

La realización de esta pasantía permitió fortalecer mis conocimientos sobre el aprovechamiento de residuos agroindustriales, específicamente en el pretratamiento de materiales para la generación de hidrolizados, los cuales pueden utilizarse como medios de cultivo para el crecimiento microbiano. Esta experiencia me proporcionó una visión más amplia sobre las diversas estrategias para valorizar residuos que, en muchos casos, carecen de una alternativa clara de aprovechamiento dentro del modelo de economía circular.

Adicionalmente, los sistemas de columna de burbujas representan una tecnología fundamental en los bioprocesos con hongos filamentosos. En Costa Rica, estos sistemas son prácticamente inexistentes en centros de investigación públicos, lo que convierte esta experiencia en una oportunidad invaluable para mi formación. El acceso y manejo de este tipo de equipamiento

especializado ha enriquecido significativamente mi perfil profesional, proporcionándome competencias técnicas diferenciadas en el campo de la biotecnología industrial.

Además, la pasantía destacó la importancia de optimizar los recursos disponibles, especialmente en América Latina, donde la escasez de inversión en investigación científica representa un desafío constante. Esto resalta la necesidad de buscar alternativas innovadoras y sostenibles para la ejecución de proyectos viables, asegurando que, incluso con recursos limitados, se puedan obtener resultados relevantes y de impacto.

Uno de los aprendizajes más valiosos fue la creación y fortalecimiento de redes de colaboración. La experiencia evidenció que, aunque los recursos financieros pueden ser limitados, la cooperación científica tanto a nivel nacional como internacional permite superar barreras y potenciar el desarrollo de investigaciones de calidad. Estas colaboraciones no solo facilitan el acceso a financiamiento, sino que también promueven el intercambio de conocimientos y tecnologías.

Por último, la integración cultural adquirida durante la pasantía representa una herramienta invaluable para la búsqueda y aprovechamiento de oportunidades académicas y profesionales. Esta experiencia ha sido un gran incentivo para explorar opciones de formación en posgrados, así como para visualizar la implementación y escalamiento de proyectos a nivel internacional, permitiendo la transferencia del conocimiento generado en el laboratorio hacia aplicaciones a mayor escala.

## **Conclusiones y recomendaciones**

El hidrolizado de grano gastado de malta (GGM) suplementado demostró ser un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de *Rhizopus oryzae*, un hongo de interés industrial por su capacidad para producir ácidos orgánicos. Estos hallazgos respaldan su potencial en estrategias de economía circular aplicadas a la industria cervecera, al promover la revalorización de residuos agroindustriales como materia prima para procesos fermentativos.

Desde el punto de vista operativo, la experiencia obtenida durante la etapa experimental sugiere que la presencia de micelio disperso puede representar una ventaja en determinadas

aplicaciones, particularmente cuando es necesario facilitar la transferencia del inóculo a través de entradas estrechas en los biorreactores. Aunque los pellets fúngicos suelen preferirse por su facilidad de manejo y sedimentación, el micelio disperso surge como una alternativa viable en escenarios donde no es posible o conveniente inducir la formación de pellets.

El empleo de sistemas como la columna de burbujas permitió establecer condiciones favorables para maximizar el rendimiento del cultivo, optimizando tanto el crecimiento como el metabolismo de *R. oryzae*. No obstante, para avanzar hacia una producción industrial eficiente de ácidos orgánicos, será necesario profundizar en el estudio de variables clave como el tamaño del inóculo, el control del pH, la morfología fúngica y otros parámetros operativos que inciden directamente en la productividad del proceso.

A pesar de que el hidrolizado suplementado ha mostrado ser un sustrato prometedor para la generación de biomasa, el control de la morfología del hongo continúa siendo un desafío relevante. Alcanzar una morfología homogénea y estable será esencial para asegurar la reproducibilidad del proceso y su viabilidad a escala industrial.

Como perspectivas futuras, se recomienda evaluar la formación de productos metabólicos que puedan inhibir el crecimiento o la síntesis de compuestos de interés durante la fermentación. Asimismo, resulta valioso caracterizar en mayor detalle la composición química y nutricional tanto del residuo sólido (biomasa seca de GGM) como del hidrolizado, con el fin de identificar posibles limitantes y optimizar las condiciones del cultivo para mejorar la producción fúngica y metabólica.

