

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación de la producción de micelio de *Phanerochaete chrysosporium* y su potencial aplicación como materia prima en la industria textil

Trabajo de graduación presentado por Sofia Deyanira Batres Ardón  
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial

Guatemala,

2024



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación de la producción de micelio de *Phanerochaete chrysosporium* y su potencial aplicación como materia prima en la industria textil

Trabajo de graduación presentado por Sofia Deyanira Batres Ardón  
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial


Guatemala,

2024

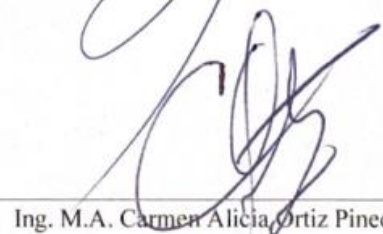
Vo.Bo.

(f)   
Ing. M.Sc. Luis Ernesto Núñez Gonzáles

Tribunal examinador:

(f)   
Ing. M.Sc. Luis Ernesto Núñez Gonzáles

(f)   
Ing. M.Sc. Gamaliel Zambrano Ruano

(f)   
Ing. M.A. Carmen Alicia Ortiz Pineda

Fecha de aprobación del examen de graduación:

Guatemala, 4 de enero de 2024

## PREFACIO

El presente trabajo es el resultado de dedicación, esfuerzo, compromiso y aprendizaje de 5 años de estudio. Agradezco el apoyo y amor de mis padres Eriberto y Mariela a quienes admiro y amo. Gracias por darme la oportunidad de superarme, creer en mí y enseñarme a luchar por lo que quiero. Agradezco a mi hermana Natalia por su apoyo, amor, por todas las madrugadas desvelándonos juntas haciendo tareas y por motivarme a ser la mejor versión de mí. A Cindy quien fue como una hermana mayor, su ausencia deja un vacío que nunca podrá ser llenado, pero su apoyo y amor siempre perdurarán en mi corazón. A mis gatitos Luca, Bella y Noah por acompañarme y volver mis momentos de agotamiento y estrés en alegría. Agradezco también a mis amigos en especial Frida, Gabriela y Zarina por ser mis compañeras durante este viaje en el cual hemos sufrido y gozado; gracias por alegrarme los días en la Universidad y por todo su cariño.

Agradezco incondicionalmente a mi asesor Ing. Luis Núñez por su acompañamiento, apoyo, paciencia y tiempo dedicado durante todos los años de carrera y asesoramiento de mi trabajo de graduación. Al Ing. Gamaliel Zambrano por su aprecio, confianza y brindarme las herramientas necesarias para mi formación académica. Finalmente agradezco a todos los que han sido parte de mi crecimiento y a Dios cuya bendición me ha permitido ser la persona que soy ahora.

# ÍNDICE

	Página
PREFACIO .....	v
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	2
III. JUSTIFICACIÓN .....	4
IV. OBJETIVOS .....	6
A. General .....	6
B. Específicos .....	6
V. MARCO TEÓRICO.....	7
A. Fibras textiles .....	7
B. Hongos .....	13
C. Biomateriales .....	22
VI. METODOLOGÍA.....	25
VII. RESULTADOS.....	38
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	48
IX. CONCLUSIONES .....	59
X. RECOMENDACIONES.....	60
XI. REFERENCIAS.....	61
XII. ANEXOS .....	65
A. Imágenes de experimentación.....	65
B. Datos originales .....	73
C. Cálculos de muestra .....	82
D. Datos calculados .....	87
E. Análisis de error .....	106
F. Especificaciones reactivos y equipo .....	109
G. Glosario.....	112

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Resumen de los valores de módulo de Young, tensión de rotura y porcentaje de elongación para distintas fibras y materias primas empleadas en la industria textil	12
Cuadro 2: Concentraciones de los reactivos a emplear para elaborar los medios de cultivo variando concentración de la fuente de carbono.	28
Cuadro 3: Concentraciones de los reactivos a emplear para elaborar los medios de cultivo variando concentración de la fuente de nitrógeno.	30
Cuadro 4: Concentraciones de los reactivos a emplear para elaborar los medios de cultivo para evaluar rendimientos en dos técnicas de cultivo.	32
Cuadro 5. Formulaciones desarrolladas, variando la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno, para la producción de micelio de <i>P.chrysosporium</i>	38
Cuadro 6. Concentraciones y rendimiento de formación de biomasa respecto a fuente de carbono y nitrógeno total en las 6 formulaciones realizadas.	38
Cuadro 7. Promedio y desviación estándar de curva de crecimiento empleando formulación final	42
Cuadro 8. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales realizados en el software Berkley Madonna para la producción de micelio de <i>P. chrysosporium</i> en un medio con 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína y 5 g/L peptona de carne	45
Cuadro 9. Concentraciones y rendimiento de formación de biomasa respecto a fuente de carbono y nitrógeno total empleando una fermentación por lotes y alimentada	47
Cuadro 11. Datos originales para curva de crecimiento en formulación inicial	73
Cuadro 12. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando la formulación 1 en triplicado.	73
Cuadro 13. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando la formulación 2 en triplicado.	74
Cuadro 14. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando la formulación 3 en triplicado.	74
Cuadro 15. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando la formulación 4 en triplicado.	75
Cuadro 16. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando la formulación 5 en triplicado.	75
Cuadro 17. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando la formulación 6 en triplicado.	76
Cuadro 18. Curva de crecimiento en formulación final en triplicado	76
Cuadro 19. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando fermentación por lotes.	78
Cuadro 20. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando fermentación alimentada.	78
Cuadro 21. Datos originales de las pruebas de tensión aplicadas a micelio en triplicado.	79

Cuadro 22. Datos originales de las pruebas de tensión aplicadas a micelio tratado con taninos	80
Cuadro 23. Datos originales de las pruebas de tensión aplicadas a micelio tratado con agar	81
Cuadro 24. Curva de crecimiento en formulación inicial	87
Cuadro 25. Azúcares fermentables y nitrógeno total consumido durante la formulación 1 en triplicado.	88
Cuadro 26. Azúcares fermentables y nitrógeno total consumido durante la formulación 2 en triplicado.	88
Cuadro 27. Azúcares fermentables y nitrógeno total consumido durante la formulación 3 en triplicado.	89
Cuadro 28. Análisis estadístico por prueba F para varianza de dos muestras para determinar si la varianza igual o desigual con significancia de 0.05, en las fermentaciones donde se varia la concentración de la fuente de carbono.	89
Cuadro 29. Análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias obtenidas en las fermentaciones donde se varia la concentración de la fuente de carbono para evaluar el efecto de estas sobre la producción de biomasa con significancia de 0.05.	90
Cuadro 30. Azúcares fermentables y nitrógeno total consumido durante la formulación 4 en triplicado.	90
Cuadro 31. Azúcares fermentables y nitrógeno total consumido durante la formulación 5 en triplicado.	91
Cuadro 32. Azúcares fermentables y nitrógeno total consumido durante la formulación 6 en triplicado.	91
Cuadro 33. Análisis estadístico por prueba F para varianza de dos muestras para determinar si la varianza igual o desigual con significancia de 0.05, en las fermentaciones donde se varia la concentración de la fuente de nitrógeno.	92
Cuadro 34. Análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias obtenidas en las fermentaciones donde se varia la concentración de la fuente de nitrógeno para evaluar el efecto de estas sobre la producción de biomasa con significancia de 0.05.	92
Cuadro 35. Análisis estadístico por prueba F para varianza de dos muestras para determinar si la varianza igual o desigual con significancia de 0.05, al emplear la formulación 1 y 5.	93
Cuadro 36. Análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias obtenidas en los rendimientos de las fermentaciones 1 y 5	93
Cuadro 37. Curva de crecimiento en formulación final en triplicado	94
Cuadro 38. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando fermentación por lotes.	95
Cuadro 39. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando fermentación alimentada.	96
Cuadro 40. Análisis estadístico por prueba F para varianza de dos muestras para determinar si la varianza igual o desigual con significancia de 0.05, al utilizar una fermentación por lotes y una alimentada en medio líquido.	96



Cuadro 41. Análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias obtenidas en las fermentaciones por lotes y alimentadas para evaluar el efecto de estas sobre la producción de biomasa con significancia de 0.05.	97
Cuadro 42. Pruebas de tensión aplicadas a micelio en triplicado corrida 1.	97
Cuadro 43. Pruebas de tensión aplicadas a micelio en triplicado corrida 2.	99
Cuadro 44. Pruebas de tensión aplicadas a micelio en triplicado corrida 3.	101
Cuadro 45. Pruebas de tensión aplicadas a micelio tratado con taninos	103
Cuadro 46. Pruebas de tensión aplicadas a micelio tratado con agar	104
Cuadro 47. Incubadora Lab Line Laboratorio Procesos Bioindustriales empleada para crecimiento del hongo en cajas Petri	109
Cuadro 48. Incubadora Laboratorio Procesos Bioindustriales empleada para crecimiento del hongo en los Erlenmeyers	109
Cuadro 49. Autoclave Laboratorio Procesos Bioindustriales empleada para esterilización de medios de cultivo	109
Cuadro 50. Colorímetro HACH y método cuantificación de Nitrógeno	109
Cuadro 51. Estufa empleada para preparación de medios	110
Cuadro 52. Campana de extracción empleada para preparación de inóculos	110
Cuadro 53. Balanza analítica empleada para pesaje de reactivos, biomasa, inóculo inicial.	110
Cuadro 54. Especificaciones HPLC del Laboratorio de Analítica Instrumental Avanzada	110
Cuadro 55. Reactivos empleados durante experimentación	111

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Reporte de la producción global de fibras para textiles producidas en 2020 (millones de toneladas +%).	7
Figura 2. Ejemplo de una curva de tensión-elongación.	9
Figura 3. Ejemplo de una curva de tensión-elongación al tener una rotura repentina.	9
Figura 4. Pruebas de tensión en textiles.	11
Figura 5. Representación esquemática de la estructura celular de los hongos	14
Figura 6. Representación esquemática de composición de la pared celular de los hongos.	15
Figura 7. Representación esquemática del metabolismo de los hongos	17
Figura 8. Representación esquemática del metabolismo central de los hongos	18
Figura 9. Crecimiento celular en función del tiempo.	20
Figura 10. Balance de masa global de la fermentación empleando la formulación 1 de medio de cultivo para la producción de micelio de <i>P. chrysosporium</i> .	39
Figura 11. Balance de masa global de la fermentación empleando la formulación 2 de medio de cultivo para la producción de micelio de <i>P. chrysosporium</i> .	40
Figura 12. Balance de masa global de la fermentación empleando la formulación 3 de medio de cultivo para la producción de micelio de <i>P. chrysosporium</i> .	40
Figura 13. Balance de masa global de la fermentación empleando la formulación 4 de medio de cultivo para la producción de micelio de <i>P. chrysosporium</i> .	40
Figura 14. Balance de masa global de la fermentación empleando la formulación 5 de medio de cultivo para la producción de micelio de <i>P. chrysosporium</i> .	41
Figura 15. Balance de masa global de la fermentación empleando la formulación 6 de medio de cultivo para la producción de micelio de <i>P. chrysosporium</i> .	41
Figura 16. Curva de crecimiento empleando formulación final	42
Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L $\text{ZnSO}_4$ . pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Las líneas representan una tendencia suavizada, los puntos corresponden a los datos experimentales.	42
Figura 17. Comportamiento de la formación de biomasa en el tiempo	43
Curvas de biomasa respecto al tiempo para determinar las fases de crecimiento. Las líneas representan una tendencia suavizada, los puntos corresponden a los datos experimentales.	43
Figura 18. Ajuste de datos experimentales, para la determinación de parámetros cinéticos de la producción de micelio de <i>P. chrysosporium</i> en un medio con 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína y 5 g/L peptona de carne, en el software Berkley Madonna.	46
Figura 19. Crecimiento del hongo en placa de agar PDA.	65
Figura 20. Crecimiento del hongo observado en microscopio	65
Figura 21. Medio de cultivo empleando peptona de carne, peptona de caseína y sacarosa	66
Figura 22. Curva de crecimiento inicial.	66
Figura 23. Fermentación de <i>P. chrysosporium</i> en medio de cultivo, variando la concentración de la fuente de carbono.	67
Figura 24. Fermentación de <i>P. chrysosporium</i> en medio de cultivo, variando la concentración de la fuente de nitrógeno.	67
Figura 25. Micelio de <i>P. chrysosporium</i> luego de filtrar del medio de fermentación.	68

Figura 26. Micelio de <i>P.chrysosporium</i> luego de 6 días de fermentación en medio de cultivo final.	69
Figura 27. Fermentación de <i>P.chrysosporium</i> en medio de cultivo con formulación final empleando técnica de cultivo por lotes.	69
Figura 28. Fermentación de <i>P.chrysosporium</i> en medio de cultivo con formulación final empleando técnica de cultivo alimentada.	70
Figura 29. Micelio de <i>P.chrysosporium</i> luego del tratamiento con taninos.	70
Figura 30. Micelio de <i>P.chrysosporium</i> luego del tratamiento con agar.	71
Figura 31. Pruebas de tensión a micelio de <i>P.chrysosporium</i> puro.	71
Elaboración propia	71
Figura 32. Pruebas de tensión a micelio de <i>P.chrysosporium</i> tratado con taninos.	72
Elaboración propia	72
Figura 33. Pruebas de tensión a micelio de <i>P.chrysosporium</i> tratado con agar.	72
Elaboración propia	72
Figura 34. Curva de crecimiento empleando formulación inicial	87
Figura 35. Tensión vs elongación del micelio sometido a pruebas de tensión corrida 1	98
Figura 36. Tensión vs elongación del micelio sometido a pruebas de tensión corrida 2	100
Figura 37. Tensión vs elongación del micelio sometido a pruebas de tensión corrida 3	102
Figura 38. Tensión vs elongación del micelio tratado con taninos sometido a pruebas de tensión	103
Figura 39. Tensión vs elongación del micelio tratado con agar sometido a pruebas de tensión	105

## RESUMEN

El micelio de hongo se está considerando como un posible material alternativo en la industria textil debido a sus propiedades y versatilidad. Debido a la reciente emergencia del tema, no se encontraron estudios precedentes realizados en Guatemala, que evalúen la producción de micelio en un medio de cultivo líquido y sus propiedades mecánicas. Por estas razones en el presente trabajo se evaluó el crecimiento de micelio de *P.chrysosporium* en un medio formulado con sacarosa y peptonas, al igual que su posible uso como materia prima en la industria textil mediante pruebas de tensión. Se determinó que la formulación que presenta el mayor rendimiento de producción de biomasa respecto a consumo de sustrato a pH 6.20, 100 rpm y 37°C es de 40 g/L de sacarosa, 5 g/L de peptona de carne, 5 g/L peptona de caseína, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ . Con esta formulación se obtuvo un modelo de Monod modificado que permite explicar los factores que influyen durante la fermentación y se analizó la técnica de fermentación por lotes y alimentada en donde se obtuvieron concentraciones de biomasa de  $4.615 \pm 1.071$  g/L y  $6.385 \pm 0.325$  g/L respectivamente. A pesar de que se obtuvo una mayor concentración en el cultivo alimentado, no se presenta una diferencia estadísticamente significativa respecto al cultivo por lotes. El módulo de Young, tensión de rotura y porcentaje de elongación máximo obtenido, luego de realizar pruebas de tensión al micelio puro y tratado, fue de 0.0037 GPa, 2.26 MPa y 57.5%, respectivamente.

## ABSTRACT

Fungal mycelium is being considered as a possible alternative material for the textile industry due to its properties and versatility. Due to recent emergence of the topic, no previous studies carried out in Guatemala were found, that evaluate the production of mycelium in a liquid culture medium and its mechanical properties. For these reasons, in the present work the growth of *P.chrysosporium* mycelium in a medium formulated with sucrose and peptones was evaluated, as well as its possible use as a raw material in the textile industry through tension tests. It was determined that the formulation that presents the highest biomass production yield with respect to substrate consumption at pH 6.20, 100 rpm and 37°C is 40 g/L of sucrose, 5 g/L of meat peptone, 5 g/L casein peptone, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. With this formulation, a modified Monod model was obtained that allows explaining the factors that influence during fermentation and a batch and fed fermentation technique was analyzed where biomass concentrations of 4.615 ± 1.071 g/L and 6.385 ± 0.325 g/L were obtained, respectively. Although a higher concentration was obtained in the fed culture, there is no statistically significant difference compared to the batch culture. The maximum Young's modulus, tensile strength and elongation percentage obtained, after performing tension tests on pure and treated mycelium, were 0.0037 GPa, 2.26 MPa and 57.5%, respectively.

# I. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental y creciente necesidad de implementar materiales en las industrias, que sustituyan los métodos de producción actuales y tengan un menor impacto negativo en el ambiente, han fomentado la utilización de microorganismos y fuentes biológicas en los procesos de manufactura. Un ejemplo de estos son los biomateriales, estos son productos que se elaboran a partir de biomasa o son sintetizados por sistemas biológicos, los cuales posteriormente se someten a distintos procesos que le otorgan valor. La utilización de micelio de hongo para la fabricación de biomateriales se está considerando como futura tecnología debido al rápido crecimiento y habilidad de crecer en medios poco costosos (Ellen Macarthur Foundation, 2017).

Los hongos son organismos eucariotas que se alimentan mediante la digestión enzimática de los nutrientes, estos pueden crecer en medios líquidos o sólidos media vez contengan las condiciones necesarias para su crecimiento. Comúnmente se utilizan medios sólidos elaborados a partir de residuos de la industria agrícola para la producción del micelio, pero estos presentan desventajas al momento de escalar la producción en reactores. Por lo tanto, la determinación de un medio en donde se promueva la producción de la biomasa y de fácil escalamiento es un tema de interés. La efectividad en la utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento del hongo dependerá del metabolismo y capacidad enzimática de cada especie (Carlile, Watkinson, & Gooday, 2001).

*Phanerochaete chrysosporium* es de los hongos más estudiados debido a su capacidad de degradar lignina, producción de enzimas y biorremediación (Kheiralla, El-Din, Malek, & Aziz, 2013). Actualmente se ha evaluado la implementación de micelio de *P. chrysosporium* para la elaboración de biomateriales, debido a las ventajas que representa en cuanto a rapidez de crecimiento y utilización de fuentes de carbono y nitrógeno accesibles (Saiz-Jimenez, 1983). En base a esto, en el presente trabajo de graduación se propuso la evaluación de la producción de *P. chrysosporium* en un medio líquido empleando sacarosa como fuente de carbono y peptonas como fuente de nitrógeno. La sacarosa representa una fuente rica de carbono y permite tener un entendimiento inicial de cómo se podría comportar el hongo ya sea con fuentes de carbono más complejas o derivadas de residuos de la industria o subproductos como melaza. Las peptonas representan una fuente de nitrógeno orgánica que permite simular las condiciones de crecimiento naturales de los hongos (McCoy, 2016).

