



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Ingeniería Química



Maestría en Ingeniería Química

TESIS

**“Evaluación de los Parámetros de Crecimiento de
Verticillium hemileiae para el Diseño de un
Biorreactor”**

PRESENTA:

Q.I. José Antonio Domínguez Calva

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ingeniería Química

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Esmeralda Vidal Robles

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Edgar Ayala Herrera

H. Puebla de Z. Enero, 2025



Oficio: FIQ/SIEP/004/2025

Mtro. Ricardo Valderrama Valdez
Director de la Dirección de Administración Escolar
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Reciba un afectuoso saludo y al mismo tiempo me permito presentar a usted a los integrantes del jurado de examen que para obtener el grado de Maestro en Ingeniería Química sustentará el:

Q. I. José Antonio Domínguez Calva

perteneciente a la generación 2022 con número de matrícula 222470211 y cuyo tema de tesis es: "EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE *Vorticillium hemileiae* PARA EL DISEÑO DE UN BIORREACTOR".

Dicho jurado está integrado por:

JURADO	
Presidente	Dra. María Elena Ramos Cassellis
Secretario	Dr. Marco Antonio Marín Castro
Vocal	Dra. Esmeralda Vidal Robles
Vocal	Dr. Edgar Ayala Herrera

Asimismo, comunico a usted que el alumno cumple con todos los requisitos para poder llevar a cabo su examen de grado, y que los integrantes de este jurado están citados con anticipación para la fecha y lugar indicados a continuación.

FECHA DE EXAMEN: 30 de enero de 2025
HORA: 12:00 horas
LUGAR: Edificio FIQ7/302
DÍA: Jueves

Sin otro particular, me es grato quedar de usted.

Atentamente,
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z. a 22 de enero de 2025

Dra. Esmeralda Vidal Robles
Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado



c.c.p. Archivo
E-mail: esmeralda.vidal@correo.buap.mx

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72590
01 (222) 229 55 00
Exts. 7250 y 7251



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA



ACTA DE REVISIÓN, LIBERACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS

Nombre de la estudiante: JOSÉ ANTONIO DOMÍNGUEZ CALVA

Matrícula: 222470211

Nombre del director: DRA. ESMERALDA VIDAL ROBLES

Nombre del codirector: DR. EDGAR AYALA HERRERA

Título de la Tesis:

“EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE *Verticillium hemileiae* PARA EL DISEÑO DE UN BIORREACTOR”

Comisión Revisora:

Presidente: Dra. María Elena Ramos Cassellis

Firma: _____

Secretario: Dr. Marco Antonio Marín Castro

Firma: _____

Vocal (1): Dra. Esmeralda Vidal Robles

Firma: _____

Vocal (2): Dr. Edgar Ayala Herrera

Firma: _____

Los integrantes de la Comisión Revisora expresamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de maestría que presenta la estudiante arriba indicado, por lo que estamos de acuerdo en que se proceda con la impresión definitiva de la tesis y que el (la) estudiante presente su defensa y examen de grado en la fecha, horario y lugar que se indican a continuación.

Fecha de examen: 30 de enero de 2025

Hora: 12:00 hrs

Día de la semana: jueves

Lugar: Salón FIQ7/302



El presente trabajo se realizó en la Facultad de Ingeniería Química y en el Departamento de Investigación en Ciencias Agrícolas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección de la Dra. Esmeralda Vidal Robles y en codirección del Dr. Edgar Ayala Herrera.

El nombre científico *Verticillium hemileiae* en el título de la presente tesis se ha cambiado por *Akanthomyces muscarius* en la redacción del manuscrito.

*"El crecimiento constante es el
resultado del esfuerzo continuo"
Napoleón Hill*

DEDICATORIAS

A **dios**, por dotarme de paciencia y sabiduría en cada paso en mi vida.

A mi mamá, **Elena Calva Gómez**, por ser mi pilar, aquel que no se derrumba con nada y quien ha celebrado mis triunfos y consolado mis derrotas.

A mi hermana, **Lizbeth Domínguez Calva** y mis sobrinos, **José Ángel Arcos Domínguez** y **Fernanda Arcos Domínguez**, su ánimo y apoyo fueron incondicionales.

A **Jesús Antonio Carrasco Hinojosa**, quien fue una luz en mis días más oscuros y hoy en día me inspira a ser una mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Esmeralda Vidal Robles**, por su amistad, apoyo en el desarrollo del presente proyecto y, además, por su gran calidad humana. Gracias por ser la primera investigadora que apostó por el proyecto.

Al **Dr. Edgar Ayala Herrera**, por sus consejos, recomendaciones y apoyo para el logro de los objetivos de este trabajo, sin duda ampliaron mis horizontes en la ingeniería.

Al **Dr. Marco Antonio Marín Castro**, por su sabiduría, calidad humana e incondicional apoyo durante el desarrollo de los experimentos en su laboratorio. Le agradezco profundamente por hacerme sentir siempre bienvenido y como en casa en su laboratorio.

A la **Dra. María Elena Ramos Cassellis**, por sus asesorías y contribuciones al presente proyecto, fueron esenciales durante el desarrollo de las técnicas analíticas.

A **mis profesores**, en especial al **Dr. Irving Israel Ruiz López**, al **Dr. José Alberto Galicia Aguilar** y al **M.C. César Luna Ortega**, sus valiosos conocimientos, consejos y perspectivas asentaron las bases de este proyecto.

Al **Dr. Genaro Leocadio Varela Caselis** y al **Dr. Efraín Rubio Rosas** por facilitar el servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Departamento de Recursos Tecnológicos de la BUAP.

A la **M.C. María Guadalupe Tita Vázquez Espinosa de los Monteros** de la **Facultad de Ingeniería Química** y a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)** por el apoyo económico para la participación en congresos.

A la **Facultad de Ingeniería Química** y al **Departamento de Investigación en Ciencias Agrícolas** por permitirme hacer uso de las instalaciones e infraestructura durante la ejecución de los experimentos.

A mis compañeros de clase: **Paulina, Mariana, Francisco y Wendy**. Me enseñaron a que juntos llegamos más lejos. Gracias por ser simplemente ustedes.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el Apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del eje IV. Modelo de Investigación Abierta y Compartida. Objetivo 13. Formar recursos humanos que impacten positivamente el contexto social y científico como consecuencia de su accionar en una comunidad para lograr una educación desarrolladora de la transformación. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2021-2025.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xvi
SIMBOLOGÍA.....	xviii
RESUMEN DEL TRABAJO	xix
INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
OBJETIVOS.....	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos.....	4
HIPÓTESIS	4
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES.....	6
1.1 Hongos	7
1.1.1. Generalidades	7
1.1.2. Formas de reproducción.....	10
1.1.3. Ascomicetos	12
1.1.4. Los Hongos como Agentes de Control Biológico	13
1.2. El Café y la Roya	15
1.2.1 Impacto económico del café.....	15
1.2.2. Roya del café	15
1.2.3. Control biológico de la roya del café	16
1.3. Akanthomyces muscarius	17
1.3.1. Clasificación Taxonómica	17
1.3.2. Potencial Biotecnológico de <i>Akanthomyces muscarius</i>	18
1.4. Producción de Hongos	19
1.4.1. Fermentación Sólida (FS)	19
1.4.2. Fermentación Sumergida (FLS)	20
1.5. Cinética de Crecimiento Microbiano	21
1.5.1. Modelo de Monod	23
1.5.2. Modelo Logístico.....	24
1.5.3. Consumo de sustrato	25
1.5.4. Transferencia y Consumo de Oxígeno	27
1.6. Tecnología Arduino para el Diseño de Biorreactores	28

1.6.1. Elementos de un Sistema de Control para Biorreactores	29
1.6.2. Sensores Utilizados para Medir pH y Temperatura	30
1.6.2.1. Sensor de pH pH4502C	31
1.6.2.2. Sensor de temperatura MAX6675	31
1.6.3. Control Mediante Microsoft Visual Studio.....	32
1.7 Referencias	33
CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA	38
2.1 Aislamiento y Caracterización Morfológica de <i>Akanthomyces muscarius</i>	39
2.1.1 Recolecta de muestras	39
2.1.2 Siembra en caja Petri.....	40
2.1.3. Selección y purificación de la cepa.....	40
2.1.4 Descripción morfológica	41
2.1.5 Conservación de la cepa.....	42
2.1.6 Preparación de medios de cultivo	42
2.1.7 Tinción con azul de metileno	43
2.2 Identificación genotípica	43
2.2.1 Extracción de DNA	43
2.2.2 Cuantificación y calidad de DNA.....	44
2.2.3 Electroforesis del DNA extraído	44
2.2.4 Amplificación mediante PCR.....	45
2.2.5 Electroforesis del DNA amplificado.....	46
2.2.6 Purificación de los productos de PCR.....	47
2.2.7 Análisis de secuencias genómicas.....	47
2.3 Fermentación en fase sólida.....	48
2.3.1 Crecimiento superficial en agar SDA y PDA.....	48
2.3.2 Propagación de micelio en grano de trigo y bagazo de café	49
2.3.3 Preparación del sustrato.....	49
2.3.3 Biorreactor de lecho fijo: diseño y asepsia.....	51
2.4 Fermentación líquida superficial.....	53
2.4.1 Preparación de medios de cultivo	53
2.4.2 Inoculación e incubación.....	54
2.4.3 Conservación de la biomasa fresca	54
2.4.4 Secado y rendimiento de biomasa	54
2.5 Fermentación líquida Sumergida	55
2.5.1 Selección de la formulación del medio de cultivo	55
2.5.2 Efecto del volumen, agitación, pH, agitación y concentración de glucosa ..	58

2.5.3 Optimización para el crecimiento de <i>Akanthomyces muscarius</i> mediante fermentación líquida sumergida	60
2.6 Fermentación líquida sumergida en el biorreactor batch	61
2.6.1 Propuesta del modelo cinético	62
2.7 Cuantificación de la biomasa	64
2.8 Cuantificación de la concentración del sustrato: Glucosa.....	64
2.8.1 Preparación del reactivo DNS	64
2.8.2 Curva de calibración	65
2.8.3 Estimación del coeficiente k_{LA}	66
2.9 Diseño, construcción, control y asepsia del Biorreactor batch	67
2.9.1 Diseño y construcción	67
2.9.2 Control.....	73
2.9.3 Asepsia del Biorreactor batch.....	78
Referencias.....	80
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
3.1 Aislamiento y caracterización morfológica de <i>Akanthomyces muscarius</i>.....	83
3.2 Identificación genotípica	85
3.3 Fermentación en fase sólida.....	89
3.4 Fermentación líquida superficial.....	96
3.5 Fermentación líquida sumergida.....	97
3.5.1 Efecto de la formulación del medio de cultivo	98
3.5.2 Efecto del volumen de trabajo, agitación, pH y concentración de glucosa	103
3.5.3 Optimización para el crecimiento de <i>Akanthomyces muscarius</i> mediante fermentación líquida sumergida.....	108
3.6 Evaluación de los parámetros cinéticos en el biorreactor batch con tecnología Arduino.....	118
Referencias.....	123
CONCLUSIONES.....	125
ANEXO A: Código del biorreactor de lecho empacado.....	127
ANEXO B: Código para el ajuste de la ecuación de Monod en sistema de matraz agitado.....	130
ANEXO C: Código para el ajuste de la ecuación de Monod, Consumo de sustrato y balance de oxígeno:	131

ANEXO D: Código biorreactor batch.....133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diversas formas de crecimiento de hongos.	9
Figura 2. Reproducción asexual de algunos hongos.	11
Figura 3. Ejemplos de ascomicetos en medio de cultivo sólido.	12
Figura 4. Curva típica de crecimiento celular.	23
Figura 5. Recolecta y siembra de muestras de hojas infectadas con <i>H. vastatrix</i> y parasitadas con <i>A. muscarius</i> ,	41
Figura 6. Ejemplo del electroferograma de la secuenciación ITS de la cepa de estudio.	48
Figura 7. Esporas observadas en cámara de Nuwbauer en un aumento 40x.	51
Figura 9. Armado del biorreactor de lecho empacado, utilizando trigo como sustrato.	53
Figura 10. Curva de calibración para estimar la concentración de azúcares reductores con el reactivo DNS.	66
Figura 11. Diagrama de Tuberías e Instrumentación (DTI) para el sistema de control.	68
Figura 12. Diseño electrónico secuencial del biorreactor batch.	69
Figura 13. Interfaz para la comunicación con el microprocesador del sistema mediante Microsoft Visual Studio 2022.	70
Figura 14. Módulos que conforman al biorreactor batch.	71
Figura 15. Vistas de la parte electrónica del biorreactor.	72
Figura 16. Módulo de bombas.	72
Figura 17. Ajuste del pH obtenido por el sensor con un potenciómetro de referencia.	74
Figura 18. Fragmento de código actualizado con la ecuación de ajuste para el sensor de pH.	74
Figura 19. Gráfico de residuos después de hacer la corrección con la ecuación de ajuste.	75
Figura 20. Lógica de programación para el control de temperatura.	75
Figura 21. Lógica de programación para el control de pH.	76
Figura 22. Lógica de programación para el ajuste de la velocidad de agitación.	77

Figura 23. Prueba del control de temperatura y pH.....	78
Figura 24. Proceso de asepsia y montado del biorreactor.....	79
Figura 25. Aislamiento y morfología de colonias aisladas de <i>Akanthomyces muscarius</i>	84
Figura 26. Morfología microscópica de <i>Akanthomyces muscarius</i>	85
Figura 27. Geles de electroforesis del DNA genómico y de la región ITS de <i>Akanthomyces muscarius</i>	86
Figura 28. Secuencia de nucleótidos de las regiones amplificadas.	87
Figura 29. Primeras 16 secuencias de la región ITS similares a la cepa de estudio analizadas desde BLAST.	88
Figura 30. Primeras 17 secuencias de la región 18S rRNA similares a la cepa de estudio analizadas desde BLAST	88
Figura 31. Velocidad de propagación del micelio de <i>Akanthomyces muscarius</i> en medio sólido.....	90
Figura 32. Propagación de <i>A. muscarius</i> en los sustratos de estudio y en el biorreactor de lecho empacado.	91
Figura 33. Velocidad de propagación del micelio de <i>Akanthomyces muscarius</i> en trigo precocido y empacado en el biorreactor de lecho fijo.....	93
Figura 34. Monitoreo de la concentración de CO ₂ , humedad relativa y temperatura del sustrato.	95
Figura 35. Propagación de micelio en fermentación líquida superficial.	97
Figura 36. Fermentación líquida sumergida de <i>Akanthomyces muscarius</i> en matraz agitado.....	98
Figura 38. Ajuste de los datos experimentales de la formulación 1 mediante el modelo de Monod y logístico.....	102
Figura 39. Modelo de regresión lineal para predecir la variable de respuesta $\mu_{\text{máx}}$	106
Figura 40. Modelo de regresión lineal para predecir la variable de respuesta $x_{\text{máx}}$	108
Figura 41. Modelo de regresión lineal para predecir la variable de respuesta $\mu_{\text{máx}}$	112
Figura 42. Modelo de regresión lineal para predecir la variable de respuesta $x_{\text{máx}}$	114

Figura 42. Superficies de respuesta de $\mu_{\text{máx.}}$ y $x_{\text{máx.}}$ para el crecimiento de <i>Akanthomyces muscarius</i> en FLS respecto al volumen de trabajo, agitación y concentración de glucosa.	115
Figura 43. Ajuste de los datos experimentales de la fermentación con las condiciones predichas por la optimización mediante el modelo de Monod y logístico.	116
Figura 44. Fermentación líquida sumergida de <i>A. muscarius</i> en el biorreactor batch.	118
Figura 45. Tamaño y morfología de los pellets en el biorreactor batch.....	119
Figura 46. Estimación del coeficiente de transferencia de masa líquido-gas (K_{LA}) en el medio de cultivo a los 4 días del proceso de fermentación.	120
Figura 47. Ajuste de los datos experimentales de la fermentación con el modelo propuesto.....	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Akanthomyces muscarius</i>	17
Tabla 2. Comparación entre la Fermentación sólida y sumergida	21
Tabla 3. Protocolo para la amplificación de las regiones ITS y de la subunidad pequeña 18S rRNA	45
Tabla 4. Condiciones del termociclador para la amplificación de las regiones de interés	46
Tabla 5. Composición de los medios de cultivo empleados para la fermentación líquida sumergida.	55
Tabla 6. Niveles de los factores para el diseño factorial 2 ⁴	58
Tabla 7. Tratamientos para el diseño factorial 2 ⁴	59
Tabla 8. Niveles de los factores para el diseño de caras centradas	60
Tabla 9. Tratamientos para el diseño de caras centradas	61
Tabla 10. Velocidad de propagación de <i>Akanthomyces muscarius</i> en agar y sustratos	91
Tabla 11. Rendimiento de biomasa respecto al sustrato (glucosa)	97
Tabla 12. Variables de respuesta para cada una de las formulaciones evaluadas	99
Tabla 13. ANOVA de una sola vía respecto al efecto de la formulación del medio de cultivo en la velocidad de crecimiento específico máximo ($\mu_{m\acute{a}x}$).....	99
Tabla 14. ANOVA de una sola vía respecto al efecto de la formulación del medio de cultivo en la concentración de biomasa máxima ($x_{m\acute{a}x}$)	100
Tabla 15. ANOVA de una sola vía respecto al efecto de la formulación del medio de cultivo en el rendimiento (Yx/s)	100
Tabla 16. Parámetros cinéticos de ajuste para el modelo de Monod y logístico con los datos experimentales de la formulación 1.....	103
Tabla 17. Niveles de los factores para el diseño factorial 2 ⁴	103
Tabla 18. Respuestas para el crecimiento de <i>A. muscarius</i> bajo un diseño factorial 2 ⁴	104
Tabla 19. ANOVA de la $\mu_{m\acute{a}x}$. de <i>A. muscarius</i> usado un diseño factorial 2 ⁴	105
Tabla 20. Parámetros del ajuste lineal con los datos observados para $\mu_{m\acute{a}x}$	105
Tabla 21. Significancia estadística de los parámetros del modelo lineal para $\mu_{m\acute{a}x}$	105

Tabla 22. ANOVA de la $x_{m\acute{a}x}$.de <i>A. muscarius</i> usado un dise\~no factorial 2^4	106
Tabla 23. Par\~metros del ajuste lineal con los datos observados para $x_{m\acute{a}x}$	107
Tabla 24. Significancia estadística de los par\~metros del modelo lineal para $x_{m\acute{a}x}$.	107
Tabla 25. Efecto de la agitaci3n en el crecimiento de <i>A. muscarius</i> mediante FLS.	109
Tabla 26. Niveles de los factores evaluados para el dise\~no de caras centradas	109
Tabla 27. Respuestas para el crecimiento de <i>A. muscarius</i> bajo un dise\~no de caras centradas.....	110
Tabla 28. ANOVA de la $\mu_{m\acute{a}x}$ de <i>A. muscarius</i> usado un dise\~no de caras centradas	111
Tabla 29. Par\~metros del ajuste lineal con los datos observados para $\mu_{m\acute{a}x}$. mediante un dise\~no de caras centradas.....	111
Tabla 30. Significancia estadística de los par\~metros del modelo lineal para $\mu_{m\acute{a}x}$.	111
Tabla 31. ANOVA de la $x_{m\acute{a}x}$.de <i>A. muscarius</i> usando un dise\~no de caras centradas	113
Tabla 32. Par\~metros del ajuste lineal con los datos observados para $x_{m\acute{a}x}$. mediante un dise\~no de caras centradas.....	113
Tabla 33. Significancia estadística de los par\~metros del modelo lineal para $x_{m\acute{a}x}$.	113
Tabla 34. Par\~metros cinéticos de ajuste para el modelo de Monod y logístico con los datos experimentales de la fermentaci3n.....	117
Tabla 35. Par\~metros cinéticos de ajuste para el modelo propuesto con los datos experimentales de la fermentaci3n en el reactor batch.	122

SIMBOLOGÍA

FS	Fermentación sólida
FLS	Fermentación líquida sumergida
ITS	Espaciador Transcrito Interno
Lag	Fase de adaptación
C _s	Concentración de sustrato
K _s	Constante de Monod (Constante de saturación de sustrato)
μ_{max}	Velocidad de crecimiento específico máximo (días ⁻¹)
x_{max}	Concentración máxima de biomasa (g/L)
$Y_{x/s}$	Rendimiento (peso seco de biomasa/peso del sustrato)
C _{O₂}	Concentración de oxígeno disuelto en el líquido (mg/L)
C _{O₂} [*]	Concentración de oxígeno en equilibrio con la fase gaseosa (mg/L)
K _{LA}	Coefficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno (s ⁻¹)
q _O	Tasa de crecimiento específico de consumo de oxígeno por celular (g/L- día)
$Y_{x/o}$	Rendimiento se concentración de biomasa por consumo de oxígeno
k	velocidad específica de producción de CO ₂ (días ⁻¹)
CO _{2,0}	Concentración de CO ₂ al inicio del experimento (mg/dm ³)
CO _{2, máx}	Concentración máxima de CO ₂ (mg/dm ³)
PDA	Agar Papa Dextrosa
SDA	Agar Sabouraud
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
ADNr	ADN ribosómico
rRNA	ARN robosomal mitocondrial
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico

RESUMEN DEL TRABAJO

El presente trabajo se centró en determinar los parámetros de crecimiento de *Akanthomyces muscarius* en fermentación líquida sumergida, el cual es un hongo con potencial antagonico para el control de la enfermedad de la roya (*Hemileia vastatrix*) del café. Para ello, se aisló una cepa proveniente de plantaciones de café con roya de la Sierra Norte de Puebla. Se realizó una caracterización morfológica y molecular, también se evaluó el crecimiento en fermentación sólida tanto en agar como en dos sustratos: trigo y bagazo de café. Posteriormente se realizaron tres diseños experimentales respecto a la fermentación líquida sumergida en sistema de matraz agitado, el primero consistió en un diseño totalmente al azar para la selección de la mejor formulación en el medio de cultivo, el segundo fue un diseño factorial 2^4 , en el cual se evaluó el efecto del nivel de volumen de trabajo, pH, agitación y concentración de glucosa y el último fue un diseño de caras centradas para la optimización en las condiciones de fermentación mediante superficies de respuesta al maximizar $\mu_{m\acute{a}x}$ y $x_{m\acute{a}x}$ del crecimiento del hongo. Con lo anterior, se diseñó y se construyó un biorreactor batch replicando las mejores condiciones identificadas en el sistema de matraz agitado. Para la cinética del fermento, se propuso un modelo que contempló el consumo de sustrato, concentración de biomasa y la transferencia de oxígeno.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, México ocupa el décimo lugar en producción de café y, además, es líder en exportación de café orgánico siendo una fuente de trabajo de millones de mexicanos desde la recolección del grano hasta su procesamiento (OIC, 2022; CEDRSSA, 2019). A nivel nacional, Puebla ocupa el tercer lugar en producción de café gracias a la región cafetalera de la Sierra Norte (Cressey, 2021).

La roya, inducida por el fitopatógeno *Hemileia vastatrix*, es considerada como una de las enfermedades más devastadoras en la producción de café (Alvarado *et al.*, 2020). Actualmente se han implementado alternativas para el combate de la enfermedad, una de ellas es el control biológico, la cual hace uso de microorganismos antagónicos como hongos con capacidad para controlar a un determinado fitopatógeno. *Akanthomyces muscarius* es un hongo ascomiceto considerado como un enemigo natural de *Hemileia vastatrix* y se suele observar sobre las pústulas de la roya en cafetales de la Sierra Norte de Puebla (Ramírez *et al.*, 2021). Por otro lado, también se ha reportado como un agente potencial para el control de plagas en diversos cultivos, por tanto, resulta ser biotecnológicamente bastante atractivo; sin embargo, solo se suele cultivar por fermentación sólida con un lento crecimiento en comparación con otros géneros como *Trichoderma*, que suelen crecer relativamente rápido. Esto es una clara desventaja para su escalamiento y aprovechamiento comercial. Otros hongos como *Aspergillus niger* se han cultivado exitosamente en fermentación sumergida (fermentación sumergible en medio de cultivo líquido), la cual ofrece un mayor aprovechamiento de los nutrientes, se logran estructuras más infectivas y, además, es escalable a nivel industrial (García & López, 2018). Condiciones experimentales como la formulación del medio de cultivo, concentración del sustrato, pH, temperatura, agitación y aireación se evalúan comúnmente en este tipo de fermentaciones. Para ello, los parámetros cinéticos del crecimiento celular son clave

para optimizar las condiciones de crecimiento y sirven de base para el diseño y escalamiento del cultivo en un biorreactor apropiado.

En este contexto, la presente investigación abordó el aislamiento del hongo *Akanthomyces muscarius* proveniente de plantaciones infectadas de roya de la Sierra Norte de Puebla. Enseguida, se identificó la mejor formulación del medio de cultivo para agilizar su crecimiento y se evaluó además el efecto de la agitación, volumen ocupado, pH y concentración de sustrato sobre la velocidad de crecimiento específico máximo μ_{max} y concentración máxima $x_{m\acute{a}x}$ de crecimiento microbiano. Finalmente, se realizó el escalamiento del cultivo en un biorreactor intermitente con sistema de agitación y automatizado con tecnología Arduino, para esta etapa, se evaluó el efecto de la aireación sobre μ_{max} y x_{max} . Los resultados obtenidos contribuirán a la producción de agentes de control biológico en fase líquida y, en el caso particular de *Akanthomyces muscarius*, para el desarrollo de un bioproducto cuya eficiencia puede ser evaluada en plantas de café infectadas con roya de la Sierra Norte de Puebla.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En años recientes se ha incrementado el uso de microorganismos antagónicos como los hongos en atención a la aplicación de las prácticas limpias en la agricultura para el control de enfermedades agrícolas (Agrios, 2020). Aunque los hongos de interés biotecnológico suelen cultivarse en fase sólida, debido a su bajo costo, esta tecnología presenta desventajas significativas como el desaprovechamiento de nutrientes, un crecimiento más lento y limitaciones para el escalamiento industrial.

En el contexto del control biológico de la roya de café, se han explorado diversos hongos, entre ellos a *Akanthomyces muscarius*. Recientemente se ha reportado que este hongo tiene efecto potencial para el control de la roya del café e incluso para el control de otras enfermedades y plagas (Zhang *et al.*, 2017, Turco *et al.*, 2024,

Wilberts, 2023, Zelaya-Molina, 2022); sin embargo, presenta una propagación lenta en fase sólida a comparación de otros géneros como *Trichoderma*, que suelen crecer relativamente rápido (Cortez-Madriral, 2007), por ejemplo, en diversos agares se han reportado crecimientos radiales entre 2.1-2.5 mm en 10 días (Saidi, 2023) y en diversos sustratos como arroz, trigo, etc., presenta colonización completa después de los 20 días de incubación (Díaz, *et al.*, 2014), lo que limita su viabilidad comercial y escalamiento industrial. Estas características subrayan la necesidad de explorar alternativas como la fermentación líquida sumergida para optimizar su producción y escalabilidad disminuyendo los costes comerciales y así, hacerlo más accesible a los productores (Gutiérrez-Miceli *et al.*, 2020).

La fermentación líquida sumergida (FLS) permite mejorar los rendimientos y acortar los tiempos de fermentación con menos mano de obra (López, 2023); también facilita la producción a una mayor escala con menor espacio físico y, permite controlar las condiciones de crecimiento nutricional durante el cultivo (Mascarin, *et al.*, 2019). Además, se ha reportado una virulencia similar o incluso mayor de hongos de control biológico en comparación con aquellos cultivados mediante fermentación sólida (Mascarin 2015, López, 2023).

Por otro lado, diversos estudios han reportado exitosamente el crecimiento y esporulación de algunos hongos de control biológico tales como: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, y *Paecilomyces fumosoroseus* (Samsinakova, A. 1966; De la Torre, M. y Cárdenas-Cota, H. M. 1996; Hegedus, D. D., *et al.*, (1990); Jackson, M. A. *et al.*, 2003) y más recientemente se han identificado algunos medios de cultivo para el crecimiento en fase líquida de *Lecanicillium lecanii* (Reyes-Hernández, *et al.*, 2014).

López, *et al.*, (2023) fue pionero en explorar la FLS con *Akanthomyces muscarius* teniendo una alta producción de blastosporas incluso desde el segundo día de fermentación; sin embargo, en este reporte no se exploró el efecto de las condiciones

de cultivo que maximicen tanto la producción de biomasa como la velocidad de crecimiento de este antagonico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los parámetros de crecimiento en fermentación líquida sumergida de *Akanthomyces muscarius* para el diseño y operación de un biorreactor batch a escala.

Objetivos específicos

1. Aislar al hongo *Akanthomyces muscarius* de hojas de café infectadas con *Hemileiae vastatrix* provenientes de la Sierra Norte de Puebla.
2. Caracterizar la morfología macroscópica y microscópica en medio de cultivo sólido.
3. Realizar la identificación genotípica de *Akanthomyces muscarius* mediante la extracción, amplificación y secuenciación de la región del Espaciador Transcrito Interno (ITS) y de la subunidad pequeña mitocondrial 18S rRNA.
4. Determinar los parámetros de crecimiento (formulación del medio de cultivo, concentración de glucosa, volumen de trabajo, pH y agitación) de *Akanthomyces muscarius* en fermentación líquida sumergida en sistema de matraz agitado.
5. Diseñar y evaluar la eficiencia de un biorreactor batch a escala para el crecimiento de *Akanthomyces muscarius*.

HIPÓTESIS

Akanthomyces muscarius tendrá mayor velocidad de crecimiento a través de la FLS en un biorreactor batch con tecnología Arduino respecto al sistema de matraz agitado y respecto a la fermentación sólida convencional.

*"Un objetivo sin un plan es solo
un deseo"
Antoine de Saint-Exupéry*

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

En este Capítulo se abordan conocimientos generales respecto a los hongos con énfasis en los ascomicetos, una gran familia que tiene capacidad de control biológico, posteriormente se aborda a la roya, una problemática latente en el café. Enseguida se resalta la importancia biotecnológica de *Akanthomyces muscarius*, un hongo potencial para el control de esta enfermedad. Finalmente se discuten las formas en las que se pueden producir los hongos en forma *ex situ*, siendo la fermentación líquida sumergida una alternativa para el escalamiento industrial de *Akanthomyces muscarius* con tecnología Arduino.

1.1 Hongos

1.1.1. Generalidades

Los hongos no pertenecen ni al reino Plantae ni al reino Animalia, sino que se agrupan en un reino independiente conocido como Fungi. Estos organismos son eucariotas y comparten ciertas características superficiales con las plantas, como la presencia de una pared celular, vacuolas llenas de jugo celular y una corriente plasmática observable, además, son organismos inmóviles. No obstante, se diferencian de las plantas en que carecen de clorofila y, por ende, de la capacidad de realizar fotosíntesis; en cambio, son heterótrofos, lo que significa que dependen de la materia orgánica para obtener energía y nutrientes (Schlegel, 1997).

Los hongos requieren condiciones aerobias para su crecimiento, y su fuente de energía proviene de la oxidación de materia orgánica, la cual pueden adquirir mediante tres estrategias diferentes: saprofitismo, parasitismo y simbiosis mutualista. En el saprofitismo, los hongos descomponen materia orgánica muerta o en estado de descomposición, desempeñando un papel crucial en los ciclos biogeoquímicos. Por otro lado, el parasitismo implica que el hongo vive a expensas de otro organismo, generalmente causando daño al hospedador. Finalmente, la simbiosis mutualista se

caracteriza por una interacción biológica en la que el hongo establece una relación de beneficio mutuo con otra especie, como ocurre en las micorrizas, donde los hongos facilitan la absorción de nutrientes en las raíces de las plantas a cambio de compuestos orgánicos que la plantas les proveen (Villalba, 2021; Smith & Read, 2008).

El reino Fungi incluye una amplia diversidad de especies que desempeñan roles ecológicos, económicos y médicos fundamentales. Desde su participación en la descomposición de materia orgánica y el reciclaje de nutrientes, hasta su uso en la producción de alimentos, medicamentos y biofertilizantes, los hongos son esenciales en múltiples aspectos de la vida en la Tierra. Comprender sus mecanismos de interacción y obtención de energía es clave para aprovechar su potencial biotecnológico y ecológico.

Los hongos están conformados por un cuerpo vegetativo que se caracteriza por la presencia de filamentos delgados denominados hifas, los cuales miden aproximadamente 5 micrómetros de diámetro (ver figura 1). Estas hifas se ramifican repetidamente, extendiéndose tanto sobre la superficie como al interior del sustrato, lo que les permite explorar y absorber nutrientes de manera eficiente (Kuhar *et al.*, 2013).

Cada hifa está compuesta por una pared celular rígida, formada principalmente por quitina y glucanos, que proporciona soporte estructural y protege al hongo contra el estrés ambiental. En su interior se encuentra el citoplasma, que contiene los orgánulos celulares necesarios para las funciones metabólicas del organismo. El conjunto de todas las hifas que forman parte del hongo se denomina micelio, el cual constituye su estructura principal y es esencial para su supervivencia y crecimiento (Carlile *et al.*, 2001).

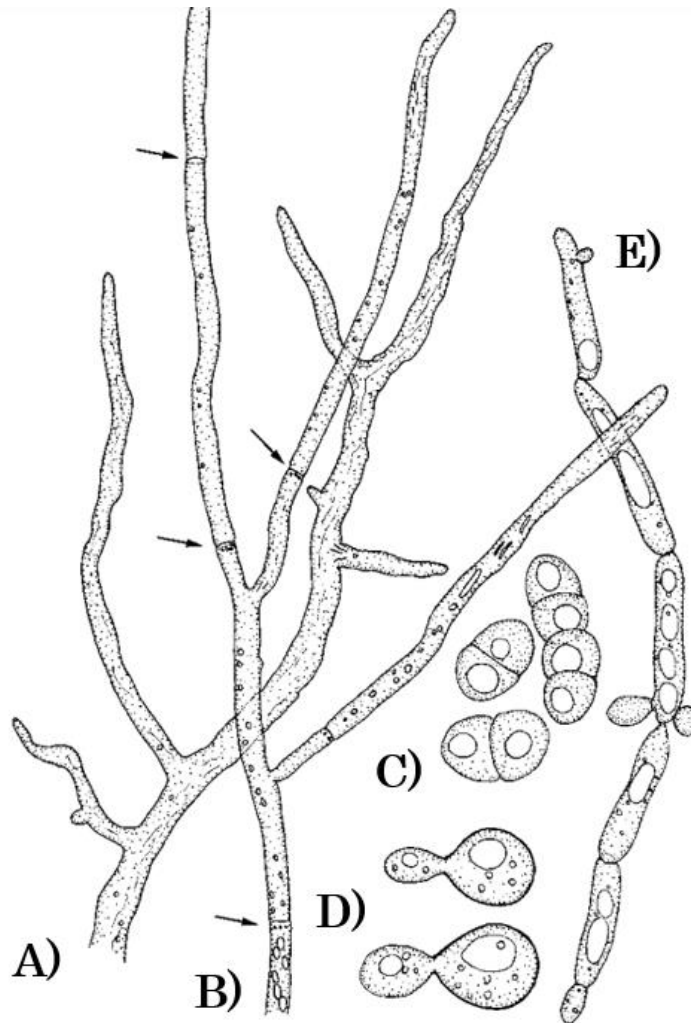


Figura 1. Diversas formas de crecimiento de hongos. A) Hifa aseptada de *Mucor mucedo* (Zygomyceto). La hifa se ramifica para formar un micelio. B) Hifa septada y ramificada de *Trichoderma viride* (Ascomiceto). Los septos se indican con flechas. C) Células de levadura de *Schizosaccharomyces pombe* (Ascomiceto) dividiéndose por fisión binaria. D) Células de levadura de *Dioszegia takachimae* (Basidiomiceto) dividiéndose por gemación. E) Pseudohifa de *Candida parapsilosis* (Ascomicota), que se considera una etapa intermedia entre las células de levadura y las hifas verdaderas. Fuente: Webster, 2007

Una característica distintiva de las hifas es su capacidad de crecer por los extremos, un proceso conocido como crecimiento apical. Este tipo de desarrollo permite que cualquier parte del micelio pueda extenderse, lo que contribuye a la colonización

eficiente de nuevos sustratos y a la expansión del hongo en su entorno (Moore *et al.*, 2011). Este crecimiento está regulado por la acción de vesículas que transportan materiales necesarios para la síntesis de la pared celular y la expansión de la membrana plasmática en los extremos de las hifas.

Los hongos desempeñan un papel crucial en los ecosistemas como descomponedores de materia orgánica y como simbioses, y su micelio es clave para estas funciones. Además, su capacidad de ramificación y expansión hace que sean organismos de gran interés en aplicaciones biotecnológicas y agrícolas.

1.1.2. Formas de reproducción

En los hongos se pueden distinguir dos tipos principales de reproducción: la asexual y la sexual. La reproducción asexual consiste en la formación de esporas a través de procesos como gemación o fragmentación (ver figura 1 C y D y figura 2 A). En este mecanismo, se generan estructuras conocidas como conidios o conidiósporas (ver figura 2 B), las cuales se forman por estrangulación en el extremo de las hifas (Schlegel, 1997). Por otro lado, si las esporas se producen dentro de receptáculos denominados esporangios, estas se llaman esporangiósporas. Además, la multiplicación puede ocurrir mediante la rotura de las hifas, lo que genera células individuales denominadas artrósporas. En algunos casos, estas células se encuentran rodeadas por una pared celular gruesa y se denominan clamidiósporas tal como se ilustra en la figura 2 C (Villalba, 2021).

La reproducción sexual, por su parte, implica la fusión de dos núcleos mediante la formación de células sexuales o gametos. Este proceso conlleva una mayor variabilidad genética y es una característica fundamental para muchos hongos (Schlegel, 1997). Según el tipo de reproducción, los hongos se clasifican en dos grandes grupos principales: **Ascomycota** y **Basidiomycota**.