## Referencias bibliográficas

- Abedi, E., & Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10), e04974. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>
- Aquilani, B., Laureti, T., Poponi, S., & Secondi, L. (2015). Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. *Food Quality and Preference*, 41, 214–224. <https://doi.org/10.1016/J.FOODQUAL.2014.12.005>
- Bachmann, S. A. L., Calvete, T., & Féris, L. A. (2022). Potential applications of brewery spent grain: Critical an overview. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(1), 106951. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.106951>
- Bai, D. M., Jia, M. Z., Zhao, X. M., Ban, R., Shen, F., Li, X. G., & Xu, S. M. (2003). L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. *Chemical Engineering Science*, 58(3–6), 785–791. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(02\)00608-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(02)00608-5)
- Bernal-Ruiz, M., Correa-Lozano, A., Gomez-Sánchez, L., Quevedo-Hidalgo, B., Rojas-Pérez, L. C., García-Castillo, C., Gutiérrez-Rojas, I., & Narváez-Rincón, P. C. (2021). Brewer's spent grain as substrate for enzyme and reducing sugar production using *Penicillium* sp. HC1. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 45(176), 850–863. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1379>
- Chotisubha-Anandha, N., Thitiprasert, S., Tolieng, V., & Thongchul, N. (2011). Improved oxygen transfer and increased l-lactic acid production by morphology control of *Rhizopus oryzae* in a static bed bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(2), 163–172. <https://doi.org/10.1007/s00449-010-0457-z>
- Conway, J. (2024). *Global beer production 1998-2022*. <https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>
- Cruz, L., González, C., Franco, K., Duran, D., Chirivi, J., & Sierra, R. (2019). Rice husk biological pretreatment with *pleurotus ostreatus*. *European Biomass Conference and Exhibition Proceedings, May*, 1364–1371.
- da Costa Maia, I., Thomaz dos Santos D'Almeida, C., Guimarães Freire, D. M., d'Avila Costa Cavalcanti, E., Cameron, L. C., Furtado Dias, J., & Simões Larráz Ferreira, M. (2020). Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer's spent grain revealed by UPLC-MSE. *LWT*, 133, 110136. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110136>

- de Azevedo Silva, F., de Oliveira Vieira, V., Correia da Silva, R., Guariz Pinheiro, D., & Antônio Soares, M. (2021). Introduction of *Trichoderma* spp. biocontrol strains against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary change soil microbial community composition in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivation. *Biological Control*, 163(104755). <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104755>
- Doran, P. (2013). Engineering Principles Second Edition. In *Academic Press*. <http://www.sciencedirect.com:5070/book/9780122208515/bioprocess-engineering-principles>
- Du, J., Cao, N., Gong, C. S., & Tsao, G. T. (1998). Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* in a bubble column fermenter. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 70–72, 323–329. <https://doi.org/10.1007/BF02920148>
- Du, J., Cao, N., Gong, C. S., Tsao, G. T., Fu, Y. Q., Li, S., Chen, Y., Xu, Q., Huang, H., Sheng, X. Y., Park, E. Y., Kosakai, Y., Okabe, M., Bai, D. M., Jia, M. Z., Zhao, X. M., Ban, R., Shen, F., Li, X. G., & Xu, S. M. (1998). Enhancement of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using a two-stage dissolved oxygen control strategy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 14(4), 699–704. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8831-5>
- Emmanuel, J. K., Nganyira, P. D., & Shao, G. N. (2022). Evaluating the potential applications of brewers' spent grain in biogas generation, food and biotechnology industry: A review. *Heliyon*, 8(10), e11140. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2022.E11140>
- Essawy, A. A. I., & Abdel-Mottaleb, M. S. A. (2003). Photosensitized degradation of dinitrosalicylic acid by uranyl ions. *International Journal of Photoenergy*, 5(4), 219–221. <https://doi.org/10.1155/S1110662X03000357>
- Ferrero, D., Moscato, E., Spina, F., Cavalluzzi, M. M., Rotondo, N., Oddon, S. B., Gargano, M. L., Venturella, G., Lentini, G., Berteà, C. M., Gasco, L., & Varese, G. C. (2024). The fungal alternative: Insights on medicinal mushrooms-based protein-rich biomasses by submerged fermentation of agro-industrial by-products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 95(January), 103721. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103721>
- Fu, Y. Q., Yin, L. F., Zhu, H. Y., Jiang, R., Li, S., & Xu, Q. (2014). Effects of Pellet Characteristics on L-Lactic Acid Fermentation by *R. oryzae*: Pellet Morphology, Diameter, Density, and Interior Structure. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(6), 2019–2030. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1146-1>
- Fundación UNAM & Gaceta UNAM. (2019). *SE CONSOLIDA EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS*. Fundación UNAM. <https://www.fundacionunam.org.mx/donde-paso/se-consolida-el-instituto-de-investigaciones->

