



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



Posgrado en Biotecnología

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS

“ Efecto de la concentración de nutrientes y de la luz en el crecimiento de *Neurospora crassa* en fermentación sólida ”

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en Ing. Q. RUBERTH RIVERA PÉREZ

Matrícula: 2233801399

rruberth@gmail.com

ASESOR: DR. ERNESTO FAVELA TORRES

LECTOR: DR. CHRISTIAN DE JESÚS MORA PÉREZ

IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO A 05 DE DICIEMBRE 2024

Resumen

Este trabajo evaluó la influencia de la concentración de nutrientes, la relación volumen de medio de cultivo por gramo de soporte inerte seco (VC/PI), la frecuencia de ciclos luz/oscuridad y el color de la luz sobre los parámetros de producción de CO₂, el crecimiento celular y la producción de proteínas extracelulares secretadas por *Neurospora crassa* cultivada sobre espuma de poliuretano embebida con medio mineral Vogel.

En una primera etapa se evaluó el efecto de la combinación de cuatro concentraciones iniciales de sacarosa (15, 50, 100 y 150 g/L) con tres relaciones de volumen de medio por gramo de soporte inerte (5, 10 y 15 mL/g) en el metabolismo de *Neurospora crassa*. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado en reactores compuestos por matraces de 250 mL de volumen nominal. Cada uno de los matraces fue empacado con cilindros de espuma de poliuretano de 2.47 ± 0.06 gramos de peso seco. Los cultivos se llevaron a cabo a 30 hasta agotar el sustrato (sacarosa). Los resultados mostraron que la mejor condición para la secreción de proteína extracelular (relación VC/PI de 5 mL/g y concentración inicial de sacarosa de 150 g/L) coincide con la mayor duración de la fase lag, seleccionándose la relación VC/PI de 5 mL/g y concentración inicial de sacarosa de 100 g/L como la condición más conveniente desde el punto de vista de la productividad del proceso. En las siguientes etapas se evaluó de forma independiente el efecto del color de la luz y de la frecuencia de los ciclos luz/oscuridad sobre la producción de proteína extracelular resultando en la selección de luz azul en períodos 12/12 (luz/oscuridad). Finalmente, con los resultados obtenidos, se estableció la estequiometría de crecimiento de *Neurospora crassa* y de producción de proteína extracelular, con las cuales se determinó el efecto de la altura del lecho sobre la difusión de oxígeno en un fotobiorreactor de charolas, así como su concepción, dimensionamiento y confección a escala de banco.

Abstract

This work evaluated the influence of nutrient concentration, the ratio of culture medium volume per gram of dry inert support (VC/PI), the frequency of light/dark cycles and light color on the parameters of CO₂ production, cell growth and the production of extracellular proteins secreted by *Neurospora crassa* cultured on polyurethane foam embedded with Vogel's mineral medium.

In the first stage, the effect of the combination of four initial sucrose concentrations (15, 50, 100 and 150 g/L) with three ratios of volume of medium per gram of inert support (5, 10 and 15 mL/g) on the metabolism of *Neurospora crassa* was evaluated. Each assay was performed in triplicate in reactors consisting of 250 mL nominal volume flasks. Each flask was packed with polyurethane foam cylinders of 2.47 ± 0.06 grams dry weight. Cultures were run at 30 until the substrate (sucrose) was exhausted. The results showed that the best condition for extracellular protein secretion (VC/PI ratio of 5 mL/g and initial sucrose concentration of 150 g/L) coincides with the longest duration of the lag phase, selecting the VC/PI ratio of 5 mL/g and initial sucrose concentration of 100 g/L as the most convenient condition from the point of view of process productivity. In the following stages, the effect of light color and the frequency of light/dark cycles on extracellular protein production was evaluated independently, resulting in the selection of blue light in 12/12 (light/dark) periods. Finally, with the results obtained, the stoichiometry of *Neurospora crassa* growth and extracellular protein production was established, with which the effect of bed height on oxygen diffusion in a tray photobioreactor was determined, as well as its conception, sizing and bench-scale construction.

Contenido

Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Marco Conceptual	3
2.1. Fermentación en estado sólido	3
2.1.1 Definición	3
2.1.2 Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido	4
2.1.3 Comparación entre los cultivos en medio sólido y los sumergidos	5
2.1.4 Variables que influyen en los procesos de FES	5
2.1.5 Control de temperatura en los procesos de FES	7
2.1.6 Variables a considerar en el diseño de sistemas fermentativos en FES	8
2.1.7 Obtención de enzimas mediante FES de sistemas fúngicos	9
2.2 <i>Neurospora crassa</i>	9
2.2.1 Ciclo de vida de <i>Neurospora crassa</i>	9
2.2.2 Requerimientos nutricionales de <i>Neurospora crassa</i>	11
2.2.3 Ciclos circadianos en <i>Neurospora Crassa</i>	12
Capítulo 3. Materiales y métodos	13
3.1 Microorganismo	13
3.2 Medio de cultivo	13
3.3 Preparación del inóculo	13
3.4 Preparación del soporte para estudios de FES	13
3.5 Condiciones de cultivo	14
3.6 Análisis respirométrico	14
3.7 Determinación de la biomasa seca	14
3.8 Determinación de azúcares totales	15
3.9 Cuantificación de proteínas extracelulares	15
Capítulo 4. Resultados y discusión	16
4.1 Efecto de la concentración de nutrientes del medio de cultivo y la relación volumen de medio de cultivo: peso de soporte inerte sobre el crecimiento y la producción de proteína extracelular por <i>Neurospora crassa</i>	16
4.2 Efecto del color de la luz sobre el crecimiento y la producción de proteína extracelular por <i>Neurospora crassa</i>	21
4.3 Efecto de la frecuencia de los ciclos Luz: Oscuridad sobre el crecimiento y la producción de proteína extracelular por <i>Neurospora crassa</i>	24

4.4 Propuesta. Biorreactor de Charolas	27
4.4.1 Balance de Oxígeno	28
4.4.2 Estequiometría para el crecimiento celular y la formación del producto	31
4.4.3 Efecto de la altura del lecho en los perfiles de concentración de Oxígeno.....	37
4.4.4 Componentes del fermentador de charolas	39
Charolas	39
Armario	39
Sistema de iluminación.....	40
Medidor de Humedad	41
Sistema de Control de Temperatura	41
Conclusiones.....	44
Bibliografía.....	45
Anexos	51

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo biológico de N. crassa	10
Figura 2. Parámetros asociados a la producción de CO₂ por Neurospora crassa en cultivo sólido sobre PUF	17
Figura 3. Diagrama de Pareto estandarizado para los parámetros de crecimiento.	18
Figura 4. Diagrama de Pareto y gráfico de las interacciones de los factores estudiados sobre la actividad enzimática de Invertasa	19
Figura 5. Producción de biomasa y proteína extracelular en los cultivos sólidos de Neurospora Crassa	20
Figura 6. Gráficos de las medias para los parámetros asociados a la producción de CO₂ ..	22
Figura 7. Gráfico de las medias asociado a la actividad enzimática.....	23
Figura 8. Gráficos de las medias para los parámetros asociados a la producción de biomasa y secreción de proteína extracelular.....	23
Figura 9. Gráficos de las medias para la biomasa, el CO₂, producido, y la tasa específica de producción de CO₂.	25
Figura 10. Gráficos de las medias para la actividad invertasa, la secreción de proteína extracelular, tasa máxima de producción de CO₂ y tiempo lag.....	26
Figura 11. Vistas ortogonales del fermentador de Charolas	27

Figura 12. Variación de la concentración adimensional de oxígeno en el fondo de la charola respecto al tiempo de fermentación para distintas alturas de la cama.	38
Figura 13. Charola metálica	39
Figura 14. Caja empleada como armario para el reactor.....	40
Figura 15.Lampara del sistema de iluminación	40
Figura 16. higrómetro digital de sonda.....	41
Figura 17. Controlador de temperatura	42
Figura 18. Resistencia eléctrica	42
Figura 19. Ventilador axial de disipación de calor	43
Figura 20.Diseño final del fermentador	43

Índice de tablas

Tabla 1. Diferencias principales entre cultivos sumergidos y cultivos sobre soportes sólidos.....	5
Tabla 2. Diseño experimental.	16
Tabla 3. Análisis estadístico del diseño experimental para la variable respuesta PE. *Valores significativos.	20
Tabla 4. Análisis estadístico del diseño experimental para la variable respuesta X. *Valores significativos	20
Tabla 5. Efecto de la frecuencia de luz oscuridad en los parámetros fisiológicos asociados a la producción de CO₂, producción de biomasa y proteína extracelular durante el cultivo de Neurospora crassa en medio sólido	25
Tabla 6. Resultados experimentales de los cultivos en las mejores condiciones de fermentación.....	34
Tabla 7. Constantes usadas en la simulación	37
Tabla 8. Datos experimentales de producción de dióxido de carbono.	38

Capítulo 1. Introducción

El desarrollo actual de la biotecnología moderna aprovecha ha permitido el uso de la maquinaria metabólica de los microorganismos para la producción industrial de diversos metabolitos (1). De estos, los hongos filamentosos, también conocidos como mohos, se distinguen por su capacidad de producir filamentos en formas de hifas (2). Adicionalmente, son eucariotas heterótrofos que dependen de fuentes externas de carbono y pueden reproducirse sexual o asexualmente (3), entre estos, *Neurospora crassa* ha sido de los más estudiados.

Neurospora crassa pertenece a la división de ascomicetos (4). Debido a su rápido crecimiento, es fácil de cultivar en medios de cultivos definidos (5). Su manipulación genética es relativamente simple ya que su genoma está completamente secuenciado (6), lo que lo hace un modelo experimental para la investigación sobre estudios genéticos (7), bioquímicos (8) y subcelulares (9). Así como en estudios de fotobiología (10), ciclos circadianos (11), morfogénesis (12), reparación y recombinación de ADN (13) y diversos procesos epigenéticos (14).

La producción de proteínas extracelulares, específicamente enzimas, por *Neurospora crassa* mediante fermentación sólida ha sido poco estudiada. Entre las enzimas más relevantes se encuentran las celulasas obtenidas a partir de paja de trigo (15), proteasas de pulpa de soja (16) y β -glucosidasas de paja de trigo embebida en soluciones de minerales (17). De acuerdo con estos antecedentes, se puede suponer la gran capacidad de secreción de proteínas extracelulares de interés industrial.

Justificación

Las proteínas extracelulares producidas por *Neurospora crassa* tienen aplicaciones potenciales en la industria, por ello la optimización de los procesos de fermentación en medio sólido son esenciales para su escalamiento y posterior producción

Hipótesis

La luz y la concentración del medio de cultivo tienen un efecto significativo sobre el crecimiento, secreción de proteínas y ciclo circadiano en *Neurospora crassa*.

Objetivo general

Analizar el efecto de la luz y la concentración del medio de cultivo sobre el crecimiento, secreción de proteínas extracelulares y ciclo circadiano de *Neurospora crassa* cultivada en un fotobiorreactor de fermentación en medio sólido.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la concentración inicial de sacarosa y la relación volumen de medio / peso de soporte inerte sobre crecimiento y producción de proteínas extracelulares por *Neurospora crassa* sobre espuma de poliuretano.
2. Determinar el efecto del color de la luz y de la frecuencia de ciclos luz: oscuridad sobre crecimiento y producción de proteínas extracelulares por *Neurospora crassa* sobre espuma de poliuretano.
3. Determinar la estequiometría del crecimiento de *Neurospora crassa* sobre espuma de poliuretano.
4. Desarrollar un diseño conceptual del biorreactor que cumpla con los requisitos del proceso, considerando aspectos como la geometría, capacidad, humedad y control de temperatura.

Capítulo 2. Marco Conceptual

2.1. Fermentación en estado sólido

2.1.1 Definición

La fermentación en estado sólido (FES) se erige como un fenómeno singular y versátil dentro del amplio espectro de técnicas de cultivo en sustratos sólidos, englobando desde la fermentación en estado sólido convencional hasta procesos avanzados como el compostaje y la fermentación de lodos **(18)**. La distinción entre estas modalidades facilita la aplicación de tratamientos cuantitativos específicos para cada técnica, proporcionando una comprensión más detallada y precisa de sus aplicaciones y alcances respectivos.

La FES se define como el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas en ausencia de agua libre en el sistema **(19)**. En este sentido, parte del agua presente se encuentra ligada en una forma compleja dentro de la matriz sólida **(20)**. Esta interacción entre el agua y la matriz sólida puede manifestarse de diversas maneras, ya sea como una fina capa adsorbida en la superficie de las partículas **(21)** o retenida dentro de la región capilar del sólido **(22)**.

En una definición más abarcadora, la fermentación en estado sólido se presenta como un método de cultivo de microorganismos sobre y/o dentro de partículas sólidas. Es esencial que la cantidad de líquido asegure la actividad de agua necesaria para el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos, sin superar la capacidad máxima de retención de agua de la matriz sólida **(23)**. Esta definición se complementa con aspectos adicionales.

La matriz sólida utilizada puede clasificarse en dos categorías principales **(20-23)**:

- Sólido como soporte y sustrato simultáneamente: Se refiere a materiales orgánicos agroindustriales que desempeñan la función tanto de soporte físico como de sustrato nutricional para el crecimiento de microorganismos.
- Sólido como soporte que requiere embeberse con soluciones nutritivas: Incluye materiales sintéticos y minerales que actúan únicamente como soporte físico, dependiendo de la adición de soluciones nutritivas para facilitar el crecimiento microbiano.

La literatura científica prueba la utilización de la matriz sólida en ambos contextos. Los soportes inertes, especialmente aquellos derivados de sólidos sintéticos se emplean como modelos ideales en investigaciones básicas y en la formulación de modelos matemáticos para describir fenómenos durante la fermentación. Además de su función en la investigación, estos soportes inertes se emplean en la producción de metabolitos valiosos(24) como el ácido cítrico (25) o el ácido giberélico (26), entre otros.

El uso de materiales orgánicos agroindustriales como sustratos en la fermentación en estado sólido ha encontrado diversas aplicaciones. Estas incluyen el aumento del contenido de proteínas en el sólido para su aplicación en la alimentación animal (27), la producción de enzimas (28), y la generación de etanol (29), entre otras. Entre los sustratos más comúnmente empleados se encuentran el salvado y la paja de trigo, la pulpa de remolacha, el bagazo de caña y la harina de yuca (30).

2.1.2 Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido

Ventajas (31):

- La escasez de agua permite un cultivo selectivo de hongos, cuyo hábitat natural se asemeja a las condiciones de estas técnicas.
- En ocasiones, la materia prima clave es un residuo sólido, como desechos agroindustriales o urbanos, lo que ayuda a limpiar el medio ambiente
- Se requiere menor volumen de reactor por gramo de sustrato, ya que hay menos líquido en el sistema. Esto reduce tanto los costos de inversión como los de operación.
- Presenta bajos umbrales de represión catabólica e inhibición por sustrato

Desventajas(31):

- La disipación del calor metabólico durante el crecimiento puede ser un desafío significativo en una escala mayor.
- La consistencia sólida del medio dificulta la medición de parámetros durante el proceso.
- La fermentación en estado sólido se limita a microorganismos que prosperan en entornos de baja humedad, restringiendo así el número de procesos y productos en comparación con los cultivos sumergidos.