Como se mencionó anteriormente la utilización de micelio de hongo para la fabricación de biomateriales se está considerando como futura tecnología para aplicarse en la industria, entre estas la textil pues es de las mayores contaminantes y el 70% de las emisiones que libera se atribuye al proceso de producción de las fibras y a la producción del textil a escala industrial, por consecuencia se busca implementar nuevas tecnologías que permitan disminuir el impacto en el ambiente (McKinsey & Company, 2020). A partir de esta potencial importancia en las siguientes secciones del informe se puede encontrar la evaluación de la producción de micelio de *Phanerochaete chrysosporium* para la elaboración de un material y un estudio que da a conocer su posible aplicación. En el apartado de metodología se puede encontrar a detalle las evaluaciones realizadas y las tablas de resultados obtenidos y análisis de resultados en las secciones correspondientes. Los apartados de anexos, marco teórico y antecedentes permiten completar la información y mejorar la comprensión del tema.

## II. ANTECEDENTES

La necesidad de implementar materiales sostenibles para la producción de textiles ha generado la investigación relacionada a la producción de materia prima utilizando microorganismos. La utilización de micelio de hongo para la fabricación de biomateriales se está considerando como futura tecnología que permita incorporarse en nuestro día a día. Para lograrlo, se requiere de experimentación relacionada a la producción de la biomasa para la elaboración del biomaterial e información sobre las propiedades de estos materiales y su aplicabilidad. Actualmente, la fabricación de material a partir de micelio de hongo se ha desarrollado sin una base experimental concisa y estandarizada. Estudios realizados se han enfocado en variar la especie de hongo, modificar el tipo de sustrato y experimentar con distintos post-tratamientos para determinar cómo estos factores afectan las propiedades del micelio. Investigaciones precedentes han centrado sus estudios principalmente en la utilización de hongos filamentosos del filo basidiomiceto debido a su rápido crecimiento y flexibilidad de adaptación a distintos de medios de cultivo.

Los sustratos más utilizados para el crecimiento de micelio son los subproductos o residuos que se obtienen de la agricultura entre estos se encuentran trigo, maíz, algodón, vaina de frijol, aserrín, etc. el hongo degrada la lignocelulosa presente en estos sustratos y crece entre las fibras de estos, generando un material compuesto. Bayer & McIntyre, 2016 inoculan el hongo *Pleurotus ostreatus* en un sustrato compuesto de papel reciclado, cascara de arroz, granos secos de destilería, fibra de coco y aserrín, en este concluyen que el hongo logra adherirse a la superficie y parte interior del sustrato generando una estructura sustrato-micelio (Bayer & McIntyre, 2016). Elsacker, 2021 utiliza *Trametes versicolor*, *Ganoderma resinaceum*, *Pleurotus salmoneo-stramineus* y *Schizophyllum commune* e inocula en cáñamo para determinar el porcentaje de colonización luego de 7 días de incubación. El hongo con el crecimiento más rápido fue *G. resinaceum* pues colonizó por completo el sustrato en 6 días, *T. versicolor* en el día 7 aún no había crecido por completo en el sustrato, *P. salmoneo-stramineus* y *S. commun* presentaron un tiempo de colonización del sustrato de 7 días (Elsacker, 2021).

En un estudio realizado por Raman et al, en 2022 crecen *Fomitella fraxinea* en un sustrato compuesto de cáscara de arroz y aserrín, luego de la producción del micelio, lo sumergen 48 horas en diferentes soluciones: 15% glicerol, 15 % etilenglicol y 20% polietilenglicol. El módulo de elasticidad del micelio sin tratamiento fue de 1.37 MPa, tensión de rotura de 1.4 MPa y una tasa de elongación de 4.59 MPa. Al tratar el micelio con una solución 15% de glicerol se obtuvo un módulo de Young de 1.18 MPa, tensión de rotura de 1.6 MPa y tasa de elongación de 69.7%. Al tratar el micelio con una solución 15% de etilenglicol se obtuvo un módulo de Young de 5.91 MPa, tensión de rotura de 37 MPa y tasa de elongación de 37.9%. El micelio que pasó 48 horas en una solución 20% de polietilenglicol obtuvo un módulo de Young de 1.16 MPa, tensión de rotura de 1.74 MPa y tasa de elongación de 29.29% (Raman, Kim, Kim, & Shin, 2022).

El micelio de hongo también puede desarrollarse en medio líquido, en donde se forman pellets que varían en tamaño dependiendo de la fuente de carbono y nitrógeno empleadas. Un estudio efectuado por Sinha et al, 2014 demostró que el tamaño de los pellets de *A.niger* aumentan al incrementar la concentración de sacarosa de 20 g/L a 60 g/L. Cho et al, demostró que las células de diferentes especies de hongos tienden a generar hifas largas al emplear un medio con sacarosa (El-Enshasy H. A., 2007).

Tambe, 2007 comprobó el crecimiento de *S. sinnamarinense* en diferentes fuentes de nitrógeno en donde se demostró que la cantidad de biomasa producida en arginina (12.9 mg), alanina (11.2 mg) y peptona (16.7 mg) luego de 30 días de incubación es mayor a la producida en amonio (7.2 mg), ácido glutámico (8.8 mg) y nitrato (4.2 mg); observándose el mayor rendimiento en un medio con peptona (Bechem, 2012). Dan Hung et al en 2019 cultivan *Codiceps militaris* en diferentes medios, obteniendo la mayor cantidad de micelio en una formulación con 30 g/L de glucosa, 1 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.7 g/L de MgSO<sub>4</sub> y 0.25 g/L FeSO<sub>4</sub>, 0. g/L vitamina B1, 6 g/L de peptona.

Como se mencionó anteriormente investigaciones precedentes han centrado sus estudios en la utilización de hongos basidiomicetos, estos en su mayoría producen un cuerpo fructífero que tiende a retardar la expansión de micelio en el sustrato. Un estudio realizado por Pelkmans, et al, 2017 modificaron genéticamente el hongo *S. commune* para silenciar las rutas encargadas de la producción de cuerpo fructífero de la especie, esto ocasionó un crecimiento tres veces más rápido del micelio respecto al de la cepa original (Jordi F. Pelkmans, 2017). No obstante, existen diversas cepas silvestres de hongos que ya carecen de estas rutas, no generan cuerpo fructífero y únicamente producen la extensión de sus hifas en el sustrato. Entre los hongos que tienen esta capacidad se encuentra *Phanerochaete chrysosporium*.

La mayoría de estudios empleando *P. chrysosporium* se centran en su utilización para la degradación de sustratos sólidos con el objetivo de producir y extraer enzimas lignocelulosicas o exopolisacáridos; también se ha evaluado su implementación en el área de biorremediación. Existen pocos antecedentes de la producción de biomateriales empleando dicha especie, entre estos el de Banerjee et al, 2018 en donde utilizan *Phanerochaete chrysosporium* para la producción de micelio en un medio líquido, luego de recolectar el micelio le colocan una solución de curcumina para otorgarle actividad antimicrobiana y lo emplearon como un parche cicatrizante para heridas (Banarjee, Paban, & Khamrai, 2018). Debido a la falta de estudios en donde se busque elaborar biomateriales a partir de micelio de *P. chrysosporium* en fermentaciones líquidas, es necesario realizar investigación en esta área.



### III. JUSTIFICACIÓN

La contaminación ambiental es un problema global y de continuo incremento, siendo la actividad humana, el principal factor responsable de esta. La industria textil juega un rol importante dentro del problema, pues es de las que mayor cantidad de gases de efecto invernadero genera. Un estudio demostró que la producción de textiles produce 1.2 mil millones de toneladas de CO<sub>2</sub> al año, lo que representa un 5% de la emisión global de gases de efecto invernadero y constituye un 20% de la contaminación del agua (Ellen Macarthur Foundation, 2017). Se espera que para el 2030 las emisiones aumenten a los 2.1 mil millones de toneladas de CO<sub>2</sub> al año (McKinsey & Company, 2020). Los textiles se dividen en fibras sintéticas, derivadas de animales, plantas y celulósicas. La mayor parte de los textiles se elaboran a partir de fibras sintéticas, a estas se les atribuye una gran parte de la contaminación, pues al lavarlas liberan microfibras. En el año 2017, se estimó que alrededor de medio millón de toneladas de microfibras fueron liberadas al océano y se espera que dentro de los siguientes 35 años se liberen 22 millones de toneladas (Ellen Macarthur Foundation, 2017).

La producción de fibras sintéticas emite 9.52 kilogramos de CO<sub>2</sub> por tonelada de fibra y requiere de 100-150 litros de agua por kilogramo de fibra. La producción de algodón para textiles emite 5.2 kilogramos de CO<sub>2</sub> por tonelada de fibra al año. El algodón a pesar de producir una huella de carbono menor al de las fibras sintéticas, requiere de grandes espacios de tierra para su cultivo, al igual que pesticidas, herbicidas y fertilizantes lo cual afecta los suelos, además para la producción de 1 kilogramo de algodón se requieren 10,000 litros de agua. La elaboración de cueros requiere de utilización de la tierra y deforestación generando 110 kilogramos de CO<sub>2</sub> por cada metro cubico de cuero y una huella hídrica de 103,950 litros (UNIDO, 2017) (Water Footprint, 2017) (Rana, Pichandi, Moorthy, & Bhattacharyya, 2015).

El 70% de las emisiones que libera la industria textil se atribuye al proceso de producción de las fibras y a la producción del textil a escala industrial, por consecuencia es de gran importancia implementar nuevos materiales para la producción de textiles (McKinsey & Company, 2020). Actualmente se han evaluado distintas estrategias para producir fibras a partir de sustratos que no requieran uso de suelos y no provengan de derivados de petróleo. Entre estas se encuentra la producción de fibras textiles a partir de micelio de hongo, pues es una alternativa natural y de rápido crecimiento. Existen diferentes empresas, entre estas Ecovative Desing, MycoWorks, Mylium, Mylo, etc. que trabajan con micelio de hongo, pero no hay reportes que demuestren la metodología detallada para la producción y tratamiento de estas fibras debido a que son procedimientos patentados. Actualmente se cultiva el micelio en medios sólidos, lo que genera periodos de incubación largos, poco control sobre el consumo de sustrato con el tiempo y condiciones de cultivo, dificultad para obtener el micelio puro y escalar el proceso.

Debido a la reciente emergencia del tema, no se encontraron estudios precedentes realizados en Guatemala, que planteen propuestas para la producción de micelio para la elaboración de biomateriales. Por dichas razones, la evaluación de un medio que favorezca el crecimiento de micelio, al igual que la determinación del rendimiento de producción de este, es indispensable para generar propuestas que a futuro permitan el planteamiento y escalamiento de procesos para la sustitución de las fibras convencionales y reducir el impacto ambiental generado por estas. Por estas razones en el presente trabajo se plantea un estudio que evalúa el crecimiento de micelio en un medio formulado con sacarosa y peptonas, se comparan los rendimientos obtenidos al modificar la concentración de los sustratos, se plantea un modelo cinético que permita explicar los factores que influyen durante la fermentación

y cómo se lleva a cabo el consumo de los sustratos con el tiempo y se compara la producción de biomasa al emplear dos métodos de cultivo. Asimismo, se evalúa el posible uso como materia prima en la industria textil, del micelio producido con el medio formulado, mediante pruebas de tensión. Este trabajo representa una investigación inicial, pues es un tema poco estudiado y analizado debido a la reciente implementación del uso de micelio en la industria.

## IV. OBJETIVOS

### A. General

Evaluar la producción de micelio de *Phanerochaete chrysosporium* y su potencial aplicación como materia prima en la industria textil empleando un cultivo in vitro.

### B. Específicos

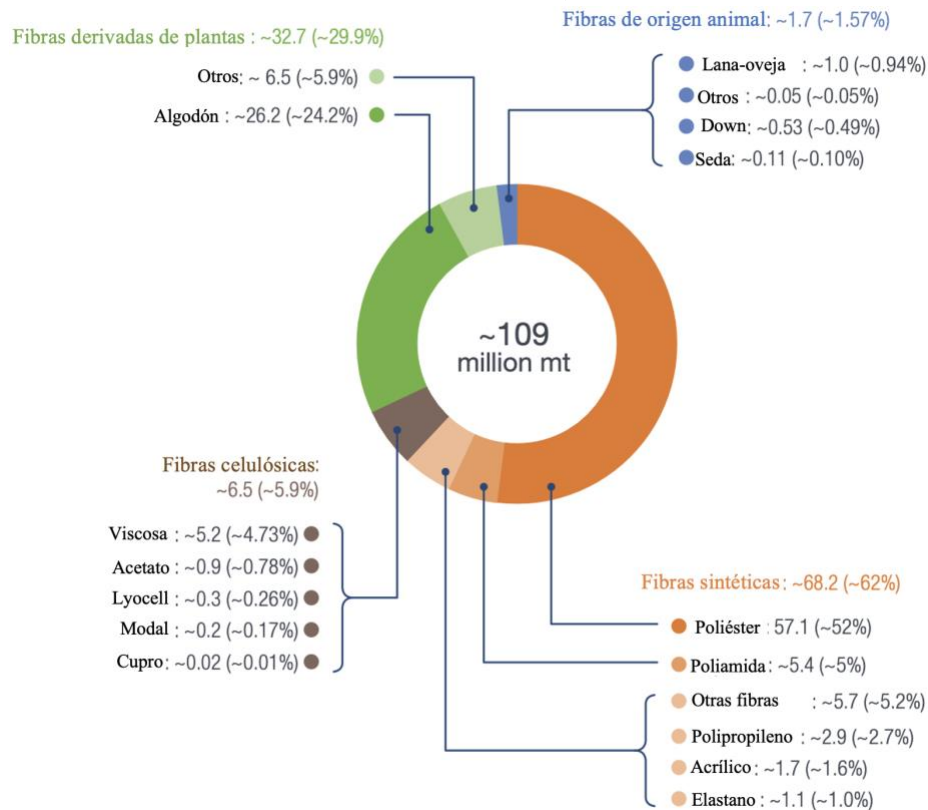
- Desarrollar medios de cultivo para la producción de micelio de *Phanerochaete chrysosporium* en una fermentación líquida empleando azúcar comercial como fuente de carbono.
- Evaluar la producción de micelio en las formulaciones realizadas para determinar la que mayor rendimiento presenta.
- Comparar la producción de micelio al utilizar una fermentación por lotes y una alimentada en medio líquido, para determinar la técnica que presenta mayor rendimiento.
- Evaluar propiedades mecánicas del micelio producido mediante pruebas de tensión para determinar su posible aplicación como materia prima en la industria textil.

## V. MARCO TEÓRICO

### A. Fibras textiles

Las fibras textiles se pueden clasificar en dos categorías: fibras naturales y manufacturadas. Dentro de la clasificación de las fibras naturales se encuentran las celulósicas (de origen vegetal), algodón, seda, lana, cuero (piel animal). Las fibras manufacturadas incluyen polímeros sintéticos como el acrílico, poliéster, polietileno, polipropileno provenientes de petróleo y fibras celulósicas como el acetato, viscosa, Lyocell, etc. las cuales provienen de la fuente natural (celulosa) pero pasan por un proceso químico de transformación (Burkinshaw, 2016). En el año 2020 el poliéster representó 52% de la producción global total de las fibras mencionadas anteriormente. El polipropileno representó un 2.7%, la poliamida (nylon) 5%, el acrílico 1.6% y el resto de las fibras sintéticas un 0.7% de la producción global. La demanda de algodón representó un 24.2% y las fibras elaboradas a partir de celulosa representaron un 5.9%. Los textiles derivados de animales como vacas y corderos (cuero) representaron 1.57% de la producción global de fibras (ir a Figura 1) (Textile Exchange, 2021).

Figura 1. Reporte de la producción global de fibras para textiles producidas en 2020 (millones de toneladas +%).



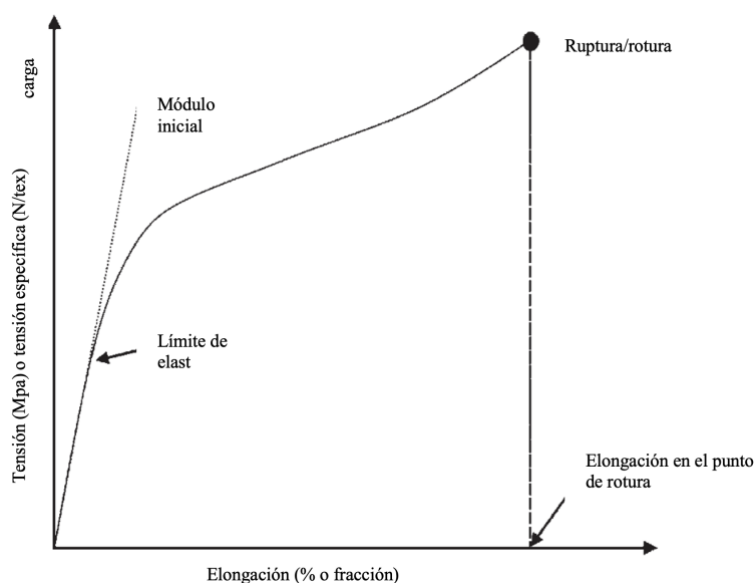
(Textile Exchange, 2021)

Las fibras tienen características químicas, visuales y mecánicas específicas las cuales les otorgan diferentes propiedades y un diverso rango de aplicaciones, las cuales se pueden determinar mediante pruebas. Los ensayos químicos se realizan al poner en contacto al material de interés con diferentes agentes químicos como ácidos, decolorantes, solventes e incluso agua para determinar si la fibra cambia de color o pierde sus propiedades químicas como la despolimerización o hidrólisis de los polímeros que la componen, cambio en la coloración o geometría molecular de la fibra. En la examinación visual se evalúa de forma cualitativa la textura, características de la superficie, patrones, estructura de las fibras, etc. esto se puede observar mediante microscopios o imágenes computarizadas. Las fibras también pueden ser evaluadas para determinar la sensación que estas generan al ser utilizadas como calor, frío, posibles alergias, etc. Igualmente se puede someter la fibra a distintas condiciones de humedad para determinar si es propensa a ser colonizada por microorganismos como hongos y bacterias o insectos y si esto fomenta el mal olor, decoloración o desgaste del material (Textile Institute, 2008).