biomedicas-semillero-de-patentes/

- Gmoser, R., Fristedt, R., Larsson, K., Undeland, I., Taherzadeh, M. J., & Lennartsson, P. R. (2020). From stale bread and brewers spent grain to a new food source using edible filamentous fungi. *Bioengineered*, *11*(1), 582–598. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1768694>
- Instituto De Investigaciones Biomédicas. (2016). *Unidad de Bioprocesos*. <https://www.biomedicas.unam.mx/servicios/unidad-de-bioprocesos/>
- Ismail, Y. (2011). *Study on Dilute Acid- and Ionic Liquid Pretreatment of Agro Wastes Master of Science Thesis in the Master Degree Programme , Biotechnology* (Issue xxxx). Chalmers University of Technology.
- Jacometti, G. A., Mello, L. R. P. F., Nascimento, P. H. A., Sueiro, A. C., Yamashita, F., & Mali, S. (2015). The physicochemical properties of fibrous residues from the agro industry. *LWT - Food Science and Technology*, *62*(1), 138–143. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.01.044>
- Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6\\_58](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_58)
- Jenkinson, D. S. (1966). Studies on the Decomposition of Plant Material in Soil: Ii. Partial Sterilization of Soil and the Soil Biomass. *Journal of Soil Science*, *17*(2), 280–302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1966.tb01474.x>
- Kaschuk, J. J., de Alexandria Santos, D., Frollini, E., Canduri, F., & Porto, A. L. M. (2020). Influence of pH, temperature, and sisal pulp on the production of cellulases from *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 and hydrolysis of cellulosic materials with different hemicelluloses content, crystallinity, and average molar mass. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *10*(2), 483–494. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00440-2>
- Liao, W., Liu, Y., & Chen, S. (2007). Studying pellet formation of a filamentous fungus *Rhizopus oryzae* to enhance organic acid production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *137–140*(1–12), 689–701. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9089-4>
- Liao, W., Liu, Y., Frear, C., & Chen, S. (2007). A new approach of pellet formation of a filamentous fungus - *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, *98*(18), 3415–3423. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.028>
- Maneeboon, T., Vanichsriratana, W., Pomchaitaward, C., & Kitpreechavanich, V. (2010). Optimization of lactic acid production by pellet-form *rhizopus oryzae* in 3-l airlift bioreactor using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *161*(1–8). <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8860-0>
- Millati, R., Edebo, L., & Taherzadeh, M. J. (2005). Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor*