- Los tiempos de cultivo son principalmente más extensos que en los cultivos sumergidos, dado el menor ritmo de crecimiento específico de los microorganismos, principalmente hongos. Esto se traduce en rendimientos inferiores a los obtenidos en los cultivos sumergidos.
- El escalamiento presenta problemas asociados a transferencia de masa y calor.

Tanto las ventajas como las desventajas antes mencionadas deben ser consideradas como relativas o como señales de tendencias generales ya que existen ejemplos de procesos con resultados satisfactorios que pudieran contradecir algunas de ellas. En todo caso la recomendación más sabia es escoger como técnica de cultivo (FES o sumergido en líquido) para un proceso particular aquella que mejores resultados aporte.

2.1.3 Comparación entre los cultivos en medio sólido y los sumergidos

En la tabla 1 se resumen las principales diferencias que existen entre las técnicas de cultivo sobre sustratos sólidos y las de cultivos sumergidos (31):

Tabla 1. Diferencias principales entre cultivos sumergidos y cultivos sobre soportes sólidos.

Cultivos sobre sustratos sólidos	Cultivos sumergidos en líquidos
El medio de cultivo no es fluido	Casi siempre el medio de cultivo es fluido
La disponibilidad de agua es la suficiente para garantizar el crecimiento óptimo y el metabolismo del microorganismo. El agua presenta una proporción pequeña en el volumen del medio.	La disponibilidad de agua es abundante sin considerarse el verdadero requerimiento. El agua ocupa la proporción mayor del volumen de medio
Durante el desarrollo del proceso es común la presencia de gradientes de concentración de nutrientes y productos	Los gradientes de nutrientes y productos durante el proceso pueden mantenerse en una magnitud despreciable
Los requerimientos de control durante el proceso se concentran en la remoción del calor metabólico y el suministro de oxígeno	Casi siempre se realiza el control riguroso de la mayoría de los parámetros medibles
La aireación suministra el oxígeno y remueve el calor metabólico y los productos gaseosos	La aireación suministra el oxígeno y remueve los productos gaseosos. El calor metabólico se extrae a través de superficies de intercambio con agua de enfriamiento
El crecimiento de hongos se caracteriza por la penetración de las hifas en el interior de las partículas sólidas	El crecimiento de hongos ocurre en forma de micelios, de pellets distribuidos uniformemente en el medio líquido
La concentración del producto en el sólido cosechado es alta	La concentración del producto en el líquido de cosecha es mucho más baja en comparación con la del medio sólido

2.1.4 Variables que influyen en los procesos de FES

Similar a los cultivos sumergidos, hay varias variables que influyen en la respuesta celular durante la FES. Entre ellas, se destacan la temperatura, el pH, la concentración y

disponibilidad del sustrato, el tamaño de partículas, la humedad y la actividad del agua. Las primeras tres variables afectan a la célula de manera similar a como lo hacen en los cultivos sumergidos.

Las tres últimas variables mencionadas tienen una influencia específica en los procesos de fermentación en estado sólido debido a las condiciones particulares en las que estos se desarrollan.

Con relación al tamaño de partículas, este influye en la transferencia de masa, dividiendo el análisis en transferencia intrapartícula e interpartícula. El ensayo experimental con diferentes formas y tamaños de partículas ha sido la metodología más empleada para determinar el tamaño óptimo **(18)**.

El porcentaje de humedad puede variar entre 30% y 80%, dependiendo del sólido utilizado, el microorganismo y el objetivo del proceso. Tanto el exceso como la falta de humedad pueden tener efectos negativos, como contaminación, reducción del espacio interpartículas y dificultades en la difusión de nutrientes **(28)**.

La actividad del agua (a_{H_2O}) se utiliza para cuantificar las interacciones físicas y/o químicas entre el agua y los componentes del medio de cultivo. Esta actividad se define como la humedad relativa de la atmósfera gaseosa en equilibrio con la del sustrato. La propuesta de utilizar soportes inertes de alta capacidad de absorción de líquido, como el bagazo de caña, ha mostrado ser una solución viable para mantener la actividad del agua por encima del valor crítico para el desarrollo del proceso **(32)**.

La isoterma de adsorción revela tres regiones de disponibilidad de agua para los microorganismos, siendo la última (humedad > 50%) donde se lleva a cabo la fermentación en estado sólido. La actividad del agua no solo afecta el crecimiento, sino también la formación de productos, y su control puede hacer que el sistema sea selectivo para una especie de microorganismo sin depender de medidas extremas de asepsia durante el proceso **(32)**.

2.1.5 Control de temperatura en los procesos de FES

Debido a la imposibilidad hasta el momento de medir y por tanto de controlar en los procesos de FES un determinado conjunto de variables comúnmente controladas en los cultivos sumergidos (ejemplo el pH, la concentración de algún sustrato o producto) la estrategia seguida con la FES ha sido tratar de controlar la temperatura como una vía para disminuir los gradientes del resto de las variables basándose en la reflexión siguiente: Si en el tiempo de inicio del proceso las concentraciones de todos los nutrientes, la del inóculo, el valor del pH y de todas las variables son uniformes en el espacio y se logra mantener la temperatura del cultivo durante el proceso de manera uniforme y en el valor deseado, se podrá esperar que el desarrollo del microorganismo será uniforme en el espacio y por tanto las variaciones de todas las variables también, de manera que no se crearán gradientes en el sistema (33, 34).

El control de la temperatura se ha tratado a través de métodos convencionales de extracción de calor y de métodos no convencionales.

Los métodos convencionales incluyen el intercambio de calor por los mecanismos de conducción y convección forzada. Se ha demostrado que los primeros no son tan efectivos como los segundos. Sin embargo, los métodos de extracción de calor por convección para ser efectivos requieren de elevadas tasas de aireación que con frecuencia deshidratan al medio.

Los métodos no convencionales se refieren a la utilización del calor latente de vaporización del agua para eliminar el calor metabólico de manera rápida y efectiva. Hoy se reconoce que el flujo de aire es la vía más efectiva para lograr el control de la temperatura aunque el mismo juega otras funciones importantes para el proceso como son suministrar el oxígeno necesario y extraer el CO₂ formado, de manera que el flujo óptimo de aire debe tomar en consideración la naturaleza del microorganismo utilizado, los requerimientos de oxígeno para el crecimiento y/o la formación del producto deseado, la velocidad de generación de calor metabólico, la concentración crítica del dióxido de carbono y de metabolitos volátiles entre otros. Por lo general el flujo de aire debe ir aumentándose gradualmente durante el proceso para controlar la temperatura.

También se reconoce que la manera más efectiva de extraer el calor metabólico mediante el flujo de aire es a través de la evaporación de una parte de la humedad del medio de cultivo (método no convencional). En algunos casos sobre todo cuando la velocidad de generación de calor metabólico es muy alta esta forma de control puede constituir un problema ya que requeriría de un cambio grande de la humedad y de la actividad del agua lo que puede a su vez provocar afectaciones en el microorganismo. Por lo tanto, para evitar estas afectaciones es necesario tener en cuenta no solo el valor del flujo de aire, la humedad y la temperatura del aire, sino también la influencia de la humedad del medio de cultivo y de la actividad del agua sobre el microorganismo. Será necesario resolver entonces simultáneamente los balances de energía y de agua en el proceso.

2.1.6 Variables a considerar en el diseño de sistemas fermentativos en FES

A continuación, se relacionan aspectos importantes que deben tenerse en cuenta de manera integrada para el diseño y la operación de un proceso de FES con vistas a lograr un control eficiente de la temperatura. Los aspectos se clasifican en tres grupos **(31)**.

Variables o aspectos de operación a considerar:

- La temperatura de entrada del aire
- La humedad de entrada y de salida del aire
- El flujo de aire
- La humedad del medio de cultivo
- La forma de llenado del biorreactor al inicio del proceso
- La velocidad y frecuencia de agitación para el caso de biorreactores dinámicos
- La altura de la cama de sólidos para el caso de biorreactores de cama fija

Variables asociadas al microorganismo:

- La forma del patrón de crecimiento
- La tasa específica de crecimiento
- El valor de los coeficientes de rendimiento de interés para el proceso (Y_x/s , Y_p/s , etc.)

Variables de diseño del biorreactor:

- Tipo de geometría
- Tipo de biorreactor (estático, semi dinámico o dinámico)
- Tipo de agitador para el caso de biorreactores dinámicos o semidinámicos

2.1.7 Obtención de enzimas mediante FES de sistemas fúngicos

Las principales aplicaciones de la fermentación en estado sólido implican procesos que explotan sistemas fúngicos y, en menor medida, sistemas bacterianos (35). Los sistemas fúngicos son una opción obvia, ya que estos sistemas requieren matrices de soporte sólidas para su crecimiento en circunstancias naturales (36). En los hábitats naturales, los hongos crecen sobre madera, corteza, hojas de plantas, materia orgánica en descomposición y otras superficies húmedas (37). Dada esta tendencia al crecimiento adherido en entornos naturales, los hongos se han explotado al máximo. Las enzimas producidas por SSF incluyen celulasas (38), hemicelulasas (39), pectinasas (40), amilasas (41), galactosidasas (42), cafeinasas (43), taninasas (44), proteasas (45), etc.

2.2 *Neurospora crassa*

Neurospora crassa se había reconocido desde 1843 como un hongo filamentoso con esporas asexuales de color naranja brillante. Se estudió ampliamente en Francia en la década de 1840 con la esperanza de controlar una infestación epidémica de panaderías, y más tarde se reconoció como un contaminante de las plantas de procesamiento de caña de azúcar y de la vegetación quemada. El estadio sexual de las especies de *Neurospora*, descrito completamente por Shear y Dodge (46), inició nuestra comprensión actual del género.

2.2.1 Ciclo de vida de *Neurospora crassa*

La figura 1 representa el esquema del ciclo de vida de *Neurospora crassa*. Las etapas 1-4, desde la germinación de la ascospora hasta la fecundación, constituyen la fase vegetativa, y las etapas 4-8, desde la fecundación hasta la maduración de la ascospora, constituyen la fase sexual. La fusión nuclear y la profase meiótica se producen 4-5 días después de la fecundación a 25 °C. Las ascosporas salen disparadas del peritecio a partir del noveno día.

- 1- Las ascosporas negras, de aproximadamente $17 \times 26 \mu\text{m}$, pueden aislarse manualmente de una superficie de agar sin necesidad de utilizar aparatos de micromanipulación. La latencia de las ascosporas se rompe con calor o productos químicos. Se muestra una ascospora en germinación, con hifas creciendo desde ambos extremos.
- 2- El micelio está formado por hifas ramificadas y filiformes compuestas por células multinucleadas separadas por paredes transversales perforadas a través de las cuales pueden pasar fácilmente los núcleos y el citoplasma. El crecimiento lineal de las hifas puede superar los 5 mm/h a 37°C .
- 3- Las esporas vegetativas son de dos tipos de desarrollo distintos: conidios anaranjados pulverulentos de $6\text{-}8 \mu\text{m}$ de diámetro, en su mayoría multinucleados, y microconidios más pequeños, que son uninucleados.
- 4- Los protoperitecios se forman por enrollamiento de las hifas alrededor de las células ascogoniales. Las hifas especializadas, los tricoginos, son atraídas por células del tipo de apareamiento opuesto, de las que recogen núcleos y los transportan al ascogonio dentro del protoperitecio. Los núcleos fecundantes pueden proceder de macroconidios, microconidios o micelio. Por lo general, sólo un tipo nuclear fecundante contribuye al contenido de un peritecio, pero pueden darse excepciones que se ponen de manifiesto cuando el progenitor fecundante es heterocariota (47).

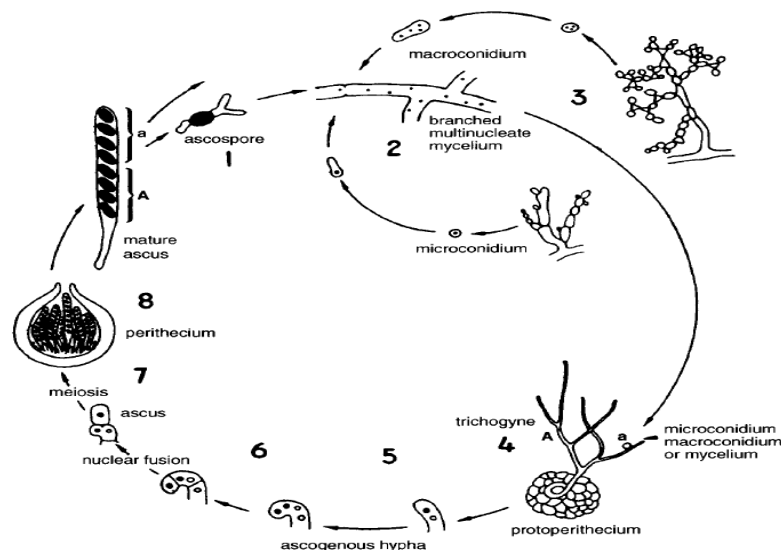


Figura 1. Ciclo biológico de *Neurospora crassa*.

- 5- Tras la fecundación, los núcleos haploides A y a no se fusionan, sino que proliferan en hifas ascógenas heterocarióticas.
- 6- La división conjugada final antes de la formación del ascus se produce en una estructura binucleada en forma de gancho, el báculo. Los núcleos de tipo de apareamiento opuesto se fusionan, y el núcleo diploide del cigoto entra inmediatamente en meiosis. El núcleo de fusión es el único núcleo diplonte presente en el ciclo biológico de este microorganismo. Hasta la formación de las paredes de la ascospora tras una mitosis postmeiótica, el ascus sigue siendo una célula única e indivisa en cuyo interior los dos genomas parentales están presentes en una proporción 1:1 en un citoplasma común.
- 7- Los ascos dentro de un peritecio no se desarrollan sincrónicamente. Numerosos ascos se inician sucesivamente a partir de la misma hifa ascógena. Los ascos maduros de ocho esporas miden unos 20 x 200 μm (48).
- 8- La pared peritecial es de origen materno. Cada peritecio maduro, de 400-600 μm de diámetro, desarrolla un pico que termina en una osteola a través de la cual se disparan forzosamente las ascosporas en grupos de ocho, cada uno de los cuales comprende el contenido de un asco (49).

2.2.2 Requerimientos nutricionales de *Neurospora crassa*

Neurospora tiene unos requisitos nutricionales modestos. Los diversos medios mínimos para *Neurospora crassa* y otras especies del género (50) incluyen un azúcar (glucosa o sacarosa), una fuente de nitrógeno (tanto las sales de amonio como las de nitrato favorecen el crecimiento), fosfato, sulfato, potasio, magnesio, calcio, metales traza y una pequeña cantidad de la vitamina biotina.

El organismo crece bien con una variedad de mono y disacáridos como fuentes de carbono y puede digerir carbohidratos complejos como el almidón y la celulosa, como sugiere su capacidad para crecer en vegetación quemada. *Neurospora crassa* utiliza muchos aminoácidos y proteínas como fuentes de nitrógeno; algunos aminoácidos pueden utilizarse también como fuentes de carbono; y la metionina y la cisteína sirven como fuentes alternativas de azufre. *Neurospora* puede obtener su azufre de otras formas orgánicas como los arilsulfatos. Puede crecer en fosfatos orgánicos complejos como el ácido nucleico.