## 1. Propiedades mecánicas de las fibras textiles

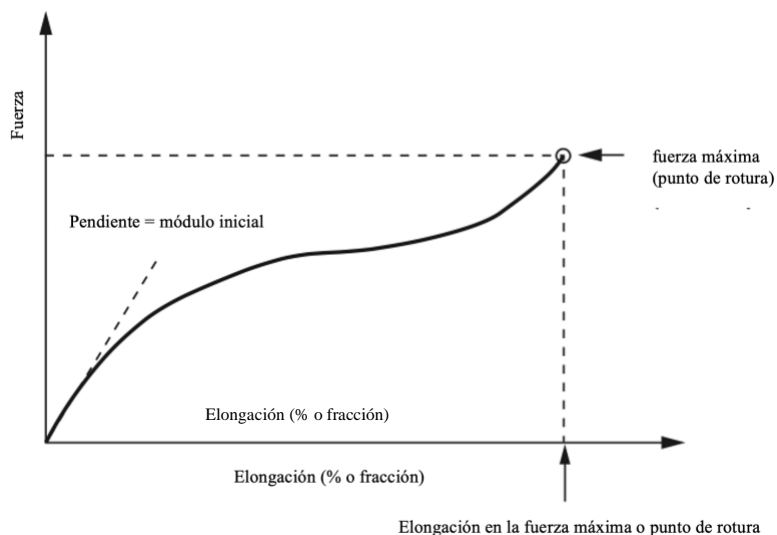
Las propiedades mecánicas representan la respuesta de las fibras a diferentes fuerzas de tensión, elongación, compresión, etc. La mayoría de estas se determinan utilizando curvas de tensión-deformación las cuales se obtienen de la aplicación de una fuerza hasta la deformación de la fibra. La fuerza de elongación se aplica de forma constante y a una velocidad controlada hasta el punto de rotura. La fuerza se expresa en Newton (N) o se puede expresar en función de la presión (fuerza/área transversal) que se aplica a la fibra y la elongación en centímetros (cm) o en porcentaje de deformación. Algunas fibras no tienen un área definida o uniforme por lo que en lugar de expresar la fuerza de elongación en función de la presión se expresa en N/tex en donde tex representa el peso en gramos de 1000 metros de fibra. El resultado final de este tipo de pruebas es una curva como la que se observa en la Figura 2 (Burkinshaw, 2016). O como la Figura 3, en donde se tiene una rotura repentina o brusca. La fuerza máxima que soporta el material y la elongación dependerá específicamente del tipo, estructura y ángulos de unión entre las fibras del textil (Textile Institute, 2008).

Figura 2. Ejemplo de una curva de tensión-elongación.



(Burkinshaw, 2016)

Figura 3. Ejemplo de una curva de tensión-elongación al tener una rotura repentina.



(Textile Institute, 2008)

Se puede observar que la parte inicial de la curva representa una recta ascendente, esta se obtiene cuando se aplica una fuerza a la fibra, pero al dejar de aplicarla, regresa a su forma original. La pendiente de esta recta es el Módulo de Young, este indica la rigidez o elasticidad del material, mientras más grande es el Módulo de Young, más rígida (o menos elástica) es la fibra pues requiere de una mayor tensión para su deformación o tienen menores elongaciones en presencia de fuerzas o tensiones. Los materiales con un módulo de Young (también llamado módulo inicial) bajo son

materiales más blandos y tienden a presentar una mayor elongación antes de romperse (Textile Institute, 2008).

Luego de esta parte, se alcanza el límite elástico, en el cual si se somete la fibra a una tensión mayor no volverá a su forma original e incluso podrá romperse. Esta deformación no elástica se puede observar en la parte no lineal de la curva, las fibras textiles tienden a presentar una amplia región de deformación no elástica dando como resultado la ruptura de esta. Esta región se puede cuantificar con el alargamiento a la rotura (cambio en la longitud dividido longitud inicial, esta describe la deformación de la fibra bajo una presión o fuerza específica) o resistencia a la rotura (fuerza máxima utilizada para extender una fibra hasta la rotura de esta) (Burkinshaw, 2016). Las fibras naturales como el algodón y lana presentan tenacidades de 0.1-0.6 N/tex y las fibras sintéticas entre 0.4-0.6 N/tex. El algodón tiene un porcentaje de elongación de aproximadamente 6-10%, la lana entre 25-50% al igual que la mayoría de las fibras sintéticas. Las fibras de elastano tienen porcentajes de elongación superiores a 400%, lo que indica que soportan altas fuerzas de elongación sin deformarse permanentemente. Las fibras de nylon tienden a recuperar su forma original a mayor presión que las de poliéster (Burkinshaw, 2016).

El módulo de Young se calcula al tomar la tensión ( $\sigma$ ) y dividirla por la elongación o extensión por unidad de longitud ( $\epsilon$ ). Por lo que  $\sigma$  (N/mm<sup>2</sup> o MPa) es la fuerza en N que se aplica por unidad de área transversal de la muestra y  $\epsilon$  es la diferencia entre la longitud final del material (luego de la aplicación de la fuerza) y la longitud inicial dividido la longitud inicial.

Ecuación 1. Cálculo para determinar la tensión

$$\sigma = \frac{F (N)}{A (mm^2 \text{ o } m^2)}$$

F = fuerza

A = área transversal de la muestra

Ecuación 2. Cálculo para determinar la extensión por unidad de longitud

$$\epsilon = \frac{L_f - L_o}{L_o}$$

L<sub>f</sub> = Longitud luego de la aplicación de la fuerza al material

L<sub>o</sub> = Longitud del material antes de aplicar la fuerza

Ecuación 3. Cálculo para determinar el Módulo de Young

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

$\sigma$  = tensión (N/mm<sup>2</sup> o N/m<sup>2</sup>)

$\epsilon$  = extensión por unidad de longitud

La tensión de rotura es la máxima tensión que un material puede soportar antes de presentar una rotura o romperse por completo, esta se determina empleando la ecuación 1. El porcentaje de elongación de una fibra o material representa la deformación en forma de estiramiento que se presenta antes de una rotura se determina empleando la ecuación 2 y multiplicando por cien, para tener el porcentaje. Estas propiedades mecánicas permiten determinar las características físicas del material importantes para establecer el uso y los procesos a los que se debe someter para que alcance las características deseadas. La determinación de estas permite tener un control de los procesos de producción y costos para que el producto presente el estándar de calidad necesarios satisfacer a los consumidores y para desarrollar mejoras mediante investigación. Igualmente permite seleccionar la materia prima, pues esta se puede transformar mediante procedimientos químicos para llegar a las características necesarias; si la materia prima no permite que se llegue a los estándares deseados, se busca implementar nuevos materiales que permitan producir los resultados esperados.

Existen pruebas estandarizadas creadas por empresas como ASTM, AATCC, ISO etc. las cuales permiten determinar las características mecánicas, químicas y demás con el objetivo de brindar un marco de calidad que, sí se cumple, permite la comercialización e innovación de los materiales. Algunos ejemplos son ISO 139334-1:1999, ASTM D5035-95, AS 2001.2.3.1-2001, en las cuales se miden las propiedades de tensión de los textiles mediante la aplicación de distintas fuerzas de tensión hasta obtener la máxima elongación del material. En estas normativas se listan las dimensiones que debe tener el material a estudiar, porcentaje de humedad, condiciones ambientales del laboratorio en donde se realizan las pruebas, y cómo se debe configurar la máquina con la que se hacen los ensayos. El método más empleado para la determinación de la tensión de rotura y elongación es en donde se sujeta todo el ancho de la muestra tanto de la parte superior como inferior con una mordaza u otra herramienta sujetadora que sea por lo menos 1 cm más ancha que la muestra a sostener (ir a Figura 4) (ASTM D5035-06, 2008).

Figura 4. Pruebas de tensión en textiles.



(ZwickRoell, 2018)



El cuero presenta un amplio rango de módulos de Young, aproximadamente entre 20 a 100 MPa, pues depende de las características de la piel empleada como materia prima y el tratamiento que se le da (Mihai, Seul, Curteza, & Costea, 2022). Normalmente el cuero presenta un módulo de Young promedio de 45 MPa, tensión a la rotura de 25 MPa y porcentajes de elongación de 56% (Jones, Gandia, John, & Bismarck, 2020). La seda presenta un módulo entre 2- 20 GPa ( $2 \times 10^3$ - $2 \times 10^4$  MPa) (Ashby, Gibson, Wegst, & Olive, 1995). El algodón está compuesto por fibras de celulosa, el módulo de Young de las fibras de algodón se encuentra entre 5-13 GPa ( $5 \times 10^3$ - $13 \times 10^3$  MPa) (Serra A, 2019). El poliéster presenta un módulo de aproximadamente 2-4.4 GPa, tensión de rotura de 55-72 MPa y entre 50-300% de elongación (Gungor Gunduz & Akka, 2005), el polipropileno de 1.1 a 2 GPa (1000-2000 MPa) con tensión de rotura entre 28-40 MPa y porcentajes de elongación de hasta el 700%, la poliamida de 1.5 a 4 GPa, con tensiones de rotura de 76-83 MPa y 300% de elongación; el acrílico con 3.5-4 GPa, tensión de rotura de 64 MPa y hasta 4% de elongación (SpecialChem, 2019) (Harper, 2000). Es importante resaltar que estos datos pueden variar dependiendo del tipo específico de poliéster, acrílico, poliamida, algodón y demás fibras se estén usando pues las características de estas pueden cambiar dependiendo del origen de la fibra, el tipo de tratamiento que se les otorga, las condiciones a las que son procesadas y el método con el que se determinan las propiedades.

Cuadro 1. Resumen de los valores de módulo de Young, tensión de rotura y porcentaje de elongación para distintas fibras y materias primas empleadas en la industria textil

Material	Módulo de Young (GPa)	$\sigma$ (MPa)	$\varepsilon$ (%)
Cuero	0.02 – 0.1	25	56
polipropileno	1.1 – 2.0	28-40	< 700
Poliamida (nylon)	1.5 – 4.0	76-83	< 300
Poliéster	2 – 4.4	55-72	< 300
Acrílico	3.5 – 4.0	64	4
Algodón	5.0 – 13.0	287-840	3-10
Seda	2.0 – 20.0	300-2000	10-20

$\sigma$ : tensión de rotura,  $\varepsilon$ : porcentaje de elongación.

Las materias primas tienen propiedades mecánicas las cuales se van modificando luego de los procesos que se realizan para la producción de los textiles a partir de las fibras. Fibras naturales como el algodón y seda vegetal únicamente deben pasar por procesos de secado, posteriormente se inicia el hilado y por último por máquinas tejedoras para formar las telas, entre estos procesos se agregan aclarantes, pigmentos, biocidas, retardantes de llama, agentes desinfectantes, repelentes de agua, etc. Las fibras sintéticas, al igual que el algodón, requieren de procesos de hilado y tejido,

estas deben someterse a más procesos los cuales incluyen calor o tratamientos químicos (con ftalato, por ejemplo) para otorgarles flexibilidad, elasticidad o mayor rigidez (Zipser, 2018). La piel de vaca, oveja o cualquier otro animal debe pasar inicialmente por eliminación de pelo con sulfuros y soluciones alcalinas, luego se somete a soluciones enzimáticas, desengrasantes, curtido con taninos vegetales o metales el cual sirve como biocida y otorga resistencia al cuero pues estos forman enlaces con los grupos carboxílicos de las fibras de colágeno, volviendo la piel en cuero al hacerlo más estable químicamente; por último se añaden aceites y tintes para evitar el agrietamiento del cuero y otorgarle un acabado que se acople a las necesidades (Covington, 2009).

## B. Hongos

Los hongos son organismos eucariotas que se alimentan mediante la digestión enzimática de los nutrientes que se encuentran en el medio en el que están creciendo y se reproducen mediante la formación de esporas. Se estima que existen alrededor de 6 millones de especies de hongos, de las cuales solo el 1.5% se han clasificado. El reino fungi se divide en siete filos: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota (McCoy, 2016).

Las primeras tres divisiones Chytridiomycota, Blastocladiomycota y Neocallimastigomycota comparten muchas similitudes, tienden a ser organismos unicelulares y cuentan con un flagelo que les permite movilizarse, por esta razón se encuentran normalmente en ambientes acuáticos. Las especies pertenecientes a estos filos son parásitos de bacterias y plantas. En la división Microsporidia se encuentran igualmente hongos unicelulares, estos se caracterizan por carecer de mitocondria y por consecuencia se ven obligados a parasitar diferentes animales como insectos, crustáceos, peces, humanos etc (McCoy, 2016).

Los Glomeromicetos son de los hongos terrestres más antiguos con fósiles de más de 450 millones de años. Las esporas forman agregados relaciones simbióticas con las raíces de las plantas y con sus extensiones micelares permiten el intercambio de azúcares y nutrientes. El hongo absorbe los nutrientes y agua del suelo, los transporta a las raíces de la planta y esta le otorga al hongo los azúcares producto de la fotosíntesis. El 75% de las especies descritas pertenecen a la división Ascomycota, estas son empleadas en la producción de cerveza, enzimas, pan y demás fermentaciones. Los géneros más estudiados de esta división son *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Saccharomycetes* y *Candida*, siendo de las especies más importantes la levadura *Saccharomices cerevisiae* y el hongo *Penicillium notatum* (McCoy, 2016).

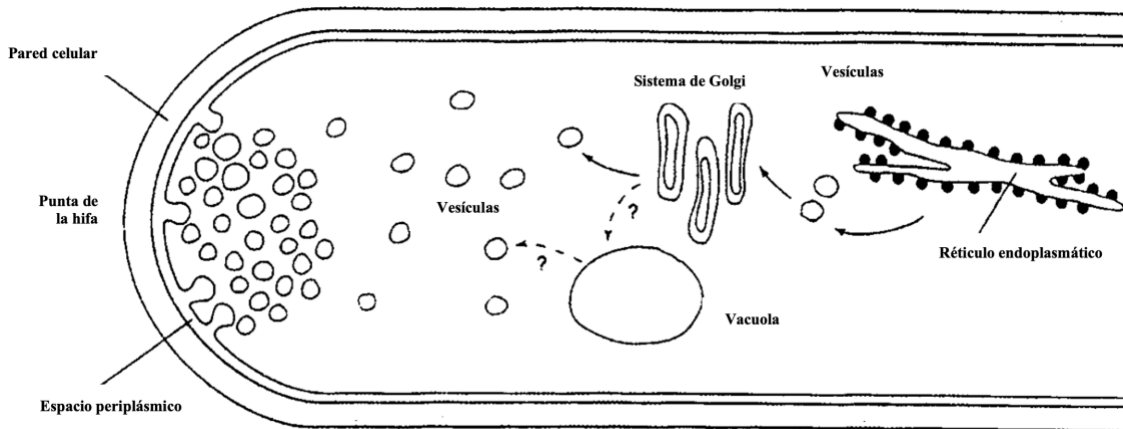
Los Basidiomicetos son los hongos que más han evolucionado, son reconocidos por la producción de cuerpo fructífero y por su uso en el área de alimentos y medicina. El ciclo de vida de un Basidiomiceto inicia con la germinación de una espora, esta forma hifas las cuales se van extendiendo hasta formar un micelio primario, este continúa alargándose hasta encontrar otro

micelio primario compatible, elaborado a partir de otra espora. Ambos micelios primarios se fusionan para formar un micelio secundario dicariótico (que contiene dos núcleos) (McCoy, 2016).

La división celular de los basidiomicetos ocurre cada 3 minutos y el micelio dicariótico continúa creciendo hasta que se agota el alimento o no hay espacio. Las puntas de las hifas de las especies pertenecientes a esta división se les llama basidium o basidio, dentro de estas los núcleos se fusionan para empezar el proceso de meiosis, mitosis y continuar el crecimiento del micelio (McCoy, 2016). Los géneros más estudiados de esta división son *Agaricus*, *Auricularia*, *Rhizopogon*, *Cantharellus*, *Ganoderma*, *Remispira*, *Polyporus*, *Trametes*, *Schizophyllum*, *Phanerochaete*, *Puccinia* y *Hemileia* (Carlile, Watkinson, & Gooday, 2001).

La estructura de la pared celular depende de la especie de hongo, dentro de esta se encuentran los organelos que permiten el proceso de crecimiento y reproducción del hongo como retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vacuolas, mitocondria, citoesqueleto compuesto de microfilamentos y microtúbulos, núcleo, citoplasma, etc. (Figura 5) (Money, 2016). La pared celular está compuesta de glicoproteínas, polisacáridos (beta-glucanos) y quitina, la cual se conforma a partir de cadenas de beta-1,4-N-acetilglucosamina. Estos compuestos se encuentran entrecruzados lo que permite la formación básica de la pared celular y otorgan tensión y solidez (Philipp Fesel, 2015).

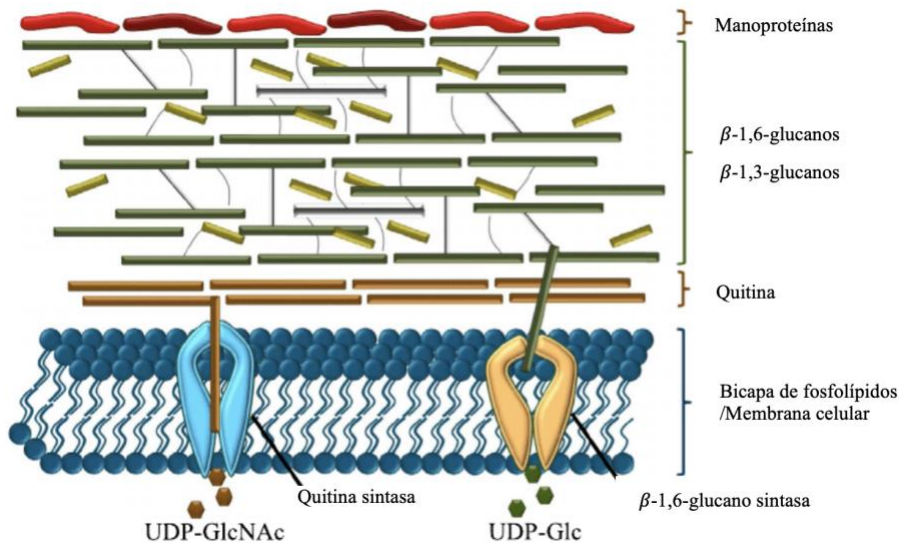
Figura 5. Representación esquemática de la estructura celular de los hongos



(El-Enshasy H. , 2007)

La quitina es un componente estructural que le concede rigidez a la pared celular, esta se sintetiza a partir de uridina difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) y representa entre 10 y 20% de la pared celular de los hongos (la cantidad puede ser mayor o menor dependiendo de la especie) (Philipp Fesel, 2015). La síntesis es controlada mediante la enzima quitina sintasa la cual transfiere residuos de N-acetilglucosamina a la cadena de quitina formada (Figura 6) (Bowman & Free, 2006).

Figura 6. Representación esquemática de composición de la pared celular de los hongos.



(Philipp Fesel, 2015)

Los glucanos constituyen un 50-60% de la pared celular siendo los beta-1,3-glucanos los más abundantes (entre 65-90%), el resto se divide en beta-1,6-glucanos, alfa-1,4-glucanos y alfa-1,3-glucanos, dependiendo la especie de hongo. El beta-1,3-glucano representa el componente estructural más importante y por consecuencia es necesario que se sintetice de forma correcta. Estos se forman mediante la acción de la enzima glucano sintasa la cual cataliza la formación de las cadenas de glucano a partir de residuos de glucosa provenientes de la molécula uridina difosfato glucosa (UDP-Glc) (Bowman & Free, 2006).

Las proteínas representan un 20-30% de la pared celular, la mayoría son glucoproteínas y suelen encontrarse en la parte exterior de la pared o entre las cadenas de quitina y glucanos, con ayuda de enlaces covalentes. La estructura de la glucoproteína varía entre especies, pero la más común es la manoproteína, estas se integran mediante procedimientos de N- y O-glicosilación los cuales ocurren en la membrana del retículo endoplasmático (Bowman & Free, 2006). Estos tres principales componentes forman enlaces covalentes y uniones enzimáticas entre sí para formar una matriz, la pared celular, esto permite representar una célula fúngica con la siguiente formulación  $C_{10}H_{17}O_6N$  (McCoy, 2016).