- in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2–3), 294–300. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2004.09.007>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Mancilha, I. M., & Roberto, I. C. (2008). Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.01.013>
- Nigam, P. S. (2017). An overview: Recycling of solid barley waste generated as a by-product in distillery and brewery. *Waste Management*, 62, 255–261. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2017.02.018>
- Ojha, N., Pradhan, N., Singh, S., Barla, A., Shrivastava, A., Khatua, P., Rai, V., & Bose, S. (2017). Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific Reports*, 7(July 2016), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep39515>
- Olvera Barranco, M. (2024). *Obtención de Ácido Láctico a partir de la fermentación de residuos de la industria cervecera*. [Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000864191/3/0864191.pdf>
- Park, E. Y., Kosakai, Y., & Okabe, M. (1998). Efficient production of L-(+)-lactic acid using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor. *Biotechnology Progress*, 14(5), 699–704. <https://doi.org/10.1021/bp9800642>
- Ponte, X., Montesinos-Seguí, J. L., & Valero, F. (2016). Bioprocess efficiency in *Rhizopus oryzae* lipase production by *Pichia pastoris* under the control of PAOX1 is oxygen tension dependent. *Process Biochemistry*, 51(12), 1954–1963. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2016.08.030>
- Premalatha, A., Vijayalakshmi, K., Shanmugavel, M., & Rajakumar, G. S. (2023). Optimization of culture conditions for enhanced production of extracellular  $\alpha$ -amylase using solid-state and submerged fermentation from *Aspergillus tamarii* MTCC5152. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 70(2), 835–845. <https://doi.org/10.1002/bab.2403>
- Puligundla, P., & Mok, C. (2021). Recent advances in biotechnological valorization of brewers' spent grain. *Food Science and Biotechnology*, 30(3), 341–353. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00900-4>
- Ravindran, R., Jaiswal, S., Abu-Ghannam, N., & Jaiswal, A. K. (2018). A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers' spent grain. *Bioresource Technology*, 248, 272–279. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.06.039>
- Reis, J. M. L., & Menezes, E. M. (2017). Barley residue reinforced polymer mortars: Fracture

- mechanics approach. *Composite Structures*, 173, 53–57.  
<https://doi.org/10.1016/J.COMPSTRUCT.2017.04.005>
- Rodrigues, D. M., da Silva, M. F., Almeida, F. L. C., de Mélo, A. H. F., Forte, M. B. S., Martín, C., Barud, H. da S., Baudel, H. M., & Goldbeck, R. (2024). A green approach to biomass residue valorization: Bacterial nanocellulose production from agro-industrial waste. In *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Vol. 56). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103036>
- Rodríguez-Torres, M., Romo-Buchelly, J., & Orozco-Sánchez, F. (2022). Effects of oxygen transfer rate on the L(+) lactic acid production by *Rhizopus oryzae* NRRL 395 in stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 187(September). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108665>
- Rousta, N., Larsson, K., Fristedt, R., Undeland, I., Agnihotri, S., & Taherzadeh, M. J. (2022). Production of fungal biomass from oat flour for the use as a nutritious food source. *NFS Journal*, 29(April), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2022.09.001>
- Sar, T., Larsson, K., Fristedt, R., Undeland, I., & Taherzadeh, M. J. (2022). Demo-scale production of protein-rich fungal biomass from potato protein liquor for use as innovative food and feed products. *Food Bioscience*, 47(December 2021), 101637. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101637>
- Senthivelan, T., Kanagaraj, J., Panda, R. C., & Narayani, T. (2019). Screening and production of a potential extracellular fungal laccase from *Penicillium chrysogenum*: Media optimization by response surface methodology (RSM) and central composite rotatable design (CCRD). *Biotechnology Reports*, 23, e00344. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00344>
- Serra, S., D'Arrigo, P., Rossato, L. A. M., & Ruffini, E. (2023). Microbial Fermentation of the Water-Soluble Fraction of Brewers' Spent Grain for the Production of High-Value Fatty Acids. *Fermentation*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/fermentation9121008>
- Skory, C. D. (2004). Lactic acid production by *Rhizopus oryzae* transformants with modified lactate dehydrogenase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 237–242. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1480-7>
- Suasty, M. C. (2022). *Obtención de un snack tipo totopo a base de harina generada a partir del grano gastado del mosto cervecero de la empresa "Laguna Verde"*. Universidad Mariana.
- Taskin, M., Esim, N., & Ortucu, S. (2012). Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. *Food and Bioprocess Processing*, 90(4), 773–779. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.05.003>
- Trakarnpaiboon, S., Praneetrattananon, S., & Kitpreechavanich, V. (2018). Simultaneous saccharification and fermentation of L-(+)-lactic acid production from liquefied cassava starch