2.2.3 Ciclos circadianos en *Neurospora Crassa*

El hábitat natural de *Neurospora* incluye la exposición a la luz, y el organismo tiene una variedad de respuestas apropiadas a la luz. Una es el fototropismo que presentan las hifas aéreas, otra la formación de carotenoides miceliales conidiales inducida por señales lumínicas **(51)**. Otra, mencionada anteriormente, es el fototropismo del pico peritecial y la eyección direccional de las ascosporas. Tales respuestas están correlacionadas con la existencia de un reloj biológico **(52)**. El reloj es independiente de la temperatura, es arrastrado (reajustado) por la luz, y se manifiesta en el calendario de expresión de muchos genes.

Los relojes circadianos son cronómetros celulares endógenos que controlan una gran variedad de ritmos fisiológicos y moleculares diarios en organismos eucariontes y algunos procariontes **(52)**.

La tres propiedades básicas de los ciclos circadianos son:

- 1- Persisten en condiciones constantes con un período de unas 24 h.
- 2- Pueden reajustarse por señales ambientales, siendo la temperatura y la luz, las señales más importantes.
- 3- Estos están compensados por la temperatura, es decir, la duración del período del ritmo es estable en una amplia gama de temperaturas fisiológicas.

Las investigaciones del sistema de reloj circadiano de *Neurospora crassa* han dilucidado mucho de los mecanismos básicos que subyacen a los ritmos circadianos, incluyendo la retroalimentación negativa **(52)**.

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1 Microorganismo

En el presente trabajo se utilizará una cepa de *Neurospora crassa* FGSC#9717 Δ mus-51::bar⁺; mat A his-3) auxótrofa a histidina.

3.2 Medio de cultivo

Para el mantenimiento y crecimiento de las cepa de *Neurospora crassa* se utilizará medio mínimo de Vogel (MMV), que contiene sales de Vogel 1X (100 mL de sales de Vogel 50X contienen: 12.35 g de Citrato de Sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g de Fosfato de potasio monohidratado (KH_2PO_4), 10 g de Nitrato de Amonio (NH_4NO_3), 0.49 g de Sulfato de Magnesio Anhidro (MgSO_4), 0.38 g de Cloruro de calcio anhidro (CaCl_2), 500 μL de elementos traza, 250 μL de solución de biotina a una concentración inicial de 0.1 mg/mL) y sacarosa al 1.5 %. También se añaden 20 μg de histidina por cada 15 mg de sacarosa.

3.3 Preparación del inóculo

Se inocularon matraces Erlenmeyer (250 mL) con 50 mL de medio Vogel modificado con sacarosa como fuente de carbono e inductor para la producción de invertasa y 1.5% (p/v) de agar con *Neurospora crassa* y se incubaron a 30 °C durante 4 días. Las esporas se recuperaron con 50 mL de Tween 80 estéril al 0.05% (v/v). Se utilizaron 200 μL de la suspensión de esporas para inocular matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio Vogel modificado con 1.5% de sacarosa y 1.5% de agar. Tras cinco días a 30 °C, se cosecharon las esporas y se utilizaron como inóculo para los estudios de FES.

3.4 Preparación del soporte para estudios de FES

Se utilizó espuma de poliuretano (PUF, con una densidad de 17 kg/m³) como soporte para los sistemas de FES. El PUF se cortó en cilindros (de 5.4 cm de diámetro, 3.0 cm de altura y 2.47 g $\pm$ 0.06 g de peso seco). Los cilindros se lavaron exhaustivamente con agua del grifo y posteriormente, se enjuagaron con agua destilada. Después, se secaron a 60 °C y se almacenaron en condiciones de sequedad y oscuridad.

3.5 Condiciones de cultivo

Se utilizaron matraces Erlenmeyer que contenían un cilindro de PUF seco con 9 ± 1 , 17 ± 1 y 34 ± 1 mL de medio de cultivo inoculado (2×10^7 conidios/ g de PUF seco) para tener las proporciones volumen de medio de cultivo a masa de PUF de 5, 10 y 15 mL/g, respectivamente. Los matraces Erlenmeyer con medio de cultivo inoculado se conectaron al metabolímetro y se incubaron a 30 °C hasta el final del cultivo, determinado por la ausencia de producción de CO₂. Antes de la inoculación la mitad del medio de cultivo se añadió en los matraces que contenían un cilindro de PUF por matraz y la otra se colocó en tubos Falcon. Se esterilizaron a 120 °C durante 15 minutos. Tras la esterilización, los inóculos se añadieron a los tubos Falcon y posteriormente se transfirieron a los matraces que contenían un cilindro de PUF. Cada condición experimental se evaluó por triplicado. Las variables respuestas se analizaron mediante ANOVA unidireccional. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de múltiples rangos de Duncan ($\alpha = 0.05$). Las diferencias estadísticas ($p < 0.001$). Los análisis se realizaron mediante el uso del programa informático Statgraphics Centurion XVI..

3.6 Análisis respirométrico

La producción de CO₂ se utilizó como indicador del crecimiento de los microorganismos. El aire proveniente de un compresor se hizo pasar a través de agua (destilada) para humidificarlo. El aire húmedo se introdujo en las unidades experimentales para proveer el O₂ necesario para la respiración del microorganismo y remover el CO₂ y parte del calor generado por la actividad metabólica del mismo. El aire a la salida de los matraces se pasó por una columna empacada con sílica-gel para deshidratarlo. El aire seco pasó a través de un metabolímetro que registra automáticamente los valores de flujo y la concentración de CO₂ en unidades porcentuales (mL/100mL aire). Los datos se emplearon para estimar parámetros cinéticos como el tiempo de la fase de retardo, la tasa específica de producción de CO₂, la tasa máxima de producción de CO₂ y la producción final de CO₂.

3.7 Determinación de la biomasa seca

La biomasa producida se determinó gravimétricamente. El cilindro de PUF contenido en cada matraz se extrajo con 50 mL de agua destilada, se exprimió para obtener el extracto

celular utilizado para todas las determinaciones (sacarosa, proteína extracelular y actividad invertasa). A continuación, el cilindro de PUF extraído se transfirió al embudo Büchner con papel de filtro y se filtró al vacío. El cilindro extraído y enjuagado con el papel de filtro se secó a 60 °C hasta peso constante. El peso de la biomasa se corresponde a la diferencia del peso total menos los pesos secos del papel de filtro y del cilindro. La estimación de biomasa se realizó por triplicado.

3.8 Determinación de azúcares totales

Las concentración inicial y final de azúcares totales se determinaron mediante el método de fenol- ácido sulfúrico (53).

3.9 Cuantificación de proteínas extracelulares

El ensayo de cuantificación de proteínas se realizó con el método desarrollado por Bradford en 1976. Este es un método colorimétrico que consiste en la cuantificación de la unión de un colorante, azul de Coomassie a la proteína (54).

En tubos Eppendorf de 1.5 ml se añaden 800 µL de los sobrenadantes libres de células. Posteriormente se añade a cada tubo 200 µL de reactivo de Bradford sin diluir. El contenido de los tubos se homogeniza mediante la utilización de un Vortex. Luego, se dejan incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos, y no más de 60. Posteriormente, se ajustó el lector el espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda y se miden las absorbancias de las muestras.

Finalmente, se determina la concentración de proteína en las muestras utilizando una curva de calibración confeccionada con anterioridad. Si se hizo una dilución debido a que la cantidad de proteínas presentes era excesiva, se toma en cuenta el factor de dilución que se utilizó para obtener la concentración de proteína

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1 Efecto de la concentración de nutrientes del medio de cultivo y la relación volumen de medio de cultivo: peso de soporte inerte sobre el crecimiento y la producción de proteína extracelular por *Neurospora crassa*

Este experimento se realizó para determinar el efecto de la concentración de nutrientes (F.C) y la relación volumen de medio / peso de soporte inerte (VC/PI) sobre el crecimiento celular y la producción de proteína extracelular por *Neurospora crassa* en fermentación sólida sobre espuma de poliuretano. Para esto, se decidió realizar un diseño de experimento del tipo multifactorial con dos factores a tres y cuatro niveles según el factor, para un total de 36 corridas experimentales, incluyendo dos réplicas, que se realizó en 4 bloques de trabajo. Los factores y niveles que estudiar se muestran en la tabla 2. Se prepararon medios de cultivo concentrados para alcanzar la concentración inicial de sacarosa indicada; esto para mantener la misma proporción de todos los componentes del medio de cultivo.

Tabla 2. Diseño experimental.

Factor	Nivel			
Concentración de sacarosa (g/L)	15	50	100	150
Relación VC/PI (mL/g)	5	10	15	

Condiciones de cultivo:

- Matraces de 250 mL de volumen nominal.
- Ciclos de oscuridad: Luz blanca (12:12)
- Temperatura a 30 °C

Las variables de respuesta fueron parámetros de producción de biomasa (X), concentración de proteína extracelular (PE) y otros parámetros asociados al crecimiento celular y la secreción de proteínas. El objetivo fue encontrar la condición de mayor secreción de proteínas extracelulares.

La figura 2 representa las interacciones entre la relación volumen de cultivo/peso de soporte inerte y concentración inicial de sacarosa respecto a parámetros asociados al crecimiento celular

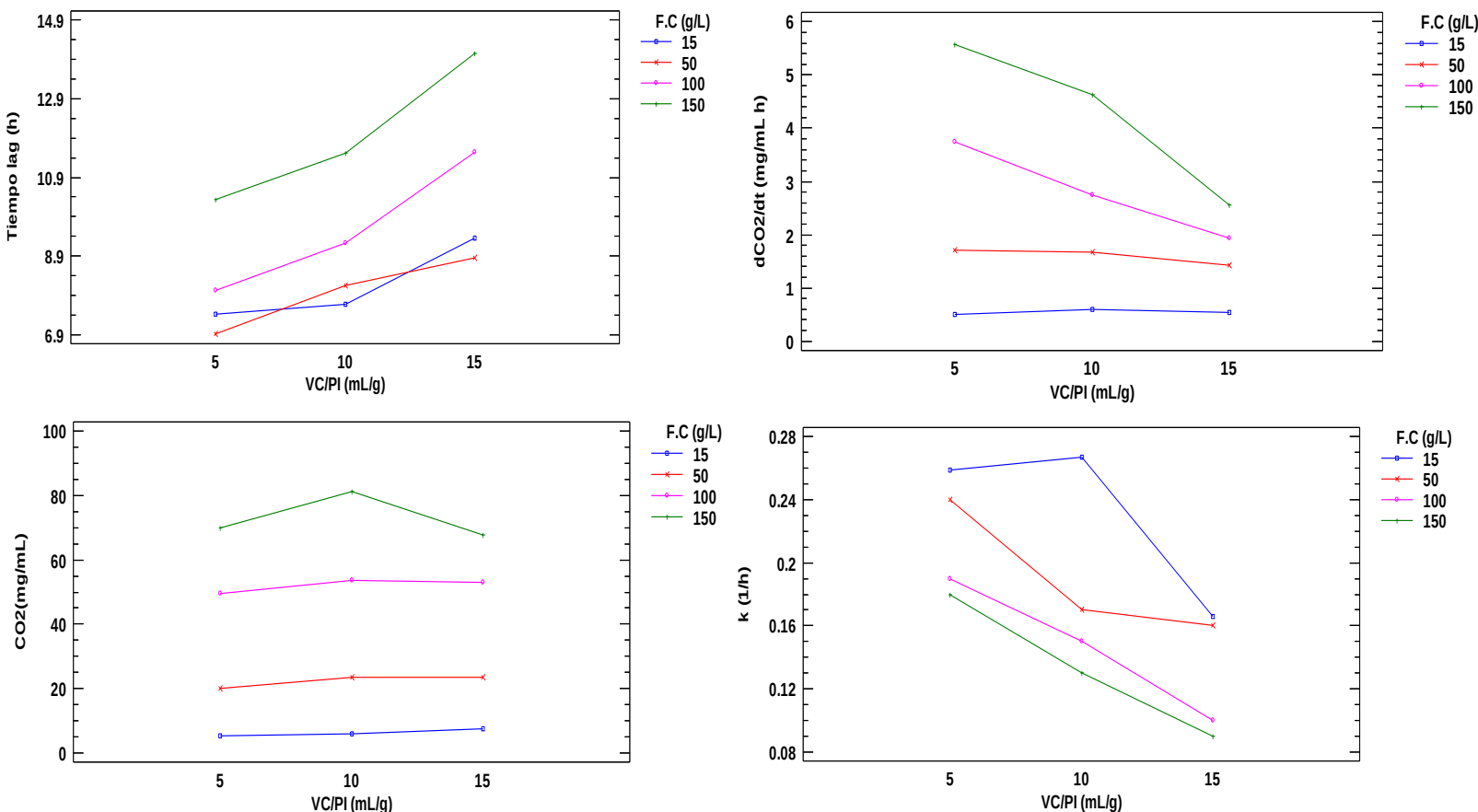


Figura 2. Parámetros asociados a la producción de CO_2 por *Neurospora crassa* en cultivo sólido sobre PUF

La duración de la fase lag en todos los cultivos aumenta al incrementarse tanto la relación volumen de medio/ peso de inerte (menos del 40%) como la concentración inicial de sacarosa en el medio (alrededor de 50%), siendo de estos dos factores la concentración de la fuente de carbono el que más afecta a este parámetro, lo que se corrobora con el diagrama de Pareto (figura 3). Para el mismo intervalo de relaciones VC/PI se observa que a las concentraciones de sacarosa más bajas la tasa máxima de producción de CO_2 (dCO_2/dt) permanece prácticamente constante, mientras a las concentraciones más altas de la fuente de carbono, a medida que aumenta la relación VC/PI, la dCO_2/dt máxima disminuye. El máximo valor de la tasa de producción de dióxido de carbono se obtiene con la combinación de concentración inicial de sacarosa de 150 g/L y relación VC/PI de 5 mL/g.

Para cada concentración inicial de sacarosa, la producción de dióxido de carbono (CO_2) permanece prácticamente constante con el aumento de la relación VC/PI, indicando que este parámetro del crecimiento es de forma aproximada independiente de esta variable. La tasa específica de producción de CO_2 (k) disminuye al incrementarse la concentración inicial de sacarosa, obteniéndose los valores máximos para los cultivos con 15 g/L inicial de sacarosa y las relaciones VC/PI de 5 y 10. El rendimiento de producción de CO_2 por sacarosa consumida de los cultivos estuvo comprendido entre 0.39 y 0.55 g CO_2 / g de sacarosa, siendo el valor promedio de aproximadamente 0.49 g CO_2 / g de sacarosa (3.81 mol CO_2 / mol sacarosa).