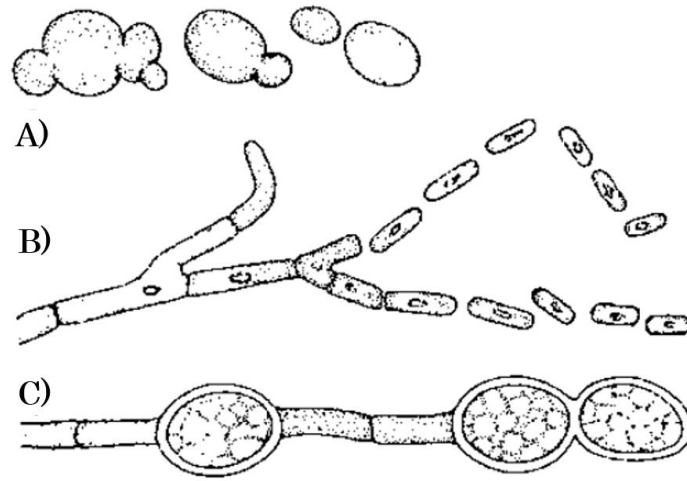


Figura 2. Reproducción asexual de algunos hongos. A) Por gemación como lo hacen las levaduras. B) Por ruptura de hifas en células aisladas como los conidios y C) por la formación de una pared gruesa, clamidósporas. Fuente: Hans G. Schlegel, 1997.

Los hongos del filo **Ascomycota** tienen la capacidad de reproducirse tanto sexual como asexualmente. Durante la reproducción asexual, estos hongos forman esporas denominadas conidios o conidiósporas directamente a partir de las hifas, sin necesidad de desarrollar un cuerpo fructífero (Kuhar *et al.*, 2013). Por otro lado, cuando la reproducción sexual ocurre, se forman cuerpos fructíferos que albergan una estructura especializada conocida como asco. En estos ascos, se producen células en forma de bolsa que contienen a las esporas sexuales, llamadas ascosporas (Kuhar *et al.*, 2013).

En contraste, los hongos del filo **Basidiomycota** se caracterizan por reproducirse exclusivamente de manera sexual. En este caso, las esporas sexuales, denominadas basidiosporas, se forman en la punta de estructuras llamadas basidios. Este mecanismo de reproducción está estrechamente relacionado con los cuerpos fructíferos macroscópicos que suelen desarrollar, como los típicos "hongos" que se observan en la naturaleza (Villalba, 2021).

1.1.3. Ascomycetos

Según la clasificación tradicional, los hongos se agrupan en cinco grandes filos principales: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Webster & Weber, 2007). De estos, los ascomicetos (*Ascomycota*) representan el grupo más diverso, con aproximadamente el 75% de las especies de hongos conocidas. Además de su importancia taxonómica, los ascomicetos destacan por su diversidad de formas de vida, que incluyen organismos unicelulares como las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), así como hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Akanthomyces* (figura 3). Estas características les permiten adaptarse a una amplia variedad de nichos ecológicos, desde suelos y aguas hasta interacciones simbióticas como los líquenes, en los cuales colaboran con algas o cianobacterias (Honegger, 2001). En términos fisiológicos, los ascomicetos, al igual que otros hongos, presentan una pared celular compuesta por quitina y glucanos, pero su ciclo de vida incluye tanto fases haploides como diploides, lo que favorece una alta variabilidad genética. Además, su reproducción mediante conidios les permite una rápida dispersión y colonización de nuevos hábitats (Deacon, 2006).

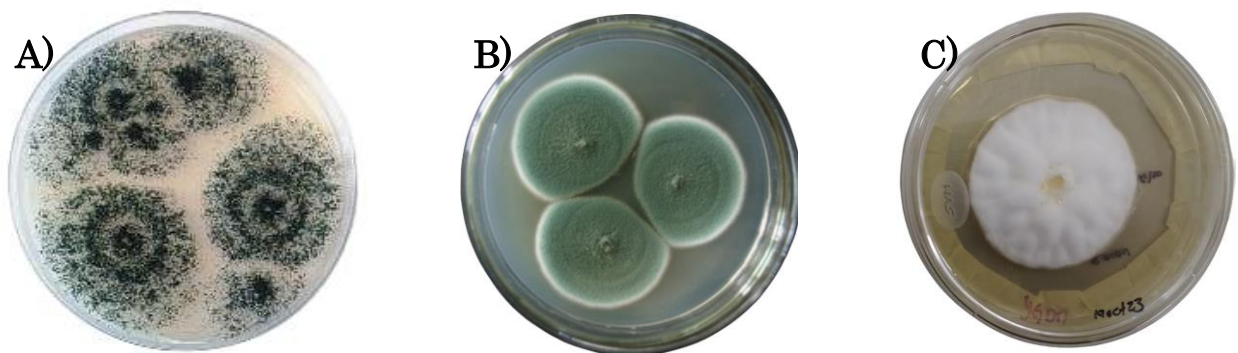


Figura 3. Ejemplos de ascomicetos en medio de cultivo sólido. A) *Aspergillus niger* (Levitin, E., 2024), B) *Penicillium sp* (Xiuping, 2012) y C) *Akanthomyces muscarius* (Fuente propia).

Desde una perspectiva biotecnológica, los ascomicetos son fundamentales en la producción de compuestos de interés industrial y farmacéutico. Por ejemplo, *Penicillium chrysogenum* es responsable de la producción de penicilina, mientras que *Aspergillus niger* se emplea en la producción de ácido cítrico y enzimas como amilasas y proteasas (Sanchez, 2009). Estas aplicaciones los hacen cruciales para la biotecnología moderna y resaltan la importancia de su estudio y aprovechamiento.

1.1.4. Los Hongos como Agentes de Control Biológico

El control biológico es el conjunto de técnicas que emplea organismos vivos para disminuir y/o controlar plagas y enfermedades específicas de cultivos, cuyo propósito es tener una menor afectación al medio ambiente (Vidal *et al.*, 2021); para ello, es importante identificar claramente a los enemigos naturales (antagonistas) de los fitopatógenos y de plagas que permitan un control seguro y eficaz. Dentro de los grupos de microorganismos que tienen capacidad antagónica, destacan los hongos, levaduras y bacterias utilizados para la elaboración de productos comerciales y suelen ser aplicados en las semillas, plántulas, suelo, o por aspersión foliar y hasta en frutos (Bhattacharjee & Dey, 2014; Hernández *et al.*, 2007).

Las principales características de los hongos antagonistas son: 1) capacidad para colonizar superficies y persistir, 2) mayor habilidad para adquirir nutrientes, 3) capacidad de adaptación y sobrevivencia a diferentes condiciones ambientales, 4) estabilidad genética, 5) eficacia en bajas concentraciones, 6) bajos requerimientos de elementos nutricionales y, 7) eficacia de sobrevivir o parasitar una amplia gama de microorganismos patógenos y/o plagas (Vidal *et al.*, 2021).

Dentro de los mecanismos de acción asociados a microorganismos antagonistas destaca la competencia por espacio y nutrientes, siendo esta última la principal causa

de muerte microbiana; en tanto la antibiosis es el proceso mediante el cual un microorganismo destruye a otro por medio de la producción de metabolitos tóxicos, compuestos volátiles y enzimas líticas las cuales disuelven o dañan los polímeros estructurales de la pared celular tales como quitina y β (1-3) glucano (Sucaticona, 2018). El parasitismo o el micoparasitismo es la acción antagónica entre dos hongos, donde uno parasita al otro, proceso mediante el cual el micelio del agente de control penetra en diferentes estructuras del hongo patógeno y degrada sus células a través de la síntesis de exoenzimas hidrolíticas, que degradan la pared celular del hospedante, pudiendo ser utilizado como fuente de alimento por parte del antagonista. La fungistasis tiene que ver con la imposición de dormancia por el controlador biológico, al limitar nutrientes como la disponibilidad del carbono al patógeno.

Otros mecanismos son la inducción de la resistencia en las plantas y depredación (Vidal *et al.*, 2021). En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción por lo que la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico (Larrea, 2001; Sucaticona, 2018).

Algunos de los principales retos de esta aplicación biotecnológica es el uso de microorganismos antagónicos inocuos al ser humano, sin efectos adversos al medio ambiente, y que presenten adaptabilidad a las condiciones ambientales de la región donde serán aplicados; una alternativa viable es la exploración del uso de antagonistas nativos de cada región. En cuanto a su escalamiento, la producción masiva de hongos requiere tecnología adecuada, como la fermentación líquida, lo que puede incrementar los costos iniciales (Harman *et al.*, 2004).

1.2. El Café y la Roya

1.2.1 Impacto económico del café

El café es considerado como uno de los productos agrícolas más importantes en el plano internacional. Actualmente, alrededor de 25 millones de pequeños agricultores son responsables del 80 % de la producción mundial de café mientras que, más de 125 millones de personas dependen del café para su sustento (OIC, 2020). Actualmente, México ocupa el décimo lugar en producción de café, con una contribución del 2.3% de la producción internacional y, además, es líder en exportación de café orgánico (statista, 2024), siendo Chiapas (40.6%), Veracruz (24.3%) y Puebla (15.8%), los principales estados productores de este producto agrícola (SIAP, 2024). A nivel regional, la Sierra Norte es la principal zona cafetalera de Puebla, con una contribución del 89.6% en el año agrícola 2023 a nivel estado (SIAP, 2024).

1.2.2. Roya del café

La roya del cafeto, enfermedad causada por el hongo *Hemileiae vastatrix*, es la principal causa de las pérdidas en la producción de café (Castillo *et al.*, 2022). Un hallazgo que marcó huella de la roya en México fue lo acontecido entre los años 2012 y 2016, periodo en el cual se registró una pérdida en producción de café cercana al 40 % (SIAP, 2024). El impacto económico de *H. vastatrix* en el cultivo del café no sólo se debe a la reducción de la cantidad y la calidad de la producción, sino también a la necesidad de implementar costosas medidas de control en los cultivares susceptibles. En México esta enfermedad se ha reportado prácticamente en todos los estados productores de café tales como Chiapas, Veracruz, Oaxaca, y Puebla (SENASICA, 2019). Existen diversas estrategias para el control de la enfermedad; sin embargo, en los últimos años, el control biológico sido de gran interés debido a las ventajas que ofrece sobre otros tipos de control. Actualmente países como Brasil, Costa Rica, Colombia, entre varios otros, han evaluado el uso de antagonistas tanto a nivel

laboratorio como en campo abierto. En cuanto al impacto del control biológico de la enfermedad, diversos estudios han reportado eficiencias superiores al 60% con el uso de hongos, reduciendo tanto los efectos de *Hemileia vastatrix* como la producción de urediniosporas; sin embargo, pocos estudios han probado la efectividad en unidades experimentales a campo abierto y una de las principales razones se debe a que requieren grandes cantidades de hongos antagonicos para dichos experimentos.

1.2.3. Control biológico de la roya del café en México

Es importante saber el curso de antagonicos de *Hemileia vastatrix* en México ya que, uno de los principales inconvenientes en el uso de estos microorganismos implica que estos sean tolerantes a las condiciones ambientales de cada región, de lo contrario, no es garantía que los resultados reportados por estudios extranjeros sean reproducibles en México. Algunos estudios han evaluado el potencial antagonico de bacterias, hongos, metabolitos y la combinación de ellos; sin embargo, la mayoría de las investigaciones reportan bajos rendimientos o bien, los resultados no son concluyentes (Fajardo *et al.*, 2020; Ramírez *et al.* 2020; Martins, 2015; Gómez *et al.*, 2017); como bien se describió anteriormente, un reto de la biotecnología de hongos y bacterias consiste en incrementar la tolerancia a las condiciones medioambientales, y por ello, una estrategia bastante conveniente consiste en la evaluación de potenciales antagonistas nativos de la región de interés. Por ejemplo, existe evidencia de que esporas de *Acanthomyces muscarius*, un hiperparásito de *H. vastatrix*, pueden permanecer latentes por periodos de un año en el suelo, y ser transportadas hasta las hojas de los cafetos por hospederos como *Coccus viridis* y la hormiga *Azteca instabilis* (Jackson *et al.*, 2012). Estas interrelaciones permiten el control natural de *H. vastatrix*.

1.3. *Akanthomyces muscarius*

1.3.1. Clasificación Taxonómica

Akanthomyces muscarius es un hongo que ha llamado la atención por su potencial uso como agente de control. De acuerdo con López, *et al.* (2020), la clasificación taxonómica se muestra en la tabla 1. Dentro del género *Akanthomyces*, las especies se han catalogado como agentes de control en el ámbito agrícola.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Akanthomyces muscarius*

Reino	Fungi
Filo	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Clavicipitaceae</i>
Género	<i>Akanthomyces</i>
Especie	<i>Akanthomyces muscarius</i>

Cabe mencionar que, los nombres científicos de hongos se han actualizado, específicamente, *Verticillium hemileiae* es un hongo que fue aislado de hojas de café infectadas con *Hemileia vastatrix* (Díaz, 2014); sin embargo, este hongo se reagrupó como *Verticillium lecanii*, que más tarde fue nombrado como *Lecanicillium lecanii* ó *Lecanicillium muscarius* (Turco, 2024), estas discrepancias fueron atribuidas en algunos casos a la alta similitud de sus características morfológicas y que todos ellos son considerados agentes de control biológico tanto de plagas como en enfermedades agrícolas, otra atribución adicional es que han sido aislados de mismas fuentes de origen, lo que dificulta su diferenciación. Finalmente, esta clasificación fue actualizada, ya que, un número considerable de especies dentro de *Lecanicillium* y *Verticillium* han sido transferidas a *Akanthomyces* y esto fue posible gracias a una profunda reclasificación filogenética en el orden *Hypocreales* (Kepler *et al.*, 2017; Turco, 2024). Una forma tangible de identificar a la especie sigue siendo mediante el análisis de secuencias genómicas.

1.3.2. Potencial Biotecnológico de *Akanthomyces muscarius*

Los hongos entomopatógenos son agentes de control biológico que atacan a insectos, en este caso, insectos que se consideran plaga de un determinado cultivo. *Akanthomyces muscarius* es conocido por su actividad entomopatógena en diferentes grupos de insectos. De hecho, se han aislado cepas del género *Akanthomyces* en una gran variedad de organismos, desde nemátodos (Meyer, *et al.*, 1990; Gan, *et al.*, 2007; Van, *et al.*, 2007), insectos e incluso ácaros (Zare y Gams, 2001; Kim, *et al.*, 2007; Turco, 2024). De hecho, ha mostrado resultados promisorios contra *Bemisia tabaco* (Mosca blanca), una plaga sumamente impactante en agricultura (Broumandnia, 2021). El mecanismo de control consiste en la adherencia de los conidios o blastosporas fúngicas a la cutícula del hospedador, enseguida las enzimas líticas como proteasas, quitinasas, lipasas, entre otras avalan la germinación y luego la penetración de la cutícula, eventualmente el insecto muere cuando el micelio ha inundado los tejidos internos (Turco, 2024). Debido a su alta efectividad, ya se comercializa en Italia con los nombres comerciales de Mycotal para moscas blancas y Verticillium para pulgones y ácaros (De Faria, 2007; turco, 2024). *A. muscarius* puede sobrevivir fuera de su hospedero ya que, se considera un endófito de algunas especies como el pepino (Nicoletti, Becchimanzi, 2020).

En cuando a su capacidad como agente de control de enfermedades, el hongo también ha mostrado eficacia contra patógenos fúngicos como la roya del café y el oídio (López *et al.*, 2020; Vargas *et al.*, 2021). Estudios de campo en Brasil han demostrado que la aplicación de *Akanthomyces muscarius* reduce la incidencia de roya en plantaciones de café en un 85% lo que resalta la utilidad del hongo como parte de estrategias de manejo integrado de enfermedades (Rodríguez *et al.*, 2022); sin embargo, en México no se ha explorado significativamente. Es importante mencionar que evaluar la eficiencia de este agente de control proveniente de marca comercial extranjera como

Mycotal y aplicarlo a plantaciones de café infectadas con *Hemileia vastatrix* en México no garantiza una alta eficiencia en el control de la enfermedad, una de las razones principales es debido a las condiciones ambientales, que pueden ser muy distintas a las condiciones óptimas recomendadas para el producto comercial, por tanto, es importante continuar con el aislamiento de especies nativas de este género para ser evaluadas en cultivos agrícolas de la misma región.

Otro problema adicional a la aplicación de estos agentes de control es su escalamiento industrial, y por tanto es imprescindible hacer esfuerzos para explorar diversas formas de cultivo para optimizar la producción a gran escala y así reducir los costos en la aplicación de estos productos.

1.4. Producción de Hongos

El cultivo de hongos representa una herramienta biotecnológica esencial en la producción de metabolitos secundarios, enzimas industriales, bioplaguicidas, y otros productos de interés económico. Los métodos de cultivo predominantes son la fermentación sólida (FS) y la fermentación líquida sumergida (FLS). Estos procesos ofrecen diferentes ventajas y limitaciones dependiendo del tipo de hongo, el producto deseado, y las condiciones operativas.

1.4.1. Fermentación Sólida (FS)

La FS es un método basado en el crecimiento de hongos en sustratos sólidos con alto contenido de humedad. Simula las condiciones naturales de crecimiento, favoreciendo la producción de metabolitos específicos que no se producen en FLS debido a la naturaleza del ambiente sólido. Los sustratos más comunes son residuos agrícolas y agroindustriales, lo que la hace una técnica sostenible. Ejemplos incluyen bagazo de caña, salvado de trigo, cáscaras de café y frutas, mazorcas de maíz molidas. La

mayoría de los hongos tanto ascomicetos como basidiomicetos se crecen preferentemente por este tipo de fermentación. Por ejemplo, *Aspergillus niger*: es cultivado en salvado de trigo para la producción de ácido cítrico, con rendimientos que alcanzan hasta 180 g/kg de sustrato seco (Ali *et al.*, 2016). Otro ejemplo es *Trichoderma reesei*, la cual crece relativamente rápido en bagazo de caña en la cual produce celulasas, esenciales para la degradación de biomasa lignocelulósica. Este método genera hasta 350 U/g de celulasas (Kumar *et al.*, 2008). La FS presenta menor consumo energético, ya que no requiere agitación ni equipos sofisticados, utiliza residuos agrícolas, reduciendo costos y promoviendo la economía circular y favorece la producción de metabolitos hidrofóbicos; sin embargo, es de difícil escalabilidad debido a problemas de control de temperatura y oxigenación y mayor susceptibilidad a contaminaciones en comparación con FLS.

1.4.2. Fermentación Sumergida (FLS)

La FLS consiste en cultivar hongos en medios líquidos bien oxigenados. Es el método preferido para aplicaciones industriales que requieren alta productividad y control preciso de parámetros fisicoquímicos. Los medios líquidos suelen estar enriquecidos con fuentes de carbono (glucosa, lactosa), nitrógeno (peptonas, sales de amonio) y micronutrientes. Por ejemplo, el medio de Sabouraud modificado para la producción de antibióticos o bien, el medio con sacarosa y sales para cultivos de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*. Este tipo de fermentación ha sido menos explorada en comparación con la FS; sin embargo, se ha explorado la FLS con *Penicillium chrysogenum*, el cual es cultivado para la producción de penicilina, el antibiótico más producido a nivel mundial. Se reportan rendimientos de hasta 50 g/L (Demain & Elander, 1999). También se ha explorado *Akanthomyces muscarius*: para producir conidios destinados al control de plagas, como la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), alcanzando producciones de hasta 2×10^9 conidios/L e inhibiciones del 70%-

85% en cultivos de tomate (Shah & Pell, 2003, Bing-Lan, *et al.*, 2003); sin embargo, hasta el momento, no se han encontrado reportes sobre la optimización de las condiciones de fermentación de esta especie o incluso de otros agentes de control. Algunas ventajas de este tipo de fermentación son: fácil escalabilidad y automatización en biorreactores, producción homogénea debido a la mezcla constante del medio y control preciso de factores como temperatura, pH y oxigenación; sin embargo, el alto consumo energético y de agua, así como un mayor costo debido al diseño y operación de biorreactores ha limitado su uso. La tabla 2 muestra un breve resumen comparativo entre las FS y la FLS.

Tabla 2. Comparación entre la Fermentación sólida y sumergida

Característica	Fermentación sólida (FS)	Fermentación líquida sumergida (FSM)
Ambiente	Sólido, baja humedad	Líquido
Costo	Bajo	Alto
Escalabilidad	Difícil	Fácil
Productos	Enzimas, metabolitos	Antibióticos, bioplaguicidas

Fuente: Tabla adaptada de Kumar, *et al.*, (2008), Demain y Elander (1999) y Shah y Pell (2003).

1.5. Cinética de Crecimiento Microbiano

La cinética de crecimiento microbiano estudia la velocidad a la cual los microorganismos crecen y se multiplican en un medio dado, influenciada por factores como nutrientes, temperatura, pH, oxígeno, entre otros. Este conocimiento es crucial en biotecnología, industria alimentaria y procesos ambientales para optimizar la producción de metabolitos, enzimas, o biomasa (Madigan *et al.*, 2018).

Cuando una cantidad pequeña (inóculo) de células vivas es adicionada a una solución líquida con nutrientes esenciales, a temperatura y pH adecuados, las células crecen. Dicho crecimiento tiene dos manifestaciones de acuerdo con la morfología de las células involucradas. Para organismos unicelulares su crecimiento es debido a su división, el incremento de biomasa (masa de materia viva) es acompañado del incremento del tamaño, la longitud y el número de células presentes. Para el caso particular de hongos, la longitud y número de micelio incrementan. Asociado con el crecimiento hay otros dos procesos: consumo de algún material por la célula y la generación de algún metabolito o producto (Bailey y Ollis, 1989).

El sistema discontinuo consiste en sembrar un medio líquido con inóculo de células vivas, nada (excepto algún gas) es adicionado al cultivo o removido de él durante el proceso de crecimiento. La concentración de nutrientes, células y productos cambian con el tiempo (Bailey y Ollis, 1989). También deben considerarse las condiciones de temperatura, fuerza iónica, pH, aireación, etc., si se establecen al inicio es probable que varíen durante el transcurso, a no ser que se controlen externamente (Quintero, 1981).

De acuerdo con Brock, *et al.*, (2008), el crecimiento microbiano en un cultivo cerrado (batch) típicamente se divide en cuatro fases (ver figura 4):

1. **Fase lag (adaptación):** El microorganismo ajusta su metabolismo al medio ambiente. No hay incremento significativo en la biomasa.
2. **Fase exponencial (log):** El crecimiento ocurre a su máxima velocidad, determinada por factores intrínsecos del microorganismo y condiciones ambientales.
3. **Fase estacionaria:** Los nutrientes se agotan y/o los productos metabólicos tóxicos se acumulan. El crecimiento neto se estabiliza.

4. **Fase de muerte:** Los microorganismos empiezan a morir debido a condiciones desfavorables.



Figura 4. Curva típica de crecimiento celular. Figura adaptada de Doran (1988)

Los modelos matemáticos describen y predicen el comportamiento del crecimiento bajo diferentes condiciones. Entre los más usados están el modelo de Monod y el modelo logístico.

1.5.1. Modelo de Monod

El modelo de Monod describe el crecimiento microbiano en función de la concentración del sustrato limitante mediante la ecuación 1 y 2.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (2)$$

Donde x : Concentración de biomasa (g/L), μ : velocidad específica de crecimiento microbiano (h^{-1}), C_s : concentración de sustrato, g/ L, μ_{max} : velocidad específica máxima de crecimiento en h^{-1} , alcanzada cuando el sustrato no es limitante, y K_s : la constante de Monod, g/L, también llamada constante de saturación, es la concentración de sustrato a la que la tasa específica de crecimiento es la mitad de μ_{max} .

A concentraciones bajas de sustrato ($C_s \ll K_s$), el crecimiento es limitado por el sustrato, y μ es proporcional a C_s . Por otro lado, a altas concentraciones de sustrato ($C_s \gg K_s$), μ se aproxima μ_{max} , indicando que el crecimiento ya no depende del sustrato (Monod, 1949).

El tiempo requerido para que el número de células o peso seco se duplique, llamado tiempo de duplicación t_d , es relacionado a la velocidad específica de crecimiento por:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (3)$$

μ_{max} representa la capacidad máxima del microorganismo para crecer bajo condiciones óptimas. Un valor alto indica un microorganismo altamente eficiente. Por otro lado, C_s indica la afinidad por el sustrato. Microorganismos con valores bajos de C_s pueden crecer eficientemente en bajas concentraciones de sustrato.

1.5.2. Modelo Logístico

El modelo logístico describe el crecimiento microbiano en condiciones limitadas por espacio o nutrientes, siendo útil en sistemas cerrados. La ecuación 4 describe al modelo.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}x \left(1 - \frac{x}{x_{max}}\right) \quad (4)$$

Donde x : Concentración de biomasa (g/L), x_{max} : Biomasa máxima que puede alcanzarse en el sistema (g/L), conocida como capacidad de carga y μ_{max} : velocidad específica máxima de crecimiento en días⁻¹.

Cuando $x \ll x_{max}$, el crecimiento es exponencial, dominado por μ_{max} ; sin embargo, cuando $x \rightarrow x_{max}$, el crecimiento se desacelera, ya que los recursos disponibles son limitados y cuando $x = x_{max}$: la tasa de crecimiento es cero, indicando que el sistema ha alcanzado su límite de capacidad. Si μ_{max} es elevado, implica un crecimiento más rápido en la fase exponencial mientras que x_{max} depende del cultivo, el volumen y la naturaleza del microorganismo. Así pues, este modelo es bastante útil cuando existe una desaceleración tal como la fase estacionaria, además, es útil porque el modelo solo depende de X (Verhulst, 1838, Kirkwood, 1995).

En resumen, ambos modelos tienen implicaciones específicas, el modelo de Monod es ideal para describir sistemas dependientes del sustrato, mientras que el modelo logístico es más apropiado para sistemas con limitaciones especiales o ambientales.

1.5.3. Consumo de sustrato

El sustrato consumido por las células se canaliza a diferentes rutas metabólicas. Parte del sustrato puede utilizarse directamente en el crecimiento y en la síntesis de producto, mientras que otra parte se utiliza para generar la energía necesaria para las actividades de mantenimiento. El sustrato requerido para el mantenimiento varía considerablemente dependiendo del organismo y de las condiciones de cultivo. Una estimación completa del consumo de sustrato debería incluir un componente de mantenimiento (Madigan *et al.*, 2018). La velocidad específica de consumo de sustrato para actividades de mantenimiento se conoce como coeficiente de mantenimiento, m_s ;

sin embargo, este parámetro ha sido muy debatido, ya que existen indicios de que m_s no es constante a todas las velocidades de crecimiento, para un determinado organismo; sin embargo, el valor de dicha constante es pequeño, y suele excluirse de la ecuación.

La velocidad de consumo de sustrato ($\frac{dC_s}{dt}$) puede expresarse en función de la concentración de biomasa mediante la ecuación 5.

$$-\frac{dC_s}{dt} = \frac{1}{Y_{xs}} \frac{dX}{dt} + m_s \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

Donde Y_{xs} : es el rendimiento verdadero de biomasa a partir de sustrato, m_s : es el coeficiente de mantenimiento y x : la concentración de la biomasa (g/L). La anterior ecuación establece que la velocidad de consumo de sustrato depende en parte de la velocidad de crecimiento pero que varía con la concentración de células presentes. Cuando C_s es cero, el sustrato se consumirá a una velocidad igual a $m_s C$. El consumo de sustrato en ausencia de sustrato es imposible, por lo que esta situación en la ecuación (5) no es realista; sin embargo, la ecuación es una descripción realista del consumo de sustrato siempre que exista sustrato en el exterior.

Algunos factores que afectan el consumo del sustrato son el tipo de sustrato ya que algunos microorganismos tienen mayor afinidad por sustratos específicos. Por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* consume eficientemente glucosa, pero a menor tasa consume xilosa (Lynd *et al.*, 2002), la Concentración de Sustrato pues a altas concentraciones pueden causar inhibición por sustrato en algunos casos, mientras que concentraciones muy bajas limitan el crecimiento (Monod, 1949), la Disponibilidad de Oxígeno ya que en procesos aeróbicos, el consumo de oxígeno está estrechamente ligado al consumo de sustrato y finalmente las Estrategias de Alimentación pues en

procesos fed-batch, el suministro gradual de sustrato puede prevenir inhibiciones y mejorar la eficiencia (Lee *et al.*, 1999).

1.5.4. Transferencia y Consumo de Oxígeno

El balance de oxígeno es crítico en las fermentaciones aerobias, ya que es esencial para la respiración celular y la generación de energía en los microorganismos. En sistemas industriales, mantener un adecuado suministro de oxígeno es clave para optimizar el crecimiento celular y la producción de metabolitos. El oxígeno se transfiere desde la fase gaseosa a la fase líquida y luego es consumido por los microorganismos (Shuler & Kargi, 2017).

El balance global de oxígeno en el biorreactor desde el gas al líquido se describe por la ecuación 6.

$$\frac{dC_o}{dt} = k_{La}(C_o^* - C_o) - q_o \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

Donde C_{o2} : concentración de oxígeno disuelto en el líquido (mg/L), C_{o2}^* : Concentración de oxígeno en equilibrio con la fase gaseosa (saturación, mg/L) y k_{La} : Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1}), que describe la eficiencia con que el oxígeno se transfiere al medio, q_o : Tasa específica de consumo de oxígeno por célula (mg de O_2 /g de biomasa-h) y x : Concentración de biomasa (g/L).

El consumo de oxígeno (q_o) se puede calcular a partir de la ecuación 7.

$$q_o = \frac{\mu}{Y_{x/o}} \quad (7)$$

Donde $Y_{x/o2}$: Rendimiento de concentración de biomasa por consumo de oxígeno g biomasa/g de O_2 -h) y μ : velocidad específica de crecimiento microbiano (h^{-1}).

Si $C_{o_2} \rightarrow 0$: El consumo supera la transferencia, provocando limitaciones de oxígeno, lo que afecta el crecimiento celular, por otro lado, $C_{o_2}^* \rightarrow C_{o_2}$: es constante, indica que el sistema mantiene un balance entre transferencia y consumo.

La primera parte del lado derecho de la ecuación 6 describe la transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida mientras que, la segunda parte describe el consumo por los microorganismos.

Así pues, k_{La} depende de las características del sistema, es decir, velocidad de agitación, diseño del reactor y tipo de dispersor del gas, también de las propiedades del medio como la viscosidad, densidad, etc. y de las condiciones operativas, es decir, flujo de aire, presión, temperatura, etc. (Garcia-Ochoa y Gomez, 2009). Por tanto, este parámetro permite seleccionar el diseño más eficiente para sistemas con alta demanda de oxígeno, predice los cambios en las tasas de transferencia de oxígeno en el escalamiento y sirve de monitoreo y control ya que permite ajustar la velocidad de agitación y/o flujo de aire. Dentro de las condiciones operativas una mayor agitación y aireación aumentan k_{La} mejorando la transferencia. Por otro lado, una alta densidad celular el consumo de oxígeno aumenta mientras que medios viscosos reducen la transferencia de oxígeno al aumentar la resistencia en la película líquida (Garcia, Gomez, 2009).

1.6. Tecnología Arduino para el Diseño de Biorreactores

Los avances tecnológicos han impulsado el diseño de procesos industriales que maximizan la eficiencia energética y operativa, lo que resulta en una mayor competitividad en el mercado. En este contexto, la implementación de sistemas de control automático juega un papel esencial al optimizar el rendimiento y reducir la variabilidad de los procesos. Según Seborg *et al.* (2010), el control automático permite

mejorar significativamente la estabilidad y la productividad en sistemas complejos. De igual manera, Ogunnaike y Ray (1994) destacan que estos sistemas facilitan la integración de tecnologías avanzadas para responder de manera efectiva a los desafíos dinámicos en entornos industriales.

La implementación de biorreactores comerciales se enfrenta a desafíos significativos, siendo los costos de adquisición y mantenimiento los principales obstáculos para su adopción en muchas instalaciones de investigación y producción. Estos equipos suelen requerir inversiones sustanciales, tanto en la compra inicial como en los gastos operativos para garantizar su funcionalidad a largo plazo. Ante esta limitación, se ha buscado el diseño de biorreactores más accesibles, utilizando tecnologías económicas y versátiles, como es el caso de Arduino (Seborg *et al.*, 2010).

Arduino es una plataforma de hardware de código abierto que consta de un microcontrolador programable, el cual puede ser utilizado para desarrollar una amplia variedad de sistemas electrónicos. La ventaja principal de Arduino radica en su bajo costo, facilidad de uso, y la posibilidad de personalizar sistemas de monitoreo y control, lo que lo convierte en una opción ideal para el diseño de biorreactores económicos (Shuler & Kargi, 2017). Con Arduino, es posible integrar una variedad de sensores y actuadores para controlar y monitorear variables clave en un biorreactor de manera precisa y en tiempo real.

1.6.1. Elementos de un Sistema de Control para Biorreactores

El monitoreo y control de las variables en un biorreactor requiere la implementación de los elementos básicos de un sistema de control, los cuales permiten regular los parámetros del proceso de manera eficiente (Seborg *et al.*, 2010). Estos son:

1. **Sensores:** Dispositivos que miden las variables del sistema, como la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto. Los sensores proporcionan datos vitales para el proceso de control (Ogunnaike & Ray, 1994).

2. **Controlador:** El microcontrolador de Arduino, que procesa las señales provenientes de los sensores y toma decisiones de control en base a ellas. Este componente es crucial para garantizar que las condiciones del biorreactor se mantengan dentro de los parámetros deseados.
3. **Actuadores:** Son los dispositivos que realizan ajustes en el sistema, tales como válvulas, bombas dosificadoras o motores de agitación. Los actuadores permiten modificar el entorno del biorreactor de acuerdo con las instrucciones del controlador (Zulkefli *et al.*, 2019).
4. **Planta:** Es el propio biorreactor, que es el entorno donde se realiza el proceso biotecnológico. El biorreactor es donde se cultivan microorganismos o células y donde se lleva a cabo la producción de los productos deseados.
5. **Señal de Realimentación:** Los datos obtenidos por los sensores se envían de vuelta al controlador para que este pueda ajustar las condiciones del biorreactor en tiempo real, creando un sistema de retroalimentación que garantiza el óptimo desempeño del proceso.

1.6.2. Sensores Utilizados para Medir pH y Temperatura

En el diseño de biorreactores con Arduino, algunos de los sensores más utilizados son los de pH y temperatura, los cuales son fundamentales para controlar el ambiente del fermento. Para medir el pH, se emplean electrodos de pH, que pueden ser conectados a módulos de adquisición de datos compatibles con Arduino, permitiendo realizar ajustes en el medio a través de la adición de ácidos o bases (Hernández *et al.*, 2020). Por otro lado, los sensores de temperatura, como el MAX6675, proporcionan mediciones precisas de la temperatura del fermento, lo que es esencial para mantener las condiciones óptimas para el crecimiento de microorganismos o células (García-Ochoa & Gomez, 2009).

1.6.2.1. Sensor de pH pH4502C

El sensor de pH pH4502C es utilizado para medir la acidez o alcalinidad de una solución. Este sensor está diseñado para ofrecer mediciones precisas y es ampliamente utilizado en aplicaciones de monitoreo ambiental, industrial y en biotecnología, como en la medición de pH en fermentaciones. Se utiliza comúnmente en proyectos basados en plataformas como Arduino, debido a su bajo costo, facilidad de integración y capacidad para medir con precisión el pH de soluciones líquidas.

Características Principales:

1. Rango de Medición: El pH4502C tiene un rango de medición de 0 a 14 pH, lo que lo hace adecuado para una amplia gama de aplicaciones que abarcan desde soluciones altamente ácidas hasta soluciones altamente alcalinas (Dinesh *et al.*, 2015).
2. Señal de Salida Analógica: El sensor pH4502C proporciona una señal de salida analógica proporcional al pH de la solución medida. Esta señal puede ser leída directamente por un microcontrolador, como Arduino, para su procesamiento y visualización (Xu *et al.*, 2018).
3. Precisión: El sensor ofrece una precisión de aproximadamente ± 0.1 pH, lo que lo hace adecuado para aplicaciones donde se requiere un monitoreo de pH constante y confiable (Dinesh *et al.*, 2015).

1.6.2.2. Sensor de temperatura MAX6675

Por otro lado, el sensor de temperatura MAX6675 es un sensor de temperatura digital que utiliza un termopar tipo K para medir la temperatura en un amplio rango, de -200°C a $+700^{\circ}\text{C}$, siendo ideal para aplicaciones industriales, científicas y de laboratorio donde se requieren mediciones de alta precisión. Este sensor se caracteriza por su facilidad de uso, ya que proporciona lecturas digitales de

temperatura a través de una interfaz SPI (Serial Peripheral Interface), lo que lo hace adecuado para microcontroladores como Arduino (MAXIM Integrated, 2012).

De acuerdo con MAXIM (2012), Características Principales son:

1. Medición de Temperatura: El MAX6675 tiene un rango de medición que va desde $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $+700\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que lo hace adecuado para diversas aplicaciones de control de temperatura que requieren rangos amplios.
2. Interfaz Digital SPI: La comunicación a través de SPI permite una transmisión eficiente y sin ruidos de las mediciones de temperatura, lo que simplifica la integración con otros sistemas y microcontroladores.
3. Resolución: Ofrece una resolución de $0.25\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que significa que puede detectar cambios pequeños en la temperatura, brindando mediciones precisas dentro de su rango operativo.
4. Alimentación y Consumo: El sensor es alimentado por una fuente de 3.0 V a 5.5 V y consume poca energía, lo que lo convierte en una opción ideal para dispositivos de bajo consumo.
5. Precisión: Tiene una precisión de $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que lo hace confiable para muchas aplicaciones donde se requiere control preciso de la temperatura.

1.6.3. Control Mediante Microsoft Visual Studio

El control de variables en el biorreactor basado en Arduino puede ser gestionado mediante la integración de software como Microsoft Visual Studio. Esta plataforma permite crear aplicaciones que se comunican con Arduino para gestionar parámetros como la agitación, el pH y la temperatura del sistema. A través de la programación de rutinas específicas, se pueden ejecutar ajustes automáticos, lo que facilita la operación continua del biorreactor y garantiza que los parámetros se mantengan dentro de los niveles óptimos para el proceso biotecnológico (Shuler & Kargi, 2017).