Las hifas se forman debido a la elongación de la pared celular, estas se van extendiendo y forman ramas las cuales se van interconectando para formar el micelio (Money, 2016). Las hifas se pueden propagar sobre una superficie líquida, lo que genera una capa de micelio en la interfase aire-líquido; penetrar un sustrato, lo que produce un compuesto sustrato-micelio; se pueden propagar sobre un sustrato mediante la utilización de hidrofobinas para producir una capa de micelio aéreo o formar pellets dentro de un medio líquido. Las hifas se continúan elongando hasta

que el sustrato se termina, no hay más espacio o se produzcan compuestos tóxicos para el hongo durante el consumo de los nutrientes (Carlile, Watkinson, & Gooday, 2001).

Los hongos pueden crecer en medios líquidos o sólidos media vez contengan las condiciones necesarias para su crecimiento. La fuente de carbón es importante, pues como se mencionó anteriormente la pared celular está compuesta principalmente por glucanos, cadenas de quitina y glucoproteínas, por lo que se requiere para la síntesis de estos. Los hongos pueden emplear la glucosa de forma eficiente pues tienen mecanismos activos para el transporte y utilización de esta, igualmente pueden utilizar disacáridos como maltosa, sacarosa o lactosa debido a la capacidad que tienen de realizar hidrólisis enzimática. La fuente de carbono también puede obtenerse de polisacáridos como almidón o celulosa, pues algunas especies producen amilasas o enzimas que permiten la degradación de lignina. Igualmente se pueden utilizar ácidos orgánicos, alcoholes y lípidos para la obtención de carbono. La efectividad en la utilización de cada una de estas fuentes dependerá del metabolismo y capacidad enzimática de cada especie (Carlile, Watkinson, & Gooday, 2001).

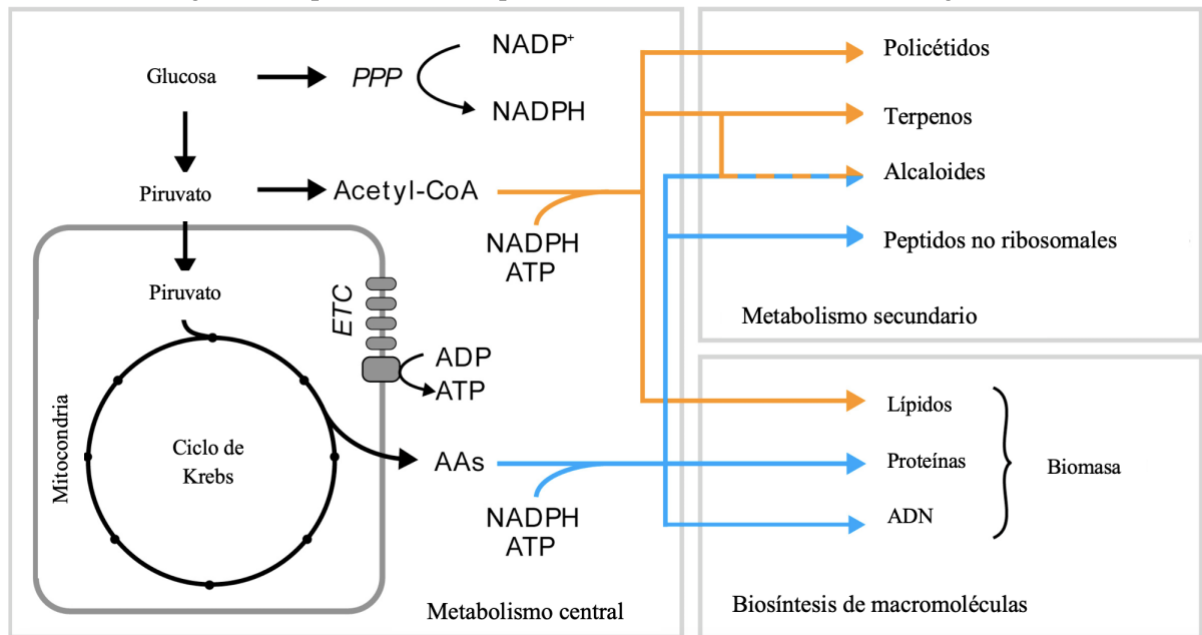
La fuente de nitrógeno puede obtenerse de nitratos, amonio, aminoácidos y amidas; pues extracelularmente se liberan nitrito reductasas y nitrato reductasas. Algunos hongos son incapaces de utilizar fuentes inorgánicas de nitrógeno por lo que se emplean fuentes orgánicas de este como los polipéptidos y proteínas los cuales se transportan dentro de la célula mediante péptido permeasas y luego son hidrolizadas por peptidasas. Los demás elementos azufre, fósforo, magnesio y potasio pueden ser proporcionados mediante la adición de sales como sulfato de magnesio y fosfato de potasio. Elementos como cobre, calcio, manganeso, zinc, etc. son incorporados para el correcto funcionamiento de enzimas que requieran de cofactores. El problema con la adición de estos oligoelementos es que en altas concentraciones pueden ser tóxicos para el hongo y no se conocen exactamente las cantidades necesarias para la mayoría de las especies (Carlile, Watkinson, & Gooday, 2001).

Los hongos pueden crecer a temperaturas entre 30-40°C y pH en un rango de 4-8. Estos se ven favorecidos en medios con una relación carbono:nitrógeno entre 40:1-60:1 para la correcta producción de polisacáridos extracelulares y formación de la pared celular (McCoy, 2016). Los hongos pueden crecer en cultivos estáticos líquidos en donde se crea un micelio en la interfase líquido-aire, este tiende a ser poco homogéneo y de lento crecimiento, pero permite la formación de un micelio bien estructurado. También se puede crecer en un medio con agitación lo que genera la formación de pellets esféricos de micelio, pues el movimiento ocasiona la fragmentación de las hifas (Carlile, Watkinson, & Gooday, 2001).

## 1. Metabolismo celular

Los hongos requieren de la utilización del sustrato para la generación de organelos internos, elongación de la pared celular, metabolismo celular central, secundario y síntesis de macromoléculas (Sato, Liu, Koc, & Tien, 2007).

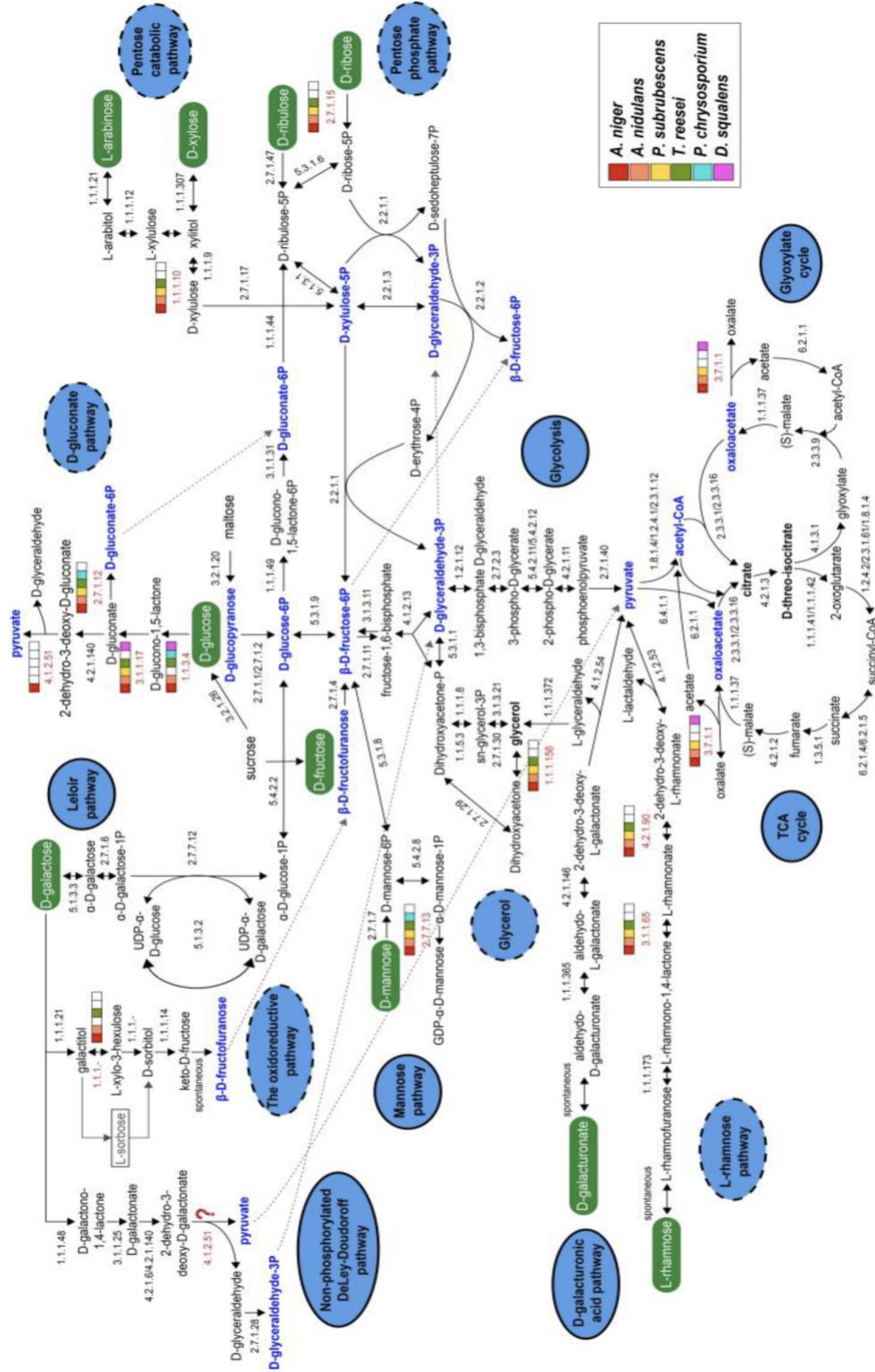
Figura 7. Representación esquemática del metabolismo de los hongos



(Nielsen, 2017)

El metabolismo de un hongo se puede dividir en metabolismo central en donde la glucosa es empleada para la producción de ATP y piruvato mediante la glucólisis; el piruvato se convierte en acetyl-CoA y permite la generación de metabolitos secundarios. Dentro de la mitocondria, con la ayuda de transportadores membranales, se inicia el ciclo de Krebs el cual permite generar oxalacetato, alfa cetoglutarato, succinil-CoA. Igualmente, en el metabolismo central se encuentra presente la cadena transportadora de electrones la cual permite generar energía para las células en forma de ATP y la ruta de las pentosas fosfato la cual permite generar desoxirribosa y ribosa a partir de glucosa. También está presente el metabolismo secundario en donde se generan péptidos, terpenos, policétidos y demás metabolitos secundarios. Por último, el metabolismo de producción de macromoléculas en donde se sintetizan carbohidratos, lípidos y proteínas a partir de los productos generados en el ciclo de Krebs y ADN que se sintetiza con los productos generados en la ruta de las pentosas fosfato (Nielsen, 2017).

Figura 8. Representación esquemática del metabolismo central de los hongos



(Li, 2022)

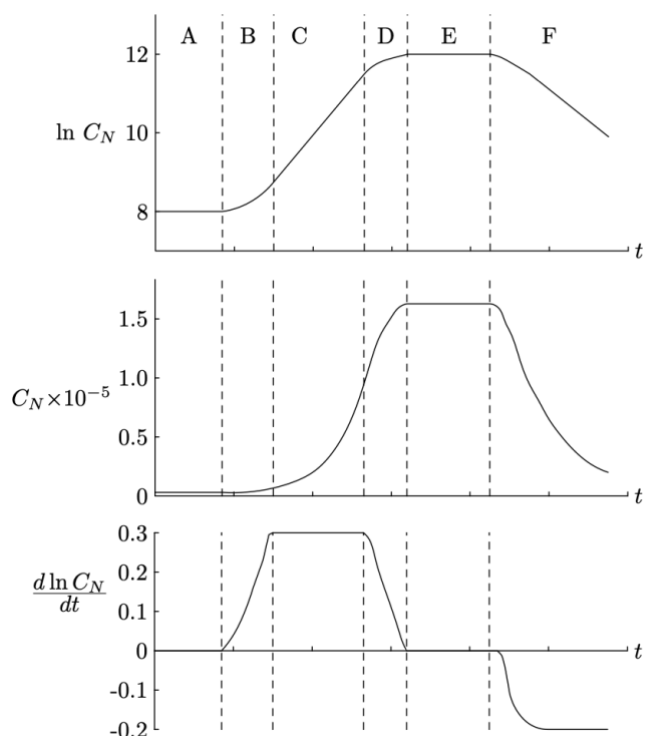
## 2. Crecimiento celular y cinética

El crecimiento de los hongos se puede explicar de forma general (ir a Figura 5), empleando cinética microbiana. En esta se analiza el crecimiento celular y el consumo o disponibilidad de sustrato en cada una de las etapas del metabolismo. Inicialmente se presenta la fase Lag o de retardo, en esta el inóculo inicial se ajusta al medio y condiciones de este en donde se generan los metabolitos necesarios (por ejemplo, enzimas) para la hidrólisis o metabolismo de los sustratos, para reducir el tiempo de esta fase se puede realizar una adaptación previa; la reproducción celular es mínima, pues estas únicamente crecen y producen los metabolitos necesarios (Lee, 2009).

Posteriormente ocurre una aceleración del crecimiento celular y se inicia la fase exponencial, en esta las células tienen un tiempo de duplicación constante y velocidad de crecimiento máximo, el sustrato se consume y se inicia una etapa de desaceleración en donde la velocidad de crecimiento disminuye al igual que el tiempo de duplicación. La siguiente fase es la estacionaria, en donde las células dejan de dividirse debido a la limitada concentración de nutrientes o la generación de inhibidores de crecimiento. Esta fase se ve afectada principalmente por el equilibrio de reacción, por último, se presenta la fase de muerte, en donde las células mueren debido a la falta de sustrato (Lee, 2009). Es importante resaltar que los gráficos mostrados en la Figura 9, representan modelos generales pero la forma de las curvas varía durante la experimentación debido a los distintos factores que afectan las fermentaciones. La selección del sustrato, temperatura, pH, previa adaptación al medio de cultivo, afectarán la tasa de crecimiento y velocidad, lo que ocasiona curvas de crecimiento con formas diferentes a las observadas en la Figura 5 (Lee, 2009).



Figura 9. Crecimiento celular en función del tiempo.



En el eje X se muestra la concentración celular, mientras el eje Y representa el tiempo. A representa la fase lag o de retardo, B la etapa de aceleración, C es la fase exponencial, D la desaceleración, E es la fase exponencial y F la muerte celular en donde la concentración disminuye debido a la disminución de la masa celular en consecuencia de la apoptosis. Los tres gráficos representan la misma curva, lo que varía es la forma en la que se interpreta la concentración celular, en el primer gráfico el eje Y es el logaritmo natural de la concentración celular, la segunda es la concentración celular que se obtiene a partir métodos de cuantificación celular y en la tercera se realiza un cambio de la concentración celular en el tiempo (Lee, 2009).

En cada etapa mencionada anteriormente se consume sustrato el cual se emplea en distintos procesos metabólicos como activación celular, mantenimiento, producción de metabolitos, crecimiento celular y desarrollo interno de las células para la formación de organelos y demás componentes celulares. Los rendimientos globales permiten determinar la relación entre la cantidad de biomasa formada respecto al sustrato consumido en un tiempo determinado, igualmente puede emplearse para relacionar la producción de productos y subproductos (Lee, 2009).

Los rendimientos se pueden definir mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 4. Rendimiento de la concentración de microorganismo o biomasa respecto al consumo de sustrato.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{S_f - S_i}$$

En donde:

$X_f$  = concentración final de biomasa luego de un tiempo determinado (g/L)

$X_i$  = concentración inicial de biomasa luego de un tiempo determinado (g/L)

$S_f$  = concentración final de sustrato luego de un tiempo determinado (g/L)

$S_i$  = concentración inicial de sustrato luego de un tiempo determinado (g/L)

El sustrato que se utiliza dependerá del analito que se esté evaluado, el cual puede ser la fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y cualquier otro componente involucrado en el crecimiento celular. Normalmente los rendimientos se determinan a partir del sustrato limitante el cual tiende a ser la fuente de carbono en la mayoría de los casos. El rendimiento también puede evaluarse a partir de la concentración de producto respecto a consumo de sustrato  $Y_{P/S}$  el cual se obtiene al modificar la ecuación 4, colocando el cambio en la concentración de producto en el numerador luego de un tiempo determinado (Lee, 2009).

El estudio de la cinética permite determinar expresiones matemáticas que relacionan el crecimiento microbiano, la formación de productos, mantenimiento celular, etc. con las distintas variables que influyen como la concentración de sustrato disponible, temperatura, pH, etc. La ecuación que permite definir el crecimiento microbiano es la siguiente.

Ecuación 5. Expresión de velocidad de crecimiento celular ( $r_x$ )

$$r_x = \frac{C_x}{dt} = \mu C_x$$

Donde la velocidad de crecimiento celular  $r_x$ , se puede expresar como la concentración celular ( $C_x$ ) en el tiempo o como la multiplicación de la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) con la concentración celular ( $C_x$ ). La tasa específica de crecimiento celular ( $\mu$ ) se puede definir empleando la ecuación 6.

Ecuación 6. tasa específica de crecimiento

$$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{K_s + S}$$

Donde la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ), se puede expresar como la velocidad de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) por la concentración de sustrato ( $S$ ) dividido la suma entre la concentración de sustrato ( $S$ ) y la constante de afinidad al sustrato ( $K_s$ ). Al ser mayor la  $K_s$ , el microorganismo será menos afín al sustrato y viceversa.  $\mu_{max}$  es la velocidad máxima a la que

puede crecer el microorganismo en condiciones de cultivo específicas, por lo que esta tiende a variar cuando se modifican las condiciones como: temperatura, especie de microorganismo, pH, tipo de sustrato o composición del medio (Castañeda, 2019).

## C. Biomateriales

Los biomateriales son productos que se elaboran a partir de biomasa o son sintetizados por sistemas biológicos, los cuales posteriormente se someten a distintos procesos que le otorgan valor. Los biomateriales surgen como una alternativa a los productos derivados de petróleo y se consideran más amigables con el medio ambiente, aunque esto depende de la fuente inicial de biomasa u organismo del que derive. Los biomateriales pueden categorizarse dependiendo de la biomasa de la que provienen (celulosa, hemicelulosa, quitina, almidón, lignina), del organismo que provienen (plantas, bacterias, hongos, animales) o respecto a su uso (químicos industriales, materiales de construcción, fibras para textiles, empaques, cosméticos, farmacéuticos, etc.) (Curran, 2010).

Los biomateriales más comunes y utilizados representan un amplio rango de productos como el papel, madera, cuero, lana, etc. actualmente se ha innovado en el área y se han implementado biomateriales derivados de microorganismos, como la producción de pigmentos, ácido poliláctico y polihidroxialcanoatos a partir de bacterias o la elaboración de productos a partir de la pared celular de los hongos. El uso de microorganismos representa una ventaja debido a su rápido crecimiento, bajo costo y versatilidad (Appels & Wösten, 2020).