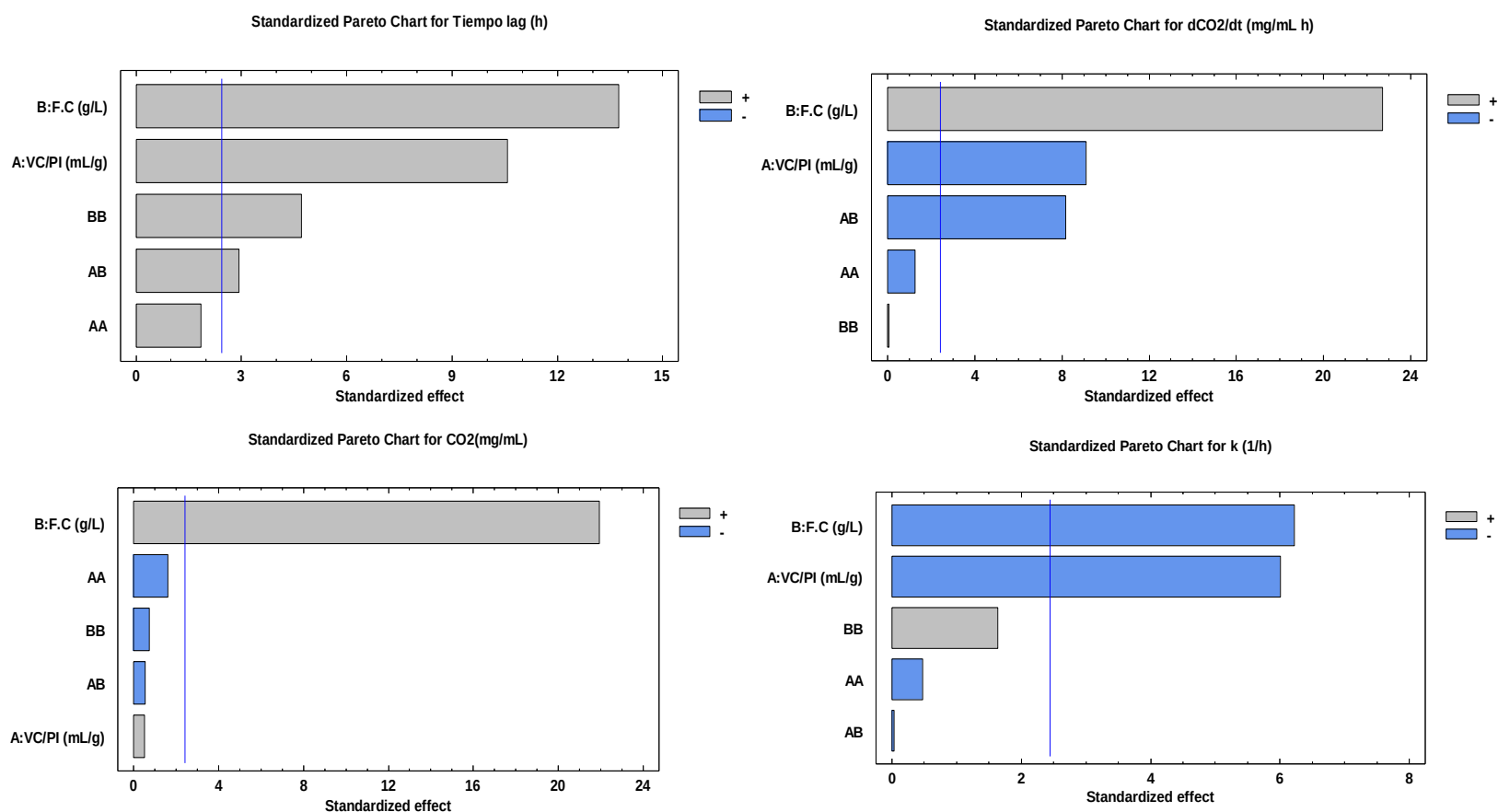


Figura 3. Diagrama de Pareto estandarizado para los parámetros de crecimiento.

En la figura 3 se presenta el diagrama de Pareto estandarizado para los parámetros de crecimiento. Este indica el orden en que los factores, sus interacciones y efectos cuadráticos afectan a las variables respuesta y si dicho efecto es positivo o no. En ella se aprecia que la concentración inicial de sacarosa es sin dudas el factor que afecta más

significativamente a todas las variables de estudio, afectando positivamente a tres de estas y de forma negativa únicamente a k, indicando que este parámetro se favorece empleando el nivel bajo de la fuente de carbono. Con respecto a la relación VC/PI, este factor es no significativo únicamente para la producción de dióxido de carbono.

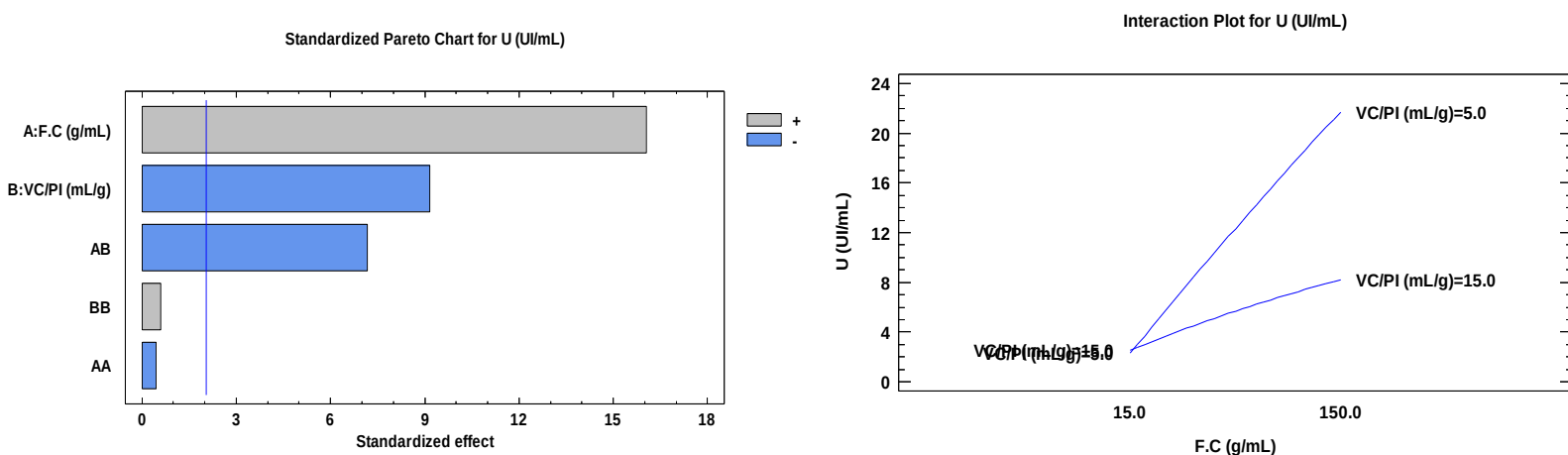


Figura 4. Diagrama de Pareto y gráfico de las interacciones de los factores estudiados sobre la actividad enzimática de Invertasa

La figura 4 a) muestra que la actividad invertasa está fuertemente influenciada por los factores de estudio, así como por la interacción de estos. Como toda enzima inducible, al aumentar la concentración del sustrato sobre el cual actúa, se estimula su síntesis y producción, lo que significa una mayor actividad enzimática, de ahí que la concentración inicial de sacarosa sea el factor que mayor efecto tiene sobre la actividad invertasa y que influye de manera positiva sobre esta variable respuesta. La figura 4 b) muestra como a bajas concentraciones de sacarosa no existen diferencias significativas entre los valores de actividad obtenidos independientemente de los valores VC/PI que se empleen, y que dichas diferencias van cobrando importancia o significación a medida que se incrementa la concentración de sacarosa, siendo la mejor combinación para la producción de invertasa una concentración inicial de 150 g/ L con una relación VC/PI de 5.0 mL/g.

La concentración de biomasa obtenida al final de los cultivos para cada concentración inicial de sacarosa permanece prácticamente constante al aumentar la relación VC/PI (figura 5), siendo de acuerdo con el análisis ANOVA independiente de este factor (tabla 3). En el caso de la concentración de proteína extracelular para los niveles de mayor concentración de

sacarosa, a medida que se incrementa la relación VC/PI disminuye y para los niveles bajos de concentración permanece prácticamente constante, de acuerdo con el análisis ANOVA (tabla 4) ambos factores influyen en esta variable respuesta siendo la concentración de sacarosa el factor de mayor impacto. Para ambas variables de estudio el máximo valor se obtiene al emplear la combinación nivel bajo de VC/PI/ nivel alto de concentración inicial de sacarosa.

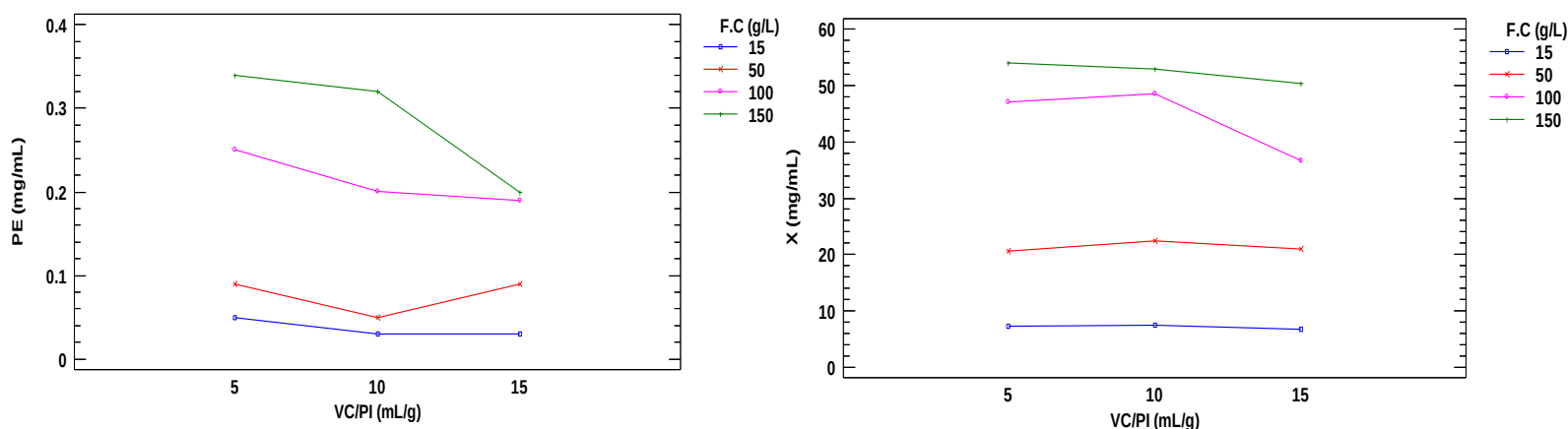


Figura 5. Producción de biomasa y proteína extracelular en los cultivos sólidos de *Neurospora Crassa*

Tabla 3. Análisis estadístico del diseño experimental para la variable respuesta PE. *Valores significativos.

Término	Coefficiente estimado	F-value	P-value
Intercepto	-0.00663343	-	-
A: VC/PI	-0.00196041	6.27	0.0463*
B: F.C	0.00299167	110.10	0.0000*
AA	0.0002	0.06	0.8129
AB	-0.0000957409	4.38	0.0813
BB	-4.49746E-7	0.01	0.9295
R ²	95.2427	-	-

Tabla 4. Análisis estadístico del diseño experimental para la variable respuesta X. *Valores significativos

Término	Coefficiente estimado	F-value	P-value
Intercepto	-10.2142	-	-
A: VC/PI	1.86355	2.26	0.1833
B: F.C	0.644471	304.42	0.0000*
AA	-0.09375	1.18	0.3185
AB	-0.0044102	0.82	0.4006

BB	-0.00153305	8.70	0.0256*
R²	98.1294	-	-

A pesar de que la mejor condición para la secreción de proteína extracelular es el empleo de nivel bajo relación VC/PI combinado con el nivel alto de concentración inicial de sacarosa inicial, esta condición coincide con la mayor duración de la fase lag. Desde el punto de vista técnico el tiempo de la fase lag debe ser lo menor posible, pues afecta negativamente la productividad del proceso. Por esta razón para la siguiente etapa se decidió evaluar el efecto del color de la luz sobre el crecimiento y la producción de proteína extracelular por *Neurospora crassa* manteniendo la relación VC/PI de 5 mL/g y empleando una concentración inicial de sacarosa de 100 g/L. Ya que, al emplear este nivel de concentración en vez del nivel alto, de acuerdo con el modelo polinómico de segundo grado arrojado por el programa Statgraphics Centurion XVI, el tiempo de la fase lag disminuiría de 14.91 h hasta 8.16 horas, disminuyendo en un 45 %. El modelo se encuentra representado por la ecuación 1 y de acuerdo con el coeficiente de regresión múltiple (R^2), esta ecuación ajustada puede explicar el 98.24 % de la variabilidad en la duración de la fase lag.

$$\begin{aligned} \text{Tiempo lag (h)} = & 8.07808 - 0.186877 \left(\frac{VC}{PI} \right) - 0.0294461(F.C) + 0.01716 * \left(\frac{VC}{PI} \right)^2 \\ & + 0.00153812 \left(\frac{VC}{PI} \right) (F.C) + 0.000263114(F.C)^2 \quad (1) \end{aligned}$$

4.2 Efecto del color de la luz sobre el crecimiento y la producción de proteína extracelular por *Neurospora crassa*

En esta etapa se determinó el efecto del color de la luz sobre los parámetros de producción de CO₂, producción de biomasa y secreción de proteína extracelular estudiados en la sección anterior. Para ello se seleccionó un diseño de experimentos del tipo unifactorial categórico de 4 niveles. Estos fueron: luz blanca, azul, roja y verde. En todos los casos se usaron ciclos de cada color de 12 h de oscuridad y 12 h de luz. El experimento se realizó con un total de 12 corridas experimentales, incluyendo tres réplicas.

Condiciones de cultivo:

- Matraces de 250 ml de volumen nominal.
- Ciclos de oscuridad Luz 12:12
- Temperatura 30 °C
- Relación VC/PI de 5mL/g
- Concentración inicial de sacarosa de 100 g/L.
- En todos los casos se llevaron a cabo fermentaciones en total oscuridad a modo de controles.

En las figuras 6, 7 y 8 se ofrecen los gráficos de las medias para obtenidos para el factor estudiado sobre las variables respuestas

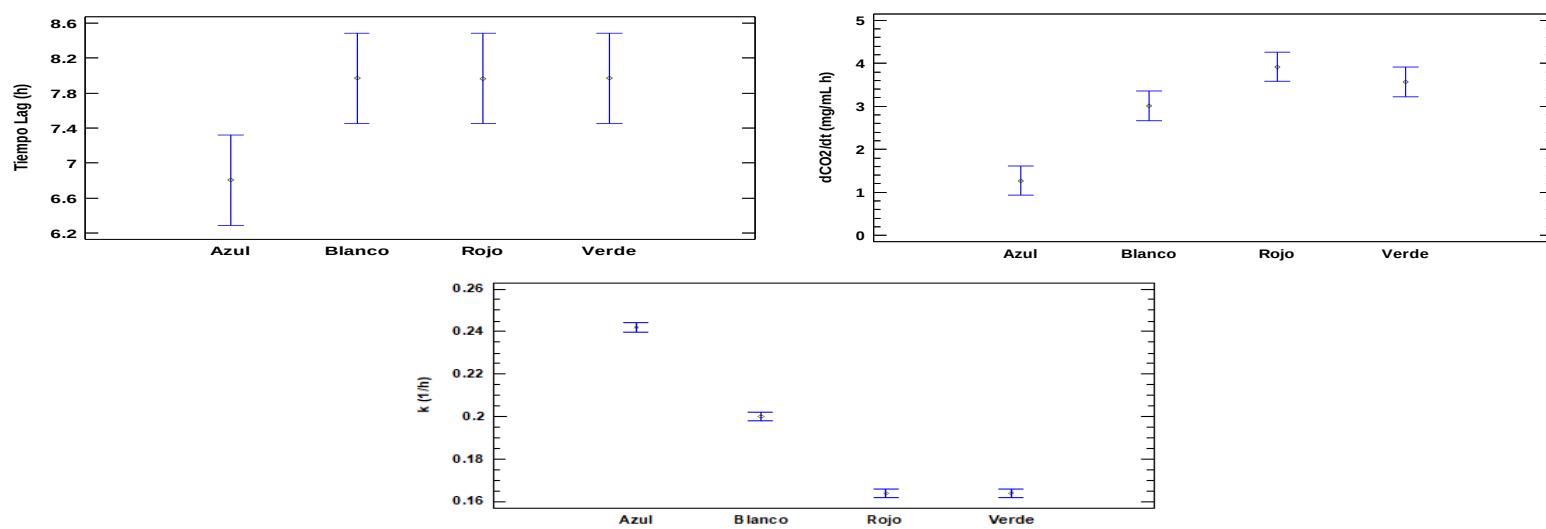


Figura 6. Gráficos de las medias para los parámetros asociados a la producción de CO₂

De acuerdo con la figura 6, los menores valores de duración del período de adaptación y de la tasa de producción de CO₂ se alcanzaron en los cultivos iluminados con luz de color azul y no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de estos parámetros al emplear luz blanca, roja o verde. Sin embargo, la tasa específica de producción de CO₂ no tiene el mismo comportamiento; en este caso los mayores valores se obtienen con luz azul, seguido de los cultivos con luz blanca y los menores valores de este parámetro lo presentan los cultivos con luz roja y verde, no existiendo diferencias en el uso de luz de estos últimos colores.