1.7 Referencias

1. Agrios, G. N. (2020). *Plant Pathology* (6th ed.). Academic Press.
2. Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology* (4th ed.). Wiley.
3. Alvarado, R., Pérez, M., & Torres, J. (2020). Control biológico de enfermedades en cafetales: Retos y avances. *Revista Agroecológica*, 15(3), 123-135.
4. Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249-260.
5. Bhattacharjee, R., & Dey, U. (2014). An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. *African Journal of Microbiology Research*, 8(17), 1749-1762.
6. Castillo, C., Fernández, A., & Gómez, L. (2022). Impacto de *Hemileia vastatrix* en cultivos de café en América Latina. *Revista Agroecológica*, 18(2), 45-56.
7. Cressey, D. (2021). "The global coffee crisis: How climate change is threatening your cup." *Nature*, 595(3), 23-27.
8. Deacon, J. W. (2006). *Fungal Biology* (4th ed.). Blackwell Publishing.
9. Díaz-Vicente, V. M. (2014). El hongo *Verticillium hemileiae* Bouriquet, alternativa para el control de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.). *Agro productividad*, 7(3).
10. Fajardo, M., Ramírez, J., & Álvarez, P. (2020). Estrategias de control biológico en el manejo de la roya del cafeto. *Acta Fitopatológica Mexicana*, 38(3), 109-121.
11. García, L., & López, R. (2018). Parámetros cinéticos en fermentación sumergida: Una revisión. *Biotecnología en el Agro*, 22(1), 45-57.
12. García-Ochoa, F., & Gómez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153-176.

13. Goettel, M. S., Eilenberg, J., & Glare, T. R. (2005). Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. *Comprehensive Molecular Insect Science*, 361-406.
14. Gómez, L., Jiménez, R., & Salinas, H. (2017). Evaluación de antagonistas para el control de la roya del cafeto en México. *Revista Científica Agropecuaria*, 12(1), 23-32.
15. Gutiérrez-Miceli, F. A., Santiago-Borraz, J., Molina, A. C., & Olivares, R. F. (2020). Biocontrol of coffee pests using antagonistic fungi. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 15(2), 45–53.
16. Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56.
17. Hans, G. S. (1997). *General Microbiology*. Cambridge University Press.
18. Hernández, G., López, J., & Torres, A. (2020). Arduino-based bioreactor for pH and temperature control in yeast fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(5), 823-830.
19. Hernández, M., Ruiz, D., & Cañedo, V. (2007). Agentes de control biológico y su uso en el manejo integrado de plagas. *Revista Colombiana de Entomología*, 33(2), 152-159.
20. Honegger, R. (2001). The lichens: A unique symbiotic association between two unrelated kingdoms. *New Phytologist*, 150(3), 537-553.
21. Jackson, M. A., Kleespies, R. G., & Neves, P. M. (2012). Ecología y aplicaciones de *Acanthomyces muscarius*. *Mycological Applications*, 22(3), 35-47.
22. Jackson, M. A., Kleespies, R. G., & Neves, P. M. (2012). *Acanthomyces muscarius*: A promising agent for coffee rust control. *Biocontrol Science and Technology*, 27(3), 189–198.

23. Kirkwood, J. K. (1995). Mathematical models of microbial growth. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 261(1362), 35-43.
24. Kuhar, F., Daró, E., & Pastor, N. (2013). Reproducción y características estructurales de los hongos. *Microbiología Aplicada*, 12(3), 45-56.
25. Lee, S. Y., Chang, H. N., & Kim, C. S. (1999). High cell density cultivation of *Escherichia coli* for the production of recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, 17(1), 29-48.
26. Levitin, E. (2004). An atlas of fungal spores. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113, 366.
27. López, F., Martínez, J., & Rodríguez, A. (2020). *Akanthomyces muscarius*: Un hongo entomopatógeno de interés agrícola. *Biocontrol Science*, 18(1), 33-47.
28. Martins, C. A. (2015). Control biológico de *Hemileia vastatrix* en Brasil: avances y retos. *Tropical Plant Pathology*, 40(4), 257-264.
29. Meyer, S. L., Huettel, R. N., & Sayre, R. M. (1990). Isolation of fungi from *Heterodera glycines* and in vitro bioassays for their antagonism to eggs. *J. Nematol*, 22, 532-537.
30. Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3, 371-394.
31. Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. P. J. (2011). *21st Century Guidebook to Fungi*. Cambridge University Press.
32. Organización Internacional del Café (OIC). (2022). Estadísticas mundiales del café. Recuperado de <https://www.ico.org>
33. Organización Internacional del Café (OIC). (2020). Estadísticas globales del café 2019. Recuperado de <https://www.ico.org>
34. Pérez, S., Vargas, R., & Rodríguez, E. (2023). Evaluación de diferentes medios de cultivo para *Akanthomyces muscarius* en su producción de conidios. *Journal of Agricultural Mycology*, 22(4), 130-137.

35. Rodríguez, E., Martínez, J., & Vargas, R. (2022). *Akanthomyces muscarius* en el control de plagas y enfermedades agrícolas: Un enfoque práctico. *Biological Control Review*, 19(2), 65-80.
36. Saidi, A., Mebdoua, S., Mecerem, D., Al-Hoshani, N., Sadrati, N., Boufahja, F., & Bendif, H. (2023). Dual biocontrol potential of the entomopathogenic fungus *Akanthomyces muscarius* against *Thaumetopoea pityocampa* and plant pathogenic fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(8), 103719.
37. Schlegel, H. G. (1997). *Microbiología general*. Ediciones Omega.
38. Seborg, D. E., Edgar, T. F., Mellichamp, D. A., & Doyle, F. J. (2010). *Process Dynamics and Control* (3rd ed.). Wiley.
39. Shuler, M. L., & Kargi, F. (2017). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts* (3rd ed.). Prentice Hall.
40. Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* (3rd ed.). Academic Press.
41. Smith, K., & Brown, T. (2018). Industrial applications of fungal fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 36(5), 1234–1241.
42. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (18 febrero de 2024). Acciones y Programas. Producción Agrícola 2022. Sitio web: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
43. Statista (18 de febrero de 2024). Ranking de los 15 principales países productores de café a nivel mundial en 2022. Sitio web: <https://es.statista.com/estadisticas/600243/ranking-de-los-principales-productores-de-cafe-a-nivel-mundial/>

"El trabajo todo lo vence"
Anónimo

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

Este capítulo aborda la metodología en 6 secciones, la primera se enfoca en el aislamiento de *Akanthomyces muscarius*, desde la recolección de las muestras hasta la purificación de la cepa. La segunda sección corresponde a la caracterización genotípica que comprende la extracción de ADN genómico, Amplificación por PCR y el análisis de las secuencias genómicas. La tercera sección corresponde a la fermentación en fase sólida tanto en caja Petri como en un biorreactor de lecho empacado. La cuarta sección aborda el diseño experimental totalmente al azar para la selección de la mejor formulación que servirá de base para la fermentación líquida sumergida en un sistema de matraz agitado, luego el diseño factorial 2^k para evaluar el efecto del pH, agitación, volumen de trabajo y concentración de glucosa y, finalmente un diseño de caras centradas para optimizar las mejores condiciones de cultivo. la quinta sección evalúa la eficiencia del biorreactor en cuanto a los parámetros cinéticos μ_{max} y X_{max} respecto al mejor tratamiento identificado en matraz agitado. La última sección se enfoca en el diseño y construcción del biorreactor batch.

2.1 Aislamiento y Caracterización Morfológica de *Akanthomyces muscarius*

2.1.1 Recolecta de muestras

Se recolectaron hojas con pústulas de *Hemileia vastatrix* parasitadas con *Akanthomyces muscarius* directamente de plantas de café adultas y en etapa de fruto (mayores a 3 años) tal como se observa en la figura 5B, las hojas fueron elegidas sin daño aparente (mordidas, fragmentadas, dobladas, ni con suciedad excesiva), ni con presencia de insectos en ellas. Dicho muestreo se realizó en una plantación de café en el municipio de Xicotepec de Juárez, Puebla, con coordenadas 20° 16' 39.0" N y 97° 57' 06.0" W, a 1,100 msnm durante el mes de septiembre de 2022. Todas las hojas recolectadas fueron guardadas y sin compactarse en bolsas de plástico estériles hasta su traslado al laboratorio.

2.1.2 Siembra en caja Petri

En el laboratorio, se hizo revisión de las hojas recolectadas seleccionando aquellas que presentaron pústulas de roya con abundante parasitismo de *Akanthomyces muscarius* (ver figura 5E). Un total de 100 hojas fueron agrupadas en 5 conjuntos, posteriormente de cada conjunto se hicieron 5 subconjuntos. Se escogió un subconjunto por cada conjunto, dando un total de 20 hojas escogidas al azar. En cada hoja se hicieron cortes finos de 3 mm por lado en zonas de abundante parasitismo (ver figura 5F). La mitad de los cortes fueron sembrados bajo condiciones estériles en cajas Petri con medio de cultivo PDA (ver figura 5G) mientras que la otra mitad en cajas Petri con medio de cultivo PDA con estreptomycinina (50 µg/mL). Las siembras se incubaron a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ por siete días durante ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

2.1.3. Selección y purificación de la cepa

Las siembras sin aparente crecimiento bacteriano fueron seleccionadas para siembras sucesivas, para ello, se hicieron cortes de hifas de aquellos crecimientos que mostraron una apariencia blanca y algodonosa característica de una colonia de *Akanthomyces muscarius* en agar PDA (Turco, 2024). Se realizaron hasta 5 ciclos de resiembra bajo condiciones estériles hasta observar el crecimiento de la cepa de interés sin contaminación. Todas las etapas de purificación se realizaron en cajas Petri con medio de cultivo PDA e incubadas bajo las mismas condiciones experimentales descritas en la etapa de siembra.

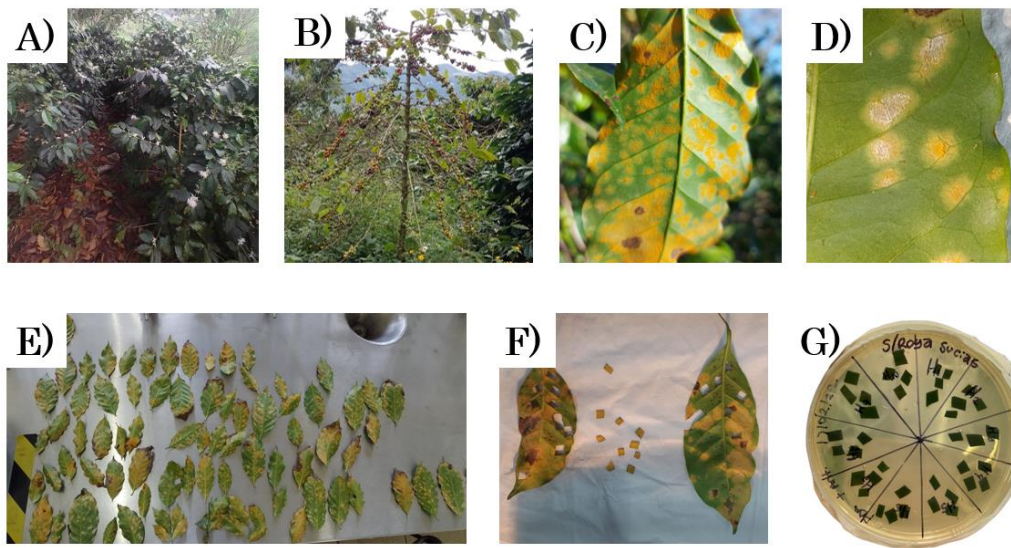


Figura 5. Recolecta y siembra de muestras de hojas infectadas con *H. vastatrix* y parasitadas con *A. muscarius*, A) plantas sanas, B) planta totalmente infectada con *H. vastatrix*, C) hoja con pústulas de *H. vastatrix* sin presencia de *A. muscarius*, D) hoja con pústulas de *H. vastatrix* parasitadas con *A. muscarius*, E) una de las colectas de hojas con *A. muscarius* analizadas en el laboratorio, F) ejemplo de cortes finos realizados sobre pústulas de *H. vastatrix* parasitadas con *A. muscarius* y G) ejemplo de una de las siembras realizadas en caja Petri con PDA, cada división observada corresponde a una hoja distinta.

2.1.4 Descripción morfológica

La caracterización macroscópica de *Akanthomyces muscarius* se llevó a cabo mediante observación respecto al color y apariencia de una colonia crecida en agar PDA y SDA después de 7 días de incubación a 25 ± 1 °C en oscuridad.

Respecto a la caracterización microscópica, se realizaron observaciones de muestras de tejido cultivado en medio PDA teñidas con azul de metileno al 0.01%, la morfología se observó mediante un microscopio óptico (AmScope) en un aumento 40x. Por otro lado, se realizaron observaciones del tejido de *A. muscarius* en hojas infectadas con *H. vastatrix* mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). El propósito de la

observación microscópica fue identificar la morfología de hifas y esporas *in vitro* e *in vivo*.

2.1.5 Conservación de la cepa

Las cepas aisladas fueron sembradas en tubos de cultivo con tapa de rosca tipo baquelita con medio PDA, para ello, se tomó una pequeña muestra de micelio y se sembró directamente en el tubo bajo condiciones estériles. Los tubos fueron incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por siete días en oscuridad. Posteriormente, fueron almacenados en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso. Respecto a los experimentos siguientes, se realizaron resiembras cada 7 días en las cuales, para ello, se tomaron muestras de micelio fresco que fueron esparcidas con asa acodada en cajas Petri con medio de cultivo PDA e incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad.

2.1.6 Preparación de medios de cultivo

Los medios PDA y SDA fueron preparados siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Para el caso del medio PDA, se disuelven 39 g en 1 L de agua destilada, para el caso del medio SDA, se disuelven 65 g en 1 L de agua. Enseguida, se esteriliza el medio a 121°C durante 15 minutos. Cuando se encuentre a 50°C , se vacía en cajas Petri estériles de poliestireno de 90×15 mm. El proceso de vaciado en placa se lleva a cabo bajo condiciones estériles. Una vez que el medio se ha solidificado, las cajas se almacenan y se pueden utilizar un día posterior a su preparación.

Para el caso de cultivos en tubo, el agar se disuelve con las proporciones indicadas previamente y, enseguida se vacía en los tubos de cultivo, posteriormente se esterilizan a 121°C durante 15 minutos. Finalmente, los tubos se enfrían con una inclinación de 20° hasta solidificación.

2.1.7 Tinción con azul de metileno

Se toma una porción de muestra de una colonia de *Akanthomyces muscarius* y se deposita en un portaobjetos, se aplica una gota de una solución de azul de metileno al 0.01%, se deja reposar 5 minutos o hasta sequedad, posteriormente, se enjuaga la muestra con agua destilada y se observa al microscopio en un aumento 40x. Con este aumento, se puede observar la morfología de hifas y conidios.

2.2 Identificación genotípica

2.2.1 Extracción de DNA

la extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo I CTAB de Weising *et al.* (2005), con la excepción de que la biomasa (micelio y esporas) fue removida de un cultivo del hongo incubado en PDA durante 7 días a 28 ± 1 °C en total obscuridad. Dicha biomasa se recolectó en tubos Eppendorf de 2 mL bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar. Se agregó 1 mL de CTAB (CTAB 2%, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% PVP 40,000, 0.2% β -mercaptoetanol) precalentado a 60 °C, posteriormente se agregaron 10 μ L de β -mercaptoetanol por muestra. Las muestras se encubaron a 60°C durante una hora con intervalos de 10 minutos para mezclado con inversión del tubo. Enseguida, se agregó 1 volumen de alcohol cloroformo-isoamílico (24:1) por muestra y se mezcló por inversión de tubo durante 10 minutos. Las muestras fueron centrifugadas por 10 minutos a 8,000 rpm. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo, al cual se le agregó 0.6 volumen de isopropanol, se mezcló por inversión de tubo. Se adicionó 1 mL de etanol 70% por muestra y se agitaron durante 3 minutos, después se centrifugaron por otros 10 minutos a 8,000 rpm. Se deshecho el sobrenadante quedando una pastilla, la cual se dejó secar. Se agregaron de 250 μ L a 500 μ L de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) para resuspender la pastilla y se volvieron a incubaron a 4 °C por 30 minutos. Se añadieron 8 μ L de RNAsa a una concentración de 10 μ g/mL, mezclándose e incubándose a 37 °C

por una hora. A cada muestra se le agregó 0.05 volumen de 5 M de NaCl, se mezcló por inversión de tubo y se incubaron durante 10 minutos a 4 °C. Se centrifugaron por 30 minutos a 8,000 rpm. En cada muestra se observaron dos fases, se transfirió el sobrenadante a tubo nuevo, se agregó 1 volumen de isopropanol 100%, se mezcló por inversión y se almacenó a -20 °C por una hora. Se centrifugó 10 minutos a 8000 rpm por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante de cada muestra, se secó la pastilla y nuevamente se disolvió en 100 µL de buffer TE.

2.2.2 Cuantificación y calidad de DNA

Los productos de DNA obtenidos del proceso de extracción se cuantificaron con el software ND_1000 V.3.5.2 utilizando el equipo NanoDrop espectrofotómetro ND 1000® (Accesolab S.A. de C.V.) a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm, el primero proporciona la concentración en ng/µl muestras que la relación 260/280 nm proporciona la calidad del DNA extraído, DNA de buena calidad debe estar dentro del rango de 1.8-2.0, indicando que la muestra es libre de proteínas, fenoles y otros compuestos.

2.2.3 Electroforesis del DNA extraído

La calidad del DNA también se estimó mediante geles de agarosa al 1.2% con amortiguador TAE 1X (Tris-base, ácido acético glacial, EDTA 0.5 M pH 8.0). Para la preparación de un gel, se disolvieron 0.36 g de agarosa en 60 mL de amortiguador TAE 1X, posteriormente se calentó en microondas hasta disolución total. Una vez que la mezcla alcanzó la temperatura ambiente, se colocó en porta-geles hasta solidificación. Posteriormente, se retiró el peine, goma y cinta masking-tape. Enseguida el porta-geles se colocó en la cámara de electroforesis y se cubrió con el amortiguador TAE 1X. En cada pozo fueron cargados 4 mL de muestra previamente mezclada con 4 mL de buffer de carga (Loading buffer). Las muestras migraron en el

gel a 90 V durante 2 h. El gel fue revelado con una solución de Bromuro de Etidio (0.5 mg/mL) durante 10 minutos, luego se lavó con agua destilada por 10 minutos. El gel se visualizó con luz ultravioleta en un transiluminador Modelo Universal Hood II (Bio-Rad).

2.2.4 Amplificación mediante PCR

Para la identificación del género y especie, se realizó la amplificación de dos regiones, una de ellas, la región ITS (Internal Transcribed Spacer, por sus siglas en inglés), la cual es una región del ADN ribosómico (ADNr) altamente conservada entre los hongos (Tedersoo, *et al.*, 2018). Por otro lado, la segunda región corresponde al gen que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosomal mitocondrial (18S rRNA). Se utilizó 1 µl del DNA extraído como plantilla para la amplificación con los cebadores NMS1 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3') y NMS2 (5'-GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC-3') para la región 18S rRNA e ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') para la región ITS. La tabla 3 muestra el protocolo de reactivos adicionados por muestra.

Tabla 3. Protocolo para la amplificación de las regiones ITS y de la subunidad pequeña 18S rRNA

Reactivo	Stock	Reacción	Volumen/muestra
Buffer	10x	1x	5.0 µL
MgCl ₂	25.0 mM	2.0 mM	4.0 µL
DNTPs	10.0 mM	0.2 mM	1.0 µL
Taq polimerasa	5 unidades/µL	0.025 unidades/µL	0.25 µL
Iniciador sentido	10.0 µL	0.2 mM	1.0 µL
Iniciador a-sentido	10.0 µL	0.2 mM	1.0 µL
Agua			variable
DNA		20 ng/µL	variable

Volumen final	50 μ L
---------------	------------

La tabla 4 muestra las condiciones para la amplificación de las regiones en el termociclador GeneAmp PCR System 2700 de Applied Biosystems. Finalmente, los productos de PCR fueron cuantificados utilizando el equipo NanoDrop espectrofotómetro ND 1000® (Accesolab S.A. de C.V.) con el mismo procedimiento del DNA extraído.

Tabla 4. Condiciones del termociclador para la amplificación de las regiones de interés

	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Alineamiento	56	1	
Polimerización	72	1	
Extensión final	72	10	1
	10	10	1

2.2.5 Electroforesis del DNA amplificado

La electroforesis de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 1.2%. En cada pozo se cargó una mezcla de 4 μ L del producto de PCR con 4 μ L de buffer de carga. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis GIBCO BRL con un buffer de corrida de Tris-Acetato de sodio-EDTA (TAE) 1X. El tiempo de corrida fue de 80 minutos a 90 V. El gel fue revelado con una solución de Bromuro de Etidio (0.5 mg/mL) durante 10 minutos, luego se lavó con agua destilada por 10 minutos. El gel se visualizó con luz ultravioleta en un transiluminador Modelo Universal Hood II (Bio-Rad).

2.2.6 Purificación de los productos de PCR

Los productos de reacción de las regiones amplificadas fueron purificados con la enzima EXO-SAP, la cual degrada los residuos de dNTP's e iniciadores que no fueron incorporados durante la etapa de PCR, para ello, se preparó un mix que consiste en 2 μ L de SAP (1 Unit/mL), 0.2 μ L de EXO (10 Unit/mL) y 6 μ L de agua MiliQ, este mix es preparado por muestra. Una vez preparado, se agregan 4 μ L del producto de PCR. Enseguida las muestras se incubaron a 37 °C por 1 h y finalmente a 72 °C por 15 minutos para degradar a la enzima. Estas muestras se mandaron a secuenciar en ambas direcciones a la compañía Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

2.2.7 Análisis de secuencias genómicas

Los electroferogramas resultantes de la secuenciación fueron analizados mediante tres softwares, FinchTV, sequencer 4.1.4 y Chromas. Con estos softwares, se alinearon las secuencias sentido y antisentido, tal como se muestra en la parte superior de la figura 6, se eliminaron los extremos con pobre resolución (ver el recuadro naranja de la figura 6) y se verificó la correcta asignación de las bases para pico observado, por ejemplo, en el caso del electroferograma mostrado en la figura 6, en la parte inferior se muestra una región de buena calidad y clara asignación de bases. Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos por cada región amplificada, estas fueron comparadas con las secuencias reportadas en el GenBank mediante el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar primero el género con la región amplificada del ITS y la especie con la región amplificada de la subunidad pequeña del ARN ribosomal mitocondrial.

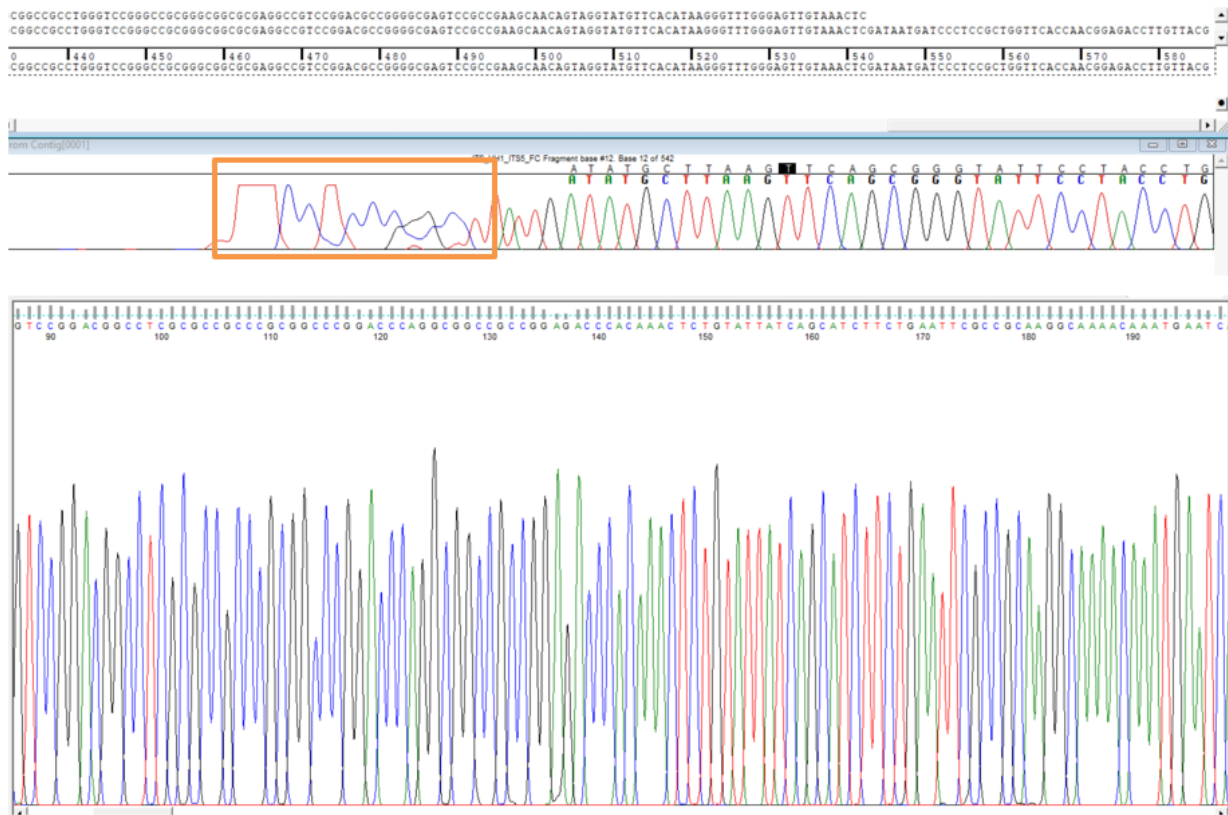


Figura 6. Ejemplo del electroferograma de la secuenciación ITS de la cepa de estudio. El recuadro naranja resalta un extremo con baja calidad en la secuenciación.

2.3 Fermentación en fase sólida

2.3.1 Crecimiento superficial en agar SDA y PDA

Las esporas de *A. muscarius* de un cultivo en PDA fueron removidas con un isopo estéril para luego ser suspendidas en agua estéril con Tween al 2%, posteriormente fueron centrifugadas durante 2 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante fue recuperado en 1 mL de agua estéril para su posterior cuantificación. Se ajustó la concentración de esporas hasta 1×10^6 esporas/ μL . Se midieron exactamente 10 μL de esta solución y se depositaron en el centro de cada caja Petri con medio SDA o PDA. Después del tercer día de siembra, se midió el diámetro de la colonia hasta el día veinte. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

2.3.2 Propagación de micelio en grano de trigo y bagazo de café

La propagación consistió en monitorear el crecimiento del micelio en grano de trigo o bagazo de café húmedos y estériles. Para ello, se agregó sustrato hidratado y acondicionado en tubos de cultivo con tapa tipo baquelita hasta alcanzar un 50 % del volumen total del tubo. Los frascos fueron esterilizados (121 °C, 30 min) e inoculados con 1 mL *A. muscarius* (1×10^6 esporas/ μ L). El crecimiento fue monitoreado midiendo el área superficial de los tubos de cultivo hasta colonización completa o hasta llegar a la fase estacionaria del crecimiento. Al final de la propagación, se cuantificó la concentración de esporas obtenidas por Kg de sustrato en base seca.

2.3.3 Preparación del sustrato

2.3.3.1 Acondicionamiento del grano de trigo

El grano de trigo se limpió para remover impurezas, se registró su peso inicial, posteriormente fue precocido en agua a punto de ebullición (96°C) durante 15 minutos. Enseguida se escurrió y se enjuagó con agua destilada para remover exceso de almidón. Se procedió a deshidratar extendiendo dicho sustrato sobre toallas absorbentes. Se monitoreó el peso hasta que el agua en exceso fue removida del sustrato (~30% de humedad). Finalmente, se aplicó yeso (0.5% en peso respecto al sustrato en peso seco) y cal (2% en peso respecto al sustrato en peso seco).

2.3.3.2 Acondicionamiento del bagazo de café

El bagazo de café fue triturado en un molino convencional hasta un tamaño promedio de 30 mm, se registró el peso inicial. Posteriormente fue remojado en agua destilada a temperatura ambiente durante 12 h. Enseguida, se deshidrató sobre toallas absorbentes, se monitoreó el peso del sustrato hasta remover el exceso de agua (~70%

de humedad). Finalmente, se aplicó yeso (0.5% en peso respecto al sustrato en peso seco) y cal (2% en peso respecto al sustrato en peso seco).

2.3.3.3 Esterilización de sustratos e inoculación

Los sustratos dentro de los frascos de cultivo fueron esterilizados a 121 °C durante 15 minutos, una vez fríos, fueron inoculados bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar. El inóculo consistió en aplicar un disco de micelio de 1 cm de diámetro proveniente de cultivo de PDA incubado previamente durante 7 días.

2.3.3.4 Cuantificación de esporas

Para la observación de las esporas, primero se homogeneizó el inóculo (solución de esporas) mediante agitación con vórtex y enseguida centrifugación a 3,500 rpm durante 1 minutos, se recuperó el sobrenadante y se ajustó al volumen deseado con Tween al 2%. Para la cuantificación, una alícuota del inóculo se diluyó apropiadamente con solución Tween al 2%, posteriormente, se tomaron 5 µL de solución de esporas, las cuales fueron teñidas con azul de metileno 0.001% y deshidratadas hasta sequedad sobre la cámara (mismo procedimiento para la tinción de micelio). La figura 7 muestra tres micrografías de acuerdo con la calidad en la tinción y a diferentes diluciones, la figura 7 C es ideal para el conteo de esporas. La cuantificación se realizó con al menos 5 cuadrantes distintos en la cámara de Neubauer en un aumento 40x y se excluyeron aquellas esporas que estuvieron en la línea divisoria de cada cuadrante. Finalmente se utilizó la fórmula que se describe a continuación:

$$\#esporas/\mu L = \frac{\text{Número de esporas contadas}}{(\text{Superficie contada (mm}^2\text{)})(\text{Profundidad de la cámara (mm)})} \times \text{dilución}$$

Donde:

$$\text{Superficie (mm}^2\text{)} = 0.0025$$

Profundidad (mm) = 0.1

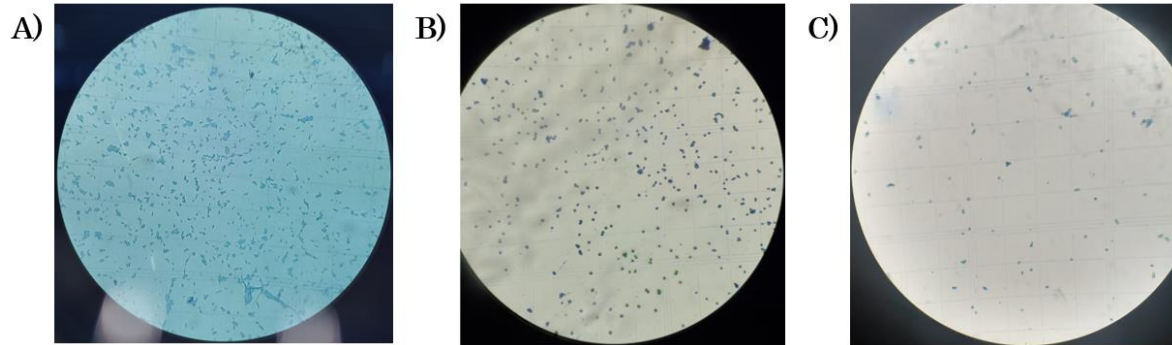


Figura 7. Esporas observadas en cámara de Nuwbauer en un aumento 40x. A) Dilución concentrada de esporas y con exceso de colorante, B) Inóculo diluido, pero con esporas aglomeradas y C) Inóculo diluido con esporas aisladas y con buen contraste para su cuantificación.

2.3.3 Biorreactor de lecho fijo: diseño y asepsia

Se diseñó un biorreactor de lecho empacado con el propósito de monitorear el CO₂ derivado de la respiración celular durante la fermentación sólida de *Akanthomyces muscarius*. Para ello, se diseñó un pequeño diagrama eléctrico que se ilustra en la figura 8 y que sirvió de base para la construcción del biorreactor.

El biorreactor estuvo conformado por un sensor de humedad sumergible capacitivo, un sensor de temperatura DS18B20 y otro más para medir calidad de aire, MQ135. Estos sensores estuvieron comunicados con el microprocesador (tarjeta Arduino), que a su vez permitió visualizar las lecturas mediante una la pantalla OLED SSDB06 y, además, los almacenó como archivo .txt en una microSD. Este biorreactor trabajó con una corriente directa de 5 V. El código de programación de encuentra en en Anexo A.

El biorreactor básicamente fue un tubo de vidrio sin tapas, por la parte inferior se le colocó una malla fina y plástico aislante, la cual retuvo al sustrato dentro del reactor,

por la parte superior se introdujo el sustrato, inóculo y sensores para luego ser sellado con plástico aislante.

Durante el armado (figura 9), todas las piezas de vidrio y plásticos fueron lavadas e incubadas con agua al 0.5% de hipoclorito de sodio durante un lapso de 12 h. Posteriormente, todas las piezas fueron esterilizadas mediante radiación UV-vis durante 30 minutos. Posteriormente se empacó el sustrato y sensores previamente esterilizados y al final el inóculo. Se selló el sistema procurando dejar drenar los gases sin riesgo de contaminación. Durante el proceso de fermentación, se monitoreó el crecimiento de acuerdo con el área superficial propagada, para ello, se cuantifica con referencia de una hoja milimétrica cuadrículada.

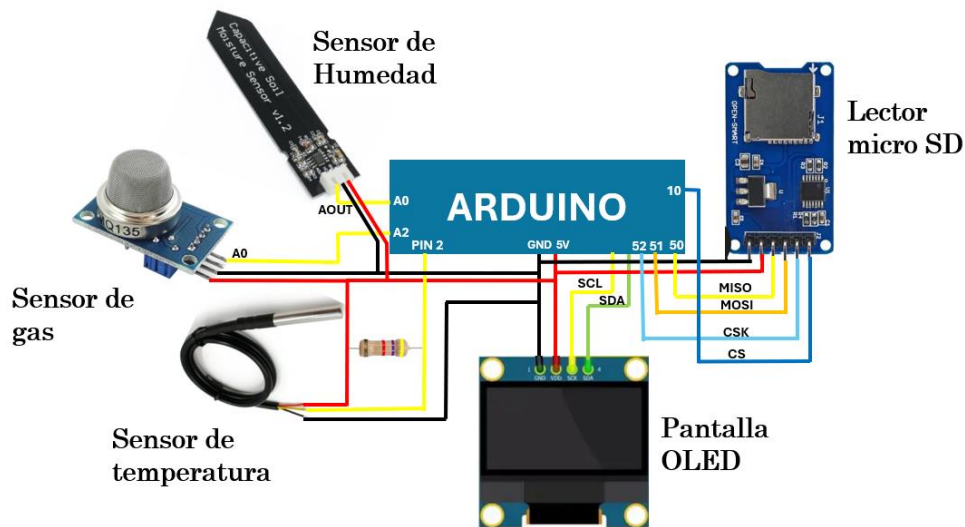


Figura 8. Diagrama electrónico del biorreactor de lecho empacado.

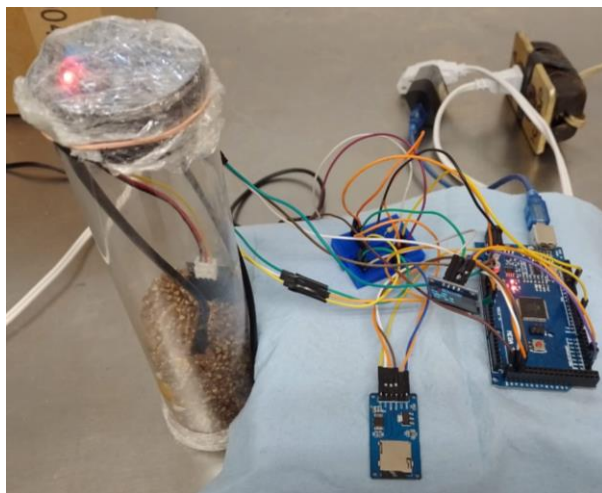


Figura 9. Armado del biorreactor de lecho empacado, utilizando trigo como sustrato.

2.4 Fermentación líquida superficial

2.4.1 Preparación de medios de cultivo

El caldo PD comercial fue preparado siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. En este caso se disolvieron 26.5 g en 1 L de agua destilada. Enseguida, se esterilizó el medio a 121 °C durante 15 minutos. Finalmente, se dejó enfriar el medio para su posterior inoculación.

El caldo PD propuesto consistió en una infusión de trozos de papa de 1 cm de diámetro en agua a punto de ebullición (96 °C) durante 10 min, seguido de una filtración en caliente. Al caldo se agregaron 20 g de dextrosa anhidra y 6 g de KH_2PO_4 . Una vez disueltos los reactivos, el caldo se filtró sobre una tela fina y después sobre papel Whatman #1. Finalmente se esterilizó con las mismas condiciones que el caldo PD comercial.

2.4.2 Inoculación e incubación

La inoculación consistió en colocar discos de 1 cm de diámetro sin exceso de agar sobre el medio de cultivo líquido con precaución de no sumergirlos. Tanto el corte de los discos como la inoculación propiamente se realizó bajo condiciones estériles. Los medios de cultivo se dejaron incubar a 25 ± 0.2 °C en oscuridad.

2.4.3 Conservación de la biomasa fresca

La torta obtenida del paso anterior (biomasa sobre la superficie del medio líquido) fue removida del medio de cultivo. Las tortas homogéneas en forma y densidad fueron seleccionadas como inóculo para los experimentos posteriores. El micelio se conservó en el medio líquido hasta su uso inmediato, procurando no rebasar los 20 días de incubación.

2.4.4 Secado y rendimiento de biomasa

Las tortas seleccionadas fueron pesadas y fragmentadas en discos de 1 cm de diámetro para su uso inmediato, pero se resguardaron al menos 3 discos por torta para registrar su peso y posterior deshidratación, la cual consistió en colocar los discos en cajas Petri nuevas, que fueron deshidratadas a 40 °C hasta peso constante. Todos estos pasos se realizaron en condiciones estériles.

Conociendo el peso húmedo de la torta y el peso en base húmeda y seca de los discos muestra, fue posible estimar el rendimiento de la biomasa ($Y_{x/s}$) obtenida por gramo de sustrato mediante la siguiente fórmula:

$$Y_{x/s} = \frac{P_{hT} * \overline{P_{SD}}}{\overline{P_{hD}} * P_{glucosa}}$$

Donde P_{hT} : Peso húmedo de la torta (g), $\overline{P_{SD}}$: Peso promedio de los discos secos (g), $\overline{P_{hD}}$: Peso promedio de los discos húmedos (g) y $P_{glucosa}$: Peso de la glucosa (Dextrosa) de cada formulación (g).