### 1. Biomateriales elaborados con micelio de hongo

Los hongos pueden utilizarse para sustituir materiales de construcción, fibras para textiles y espumas sintéticas para empaque. Estos pueden producirse a partir de cultivos puros de hongo, en donde se utiliza únicamente el micelio, o mediante la utilización de residuos lignocelulósicos. Los hongos colonizan el sustrato y forman estructuras con sus hifas, estas pueden llegar a formar materiales con propiedades parecidas a espumas, polímeros y elastómeros. Actualmente los hongos pertenecientes a la división de basidiomicetos son los más utilizados en la producción de biomateriales debido al mecanismo de crecimiento de la hifa y pueden crecer en una amplia variedad de biomasa o sustratos. Alrededor de 36 especies de hongo han sido empleadas para la producción de biomateriales, entre estas *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma lucidum*, *Irpex Lacteus*, *Pleurotus djamor*, *Pleurotus ostreatus*, *Agarocybe aegerita*, *Lnetinula edodes*, *Polyporus alveolaris*, *Stereum ostrea*, *Phanerochaete sp* (Elsacker, 2021).

El tipo de material que se obtenga depende de las condiciones de crecimiento, el sustrato que se utilice para crecer al hongo, el método de cultivo y la especie del hongo. En un estudio evaluaron la producción de espuma para empaque a partir del crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en trigo. *Ganoderma Lucidum* se ha empleado para generar material de empaque a partir de su inoculación

en algodón o aserrín. Holt et al. (2012) utiliza *Ganoderma sp.* para la elaboración de un empaque, al que se le realizaron pruebas para evaluar las propiedades mecánicas y se logró demostrar que el material producido cumplía con las características de poliestireno (Holt, y otros, 2012). En otro estudio Travaglini et al. (2019), igualmente utilizan *Ganoderma Lucidum* para la producción de micelio en la elaboración de empaques. Mayoral et al. en 2016 utilizan el micelio de *Pleurotus Ostreatus* para la elaboración de material estructural para muebles (Mayoral & González, 2016). Banerjee et al. (2018) utilizan *Phanerochaete chrysosporium* para la producción de micelio en un medio líquido, luego de recolectar el micelio le agregaron curcumina para otorgarle actividad antimicrobiana y lo emplearon como un parche cicatrizante para heridas (Banerjee, Paban, & Khamrai, 2018).

Al cultivar los hongos en medio líquido se forma una película de biomasa (micelio) la cual puede separarse del medio mediante filtros o decantación y posteriormente se seca para desactivar el hongo y someterlo a tratamientos químicos que permitan mejorar las propiedades mecánicas del micelio. La empresa MycoWorks Inc. Utiliza una cepa de *Ganoderma Lucidum* para la producción de un material que funcione como un sustituto a cuero, la fibra producida con este hongo tiene una tensión de rotura de 5.6 a 12.5 MPa y porcentaje de elongación (alargamiento a la rotura) entre 16-80%. La compañía Ecovative Design LLCs, es de las pioneras en implementar micelio de hongo en la industria textil, el micelio se produce en un medio sólido en el cual crece como una espuma la cual se trata para su uso como textil, el producto finalizado tiene una tensión de rotura de 0.1-0.3 MPa y módulo de Young de 0.6-2.0 MPa. Mylea es un sustituto de cuero elaborado con micelio de hongo (*G. lucidum*), este tiene una tensión de rotura de 8-11 MPa y porcentaje de elongación de 22-35%. Otras especies empleadas para la producción de fibras son *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*, las fibras elaboradas a partir de micelio de hongo tienden a ser menos rígidas y más frágiles que el cuero, fibras celulósicas y fibras sintéticas, los cuales pueden llegar a tener tensiones de rotura de hasta 25 MPa y porcentajes de elongación de 60% (Jones, Gandia, John, & Bismarck, 2020).

En un estudio realizado por Freek Appels se analizan las propiedades mecánicas de micelio de *S. commune*. Al crecer el micelio en un medio líquido por 7 días de forma estática se obtiene un módulo de Young de 0.483-0.913 GPa y tensión de rotura de 5.1-9.6 MPa. El micelio tratado con 32% de solución de glicerol durante 24 horas presentó un módulo de Young de 0.003 GPa y tensión de rotura de 1.8 MPa. Se realizó una modificación genética al hongo *S. commune* en la cual suprimen la expresión del gen de hidrofobina SC3, la ausencia de esta proteína disminuye el cross-linking entre la quitina y los beta y alfa glucanos presentes en la pared celular del hongo. Este crosslinking reduce la movilidad del micelio lo que reduce la elasticidad, la delección del gen generó un micelio con un módulo de Young entre 1.237 y 2.727 GPa y tensión de rotura de 15.6-40.4 MPa (Appels F. V., 2020)

## 2. *Phanerochaete chrysosporium* para la producción de biomateriales

*Phanerochaete chrysosporium* es de los basidiomicetos más estudiados debido a su capacidad de degradar lignina, aplicaciones en la producción de enzimas y utilización para biorremediación de contaminantes contenido en productos industriales como: tintes para textiles, pesticidas, fertilizantes y absorción de metales como cobre, cadmio y níquel (Pacheco et al, 2015). *P. chrysosporium* es de rápido crecimiento, se ha demostrado que esta cepa es capaz de degradar el 90% del sustrato lignocelulósico en el que se encuentra en 2-3 meses, mientras que otras especies de la misma división degradan únicamente el 50% en el tiempo mencionado. La producción de este se ha llevado a cabo en medio sólidos y líquidos y representa una ventaja respecto a los demás hongos debido al fácil manejo de cultivo (Saiz-Jimenez, 1983).

*P. chrysosporium* requiere de una temperatura entre 35-40°C para su óptimo crecimiento y un pH entre 4-6. La lignina no es la fuente de carbono que utiliza para su crecimiento, pues la degradación de esta se realiza como un proceso secundario de su metabolismo, debido a la producción de enzimas especializadas en este proceso. *P. chrysosporium* requiere de una fuente de carbono como glucosa o fructosa para su correcto crecimiento (Saiz-Jimenez, 1983). Un estudio demostró que el mayor rendimiento de producción de micelio de *P. chrysosporium* se obtiene al emplear inóculos de suspensión de esporas en 50 mL de un medio el cual contenía fructosa 3% como fuente de carbono. Este basidiomiceto tiende a preferir fuentes orgánicas de nitrógeno y glucosa, fructosa y sacarosa como fuentes de carbono (Kheiralla, El-Din, Malek, & Aziz, 2013).

Como se mencionó anteriormente, los hongos más utilizados en la producción de biomateriales son *Ganoderma*, *Trametes* y *Pleurotus*. Actualmente se ha evaluado la implementación de micelio de *P. chrysosporium*, debido a las ventajas que representa en cuanto a rapidez de crecimiento y utilización de fuentes de carbono y nitrógeno accesibles. Un factor importante es que, la mayoría de los hongos empleados actualmente para la elaboración de biomateriales, producen cuerpos fructíferos, lo que ocasiona que la velocidad de expansión del micelio disminuya. *P. chrysosporium* no produce este cuerpo fructífero, por lo que toda la energía se concentra en la expansión horizontal del micelio y por consecuencia genera un micelio más amplio que el de los hongos mencionados anteriormente (Elsacker, 2021). Por estas razones, la producción de micelio de *P. chrysosporium* puede evaluarse para posteriormente escalarlo y producir biomateriales que se puedan aplicar a la industria.

## VI.METODOLOGÍA

### A. Preparación de inóculo

#### Material y equipo

- Caja madre de *Phanerochaete chrysosporium*
- 3 cajas Petri
- 1 asa microbiológica
- 3.5 gramos de Potato Dextrose Agar
- Cloro 10%
- Etanol 70%
- Balanza analítica
- Estufa
- 1 espátulas
- Papel aluminio
- 1 Erlenmeyer de 250 mL
- Mechero
- 1 probeta 100 mL
- Agitador magnético
- Autoclave
- Parafilm

#### Procedimiento

##### Medio sólido

1. Con una espátula y trozo de aluminio pesar 3.5 gramos de Potato Dextrose Agar en una balanza analítica.
2. Con una probeta de 100 mL verter 90 mL de agua destilada en un Erlenmeyer de 200 mL y agregar los 3.5 gramos de Potato Dextrose Agar previamente pesados.
3. Colocar un agitador magnético y situarlo en la estufa a 60 °C con agitación. Esperar a que la mezcla se homogenice y retirar el Erlenmeyer de la estufa.
4. Esterilizar el medio en una autoclave a 121 °C por 15 minutos.
5. Dejar enfriar el agar a 40°C, encender el mechero, verter 25-30 mL del medio en cada caja de Petri estéril, dejar que el medio solidifique.
6. Encender campana de extracción y limpiarla con una solución 10% de cloro y posteriormente con alcohol al 70%.
7. Encender un mechero, esterilizar el asa microbiológica y tomar una asada del cultivo de *Phanerochaete chrysosporium* de la caja madre, estriar una de las cajas de Petri con Potato Dextrose Agar e identificarlo.
8. Realizar el mismo procedimiento con las demás cajas Petri.
9. Incubar las placas a 39°C por 48 horas sin agitación.

B. Curva de crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* en un medio de cultivo a base de sacarosa y peptonas

Material y equipo

- Balanza analítica
  - 3 estufas
  - 3 espátulas
  - Papel aluminio
  - 800 mL de agua destilada
  - 1 Erlenmeyer de 1000 mL
  - 8 Erlenmeyer de 250 mL
  - Mechero
  - 1 probeta 1000 mL
  - 1 agitador magnético
  - Autoclave
  - Parafilm
  - Cinta testigo
  - Solución HCl 1M
  - Solución NaOH 1M
  - 60 g/L Sacarosa (azúcar comercial)
  - 5 g/L peptona de carne
  - 5 g/L peptona de caseína
  - 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - 0.3 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - 0.07 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1. Pesar con una espátula, las cantidades necesarias de los reactivos listados anteriormente para preparar 800 mL de solución.
  2. Agregar los reactivos pesados en un Erlenmeyer de 1000 mL y con una probeta de 1000 mL agregar 800 mL de agua destilada.
  3. Ajustar a pH 6 con solución NaOH 1M y HCl 1M utilizando pipeta de 10 mL.
  4. Colocar el Erlenmeyer con un agitador magnético en una estufa a 60 °C con agitación. Esperar a que la mezcla se homogenice y retirar de la estufa.
  5. Esterilizar el medio en una autoclave a 121 °C por 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.
  6. En 8 Erlenmeyer de 250 mL colocar 100 mL del medio, agregar 0.003 gramos de esporas raspando del medio sólido preparado en el inciso anterior, tapar con un trozo de aluminio, colocar cinta testigo e identificarlos (cada Erlenmeyer representa un día) incubar a 37°C y 100 rpm.

7. Luego de 24 horas de incubación tomar el Erlenmeyer identificado como día 1 filtrar micelio producido, quitar exceso de medio líquido retenido en el micelio y pesarlo en balanza analítica.
8. Tomar una muestra de 10 mL para analizar con HPLC (apartado H) el consumo de azúcares.
9. Secar el micelio con una prensa de calor por 30 segundos a 100 °C y pesar en balanza para determinar peso seco.
10. Realizar pasos 7-9 hasta completar los 8 días y elaborar una curva de formación de biomasa vs consumo de azúcares.

### C. Formulación de medio de cultivo variando la concentración de la fuente de carbono

#### Material y equipo

- Balanza analítica
- 3 estufas
- 3 espátulas
- Papel aluminio
- 1000 mL de agua destilada
- 3 Erlenmeyer de 500 mL
- 9 Erlenmeyer de 250 mL
- Mechero
- 1 probeta 1000 mL
- 3 agitadores magnéticos
- Autoclave
- Parafilm
- Cinta testigo
- Solución HCl 1M
- Solución NaOH 1M
- Sacarosa
- 5 g/L peptona de carne
- 5 g/L peptona de caseína
- 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0.3 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.07 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



### Procedimiento

1. Pesar con una espátula, las siguientes cantidades necesarias para preparar 300 mL de cada formulación de medio de cultivo variando la concentración de la fuente de carbono:

Cuadro 2: Concentraciones de los reactivos a emplear para elaborar los medios de cultivo variando concentración de la fuente de carbono.

<b>Reactivo</b>	<b>Formulación 1</b>	<b>Formulación 2</b>	<b>Formulación 3</b>
Sacarosa	40 g/L	60 g/L	80 g/L
Peptona de carne	5 g/L	5 g/L	5 g/L
Peptona de caseína	5 g/L	5 g/L	5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L	1 g/L	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.3 g/L	0.3 g/L	0.3 g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.07 g/L	0.07 g/L	0.07 g/L

2. Agregar los reactivos pesados en la formulación 1 en un Erlenmeyer de 500 mL y con una probeta de 500 mL agregar 300 mL de agua destilada.
3. Ajustar a pH 6 con solución de NaOH y HCl.
4. Repetir con las formulaciones 2 y 3.
5. Colocar los 3 Erlenmeyer con un agitador magnético en una estufa a 60 °C con agitación. Esperar a que la mezcla se homogenice y retirar cada Erlenmeyer de la estufa.
6. Esterilizar los 3 medios en una autoclave a 121 °C por 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.
7. Tomar 3 Erlenmeyer de 250 mL colocar 100 mL de la Formulación 1 en cada uno, tapar con un trozo de aluminio, colocar cinta testigo e identificarlos. Realizar el mismo procedimiento con las otras 2 formulaciones.

### D. Fermentación para la producción de micelio de hongo

#### Material y equipo

- Parafilm
- Campana de extracción
- Mechero
- Cloro 10%
- Etanol 70%
- 9 Erlenmeyer con las 3 formulaciones
- Inóculo en medio sólido preparado en la sección A

#### Procedimiento

1. Encender campana de extracción y limpiarla con una solución 10% de cloro y posteriormente con alcohol al 70%.
2. Encender un mechero y remover papel aluminio de los 3 Erlenmeyer con Formulación 1.
3. Tomar con un asa 0.003 gramos de esporas del medio sólido preparado en la sección A (con el asa formar un cuadro de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y raspar las esporas que se encuentran dentro de este).
4. Colocar el asa con las esporas dentro del Erlenmeyer con el medio y agitar hasta que todas se hayan desprendido en el medio.
5. Cubrir los Erlenmeyer con papel aluminio y Parafilm.
6. Incubar por 6 días a 37°C y 100 rpm.
7. Repetir el procedimiento para las formulaciones 2 y 3.

#### E. Evaluación del rendimiento de la producción de micelio

##### Material y equipo

- Balanza analítica
- Horno
- Papel absorbente
- Agua destilada

##### Procedimiento

1. Sacar las 3 fermentaciones con formulación 1 de la incubadora y filtrar el micelio de cada Erlenmeyer e identificar.
2. Quitar exceso de medio líquido retenido en el micelio y pesarlo en balanza analítica.
3. Secar el micelio con una prensa de calor por 30 segundos a 100 °C y pesar en balanza para determinar el peso seco.
4. Obtener un promedio y desviación estándar de gramos de micelio por litro de medio líquido del triplicado utilizando el software Microsoft Excel (Ver cuadros No.)
5. Tomar 2 muestras de 5 mL, centrifugar en Centrifuga Eppendorf 5804 R a 5000 rpm por 15 minutos, colocar en estufa a 60°C durante 10 minutos para inactivar el hongo y posteriormente analizar con HPLC y HACH (ir a apartado H).
6. Repetir el procedimiento con las 6 fermentaciones restantes, 3 de la formulación 2 y 3 de la formulación 3.
7. Seleccionar la concentración que presentó el mayor rendimiento.

## F. Formulación de medio de cultivo variando la concentración de la fuente de nitrógeno

### Material y equipo

- Balanza analítica
- 3 estufas
- 3 espátulas
- Papel aluminio
- 1000 mL de agua destilada
- 3 Erlenmeyer de 500 mL
- 9 Erlenmeyer de 250 mL
- Mechero
- 1 probeta 500 mL
- 3 agitadores magnéticos
- Autoclave
- Parafilm
- Cinta testigo
- Solución HCl 1M
- Solución NaOH 1M
- Sacarosa
- Peptona de carne
- Peptona de caseína
- 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0.3 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.07 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

### Procedimiento

1. Pesar con una espátula, las siguientes cantidades necesarias para preparar 300 mL de cada formulación de medio de cultivo variando la concentración de la fuente de nitrógeno:

Cuadro 3: Concentraciones de los reactivos a emplear para elaborar los medios de cultivo variando concentración de la fuente de nitrógeno.

Reactivo	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
Sacarosa	Concentración que presentó mayor rendimiento		
Peptona de carne	2.5 g/L	5 g/L	10 g/L
Peptona de caseína	2.5 g/L	5 g/L	10 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g/L	1 g/L	1 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g/L	0.3 g/L	0.3 g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.07 g/L	0.07 g/L	0.07 g/L

2. Agregar los reactivos pesados en la formulación 1 en un Erlenmeyer de 500 mL y con una probeta de 500 mL agregar 300 mL de agua destilada.
3. Ajustar a pH 6 con solución de NaOH y HCl.
4. Repetir con las formulaciones 2 y 3.
5. Colocar los 3 Erlenmeyer con un agitador magnético en una estufa a 60 °C con agitación. Esperar a que la mezcla se homogenice y retirar cada Erlenmeyer de la estufa.
6. Esterilizar los 3 medios en una autoclave a 121 °C por 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.
7. Tomar 3 Erlenmeyer de 250 mL colocar 100 mL de la Formulación 1 en cada uno, tapar con un trozo de aluminio, colocar cinta testigo e identificarlos. Realizar el mismo procedimiento con las otras 2 formulaciones empleando 3 Erlenmeyer para cada una.
8. Realizar procedimientos de sección D y E.

G. Rendimiento de la producción de micelio al utilizar una fermentación por lotes y una alimentada en medio líquido

Material y equipo

- Balanza analítica
- 2 estufas
- 2 espátulas
- Papel aluminio
- 3000 mL de agua destilada
- 3 Erlenmeyer de 2000 mL
- 6 bandejas de plástico
- Mechero
- 1 probeta 1000 mL
- 3 agitadores magnéticos
- Autoclave
- Cinta testigo
- Sacarosa
- Peptona de carne
- Peptona de caseína
- 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0.3 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.07 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

## Procedimiento

1. Elaborar una curva de crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* con el medio empleando las concentraciones de sacarosa y peptona de carne y caseína que presentaron mayor rendimiento, para tener un control del consumo de azúcares y crecimiento del micelio, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado B.

## Fermentación por lotes

2. Pesar con una espátula, las siguientes cantidades necesarias para preparar 500 mL de medio de cultivo

Cuadro 4: Concentraciones de los reactivos a emplear para elaborar los medios de cultivo para evaluar rendimientos en dos técnicas de cultivo.

Reactivo	Formulación
Sacarosa	Concentración que presentó mayor rendimiento
Peptona de carne	Concentración que presentó mayor rendimiento
Peptona de caseína	Concentración que presentó mayor rendimiento
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 g/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.07 g/L

3. Agregar los reactivos pesados en la formulación un recipiente de 1 L y agregar 500 mL de agua
4. Ajustar a pH 6 con solución de NaOH y HCl.
5. Colocar el recipiente con un agitador magnético en una estufa a 60 °C con agitación. Esperar a que la mezcla se homogenice y retirar el recipiente de la estufa.
6. En un Erlenmeyer de 1000 mL colocar 500 mL del medio, tapar con un trozo de aluminio, colocar cinta testigo e identificarlos.
7. Esterilizar los medios en una autoclave a 121 °C por 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.
8. Incubar a 37°C, 100 rpm por 15 días.