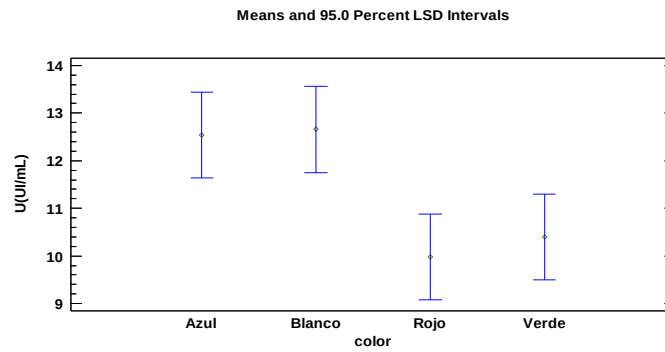


Figura 7. Gráfico de las medias asociado a la actividad enzimática.

La figura 7 demuestra que las mayores actividades de invertasa se alcanzan en aquellos cultivos sometidos a ciclos luz/oscuridad 12/12 con luz azul, mientras los menores se obtuvieron en las unidades experimentales que empleaban luz roja. También demuestra la obtención de dos grupos homogéneos, el primero conformado por los colores que generaron las mayores actividades (blanco y azul) y el segundo por los colores rojo y verde cuyo uso resultó(en las peores condiciones para la variable en cuestión

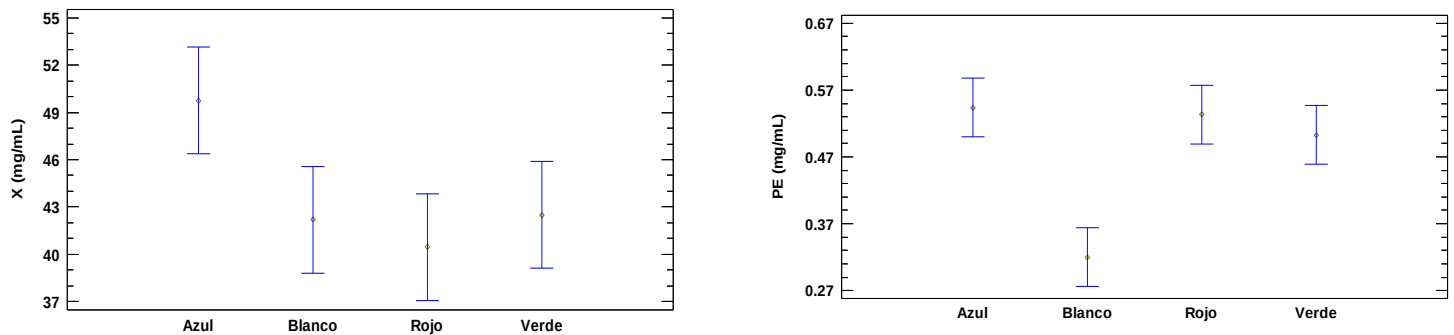


Figura 8. Gráficos de las medias para los parámetros asociados a la producción de biomasa y secreción de proteína extracelular.

El gráfico de las medias para la concentración final de biomasa indica que no existen diferencias al emplear los colores blanco, rojo o verde en las fermentaciones sólidas con *Neurospora crassa*. Con respecto a la producción de proteína extracelular (PE), los menores valores se obtuvieron con luz blanca y, a pesar de que no existen para este parámetro diferencias significativas al emplear azul, verde o rojo desde el punto de vista netamente cuantitativo, en la producción de proteína extracelular los valores obtenidos con luz azul son mayores que los obtenidos con luz roja y, a su vez, estos son mayores que los

obtenidos con luz verde. De acuerdo con los resultados, la luz azul estimula el crecimiento celular y si se considera a la proteína extracelular como un metabolito primario, esta se produce mediante el crecimiento microbiano, siendo su velocidad de síntesis proporcional a la velocidad de crecimiento, de ahí que la luz azul favorezca la secreción de PE. Además, se conoce que la especie *Neurospora crassa* tiene fotorreceptores específicos que son activados por la luz azul y que regulan tanto la expresión génica como el metabolismo (55). Este microorganismo también cuenta con fotorreceptores que se estimulan con la luz color roja (55). Los hongos filamentos captan fotones de la luz mediante la luz visible mediante los pigmentos que poseen (56); en el caso particular de *Neurospora crassa*, su color naranja característico se debe a la neurosporaxantina, pigmento que al ser un carotenoide absorbe fotones mejor en la región azul de la luz visible (57). Y el hecho de que con la luz blanca se obtenga la menor secreción de proteínas extracelulares puede deberse a que esta es la suma de todos los colores comprendiendo todo el intervalo de las longitudes de onda de la luz visible, lo que pudiera provocar una regulación negativa debido a la sobreestimulación de los receptores. Con base en estos resultados se seleccionó la luz azul; y en la próxima etapa se evaluará la influencia de la frecuencia oscuridad: luz sobre los parámetros cinéticos y de producción del cultivo.

4.3 Efecto de la frecuencia de los ciclos Luz: Oscuridad sobre el crecimiento y la producción de proteína extracelular por *Neurospora crassa*

En esta última etapa se determinó el efecto de la frecuencia de ciclos luz/oscuridad sobre los parámetros producción de CO₂, producción de biomasa y secreción de proteína estudiados. Para ello se seleccionó un diseño de experimentos del tipo unifactorial categórico de 3 niveles. Estos fueron: 06:06, 08:08 y 12:12. El experimento se realizó con un total de 12 corridas experimentales, incluyendo tres réplicas.

Condiciones de cultivo:

- Matraces de 250 ml de volumen nominal.
- Luz azul

- Temperatura 30 °C
- Relación VC/PI de 5mL/g
- Concentración inicial de sacarosa de 100 g/L.
- En todos los casos se llevaron a cabo fermentaciones en total oscuridad a modo de controles.

En la tabla 5 se resumen los resultados obtenidos experimentalmente. En las figuras 9 y 10 se ofrecen los gráficos de las medias para obtenidos para el factor estudiado sobre las variables respuesta.

Tabla 5. Efecto de la frecuencia de luz oscuridad en los parámetros fisiológicos asociados a la producción de CO₂, producción de biomasa y proteína extracelular durante el cultivo de *Neurospora crassa* en medio sólido

Frecuencia (h:h)	X (mg/mL)	PE (mg/mL)	U (UI/mL)	Tiempo Lag (h)	dCO ₂ /dt (mg/mL h)	CO ₂ producido	k (1/h)
06:06	38.75 (0.57)	0.43 (0.04)	18.34 (0.65)	9.19 (0.12)	4.08 (0.20)	65.78 (1.44)	0.17 (0.01)
08:08	41.20 (0.45)	0.45 (0.07)	9.60 (0.00)	14.25 (0.01)	4.65 (0.10)	67.63 (0.65)	0.18 (0.00)
12:12	42.81 (2.78)	0.43 (0.06)	18.32 (2.80)	8.84 (0.08)	4.71 (0.12)	69.98 (1.72)	0.19 (0.01)

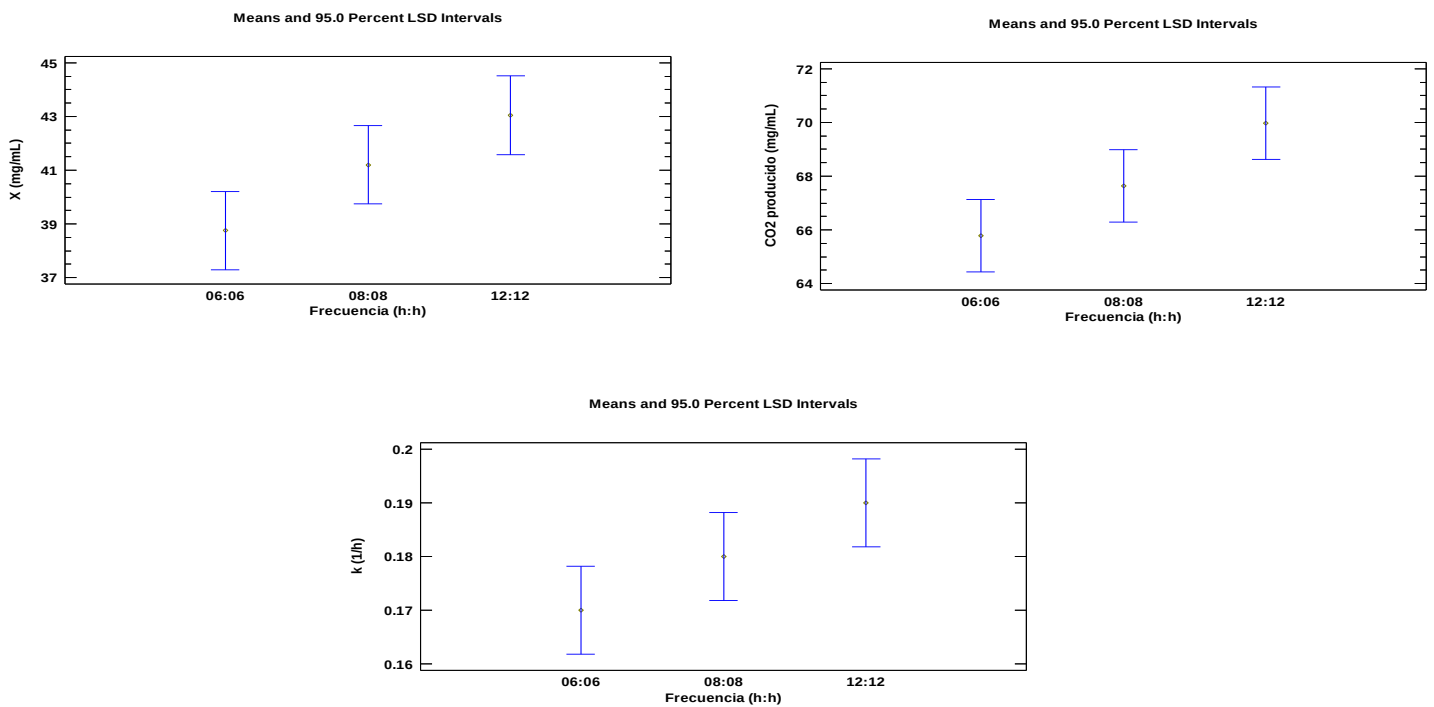


Figura 9. Gráficos de las medias para la biomasa, el CO₂, producido, y la tasa específica de producción de CO₂.

En la figura 9 se agrupan la biomasa, el CO₂ producido y la tasa específica de producción de dióxido de carbono. Como se puede observar, estas tres variables de respuesta siguen la misma tendencia ascendente con el aumento de la frecuencia de los ciclos luz/oscuridad, alcanzando sus valores máximos cuando se emplea la frecuencia 12:12. En este caso existen diferencias significativas entre los niveles 06:06 y 12:12, no siendo así para el resto de las combinaciones del factor de estudio.

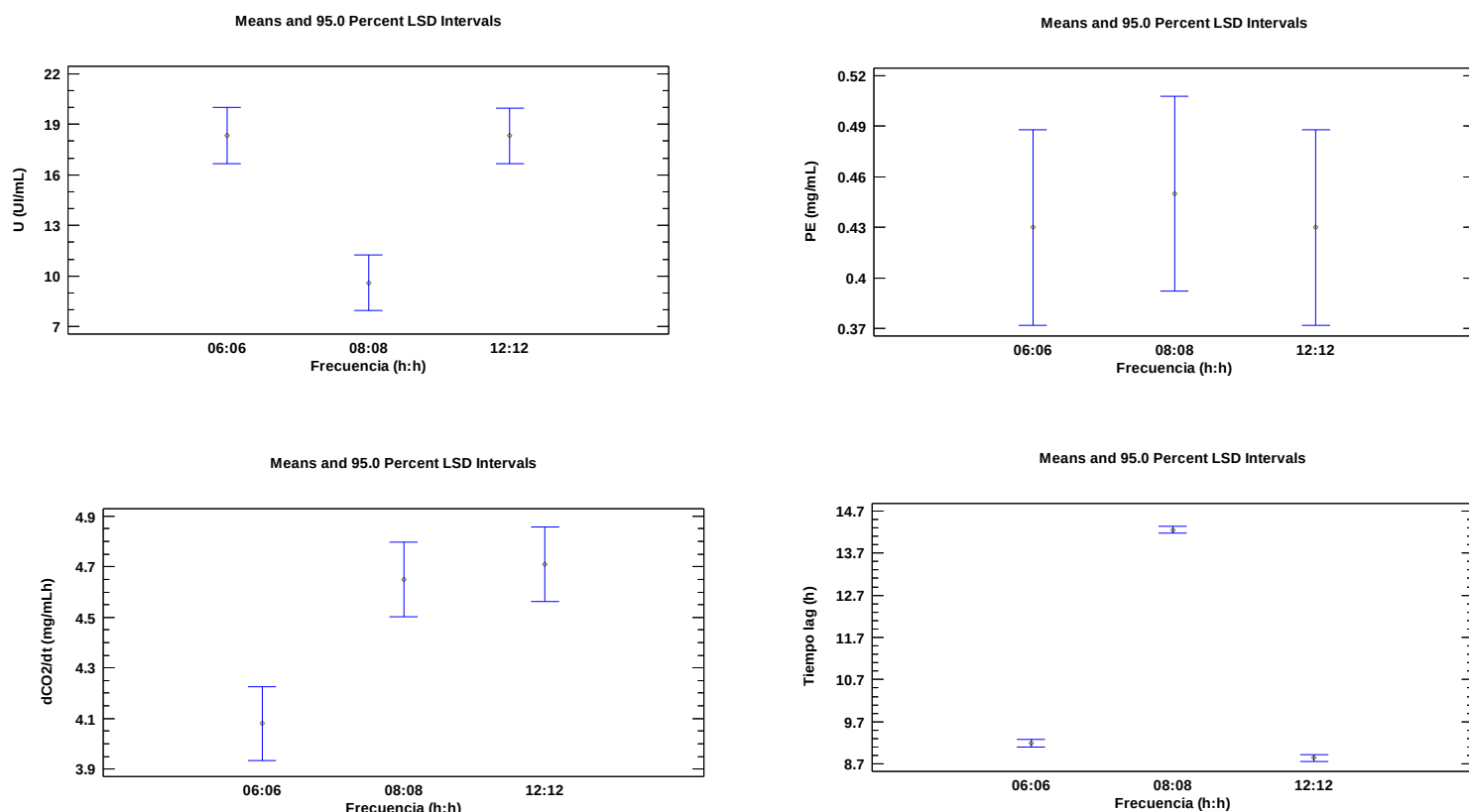


Figura 10. Gráficos de las medias para la actividad invertasa, la secreción de proteína extracelular, tasa máxima de producción de CO₂ y tiempo lag.