2.5 Fermentación líquida Sumergida

2.5.1 Selección de la formulación del medio de cultivo

Para analizar el efecto de los distintos medios de cultivo en el desarrollo de micelio bajo fermentación líquida sumergida, se diseñaron 6 formulaciones (tratamientos) cuya composición para 1 litro de cultivo se describe en la tabla 5.

Tabla 5. Composición de los medios de cultivo empleados para la fermentación líquida sumergida.

Componentes (g/L)	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Dextrosa	10	10	10	10	10	10
extracto de levadura	5	5	5		5	
extracto de papa						Si
peptona de caseína				5	20	
Minerales**	Si	Si	No	Si	Si	Si
KH ₂ PO ₄	6	1	6	6	6	6

La preparación de la formulación 6 consistió en una infusión de trozos de papa de 1 cm de diámetro durante 10 min en agua a punto de ebullición (96 °C), seguido de una filtración en caliente y una filtración fina con papel Whatman estándar. Después se agregaron el resto de los componentes al caldo. En cuanto a la adición de minerales, estos estuvieron conformados por: 1 mM de MgSO₄.7H₂O, 0.1 mM CaCl₂, 20 μM FeSO₄.7H₂O, 2 μM CuSO₄.5H₂O, 5 μM ZnCl₂, 20 μM MnSO₄.H₂O, 6 μM CoCl₂.6 H₂O y 0.1 μM NiCl₂.6H₂O.

Con las formulaciones anteriores se realizó un diseño experimental totalmente al azar a partir de 18 unidades experimentales (cada tratamiento por triplicado), en la que

cada unidad consistió en una fermentación sumergida de *Akanthomyces muscarius* en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio previamente ajustado a pH de 5.5. Las condiciones de fermentación fueron las siguientes: temperatura de 28 ± 0.1 °C, agitación orbital con una velocidad de 100 rpm y un tiempo de fermentación de 9 días.

Las variables de respuesta fueron: velocidad de crecimiento específico máximo ($\mu_{m\acute{a}x.}$, días⁻¹), concentración de biomasa máxima predicha ($x_{m\acute{a}x.}$, g/L) y rendimiento ($Y_{X/S}$, g de biomasa/g de sustrato). Los primeros dos parámetros $\mu_{m\acute{a}x.}$ y $x_{m\acute{a}x.}$ fueron estimados mediante el modelo logístico para ello, se procedió a resolver la ecuación diferencial descrita en la ecuación 4 y cuya solución es la siguiente:

$$x(t) = \frac{x_o e^{\mu_{m\acute{a}x.}t}}{1 - \left(\frac{x_o}{x_{m\acute{a}x.}}\right) (1 - e^{\mu_{m\acute{a}x.}t})}$$

Donde x_o es la concentración de biomasa inicial (g/L) y t es el tiempo (días).

Así pues, las variables de respuesta fueron entonces los parámetros de ajuste del modelo con los datos experimentales mediante la suma de mínimos cuadrados utilizando la siguiente función objetivo:

$$\sum_i^{ne} \sum_j^{np} (x_{1\ exp} - x_{1\ mod})^2 + (x_{2\ exp} - x_{2\ mod})^2 + \dots + (x_{n\ exp} - x)^2$$

Por tanto, fue necesario estimar la concentración de biomasa (g/L), la cual se detalle más adelante.

En cuando a la variable de rendimiento $Y_{X/S}$, ésta se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Y_{x/s} = \frac{x_f - x_o}{C_{s0} - C_{sf}}$$

Donde x_o, x_f, C_{s0} y C_{sf} corresponden a la concentración de biomasa y concentración de sustrato al inicial y final de la fermentación.

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA simple por cada variable de respuesta. Cabe mencionar que previo al análisis de varianza, se realizaron las pruebas de distribución normal de los datos e igualdad de varianza entre las muestras. Finalmente se realizó la prueba Post-Hoc de Tukey para identificar a la mejor o mejores formulaciones. Dichas pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de confianza $\alpha=0.05$ mediante las librerías Pandas, Pingouin y Seaborn del lenguaje de programación Python.

La mejor formulación identificada mediante la prueba Post-Hoc de Tukey fue evaluada mediante el modelo de Monod considerando la producción de biomasa y el consumo de sustrato:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x = \mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{C_s}{K_s + s} \right) x$$

$$\frac{dC_s}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt}$$

Las condiciones iniciales fueron: $x_0 = 0.15$ g/L y $C_{s0} = 10$ g/L. Los parámetros de ajuste fueron: $\mu_{m\acute{a}x}, Y_{x/s},$ y K_s . Los primeros dos fueron propuestos a partir de $\mu_{m\acute{a}x}$ del modelo logístico y $Y_{x/s}$ medido experimentalmente. Para ello, se usaron las librerías numpy, las funciones solve_ivp y optimize de scipy y matplotlib en el lenguaje de programación Python. El ajuste del modelo con los datos experimentales fue mediante la suma de mínimos cuadrados utilizando la siguiente función objetivo (ver Anexo B):

$$\sum_i^{ne} \sum_j^{np} (X_{1\ exp} - X_{1\ mod})^2 + (S_{exp} - S_{mod})^2$$

2.5.2 Efecto del volumen, agitación, pH, agitación y concentración de glucosa

Para la evaluar el efecto del volumen, agitación, pH del medio y concentración de glucosa como sustrato limitante, se realizó un diseño factorial 2^k , con $k=4$ factores. La tabla 6 muestra los niveles de cada factor. Se llevaron a cabo 16 tratamientos, los cuales se muestran en la tabla 7 y cada tratamiento se realizó por triplicado. Como variables de respuesta se consideraron los parámetros de ajuste ($\mu_{m\acute{a}x.}$ y $x_{m\acute{a}x.}$) del modelo logístico con los datos experimentales mediante la suma de mínimos cuadrados utilizando la misma función objetivo descrita anteriormente. También se cuantificó la concentración de glucosa residual al termino de cada experimento y con ello estimar el rendimiento $Y_{x/s}$. Cada unidad experimental (tratamiento) consistió en una fermentación cuya concentración inicial de biomasa fue de 0.16 ± 0.01 g/L en matraces de 250 mL y con agitación orbital a 28 °C. El tiempo final de la fermentación fue cuando se alcanzó la fase estacionaria.

Por cada tratamiento se registró el peso de la biomasa en base seca para calcular la concentración en g/L.

Tabla 6. Niveles de los factores para el diseño factorial 2^4

Variable	Parámetro	Nivel codificado	
		-1	+1
V	Volumen relativo* (%)	20	60
A	Agitación (rpm)	50	150
pH	pH del medio	5.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1
G	Glucosa (g/L)	10	40

* 20 y 60 corresponden al % de volumen ocupado por el fermento en el matraz Erlenmeyer de 250 mL.

Tabla 7. Tratamientos para el diseño factorial 2^4

Tratamiento	X_V	X_A	X_{pH}	X_G
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1
8	-1	1	1	1
9	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1
11	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1
13	1	1	-1	-1
14	1	1	-1	1
15	1	1	1	-1
16	1	1	1	1

El diseño experimental fue analizado mediante un modelo de regresión lineal, dicho modelo se describe a continuación:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_V + b_2x_A + b_3x_{pH} + b_4x_G + b_{12}x_{VA} + b_{13}x_{VpH} + b_{14}x_{vG} + b_{23}x_{ApH} + b_{24}x_{AG} + b_{34}x_{pHG}$$

Donde, \hat{y} es la respuesta predicha, es decir, $\mu_{m\acute{a}x.}$ y $x_{m\acute{a}x.}$ y x_i son las variables independientes. Los coeficientes de la regresión son: b_0 es la intersección, b_1 , b_2 , b_3 y b_4 son los coeficientes para los efectos lineales y b_{12} , b_{13} , b_{14} , b_{23} , b_{24} y b_{34} son los coeficientes para los efectos de las interacciones.

2.5.3 Optimización para el crecimiento de *Akanthomyces muscarius* mediante fermentación líquida sumergida

Para la optimización del crecimiento de *Akanthomyces muscarius* en FLS, se evaluó el efecto del volumen, agitación y concentración de glucosa como sustrato limitante mediante un diseño de caras centradas $2^k + 2k + 1$ con $k = 3$.

La tabla 8 muestra los niveles de cada factor y para el diseño, se llevaron a cabo 15 tratamientos por triplicado, los cuales se muestran en la tabla 9. Como variables de respuesta se consideraron los parámetros de ajuste ($\mu_{\text{máx.}}$ y $x_{\text{máx.}}$) del modelo logístico con los datos experimentales mediante la suma de mínimos cuadrados utilizando la misma función objetivo descrita anteriormente. También se cuantificó la concentración de glucosa residual al término de cada experimento y con ello estimar el rendimiento $Y_{x/s}$. Cada unidad experimental (tratamiento) consistió en una fermentación cuya concentración inicial de biomasa fue de 0.16 ± 0.01 g/L en matraces de 250 mL y con agitación orbital a 28 °C. El tiempo final de la fermentación fue cuando se alcanzó la fase estacionaria.

Por cada tratamiento se registró el peso de la biomasa en base seca para calcular la concentración en g/L.

Tabla 8. Niveles de los factores para el diseño de caras centradas

Variable	Parámetro	Nivel codificado		
		-1	0	+1
V	Volumen relativo* (%)	20	40	60
A	Agitación (rpm)	50	100	150
G	Glucosa (g/L)	10	25	40

* 20, 40 y 60 corresponden al % de volumen ocupado por el fermento en el matraz Erlenmeyer de 250 mL.

Tabla 9. Tratamientos para el diseño de caras centradas

Tratamiento	X _V	X _A	X _G
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1	0	0
10	1	0	0
11	0	-1	0
12	0	1	0
13	0	0	-1
14	0	0	1
15	0	0	0

El diseño experimental fue analizado mediante un modelo de regresión lineal, dicho modelo se describe a continuación:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_V + b_2x_A + b_3x_G + b_{12}x_{VA} + b_{13}x_{VG} + b_{23}x_{AG} + b_{11}x_V^2 + b_{22}x_A^2 + b_{33}x_G^2$$

Donde, \hat{y} es la respuesta predicha, es decir, $\mu_{m\acute{a}x.}$ y $x_{m\acute{a}x.}$ y x_i son las variables independientes. Los coeficientes de la regresión son: b_0 es la intersección, b_1 , b_2 y b_3 son los coeficientes para los efectos lineales y b_{12} , b_{13} , b_{23} , b_{11} , b_{22} y b_{33} son los coeficientes para los efectos de las interacciones y efectos simples cuadráticos. Finalmente, se realizaron gráficos de superficie de respuesta mediante Matlab (ver Apéndice C)

2.6 Fermentación líquida sumergida en el biorreactor batch

La fermentación de *Akanthomyces muscarius* en el biorreactor batch se llevó a cabo una vez que el biorreactor fue desinfectado y montado (la sección siguiente habla a detalle de este procedimiento). Las condiciones de operación fueron las siguientes:

temperatura= 30 ± 0.3 °C, pH= 6 ± 0.1 , agitación 105 ± 15 rpm (24 %), nivel de aireación: 2 L /min, volumen de trabajo=0.5 L, concentración de glucosa inicial C_{s0} = 40 g/L, concentración inicial de biomasa x_0 =0.5 g/L, cabe mencionar que la fermentación se realizó por duplicado. Se colectaron muestras de 2 mL cada 24 h, con dichas muestras se estimó el peso de biomasa en base seca, consumo de sustrato, y se midió el coeficiente de transferencia de masa gas-líquido (se detalla más adelante). También se tomaron muestras de los pellets para ser teñidos y observados mediante microscopía en un aumento 40x.

2.6.1 Propuesta del modelo cinético

La cinética de crecimiento mediante la ecuación de Monod es un buen modelo para estudiar la cinética de las fermentaciones; sin embargo, se requiere hacer mediciones simultáneas del crecimiento microbiano y del consumo del sustrato limitante, es por ello que se recurre a otros modelos tales como el modelo logístico, el cual facilita el análisis con una buena precisión en muchos procesos fermentativos mediante alguna variable asociada al crecimiento; sin embargo, cuando se busca conocer la eficiencia de un biorreactor, se recurre a modelos más sofisticados que permitan correlacionar el crecimiento de un microorganismo con las características de diseño del reactor (Pirt, S. J., 1975). Para el caso particular de la fermentación sumergida de *Akanthomyces muscarius* en el biorreactor batch empleado en este estudio, se modificó la ecuación de Monod tal como se describe a continuación.

Partiendo de la ecuación de Monod:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

Donde μ corresponde a la tasa de crecimiento específico (días^{-1}), que a su vez depende del sustrato limitante, en este caso, se ha suministrado oxígeno y glucosa como

sustratos de la fermentación, por tanto, μ está en función de la concentración del sustrato (C_s) en g/L, y disponibilidad del oxígeno en el medio (C_{O_2}) en g/L, es por ello por lo que, para el modelo, μ se debe calcular como se describe a continuación:

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{C_s}{k_s + s} \right) \left(\frac{C_{O_2}}{k_{C_{O_2}} + C_{O_2}} \right)$$

Donde $\mu_{m\acute{a}x}$ corresponde a la velocidad de crecimiento específico máximo (días⁻¹) mientras que, k_s y $k_{C_{O_2}}$ son las constantes de saturación de sustrato y de oxígeno, respectivamente.

Por otro lado, la concentración del sustrato es similar que en el modelo de Monod empleado anteriormente salvo en este caso, se decidió incluir al mantenimiento celular en la ecuación:

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt} - m_s \frac{dx}{dt}$$

Donde m_s (g g⁻¹) es el coeficiente de mantenimiento celular por el sustrato, es decir, relaciona la cantidad de sustrato que consume la biomasa en fase estacionaria.

En cuanto al balance de oxígeno en el biorreactor, se debe considerar la transferencia de masa del estado gaseoso al medio líquido y el consumo del oxígeno durante la fermentación:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_{LA}(C_{O_2}^* - C_{O_2}) - \frac{\mu}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt} - m_{C_{O_2}} \frac{dx}{dt}$$

La primera parte del lado derecho de la ecuación corresponde a la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la líquida, donde k_{LA} es el coeficiente de transferencia de masa gas-líquido (s⁻¹) y $C_{O_2}^*$ corresponde a la concentración de saturación de oxígeno

en el medio. La segunda parte corresponde al consumo de oxígeno durante la etapa de crecimiento microbiano donde $Y_{x/s}$ es el rendimiento de los g de biomasa/ g de oxígeno disuelto y la última parte corresponde al consumo de oxígeno por la biomasa sin crecimiento, donde $m_{C_{O_2}}$ (g g⁻¹) es el coeficiente de mantenimiento celular por el oxígeno.

El sistema de ecuaciones diferenciales se resolvió simultáneamente en Matlab mediante el ajuste de mínimos cuadrados tal como se ha hecho con los modelos anteriores y cuya función objetivo es:

$$\sum_i^{ne} \sum_j^{np} (x_{exp} - x_{mod})^2 + (C_{S_{exp}} - C_{S_{mod}})^2 + (C_{O_2_{exp}} - C_{O_2_{mod}})^2$$

2.7 Cuantificación de la biomasa

Se colectaron muestras representativas de 1 mL por cada fermento cada 24 h, posteriormente se procedió a centrifugar las muestras a 6,000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante para cuantificar la concentración residual de glucosa y en cuanto al pellet, este se re suspendió en agua destilada y se volvió a centrifugar a 6,000 rpm por otros 10 minutos. Finalmente se deshidrató a 50°C hasta peso constante. El peso en base seca de la biomasa fue convertido en unidades de concentración (g/L).

2.8 Cuantificación de la concentración del sustrato: Glucosa

2.8.1 Preparación del reactivo DNS

Se disolvieron 0.8 g de NaOH en 50 mL de agua destilada, y posteriormente se adicionaron lentamente 24 g de Tartrato de Sodio-Potasio. Se dejó agitar la solución resultante durante dos horas. Enseguida se adicionaron 0.8 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, y se continuó con la agitación por otra hora. Finalmente, la solución

resultante se aforó hasta 100 mL. El reactivo se preparó el mismo día de su uso y se preservó a temperatura ambiente en ausencia de luz (Miller, G.L., 1959).

2.8.2 Curva de calibración

Se realizó una curva de calibración para poder cuantificar los azúcares reductores de las muestras, que en este caso es la glucosa, para ello, se realizaron diluciones sucesivas de una solución de glucosa 20 g/L. Posteriormente se hicieron reaccionar todas las soluciones con el reactivo DNS tal como se describe a continuación. Se agregaron 500 μ L de cada solución y se mezclaron con 500 μ L de reactivo DNS, enseguida se catalizó cada reacción a baño María (96 °C) durante 10 minutos, luego las muestras se diluyeron con 2 mL de agua destilada. El cambio de coloración fue monitoreado a 540 nm mediante espectrofotometría de absorción UV-vis. Finalmente se construyó la curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración de glucosa. Por ley de Lambert y Beer, se hizo un ajuste lineal de los datos experimentales (concentración vs absorbancia) para estimar la pendiente, la cual es igual a la absorptividad molar (ϵ) cuando el paso óptico de la celda empleada es de 1 cm. Con la ϵ , se calculó la concentración de los sobrenadantes de las fermentaciones, las cuales reaccionaron de forma similar a las soluciones de glucosa frente al reactivo DNS. La figura 10 muestra una de las curvas de calibración realizadas durante el desarrollo de este trabajo.

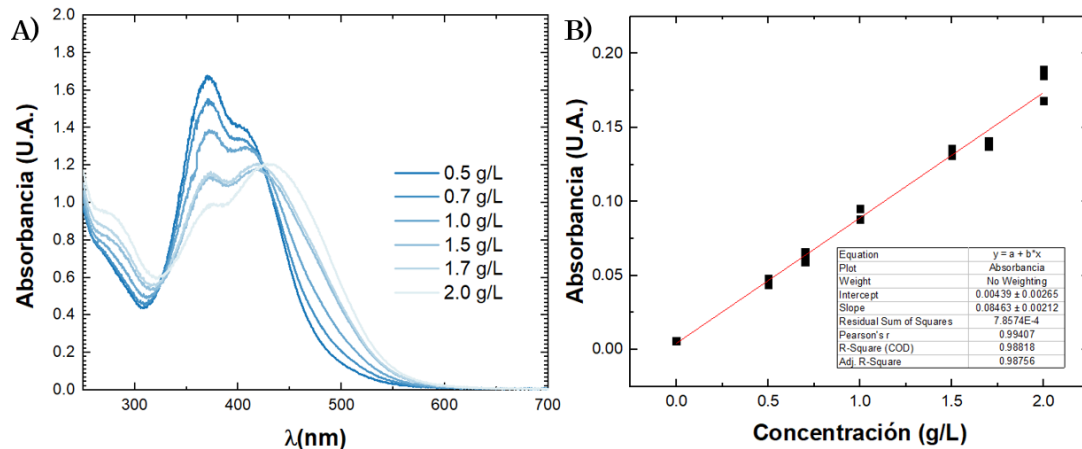


Figura 10. Curva de calibración para estimar la concentración de azúcares reductores con el reactivo DNS. A) Espectros de absorción UV-vis de la reacción de las soluciones de glucosa con el reactivo DNS, B) Ajuste lineal de los datos experimentales para calcular la absorptividad molar.

2.8.3 Estimación del coeficiente k_{LA}

Para estimar el coeficiente de transferencia de masa líquido-gas, k_{LA} , se realizó el proceso de fermentación de *Akanthomyces muscarius* en el biorreactor con otro recipiente de fermentación con las mismas condiciones de la cinética de fermentación. A los 4 días del fermento, el medio de cultivo se desoxigenó al vacío y enseguida se reanudó la oxigenación, se monitoreó el oxígeno disuelto hasta saturación. Posteriormente se construyó un gráfico de $\ln\left(\frac{C_{O_2^*} - C_{O_2}}{C_{O_2^*} - C_{O_2i}}\right)$ vs tiempo (s^{-1}), donde $C_{O_2^*}$ corresponde a la concentración saturada de oxígeno en el medio, C_{O_2} corresponde a la concentración de oxígeno durante el burbujeo y C_{O_2i} corresponde a la concentración de oxígeno al inicio del experimento (García & Gómez, 2009). El valor absoluto de la pendiente corresponde a la k_{LA} en s^{-1} . Este experimento se realizó por duplicado.

2.9 Diseño, construcción, control y asepsia del Biorreactor batch

2.9.1 Diseño y construcción

En esta sección se discute el diseño, construcción, pruebas de control y finalmente la asepsia requerida para la fermentación líquida sumergida mientras que, en la sección de resultados se discuten aquellos derivados de la fermentación con este reactor y se contrastan con aquellos obtenidos mediante el sistema de matraz agitado.

El biorreactor batch se diseñó de acuerdo con las observaciones identificadas en el sistema de matraz agitado. Bajo este esquema, se consideraron las siguientes condiciones: Control de temperatura, con el objetivo de mantener constante esta variable durante todo el proceso de fermentación a una temperatura aproximada de 28 °C; Control de pH, con el objetivo de que este parámetro se encuentre en un rango de 5-7 y, un sistema de agitación mecánico con frecuencia conocida (~100 rpm). La figura 11 muestra el diagrama propuesto de tuberías e instrumentación (DTI) para el sistema de control del biorreactor. Para la elaboración de dicho diagrama, se consultó la Norma Pemex No. 2.451.03. El diagrama no está completo, pues no se reporta la tabla resumen del balance de materia, ya que este sistema no es continuo y, además, las tuberías corresponden al sistema de control y no del proceso.

El sistema de control de temperatura está conformado por un indicador, es decir, el sensor MAX6675, el cual envía una señal eléctrica al microcontrolador (tarjeta Arduino MEGA 2560 ARD1) y después, si la temperatura es distinta a la temperatura objetivo, se activa una de dos bombas hidráulicas, cada una conectada a una tubería de agua caliente y fría. Entonces el agua recircula por el enchaquetado del biorreactor hasta alcanzar la temperatura deseada.

El control de pH está conformado propiamente por el sensor, el cual envía una señal eléctrica al microcontrolador, y este a su vez activa a una de dos bombas según el pH

objetivo (bomba peristáltica dispensadora Fluido Arduino Diy). Cada una de las bombas está conectada a dos soluciones, una llamada base, la cual es una solución de NaOH 0.5 M, mientras que la otra está conectada a una solución llamada ácida, la cual consiste en una solución H₂SO₄ 0.5 M. Ambas bombas funcionan con una corriente directa de 12 V, mientras que el microcontrolador opera bien con una corriente directa de 5 V.

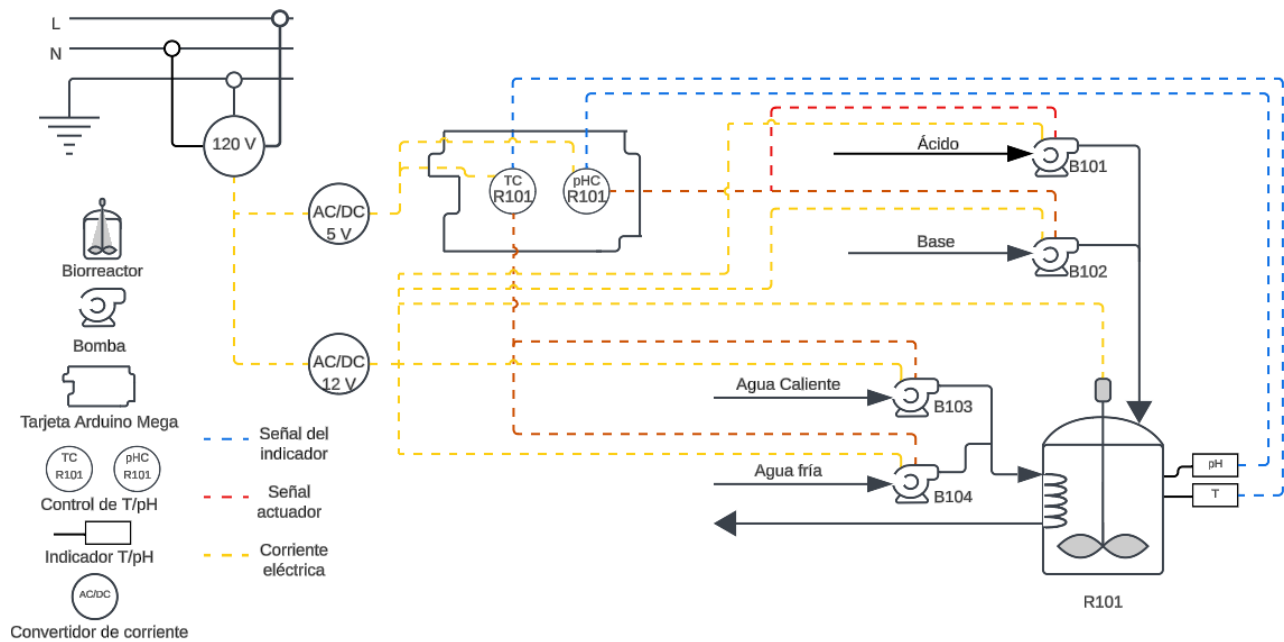


Figura 11. Diagrama de Tuberías e Instrumentación (DTI) para el sistema de control.

La figura 12 muestra el diagrama de diseño electrónico del biorreactor. Los componentes electrónicos son los siguientes:

- 1) Placa Arduino Mega 2560 (ARD1)
- 2) Sensor de pH
- 3) Sensor de temperatura (MAX6675) TERMOPAR
- 4) 4 relevadores Relay 1CH 5VDC, R1-R4
- 5) 2 bombas peristálticas (Diy) B. ÁCIDA y B. BASE

- 6) 2 bombas hidráulicas (de diafragma 12v 6w 3m para pecera) B.A. FRÍA y B.A. CAL.
- 7) Pantalla LCD 16x12 con interfaz i2C.
- 8) Driver de motor (A4988)
- 9) Motor paso a paso (para impresora 3D 42-40 Nema 17)
- 10) 2 LEDS azul y rojo con resistencia de 220 Ω

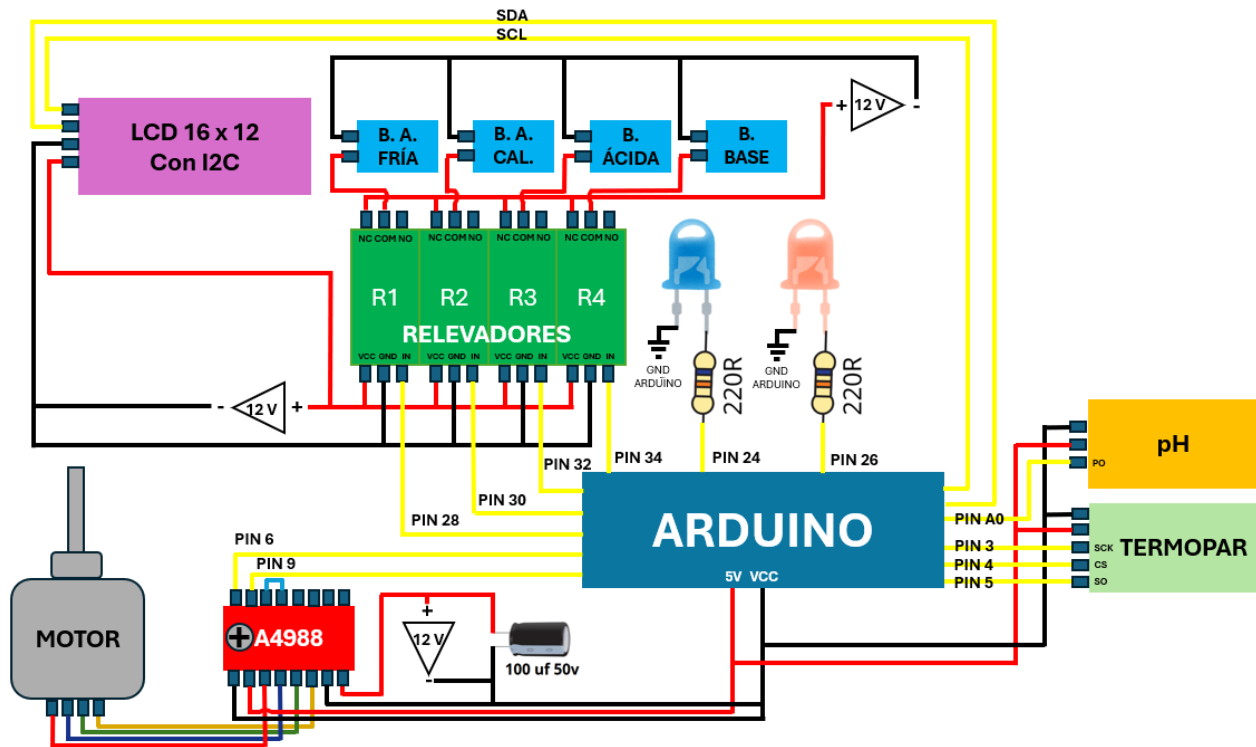


Figura 12. Diseño electrónico secuencial del biorreactor batch.

Se construyó una interfaz (ver figura 13) para tener comunicación con el microprocesador sin necesidad de trabajar desde la consola de Arduino. Dicha interfaz fue programada mediante Microsoft Visual Studio 2022. La interfaz permite enviar datos al microprocesador, tales el encendido y apagado del biorreactor a través de la opción OFF/ON, indicar el pH y temperatura de trabajo deseada, en este caso, solo se admiten números enteros y también ajustar la velocidad de agitación mediante el desplazamiento de la barra espaciadora. También el microcontrolador envía

información a la interfaz mediante la revisión de las últimas diez lecturas de pH y temperatura en forma gráfica y también mediante el almacenamiento de la información en archivo TXT en la carpeta de trabajo.

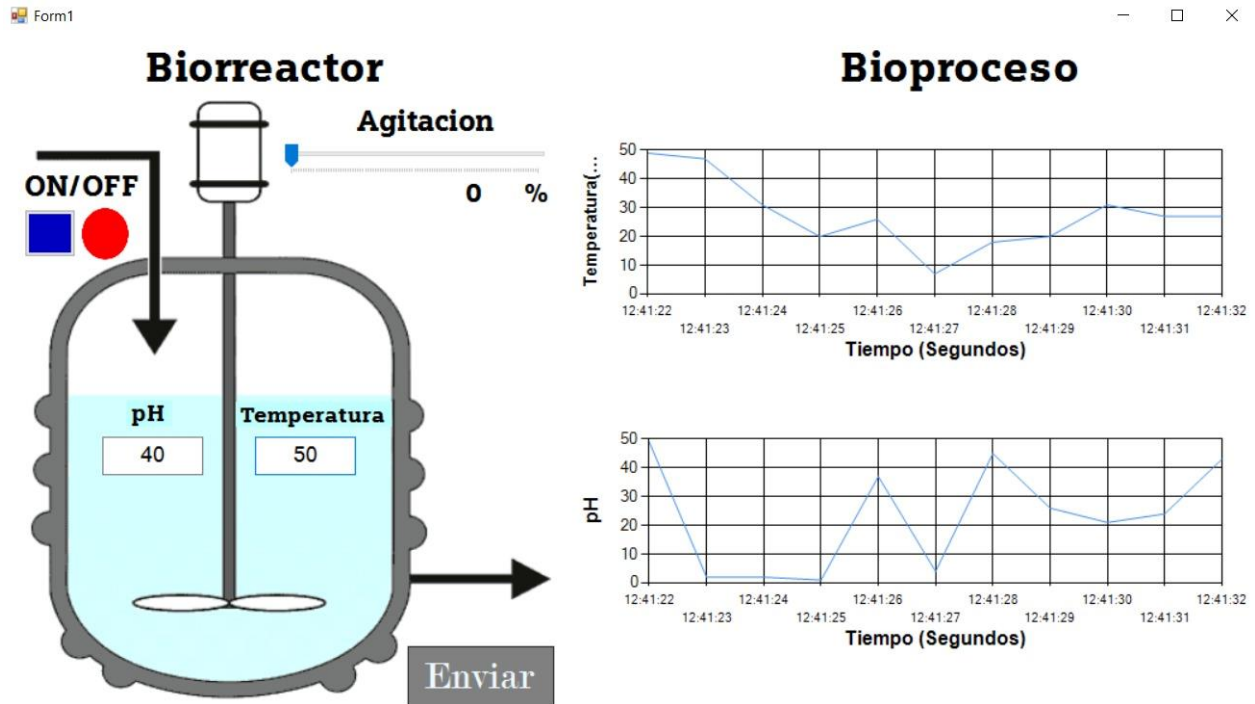


Figura 13. Interfaz para la comunicación con el microprocesador del sistema mediante Microsoft Visual Studio 2022.

La lógica de conexión consiste en conectar el sistema a corriente, luego se conecta el microprocesador al computador que ha iniciado la interfaz desde Microsoft Visual Studio, se reconoce la comunicación del puerto de conexión del Arduino con la computadora, con ello, desde la interfaz se enciende el sistema (opción ON) y para ello, se enciende el LED azul en el módulo 1 del biorreactor (ver figura 14), se introducen los parámetros de operación (pH, Temperatura y % de agitación), luego dar clic en la opción de “enviar” y automáticamente la pantalla LCD del biorreactor se actualiza. Se inicia la agitación y los sensores de Temperatura y pH envían señal a la pantalla LCD y a la interfaz gráfica, también se guardan simultáneamente en un

archivo .txt. De acuerdo con los parámetros de pH y temperatura introducidos, se activarán las bombas de pH y de temperatura y seguirán así durante la operación del biorreactor.

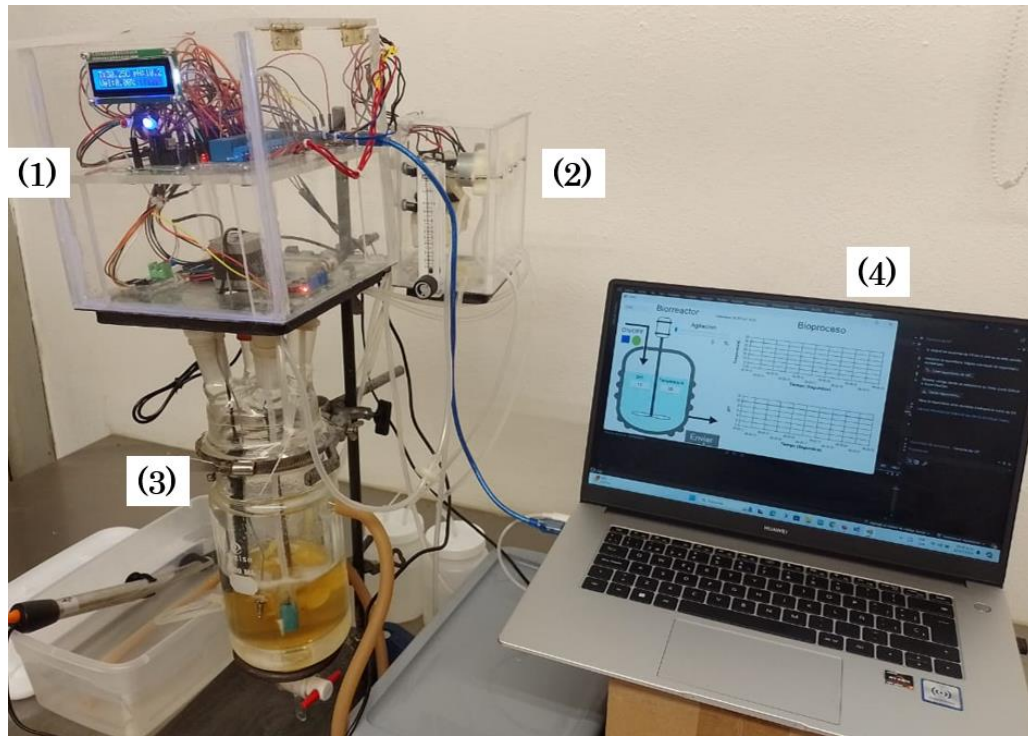


Figura 14. Módulos que conforman al biorreactor batch. (1) parte electrónica, (2) bombas para el control de temperatura y del pH, (3) Contenedor, (4) interfaz para la comunicación con el Arduino.

La figura 14 muestra al reactor batch completamente ensamblado, para su diseño, se resaltan 4 módulos, el primero comprende la electrónica del equipo, es decir al microcontrolador, relevadores, electrónica de los sensores y la pantalla LCD (ver figura 14 y 15). El segundo módulo (ver figura 14 y 16) es el área de bombas, las cuales se activan en coordinación con el sistema de control, para ello, cada bomba es alimentada de una solución ácida o básica. En este módulo también se encuentra un medidor de fluido de aire con válvula de control manual. Por este medidor fluye aire del medio ambiente, y antes de llegar al biorreactor, dicho flujo es filtrado mediante un acrodisco de 0.2 μm .

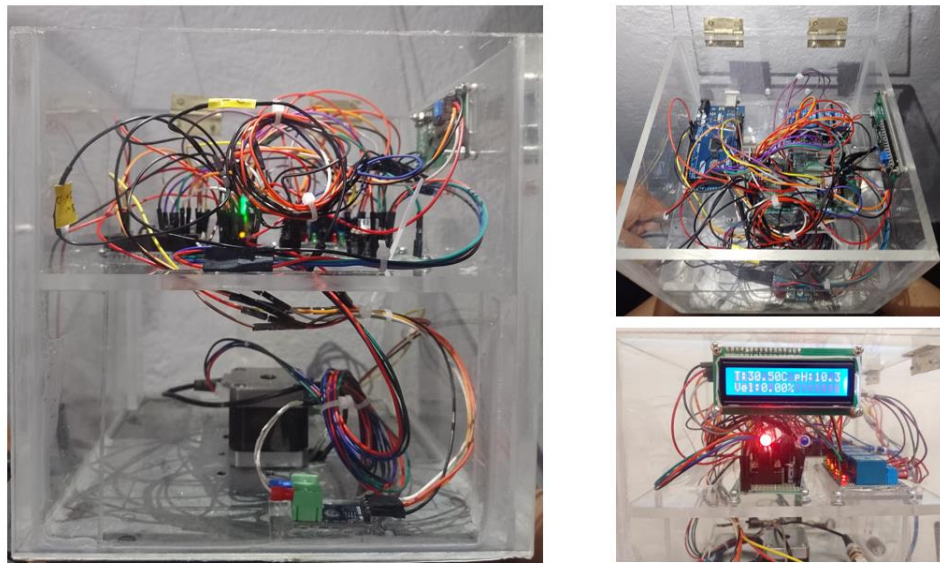


Figura 15. Vistas de la parte electrónica del biorreactor.