## Fermentación alimentada

9. Pesar con una espátula, las cantidades listadas en el cuadro 3 para preparar 350 mL de medio de cultivo
10. Agregar los reactivos pesados en la formulación un recipiente de 500 mL y agregar 350 mL de agua
11. Ajustar a pH 6 con solución de NaOH y HCl.

12. Colocar el recipiente con un agitador magnético en una estufa a 60 °C con agitación. Esperar a que la mezcla se homogenice y retirar el recipiente de la estufa.
13. En un Erlenmeyer de 1000 mL colocar los 350 mL de medio, tapar con un trozo de aluminio, colocar cinta testigo e identificar.
14. Esterilizar el medio en una autoclave a 121 °C por 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.
15. Incubar a 37°C, 100 rpm por 9 días, en donde cada 3 días se debe agregar una solución saturada de sacarosa para que el medio vuelva a tener las concentraciones iniciales. Incubar un total de 15 días.

#### **Continuación procedimiento general**

16. Sacar de la incubadora ambas fermentaciones y filtrar el micelio e identificar.
17. Del sobrenadante tomar muestras de 5 mL, centrifugar en Centrífuga Eppendorf 5804 R a 5000 rpm por 15 minutos y posteriormente analizar con HPLC y HACH (ir a apartado H).
18. Lavar el micelio con agua destilada y colocar en papel absorbente e identificar.
19. Secar el micelio con una prensa de calor por 30 segundos a 100 °C y pesar en balanza para determinar el peso seco.
20. Seleccionar la técnica de cultivo que presentó el mayor rendimiento.

#### **H. Análisis de muestras**

1. Cuantificación de contenido de sacarosa en el sobrenadante luego de la fermentación empleando el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
  - a. La columna a utilizar es Agilent Hi-plex H a 300x7.8mm, 5um, la cual tiene como fase móvil agua filtrada a 75°C, detector de índice de refracción a 55°C y automuestreador.
  - b. Tomar tres muestras de 5mL del sobrenadante obtenido y centrifugar en Centrífuga Eppendorf 5804 R a 5000 rpm por 15 minutos. El filtrado agregarlo a los viales de cromatografía y colocar en el automuestreador.
  - c. Programar la secuencia de muestro, el equipo inyecta 20 µL de muestra y bombea a 0.6 mL/min por 21 minutos a 40°C.
  - d. La fase móvil empuja la muestra a la columna e inicia la separación de compuestos.
  - e. La muestra pasa por un detector de índice de refracción a 40°C y se forman las curvas de cromatogramas.
  - f. Obtener los resultados de la cuantificación con base a los resultados obtenidos en los cromatogramas en % (m/v).

## 2. Cuantificación de contenido de nitrógeno en el sobrenadante luego de la fermentación empleando colorimetría HACH

- a. Ajustar la configuración del colorímetro HACH para la medición de nitrógeno total en mg/L en un rango entre 0.0-25.0 mg/L.
- b. Encender el reactor DRB 200 y ajustar a una temperatura de 105°C
- c. Agregar un sobre del reactivo Persulfato a un vial con reactivo de Hidróxido para Nitrógeno total (un vial se utiliza para la muestra y otro para el blanco).
- d. Agregar a un vial 2 mL del sobrenadante del medio líquido que quedó luego de centrifugar.
- e. Agregar al otro vial (blanco) 2 mL de agua destilada.
- f. Agitar durante 30 segundos y colocar en reactor DRB por 30 minutos.
- g. Retirar los viales del reactor y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- h. Agregar un sobre del Reactivo A TN a cada uno de los viales digeridos y agitar 15 segundos.
- i. Dejar reaccionar durante 3 minutos.
- j. Agregar un sobre del Reactivo B TN a cada uno de los viales y agitar 15 segundos.
- k. Dejar reaccionar durante 2 minutos.
- l. Agregar 2 mL de la muestra digerida y tratada con los reactivos a un vial con Reactivo C TN (Realizar el mismo procedimiento con el blanco).
- m. Invertir los viales 10 veces, dejar reaccionar por 5 minutos.
- n. Configurar el equipo presionando PRGM 7 y luego 58 y ENTER.
- o. Colocar el blanco en el equipo, cubrirlo y presionar el botón READ para realizar la lectura.
- p. Repetir el procedimiento con el vial de la muestra y anotar el valor dado por el equipo.

### I. Tratamiento de micelio de hongo

#### **Tratamiento con taninos**

El tratamiento con taninos se realiza para evaluar si presentan algún efecto en las características mecánicas del micelio, los taninos funcionan como crosslinkers por lo que pueden crear enlaces con los grupos amino perteneciente a la quitina o grupos hidroxilo de aminoácidos y demás componentes que conforman la pared celular del hongo.

1. Tomar muestra de micelio sin haber secado en prensa de calor y pesar en balanza analítica.
2. Realizar 20 mL de una solución 1.5% m/v con extracto de mimosa empleando agua destilada.
3. Colocar el micelio en la solución de extracto de mimosa durante 8 días a 100 rpm.
4. Sacar el micelio de la solución, quitar exceso de agua y colocar en 20 mL de una solución 20% v/v de glicerina durante 1 hora.

5. Secar el micelio con prensa de calor a 100°C durante 30 segundos.
6. Evaluar las propiedades mecánicas empleando metodología de apartado J

(Kanishka, y otros, 2022)

### **Tratamiento con agar**

1. Pesar 3 gramos (peso seco) de micelio y triturarlo para obtener un polvo.
2. Pesar 3 gramos de agar y agregar 100 mL de agua destilada.
3. Agregar 5 gramos de glicerina y calentar la mezcla hasta que llegue a punto de ebullición con agitación.
4. Agitar la mezcla hasta que se forme una solución homogénea.
5. Colocar solución en un recipiente y secar 2 horas a 65°C.
6. Evaluar las propiedades mecánicas empleando metodología de apartado J

### **J. Evaluación de las propiedades mecánicas del micelio**

En los estudios observados las pruebas para determinación de propiedades mecánicas se realizan con una máquina universal Zwick/Roell o Instron en donde cada cierto tiempo se somete a distintas tensiones (fuerzas) a la muestra hasta llegar al punto de rotura. Con los puntos se determina una curva tensión-deformación, el módulo de Young se determina en la parte lineal de la curva (Appels F. V., 2020). Se trató de simular el mismo procedimiento empleando materiales comunes, de fácil acceso y adecuándose a las dimensiones de las muestras a analizar.

1. Tomar muestra de micelio, recortar para que tenga 4 cm de alto y 1 cm de ancho.
2. Con un vernier medir el grosor de la muestra, calcular el área transversal de la muestra al multiplicar el ancho con el grosor.
3. En la parte superior de la muestra colocar un clip a 0.2 cm, este servirá como soporte.
4. En la parte inferior de la muestra colocar un clip a 0.2 cm, este servirá para colocar las masas.
5. Colocar clip superior en un soporte y del clip inferior colocar la masa 1, esperar 1 minuto y medir la longitud del micelio.
6. Realizar el mismo procedimiento empleando distintas masas hasta que el micelio se rompa. Para cada una esperar 1 minuto y medir la longitud del micelio.
7. Elaborar una gráfica de tensión vs. extensión por unidad de longitud.
8. La pendiente de la gráfica elaborada será el Módulo de Young, la tensión antes de que el micelio se haya rasgado será la tensión de rotura del micelio y con la longitud final e inicial determinar el porcentaje de elongación.
9. Realizar el mismo procedimiento para micelio puro, micelio tratado con taninos y micelio tratado con agar.



## K. Simulación modelo cinético en Berkley Madonna

1. En el software Berkley Madonna importar los datos promedio de las tres corridas realizadas de curva de crecimiento empleando la formulación final para: crecimiento de biomasa, consumo de azúcares totales y consumo de nitrógeno total a escala 100 mL.
2. Definir método de aproximación Runge-Kutta 4, tiempo inicial 0, tiempo final 10 e incremento diferencial de 0.02.
3. Establecer las expresiones del modelo de Monod, definiendo la velocidad de consumo de sustrato en función de la velocidad de crecimiento celular, consumo de nitrógeno total y rendimientos que relaciona los parámetros; la velocidad de consumo de nitrógeno en función de la velocidad de crecimiento celular y el rendimiento que relaciona los parámetros y la velocidad de generación de biomasa respecto al consumo de nitrógeno total y azúcares totales; como se muestra a continuación.

$$\begin{aligned}M_{nb} &= M_{max1} * (N - n_i) / ((N - n_i) + K_{s1}) \\M_{sn} &= M_{max2} * (S - i) / ((S - i) + K_{s2}) \\M_{sb} &= M_{max3} * (S - s_i) / ((S - s_i) + K_{s3}) \\R_1 &= M_{nb} * X \\R_2 &= M_{sn} * N / (Y_{xs} / Y_{xn}) \\R_3 &= M_{nb} * X / Y_{xn} \\R_4 &= M_{sb} * X / Y_{xs} \\R_5 &= M_{sn} * N * \text{Alfa} \\d/dt(X) &= \text{IF TIME} < 6 \text{ THEN } (R_1 + R_5) \text{ ELSE } 0 \\d/dt(S) &= \text{IF TIME} < 4 \text{ THEN } -R_2 \text{ ELSE } -R_4 \\d/dt(N) &= -R_3\end{aligned}$$

4. Definir los valores iniciales y finales para cada especie

$$\begin{aligned}\text{INIT } X &= 0.03 \\ \text{INIT } S &= 37.67 \\ \text{INIT } N &= 1.4 \\ n_i &= 0.9 \\ i &= 37.67 - 8.8 \\ s_i &= 21.5\end{aligned}$$

5. Ajustar las variables  $M_{max1}$ ,  $K_{s1}$ ,  $M_{max2}$ ,  $K_{s2}$ ,  $M_{max2}$ ,  $K_{s2}$ ,  $Y_{xs}$ ,  $Y_{xn}$  y Alfa. Para que las curvas se ajusten a los valores experimentales de crecimiento de biomasa, consumo de azúcares totales y consumo de nitrógeno total.
6. Definir sliders para las variables  $M_{max1}$ ,  $K_{s1}$ ,  $M_{max2}$ ,  $K_{s2}$ ,  $M_{max2}$ ,  $K_{s2}$ ,  $Y_{xs}$ ,  $Y_{xn}$  y Alfa e ir modificando los valores para lograr un mejor ajuste.

7. Determinar las ecuaciones de velocidad de reacción y cambio de concentración con el tiempo para generación de biomasa, consumo de azúcares totales y consumo de nitrógeno total.

## VII. RESULTADOS

Cuadro 5. Formulaciones desarrolladas, variando la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno, para la producción de micelio de *P.chrysosporium*

Formulación	Sacarosa g/L	Peptona de carne g/L	Peptona de caseína g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> g/L	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O g/L	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O g/L
1	40.00	5.00	5.00	1.00	0.30	0.07
2	60.00	5.00	5.00	1.00	0.30	0.07
3	80.00	5.00	5.00	1.00	0.30	0.07
4	40.00	2.50	2.50	1.00	0.30	0.07
5	40.00	5.00	5.00	1.00	0.30	0.07
6	40.00	10.0	10.0	1.00	0.30	0.07

Los medios de cultivo se inocularon con 0.03 g/L de esporas de *P.chrysosporium*, las fermentaciones se llevaron a cabo a pH 6-6.2, 37°C y 100 rpm durante 6 días.

Cuadro 6. Concentraciones y rendimiento de formación de biomasa respecto a fuente de carbono y nitrógeno total en las 6 formulaciones realizadas.

<b>Sacarosa 40 g/L</b>					
día	Biomasa (g/L)	N total (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Y x/s (g/g)	Y x/N (g/g)
<b>0</b>	0.030	1.400	37.392	0.186 ± 0.006	5.944 ± 0.096
<b>6</b>	2.547 ± 0.074	0.977 ± 0.006	23.884 ± 0.295		
<b>Sacarosa 60 g/L</b>					
día	Biomasa (g/L)	N total (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Y x/s (g/g)	Y x/N (g/g)
<b>0</b>	0.030	1.400	58.364	0.087 ± 0.004	6.543 ± 0.392
<b>6</b>	3.020 ± 0.252	0.943 ± 0.015	23.863 ± 1.721		
<b>Sacarosa 80 g/L</b>					
día	Biomasa (g/L)	N total (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Y x/s (g/g)	Y x/N (g/g)
<b>0</b>	0.030	1.400	85.145	0.079 ± 0.007	7.538 ± 0.987
<b>6</b>	3.857 ± 0.593	0.893 ± 0.011	37.113 ± 3.019		

<b>Peptona 2.5 g/L</b>					
día	Biomasa (g/L)	N total (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Y x/s (g/g)	Y x/N (g/g)
<b>0</b>	0.030	0.700	36.535	0.133 ± 0.008	5.209 ± 0.274
<b>6</b>	2.480 ± 0.181	0.230 ± 0.010	18.056 ± 0.270		

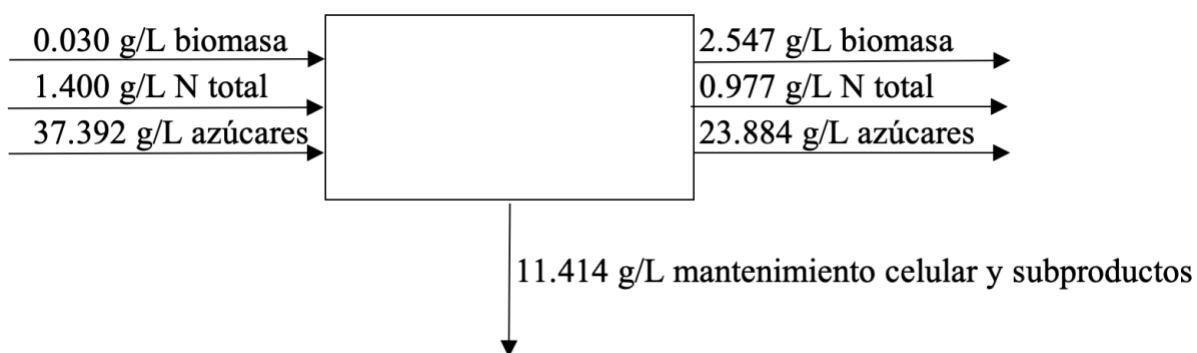
<b>Peptona 5 g/L</b>					
día	Biomasa (g/L)	N total (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Y x/s (g/g)	Y x/N (g/g)
<b>0</b>	0.030	1.400	36.990	0.183 ± 0.019	6.256 ± 0.126
<b>6</b>	2.950 ± 0.092	0.933 ± 0.006	20.943 ± 1.704		

<b>Peptona 10 g/L</b>					
día	Biomasa (g/L)	N total (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Y x/s (g/g)	Y x/N (g/g)
<b>0</b>	0.030	2.800	38.475	0.135 ± 0.002	2.440 ± 0.066
<b>6</b>	2.673 ± 0.085	1.717 ± 0.006	18.935 ± 0.613		

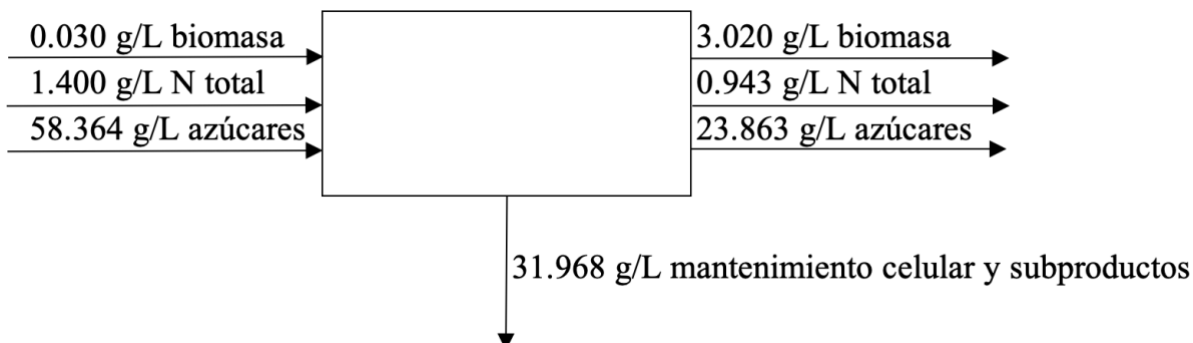
Promedio y desviación estándar de los resultados en triplicado obtenidos con la formulación, se pueden observar en datos calculados. Los datos fueron obtenidos a escala de 100 mL pH inicial 6-6.2, 37°C y 100 rpm. El nitrógeno total inicial se calculó a partir de la cantidad total de peptonas y el porcentaje de nitrógeno presente en estas según datos de fabricante. Los azúcares totales se determinaron mediante HPLC. La fermentación se llevó a cabo durante 6 días. Yx/s: rendimiento de formación de biomasa respecto a fuente de carbono (azúcares totales). Y x/N: rendimiento de formación de biomasa respecto a nitrógeno total.

Figura 10. Balance de masa global de la fermentación empleando la formulación 1 de medio de cultivo para la producción de micelio de *P. chrysosporium*.



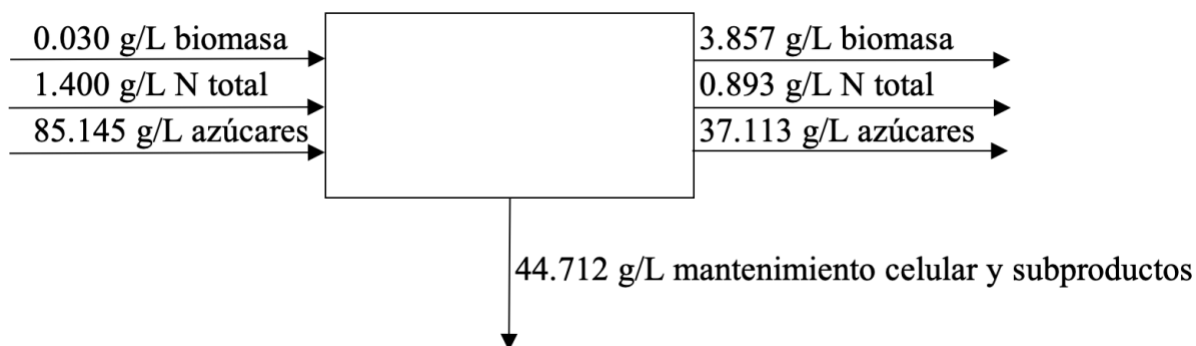
Los datos fueron obtenidos a escala de 100 mL pH inicial 6-6.2, 37°C y 100 rpm.

Figura 11. Balance de masa global de la fermentación empleando la formulación 2 de medio de cultivo para la producción de micelio de *P. chrysosporium*.