La figura 10 agrupa al resto de las variables respuestas estudiadas. Estas tienen la característica de no seguir una tendencia similar, observándose dos situaciones extremas, desde el caso de la proteína extracelular donde no existe ninguna influencia del factor estudiado sobre ella hasta el tiempo lag donde el efecto de la frecuencia es realmente marcado, existiendo diferencias significativas entre todos los niveles analizados del factor de estudio sobre este. La mayor duración del tiempo lag y la mayor producción de proteína extracelular se obtienen con la frecuencia 8:8. El menor tiempo lag y la mayor tasa máxima

de producción de CO₂ se obtienen con la combinación oscuridad:azul 12:12. Sin embargo, con los resultados obtenidos y debido al reducido efecto de las variables estudiadas, se selecciona la relación 12:12, ya que es la que garantiza un menor tiempo de duración para la fase de retraso y por tanto una mayor productividad del proceso. De esta forma quedaron establecidas las mejores condiciones para el proceso de producción de proteína extracelular por *Neurospora crassa* sobre espuma de poliuretano como soporte inerte a escala de matraz de 250 mL; debido a esto se desea el diseño de un fermentador de charolas de escala de banco que permita proveer a este hongo de las condiciones necesarias para reproducir dichos resultados a una mayor escala.

4.4 Propuesta. Biorreactor de Charolas

Se construyó un fermentador de charolas a escala de banco (figura 11). Este dispositivo consta de un armario de un material plástico de 44 x 32 x 68 cm (largo, ancho, altura), con una estructura metálica interna desmontable que soportará 4 bandejas de 30 x 25 cm (largo, ancho). El armario cuenta con un sistema de iluminación y un sistema de control de temperatura.

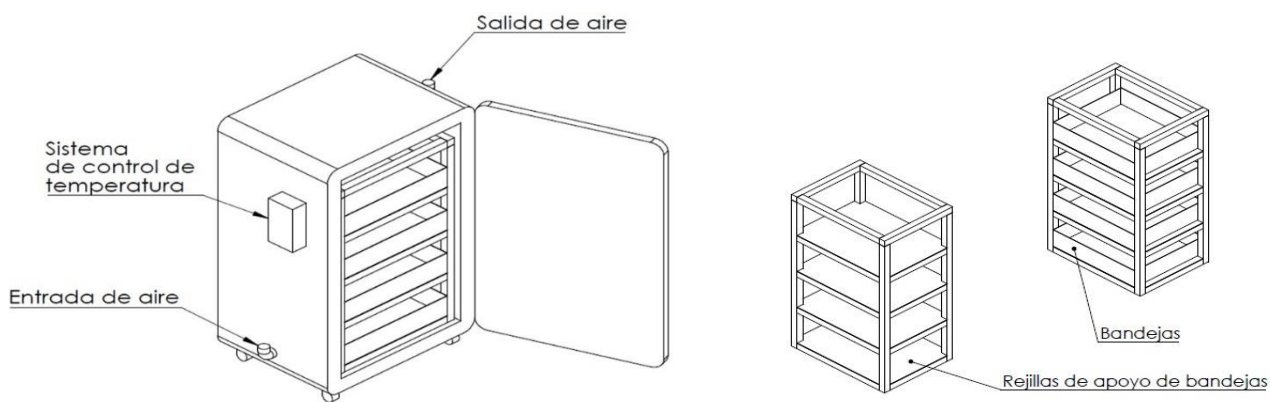


Figura 11. Vistas ortogonales del fermentador de Charolas

Las bandejas pueden deslizarse fácilmente fuera del fermentador, facilitando así la toma de muestras. Todas las dimensiones y demás vistas del fermentador se muestran en el Anexo 1.

4.4.1 Balance de Oxígeno

En esta sección se presenta el balance masa (oxígeno) empleado en la estimación de la altura crítica del lecho y que permite para llevar a cabo las predicciones de los perfiles de concentración de oxígeno. Por último, se presentan los resultados de la modelación obtenidos al estudiar los efectos de la altura del lecho empleando espuma de poliuretano como soporte inerte.

A continuación, se presentan las ecuaciones y el fundamento del modelo propuesto por Tanmay Basak y colaboradores (58). Consideraciones del modelo:

- 1- El oxígeno es el reactivo limitante y la fuente de carbono se encuentra en exceso.
- 2- La reacción es de orden cero respecto a la concentración de oxígeno, pero no procede en ausencia de este.
- 3- La temperatura del lecho es constante.
- 4- La porosidad de la cama, el rendimiento dióxido de carbono/oxígeno y la difusividad efectiva del oxígeno a través del lecho son constantes durante todo el proceso
- 5- No existe resistencia a la transferencia de masa a través de la película de gas.
- 6- Se trata de charolas no perforadas.

A partir de las consideraciones anteriores y del balance de oxígeno gaseoso en una lámina infinitesimal de espesor Δz y tomando el límite cuando Δz tiende a cero, se obtiene.

$$D_e \frac{\partial^2 C_{O_2}}{\partial z^2} - R_{O_2} = \varepsilon \frac{\partial C_{O_2}}{\partial t} \quad (2)$$

Condición inicial: $t = 0$, $C_{O_2} = C_{O_2 atm}$ en toda z

Condición de frontera: $z = 0$, $C_{O_2} = C_{O_2 atm}$; $z = H$, $\frac{\partial C_{O_2}}{\partial z} = 0$

Donde:

C_{O_2} : concentración de oxígeno en la cama g/cm³

$C_{O_2 atm}$: concentración atmosférica de oxígeno g/cm³

D_e : Difusividad efectiva cm²/h

R_{O_2} : velocidad de consumo de oxígeno g/ (cm³ h)

ε : porosidad de la cama

z : eje en dirección al espesor del lecho.

La expresión anterior se puede adimensionalizar a partir de las siguientes relaciones:

$$C^* = \frac{C_{O_2}}{C_{O_2 atm}} \quad y = \frac{z}{H} \quad t^* = \frac{t D_e}{H^2}$$

De esta forma la ecuación diferencial adimensionalizada y las condiciones quedan expresadas de la siguiente manera:

$$\frac{D_e C_{O_2 atm}}{H^2} \frac{\partial^2 C^*}{\partial y^2} - R_{O_2} = \frac{\varepsilon D_e C_{O_2 atm}}{H^2} \frac{\partial C^*}{\partial t^*}$$

$$\frac{\partial^2 C^*}{\partial y^2} - \frac{H^2 R_{O_2}}{D_e C_{O_2 atm}} = \varepsilon \frac{\partial C^*}{\partial t^*}$$

Debido a que este tipo de procesos son relativamente lentos y tardan días en completarse, puede suponerse que los perfiles espaciales de concentración se establecen mucho más rápido que los perfiles temporales. De este modo el término $\frac{\partial C^*}{\partial t^*}$ puede despreciarse:

$$\frac{\partial^2 C^*}{\partial y^2} - \frac{H^2 R_{O_2}}{D_e C_{O_2 atm}} = 0$$

$$\frac{\partial^2 C^*}{\partial y^2} - \varphi^2 = 0$$

El término φ es equivalente al módulo de Thiele de las reacciones químicas fluido sólido catalítico que relaciona la velocidad de reacción con la velocidad de difusión en los poros y es una medida de la eficiencia de la transferencia de masa.

Al integrar

$$\frac{\partial C^*}{\partial y} = \varphi^2(y + C_1)$$

$$C^* = \varphi^2 \left(\frac{y^2}{2} + C_1 y \right) + C_2$$

Donde C_1 y C_2 son constantes de integración que se pueden evaluar mediante la aplicación de las condiciones de frontera.

C.F. 1: $y = 0, C^* = 1$

$$C^* = \varphi^2 \left(\frac{y^2}{2} + C_1 y \right) + C_2$$

$$C^* = \varphi^2 \left(\frac{0^2}{2} + C_1 0 \right) + C_2$$

$$C_2 = 1$$

C.F. 2: $y = 1, \frac{\partial C^*}{\partial y} = 0$

$$\frac{\partial C^*}{\partial y} = \varphi^2(y + C_1)$$

$$0 = \varphi^2(1 + C_1)$$

$$C_1 = -1$$

Finalmente, la solución analítica queda:

$$C^* = \varphi^2 \left(\frac{y^2}{2} - y \right) + 1 \quad (3)$$

A medida que el parámetro φ se incrementa, se evidencia una mayor acentuación en los perfiles de concentración de oxígeno. Al alcanzar un valor específico de φ , la concentración en el lecho inferior se anula. Más allá de este, el plano en el cual la concentración de oxígeno llega a cero se desplaza hacia arriba, generando una región ampliada con concentración nula de oxígeno, lo que resulta en la interrupción de la reacción en esa zona. Este fenómeno se intensifica al aumentar el espesor de diseño de la charola, dado que φ guarda relación con la altura de la charola. Por consiguiente, existe una altura crítica del lecho, representada como H_c , en la cual la concentración de oxígeno en el lecho inferior se reduce a cero. Se puede derivar una expresión para H_c , al establecer $y = 1$, $C^* = 0$ y $R_{O_2} = R_{O_2 \text{ máx}}$ en la solución analítica:

$$C^* = \varphi^2 \left(\frac{y^2}{2} - y \right) + 1$$

$$0 = \varphi^2 \left(\frac{1^2}{2} - 1 \right) + 1$$

$$2 = \varphi^2$$

$$2 = \frac{H^2 R_{O_2 \text{ máx}}}{D_e C_{O_2 \text{ atm}}}$$

$$H = \sqrt{\frac{2 D_e C_{O_2 \text{ atm}}}{R_{O_2 \text{ máx}}}} \quad (4)$$

4.4.2 Estequiometría para el crecimiento celular y la formación del producto

Debido a que no se cuenta con un electrodo para poder determinar la velocidad de consumo de oxígeno, pero sí con un electrodo de detección de dióxido de carbono, se deben modificar las ecuaciones obtenidas en la sección anterior, considerando que la velocidad de consumo de oxígeno es proporcional a la velocidad de producción de dióxido de carbono a través del coeficiente de rendimiento dióxido de carbono/oxígeno. Quedando estas expresadas de la siguiente manera:

$$D_e \frac{\partial^2 C_{O_2}}{\partial z^2} - \frac{R_{CO_2}}{Y_{Y_{CO_2}/O_2}} = \varepsilon \frac{\partial C_{O_2}}{\partial t}$$

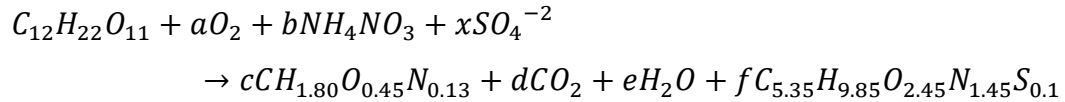
$$H = \sqrt{\frac{2D_e C_{O_2 atm} Y_{Y_{CO_2}/O_2}}{R_{CO_2 máx}}}$$

Donde:

R_{CO_2} : velocidad de producción de dióxido de carbono g/ (cm³ h)

$Y_{Y_{CO_2}/O_2}$: rendimiento dióxido de carbono/oxígeno (g/g)

Las velocidades de producción de dióxido de carbono se obtienen de forma experimental mediante el análisis respirométrico, sin embargo, el rendimiento dióxido de carbono/oxígeno debe determinarse mediante el balance estequiométrico del crecimiento celular. Para las FES de *Neurospora crassa* sobre espuma de poliuretano se asume la siguiente ecuación para el crecimiento:



En la ecuación se asume que la composición elemental de la biomasa es $CH_{1.80}O_{0.45}N_{0.13}$ **(59)**, $C_{12}H_{22}O_{11}$ es la composición elemental para el sustrato empleado en este caso sacarosa y $C_{5.35}H_{9.85}O_{2.45}N_{1.45}S_{0.1}$ se corresponde con la composición elemental de la proteína extracelular que se obtiene a partir del promedio de la composición de los 20 aminoácidos esenciales .

Esa ecuación es una simplificación de la realidad, pero tiene mucho uso para la evaluación tanto cualitativa como cuantitativa del proceso.

Las simplificaciones consisten en **(31, 60)**:

- Se considera que la composición elemental de una célula está constituida solo por los elementos C, N, O e H. en la realidad se ha demostrado que las células pueden contener hasta 22 de los elementos químicos que se conocen en la naturaleza, sin embargo, los cuatro elementos antes mencionados representan más del 90% del peso seco de una célula, razón que justifica la simplificación asumida en la ecuación. En este caso también se incluye el elemento S.
- En correspondencia con la consideración anterior el medio de cultivo puede estar formado por un número mucho mayor de compuestos químicos que los representados en la ecuación.

Es importante señalar lo siguiente **(31,60)**:

- Esta ecuación es válida para células quimioheterótrofas, es decir aquellas que toman como fuente de energía un compuesto químico y como fuente de carbono una diferente del CO₂. En el caso de estas células el mismo compuesto puede servir de las dos fuentes, es el caso de la molécula nombrada como sustrato que suele ser un carbohidrato como los azúcares.
- La ecuación representa un proceso aerobio, es decir ocurre en presencia de oxígeno.
- Por tanto, la ecuación representada tiene sus restricciones y no puede ser analizada como un caso general para cualquier proceso de fermentación.

Al aplicar balances elementales a la ecuación se obtiene el siguiente sistema de ecuaciones lineales: $C_{5.35}H_{9.85}O_{2.45}N_{1.45}S_{0.1}$

Balance de carbono:

$$12 = c + d + 5.35f$$

Balance de hidrógeno:

$$22 + 4b = 1.8c + 2e + 9.85f$$

Balance de oxígeno:

$$11 + 2a + 3b + 4x = 0.45c + 2d + e + 2.45f$$

Balance de nitrógeno:

$$2b = 0.13c + 1.45f$$

Balance de azufre:

$$x = 0.1f$$

Como se puede observar se trata de un sistema de ecuaciones lineales compuesto por 7 incógnitas y 5 ecuaciones, para que dicho sistema tenga solución se requiere el valor de dos de los coeficientes estequiométricos.