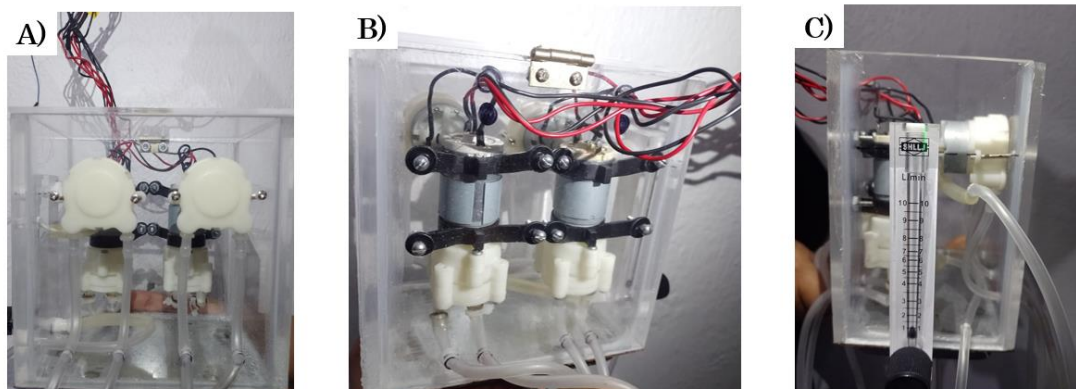


Figura 16. Módulo de bombas. A) bombas peristálticas para el control del pH del medio, B) bombas hidráulicas para el control de temperatura y C) medidor de flujo con válvula de control manual.

El tercer módulo está conformado por el contenedor del biorreactor (ver figura 14), este contenedor es de vidrio con capacidad 1 L, además cuenta con una tapa del mismo material, la cual tiene 3 bocas para el acceso al eje del agitador, los sensores y purga de gases. En la parte del fondo, cuenta con una válvula manual de drenaje. También cuenta con un enchaquetado, por donde se permite el flujo de agua caliente o fría para

el control de temperatura en el seno de la fermentación. El agua caliente proviene de una tina acoplada con una resistencia de calentamiento, mientras que el agua fría viene de otro contenedor, pero con agua a temperatura ambiente.

El cuarto módulo comprende la comunicación del microprocesador del módulo 1 con la interfaz de Microsoft Visual Studio desde la computadora.

2.9.2 Control

2.9.2.1 Calibración de sensores

Antes de iniciar con el control del sistema, se procedió a verificar la lectura de los sensores, tanto el de pH como el de temperatura. En el caso del pH, se hicieron mediciones de soluciones de pH conocidas, posteriormente se procedió a graficar el voltaje obtenido por el sensor con el correspondiente valor de pH, se realizó un ajuste polinomial, se actualizó el código del sensor y nuevamente se procedió a leer las mismas sustancias, se validó la ecuación cuando el margen de error fue menor a 0.1 (ver figura 17). En este caso, se utilizó una ecuación de ajuste lineal $pH = 0.708 * voltaje^2 - 12.07 * voltaje + 18.592$ con $R^2=0.967$, el código se actualizó tal como se muestra en el fragmento de la figura 18 o bien el apéndice D.

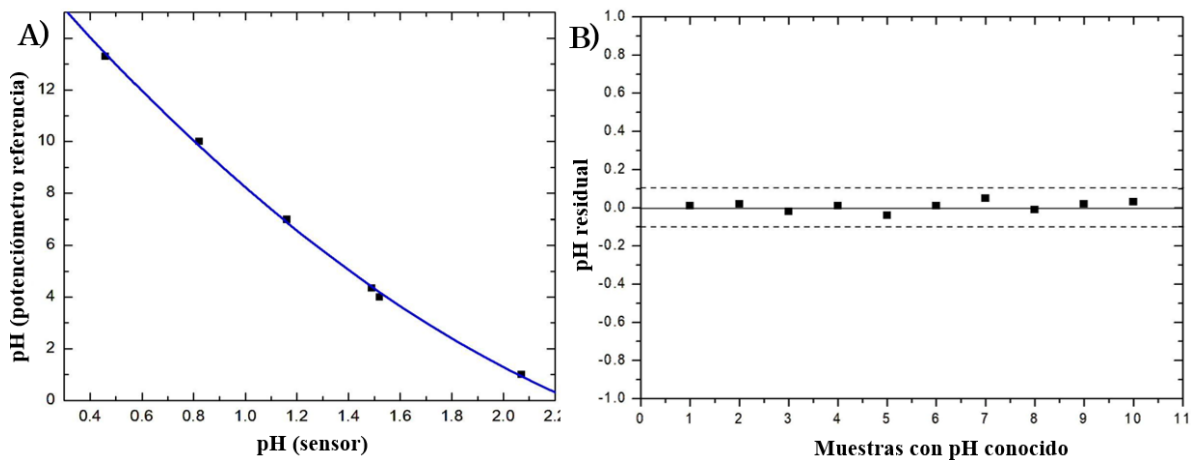


Figura 17. Ajuste del pH obtenido por el sensor con un potenciómetro de referencia. A) gráfico de ajuste, B) gráficos de residuos después de hacer la corrección con la ecuación de ajuste.

```

171     for (int i = 0; i < 9; i++) {
172         for (int j = i + 1; j < 10; j++) {
173             if (buffer_arr[i] > buffer_arr[j]) {
174                 int temp = buffer_arr[i];
175                 buffer_arr[i] = buffer_arr[j];
176                 buffer_arr[j] = temp;
177             }
178         }
179     }
180
181     unsigned long avgval = 0;
182     for (int i = 2; i < 8; i++) {
183         avgval += buffer_arr[i];
184     }
185
186     float volt = (float)avgval * 5.0 / 1024 / 6;
187     float ph_act = 0.708*(pow( volt , 2)) - 12.07*volt + calibration_value;
188
189     return ph_act;
190 }

```

Figura 18. Fragmento de código actualizado con la ecuación de ajuste para el sensor de pH.

El sensor de temperatura no fue necesario calibrar, ya que tiene un margen de error menor a 0.1 respecto a un termómetro digital de referencia, la figura 19 muestra el gráfico de residuos comparando los valores de temperatura por el sensor MAX6675 con el termómetro digital utilizando muestras de agua a baño María con diferentes temperaturas.

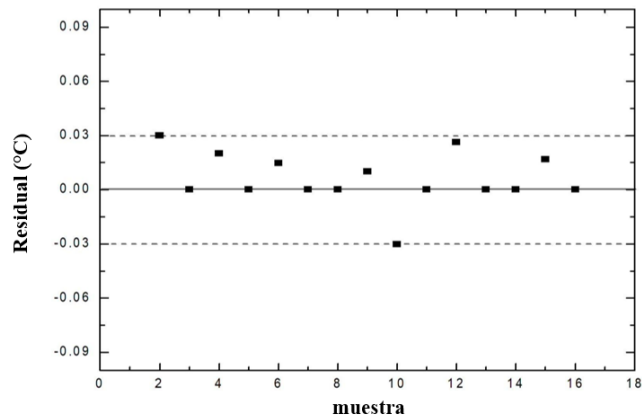


Figura 19. Gráfico de residuos después de hacer la corrección con la ecuación de ajuste.

2.9.2.2 Sistema de control

Para verificar el control de temperatura, se utilizaron 2 actuadores, es decir, dos bombas hidráulicas, una alimentada con agua caliente y la segunda con agua fría, si la temperatura del reactor es menor al setpoint, se apaga la bomba de agua fría y se activa la bomba de agua caliente, y sucede exactamente lo opuesto en caso de que la temperatura del reactor sea mayor a la del setpoint (ver figura 20).

```

211 void controlarTemperatura(double temperatura) {
212     if (start == 1) {
213         if (temperatura > setPointTemperatura) {
214             digitalWrite(pinFria, 1);
215             digitalWrite(pinCaliente, 0);
216         } else if (temperatura < setPointTemperatura) {
217             digitalWrite(pinFria, 0);
218             digitalWrite(pinCaliente, 1);
219         } if (start == 0) {
220             digitalWrite(pinFria, 0);
221             digitalWrite(pinCaliente, 0);
222         }
223     }
224 }

```

Figura 20. Lógica de programación para el control de temperatura.

En cuanto al control del pH del medio, la figura 21 muestra la programación para este parámetro. Se mide al pH, si este valor es inferior al setpoint, se activa la bomba base con un tiempo de drenado de 1 s, 30 s después se realiza otra medición, y se vuelve a

comparar el valor actual de pH con el setpoint. Por el contrario, si el valor actual es superior al setpoint, se activa la bomba ácida. El tiempo entre inyecciones es de 6 s, para dar tiempo suficiente en que el sistema se agite y se homogeneice.

```

27 // Variables globales
28 int start = 0;
29 double setPointTemperatura = 0;
30 double setPointPH = 0;
31 double setPointDimmer = 0;
32 unsigned long tiempoBombaAcido = 1000; // Milisegundos
33 unsigned long tiempoBombaBase = 1000; // Milisegundos
34 unsigned long intervaloBombaPH = 60000; // Milisegundos
35 unsigned long ultimaActivacionBombaAcido = 0;
36 unsigned long ultimaActivacionBombaBase = 0;
37
38
39
40 LiquidCrystal_I2C lcd(0x27, 16, 2);
41 MAX6675 thermocouple(pinSCK, pinCS, pinSO);
42
43 unsigned long ultimaActualizacion = 0;
44 const unsigned long intervaloActualizacion = 10000; // Milisegundos
45
46
47 float calibration_value = 18.592; // Valor de calibración para el sensor de pH
48 int buffer_arr[10]; // Array para almacenar lecturas del sensor de pH
49 unsigned long ultimoTiempoLecturaPH = 0;
50 const unsigned long intervaloLecturaPH = 30000; // Intervalo de 30 segundos para leer pH

```

```

225 void controlarPH(double ph) {
226     if (start == 1) {
227         unsigned long tiempoActual = millis();
228
229         if (ph < setPointPH && tiempoActual - ultimaActivacionBombaAcido >= intervaloBombaPH) {
230             digitalWrite(pinAcido, 1);
231             delay(tiempoBombaAcido);
232             digitalWrite(pinAcido, 0);
233             ultimaActivacionBombaAcido = tiempoActual;
234         } else if (ph > setPointPH && tiempoActual - ultimaActivacionBombaBase >= intervaloBombaPH) {
235             digitalWrite(pinBase, 1);
236             delay(tiempoBombaBase);
237             digitalWrite(pinBase, 0);
238             ultimaActivacionBombaBase = tiempoActual;
239         }
240     } if (start == 0) {
241         digitalWrite(pinBase, 0);
242         digitalWrite(pinAcido, 0);
243     }
244 }

```

Figura 21. Lógica de programación para el control de pH.

Finalmente, la figura 22 muestra el segmento de programación para el ajuste de velocidad de agitación, el setpoint va de 0 a 100, donde en 0 no hay agitación y en 100 hay máxima agitación.

```

191 void controlarAgitacion(double setPointDimmer) {
192     if (start == 1) {
193         // Limita la velocidad dentro de un rango seguro (ajustar según las necesidades)
194         if (setPointDimmer > 0 && setPointDimmer <= 100) {
195             // Establece la nueva velocidad del motor
196             double velocidad = map(setPointDimmer, 0, 100, 0, 1000);
197             stepper.setSpeed(velocidad);
198         }
199     }
200 }
201
202 // Continúa moviendo el motor a la velocidad actual
203 stepper.runSpeed();
204
205 if (start == 0) {
206     stepper.setSpeed(0);
207 }
208 }}
209

```

Figura 22. Lógica de programación para el ajuste de la velocidad de agitación.

Se realizaron varias pruebas de control, las mejores condiciones encontradas fueron las que se detalla en la redacción previa y en las figuras de la programación para cada control. En el caso de la temperatura, se alcanza el setpoint de 28 °C después de los 400 s si la temperatura de la bomba fría es >22 °C y la temperatura del agua caliente ≈ 30°C. La figura 23 A muestra el resultado de esta prueba. Otra alternativa útil consistió en mantener el setpoint a un valor más alto que el deseado y ajustar la temperatura de la bomba caliente con la temperatura deseada, entonces, como la temperatura del sistema esta debajo del setpoint, el agua caliente no deja de recircular y entonces se alcanza la temperatura deseada más rápido. En cuanto al pH, la figura 23 B muestra una prueba de control fijando un setpoint de 5.0 y el pH inicial del medio (con 6g/L de K₂HSO₄) de 4.5. A los 300 s el sistema empezó a estabilizarse en el setpoint; sin embargo, después de este tiempo el sensor se descalibró, y las lecturas ya no fueron confiables, de hecho, esto ocurrió en todas las pruebas. Desafortunadamente este sensor es analógico, y funciona bien para leer unas cuantas muestras hasta antes de su siguiente calibración. Para fines del proyecto, se bloqueó el control de pH y se decidió monitorear este parámetro por muestreo diario y en caso de requerir ajustar el pH, este se haría manualmente con soluciones acido-base

previamente preparadas. Finalmente, para conocer el porcentaje adecuado de agitación, se utilizó un anemómetro digital PM6252A y con este instrumento se encontró que a un 24% de agitación, se alcanzan 100 ± 15 rpm.

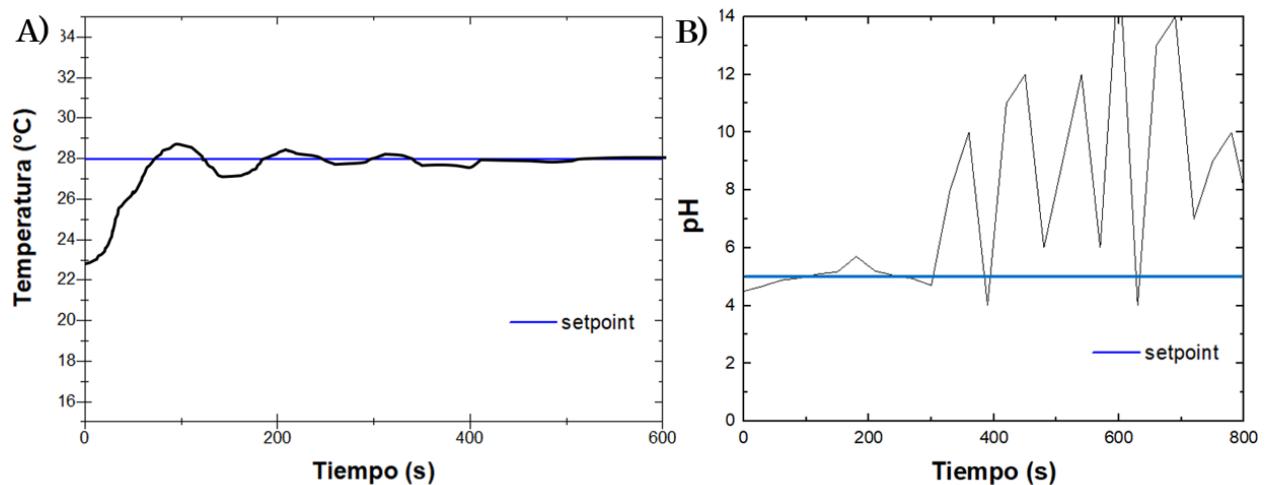


Figura 23. Prueba del control de temperatura y pH. A) Control de temperatura en los primeros 10 minutos de operación. B) control de pH en los primeros 800 s de operación.

2.9.3 Asepsia del Biorreactor batch

Todas las piezas del biorreactor (salvo electrónicas), fueron llevadas con jabón neutro y con 0.5% de hipoclorito de sodio. En cuanto al contenedor y todas sus piezas, estas fueron esterilizadas a 120 °C durante 20 minutos. Respecto a las piezas como mangueras, tapones y contenedores de plástico, estos fueron incubados con hipoclorito de sodio 0.5% durante 2 h y posteriormente enjuagados dentro de campana de flujo laminar. Una vez en la campana, las piezas fueron esterilizadas mediante luz UV-vis durante 30 minutos. Los sensores y cables también fueron esterilizados por este medio. Por otro lado, el medio de cultivo y antibiótico, fueron preparados tal como se describe en secciones previas. Se montó todo el sistema dentro de campana de flujo laminar y una vez ensamblado, se volvieron a esterilizar puntos críticos con radiación

UV-vis durante otros 20 minutos. La figura 24 muestra algunas imágenes de esta etapa.

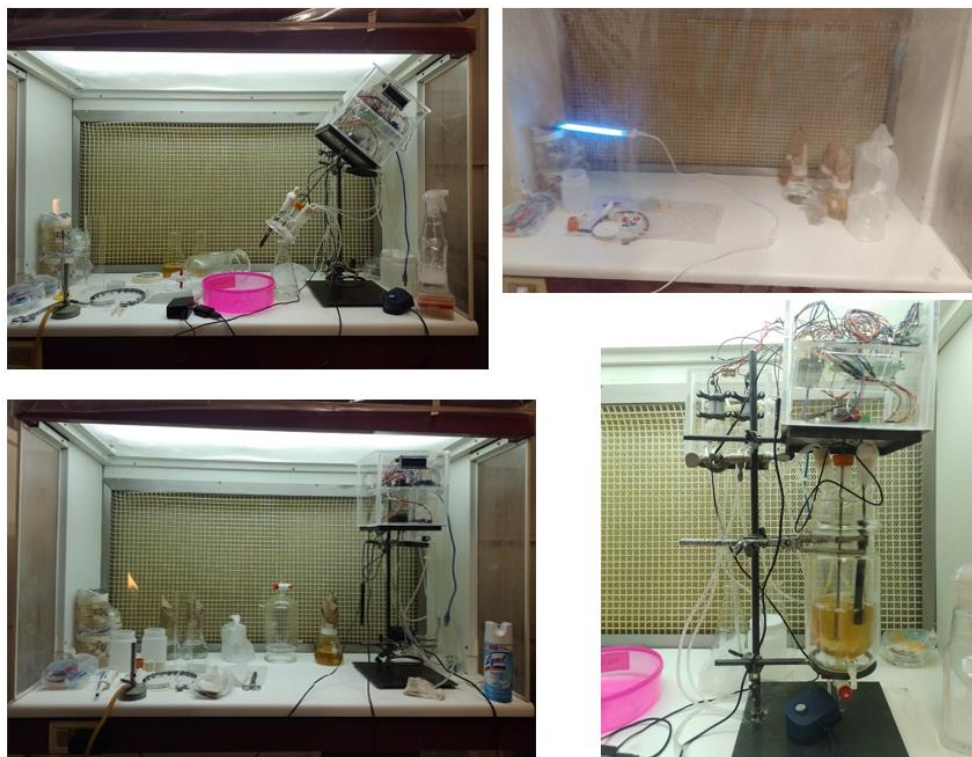


Figura 24. Proceso de asepsia y montaje del biorreactor

Referencias

1. Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153-176.
2. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
3. Pirt, S. J. (1975). *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications.
4. Tedersoo, L., Tooming-Klunderud, A., & Anslan, S. (2018). PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes: errors, biases and perspectives. *New Phytologist*, 217(3), 1370–1385.
5. Turco, S., Drajs, M. I., Rossini, L., Di Sora, N., Brugneti, F., Speranza, S., Contarini, M., & Mazzaglia, A. (2024). Genomic and pathogenic characterization of *Akanthomyces muscarius* isolated from living mite infesting hazelnut big buds. *Genes*, 15(8), 993.
6. Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Meyer, W. (2005). *DNA fingerprinting in plants: Principles, methods, and applications* (2nd ed.). CRC Press.

*"Caer está permitido, levantarse
es obligatorio"
Proverbio ruso*

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se abordan (1) los resultados obtenidos del aislamiento y descripción morfológica de *Akanthomyces muscarius*, (2) el análisis de las secuencias genómicas, (3) los resultados de los ensayos mediante fermentación sólida, (4) los resultados fermentación líquida superficial, (5) los resultados de la fermentación líquida sumergida en el sistema de matraz agitado desde la selección de la mejor formulación del medio de cultivo hasta la optimización de las condiciones experimentales mediante superficies de respuesta. Finalmente se muestran (6) los resultados obtenidos de la fermentación líquida sumergida mediante la implementación del biorreactor batch con tecnología Arduino.

3.1 Aislamiento y caracterización morfológica de *Akanthomyces muscarius*

Se recolectaron alrededor de 100 hojas infectadas con *Hemileia vastatrix* con presencia del parásito *Akanthomyces muscarius*, para ello, se evaluaron dos estrategias diferentes según el grado de asepsia. Se hicieron las siembras en medio PDA con y sin antibiótico (estreptomina 50µg/mL), de las cuales, *Akanthomyces muscarius* se logró aislar tras varias purificaciones sucesivas a partir del medio con antibiótico, ya que en este no se observó presencia de contaminación microbiana (ver figura 25 A- C). En las figuras 25 C y D se muestra la morfología de la cepa aislada, la cual presenta un micelio blanco, algodonoso, denso, blando y de lento crecimiento, en cuanto a los bordes, estos son regulares y pueden ser ligeramente levantados en relación con el centro. Por el reverso de la caja Petri (figura 25 D) se observa una coloración amarillenta sin penetrar el agar a diferencia con lo observado en el medio SDA en el cual, la colonia es más compacta y con penetración en el agar (ver figura 25 E y F). Algo en común de ambos medios, es que la colonia crece de manera radial y uniforme, expandiéndose progresivamente sobre la superficie del medio. Es importante mencionar que el crecimiento es lento en ambos medios; sin embargo, se desarrolla mejor en medio PDA que en SDA (ver figura 25 C-F).

A nivel microscópico, la figura 26 A y B muestran la forma de las hifas sin excesivas ramificaciones y conidios alargados y homogéneos como resultado del cultivo en medio PDA de *A. muscarius*, las características anteriores son semejantes a lo reportado para esta especie (Turco, 2024).

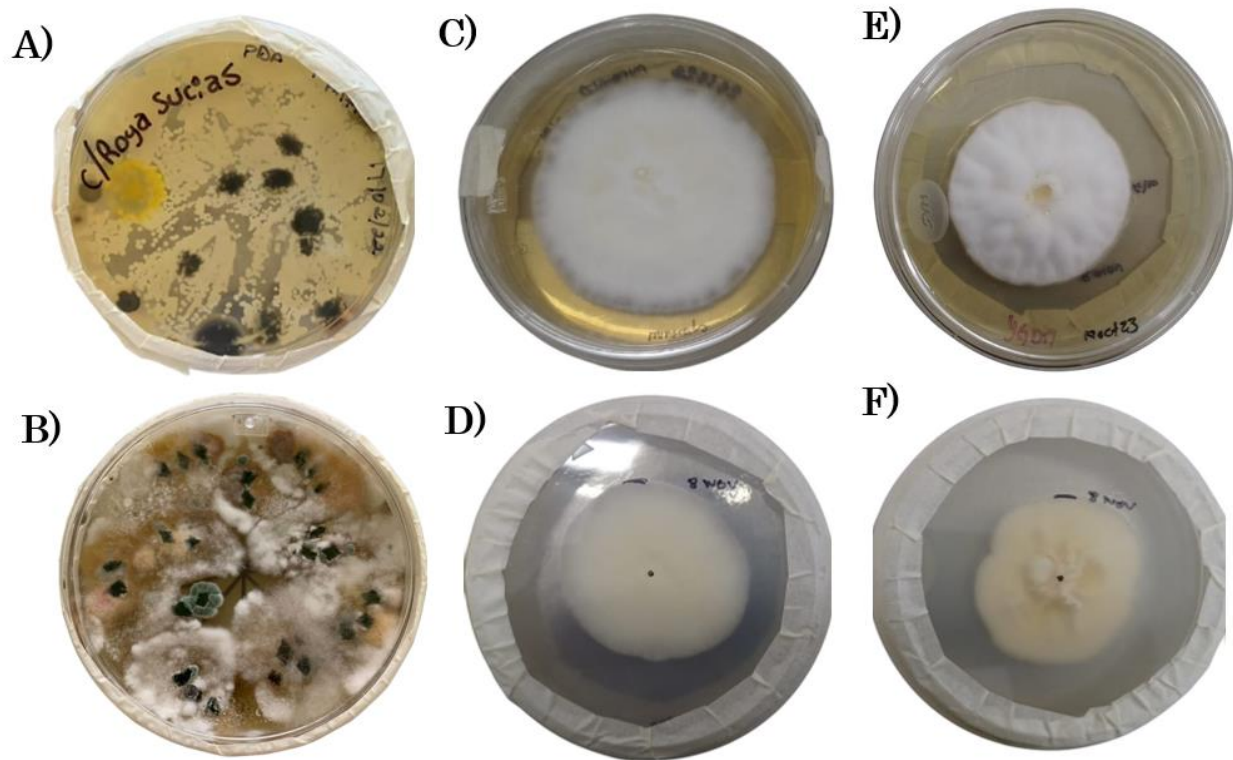


Figura 25. Aislamiento y morfología de colonias aisladas de *Akanthomyces muscarius*. A) Contaminación bacteriana a los 10 días de incubación de las muestras de hojas de café en agar PDA sin antibiótico. B) Diversidad de hongos nativos crecidos a los 10 días de incubación de las muestras de hojas de café en agar PDA con estreptomycin al 0.001%. C) Colonia de *A. muscarius* purificada y observada a los 10 días de incubación en medio PDA desde la parte anterior y D) posterior a la caja Petri. E) Otra colonia de *A. muscarius* a los 10 días de incubación en medio SDA desde la parte anterior y F) posterior a la caja Petri.

Finalmente, algunas muestras de hojas de café fueron observadas mediante SEM, la figura 26 C muestra parte del micelio y ascosporas de *A. muscarius*. Hasta ahora, solo se han reportado micrografías de este hongo en insectos, pero no en otros hábitats naturales como aquí se muestra.

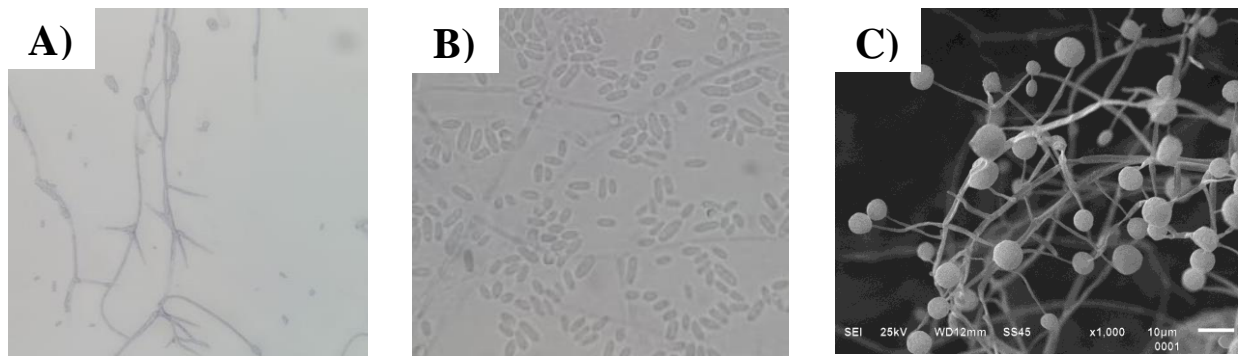


Figura 26. Morfología microscópica de *Akanthomyces muscarius*. A) hifas y B) conidios observados mediante tinción con azul de metileno en un aumento 40x. C) Morfología de micelio y ascosporas sobre tejido de hoja de café observada por SEM.

3.2 Identificación genotípica

Anteriormente, se reportaron hongos aislados de pústulas de *Hemileia vastatrix* identificadas con el género *Verticillium*; sin embargo, muchas especies fueron reagrupadas al género *Lecanicillium*, de hecho, morfológicamente son similares, de ahí la importancia de hacer la caracterización molecular (Díaz & Medel, 2024; Kepler *et al.*, 2017). Recientemente se han encontrado reportes sobre hongos del género *Akanthomyces* aislados de pústulas de *Hemileia vastatrix*, siendo este un género recientemente reorganizado.

Durante la extracción de DNA, de un total aproximado de 200 mg de micelio (en base seca), previamente incubado por 7 días en medio PDA, se obtuvieron 50 μ L de DNA con una concentración de 700 ng/ μ L y una relación 260/280 de 1.7 indicando buena calidad del DNA extraído.

La figura 27 A muestra la banda de DNA extraído en gel de agarosa tanto de la primera extracción (E_1) como de su duplicado (E_2). Por otro lado, se llevaron a cabo amplificaciones por PCR de las regiones del ITS y de la subunidad pequeña mitocondrial 18S rRNA; la figura 8 B muestra las bandas etiquetadas como P_1 y P_2

para el producto de PCR de la región ITS y de la subunidad pequeña 18S rRNA, respectivamente. Las bandas coinciden con un tamaño de 1100-1200 pb para P₁ mientras que la banda de P₂ corresponde a un tamaño de 1200-1300 pb. De dichas amplificaciones (ITS y de la subunidad pequeña 18S rRNA) se obtuvieron 42 y 38 µL con una concentración de 400 y 380 ng/µL con una relación 260/280 de 1.8 respectivamente.

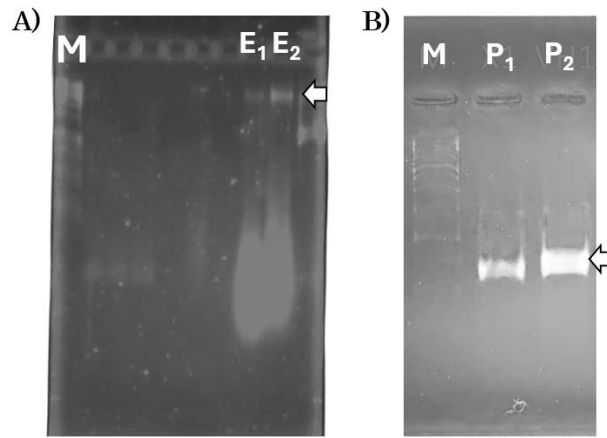


Figura 27. Geles de electroforesis del DNA genómico y de la región ITS de *Akanthomyces muscarius*. A) Gel de electroforesis del DNA genómico y B) del producto de PCR de la región ITS y de la subunidad pequeña 18S rRNA. Las bandas de interés son resaltadas con la flecha, E1 y E2 corresponden a la primera extracción y su duplicado. P1 y P2 corresponden al producto de PCR de la región ITS y de la subunidad pequeña 18S rRNA.

Los electroferogramas de ambas regiones evidenciaron buena calidad de las secuencias, de los cuales se obtuvieron dos secuencias resultantes, la primera con un tamaño de 586 pb para la región ITS y la segunda con un tamaño de 591 pb para la subunidad pequeña mitocondrial 18S rRNA (ver figura 28).

A) ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACGTTCA
 GAAGTTGGGTGTTTTACGGCGTGGCCACGTCGGGGTCCGGTGCAGTTG
 GATTACTACGCAGAGGTGCGCCGGGACGGCCGCACTCCATTTCCGGGA
 CGGCGGTATGCTGCCGTTCCCACGCCGATTTCCCCGAGGGGAAGTCGA
 GGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCAGAATGCTGGCGGGC
 CAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCGCAATTCACATT
 ACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCC
 GTTGTGAAAGTTTTGATTATTGTTTGCCTTGGCGGAATTCAGAAG
 ATGCTGATAATACAGAGTTTGTGGTCTCCGGCGGCCGCTGGTCCGGG
 CCGCGGGCGCCGAGGCCGTCGGGACGCCGGGGCAGTCCGCCGAAGCA
 ACAGTAGGTATGTTACATAAGGGTTTGGGAGTTGTAACCTCGATAATGA
 TCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTACG

B) GCAGTGAGGAATTTGGTCAATGGCCTAACGGCTGAAGTGGCAACTGGGA
 GAAGTGATAAGTCTTTAATTTGAATCCTTGGCTTACTTTGTAAGTTAAG
 GCTAGATTTAAACAAAAATTAAGATTAAATTTAGTATTGAATGAACTTT
 GTTTATATATCGATAATGACGATATATATTATGCTTGGACCAATTACG
 TGCCAGCAGTCGCGGTAATACGTAAGAGACTAGTGTTATTCATCTTAATT
 AGGTTTAAAGGGTACTCAAACGGTCAATAATAAGACTAGAGTTATATAGA
 AGAAGGTAGTACCCTTAAGGTAGAGATTATATTTGGTCATACTCGAGGGA
 CTTAGAAAAGGCGTAGGCAACCTTCTAAGCAATAACTGACGTTGAAGGAC
 GAAGGCATAGGTCACGAACAGGATTAGATACCCAAGTAGTCTTTGCGATC
 AATGATGAATGCCATAGGTTAGATAAAAAATTTAGTCTATAAATGAAAGT
 TAAGCATTTACCTCAAGAGTAATGTGGCAACGCAGGAAGTGAATCACT
 TAGCCGTTTCTGACACCAGTAGTGAAGTATGTTATTTAATT

Figura 28. Secuencia de nucleótidos de las regiones amplificadas. A) secuencia de la región ITS (586 pb) y B) secuencia de la subunidad pequeña mitocondrial 18S rRNA (591 pb).

Finalmente, el análisis de secuenciación de nucleótidos en BLAST del GenBank para la región espaciadora interna transcrita (ITS) permitió identificar el género, en este caso, de 100 secuencias encontradas, el 80% de ellas corresponden al género identificado como *Akanthomyces* (ver figura 29). Para la identificación de la especie, se comparó la secuencia de la región 18S rRNA con otras secuencias reportadas en BLAST (ver figura 30), para ello se consideraron los siguientes criterios: porcentaje de cobertura (Query cover) del 100 %, probabilidad de error (E-value) de 0% y porcentaje de identidad del 100%. Las principales especies identificadas son: 58% *A. muscarius*, 12% *L. saurus*, 8% *A. carnicus* y 7% *A. severus*. De las 58 secuencias identificadas como *A. muscarius*, la identidad de la secuencia oscila entre el 99.3-99.83%, también se identificaron especies con el nombre *Lecanicillium muscarius*; sin embargo, *Lecanicillium muscarius* se ha actualizado como *Akanthomyces muscarius* (Kepler *et al.*, 2017; Turco, 2024). Por tanto, a partir de este hallazgo, se confirma que la cepa secuenciada corresponde al género *Akanthomyces* y la especie *muscarius*.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Akanthomyces muscarius isolate Nesta_08_small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Akanthomyces m...	1083	1083	100%	0.0	100.00%	758	MN080299.1
Lecanicillium sp. culture ICMP:21611 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Lecanicillium sp...	1083	1083	100%	0.0	100.00%	626	MF687199.1
Akanthomyces muscarius culture CBS:318.70B strain CBS 318.70B small subunit ribosomal RNA gene, partial se...	Akanthomyces m...	1077	1077	100%	0.0	99.83%	588	MH859686.1
Lecanicillium uredinophilum strain CG902 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Lecanicillium ure...	1072	1072	99%	0.0	99.83%	583	OQ303622.1
Fungal sp. NM826 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, ...fungal sp. NM826	Akanthomyces m...	1070	1070	98%	0.0	100.00%	1159	KJ867414.1
Akanthomyces attenuatus strain CBF16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed ...	Akanthomyces at...	1070	1070	99%	0.0	99.83%	583	OL351559.1
Akanthomyces sp. strain YFCC 945 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Akanthomyces sp...	1061	1061	100%	0.0	99.32%	590	OQ509531.1
Akanthomyces sp. IHEM 28225 genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 2...	Akanthomyces s...	1061	1061	100%	0.0	99.32%	604	OJ989237.1
Akanthomyces attenuatus isolate JD1-047AP small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr...	Akanthomyces at...	1044	1044	100%	0.0	98.81%	601	MT644336.1
Akanthomyces lecanii strain HZLF160702_18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans...	Akanthomyces le...	1044	1044	100%	0.0	98.81%	2301	MH521026.1
Akanthomyces attenuatus strain MQ315369 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri...	Akanthomyces at...	1044	1044	100%	0.0	98.81%	609	MH558279.1
Akanthomyces attenuatus strain CCM 9195 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri...	Akanthomyces at...	1044	1044	100%	0.0	98.81%	612	OP503941.1
Akanthomyces lecanii strain CCM 9195 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed ...	Akanthomyces le...	1044	1044	100%	0.0	98.81%	612	OP437999.1
Akanthomyces lecanii strain Z3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Akanthomyces le...	1044	1044	100%	0.0	98.81%	616	MW165534.1
Akanthomyces lecanii genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal I...	Akanthomyces le...	1044	1044	100%	0.0	98.81%	2304	AB111495.1
Akanthomyces muscarius culture CBS:143.62 strain CBS 143.62 small subunit ribosomal RNA gene, partial seque...	Akanthomyces m...	1038	1038	100%	0.0	98.63%	1240	MH858126.1

Figura 29. Primeras 16 secuencias de la región ITS similares a la cepa de estudio analizadas desde BLAST. La flecha naranja resalta el nombre científico actualizado.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Lecanicillium muscarium isolate KV_56 small subunit ribosomal RNA (ms) gene, partial sequence; mitochondrial	Akanthomyces ...	915	915	83%	0.0	100.00%	495	EF513035.1
Lecanicillium muscarium isolate Sort by description	Akanthomyces ...	909	909	83%	0.0	99.80%	496	EF513064.1
Lecanicillium muscarium isolate ARSEF 1401 small subunit ribosomal RNA (ms) gene, partial sequence; mitoch...	Akanthomyces ...	902	902	83%	0.0	99.60%	494	EF513078.1
Lecanicillium lecanii isolate ARSEF 4025 small subunit ribosomal RNA (ms) gene, partial sequence; mitochondrial	Akanthomyces J...	881	881	83%	0.0	98.60%	501	EF513054.1
Lecanicillium muscarium isolate Mycotal small subunit ribosomal RNA (ms) gene, partial sequence; mitochondrial	Akanthomyces ...	876	876	83%	0.0	98.41%	502	EF513028.1
Lecanicillium muscarium isolate CBS 318.70B small subunit ribosomal RNA (ms) gene, partial sequence; mitoc...	Akanthomyces ...	874	874	83%	0.0	98.40%	499	EF513044.1
Lecanicillium muscarium isolate ARSEF 314 small subunit ribosomal RNA (ms) gene, partial sequence; mitoch...	Akanthomyces ...	870	870	83%	0.0	98.21%	502	EF513043.1
Lecanicillium lecanii isolate ARSEF 3000 small subunit ribosomal RNA (ms) gene, partial sequence; mitochondrial	Akanthomyces J...	869	869	83%	0.0	98.20%	500	EF513052.1
Lecanicillium muscarium isolate ARSEF 2065 small subunit ribosomal RNA (ms) gene, partial sequence; mitoch...	Akanthomyces ...	865	865	83%	0.0	98.00%	501	EF513050.1
Lecanicillium lecanii isolate Gr small subunit ribosomal RNA (ms) gene, partial sequence; mitochondrial	Akanthomyces J...	863	863	83%	0.0	98.00%	500	EF513041.1
Cordyceps confragosa strain RCEF 1005 mitochondrion, complete genome	Akanthomyces J...	1031	1031	100%	0.0	97.99%	24643	NC_046840.1
Akanthomyces lecanii strain RCEF6920 mitochondrion, complete genome	Akanthomyces J...	1031	1031	100%	0.0	97.99%	24577	OR508462.1
Cordyceps farinosa strain ARSEF 3 mitochondrion, complete genome	Cordyceps farino...	1026	1026	100%	0.0	97.97%	24225	MK512381.1
Akanthomyces muscarius isolate SSBG1A33 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	Akanthomyces ...	944	944	92%	0.0	97.82%	781	MN422041.1
Akanthomyces muscarius isolate SSBG1A21 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	Akanthomyces ...	944	944	92%	0.0	97.82%	781	MN422040.1
Akanthomyces muscarius isolate SSBG1A12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	Akanthomyces ...	944	944	92%	0.0	97.82%	781	MN422038.1
Lecanicillium lecanii isolate ARSEF 3600 small subunit ribosomal RNA (ms) gene, partial sequence; mitochondrial	Akanthomyces J...	859	859	83%	0.0	97.81%	502	EF513053.1

Figura 30. Primeras 17 secuencias de la región 18S rRNA similares a la cepa de estudio analizadas desde BLAST. La flecha naranja resalta el nombre científico vigente que contrasta con los nombres reportados por el investigador.