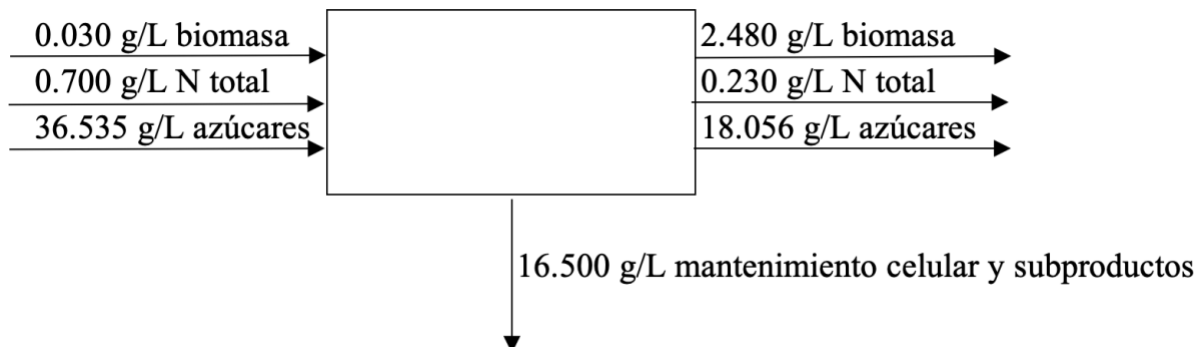
Los datos fueron obtenidos a escala de 100 mL pH inicial 6-6.2, 37°C y 100 rpm.

Figura 12. Balance de masa global de la fermentación empleando la formulación 3 de medio de cultivo para la producción de micelio de *P. chrysosporium*.



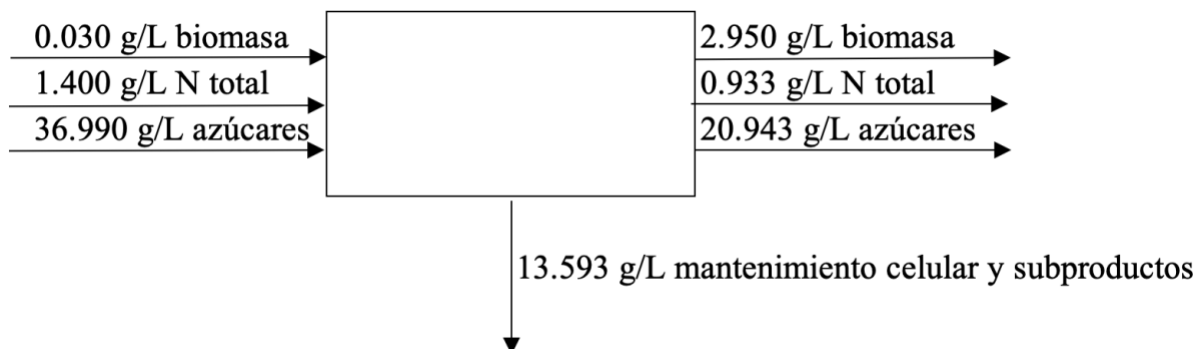
Los datos fueron obtenidos a escala de 100 mL pH inicial 6-6.2, 37°C y 100 rpm.

Figura 13. Balance de masa global de la fermentación empleando la formulación 4 de medio de cultivo para la producción de micelio de *P. chrysosporium*.



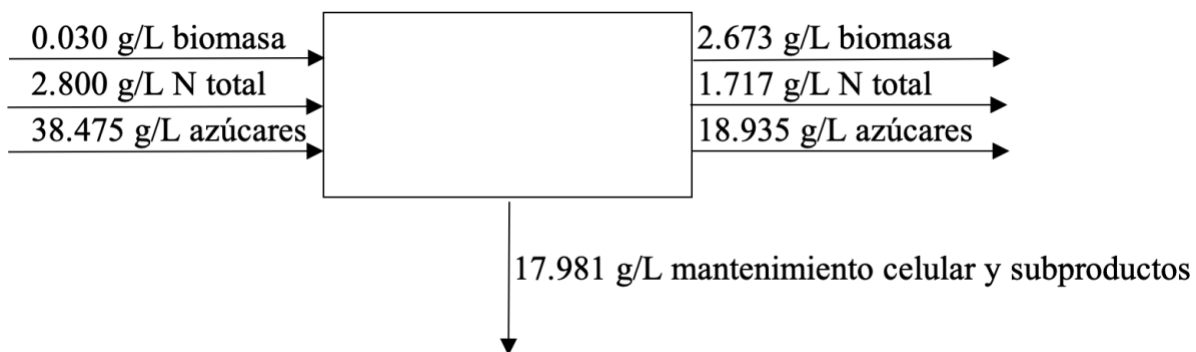
Los datos fueron obtenidos a escala de 100 mL pH inicial 6-6.2, 37°C y 100 rpm.

Figura 14. Balance de masa global de la fermentación empleando la formulación 5 de medio de cultivo para la producción de micelio de *P. chrysosporium*.



Los datos fueron obtenidos a escala de 100 mL pH inicial 6-6.2, 37°C y 100 rpm.

Figura 15. Balance de masa global de la fermentación empleando la formulación 6 de medio de cultivo para la producción de micelio de *P. chrysosporium*.



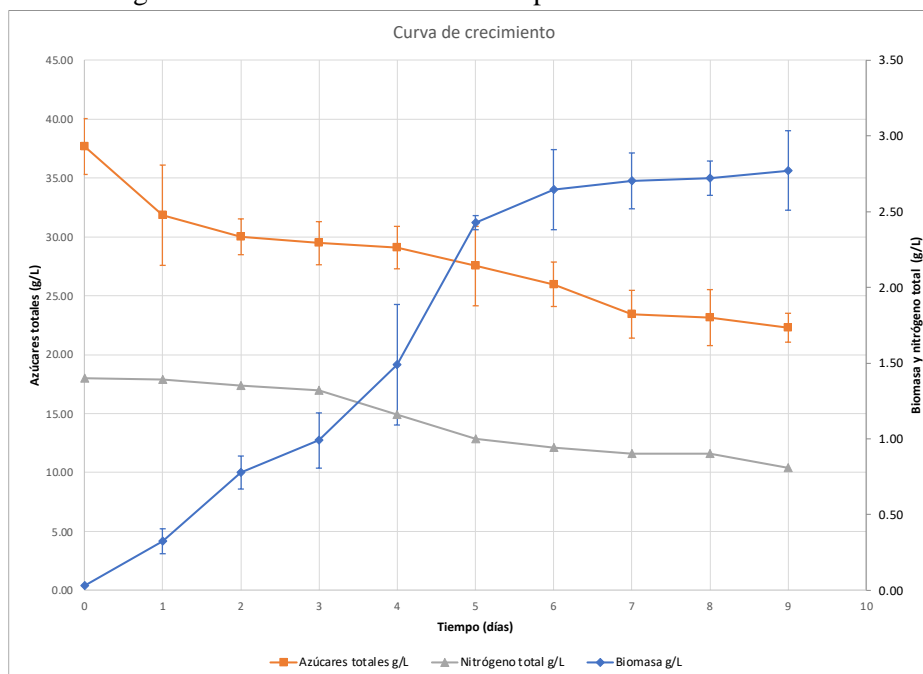
Los datos fueron obtenidos a escala de 100 mL pH inicial 6-6.2, 37°C y 100 rpm.

Cuadro 7. Promedio y desviación estándar de curva de crecimiento empleando formulación final

día	Biomasa (g/L)		Azúcares totales (g/L)		Nitrógeno total (± 0.01 g/L)
0	0.03	± 0.00	37.67	± 0.91	1.40
1	0.32	± 0.04	31.82	± 1.89	1.39
2	0.78	± 0.11	30.01	± 1.46	1.35
3	0.99	± 0.11	29.48	± 1.83	1.32
4	1.49	± 0.28	29.10	± 1.78	1.16
5	2.43	± 0.02	27.52	± 2.53	1.00
6	2.64	± 0.18	25.96	± 1.36	0.94
7	2.70	± 0.12	23.41	± 1.32	0.90
8	2.72	± 0.08	23.15	± 1.64	0.90
9	2.77	± 0.10	22.28	± 0.96	0.81

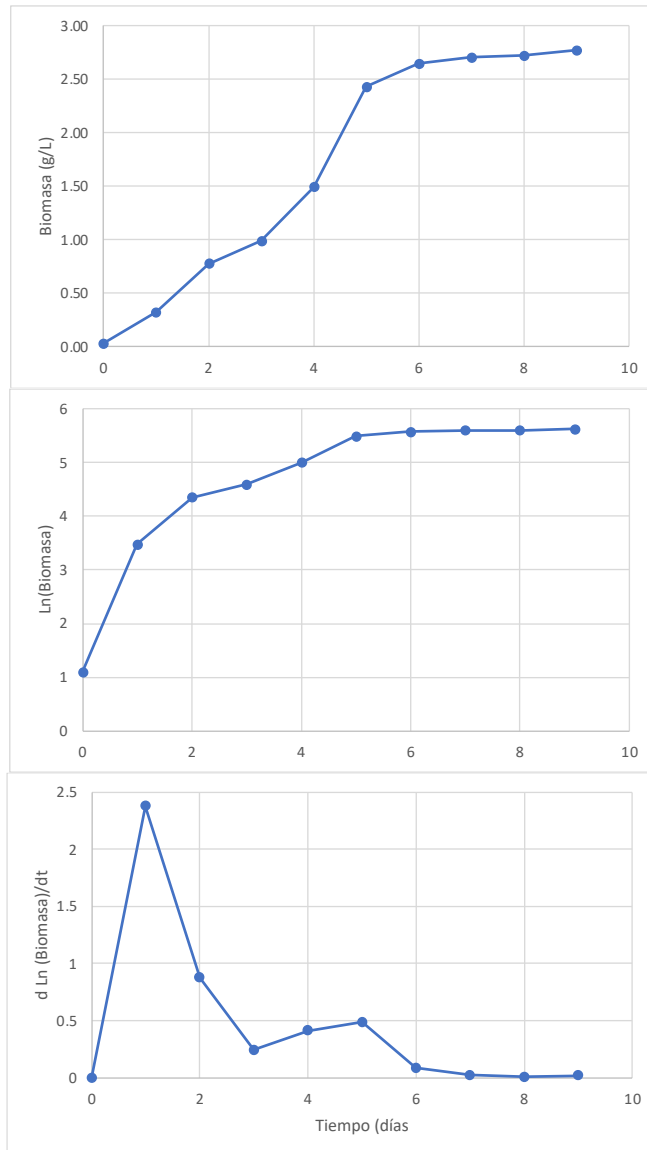
Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ . pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. La fermentación se llevó a cabo durante 9 días. Los datos representan el promedio y desviación estándar del triplicado de la fermentación, los resultados de cada corrida pueden observarse en el apartado de anexos.

Figura 16. Curva de crecimiento empleando formulación final



Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ . pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Las líneas representan una tendencia suavizada, los puntos corresponden a los datos experimentales.

Figura 17. Comportamiento de la formación de biomasa en el tiempo



Curvas de biomasa respecto al tiempo para determinar las fases de crecimiento. Las líneas representan una tendencia suavizada, los puntos corresponden a los datos experimentales.



Ecuación 7. Cambio de concentración de formación de biomasa (micelio) de *P. chrysosporium* con el tiempo.

$$\frac{dX}{dt} = X \left( \frac{\mu_{max1}(N - ni)}{K_{s1} + (N - ni)} \right) + N \left( \frac{\mu_{max2}(S - i)}{K_{s2} + (S - i)} \right) \alpha$$

ni= concentración final de nitrógeno; i= concentración final de azúcares totales durante los primeros 4 días de fermentación. La biomasa se asocia tanto al consumo de nitrógeno como de azúcares totales por lo que se realiza una suma de ambos factores.

Ecuación 8. Cambio de concentración de la fuente de carbono con el tiempo.

$$\frac{dS}{dt} = - \left( N \frac{\left( \frac{\mu_{max2}(S - i)}{K_{s2} + (S - i)} \right)}{Y_{x/s} / Y_{x/N}} + X \frac{\left( \frac{\mu_{max3}(S - si)}{K_{s3} + (S - si)} \right)}{Y_{x/s}} \right)$$

i= concentración final de azúcares totales durante los primeros 4 días de fermentación. Si= concentración final de azúcares luego de los 9 días de fermentación. Al inicio el consumo de los azúcares totales se ve influenciado por la concentración de nitrógeno, pues se propicia la producción de enzimas para degradar las peptonas y por consecuencia posteriormente si se observa un consumo de azúcares asociado a la producción de biomasa.

Ecuación 9. Cambio de concentración de nitrógeno total con el tiempo.

$$\frac{dS}{dt} = -X \frac{\left( \frac{\mu_{max1}(N - ni)}{K_{s1} + (N - ni)} \right)}{Y_{x/N}}$$

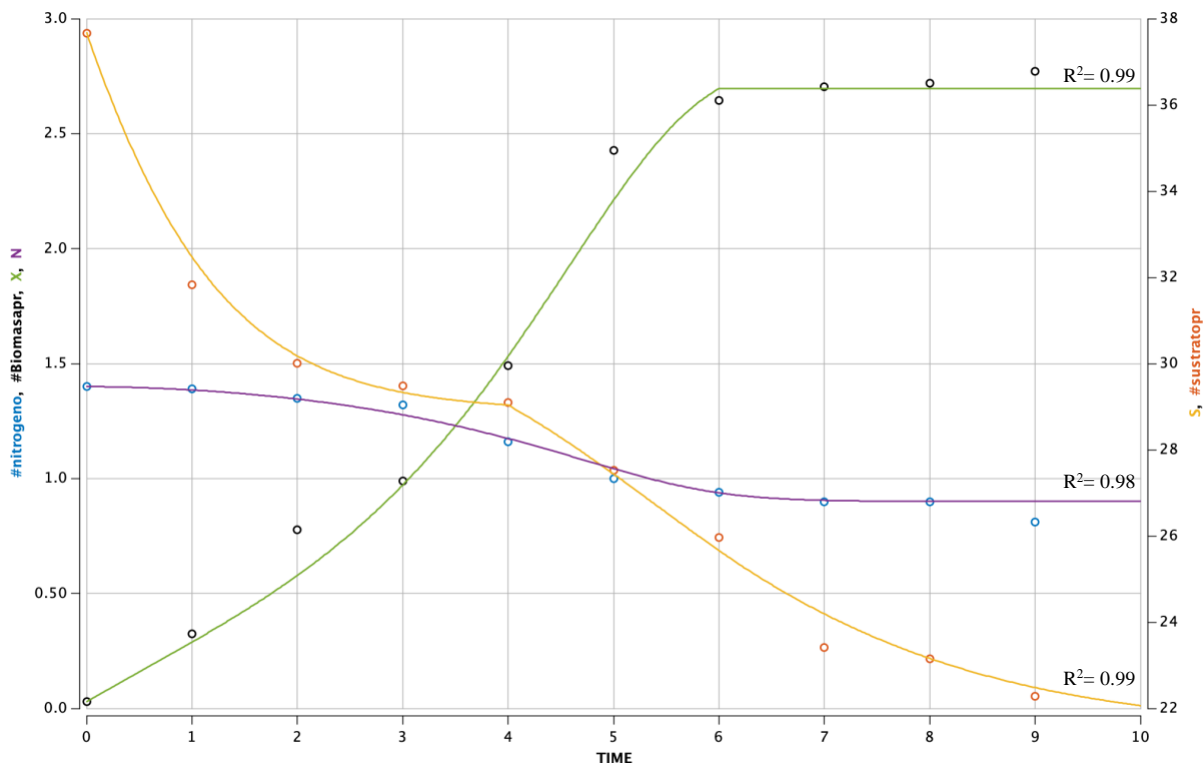
ni= concentración final de nitrógeno.

Cuadro 8. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales realizados en el software Berkley Madonna para la producción de micelio de *P. chrysosporium* en un medio con 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína y 5 g/L peptona de carne

Parámetro cinético	Definición	Valor	Unidades
$\mu_{\max 1}$	Velocidad máxima de crecimiento celular (nitrógeno-biomasa)	0.651	día <sup>-1</sup>
$K_{s1}$	Constante de afinidad al sustrato (nitrógeno-biomasa)	0.150	g/L
$\mu_{\max 2}$	Velocidad máxima de crecimiento celular (azúcares totales-biomasa-nitrógeno)	0.560	día <sup>-1</sup>
$K_{s2}$	Constante de afinidad al sustrato (azúcares totales-biomasa-nitrógeno)	20.076	g/L
$\mu_{\max 3}$	Velocidad máxima de crecimiento celular (azúcares totales-biomasa)	0.362	día <sup>-1</sup>
$K_{s3}$	Constante de afinidad al sustrato (azúcares totales-biomasa)	9.069	g/L
$Y_{x/s}$	Rendimiento de biomasa respecto a azúcares totales	0.180	gramos de biomasa/ gramos de azúcares totales
$Y_{x/N}$	Rendimiento de biomasa respecto a nitrógeno total	5.323	gramos de biomasa/gramos nitrógeno total
$\alpha$	Constante que permite relacionar la biomasa que se produce a partir del consumo de azúcares totales a causa de la concentración de nitrógeno en el medio	1.020	

Los datos fueron obtenidos del triplicado de la fermentación.

Figura 18. Ajuste de datos experimentales, para la determinación de parámetros cinéticos de la producción de micelio de *P. chrysosporium* en un medio con 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína y 5 g/L peptona de carne, en el software Berkley Madonna.



Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ . pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Datos obtenidos de la fermentación de *P. chrysosporium* en el medio mencionado durante 9 días a escala de 100 mL. Todos los datos se presentan en g/L. Los datos representan el promedio y desviación estándar del triplicado de la fermentación, los resultados de cada corrida pueden observarse en el apartado de anexos.

- Puntos naranjas: datos experimentales de la concentración de azúcares totales
- Curva naranja: modelo de ajuste de consumo de azúcares totales en el tiempo
- Puntos azules: datos experimentales de la concentración de nitrógeno total
- Curva azul: modelo de ajuste de consumo de nitrógeno total en el tiempo
- Puntos negros: datos experimentales de la concentración de biomasa (micelio)
- Curva verde: modelo de ajuste de la producción de biomasa (micelio) en el tiempo

Cuadro 9. Concentraciones y rendimiento de formación de biomasa respecto a fuente de carbono y nitrógeno total empleando una fermentación por lotes y alimentada

<b>Fermentación por lotes</b>					
día	Biomasa (g/L)	N total (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Y x/s (g/g)	Y x/N (g/g)
<b>0</b>	0.030	1.400	38.796	0.276 ± 0.057	7.774 ± 0.369
<b>15</b>	4.615 ± 1.071	0.813 ± 0.110	21.556 ± 6.404		
<b>Fermentación alimentada</b>					
día	Biomasa (g/L)	N total (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Y x/s (g/g)	Y x/N (g/g)
<b>0</b>	0.030	1.400	37.342		
<b>se añaden 15 g/L de azúcares totales</b>					
<b>15</b>	6.385 ± 0.325	0.803 ± 0.025	18.107 ± 5.152	0.188 ± 0.028	10.650 ± 0.190

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ . pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Datos obtenidos de la fermentación de *P. chrysosporium* en el medio mencionado durante 15 días a escala de 500 mL. Los datos representan el promedio y desviación estándar del triplicado de la fermentación. La alimentación se realizó cada 3 días.