- by immobilized rhizopus oryzae in a 3 L airlift fermenter. *Chiang Mai Journal of Science*, 45(1), 77–91.
- van Bokhorst-van de Veen, H., Berendsen, L., Helmond, M., & Nierop, M. (2024). In situ fortification of protein-enriched brewer's spent grain with vitamin B12 by fermentation with *Priestia megaterium* and *Propionibacterium freudenreichii*. *LWT*, 205, 116520. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2024.116520>
- Veiter, L., Rajamanickam, V., & Herwig, C. (2018). The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 2997–3006. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8818-7>
- Wainaina, S., Kisworini, A. D., Fanani, M., Wikandari, R., Millati, R., Niklasson, C., & Taherzadeh, M. J. (2020). Utilization of food waste-derived volatile fatty acids for production of edible *Rhizopus oligosporus* fungal biomass. *Bioresource Technology*, 310(March), 123444. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123444>
- White, J. S., Yohannan, B. K., & Walker, G. M. (2008). Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1175–1184. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00390.x>
- Xu, L., & Geelen, D. (2018). Developing biostimulants from agro-food and industrial by-products. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 871). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01567>
- Zhang, X. Y., Li, B., Huang, B. C., Wang, F. B., Zhang, Y. Q., Zhao, S. G., Li, M., Wang, H. Y., Yu, X. J., Liu, X. Y., Jiang, J., & Wang, Z. P. (2022). Production, Biosynthesis, and Commercial Applications of Fatty Acids From Oleaginous Fungi. *Frontiers in Nutrition*, 9(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.873657>

## Anexos

### Anexo 1. Protocolo de elaboración del reactivo DNS (Brindado por la UBP-IIBO)

Preparación reactivo DNS:

- Pesar 0.53 g de ácido dinitrosalicílico
- Pesar 0.99 g de hidróxido de sodio
- Disolver el ácido dinitrosalicílico y el hidróxido de sodio, en 70.8 mL de agua destilada.
- Una vez disuelto agregar con agitación constante, 1.53 g de tartrato de Na-K lentamente.
- Posteriormente de disolver los reactivos, agregar 0.41 g de sulfito de sodio.
- Llevar a un balón aforado de 100 mL, y aforar con agua destilada.

### Anexo 2. Cálculo de parámetros estequiométrico y volumétrico

**Rendimiento biomasa-sustrato (Y x/s) unidad g/ g:** Calculado con la siguiente ecuación (Doran, 2013):

$$Y \ x/s = \frac{\Delta x}{-\Delta s} = \frac{\text{tasa de crecimiento}}{\text{tasa de consumo del sustrato}} \quad \text{ecuación (1)}$$

x= biomasa (peso seco)

s=sustrato (concentración azúcares reductores)

Cantidad de masa o moles de biomasa producida por unidad de masa o mol de sustrato consumido. El Yx/s es un parámetro crucial en cultivos microbianos porque indica la eficiencia con la que el microorganismo convierte el sustrato en biomasa. Un valor mayor indica una conversión más eficiente del sustrato en biomasa.

**Tasa volumétrica de consumo de sustrato (rs) unidad g/L\*h** (Doran, 2013):

$$rs = qS * x \quad \text{ecuación (2)}$$

$qs = (1 / (\text{biomasa inicial (g/L)} + \text{final (g/L)} / 2) * (\text{Concentración inicial de azúcares (g/L)} - \text{Concentración final de azúcares (g/L)}) / (\text{tiempo final (horas)} - \text{tiempo inicial (horas)})$

rs = tasa específica de consumo de sustrato \* promedio de biomasa

El rs indica cuánto sustrato está siendo consumido por unidad de volumen del cultivo por unidad de tiempo. Este representa el consumo total en el sistema entero, considerando toda la biomasa

presente. Esta tasa brinda la información para determinar cuánto sustrato debe suministrarse al sistema.

### **Anexo 3. Preparación buffer de acetatos (pH 5.5)**

- Para preparar 100 mL de una solución amortiguadora de acetato 0.1 M: (Jain et al., 2020)
- Se mezclaron soluciones equimolares de acetato de sodio y ácido acético en las proporciones indicadas a continuación:
- Solución A: 0.1 M de acetato de sodio (Masa molar = 82.04 g/ mol)
- Solución B: 0.1 M de ácido acético
- Según lo reportado por Jain et al., 2020, se agregaron 86.0 mL de la solución A y 14.0 mL de la solución B.
- El pH de la solución final se confirmó con un pH metro.

CONFIDENCIAL