3.3 Fermentación en fase sólida

Se evaluó la velocidad de propagación de *Akanthomyces muscarius* en agar, para ello, se probaron dos formulaciones comerciales: PDA y SDA. El primero contiene extracto de papa y glucosa mientras que el segundo contiene peptona de caseína como fuente de nitrógeno y el doble de glucosa que el primero; además, ambos medios trabajan en un pH ≈ 5.6 . La figura 31 A muestra los resultados de estos experimentos los cuales indican que, *Akanthomyces muscarius* se propaga más rápido en medio PDA y en 20 días alcanza un diámetro promedio de ~ 3.5 mm en contraste con SDA, donde alcanza un diámetro promedio de ~ 2.5 mm. Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura (Kepler, *et al.*, 2017). Además, la tabla 5 indica que estas diferencias son significativas. Si bien, ambos medios son formulaciones universales, esta cepa no se propaga rápido, tampoco se observó que durante su desarrollo se hayan generado colonias satélites como sucede con otros hongos con esporulación pulverulenta, esto indica que no se propaga a grandes distancias como sucede con el género *Trichoderma*. Resultan varias preguntas, por ejemplo ¿El medio debe ser enriquecido con nutrientes de otra naturaleza o con micronutrientes? o ¿Se deben explorar otras formas de fermentación?

Se exploró la fermentación sólida con dos sustratos distintos, uno de ellos fue el trigo, rico en azúcares mientras que el otro, bagazo de café, es considerado un residuo agroindustrial con menos nutrientes disponibles y, además, es más ácido. Se decidió trabajar con trigo, pues es el sustrato estándar en el cultivo de hongos y el bagazo de café es propiamente un residuo que debe ser aprovechado. La figura 31 B muestra los resultados de la propagación de *A. muscarius* en ambos sustratos y la figura 32 A y B la propagación completa. Es evidente que, este hongo se desarrolla más rápido en trigo y esta diferencia es significativa (ver tabla 10). Probablemente la disponibilidad de azúcares y otros nutrientes presentes en el trigo fueron los responsables de promover

el crecimiento a diferencia del bagazo, cuya propagación fue más lenta y menos densa (comparar figura 32 A y B).

Al finalizar la fermentación sólida, se realizó un lavado a los sustratos con Tween estéril al 2%; sin embargo, se aplicaron varios lavados y filtraciones sucesivas para recuperar la mayor cantidad posible de esporas sin residuos del sustrato, esta labor es complicada pues se debe garantizar una solución sin partículas pequeñas que dificulten la cuantificación de esporas. La pérdida de precisión en esta etapa es la causante de altas desviaciones estándar en las cuantificaciones (ver tabla 5).

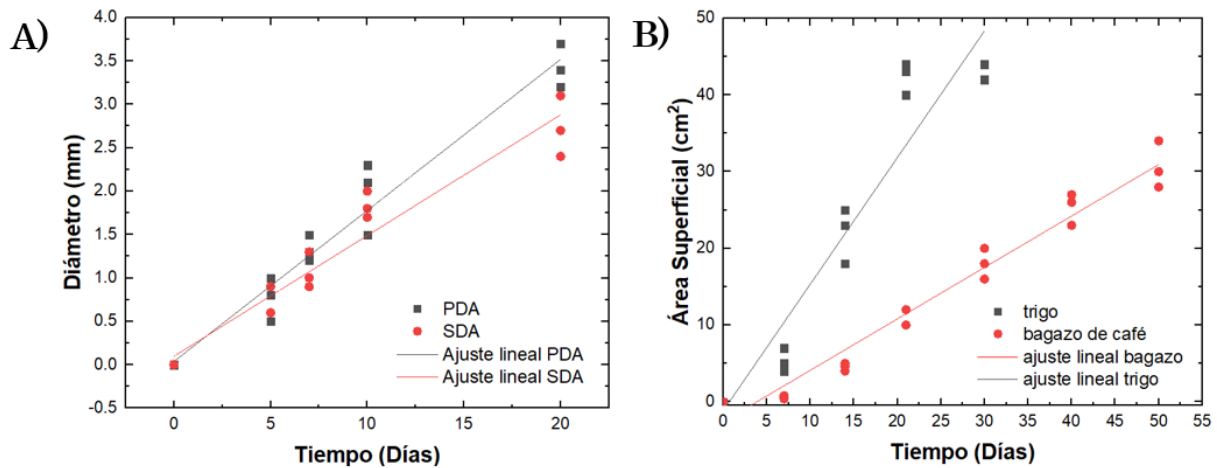


Figura 31. Velocidad de propagación del micelio de *Akanthomyces muscarius* en medio sólido. A) Tasa de propagación en PDA (cuadros negros) y SDA (círculos rojos) así como B) en trigo precocido (cuadros negros) y bagazo de café (círculos rojos). El ajuste lineal se muestra en líneas continuas negra y roja.

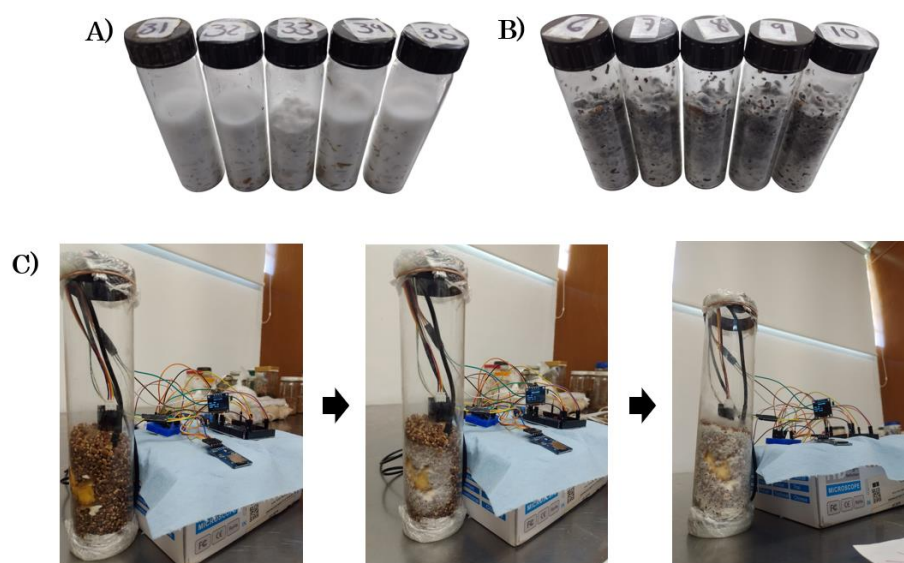


Figura 32. Propagación de *A. muscarius* en los sustratos de estudio y en el biorreactor de lecho empacado. Propagación completa en A) grano de trigo precocido después de 20 días de cultivo, B) bagazo de café después de 50 días y C) en grano de trigo en tres momentos diferentes mediante el biorreactor de lecho empacado.

Tabla 10. Velocidad de propagación de *Akanthomyces muscarius* en agar y sustratos
Velocidad de propagación (mm de diámetro/día)

Medio de cultivo	V. (mm/día)	R ²	Esporas/mL
PDA	0.1773 ± 0.0136^a	0.9596	--
SDA	0.1390 ± 0.0164^b	0.9283	--
Velocidad de propagación superficial (cm ² de superficie/día)			
Sustrato	V. (cm ² /día)	R ²	Esporas/mL
Trigo precocido	1.6507 ± 0.0504^{a*}	0.9145	1.9 ± 1.2 x10⁷
	3.0489 ± 0.1723^{b**}	0.9723	2.55±2.06 x 10⁸
Bagazo de café	0.6705 ± 0.0489^c	0.9413	1.3±1.2 x10⁷

Nota: *Velocidad de propagación estimada a partir de tubos de cultivo con tapa tipo baquelita;

** Velocidad de propagación estimada en el biorreactor de lecho fijo.

Las mediciones de la velocidad de propagación son un criterio para la elección de sustratos, pero no debe ser el único ya que no considera la densidad de biomasa, concentración de esporas, etc. En la literatura se reportan estudios cinéticos sobre la fermentación sólida de hongos y en esas aportaciones se reportan cálculos de para estimar la cantidad de biomasa generada de acuerdo con la cantidad acumulada de CO₂ que se produce durante la fermentación. Por ejemplo, en la investigación de González et al. (2017), se describe un método para calcular la biomasa formada a partir de la producción de CO₂, considerando la estequiometría de la reacción. Además, en el trabajo de Rodríguez (2005), se discuten métodos indirectos para cuantificar la biomasa en fermentaciones sólidas, incluyendo la medición de componentes celulares como la quitina, el ergosterol y las proteínas, así como actividades biológicas como la respiración, que implica la producción de CO₂.

Esto es coherente con el hecho de que el CO₂ se produce en todas las etapas de la fermentación; sin embargo, si la cinética de crecimiento es exponencial, entonces la producción debe ser equivalente:

$$\frac{d(CO_2)}{dt} \propto \mu X$$

Por otro lado, el análisis se vuelve más sencillo si se conoce el valor típico de rendimiento de biomasa respecto al CO₂ producido (o el sustrato respecto al CO₂), así se puede estimar la biomasa producida a partir del CO₂ acumulado (o la cantidad de sustrato consumido a partir del CO₂ acumulado). Dado que no se han reportado estos parámetros para *A. muscarius*, se decidió construir un biorreactor sencillo, que funcione como un reactor de lecho empacado, mimetizando a los tubos de cultivo o frascos donde comúnmente se realiza la fermentación sólida de hongos. Este reactor estuvo equipado con un sensor de CO₂, un sensor de humedad sumergible y un sensor de temperatura. Una vez que el biorreactor fue empacado con el sustrato, se procedió

a inocular con *A. muscarius*. La figura 14 A muestra el área superficial invadida respecto al tiempo.

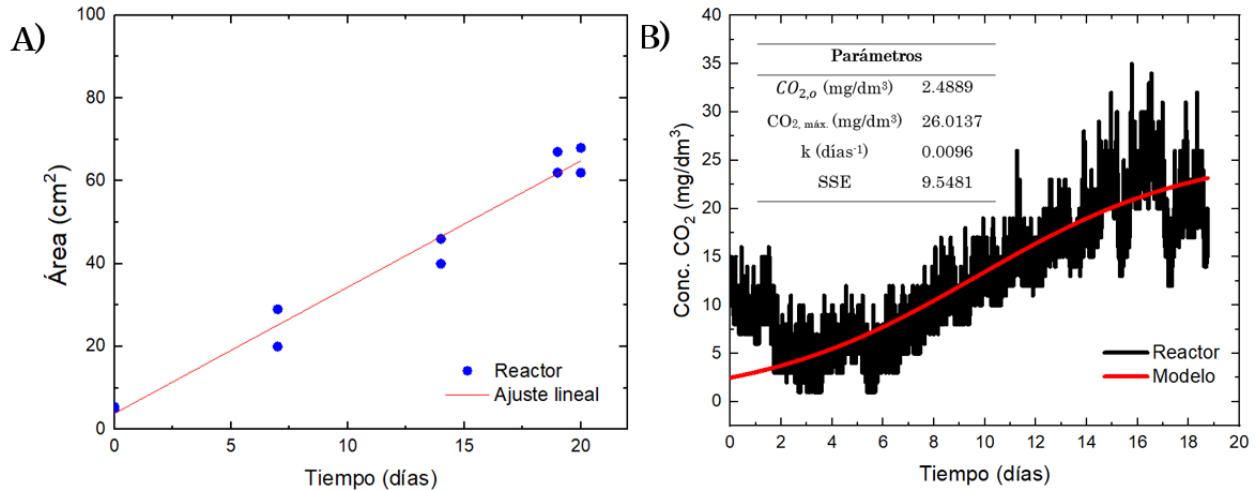


Figura 33. Velocidad de propagación del micelio de *Akanthomyces muscarius* en trigo precocido y empacado en el biorreactor de lecho fijo. A) Velocidad de propagación en trigo precocido y B) Concentración de CO₂ dentro del biorreactor. Las líneas negras corresponden a los valores detectados por el sensor mientras que la línea roja representa el ajuste de los datos a partir del modelo logístico.

La figura 33 A muestra el tiempo en el que se alcanza la fase estacionaria de la fermentación y en la tabla 10 se reporta una velocidad de 3.05 cm²/día, casi el doble de la estimada en trigo, pero monitoreado en tubo de cultivo. Probablemente la menor compactación del sustrato y mejor intercambio de gases favorecieron el crecimiento en el biorreactor de lecho fijo respecto a los tubos de cultivo.

La figura 33 B muestra la concentración de CO₂ registrado por el sensor del biorreactor, el comportamiento no es exponencial, sino más bien sigmoideal, por tanto, se propuso adaptar el modelo logístico en función de la acumulación de CO₂, para ello, la ecuación que describe al modelo logístico es:

$$\frac{dCO_2}{dt} = kCO_2 \left(1 - \frac{CO_2}{CO_{2máx}} \right)$$

Resolviendo la ecuación diferencial, se llega a la siguiente expresión:

$$CO_2 = \frac{CO_{2,o} e^{kt}}{1 - \left(\frac{CO_{2,o}}{CO_{2,máx}}\right)(1 - e^{kt})}$$

Donde k , es la velocidad específica de producción de CO_2 , $CO_{2, máx.}$ corresponde a la máxima acumulación de CO_2 dentro del sistema y $CO_{2,o}$ es la concentración de CO_2 al inicio de la fermentación.

Se evaluó dicho modelo mediante la suma de mínimos cuadrados entre los datos experimentales y los generados por el propio modelo utilizando la función objetivo:

$$\sum_i^{ne} \sum_j^{np} (CO_{2,1 exp} - CO_{2,1 mod})^2 + (CO_{2,2 exp} - CO_{2,2 mod})^2 + \dots + (CO_{2,n exp} - CO_{2,n mod})^2$$

La figura 33 B muestra la concentración de CO_2 dentro del biorreactor y el ajuste de los datos con el modelo logístico (línea roja). Los parámetros del ajuste también se muestran en la figura; si bien los parámetros tales como $CO_{2,o}$ son coherentes con los datos experimentales, la estimación de $CO_{2, máx.}$ y k están subestimados y esto se deduce del modelo ya que, en este se cuantifica CO_2 acumulado, pero el reactor de lecho no se construyó como un sistema cerrado, sino más bien, se permitía el intercambio de gases al exterior; sin embargo, el perfil cinético es coherente con la velocidad de propagación, ya que, cuando hubo una propagación completa en el sustrato, la concentración de CO_2 llegó a su fase estacionaria. Finalmente, la figura 34 muestra el monitoreo de la humedad relativa y temperatura del sustrato. Respecto a la humedad, el sustrato se deshidrató del 39% inicial al 34% después de 20 días. En cuanto a la temperatura, esta igual descendió desde 30.69 °C hasta 27.5 °C en el mismo lapso. La pérdida de humedad se debe a que se permitió el intercambio de

gases, mientras que la temperatura estuvo sujeta a las condiciones ambientales durante el periodo de fermentación.

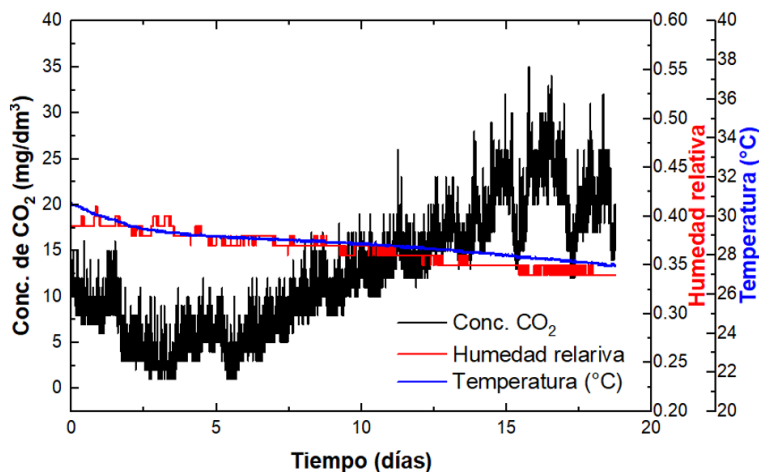


Figura 34. Monitoreo de la concentración de CO₂, humedad relativa y temperatura del sustrato.

No es apropiado comparar la velocidad de propagación de *A. muscarius* en agar (PDA/SDA) con la propagación en los sustratos (trigo/bagazo de café), la primera corresponde a una propagación sobre la superficie del agar que está en el plano XY, por otro lado, la propagación en el sustrato tiene un grado de libertad más al propagarse en el espacio tridimensional XYZ; sin embargo, es evidente que *A. muscarius* crece lento en agar y no parece tener efecto la concentración de glucosa en el medio, por otro lado, en los sustratos, el crecimiento es lento para ser escalado a nivel industrial; sin embargo, es evidente que la velocidad de propagación se puede aumentar si cambia la naturaleza del sustrato, por ejemplo, en este caso, el grano de trigo tiene más carbohidratos y microelementos que el bagazo de café, por tanto, la presencia de estos últimos debe ser importante para promover el crecimiento de *A. muscarius* y así se puedan aprovechar mejor los azúcares disponibles, pero también pueden estar gobernando otros factores como el pH del medio, nivel de aireación, metabolismo/anabolismo del hongo, etc.

3.4 Fermentación líquida superficial

Se decidió explorar la fermentación líquida superficial que consiste en cultivar micelio de hongo sobre la superficie de un medio de cultivo líquido, este tipo de fermentación es útil para la obtención de metabolitos y enzimas que el hongo de estudio produce (Sánchez & García, 2016); sin embargo, en este caso se exploró el desarrollo de micelio de *A. muscarius* con el propósito de obtener biomasa libre de agar, esto permitió cuantificar la biomasa en peso seco en forma exacta misma que se utilizó como condición inicial para la siguiente fase experimental. Se probaron dos medios de cultivo, uno de ellos a partir de la formulación comercial de caldo papa y la segunda con infusión de papa preparado en el laboratorio.

La figura 35 muestra el desarrollo del micelio en una estructura sólida sobrenadante (biomasa sobrenadante) mediante fermentación líquida superficial. En algunas replicas el desarrollo de la biomasa fue homogéneo, tal como se muestra en la figura 35 A y B, es decir, las tortas se extendieron uniformemente sobre la superficie sin generar pliegues o bultos, de hecho, en la figura 35 A se muestran tres tortas distintas, pero la de en medio presenta las características deseadas. La figura 35 B muestra algunas biomazas sobrenadantes del medio líquido para su posterior uso. Cabe mencionar que no se apreciaron diferencias en el desarrollo del micelio respecto a cada formulación, por lo que la falta de homogeneidad se debe a otros factores, probablemente mecánicos. En cuanto al rendimiento ($Y_{x/s}$), la tabla 11 muestra dichos resultados sin observar diferencias significativas entre ambas formulaciones; sin embargo, para el desarrollo de la siguiente fase experimental se decidió trabajar con la formulación comercial con el propósito de evitar variabilidad durante la preparación de la formulación propuesta.

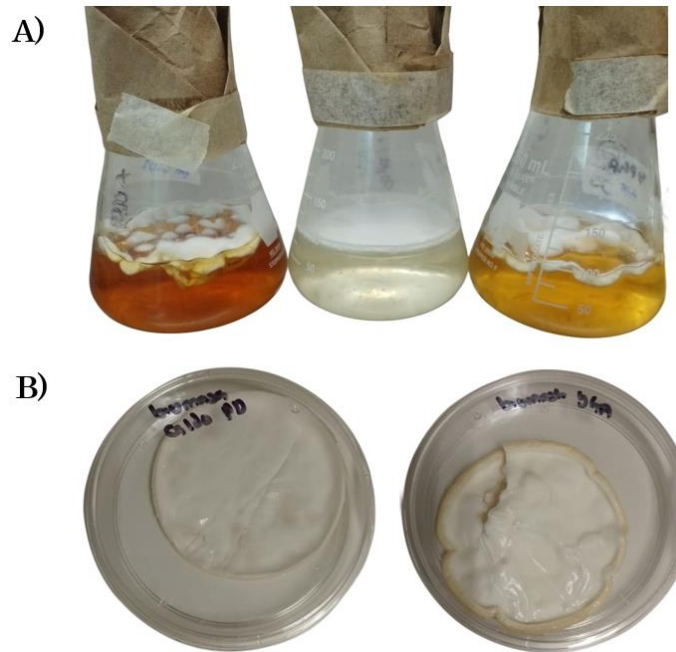


Figura 35. Propagación de micelio en fermentación líquida superficial. A) Ejemplos de capas de biomasa generadas en los medios de cultivo después de 15 días de incubación. B) Ejemplos de capas de biomasa homogénea para la fermentación líquida sumergida.

Tabla 11. Rendimiento de biomasa respecto al sustrato (glucosa)

Formulación	Peso en b.h. (g)	Peso en b.s. (g)	$Y_{x/s}$
Caldo papa comercial	9.23±0.57	1.03±0.124	0.0516±0.0062
Infusión de papa	9.43±1.19	1.01±0.195	0.0505±0.0097

b.h.: base húmeda; b.s.: base seca

3.5 Fermentación líquida sumergida

En esa sección se aborda la fermentación líquida sumergida de *Akanthomyces muscarius* mediante un sistema de matraz agitado. Los primeros experimentos evidenciaron que este microorganismo es capaz de crecer en medio líquido pero su crecimiento es mediante la formación de pellets, es decir pequeños cuerpos esféricos

de micelio, y cuyo crecimiento sucede en la superficie de estos (Rodríguez & Sánchez, 2018). En la figura 36 se observan matraces con pellets resultantes de la fermentación de *Akanthomyces muscarius* bajo un sistema de agitación orbital. Los diseños que se explican a continuación están orientados en identificar las mejores condiciones para obtener un mayor rendimiento de biomasa en el menor tiempo posible.



Figura 36. Fermentación líquida sumergida de *Akanthomyces muscarius* en matraz agitado.

3.5.1 Efecto de la formulación del medio de cultivo

En esta sección se exploraron varios factores, el primero de ellos fue conocer el efecto de la composición de la formulación del medio de cultivo en la fermentación de *Akanthomyces muscarius*, para ello se evaluaron 6 formulaciones mediante tres variables de respuesta, las cuales fueron la velocidad de crecimiento específico máximo ($\mu_{m\acute{a}x.}$, días⁻¹), concentración de biomasa máxima predicha ($x_{m\acute{a}x.}$, g/L) y rendimiento ($Y_{X/S}$, g de biomasa/g de sustrato). Los primeros dos parámetros $\mu_{m\acute{a}x.}$ y $x_{m\acute{a}x.}$ fueron estimados mediante el ajuste de datos experimentales con el modelo

logístico, mientras que el último se estimó experimentalmente. La tabla 12 muestra los resultados obtenidos con su respectiva desviación estándar para cada una de las variables de respuesta.

Tabla 12. Variables de respuesta para cada una de las formulaciones evaluadas

Formulación	$\mu_{m\acute{a}x.}$	$x_{m\acute{a}x.}$	$Y_{x/s}$
F1	0.638±0.016 ^{ab}	2.3278±0.237 ^a	0.1970±0.008 ^a
F2	0.5539±0.038 ^{bcd}	1.1682±0.094 ^a	0.1561±0.012 ^b
F3	0.4952±0.010 ^d	2.2686±0.090 ^a	0.1653±0.005 ^b
F4	0.5192±0.003 ^d	2.2149±0.279 ^a	0.1826±0.006 ^a
F5	0.6644±0.036 ^a	2.2507±0.155 ^a	0.1968±0.007 ^a
F6	0.5922±0.030 ^{ac}	2.3169±0.036 ^b	0.1972±0.008 ^a

Se realizaron las pruebas de distribución normal de los datos e igualdad de varianzas entre las muestras para cada variable de respuesta. La primera prueba se realizó mediante el método de Shapiro Wilk ($n < 30$), en este caso, los datos de todos los tratamientos presentaron una distribución normal ($p > 0.05$), de forma similar, la prueba de homocedasticidad mediante el método de Levine indica que se cumple con el supuesto de igualdad de varianzas ($\mu_{m\acute{a}x.}$: $p = 0.4078 > 0.05$, $x_{m\acute{a}x.}$: $p = 0.6949 > 0.05$ y $Y_{x/s}$: $p = 0.9330 > 0.05$). Por tanto, se puede realizar el análisis de varianza clásico por cada variable de respuesta. Las tablas 13-15, muestran los resultados de dicho análisis.

Tabla 13. ANOVA de una sola vía respecto al efecto de la formulación del medio de cultivo en la velocidad de crecimiento específico máximo ($\mu_{m\acute{a}x.}$)

Fuente de variación	G.L.	suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Formulación	5	0.05978	0.01195	11.181	0.00034
Error	12	0.00106	0.00106		
Total	17	0.06085			

Tabla 14. ANOVA de una sola vía respecto al efecto de la formulación del medio de cultivo en la concentración de biomasa máxima ($x_{m\acute{a}x}$)

Fuente de variación	G.L.	suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Formulación	5	3.0935	0.6187	13.943	0.00012
Error	12	0.5324	0.0443		
Total	17	3.6259			

Tabla 15. ANOVA de una sola vía respecto al efecto de la formulación del medio de cultivo en el rendimiento ($Y_{x/s}$)

Fuente de variación	G.L.	suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Formulación	5	0.00487	0.000974	9.5215	0.00073
Error	12	0.00122	0.000102		
Total	17	0.00609			

El análisis de varianza (Tablas 13-15) indica que la formulación tiene efecto en $\mu_{m\acute{a}x}$ ($F = 11.1816$, g. L. 5,12 y $P < 0.001$), $x_{m\acute{a}x}$ ($F = 13.943$, g. L. 5,12 y $P < 0.001$) y $Y_{x/s}$ ($F = 9.5215$, g. L. 5,12 y $P < 0.001$).

Los resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) resumidos en la tabla 7 o bien en forma gráfica en la figura 37 permiten elegir a la formulación más adecuada, tomando en cuenta que las mejores formulaciones son aquellas que maximicen cada variable de respuesta. En la gráfica de la figura 37 A se aprecia que las formulaciones 1,2, 5 y 6 son las que aumentan la velocidad de crecimiento específico máximo, por otro lado, la gráfica de la figura 37 B permite excluir a la formulación 2, ya que esta reduce drásticamente la concentración máxima de biomasa en contraste con el resto de las formulaciones. Finalmente, la figura 37 C muestra que las formulaciones que dan mejor respuesta en cuanto al rendimiento $Y_{x/s}$ son las formulaciones 1, 4, 5 y 6.

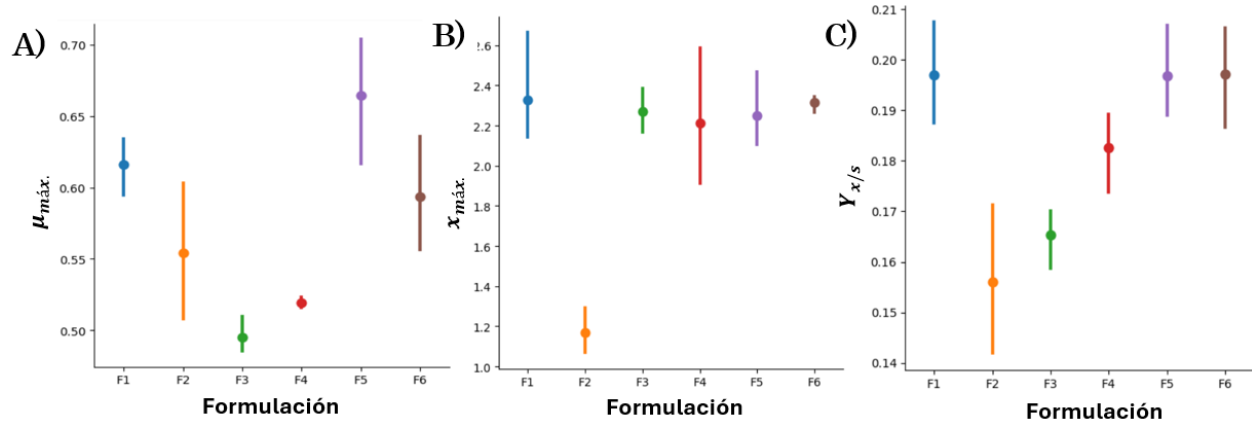


Figura 37. Gráficos de medias con Intervalos de confianza del 95% de las variables de respuesta por cada formulación. A) Gráficos correspondiente a $\mu_{m\acute{a}x.}$, B) $x_{m\acute{a}x.}$ y C) $Y_{x/s}$.

Considerando las 3 variables de respuesta, los tratamientos 1, 5 y 6 fueron las mejores formulaciones; sin embargo, se decidió excluir a la formulación 6, pues esta no se considera un medio con sustrato limitante ya que, durante la infusión, nutrientes de la papa, como almidón y otros carbohidratos, se solubilizan al medio líquido, los cuales no fueron cuantificados como azúcares reductores. Al comparar la composición entre las formulaciones 1 y 5 (ver tabla 4) se aprecia que la formulación 5 tiene dos fuentes de nitrógeno, extracto de levadura (5g/L) y peptona de caseína (20 g/L) a diferencia de la formulación 1, la cual solo contiene extracto de levadura (5 g/L). Por tanto, se decidió trabajar con la formulación 1 ya que la adición de peptona de caseína no fue una buena fuente de nitrógeno para impulsar el crecimiento de *A. muscarius*, de hecho, la formulación 9, la cual contenía únicamente peptona de caseína como fuente de nitrógeno, no promovió un buen crecimiento de este hongo. Finalmente, la concentración de KH_2PO_4 fue importante, la formulación 1 fue la que contenía la menor concentración de sal (1 g/L) a diferencia del resto de formulaciones (6 g/L). Se midió el pH final en todos los crecimientos, la lectura de pH más pequeña fue de 5.2, mientras que, para la formulación 1, el pH final fue de 4.5 ± 0.2 . Esto sugiere que el metabolismo de este hongo debe producir metabolitos ácidos que alteran el pH del medio, una concentración de 1 g/L de KH_2PO_4 no es suficiente para amortiguar el pH

durante el crecimiento de *A. muscarius*, de hecho, esto se ha reportado con otros hongos (García, 2027). Se procedió a evaluar el modelo de Monod con los resultados de la formulación 1, la figura 38 A y B muestran los ajustes con el modelo de Monod y con el modelo logístico con una SSE (suma de mínimos cuadrados) $\ll 0.2$. Para el primer modelo se consideraron tanto la velocidad de producción de biomasa como el consumo por el sustrato limitante (glucosa), mientras que para el ajuste del modelo logístico solo consideró la velocidad de producción de biomasa. La tabla 16 presenta los resultados de dichos modelos. La diferencia de $\mu_{m\acute{a}x}$ entre ambos modelos no es estadísticamente significativo ($\alpha > 0.05$), además, $Y_{x/s}$ del modelo de Monod es consistente con la estimación experimental.

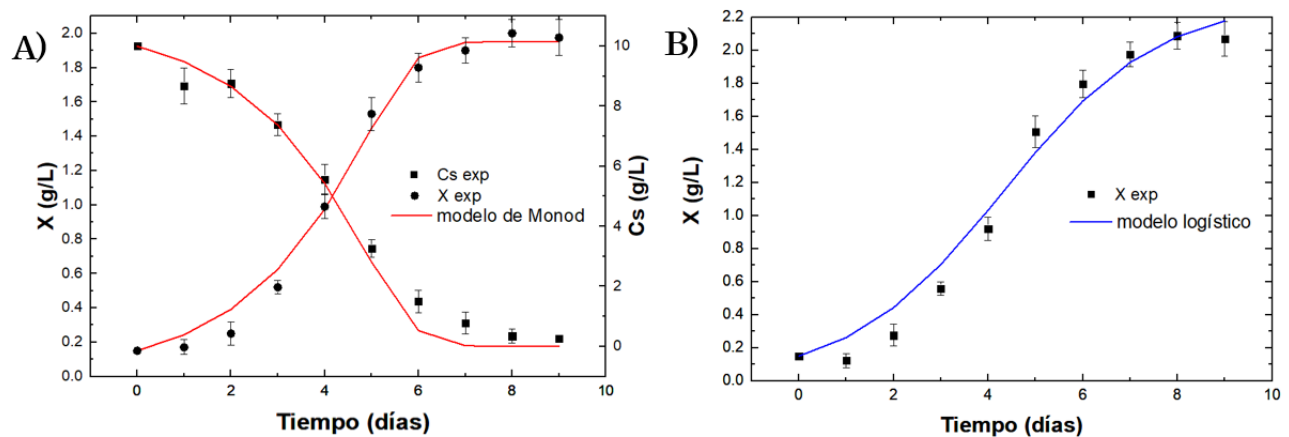


Figura 38. Ajuste de los datos experimentales de la formulación 1 mediante el modelo de Monod y logístico. A) Ajuste de los datos con el modelo de Monod y B) con el modelo logístico.

Tabla 16. Parámetros cinéticos de ajuste para el modelo de Monod y logístico con los datos experimentales de la formulación 1.

Parámetros	Modelo de Monod	Modelo logístico
$\mu_{m\acute{a}x.}$ (días ⁻¹)	0.6071 ± 0.025	0.6338 ± 0.016
$x_{m\acute{a}x.}$ (g/L)	--	2.3278 ± 0.2378
k_s (g/L)	2.6008 ± 0.6248	--
$Y_{x/s}$	0.1904 ± 0.0088	0.1970 ± 0.0081*

* Parámetro medido experimentalmente

3.5.2 Efecto del volumen de trabajo, agitación, pH y concentración de glucosa

Una vez identificada la formulación base, se evaluó el efecto del volumen de trabajo, agitación, pH y concentración de glucosa, para ello llevó a cabo un diseño factorial 2⁴, la tabla 17 muestra los niveles de cada factor.

Tabla 17. Niveles de los factores para el diseño factorial 2⁴

Variable	Parámetro	Nivel codificado	
		-1	+1
V	Volumen relativo (%)	20	60
A	Agitación (rpm)	50	250
pH	pH del medio	5	7
G	Glucosa (g/L)	10	40

La tabla 18 presenta los resultados de las fermentaciones del diseño factorial 2⁴, los tratamientos 2 y 4 aumentan la velocidad de crecimiento específico máximo y la máxima concentración de biomasa, manteniendo el mínimo volumen, la mínima agitación y la máxima concentración de glucosa, y no parece haber diferencia respecto al pH; sin embargo, los rendimientos no son los más altos y esto se atribuye debido a que el sustrato no se alcanzó a consumir completamente al final de la fermentación. Por otro lado, los tratamientos 13 y 15 fueron los que arrojaron los resultados más bajos, en todas las variables de respuesta, al parecer el incremento del volumen y agitación afectan el desarrollo del micelio durante la fermentación.

Tabla 18. Respuestas para el crecimiento de *A. muscarius* bajo un diseño factorial 2⁴

F	Vol. relativo	Agitación (rpm)	pH del medio	Glucosa (g/L)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (días ⁻¹)	$x_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$Y_{x/s}$
1	20	50	5.0±0.1	10	0.255±0.012	2.282±0.162	0.162±0.008
2	20	50	5.0±0.1	40	0.348±0.016	2.539±0.187	0.116±0.020
3	20	50	7.0±0.1	10	0.250±0.016	2.391±0.241	0.174±0.012
4	20	50	7.0±0.1	40	0.329±0.016	2.570±0.179	0.115±0.020
5	20	150	5.0±0.1	10	0.147±0.010	1.542±0.122	0.148±0.020
6	20	150	5.0±0.1	40	0.168±0.012	1.713±0.083	0.131±0.024
7	20	150	7.0±0.1	10	0.150±0.016	1.501±0.163	0.140±0.016
8	20	150	7.0±0.1	40	0.167±0.014	1.746±0.102	0.119±0.021
9	60	50	5.0±0.1	10	0.217±0.013	2.025±0.167	0.147±0.012
10	60	50	5.0±0.1	40	0.307±0.020	2.164±0.124	0.080±0.017
11	60	50	7.0±0.1	10	0.217±0.012	1.995±0.116	0.146±0.028
12	60	50	7.0±0.1	40	0.300±0.014	2.199±0.147	0.094±0.036
13	60	150	5.0±0.1	10	0.095±0.020	1.182±0.124	0.071±0.022
14	60	150	5.0±0.1	40	0.111±0.020	1.174±0.127	0.060±0.017
15	60	150	7.0±0.1	10	0.099±0.024	1.062±0.137	0.065±0.019
16	60	150	7.0±0.1	40	0.133±0.016	1.123±0.166	0.061±0.029

De acuerdo con el modelo lineal propuesto en la sección experimental para predecir las respuestas del diseño, se realizó una regresión lineal para cada variable de respuesta. En ambas regresiones, se realizó un ANOVA para estimar la significancia del efecto de los factores e identificar aquellos con significancia estadística para cada variable de respuesta. Para el caso de la velocidad de crecimiento específica máxima, la prueba de ANOVA de la tabla 19, indica que el modelo describió adecuadamente a $\mu_{m\acute{a}x}$. La tabla 20 muestra un buen ajuste del modelo lineal con los datos experimentales ($R^2 > 0.9$). Por otro lado, la tabla 21 indica claramente que la intersección y los efectos simples volumen, agitación y concentración de glucosa tienen efecto significativo en $\mu_{m\acute{a}x}$. ($\alpha < 0.05$), por otro lado, la interacción agitación/concentración de glucosa también tiene un efecto significativo (ver tabla 21).