Tabla 6. Resultados experimentales de los cultivos en las mejores condiciones de fermentación

Resultados	Valores
Concentración de sacarosa inicial (g/L)	105.482
Concentración de sacarosa inicial (g/L)	0.100
Biomasa (g/L)	42.813
Dióxido de carbono producido (g/L)	69.981
$Y_{x/s}$ (g de biomasa/g de sacarosa)	0.67
$Y_{CO_2/s}$ (g de CO_2 /g sacarosa)	0.407

El valor del coeficiente estequiométrico d puede determinarse a partir del rendimiento promedio dióxido de carbono/sacarosa (0.497 g CO_2 / g de sacarosa) obtenido en las mejores condiciones de cultivo (tabla 6):

$$d = \frac{Y_{CO_2/s} \text{ masa molar sustrato}}{\text{masa molar dióxido de carbono}}$$

La masa molecular de la sacarosa y el dióxido de carbono son 342.3 y 44 g/mol respectivamente. Por tanto, el coeficiente d queda:

$$d = \frac{0.67 \frac{g CO_2}{g \text{ sustrato}} \cdot 342.3 \text{ g/mol}}{44 \text{ g/mol}} = 5.21 \frac{\text{mol de } CO_2}{\text{mol de sustrato}}$$

Por tanto, se producen 3.81 moles de biomasa por mol de sustrato consumido. El coeficiente estequiométrico c se puede determinar a partir del rendimiento másico biomasa/sacarosa promedio obtenido en los cultivos de *Neurospora crassa* (0.45 g biomasa/g Sacarosa), solamente hay que llevar este a términos molares:

$$c = \frac{0.407 \text{ g biomasa}}{1 \text{ g de sacarosa}} \cdot \frac{1 \text{ mol biomasa}}{22.82 \text{ g biomasa}} \cdot \frac{342.3 \text{ g sacarosa}}{1 \text{ mol sacarosa}} = 6.105 \frac{\text{mol biomasa}}{\text{mol sacarosa}}$$

Sustituyendo c y d en el balance de carbono se obtiene:

$$12 = c + d + 5.35f$$

$$f = 0.127102804 \approx 0.13 \frac{\text{mol proteina extracelular}}{\text{mol sacarosa}}$$

Sustituyendo f en el balance de azufre:

$$x = 0.1f = 0.013 \approx 0.01 \frac{\text{mol sulfato}}{\text{mol sacarosa}}$$

Sustituyendo c y f en el balance de nitrógeno:

$$2b = 0.13c + 1.45f$$

$$b = 0.489299533 \approx 0.49 \frac{\text{mol nitrato de amonio}}{\text{mol sacarosa}}$$

Sustituyendo b, c y f en el balance de hidrógeno:

$$22 + 4b = 1.8c + 2e + 9.85f$$

$$e = 5.853617757 \approx 5.85 \frac{\text{mol agua}}{\text{mol sacarosa}}$$

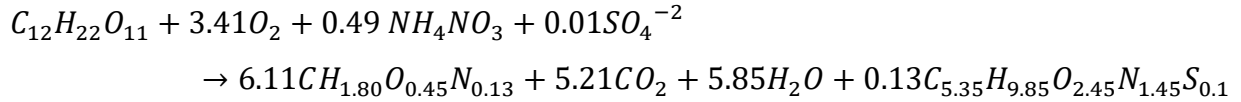
Sustituyendo b, x, c, d, e y f en el balance de oxígeno:

$$11 + 2a + 3b + 4x = 0.45c + 2d + e + 2.45f$$

$$11 + 2a + 3 \cdot 0.63315 + 4 \cdot 0.0288 = 0.45 \cdot 6.75 + 2 \cdot 3.81 + 4.8665 + 2.45 \cdot 1.44$$

$$a = 3.40788995327103 \approx 3.41 \frac{\text{mol oxígeno}}{\text{mol sacarosa}}$$

Una vez resuelto el sistema de ecuaciones anterior, la ecuación balanceada quedó:



A continuación, se determinará si los cálculos son termodinámicamente correctos mediante un balance de electrones:

$$\begin{aligned} & \text{número de electrones disponibles en el sustrato} \\ & + \text{número de electrones disponibles en el } O_2 \\ & = \text{número de electrones disponibles en la biomasa} \\ & + \text{el número de electrones disponibles en el producto} \end{aligned}$$

La relación anterior puede expresar como:

$$w\gamma_S - 4a = c\gamma_B + fj\gamma_P$$

Reajustando los términos del balance y dividiéndolos por $w\gamma_S$:

$$1 = \frac{4a}{w\gamma_S} + \frac{c\gamma_B}{w\gamma_S} + \frac{fj\gamma_P}{w\gamma_S}$$

En la ecuación anterior el primer término del miembro derecho representa a la fracción de electrones disponibles transferidos del sustrato al oxígeno, el segundo término es la fracción de electrones disponibles transferidos a la biomasa y el tercero representa la fracción de electrones disponibles transferidos a las proteínas extracelulares. Si la suma es aproximadamente igual a la unidad significa que los resultados obtenidos son termodinámicamente consistentes. Además, se calcularán los rendimientos termodinámicos molares máximos biomasa/sustrato y producto/sustrato los cuales deben ser mayores a los obtenidos

$$\gamma_S = \frac{4w + x - 2y + 5z}{w} = \frac{4 \cdot 12 + 22 - 2 \cdot 11 + 5 \cdot 0}{12} = 4$$

$$\gamma_B = \frac{4 + \alpha - 2\beta + 5\delta}{1} = \frac{4 + 1.80 - 2 \cdot 0.45 + 5 \cdot 0.13}{1} = 5.55$$

$$\gamma_P = \frac{4j + k - 2l + 5m + 6u}{j} = \frac{4 \cdot 5.35 + 9.85 - 2 \cdot 2.45 + 5 \cdot 1.45 + 6 \cdot 0.1}{5.35} = 6.39$$

$$\frac{4a}{w\gamma_S} = \frac{4 \cdot 3.41}{12 \cdot 4} \approx 0.28$$

$$\frac{c\gamma_B}{w\gamma_S} = \frac{6.11 \cdot 5.55}{12 \cdot 4} = 0.71$$

$$\frac{fj\gamma_P}{w\gamma_S} = \frac{0.13 \cdot 5.35 \cdot 6.39}{12 \cdot 4} \approx 0.09$$

$$1 = 0.13 + 0.78 + 0.19 = 1.08 \approx 1$$

$$c_{m\acute{a}x} = \frac{w\gamma_S}{\gamma_B} = \frac{12 \cdot 4}{5.55} = 8.64$$

$$f_{max} = \frac{w\gamma_S}{j\gamma_P} = \frac{12 \cdot 4}{5.35 \cdot 6.39} = 1.40$$

De a partir de los coeficientes estequiométricos se obtiene el coeficiente de rendimiento dióxido de carbono-oxígeno $Y_{CO_2/O_2} = 3.3$ g de CO_2 /g de O_2 . El elevado valor obtenido anteriormente puede deberse al hecho de que se considera solamente a la proteína extracelular como único producto secretado en el medio, y realmente pueden existir una inmensa variedad de estos.

4.4.3 Efecto de la altura del lecho en los perfiles de concentración de Oxígeno.

El comportamiento dinámico de la concentración de oxígeno a diferentes alturas de lecho se representa por la figura 12. Las tablas 6 y 7 muestran los datos utilizados:

Tabla 7. Constantes usadas en la simulación

Descripción	Símbolo	Valor	Unidades
Difusividad efectiva	D_e	0.9972	cm ² /h
Concentración atmosférica de oxígeno	$C_{O_2 atm}$	0.000178	g/cm ³

Rendimiento dióxido de carbono oxígeno gCO_2/gO_2	$Y_{\text{CO}_2/\text{O}_2}$	3.3	gCO_2/gO_2
Porosidad	ε	0.86	-

Tabla 8. Datos experimentales de producción de dióxido de carbono.

t (h)	R (g/h cm ³)	t(h)	R (g/h cm ³)
3.0	1.75E-05	33.0	1.65E-05
9.0	6.44E-05	36.0	1.99E-6
15.0	9.82E-05		
21.0	6.49E-05		
27.0	3.47E-05		

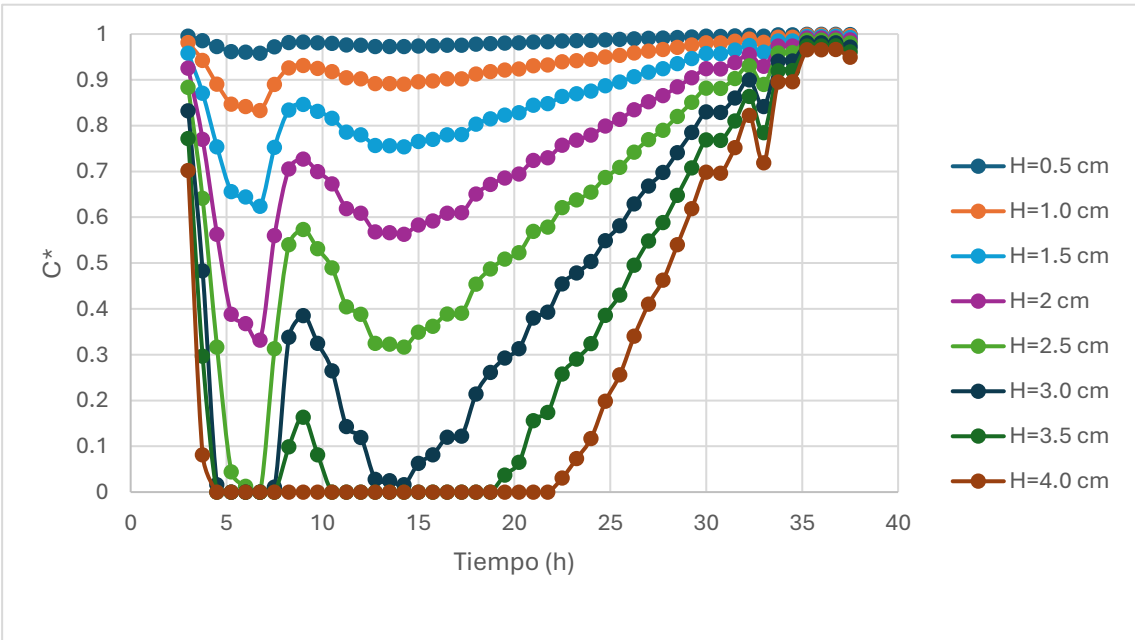


Figura 12. Variación de la concentración adimensional de oxígeno en el fondo de la charola respecto al tiempo de fermentación para distintas alturas de la cama.

La figura 12 sugiere que el grosor del lecho juega un papel importante en la dinámica de concentración de oxígeno durante la fermentación, específicamente en el fondo de la charola. En ella se muestra cómo a medida que la altura del lecho de espuma de poliuretano aumenta, la concentración de oxígeno disminuye, alejándose del valor correspondiente a la concentración atmosférica de oxígeno. Esta tendencia continúa hasta alcanzar la altura crítica de poliuretano, altura donde se forma por primera vez en el fondo de la charola un plano de concentración nula de oxígeno; en este caso ese valor se encuentra en 2.5 cm,

determinado por la ecuación 4. Por encima de este valor, el plano de concentración nula se empieza a desplazar hacia la superficie de la cama, creándose así zonas de concentración nula que pueden afectar al proceso de fermentación de *Neurospora crassa*, que es un microorganismo aerobio estricto. Otro efecto de aumentar la altura de la cama por encima de la crítica es que se va a alcanzar en el fondo de la charola la concentración cero en menores tiempos de fermentación y el periodo de permanencia de dicha condición va a ir aumentando, siendo de los casos mostrados en la figura el lecho de 4.0 cm de altura el más extremo; en este la concentración cero se alcanza a las cuatro horas de fermentación, y dicha condición se mantiene durante aproximadamente 18 horas. Hacia el final de las fermentaciones, independientemente de la altura del lecho empleado, la concentración adimensional alcanza el valor de 1, debido al inicio de la fase de desaceleración. Finalmente se decidió que las charolas tengan una altura de 6 cm usando 2.4 como factor de sobre diseño.

4.4.4 Componentes del fermentador de charolas

Charolas

Se adquirieron 4 charolas de la marca Ibili (figura 13) confeccionadas de acero estañado, cuyas dimensiones son 30x25x6 cm, dando como resultado un fermentador de charolas de 0.018 metros cúbicos de capacidad máxima.



Figura 13. Charola metálica

Armario

Para el armario se adquirió una caja organizadora grande plástica de uso rudo con tapa modelo 8197 (figura 14) de la marca Liftor, cuyas dimensiones son de 44 x 32 x 68 cm (largo, ancho, altura) y cuenta con la capacidad de soportar un peso máximo de

aproximadamente 25 kg. Es una caja resistente y duradera gracias a su material plástico ultrarresistente de alta calidad.



Figura 14. Caja empleada como armario para el reactor.

Sistema de iluminación

Para el sistema de iluminación se adquirió una lámpara USB compuesta por 4 tiras LED (una para cada charola) de la marca GUPSARA (figura 15). Estas son de fácil instalación, ya que cuentan con un adhesivo fuerte en la parte posterior de la tira. Las tiras tienen un total de ocho colores y diferentes tonos para seleccionar. Además, la lámpara viene equipada con un control remoto inalámbrico que permite cambiar el color y ajustar la intensidad del brillo. Las barras de luces Led cuentan con la función de protección contra cortocircuito y son también resistentes al agua y a ambientes húmedos, siendo adecuado su uso en este caso.



Figura 15. Lámpara del sistema de iluminación

Medidor de Humedad

Para poder conocer el porcentaje de humedad del aire alimentado al reactor se adquirió un higrómetro digital de sonda de la marca Mercader Digital (figura 16) cuya alimentación es de pila botón y que tiene la capacidad de determinar humedades comprendidas en el intervalo de 10%-99% con una precisión de 1% y cuya temperatura de trabajo debe estar comprendida entre 0 °C -50 °C. Cuenta con una pantalla LCD nítida y un diseño muy compacto, perfecto para poder acoplarlo en cualquier espacio. Otros datos técnicos son:

- Longitud sonda de 63mm
- Longitud del cable 150cm
- Tamaño 47mm x 28mm x 15mm
- Resolución temperatura 0.1°C



Figura 16. higrómetro digital de sonda

Sistema de Control de Temperatura

El sistema de control de temperatura está conformado por tres componentes. El primero es un controlador de temperatura y termostato heat cool (figura 17) de la marca Inkbird cuyas características son:

- Longitud del cable de alimentación de entrada: 1,5 m (5 pies)
- Longitud del cable de alimentación de salida: 30 cm (1 pie)
- Dimensiones del cuerpo: 140 x 68 x 33 mm (5,5 x 2,7 x 1,3 pulgadas)
- Enchufe: 85 x 42 x 24 mm (3,3 x 1,7 x 1 pulgadas)
- Rango de control de temperatura: -50/120 °C (-58 /248 °F)
- Resolución de temperatura: 0,1 °C/0,1 °F

- Precisión de temperatura: 1 °C (-50/ 70 °C) / 2 °F (-58 /160° F)
- Modo de control de temperatura: control de encendido/apagado, calefacción y refrigeración Potencia de entrada: 100 /240 V, 50 Hz/60 Hz
- Salida de control de temperatura: máximo 10 A, 100 V, 240 V



Figura 17. Controlador de temperatura

El segundo componente es una resistencia eléctrica de alambre de nicromo de la marca CPO para calentamiento de aire resistente a la humedad cuya potencia alcanza los 150 W (figura 18).