Tabla 19. ANOVA de la $\mu_{m\acute{a}x}$ de *A. muscarius* usado un dise\~{n}o factorial 2⁴

Fuente de variaci3n	G.L.	suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Modelo	10	0.3192	0.0319	84.096	2.47E-22
Residuos	37	0.0140	0.0003		
Total	47	0.3332			

Tabla 20. Parámetros del ajuste lineal con los datos observados para $\mu_{m\acute{a}x}$.

Coefficiente de correlaci3n m\~{u}ltiple	0.978701682
Coefficiente de determinaci3n R ²	0.957856982
R ² ajustado	0.946466977
Error t\~{i}pico	0.019483589
Observaciones	48

Tabla 21. Significancia estadística de los parámetros del modelo lineal para $\mu_{m\acute{a}x}$.

	Coefficientes	Error t\~{i}pico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepci3n	0.206284	0.0028122	73.352976	1.12858E-41	0.2005861	0.2119823
x_V	-0.0208177	0.0028122	-7.4026352	8.29723E-09	-0.0265158	-0.0151197
x_A	-0.0720899	0.0028122	-25.634577	3.72592E-25	-0.0777	-0.0663918
x_{pH}	-0.0002541	0.0028122	-0.0903894	0.928465307	-0.0059522	0.0054438
x_G	0.0270096	0.0028122	9.6044058	1.36263E-11	0.0213115	0.0327077
x_{VA}	-0.0032899	0.0028122	-1.16989	0.249525318	-0.0089880	0.00240
x_{VpH}	0.0024896	0.0028122	0.8853016	0.381711451	-0.0032084	0.0081877
x_{VG}	0.0009399	0.0028122	0.3342388	0.740086573	-0.0047581	0.0066380
x_{ApH}	0.0037041	0.0028122	1.3171636	0.195883127	-0.0019939	0.0094022
x_{AG}	-0.0160959	0.0028122	-5.7236032	1.48689E-06	-0.0217940	-0.0103979
x_{pHG}	-0.0004045	0.0028122	-0.143852	0.886397771	-0.006102	0.0052935

La figura 39 muestra el modelo simplificado resultante de la tabla 21. De acuerdo con el modelo, tanto el volumen como la agitaci3n son negativos, esto indica que $\mu_{m\acute{a}x}$ disminuye al aumentar el volumen del matraz Erlenmeyer y agitaci3n, por otro lado, la concentraci3n de glucosa tiene un efecto positivo en la $\mu_{m\acute{a}x}$, a medida que aumenta la concentraci3n de este sustrato, aumenta la $\mu_{m\acute{a}x}$. Finalmente, la interacci3n agitaci3n-concentraci3n de glucosa tiene efecto negativo en la variable de respuesta.

A)

$$\hat{\mu}_{m\acute{a}x.}(\text{d\acute{a}ias}^{-1}) = b_0 + b_1x_V + b_2x_A + b_4x_G + b_{24}x_{AG}$$

Coefficiente	Codificado	Decodificado
b_0	0.206	0.293
b_1	-0.021	-1.04×10^{-3}
b_2	-0.072	-1.44×10^{-3}
b_4	0.027	1.8×10^{-3}
$b_{2,4}$	-0.016	-2.145×10^{-5}

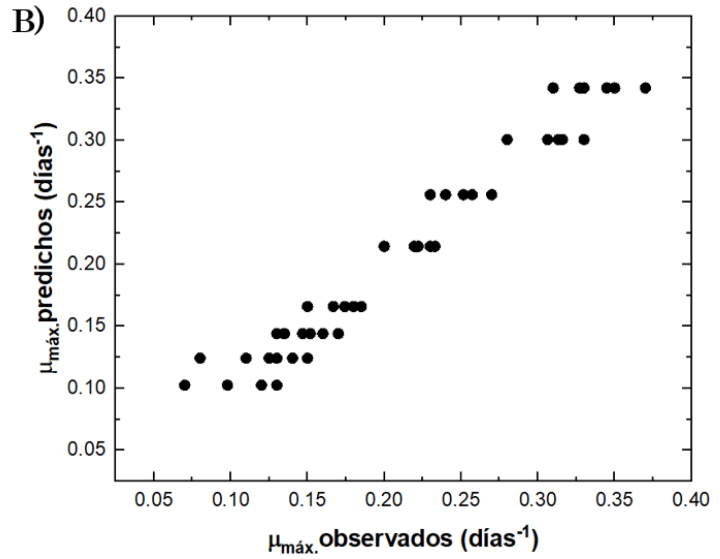


Figura 39. Modelo de regresión lineal para predecir la variable de respuesta $\mu_{m\acute{a}x.}$ A) Coeficientes del modelo lineal de ajuste codificado y decodificado. B) Correlación entre los datos observados y predichos de $\mu_{m\acute{a}x.}$

En cuanto a la variable de respuesta de concentración máxima de biomasa, $x_{m\acute{a}x.}$, la prueba de ANOVA indica que el modelo lineal fue adecuado para predecir la variable de respuesta (ver tabla 22). Por otro lado, la tabla 23 y 24 muestran los parámetros del ajuste y la significancia estadística de los efectos simples e interacciones del modelo.

Tabla 22. ANOVA de la $x_{m\acute{a}x.}$ de *A. muscarius* usado un diseño factorial 2^4

Fuente de variación	G.L.	suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Modelo	10	12.0776	1.2077	39.51	1.029E-19
Residuos	37	1.1310	0.0305		
Total	47	13.2087			

Tabla 23. Parámetros del ajuste lineal con los datos observados para $x_{m\acute{a}x}$.

Coeficiente de correlación múltiple	0.95622792
Coeficiente de determinación R^2	0.91437183
R^2 ajustado	0.89122908
Error típico	0.17483877
Observaciones	48

De acuerdo con la tabla 24, la intersección y los efectos simples (volumen, agitación y concentración de glucosa) son estadísticamente significativos para predecir $x_{m\acute{a}x}$; sin embargo, a diferencia de $\mu_{m\acute{a}x}$, ninguna interacción es estadísticamente significativa para predecir $x_{m\acute{a}x}$.

Tabla 24. Significancia estadística de los parámetros del modelo lineal para $x_{m\acute{a}x}$.

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	1.82586245	0.0252358	72.35206	1.8699E-41	1.774729	1.876995
x_V	-0.21006112	0.0252358	-8.323932	5.2947E-10	-0.261193	-0.158928
x_A	-0.44516692	0.0252358	-17.64029	1.3377E-19	-0.496299	-0.394034
x_{pH}	-0.0022071	0.0252358	-0.087458	0.93077837	-0.053339	0.04892
x_G	0.07792516	0.0252358	3.087880	0.00381057	0.026792	0.129057
x_{VA}	-0.03503101	0.0252358	-1.388147	0.1733945	-0.08616	0.016101
x_{VpH}	-0.01857895	0.0252358	-0.736213	0.4662428	-0.069711	0.032553
x_{VG}	-0.02848652	0.0252358	-1.128813	0.2662425	-0.079619	0.022646
x_{ApH}	-0.02033621	0.0252358	-0.805847	0.42547975	-0.071468	0.030796
x_{AG}	-0.01940972	0.0252358	-0.769134	0.44669585	-0.070542	0.031722
x_{pHG}	0.00822569	0.0252358	0.325953	0.74629606	-0.04290	0.059358

De acuerdo con la figura 40, una reducción tanto del volumen de trabajo como de la velocidad de agitación, y un aumento de la concentración de glucosa deben maximizar la respuesta $x_{m\acute{a}x}$ dentro de los límites de este diseño.

A)

$$\hat{x}_{m\acute{a}x.} (g/L) = b_0 + b_1 x_V + b_2 x_A + b_4 x_G$$

Coefficiente	Codificado	Decodificado
b_0	1.826	3.0062
b_1	-0.210	-0.0105
b_2	-0.445	-8.9×10^{-3}
b_4	0.078	5.193×10^{-3}

B)

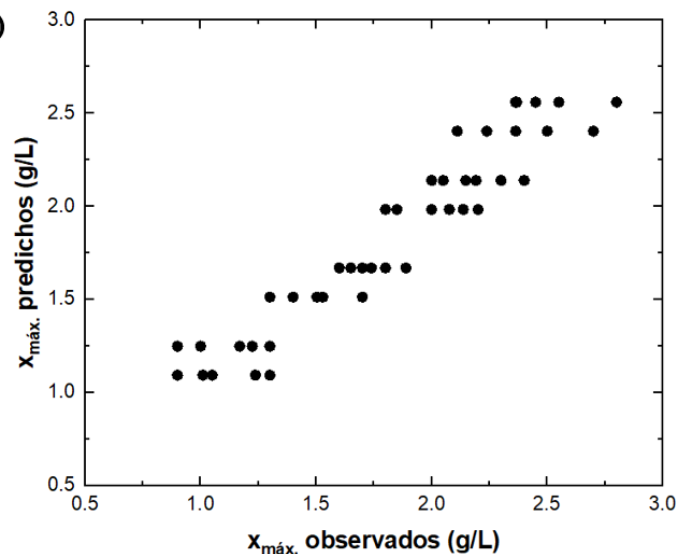


Figura 40. Modelo de regresión lineal para predecir la variable de respuesta $x_{m\acute{a}x.}$ A) Coeficientes del modelo lineal de ajuste codificado y decodificado. B) Correlación entre los datos observados y predichos de $x_{m\acute{a}x.}$

3.5.3 Optimización para el crecimiento de *Akanthomyces muscarius* mediante fermentación líquida sumergida.

De acuerdo con el análisis del diseño factorial 2^4 , se deduce que dentro de las condiciones evaluadas (volumen: 20-60%, agitación: 50-250 rpm, y concentración de glucosa: 10-40 g/L), una capacidad de volumen del 20% (50 mL en un matraz de 250 mL) y una concentración de glucosa de 40 g/L son las condiciones más adecuadas para maximizar tanto la velocidad de crecimiento específico máximo ($\mu_{m\acute{a}x.}$) como la concentración de biomasa máxima ($x_{m\acute{a}x.}$), es decir, reducir el tiempo de fermentación con un buen rendimiento, en cuanto al pH, este no tuvo efecto en la fermentación, aunque es importante mencionar que, este factor se vuelve importante cuando no se puede mantener controlado. Para los 16 tratamientos del diseño factorial 2^k , el pH al inicio y final del experimento se mantuvo dentro del rango ± 0.1 , lo que corrobora que la concentración de 6 g/L de K_2HPO_4 en la formulación es suficiente para amortiguar los cambios del pH durante el fermento; sin embargo, la agitación no presenta este

comportamiento lineal, la tabla 25 muestra las variables de respuesta de tres tratamientos, el F1, corresponde a la formulación 1 del diseño experimental totalmente al azar, mientras que T1 y T5 corresponden a los tratamientos del diseño factorial 2⁴, los tres tratamientos comprende las mismas condiciones experimentales salvo la agitación; sin embargo, las variables de respuesta parecen indicar que este factor no tiene un comportamiento lineal; por ejemplo, al comparar F1 y T1, $x_{m\acute{a}x}$. no cambia entre ellas mientras que, $\mu_{m\acute{a}x}$. es casi tres veces mayor en el tratamiento F1 que con el tratamiento T1. De forma análoga, $\mu_{m\acute{a}x}$. y $x_{m\acute{a}x}$. son mayores con el tratamiento F1 que en 5, por tanto, esta tendencia no parece ser lineal sino más bien cuadrática.

Tabla 25. Efecto de la agitación en el crecimiento de *A. muscarius* mediante FLS

T	Vol. relativo	Agitación (rpm)	pH del medio	Glucosa (g/L)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (días ⁻¹)	$x_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$Y_{x/s}$
F1	20	100	5.0 ±0.1	10	0.638±0.016	2.327±0.237	0.197±0.008
T1	20	50	5.0 ±0.1	10	0.255±0.01	2.282±0.162	0.162±0.008
T5	20	150	5.0 ±0.1	10	0.147±0.010	1.542±0.122	0.148±0.020

Se realizó un diseño experimental de caras centradas, el cual es bueno para identificar efectos cuadráticos y además para optimización de condiciones experimentales. Para ello, se evaluó el efecto del volumen, agitación y concentración de glucosa. La tabla 26 muestra los niveles de cada uno de los factores.

Tabla 26. Niveles de los factores evaluados para el diseño de caras centradas

Variable	Parámetro	Nivel codificado		
		-1	0	+1
V	Volumen relativo* (%)	20	40	60
A	Agitación (rpm)	50	100	150
G	Glucosa (g/L)	10	25	40

* 20, 40 y 60 corresponden al % de volumen ocupado por el fermento en el matraz Erlenmeyer de 250 mL.

La tabla 27 presenta los resultados de las fermentaciones del diseño de caras centradas. El tratamiento 9 con una agitación central de 100 rpm es el que arroja las

variables de respuesta más altas, seguido del tratamiento 14, que a diferencia del anterior tiene el mayor volumen de trabajo y la concentración más alta de sustrato y después el tratamiento 15. El aumento del volumen y agitación al valor extremo (60% y 150 rpm, respectivamente) son las peores condiciones para el crecimiento de *Akanthomyces muscarius* en FLS.

Tabla 27. Respuestas para el crecimiento de *A. muscarius* bajo un diseño de caras centradas.

F	Vol. relativo	Agitación (rpm)	Glucosa (g/L)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (días ⁻¹)	$x_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$Y_{x/s}$
1	20	50	10	0.259±0.032	2.296±0.188	0.148±0.027
2	20	50	40	0.338±0.053	2.322±0.166	0.116±0.020
3	20	150	10	0.148±0.040	1.509±0.326	0.150±0.016
4	20	150	40	0.138±0.021	1.542±0.285	0.141±0.013
5	60	50	10	0.226±0.024	2.291±0.223	0.143±0.017
6	60	50	40	0.304±0.033	2.414±0.212	0.097±0.028
7	60	150	10	0.099±0.040	1.079±0.269	0.078±0.013
8	0.6	150	40	0.118±0.045	1.074±0.343	0.081±0.016
9	20	100	25	0.713±0.058	5.410±0.443	0.182±0.024
10	60	100	25	0.338±0.032	2.516±0.306	0.114±0.020
11	40	50	25	0.304±0.025	3.329±0.481	0.131±0.024
12	40	150	25	0.132±0.024	1.871±0.368	0.09±0.021
13	40	100	10	0.407±0.025	2.560±0.314	0.187±0.026
14	40	100	40	0.603±0.097	6.454±0.367	0.181±0.036
15	40	100	25	0.525±0.051	4.398±0.213	0.185±0.025

De acuerdo con el modelo lineal propuesto en la sección experimental para el diseño de caras centradas, se hizo una regresión lineal para cada variable de respuesta. En ambas regresiones, se realizó un ANOVA (tabla 28) para estimar la significancia de la regresión e identificar aquellos con significancia estadística para cada variable de respuesta. Para el caso de la velocidad de crecimiento específica máxima, la prueba de ANOVA indica que el modelo es adecuado para estimar $\mu_{m\acute{a}x}$ (P<0.05). La tabla 29 muestra los parámetros de ajuste del modelo lineal con los datos experimentales con un $R^2>0.8$. Por otro lado, la tabla 30 indica claramente que la intersección y los efectos simples volumen, agitación y concentración de glucosa tienen efecto significativo en

$\mu_{m\acute{a}x.}$ ($\alpha < 0.05$) tal como se había observado en el diseño factorial 2^4 , por otro lado, el efecto cuadrático de la agitación tiene un efecto significativo (ver tabla 30).

Tabla 28. ANOVA de la $\mu_{m\acute{a}x.}$ de *A. muscarius* usado un diseño de caras centradas

Fuente de variación	G.L.	suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Modelo	9	1.2826	0.1425	19.279	4.37E-11
Residuos	35	0.2587	0.0073		
Total	44	1.5413			

Tabla 29. Parámetros del ajuste lineal con los datos observados para $\mu_{m\acute{a}x.}$ mediante un diseño de caras centradas

Coefficiente de correlación múltiple	0.9122
Coefficiente de determinación R^2	0.8321
R^2 ajustado	0.8145
Error típico	0.0859
Observaciones	45

Tabla 30. Significancia estadística de los parámetros del modelo lineal para $\mu_{m\acute{a}x.}$

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0.523530	0.0266801	19.62243	1.8123E-20	0.469366	0.577693
x_V	-0.051179	0.0156972	-3.260394	0.00248173	-0.08304	-0.019312
x_A	-0.079437	0.0156972	-5.060607	1.3358E-05	-0.11130	-0.047570
x_G	0.036186	0.0156972	2.305285	0.02719737	0.00431	0.068053
x_{VA}	-0.000483	0.0175500	-0.027572	0.97816007	-0.03611	0.035144
x_{VG}	0.003476	0.0175500	0.1980738	0.84413328	-0.03215	0.039104
x_{AG}^2	-0.018512	0.0175500	-1.054853	0.29871979	-0.05414	0.017115
x_V^2	0.002960	0.0309553	0.0956266	0.92436254	-0.05988	0.065802
x_A^2	-0.304645	0.0309553	-9.841451	1.2859E-11	-0.36748	-0.241803
x_G^2	-0.017749	0.0309553	-0.573402	0.57003873	-0.08059	0.045092

La figura 41 muestra el modelo simplificado resultante de la tabla 30. De acuerdo con el modelo, el volumen es negativo y coherente con lo observado en el diseño factorial 2^4 , esto indica que $\mu_{m\acute{a}x.}$ disminuye al aumentar el volumen de trabajo. Respecto a la agitación, su efecto no es tan claro, pues el modelo codificado indica efecto negativo pero el modelo decodificado indica lo opuesto; sin embargo, el efecto cuadrático de la

agitación incide sobre la $\mu_{m\acute{a}x}$. Finalmente, la concentración de glucosa tiene un efecto positivo sobre la variable de respuesta y también es congruente con el análisis del diseño factorial 2⁴.

A)

$$\hat{\mu}_{m\acute{a}x}(\text{días}^{-1}) = b_0 + b_1x_V + b_2x_A + b_3x_G + b_{22}x_A^2$$

Coefficiente	Codificado	Decodificado
b_0	0.5176	-0.5239
b_1	-0.0511	-2.56x10 ⁻³
b_2	-0.0794	0.0232
b_3	0.0361	2.413x10 ⁻³
$b_{2,4}$	-0.3105	-1.2424x10 ⁻⁴

B)

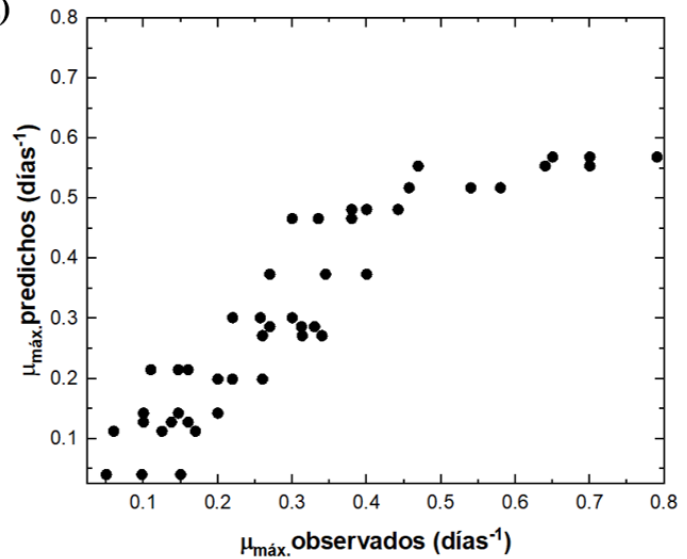


Figura 41. Modelo de regresión lineal para predecir la variable de respuesta $\mu_{m\acute{a}x}$. A) Coeficientes del modelo lineal de ajuste codificado y decodificado. B) Correlación entre los datos observados y predichos de $\mu_{m\acute{a}x}$.

En cuanto a la variable de respuesta de concentración máxima de biomasa, $x_{m\acute{a}x}$, la prueba de ANOVA (tabla 31) indica que el modelo lineal es adecuado para predecir la variable de respuesta ($P < 0.05$). Por otro lado, la tabla 32 y 33 muestran los parámetros del ajuste y la significancia estadística de los efectos simples, las interacciones y efectos cuadráticos del modelo.

Tabla 31. ANOVA de la $x_{m\acute{a}x}$ de *A. muscarius* usando un dise\~no de caras centradas

Fuente de variaci3n	G.L.	suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Modelo	9	75.25033	8.3611	9.369	4.491E-07
Residuos	35	31.23420	0.8924		
Total	44	106.4845			

Tabla 32. Par\~metros del ajuste lineal con los datos observados para $x_{m\acute{a}x}$ mediante un dise\~no de caras centradas

Coficiente de correlaci3n m\~ltiple	0.8406
Coficiente de determinaci3n R ²	0.7066
R ² ajustado	0.6312
Error t\~pico	0.9446
Observaciones	45

De acuerdo con la tabla 33, la intersecci3n, los efectos simples (volumen, agitaci3n y concentraci3n de glucosa) y el efecto cuadr\~tico de la agitaci3n son estad\~sticamente significativos para predecir $x_{m\acute{a}x}$.

Tabla 33. Significancia estad\~stica de los par\~metros del modelo lineal para $x_{m\acute{a}x}$.

	Coficientes	Error t\~pico	Estad\~stico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepci3n	4.561498	0.2931473	15.560428	2.6838E-17	3.9663781	5.1566197
x_V	-0.37057	0.1724727	-2.148586	0.0386657	-0.720711	-0.020434
x_A	-0.55769	0.1724727	-3.233524	0.0026678	-0.907833	-0.207556
x_G	0.407115	0.1724727	2.3604648	0.0239540	0.0569775	0.7572543
x_{VA}	-0.12329	0.1928304	-0.639420	0.5267126	-0.514766	0.2681668
x_{VG}	0.007232	0.1928304	0.0375059	0.9702947	-0.384234	0.3986989
x_{AG}	-0.01496	0.1928304	-0.077628	0.9385659	-0.406435	0.3764975
x_V^2	-0.638793	0.3401209	-1.878137	0.0687139	-1.329276	0.0516884
x_A^2	-2.001461	0.3401209	-5.884557	1.0959E-06	-2.691943	-1.3109790
x_G^2	-0.094653	0.3401209	-0.278294	0.7824241	-0.785135	0.5958285

De acuerdo con la figura 42, una reducci3n tanto del volumen de trabajo y un aumento de la concentraci3n de glucosa deben maximizar la respuesta $x_{m\acute{a}x}$ dentro de los l\~mites de este dise\~no; y adem\~s se confirma que estos factores tienen un efecto lineal, pero respecto a la agitaci3n esto no es muy claro.

A)

$$\hat{x}_{m\acute{a}x.}(g/L) = b_0 + b_1x_V + b_2x_A + b_3x_G + b_{22}x_A^2$$

Coefficiente	Codificado	Decodificado
b_0	4.2681	-3.733
b_1	-0.3705	-0.01853
b_2	-0.557	0.17243
b_3	0.4071	0.02714
b_{22}	-2.2948	-9.1792E-4

B)

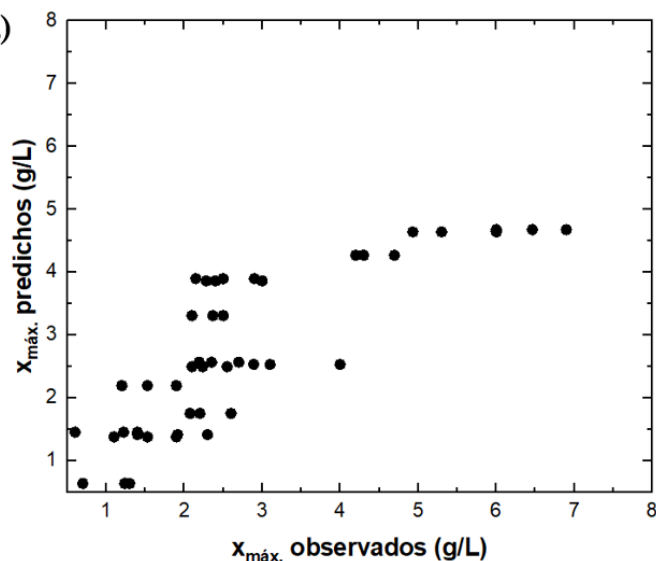


Figura 42. Modelo de regresión lineal para predecir la variable de respuesta $x_{m\acute{a}x.}$ A) Coeficientes del modelo lineal de ajuste codificado y decodificado. B) Correlación entre los datos observados y predichos de $x_{m\acute{a}x.}$

Se construyeron gráficos de superficie de respuesta derivados del diseño de caras centradas, las cuales fueron útiles para optimizar el crecimiento de *Akanthomyces muscarius* en FLS. La figura 42 (A-F) muestra el efecto de dos factores manteniendo un tercero constante. La figura 42 (A-C) representan gráficos tridimensionales del volumen de trabajo vs agitación y volumen vs concentración de glucosa. El color oscuro indica una alta respuesta de $\mu_{m\acute{a}x.}$ y $x_{m\acute{a}x.}$. A través de estas superficies se evidenció el efecto lineal de la concentración y volumen de trabajo respecto a las variables de respuesta; además, se confirma que el efecto de la agitación presenta una curvatura en cuyos extremos se induce una menor respuesta para ambas variables de estudio ($\mu_{m\acute{a}x.}$ y $x_{m\acute{a}x.}$). De acuerdo con dichas superficies, las condiciones óptimas fueron 40g/L de glucosa, 20% de volumen de trabajo y una agitación igual a 95 rpm.

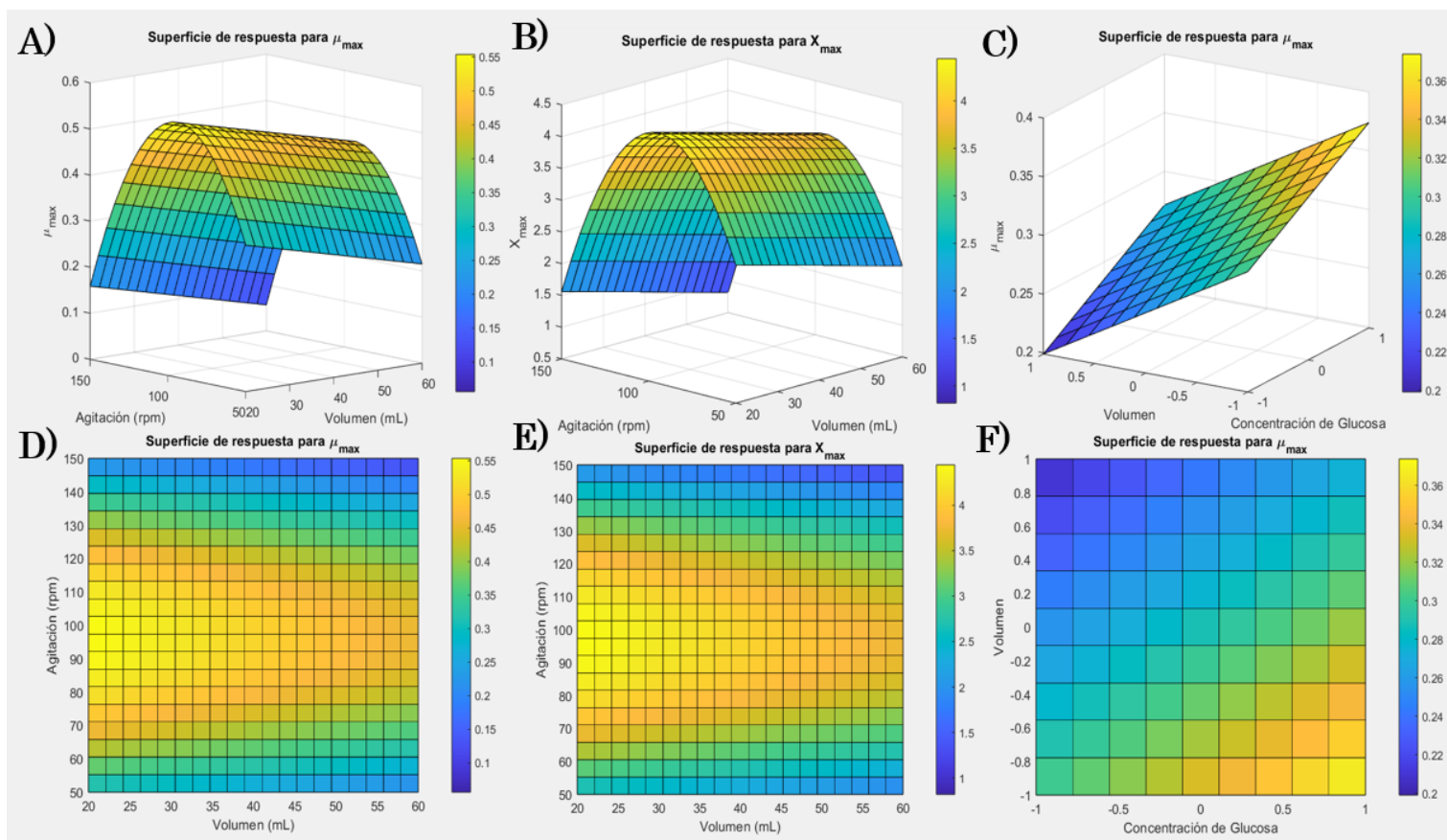


Figura 42. Superficies de respuesta de μ_{\max} y x_{\max} para el crecimiento de *Akanthomyces muscarius* en FLS respecto al volumen de trabajo, agitación y concentración de glucosa. A) y B) corresponden a las superficies de respuesta de μ_{\max} y x_{\max} , respectivamente en función de la agitación y volumen mientras que C) es la superficie de respuesta en función del volumen y concentración de glucosa. D), E) y F) corresponden a la vista superior de cada una de las superficies anteriores.

Se realizó la fermentación por triplicado con las condiciones predichas por la optimización (40g/L de glucosa, 20% de volumen de trabajo y una agitación igual a 94 rpm.). La figura 43 muestra el ajuste de los datos experimentales con el modelo de Monod y el logístico y la tabla 34 muestra los parámetros para dichos ajustes. El modelo de Monod es consistente con el rendimiento obtenido ($Y_{x/s}$) experimentalmente. Por otro lado, se observan diferencias entre ambos modelos para estimar $\mu_{m\acute{a}x.}$; sin embargo, en ambos modelos, $\mu_{m\acute{a}x.}$ es mayor a 0.60 días⁻¹ tal como se pronosticó por el modelo de optimización. De manera similar, $x_{m\acute{a}x.}$ del modelo logístico es mayor a 5.0 g/L predicho.

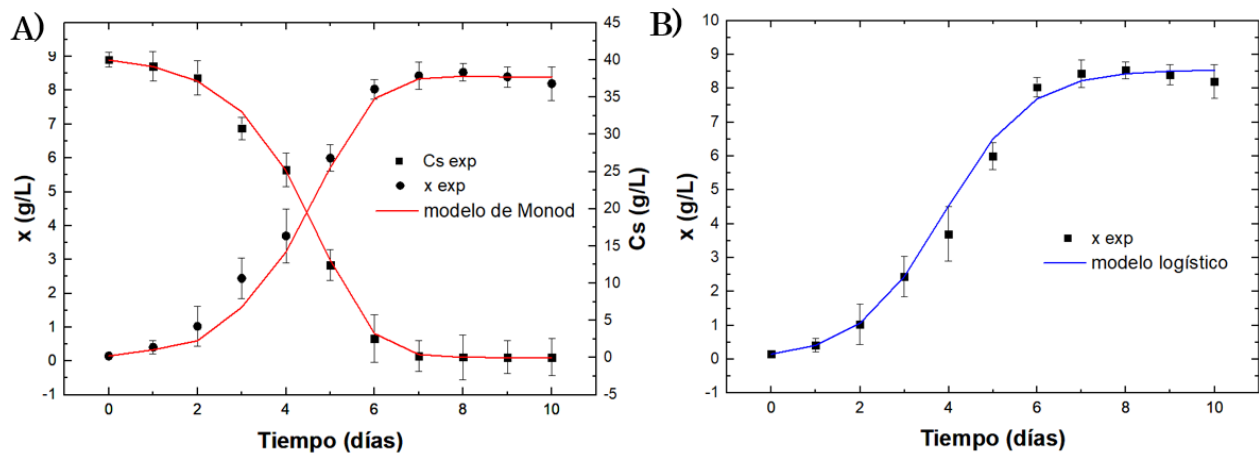


Figura 43. Ajuste de los datos experimentales de la fermentación con las condiciones predichas por la optimización mediante el modelo de Monod y logístico. A) Ajuste de los datos con el modelo de Monod y B) con el modelo logístico.

Tabla 34. Parámetros cinéticos de ajuste para el modelo de Monod y logístico con los datos experimentales de la fermentación.

Parámetros	Modelo de Monod	Modelo logístico
$\mu_{m\acute{a}x.}$ (días ⁻¹)	1.3219 ± 0.046	1.053 ± 0.11
$x_{m\acute{a}x.}$ (g/L)	--	8.6015 ± 0.1484
k_s (g/L)	24.1942 ± 1.38	--
$Y_{x/s}$	0.211±0.0047	0.21 ± 0.005*

* Parámetro medido experimentalmente

Las condiciones experimentales evaluadas están limitadas por el sistema que se utilizó para realizar las fermentaciones en este caso, matraces Erlenmeyer como recipientes de la fermentación. El porcentaje de volumen de trabajo fue una variable que estuvo indirectamente relacionada con la disponibilidad de oxígeno en el medio, de acuerdo con la arquitectura del matraz, un menor volumen permite una mayor área superficial durante la agitación orbital, un mayor volumen, tiene menos área en contacto con el oxígeno y, por tanto, en estos casos, la aireación estuvo más limitada. Por otro lado, la agitación es clave en este tipo de fermentaciones, particularmente cuando la morfología de crecimiento es en forma de pellets, una baja o nula agitación protege la estructura del micelio del pellet pero reduce la disponibilidad del oxígeno, requerido para que pueda penetrar el pellet y evitar muerte celular en el centro de los mismos, por el contrario, una agitación fuerte asegura la difusión del oxígeno pero compromete la estructura del micelio, el cuanto al pH, de acuerdo a los resultados del diseño, *Akanthomyces muscarius* es tolerante en el rango de pH evaluado pero su crecimiento se ve afectado a un pH<5.0; sin embargo, con la adecuada concentración de K₂HPO₄, es posible amortiguar el pH durante el proceso fermentativo.

3.6 Evaluación de los parámetros cinéticos en el biorreactor batch con tecnología Arduino

Se llevo a cabo la fermentación líquida sumergida de *Akanthomyces muscarius* en el biorreactor batch, las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura= 30 ± 0.3 °C, pH= 6 ± 0.1 , agitación 100 ± 10 rpm, nivel de aireación: 2 L /min, volumen=0.5 L, concentración de glucosa inicial $C_{s0}= 40$ g/L y concentración inicial de biomasa $x_0=0.5$ g/L. Cabe mencionar que la fermentación se realizó por duplicado. En cuanto a las condiciones de control, se monitorearon la temperatura, pH y nivel de aireación durante todo el proceso fermentativo. La figura 44 muestra el montaje del sistema y el crecimiento de los pellets en el recipiente del biorreactor.

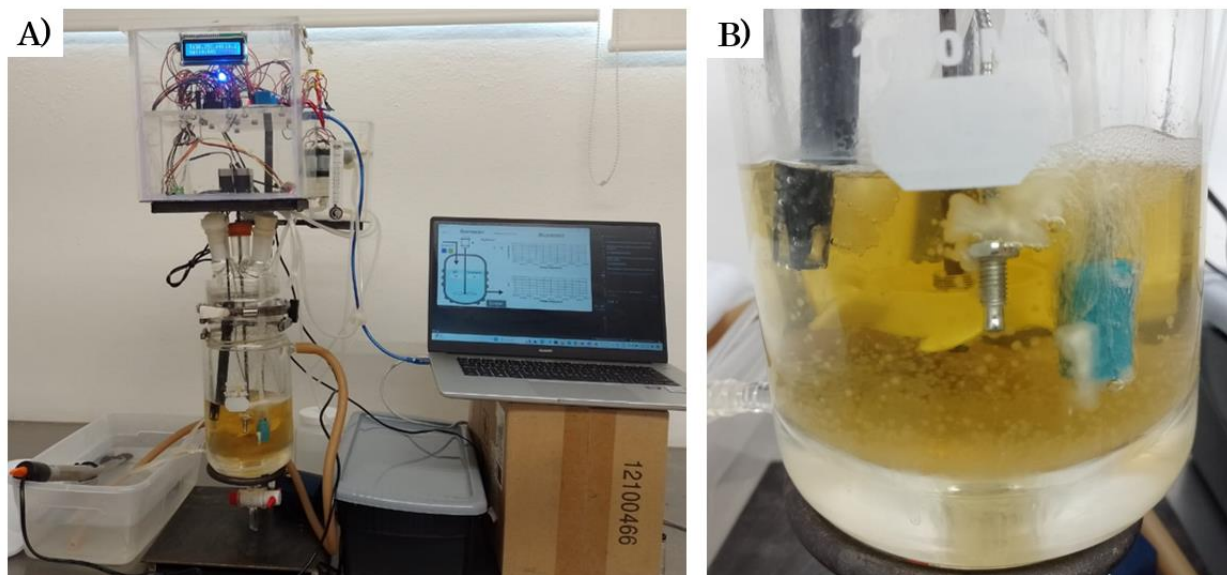


Figura 44. Fermentación líquida sumergida de *A. muscarius* en el biorreactor batch. A) Montaje del sistema, B) pellets en crecimiento a los 6 días de la fermentación.

Al final de la fermentación, se observaron pellets homogéneos de un tamaño menor a los 1.5 mm de diámetro, y menos compactos que los observados en el sistema de matraz agitado. Tampoco se observó turbidez en el medio, lo que indicó ausencia de

bacterias. Los pellets resultantes fueron comparados con los obtenidos mediante el sistema de matraces agitados, la figura 45 muestra la diferencia en tamaño y nivel de compactación; también, se observó la morfología de los pellets en microscopio en un aumento 40x, En la figura 45 B, se muestra un pellet en forma de semilla y agrupándose en forma esférica y en dicho proceso, la agitación mecánica promovió roturas de micelio, iniciando nuevos pellets y formación de conidios.

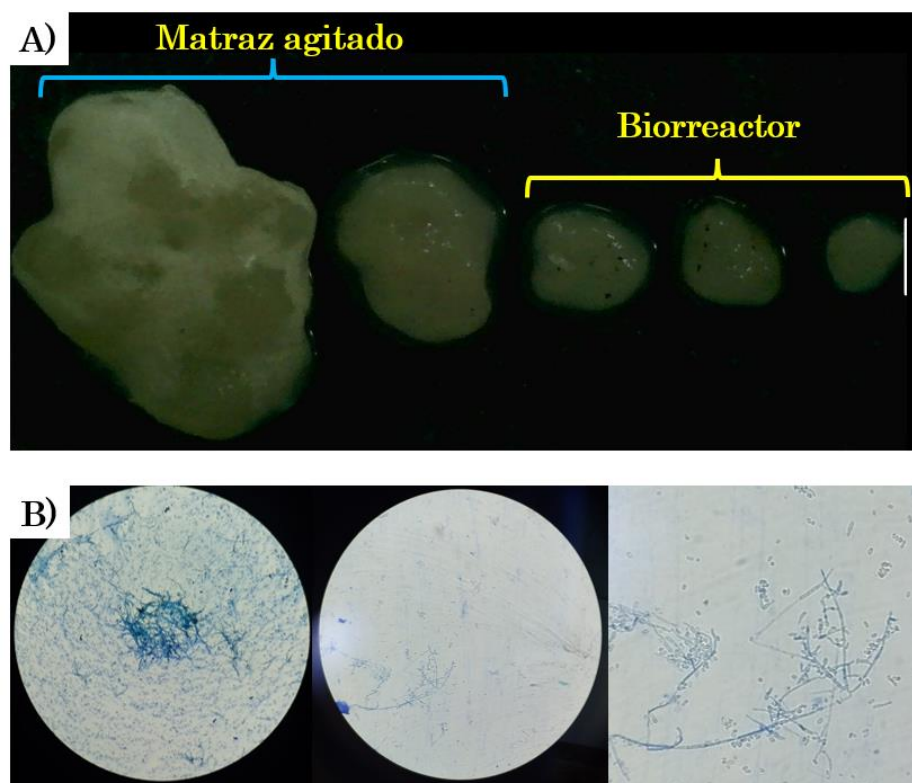


Figura 45. Tamaño y morfología de los pellets en el biorreactor batch. A) comparación de tamaños entre los pellets generados en un sistema de matraz agitado y en el biorreactor. De Izquierda a derecha se muestran los pellets del sistema de matraz agitado a 250 rpm y 100 rpm y aquellos generados en el biorreactor batch. B) Morfología de los pellets en el biorreactor, la primera micrografía muestra un pellet en formación, la segunda muestra una hoja segmentada por la agitación mecánica y la última es una amplificación de la anterior.

De acuerdo con el modelo matemático descrito en la sección metodológica, se estimó el coeficiente de transferencia masa líquido-gas, K_{LA} . De acuerdo con el ajuste lineal de los datos experimentales (concentración de oxígeno vs tiempo) que se muestran en la figura 46, $K_{LA}=7.3987 \times 10^{-4} \pm 5.16 \text{ s}^{-1}$. Este parámetro fue considerado como una de las condiciones iniciales de ajuste para el modelo matemático de la fermentación.

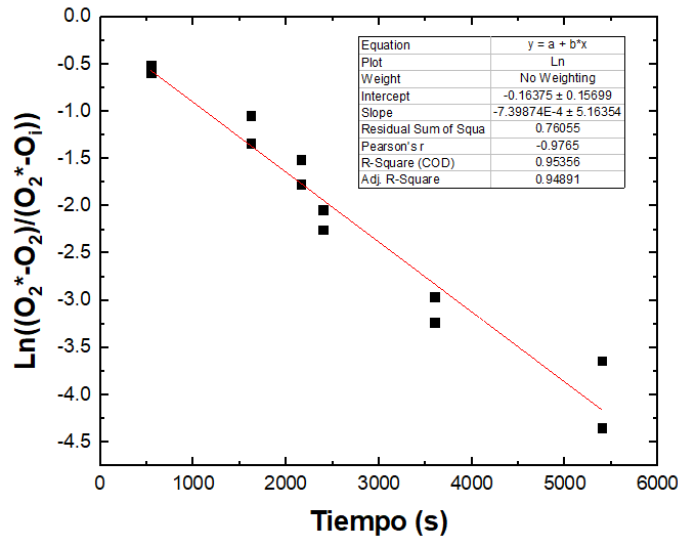


Figura 46. Estimación del coeficiente de transferencia de masa líquido-gas (K_{LA}) en el medio de cultivo a los 4 días del proceso de fermentación. La línea roja corresponde al ajuste de los datos y cuya pendiente se correlaciona con K_{LA} .

La cinética de crecimiento de *Akanthomyces muscarius* en el biorreactor batch se visualiza en la figura 47 y los parámetros de ajuste del modelo con los experimentales se muestran en la tabla 35. El modelo se ajustó a los datos experimentales con una SSE <0.01, por lo que la propuesta de modelo es adecuada, de hecho, el perfil de la concentración de sustrato y la concentración de biomasa se ajusta bien a la predicción del modelo. El mayor desajuste se observa en el perfil de la concentración de oxígeno disuelto; sin embargo, el modelo coincide en una disminución de oxígeno disuelto que se recupera cuando se llega a la fase estacionaria de la fermentación. Por otra parte, el coeficiente de transferencia de masa gas-líquido (k_{LA}), no es constante, de hecho

está sujeto a las condiciones del medio de fermentación y no solo a la ingeniería del biorreactor, por tanto, el modelo se puede ajustar para que k_{LA} sea una función de la viscosidad y densidad del medio así como de la agitación y flujo de aire al biorreactor.

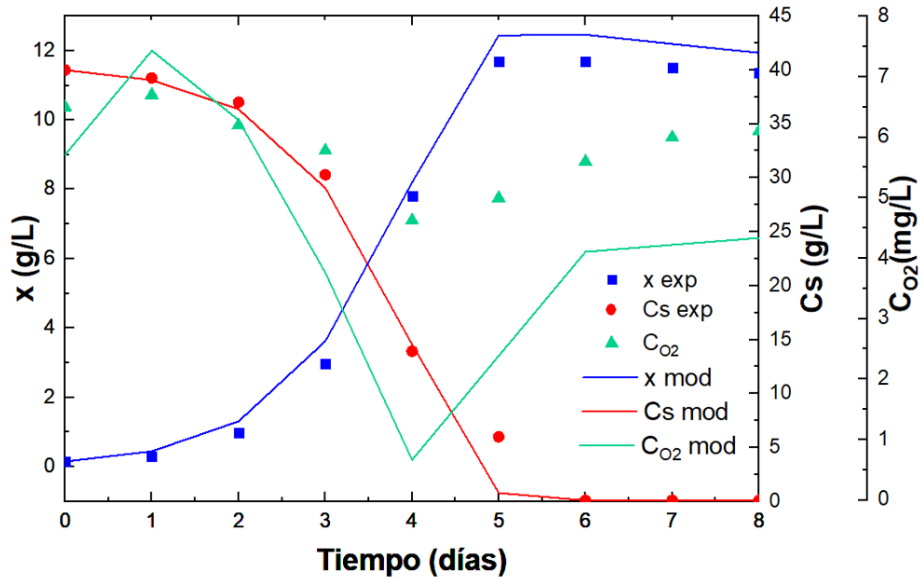


Figura 47. Ajuste de los datos experimentales de la fermentación con el modelo propuesto.

Tabla 35. Parámetros cinéticos de ajuste para el modelo propuesto con los datos experimentales de la fermentación en el reactor batch.

Parámetros	Modelo
$\mu_{m\acute{a}x.}$ (días ⁻¹)	1.4134 ± 0.04
k_s (g/L)	5.7923 ± 0.045
$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	0.3242 ± 0.009
m_s (g g ⁻¹)	0.066 ± 0.007
$Y_{x/o}$ (g g ⁻¹)	25.3236 ± 1.567
k_{LA} (s ⁻¹)	5.87x10 ⁻⁴ ± 9x10 ⁻⁵
m_{O_2} (g g ⁻¹)	0.0143 ± 0.0067
SSE	<0.01

En cuando a los parámetros de ajuste, $\mu_{m\acute{a}x.}$ aumentó en comparación del sistema de matraz agitado, posiblemente porque en ese sistema, la disponibilidad de oxígeno estuvo más limitado. Además, es coherente que $\mu_{m\acute{a}x.}$ haya incrementado, pues la fermentación en el biorreactor alcanzó más rápido la fase estacionaria en menos de 6 días con rendimiento $Y_{x/s}$ superior al obtenido con el mejor tratamiento para el sistema de matraz agitado (0.3242 ± 0.009 vs 0.211±0.0047). Es importante mencionar que el coeficiente k_{LA} es menor en la predicción que en la observación experimental; sin embargo, esto respalda más la idea de que este coeficiente no es constante y puede variar en el transcurso de la fermentación. En resumen, el biorreactor fue adecuado para la fermentación líquida sumergida de *Akanthomyces muscarius*, pues en general, la fermentación fue más rápida que el sistema de matraz agitado ($\mu_{m\acute{a}x.}$ = 1.4134 ± 0.04 vs 1.3219 ± 0.046 días⁻¹) con un mayor rendimiento ($Y_{x/s}$ = 0.3242 ± 0.009 vs 0.211±0.0047). Finalmente, el biorreactor permitió la formación de pellets más pequeños y menos compactos, con un tamaño aproximado a 1.5 mm, lo cual es un tamaño ideal desde el punto de vista industrial.

Referencias

1. Díaz, V. M., & Medel, L. A. (2014). El hongo *Verticillium hemileiae* Bouriquet, alternativa para el control de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.). *Agroproductividad*, 7(9), 62-67.
2. García, A., Pérez, R., & González, M. (2017). La producción de metabolitos secundarios en hongos del género *Amanita*. *Revista Mexicana de Micología*, 40(1), 57-66.
3. González, M., & Mercado, R. (2017). Caracterización morfológica de *Akanthomyces lecanii*: Hiperparásito de *Hemileia vastatrix*. *Ciencia Agropecuaria*, 25(3), 169-175.
4. González, L. I., Ramírez, P. G., & Cruz, G. I. (2017). Estimación de biomasa en fermentación en estado sólido mediante producción de dióxido de carbono. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 45-55.
5. Rodríguez, R. J., & Sánchez, S. (2018). Establecimiento de un protocolo para el crecimiento y multiplicación de *Fusarium spp.* y *Stachybotrys terrestris* en medios líquidos. *Tecnología en Marcha*, 31(4), 37-46.
6. Kepler, R. M., Luangsa-Ard, J. J., Hywel-Jones, N. L., Quandt, C. A., Sung, G. H., Rehner, S. A., Aime, M. C., Henkel, T. W., Sanjuan, T., Zare, R., Chen, M., & Spatafora, J. W. (2017). A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (Hypocreales). *IMA Fungus*, 8(2), 335–353.
7. Rodríguez, C. (2005). Métodos indirectos para la cuantificación de biomasa en fermentación sólida. Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Javeriana.
8. Sánchez, C., & García, J. (2016). Cultivo de hongos en fermentación líquida superficial para la producción de enzimas industriales. *Enzimas y Biotecnología*, 8(2), 45-50.
9. Turco, S., Draais, M. I., Rossini, L., Di Sora, N., Brugneti, F., Speranza, S., Contarini, M., & Mazzaglia, A. (2024). Genomic and pathogenic

characterization of *Akanthomyces muscarius* isolated from living mite infesting hazelnut big buds. *Genes*, 15(8), 993.

CONCLUSIONES

El presente trabajo se centró en evaluar los parámetros de crecimiento de *Akanthomyces muscarius*, un hongo con potencial agente de control de la roya (*Hemileia vastatrix*) del café. Los resultados respecto a la caracterización morfológica y molecular corroboran tanto al género como a la especie. Se realizaron experimentos mediante fermentación sólida tanto en agar como en otros sustratos y se corroboró que esta especie tiene una cinética de crecimiento lento en estos medios. En cuanto a la fermentación líquida sumergida, el diseño experimental totalmente al azar revela que la formulación a base de dextrosa, extracto de levadura con minerales y micronutrientes en presencia de una alta concentración de KH_2PO_4 permitieron aumentar la velocidad de crecimiento específico máximo y la concentración máxima de biomasa. Es importante recordar que, bajo estas condiciones, la fermentación se lleva a cabo mediante la formación de pellets, los cuales son comunes en la fermentación de otros hongos. El tamaño de los pellets es importante, si son muy grandes, el oxígeno estará limitado en el interior y si están muy pequeños, se corre el riesgo de que no crezcan. De hecho, los resultados tanto del diseño factorial como el de caras centradas corroboran que la agitación es clave, al menos en el sistema de matraz agitado. Una alta agitación, destruye el micelio superficial de dichos pellets mientras que, una agitación suave no compromete la estructura, pero impacta negativamente en la transferencia de oxígeno de la fase gas al líquido. Los anteriores hallazgos explican la curvatura observada en las superficies de respuesta. En cuanto a la fermentación líquida sumergida en el reactor batch, se obtuvieron mayores rendimientos $Y_{x/s}$ y parámetros cinéticos más altos ($\mu_{m\acute{a}x}$ y $x_{m\acute{a}x}$), corroborando que esta especie es fuertemente dependiente del oxígeno disuelto y también depende linealmente de la concentración de sustrato dentro del intervalo de estudio (10-40 g/L). En resumen, la mejor formulación para el medio de cultivo líquido fue a base de 5g/L extracto de levadura, 6 g/L de KH_2PO_4 más minerales y microelementos, las

mejores condiciones para la fermentación líquida sumergida en matraz agitado fueron: 28 °C, pH=5-7, 20% de volumen ocupado, 95 rpm, y 40 g/L de glucosa, y se construyó un reactor batch con tecnología Arduino con control de temperatura, oxigenación y velocidad de agitación mecánica. Bajo este sistema, se obtuvieron rendimientos máximos de 0.32 g de biomasa/ g de sustrato y $\mu_{m\acute{a}x}$ de 1.4134 días⁻¹, los cuales fueron superiores respecto al mejor tratamiento en sistema de matraz agitado y en fermentación sólida ($k=0.0096$ días⁻¹).

ANEXO A: Código del biorreactor de lecho empacado

```
1 #include <OneWire.h>
2 #include <DallasTemperature.h>
3 #include <Wire.h>
4 #include <Adafruit_GFX.h>
5 #include <Adafruit_SSD1306.h>
6 #include <SPI.h> // libreria SPI
7 #include <SD.h> // libreria para tarjetas sd
8 #define SS 10 //Slave Select en pin digital 10
9 File archivo;
10 #define SCREEN_WIDTH 128
11 #define SCREEN_HEIGHT 64
12 int porcentajeHumedad=0;
13 int temp = 0;
14 int sensorValue=0;
15 int ppm;
16 #define OLED_RESET -1
17 Adafruit_SSD1306 display(SCREEN_WIDTH, SCREEN_HEIGHT, &Wire, OLED_RESET);
18
19
20
21 // Inicializar el sensor
22 const int oneWireBus = 2;
23 OneWire oneWire(oneWireBus);
24 DallasTemperature sensors(&oneWire);
25
26 void setup() {
27 //-----SENSOR DS18B20
28 sensors.begin();
29
30 //-----OLED
31 // Inicialización del display OLED
32 if(!display.begin(SSD1306_SWITCHCAPVCC, 0x3C)) {
33 Serial.println(F("No se ha detectado el display OLED"));
34 while (true);
35 }
36
37 display.display(); // Inicia el display OLED
38 delay(2000); // Espera 2 segundos
39 display.clearDisplay(); // Limpia el display
40 display.setTextSize(1); // Establece el tamaño del texto
41 display.setTextColor(SSD1306_WHITE); // Establece el color del texto}
42 Serial.begin(9600); // Inicia la comunicación serial a 9600 baudios para imprimir resultados.
43 Serial.println("Inicializando tarjeta...");
44 if (!SD.begin(SS)){
45 Serial.println("fallo en inicializacion !");
46 }
47 else{
48 archivo = SD.open("lecturas.txt", FILE_WRITE);
49 Serial.println("Inicializacion correcta");
50 }
51 }
52 void loop() {
53
54 const int sensorPin = A0; // Define el pin analógico al que está conectado el sensor de humedad.
55
56 //-----SENSOR DE HUMEDAD-----
57
58 int humedad = analogRead(sensorPin); // Lee el valor del sensor de humedad.
59 // Mapea el valor leído del sensor al rango de 0 a 100 (porcentaje de humedad relativa).
60 porcentajeHumedad = map(humedad, 550, 0, 0, 100);
61
62 // Si el porcentaje de humedad calculado es mayor que 100, establece el valor en 100.
63 if(porcentajeHumedad > 100) porcentajeHumedad = 100;
64 | delay(500); // Espera medio segundo antes de repetir el ciclo.
65
66
67 registrasd();
68 }
69
70
```

```

71 void registrasd(){
72
73 //-----SENSOR DS18B20
74 // Mandar solicitar la temperatura
75 sensors.requestTemperatures();
76 // Leer la temperatura en grados Celsius
77 float temperaturaC = sensors.getTempCByIndex(0);
78 // Si la temperatura es válida
79 if (temperaturaC != -127.00) {
80 // Imprimir la temperatura en la consola serial
81 Serial.print("Temperatura: ");
82 Serial.print(temperaturaC);
83 Serial.println(" °C");
84 } else {
85 // Si no se puede leer la temperatura, imprimir un mensaje de error
86 Serial.println("Error al leer la temperatura");
87 }
88
89 // Esperar un segundo antes de tomar otra lectura
90 delay(1000);
91
92 const int sensorPinMQ = A2; // Pin analógico al que está conectado el sensor MQ-135
93
94 //-----SENSOR MQ135-----
95 float sensorValue = analogRead(sensorPinMQ); // Lee el valor analógico del sensor
96 float voltage = sensorValue * (5.0 / 1023.0); // Convertir el valor leído a voltaje
97 float resistance = (5.0 - voltage) / voltage; // Calcular la resistencia del sensor en base al voltaje
98 // Utilizar una curva de calibración para convertir la resistencia a concentración de CO2
99 // Este valor debe ser ajustado según tu sensor y entorno de trabajo
100 int ppm = 446 * pow(resistance, -1.2);
101 delay(1000); // Espera 1 segundo antes de realizar la siguiente lectura
102
103
104 archivo = SD.open ("lecturas.txt", FILE_WRITE);
105 if (archivo){
106
107     if (archivo){
108         archivo.print("Humedad: ");
109         archivo.print(porcentajeHumedad);
110         archivo.print(" %");
111         archivo.print(", ");
112         archivo.print("Concentracion CO2: ");
113         archivo.print(ppm);
114         archivo.print(" ppm");
115         archivo.print(", ");
116         archivo.print("Temperatura: ");
117         archivo.print(temperaturaC);
118         archivo.println(" °C");
119
120 //-----PANTALLA OLED-----
121 display.clearDisplay();
122 display.setCursor(35,0);
123 display.print("MEDICIONES");
124 display.display();
125 //MQ135
126 display.setCursor(0,20);
127 display.print("CO2: ");
128 display.println(ppm);
129 display.display();
130 //HUMEDAD
131 //display.clearDisplay();
132 display.setCursor(0,35);
133 display.print("HUMEDAD: ");
134 display.println(porcentajeHumedad);
135 display.display();
136 //TEMPERATURA
137 //display.clearDisplay();
138 display.setCursor(0,50);
139 display.print("TEMP: ");
140 display.println(temperaturaC);
141 display.display();

```

```
139     display.display();
140     // delay(1000);
141
142     Serial.print("Humedad: ");
143     Serial.print(porcentajeHumedad);
144     Serial.println(" %");
145     Serial.print("Concentracion Co2: ");
146     Serial.println(ppm); // Imprime el valor leído en el monitor serial
147     Serial.print("Temperatura: ");
148     Serial.print(temperaturaC);
149     Serial.println(" °C");
150     Serial.println(".....");
151
152     delay(1000);
153     archivo.close();
154     delay(1000);
155
156
157
158 } else {
159     Serial.println("Error en apertura de Archivo");
160     delay(2000);
161 }
162 }
```

ANEXO B: Código para el ajuste de la ecuación de Monod en sistema de matraz agitado

```
1 import numpy as np
2 from scipy.integrate import solve_ivp
3 from scipy.optimize import curve_fit
4 import matplotlib.pyplot as plt
5 import csv
6
7 # Modelo de fermentación: ecuaciones diferenciales
8 def fermentation_model(t, y, params):
9     X, S = y
10    mu_max, K_s, Y_XS = params # Solo ajustamos 3 parámetros
11    # Tasa de crecimiento
12    mu = mu_max * S / (K_s + S)
13    # Ecuaciones diferenciales
14    dX_dt = mu * X
15    dS_dt = -1 / Y_XS * dX_dt
16    return [dX_dt, dS_dt]
17
18 # Resolver el modelo de fermentación
19 def solve_model(params, t_exp):
20    # Condiciones iniciales (ajustar según tu sistema)
21    X0 = 0.15
22    S0 = 10.0
23    y0 = [X0, S0]
24
25    # Resolver las ecuaciones diferenciales
26    sol = solve_ivp(fermentation_model, [t_exp[0], t_exp[-1]], y0, t_eval=t_exp, args=(params,))
27    return sol.y
28
29 # Datos experimentales
30 t_exp = np.array([0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]) # Tiempo (h)
31 X_exp = np.array([0.15, 0.17, 0.25, 0.52, 0.99, 1.53, 1.8, 1.9, 2, 1.975]) # Biomasa (g/L)
32 S_exp = np.array([10.0, 8.673, 8.755, 7.384, 5.564, 3.27, 1.5, 0.78, 0.345, 0.267]) # Sustrato (g/L)
33
34 data_exp = np.array([X_exp, S_exp])
35
36 # Establecer un valor inicial para los parámetros
37 initial_guess = [0.63, 2, 0.2] # Solo para mu_max, K_s y Y_XS
38
39 # Ajuste de parámetros utilizando curve_fit
40 params_opt, _ = curve_fit(lambda t, *params: solve_model(params, t)[0], t_exp, X_exp, p0=initial_guess)
41
42 # Resultados de los parámetros ajustados
43 print("Parámetros óptimos:", params_opt)
44
45 # Resolver el modelo con los parámetros óptimos
46 X_pred, S_pred = solve_model(params_opt, t_exp)
47
48 # Guardar los datos en un archivo CSV
49 output_file = "fermentation_data.csv"
50 with open(output_file, mode='w', newline='') as file:
51     writer = csv.writer(file)
52     writer.writerow(["Tiempo (h)", "Biomasa Experimental (X)", "Biomasa Ajustada", "Sustrato Experimental (S)", "Sustrato Ajustado"])
53     for i in range(len(t_exp)):
54         writer.writerow([t_exp[i], X_exp[i], X_pred[i], S_exp[i], S_pred[i]])
55
56 print(f"Datos guardados en {output_file}")
57
58 # Graficar los resultados
59 plt.plot(t_exp, X_exp, 'ro', label='Biomasa experimental (X)')
60 plt.plot(t_exp, X_pred, 'r-', label='Biomasa ajustada')
61 plt.plot(t_exp, S_exp, 'go', label='Sustrato experimental (S)')
62 plt.plot(t_exp, S_pred, 'g-', label='Sustrato ajustado')
63 plt.xlabel('Tiempo (h)')
64 plt.ylabel('Concentración (g/L)')
65 plt.legend()
66 plt.title('Ajuste del modelo de fermentación')
67 plt.grid()
68 plt.show()
69
```

ANEXO C: Código para el ajuste de la ecuación de Monod, Consumo de sustrato y balance de oxígeno:

```

1  % ----- Script Principal -----
2  % Datos experimentales
3  t_exp = [0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]; % Tiempo (d)
4  X_exp = [0.15, 0.31, 0.98, 2.972, 7.8, 11.691, 11.684, 11.509, 11.35]; % Biomasa (g/L)
5  S_exp = [40, 39.27, 37.01, 30.29, 13.93, 0.45, 0.1, 0.1, 0.1]; % Sustrato (g/L)
6  O_exp = [6, 6.7, 6.2, 5.782, 4.63, 5.2, 5.3, 5.2, 5.1] / 1000; % Oxígeno (g/L)
7  data_exp = [X_exp; S_exp; O_exp];
8
9  % Parámetros iniciales
10 initial_guess = [1.5, 6, 0.3, 0.05, 20, 70, 0.00002]; % [mu_max, K_s, Y_XS, m_s, Y_XO, k_La, m_O]
11
12 % Ajuste de parámetros
13 options = optimoptions('lsqnonlin', 'Display', 'iter');
14 params_opt = lsqnonlin(@params objective_function(params, t_exp, data_exp), ...
15     initial_guess, [], [], options);
16
17 % Mostrar parámetros ajustados
18 disp('Parámetros óptimos:');
19 disp(params_opt);
20
21 % Resolver el modelo con los parámetros óptimos
22 sol = solve_model(params_opt, t_exp);
23
24 % Crear la tabla con los datos de ajuste
25 adjusted_data = [t_exp', sol(1, :)', sol(2, :)', sol(3, :)]; % Tiempo, Biomasa, Sustrato, Oxígeno
26 adjusted_table = table(adjusted_data(:,1), adjusted_data(:,2), adjusted_data(:,3), adjusted_data(:,4), ...
27     'VariableNames', {'Tiempo (h)', 'Biomasa ajustada (X)', 'Sustrato ajustado (S)', 'Oxígeno ajustado (O)'});
28
29 % Mostrar la tabla en la ventana de comandos
30 disp(adjusted_table);
31
32 % Graficar resultados
33 figure;
34 plot(t_exp, X_exp, 'ro', 'DisplayName', 'Biomasa experimental (X)');
35 hold on;
36 plot(t_exp, sol(1, :), 'r-', 'DisplayName', 'Biomasa ajustada');
37 plot(t_exp, S_exp, 'go', 'DisplayName', 'Sustrato experimental (S)');
38 plot(t_exp, sol(2, :), 'g-', 'DisplayName', 'Sustrato ajustado');
39 plot(t_exp, O_exp, 'bo', 'DisplayName', 'Oxígeno experimental (O)');
40 plot(t_exp, sol(3, :), 'b-', 'DisplayName', 'Oxígeno ajustado');
41 xlabel('Tiempo (d)');
42 ylabel('Concentración (g/L)');
43 title('Ajuste del modelo de fermentación');
44 legend show;
45 grid on;
46
47 % ----- Funciones Locales -----
48
49 function dydt = fermentation_model(t, y, params)
50 % Modelo de fermentación
51 X = y(1); % Biomasa
52 S = y(2); % Sustrato
53 O = y(3); % Oxígeno
54 mu_max = params(1);
55 K_s = params(2);
56 Y_XS = params(3);
57 m_s = params(4);
58 Y_XO = params(5);
59 k_La = params(6);
60 m_O = params(7);
61 K_o = 0.001; % Constante de saturación del oxígeno
62 O_sat = 8.0 / 1000; % Saturación de oxígeno (g/L)
63

```

```

64     % Ecuaciones diferenciales con dependencia del oxígeno
65     mu = mu_max * (S / (K_s + S)) * (O / (K_o + O)); % Tasa de crecimiento
66     dX_dt = mu * X; % Crecimiento de biomasa
67     dS_dt = -(1 / Y_XS) * dX_dt - m_s * X; % Consumo de sustrato
68     dO_dt = k_La * (O_sat - O) - (1 / Y_XO) * mu * X - m_o * X; % Balance de oxígeno con m_o X
69
70     dydt = [dX_dt; dS_dt; dO_dt];
71     end
72
73     function sol = solve_model(params, t_exp)
74         % Resolver el modelo de fermentación
75         X0 = 0.15; % Condición inicial de biomasa
76         S0 = 40.0; % Condición inicial de sustrato
77         O0 = 6.0 / 1000; % Condición inicial de oxígeno (g/L)
78         y0 = [X0, S0, O0];
79
80         % Resolver el sistema de ecuaciones diferenciales
81         [~, Y] = ode45(@(t, y) fermentation_model(t, y, params), t_exp, y0);
82         sol = Y';
83     end
84
85     function residuals = objective_function(params, t_exp, data_exp)
86         % Función objetivo para la optimización
87         sol = solve_model(params, t_exp);
88         X_pred = sol(1, :);
89         S_pred = sol(2, :);
90         O_pred = sol(3, :);
91
92         % Calcular residuos al cuadrado
93         residuals = [(data_exp(1, :) - X_pred).^2, ...
94                     (data_exp(2, :) - S_pred).^2, ...
95                     (data_exp(3, :) - O_pred).^2];
96     end

```

ANEXO D: Código biorreactor batch

```
1  |//BIORREACTOR
2  |// 18/06/2024
3  |#include <Wire.h>
4  |#include <LiquidCrystal_I2C.h>
5  |#include <max6675.h>
6  |#include <AccelStepper.h>
7  |
8  |// Pines para sensores y actuadores
9  |const int pinPH = A0;
10 |const int pinAcido = 32;
11 |const int pinBase = 34;
12 |const int pinFria = 28;
13 |const int pinCaliente = 30;
14 |const int pinLedRojo = 26;
15 |const int pinLedVerde = 24;
16 |const int pinStep = 9; // Pin STEP del driver A4988 conectado al pin 3 de Arduino
17 |const int pinDir = 6;
18 |
19 |// Crea un objeto de tipo AccelStepper
20 |AccelStepper stepper(AccelStepper::DRIVER, pinStep, pinDir);
21 |
22 |// Pines para el sensor de temperatura tipo K con MAX6675
23 |const int pinSO = 3;
24 |const int pinCS = 4;
25 |const int pinSCK = 5;
26 |
27 |// Variables globales
28 |int start = 0;
29 |double setPointTemperatura = 0;
30 |double setPointPH = 0;
31 |double setPointDimmer = 0;
32 |unsigned long tiempoBombaAcido = 1000; // Milisegundos
33 |unsigned long tiempoBombaBase = 1000; // Milisegundos
```

```

34 unsigned long intervaloBombaPH = 60000; // Milisegundos
35 unsigned long ultimaActivacionBombaAcido = 0;
36 unsigned long ultimaActivacionBombaBase = 0;
37
38
39
40 LiquidCrystal_I2C lcd(0x27, 16, 2);
41 MAX6675 thermocouple(pinsCK, pinCS, pinsO);
42
43 unsigned long ultimaActualizacion = 0;
44 const unsigned long intervaloActualizacion = 10000; // Milisegundos
45
46
47 float calibration_value = 18.592; // Valor de calibración para el sensor de pH
48 int buffer_arr[10]; // Array para almacenar lecturas del sensor de pH
49 unsigned long ultimoTiempoLecturaPH = 0;
50 const unsigned long intervaloLecturaPH = 30000; // Intervalo de 30 segundos para leer pH
51
52 void setup() {
53     Serial.begin(9600);
54     pinMode(pinStep, OUTPUT);
55     pinMode(pinDir, OUTPUT);
56     pinMode(pinPH, INPUT);
57     pinMode(pinAcido, OUTPUT);
58     pinMode(pinBase, OUTPUT);
59     pinMode(pinFria, OUTPUT);
60     pinMode(pinCaliente, OUTPUT);
61     pinMode(pinLedRojo, OUTPUT);
62     pinMode(pinLedVerde, OUTPUT);
63
64     lcd.init();
65     lcd.backlight();
66     lcd.setCursor(0, 0);
67     lcd.print("Bienvenido!");
68     delay(2000);
69     lcd.clear();
70     digitalWrite(pinLedRojo, 1);
71
72     stepper.setMaxSpeed(1000); // Velocidad máxima en pasos por segundo
73     stepper.setAcceleration(800); // Aceleración en pasos por segundo^2
74 }
75
76 void loop() {
77     // Leer comandos desde la interfaz
78     if (Serial.available()) {
79
80         String datos = Serial.readStringUntil('\n');
81         char comando = datos.charAt(0);
82
83         if (comando == 'M') {
84             digitalWrite(pinLedVerde, 1);
85             digitalWrite(pinLedRojo, 0);
86             start = 1;
87         } else if (comando == 'N') {
88             digitalWrite(pinLedVerde, 0);
89             digitalWrite(pinLedRojo, 1);
90             start = 0;
91         } else {
92             analizarDatos(datos);
93         }
94     }
95 }

```

```

94     }
95   }
96   // Controlar dimmer
97   if (setPointDimmer > 0) {
98     controlarAgitacion(setPointDimmer);
99   }
100
101   // Medir temperatura y pH cada 5 segundos
102   if (millis() - ultimaActualizacion >= intervaloActualizacion) {
103     ultimaActualizacion = millis();
104     double temperatura = thermocouple.readCelsius();
105     double ph_act = leerPH();
106
107     actualizarLCD(temperatura, ph_act, setPointDimmer);
108
109     // Enviar datos a la interfaz C#
110     Serial.print(String(temperatura) + "," + String(ph_act) + "\n");
111
112     if (setPointTemperatura > 0) {
113       controlarTemperatura(temperatura);
114     }
115
116     if (setPointPH > 0) {
117       controlarPH(ph_act);
118     }
119   }
120
121 }
122 }
123
124
125 //-----//
126 void analizarDatos(String datos) {
127   if (start == 1) {
128     int indice1 = datos.indexOf(',');
129     int indice2 = datos.indexOf(',', indice1 + 1);
130
131     setPointTemperatura = datos.substring(0, indice1).toDouble();
132     setPointPH = datos.substring(indice1 + 1, indice2).toDouble();
133     setPointDimmer = datos.substring(indice2 + 1).toDouble();
134
135     mostrarSetPoints();
136   }
137 }
138 void mostrarSetPoints() {
139   if (start == 1) {
140     lcd.clear();
141     lcd.setCursor(0, 0);
142     lcd.print("SP Temp:");
143     lcd.print(setPointTemperatura);
144     lcd.setCursor(0, 1);
145     lcd.print("SP pH:");
146     lcd.print(setPointPH);
147     delay(2000);
148     lcd.clear();
149   }
150 }
151 void actualizarLCD(double temperatura, double ph, double velocidad) {

```

```

153 lcd.clear();
154 lcd.setCursor(0, 0);
155 lcd.print("T:");
156 lcd.print(temperatura);
157 lcd.print("C pH:");
158 lcd.print(ph);
159 lcd.setCursor(0, 1);
160 lcd.print("Vel:");
161 lcd.print(velocidad);
162 lcd.print("%");
163 }
164
165 double leerPH() {
166     for (int i = 0; i < 10; i++) {
167         buffer_arr[i] = analogRead(pinPH);
168         delay(30);
169     }
170
171     for (int i = 0; i < 9; i++) {
172         for (int j = i + 1; j < 10; j++) {
173             if (buffer_arr[i] > buffer_arr[j]) {
174                 int temp = buffer_arr[i];
175                 buffer_arr[i] = buffer_arr[j];
176                 buffer_arr[j] = temp;
177             }
178         }
179     }
180
181     unsigned long avgval = 0;
182     for (int i = 2; i < 8; i++) {

```

```

181 unsigned long avgval = 0;
182 for (int i = 2; i < 8; i++) {
183     avgval += buffer_arr[i];
184 }
185
186 float volt = (float)avgval * 5.0 / 1024 / 6;
187 float ph_act = 0.708*(pow( volt , 2)) - 12.07*volt + calibration_value;
188
189 return ph_act;
190 }
191 void controlarAgitacion(double setPointDimmer) {
192     if (start == 1) {
193
194         // Limita la velocidad dentro de un rango seguro (ajustar según las necesidades)
195         if (setPointDimmer > 0 && setPointDimmer <= 100) {
196             // Establece la nueva velocidad del motor
197             double velocidad = map(setPointDimmer, 0, 100, 0, 1000);
198             stepper.setSpeed(velocidad);
199         }
200     }
201
202     // Continúa moviendo el motor a la velocidad actual
203     stepper.runSpeed();
204
205     if (start == 0) {
206         stepper.setSpeed(0);
207     }
208 }}
209
210
211 void controlarTemperatura(double temperatura) {
212     if (start == 1) {
213         if (temperatura > setPointTemperatura) {
214             digitalWrite(pinFria, 1);
215             digitalWrite(pinCaliente, 0);
216         } else if (temperatura < setPointTemperatura) {
217             digitalWrite(pinFria, 0);
218             digitalWrite(pinCaliente, 1);
219         } if (start == 0) {
220             digitalWrite(pinFria, 0);
221             digitalWrite(pinCaliente, 0);
222         }
223     }
224 }
225 void controlarPH(double ph) {
226     if (start == 1) {
227         unsigned long tiempoActual = millis();
228
229         if (ph < setPointPH && tiempoActual - ultimaActivacionBombaAcido >= intervaloBombaPH) {
230             digitalWrite(pinAcido, 1);
231             delay(tiempoBombaAcido);
232             digitalWrite(pinAcido, 0);
233             ultimaActivacionBombaAcido = tiempoActual;
234         } else if (ph > setPointPH && tiempoActual - ultimaActivacionBombaBase >= intervaloBombaPH) {
235             digitalWrite(pinBase, 1);
236             delay(tiempoBombaBase);
237             digitalWrite(pinBase, 0);
238             ultimaActivacionBombaBase = tiempoActual;
239         }
240     } if (start == 0) {
241         digitalWrite(pinBase, 0);
242         digitalWrite(pinAcido, 0);

```