Figura 18. Resistencia eléctrica

El ultimo componente del sistema de control de temperatura es un ventilador axial de disipación de calor también perteneciente a la marca CPO (figura 19) cuyas características principales se enlistan a continuación:

- Voltaje : 110V -120V AC

- Corriente: 0.23a
- Potencia: 18w
- Velocidad: 2900 - 3000rpm
- Ruido: 45 dba
- Tamaño: 120x120x38mm
- Peso: 530g



Figura 19. Ventilador axial de disipación de calor

Finalmente, el fermentador quedo confeccionado como se muestra en la siguiente figura:



Figura 20. Diseño final del fermentador

Conclusiones

1. Los resultados obtenidos indican que la concentración de sacarosa es el factor determinante en la producción de proteína extracelular por *Neurospora crassa*. Al aumentar la concentración de sacarosa, se favorece la producción de proteína extracelular. La relación volumen de medio/peso de soporte inerte, por su parte, tiene un efecto menor pero significativo, especialmente a altas concentraciones de sacarosa.
2. La luz azul estimula la producción de proteína extracelular en *Neurospora crassa*. Los resultados indican que la luz azul favorece el crecimiento celular y la síntesis de proteínas, posiblemente debido a la activación de fotorreceptores específicos en este hongo. Otros colores de luz, como el rojo y el verde, mostraron un efecto menor en la producción de proteína
3. El ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas bajo luz azul resultó ser desde el punto de vista técnico el más favorable para la productividad de la fermentación sólida de *Neurospora crassa*.
4. Se estableció la estequiometría del crecimiento celular y la formación de productos.
5. Con base en los resultados obtenidos y, considerando al oxígeno como el nutriente limitante se diseñó y construyó un biorreactor de charolas a escala de banco para la producción de proteína extracelular por *Neurospora crassa*.

Bibliografía

- 1- Abdel-Azeem, A. M., Yadav, A. N., Yadav, N., & Usmani, Z. (2021). *Industrially important fungi for sustainable development*. Springer International Publishing.
- 2- Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. P. (2020). *21st century guidebook to fungi*. Cambridge University Press.
- 3- Kendrick, B. (2017). *The fifth kingdom*. Hackett Publishing.
- 4- Davis, R. H. (2000). *Neurospora: contributions of a model organism*. Oxford University Press.
- 5- Taylor, J. W., Bowman, B. H., Berbee, M. L., & White, T. J. (1993). Fungal model organisms: phylogenetics of *Saccharomyces*, *Aspergillus*, and *Neurospora*. *Systematic biology*, 42(4), 440-457.
- 6- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., ... & Birren, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859-868.
- 7- Davis, R. H., & de Serres, F. J. (1970). [4] Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. In *Methods in enzymology* (Vol. 17, pp. 79-143). Academic press.
- 8- Schmit, J. C., & Brody, S. T. U. A. R. T. (1976). Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriological Reviews*, 40(1), 1-41.
- 9- Mitzka-Schnabel, U., & Rau, W. (1981). Subcellular site of carotenoid biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Phytochemistry*, 20(1), 63-69.
- 10-Olmedo, M., Ruger-Herreros, C., Luque, E. M., & Corrochano, L. M. (2013). Regulation of transcription by light in *Neurospora crassa*: A model for fungal photobiology. *Fungal Biology Reviews*, 27(1), 10-18.
- 11- Liu, Y., & Bell-Pedersen, D. (2006). Circadian rhythms in *Neurospora crassa* and other filamentous fungi. *Eukaryotic cell*, 5(8), 1184-1193.
- 12- Seiler, S., & Plamann, M. (2003). The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Molecular biology of the cell*, 14(11), 4352-4364.

- 13- Wakabayashi, M., Ishii, C., Inoue, H., & Tanaka, S. (2008). Genetic analysis of CHK1 and CHK2 homologues revealed a unique cross talk between ATM and ATR pathways in *Neurospora crassa*. *DNA repair*, 7(12), 1951-1961.
- 14- Aramayo, R., & Selker, E. U. (2013). *Neurospora crassa*, a model system for epigenetics research. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(10), a017921.
- 15- Romero, M. D., Aguado, J., González, L., & Ladero, M. (1999). Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3-5), 244-250.
- 16- Zheng, L., Yu, X., Wei, C., Qiu, L., Yu, C., Xing, Q., ... & Deng, Z. (2020). Production and characterization of a novel alkaline protease from a newly isolated *Neurospora crassa* through solid-state fermentation. *Lwt*, 122, 108990.
- 17- Macris, B. J., Kekos, D., Evangelidou, X., Galiotou-Panayotou, M., & Sodis, P. (1987). Solid state fermentation of straw with *Neurospora crassa* for CMCase and β -glucosidase production. *Biotechnology letters*, 9, 661-664.
- 18- Mitchell D. A., Lonsane B. K. (1992). Solid Substrate Cultivation. Doelle H. W., Elsevier Applied Science, London, N. York.
- 19- Moo-Young M., Moreira A. R., Tengerdy R. Principles of solid substrate fermentation. In the Filamentous fungi four. Ed. J. E. Smith, D. R Berry, and B. Kristianse, E. Arnold, London, 117-144, 1983
- 20- Cannel E., Moo-Young M. Solid State Fermentation System. Process Biochem., August/September 24-28, 1980
- 21- Reid I. D. Solid state fermentation for biological delignification. Enzyme Microb. Techn. 11, 786-803, 1989
- 22- Mudgett R. E. Solid state fermentation. In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Demain. Mc Graw Hill, N. York, London, Paris, Chapter 7, 66-83, 1986
- 23- Durand A. y otros. Solid State Fermentation Reactors: From Lab Scale to Pilot Plant. Biotechn. Adv., 11, 591-597, 1993
- 24- Christen P., Auria R., Marcos R., Villegas E., Revah S. Growth of *Candida utilis* on Amberlite with Glucose and Ethanol as sole Carbon Source. Adv. in Bioprocess Engineering, 87-93, 1994

- 25-Pérez, C. J. M., Torres, E. F., López, J. A. C., & Sánchez, G. G. Efecto de la relación de nutrientes sobre la producción de metabolitos por *Aspergillus brasiliensis* en fermentación en estado sólido.
- 26-Carvajal, D. P., Alvarez, A. O., & Encino, N. A. (2006). Producción de ácido giberélico utilizando biocatalizadores soportados en matrices porosas. *Universitas Scientiarum*, 11(2), 41-50
- 27- Smith R. E., Osothsilp Ch., Bicho P., Gregory K. F. Improvement in the Protein Content of Cassava by *Sporotrichum pulvurulentum* in Solid State Culture. *Biotechn. Letters*, 8, 1, 31-36, 1986
- 28- Kim J. H., Hosobuchi M., Ryu D. D. Y. Cellulase Production by a Solid-State Culture System. *Biotechn. Bioeng.*, 27, 1445-1450, 1985
- 29- Saucedo-Castañeda G., Lonsane B. K., Navarro J. M., Roussos S., Raimbault M.. Potential of Using a Single Fermenter for Biomass Build-Up, Starch Hydrolysis and Ethanol Production. *Appl. Biochem. Biotechn.*, 36, 4761, 1992
- 30-OCAMPO, A. R. A. (2022). Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de hongos funcionales.
- 31- Dustet, Julio César. "Ingeniería de las fermentaciones". Centro de Estudios de Ingeniería de Procesos (CIPRO), Facultad de Ingeniería Química Universidad Tecnológica de la Habana. Marianao, La Habana. 10 oct. 2018.
- 32- Rodríguez J. A. y otros. Optimization of Solid-State Fermentation of Citrus Dried Peel by *Aspergillus niger* in a Packed Bed Column. *Acta Biotechn.*, 6, 3, 253-258, 1986
- 33-Criollo, B., Alvarado, J. D., & Numpaque, H. (2014). Control PID de temperatura y dosificación de pH para la producción de gas metano a partir de la digestión anaeróbica de residuos sólidos orgánicos. *Revista Colombiana De Tecnologías De Avanzada (Rcta)*, 2(24), 134-141.
- 34-Tortarolo, M. F., Pereda, M., Palma, M., & Arrigo, N. M. (2008). Influencia de la inoculación de microorganismos sobre la temperatura en el proceso de compostaje. *Ciencia del suelo*, 26(1), 41-50.
- 35-Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical engineering journal*, 13(2-3), 81-84.

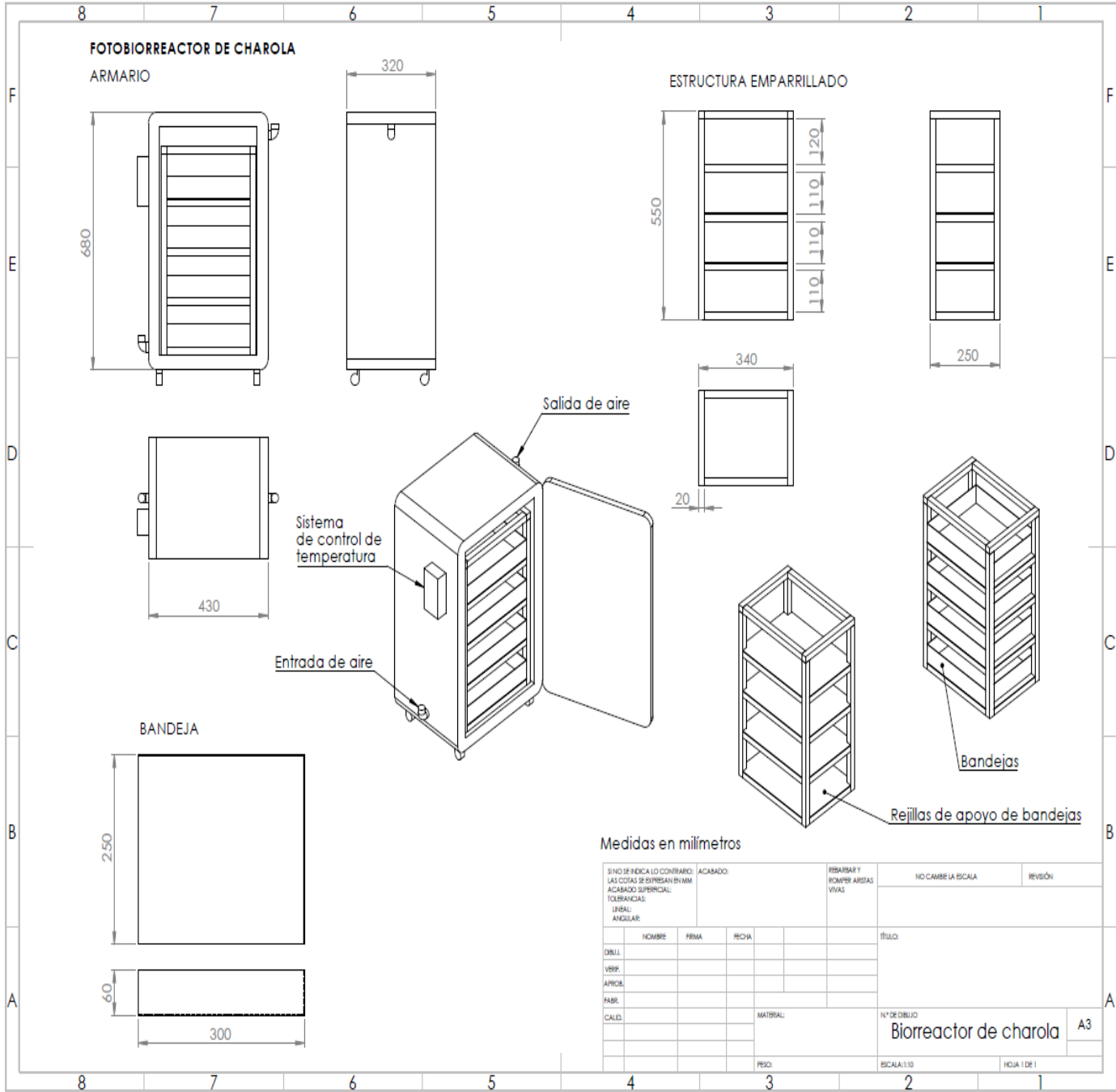
- 36- Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process biochemistry*, 35(10), 1153-1169.
- 37- Meysami, P. (2001). *Feasibility study of fungal bioremediation of a flare pit soil using white rot fungi*. University of Calgary, Department of Chemical and Petroleum Engineering.
- 38- Tengerdy, R. P., & Szakacs, G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 169-179.
- 39- Xin, F., & Geng, A. (2010). Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 295-306.
- 40- Castilho, L. R., Medronho, R. A., & Alves, T. L. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 71(1), 45-50.
- 41- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2007). Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation.
- 42- Lima, A. C., Silva, D., Silva, V., Godoy, M., Cammarota, M., & Gutarra, M. (2021). β -Mannanase production by *Penicillium citrinum* through solid-state fermentation using açaí residual biomass (*Euterpe oleracea*). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(10), 2744-2754.
- 43- JUNIOR, R. J. R. M. PRODUÇÃO DE FITASE E TANASE EM SUBPRODUTOS DO CAFÉ POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.
- 44- Chatterjee, R., Dutta, A., Banerjee, R., & Bhattacharyya, B. C. (1996). Production of tannase by solid-state fermentation. *Bioprocess engineering*, 14, 159-162.
- 45- Soares, V. F., Castilho, L. R., Bon, E. P., & Freire, D. M. (2005). High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. In *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 311-319). Humana Press.
- 46- Shear, C. L., & Dodge, B. O. (1927). *Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the Monilia sitophila group* (pp. 1019-1042). Washington, DC: US Government Printing Office.

- 47- Nakamura, K., & Egashira, T. (1961). Genetically mixed perithecia in *Neurospora*. *Nature*, 190(4781), 1129-1130.
- 48- Raju, N. B. (1980). Meiosis and ascospore genesis in *Neurospora*. *European journal of cell biology*, 23(1), 208-223.
- 49- Fincham, J. R. S., Day, P. R., & Radford, A. (1979). Fungal genetics.
- 50- Davis, R. H., & de Serres, F. J. (1970). [4] Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. In *Methods in enzymology* (Vol. 17, pp. 79-143). Academic press.
- 51- Harding, R. W., and W. Shropshire, Jr. (1980) Photocontrol of the carotenoid biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:217-238
- 52- Dunlap, J.C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2),271-290
- 53- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- 54- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- 55-Beattie, G. A., Hatfield, B. M., Dong, H., & McGrane, R. S. (2018). Seeing the light: The roles of red-and blue-light sensing in plant microbes. *Annual review of Phytopathology*, 56(1), 41-66.
- 56- Pérez Expósito, M. J. (2013). Estudio y desarrollo de materiales fotoluminiscentes con pigmentos de alta emisión en soporte vítreo sinterizado.
- 57- Najafpour, M. (Ed.). (2012). *Advances in photosynthesis: Fundamental aspects*. BoD–Books on Demand.
- 58-Pappu, J., Basak, T., & Gummadi, S. N. (2015). Mathematical modeling of macroscale phenomena: oxygen transfer for solid-state fermentation in static tray bioreactor. *British Biotechnology Journal*, 9(3), 1-14.
- 59- V Popovic, M. (2019). Thermodynamic properties of microorganisms: determination and analysis of enthalpy, entropy, and Gibbs free energy of biomass, cells, and colonies of 32 microorganism species. *Heliyon*, 5(6).
- 60-Doran, P. M. (1995). *Bioprocess engineering principles*. Elsevier.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología y Humanidades de México bajo el proyecto CF-2023-I-1001.

Anexos





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00219

Matricula: 2233801399

Efecto de la concentración de nutrientes y de la luz en el crecimiento de *Neurospora crassa* en fermentación sólida.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 5 del mes de diciembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ERNESTO FAVELA TORRES
DR. CHRISTIAN JESUS MORA PEREZ

siendo el primero asesor del alumno y lector el segundo, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

DE: RUBERTH RIVERA PEREZ

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



RUBERTH RIVERA PEREZ
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

ASESOR

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

LECTOR

DR. CHRISTIAN JESUS MORA PEREZ