Cuadro 10. Módulo de Young, tensión de rotura y porcentaje de elongación para el micelio elaborado obtenido mediante pruebas de tensión.

<b>Material</b>	<b>Módulo de Young (GPa)</b>	<b><math>\sigma</math> (MPa)</b>	<b><math>\epsilon</math> (%)</b>
micelio	0.0021-0.0027	0.31-0.63	17.5-28.75
micelio + taninos	0.0026	0.18	6.25
micelio + agar	0.0037	2.26	57.5

$\sigma$ : tensión de rotura,  $\epsilon$ : porcentaje de elongación.

## VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se llevó a cabo la evaluación de la producción de micelio de *P. chrysosporium* a partir de un medio formulado con sacarosa y peptonas para la producción de un biomaterial aplicable como materia prima a la industria textil. Esto se logró a través del desarrollo de seis formulaciones de medio de cultivo para determinar el crecimiento del hongo y evaluar el rendimiento respecto a las fuentes de carbono y nitrógeno. Esto permitió cultivar y producir la biomasa y comparar las propiedades mecánicas de la biomasa con fibras que se utilizan en la industria textil.

Para obtener un micelio con potencial uso en la industria textil se empleó el hongo *P. chrysosporium*. Este es un basidiomiceto de rápido crecimiento, reconocido por su habilidad de desarrollarse en diferentes tipos de sustratos (Saiz-Jimenez, 1983). *P. chrysosporium* es capaz de crecer en medios sólidos y líquidos. Para la formulación de los medios de cultivo para determinar el crecimiento del hongo y evaluar su rendimiento, se decidió emplear sacarosa como fuente de carbono, peptona de carne y caseína como fuentes de nitrógeno orgánico, fosfato de potasio como fuente de fósforo y sulfato de magnesio y zinc. Se decidió implementar azufre, magnesio y zinc en las formulaciones pues estos permiten el correcto funcionamiento de enzimas que requieran de cofactores (Carlile, Watkinson, & Gooday, 2001). La pared células de los hongos está constituida por betaglucanos, glucoproteínas, manoproteínas y quitina (Philipp Fesel, 2015). Estos están compuestos en su mayoría por carbono y nitrógeno; por esta razón ambas fuentes se variaron para el desarrollo del medio de cultivo dejando al resto de reactivos constantes, pues son los factores más importantes e influyentes en el crecimiento y desarrollo de las hifas para la formación del micelio.

Los hongos requieren de oxigenación para su crecimiento, pero es necesario mantener condiciones estériles durante la inoculación y crecimiento para evitar contaminación. Por esta razón se emplearon recipientes sellados, la agitación permite que el cultivo sea aeróbico y se oxigene el medio. En un cultivo sumergido, los hongos pueden presentar distintas morfologías dependiendo de la agitación y cantidad de inóculo inicial. El micelio se puede formar como pequeñas esferas redondas, esferas de mayor tamaño, como una dispersión del micelio en el medio (El-Enshasy H. A., 2007).

El cultivo en líquido de los hongos presenta tres fases de crecimiento, la primera es la germinación de las esporas y la expansión de las hifas, la segunda fase representa la formación de micelio en forma de pellet o como conexión de las hifas creando un micelio disperso en el medio. La última fase es lisis celular en donde debido a la limitación de sustrato y difícil oxigenación de las células las células mueren. El inóculo puede afectar la forma de crecimiento del micelio, si se utiliza un inóculo grande se incentiva la formación de pellets mientras que si el inóculo inicial es inferior a 0.05% m/v se fomenta la interconexión entre las hifas creando un micelio disperso en el medio. La agitación del medio presenta una influencia similar al del tamaño de inóculo, si se utiliza una agitación fuerte se fomenta la formación de pellets por lo que el micelio crea pequeñas esferas de las cuales el tamaño no aumenta, únicamente se producen más pellets con la misma morfología. Al emplear una agitación moderada, se propicia una oxigenación homogénea del medio lo que genera una mayor elongación de las hifas y por consecuencia un micelio más uniforme (El-Enshasy H. A., 2007).

Como se mencionó anteriormente las condiciones de fermentación pueden afectar considerablemente la morfología y crecimiento del micelio. Por esta razón se buscó mantener las condiciones físicas para todas las fermentaciones siendo estas las siguientes, temperatura 37°C, pH inicial 6, 100 rpm de agitación y recipientes sellados. *P. chrysosporium* requiere de una temperatura entre 35-40°C para su óptimo crecimiento y un pH entre 4-6, por esta razón las condiciones de la fermentación se encontraban entre estos rangos (Saiz-Jimenez, 1983).

Como fuente de carbono se empleó sacarosa ya que *P. chrysosporium* y en general los hongos, absorben fácilmente la glucosa y fructosa, pues son los monosacáridos más abundantes en la biomasa vegetal y el componente principal de celulosa, almidón, hemicelulosa, etc. La sacarosa representa una buena fuente de sustrato pues los hongos son capaces de hidrolizar la sacarosa, mediante la acción de la enzima invertasa y posteriormente los monosacáridos son empleados en las distintas rutas metabólicas; además la fructosa entra a la célula y se fosforila para formar fructosa 6-fosfato, mediante la hexoquinasa y la glucosa igualmente se fosforila mediante la glucoquinasa para formar glucosa 6-fosfato; una secuencia de diez reacciones enzimáticas transforma la glucosa y fructosa por medio de la glucólisis en piruvato y energía en forma de ATP (Li, 2022).

Como fuente de nitrógeno se emplearon peptonas de carne y caseína, el nitrógeno es un componente importante en la formulación de medios pues a partir de este se sintetizan aminoácidos, enzimas, ácidos nucleicos, proteínas, componentes de la pared y membrana celular, etc. Una limitada fuente de nitrógeno detiene el crecimiento y reproducción del hongo. Las fuentes de nitrógeno pueden ser inorgánicas como nitratos y amonio u orgánicas como aminoácidos y proteínas. En este caso, debido a los requerimientos de la cepa y la necesidad de producir una abundante cantidad de biomasa, se empleó una fuente orgánica. Además, se ha demostrado que fuentes inorgánicas de nitrógeno son insuficientes para satisfacer las demandas de hongos basidiomicetos (Bechem, 2012). Estudios han demostrado que en un medio con peptonas se logra obtener hasta tres veces más biomasa que en medios con formulados con fuentes de nitrógeno inorgánicas (Sośnicka, y otros, 2022).

Como se mencionó anteriormente, las fuentes de carbono y nitrógeno son los compuestos más relevantes en la formulación del medio debido a sus implicaciones metabólicas y su repercusión en el desarrollo y crecimiento del hongo. A partir de esto se modificó inicialmente la concentración de la fuente de carbono teniendo 40 g/L, 60 g/L y 80 g/L de sacarosa. La selección de dichas concentraciones fue basada en distintos artículos en donde cultivan *Ganoderma spp.* y *P. chrysosporium*, a concentraciones de sacarosa entre los 40-80 g/L, para la producción de biomasa y demás subproductos (Zárate et al., 2012); (Liu, Ren, & Zhao, 2011); (Liu et al., 2023); (Ilias, 2017). Cabe resaltar que estos estudios no se concentraban en la producción de biomasa para la formación de un biomaterial pues los estudios relacionados al tema son limitados; por lo que se probaron dichas concentraciones para determinar los rendimientos de producción de biomasa respecto a consumo de sustrato para dicha esta función en especial.

Tomando en cuenta que en un estudio se demostró que el mayor rendimiento de producción de micelio de *P. chrysosporium* se obtuvo en un medio que contenía fructosa 30 g/L como fuente de carbono (Kheiralla, El-Din, Malek, & Aziz, 2013). Por esta razón se decidió tomar como, concentración intermedia, la evaluada en el estudio mencionado convertida a concentración de sacarosa, pues es el sustrato que se está evaluado. Igualmente, al ser concentraciones relativamente bajas, permite estudios futuros empleando efluentes industriales como melaza, suero de leche, panela, etc. y determinar su influencia en el crecimiento del hongo ya que estas poseen impurezas que pueden afectar las condiciones.

Posteriormente se modificó la concentración de las peptonas teniendo 2.5 g/L, 5 g/L y 10 g/L de cada una. Esto tomando en cuenta diferentes estudios realizados en donde fomentan la producción de biomasa de *P. chrysosporium*. En un estudio realizado por Solís y colegas (2015) inducen la producción de micelio de *P. chrysosporium* empleando un medio con 5 g/L de peptona para la utilización de la biomasa en la remoción de metales pesados. Shanmugapriya y Lakshmi Prabha (2013) obtienen la mayor cantidad de biomasa en un medio con 6.6 g/L de triptona (peptona de caseína). Kheiralla y colegas (2013) obtienen 2.624 g/L de micelio al emplear un medio con 10 g/L de peptona (Pacheco, y otros, 2015; Kheiralla, El-Din, Malek, & Aziz, 2013; Shanmugapriya M, 2013). Zárate y colegas cultivan *G. lucidum* en medios con concentraciones de peptona desde 2-20 g/L (Zárate et al., 2012).

Antes de iniciar a inocular en las distintas formulaciones, se realizó una curva de crecimiento con los valores intermedios, para cada uno de los factores a modificar. Esto se realizó con el objetivo de tener un tiempo de incubación apropiado, los hongos tienen un periodo de acoplamiento al medio, posteriormente crecen de manera exponencial, llegan a un estado estacionario y por último el declive en donde las células empiezan a morir. Al llegar al punto de declive o muerte celular, estas liberan su contenido lo que hace que su densidad disminuya y por consecuencia se obtenga un menor peso (ir a Figura 34). Se puede observar que, para el sexto día, se tiene el punto mayor de biomasa y luego va en declive. En las primeras 24 horas se puede observar que se consume aproximadamente la mitad de la sacarosa inicial y se generan 0.11 g/L de biomasa, esto demuestra que se requiere un alto consumo de sustrato para la formación inicial del micelio a partir de las esporas que se inoculan. Luego de 6 días alrededor del 75% de la fuente de carbono se ha consumido, llegando a un punto de agotamiento de sustrato. En consecuencia, en los siguientes días se puede observar el declive. A partir de lo observado se determinó que el período de incubación sería de 6 días pues es el período de tiempo en donde mayor producción de biomasa se observó y la mayoría de sustrato se había consumido.

Esta curva también permitió concluir que el hongo únicamente aprovecha la sacarosa como fuente de carbono. Las peptonas al ser una mezcla de proteínas provenientes de caseína y carne tienen una composición no conocida, por esta razón pueden considerarse no solo como una fuente de nitrógeno, también como una fuente de carbono debido a las moléculas de carbono presentes en los enlaces peptídicos. La curva de crecimiento inicial (ir a Figura 34) demuestra que, al llegar a un punto de agotamiento de sustrato, la biomasa no continúa creciendo y se inicia la lisis celular. Si el hongo

estuviera aprovechando las peptonas no solo como fuente de nitrógeno si no también como fuente de carbono, se observaría un incremento en la biomasa a pesar de tener un consumo total de sacarosa.

Para las primeras tres formulaciones, se puede observar que la formulación de 80 g/L es la que mayor producción de biomasa presentó con 3.857 g/L, seguida de la concentración de 60 g/L en la cual se obtuvo 3.020 g/L de biomasa y por último la de 40 g/L de sacarosa con 2.547 g/L de micelio. Pero al realizar un análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias obtenidas, se determinó que la producción de biomasa en cada una de las formulaciones no presenta diferencia estadísticamente significativa (ver Cuadro 29 en anexos), por lo que se determinó la formulación a emplear mediante los rendimientos. En el Cuadro 6 se puede observar que el mayor rendimiento de producción de biomasa respecto a consumo de azúcares totales se presentó en la formulación de 40 g/L de sacarosa con un rendimiento de 0.186 gramos de biomasa por cada gramo de sustrato. Además, al realizar los balances de masa global para cada una de estas formulaciones (como se puede observar en las figuras 10, 11 y 12) el emplear 40 g/L es la que menor concentración de subproductos y mantenimiento celular presenta (11.414 g/L, mientras que las otras dos presentan concentraciones de 31.968 y 44.712 g/L).

Los balances de masa globales de las figuras 10, 11 y 12 demuestran como entrada la biomasa inicial del hongo, la concentración inicial de azúcares y el nitrógeno total proveniente de las peptonas. Como producto se observa la biomasa formada luego de 6 días de fermentación a 37°C y 100 rpm, para representar el sustrato no empleado se muestra el nitrógeno total y concentración de azúcares final luego de la fermentación. A partir de estos datos iniciales y finales, los cuales se cuantificaron mediante HPLC y HACH, se determinó el mantenimiento celular y subproductos no cuantificados que ocurren debido al metabolismo del hongo, en estos se incluyen enzimas, producción de CO<sub>2</sub> y demás metabolitos secundarios. Con estos balances se puede observar que el consumo de sustrato no es aprovechado en su mayoría para la formación de biomasa, pues la concentración de mantenimiento celular y subproductos prevalece de la de producción de micelio. Como se mencionó anteriormente, el emplear la formulación de 40 g/L de sacarosa se obtiene menor concentración de subproductos y mantenimiento celular. Se puede observar que, a mayor concentración de sacarosa, se presenta una mayor concentración de subproductos y mantenimiento celular mientras que la producción de biomasa aumenta, pero no de manera significativa.

Como se puede observar, la concentración de subproductos y mantenimiento celular sobrepasa la de la biomasa, es decir que la mayoría del sustrato se está empleando para la generación de enzimas y demás metabolitos. Según un estudio realizado por Sato y colegas, al cultivar *P.chrysosporium* en un medio con glucosa, el hongo produce distintas proteínas extracelulares como glicohidrolasas para la degradación de los azúcares, peroxidasas, proteasas las cuales son las encargadas de degradar los enlaces peptídicos de las peptonas para la obtención del nitrógeno. Asimismo *P.chrysosporium* al ser un hongo y célula eucariota requiere de la utilización del sustrato para la generación de organelos internos, elongación de la pared celular, metabolismo celular central, secundario y síntesis de macromoléculas (ir a el apartado de metabolismo celular en el marco teórico,



se puede observar una amplia explicación sobre los subproductos y mantenimiento celular y así comprender el porqué de la alta concentración de estos) (Sato, Liu, Koc, & Tien, 2007).

Es recomendable evaluar el efecto de distintas fuentes de carbono con el objetivo de determinar si se obtienen mayores concentraciones de biomasa. Esto además permitiría determinar si la concentración de subproductos y mantenimiento celular varía. Asimismo, es recomendable realizar un estudio sobre los subproductos como enzimas y metabolitos secundarios que se están generando para determinar si tienen alguna aplicación industrial, esto le otorgaría un valor agregado a la producción, pues no solo se estaría empleando para la generación del biomaterial. Igualmente, esto mejoraría la producción de la biomasa y los rendimientos, pues el conocer exactamente los metabolitos que se están generando permite analizar la ruta metabólica a la que están asociados y con esto tratar de reducir su producción.

Tras el análisis realizado anteriormente se decidió continuar las fermentaciones empleando 40 g/L de sacarosa, pues como se mencionó es la que mayor rendimiento  $Y_{x/s}$  y menor concentración de subproductos y mantenimiento celular presentó. Para las formulaciones 4, 5 y 6 únicamente se modificó la concentración de la fuente de nitrógeno (peptona de carne y peptona de caseína), manteniendo constante la concentración de sacarosa (40 g/L). A partir de esto se puede observar que la formulación de 5 g/L es la que mayor producción de biomasa presentó con 2.950 g/L, seguida de la concentración de 10 g/L en la cual se obtuvo 2.673 g/L de biomasa y por último la de 2.5 g/L de cada peptona con 2.480 g/L de micelio. Pero al realizar un análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias obtenidas, se determinó que la producción de biomasa con la formulación de 5 g/L presenta diferencia estadísticamente significativa respecto a las otras dos formulaciones.

La formulación empleando 5 g/L de cada una de las peptonas es la que mayor rendimiento de producción de biomasa respecto a azúcares totales y rendimiento de biomasa respecto a nitrógeno total presentó con un  $Y_{x/s}$  de 0.183 g de biomasa /g de azúcares totales y un  $Y_{x/N}$  de 6.256 g de biomasa/g de nitrógeno total (ir a Cuadro 6). La formulación empleando 10 g/L de cada una de las peptonas presentó un rendimiento inferior a la anteriormente explicada y por último la formulación empleando 2.5 g/L de cada una de las fuentes de nitrógeno (ir a Cuadro 6). Los balances de masa globales de las figuras 13, 14 y 15 demuestran como entrada la biomasa inicial del hongo, la concentración inicial de azúcares y el nitrógeno total proveniente de las peptonas. Como producto se observa la biomasa formada luego de 6 días de fermentación a 37°C y 100 rpm, como sustrato no empleado se muestra el nitrógeno total y concentración de azúcares final luego de la fermentación. A partir de estos datos iniciales y finales los cuales se cuantificaron mediante HPLC y HACH se determinó el mantenimiento celular y subproductos no cuantificados que ocurren debido al metabolismo del hongo, en estos se incluyen enzimas, producción de CO<sub>2</sub> y demás metabolitos secundarios.

Con estos balances se puede observar que la menor concentración de subproductos y mantenimiento celular se genera en la formulación empleando 5 g/L de las peptonas. A diferencia de los balances observados para las primeras tres formulaciones, en donde al aumentar la concentración

de sacarosa se observaba un aumento en la generación de subproductos y mantenimiento celular; en las formulaciones variando la fuente de nitrógeno no se observa la misma tendencia. Como se puede observar en la figura 13 y 15 ambas concentraciones de subproductos y mantenimiento celular son mayores siendo la de 10 g/L superior y seguida la de 2.5 g/L. Esto permite demostrar que se trata de un sistema complejo en donde hay un máximo empleando 5 g/L de cada peptona y que a mayor concentración de nitrógeno el consumo de sustrato se aprovecha en funciones que generan subproductos y no más biomasa y a menor concentración, no es suficiente, por lo que el hongo consume la fuente de nitrógeno para funciones vitales de supervivencia.

Se recomienda evaluar el efecto de distintas fuentes de nitrógeno para determinar los rendimientos respecto a producción de biomasa. Asimismo, es recomendable estudiar la dependencia de la generación de subproductos, como enzimas y metabolitos secundarios que se generan en la reacción, en función de las condiciones del proceso y concentraciones de las especies en la mezcla reactiva para determinar si tienen alguna aplicación industrial. Esto le otorgaría un valor agregado a la producción o si se conoce la naturaleza de estos se podría tratar de inhibir su producción para fomentar únicamente el aprovechamiento de la fuente de nitrógeno y carbono para la generación de biomasa.

Como se puede observar en el Cuadro 5 de resultados, la formulación 1 y 5 son la misma, es decir se elaboró la misma formulación dos veces. Esto se realizó pues durante la experimentación se observó que el micelio no crecía de la misma forma en los Erlenmeyer, a veces se formaban pellets redondos, en otras ocasiones se formaban pellets ovalados o más alargados. Asimismo, se observó que el tamaño variaba y en algunos Erlenmeyer no se formaban pellets, pero se formaba una biomasa grande de micelio, en conclusión, la morfología variaba. Esto motivó a realizar nuevamente la formulación 1 para verificar sí, a pesar de tener distinta morfología, los rendimientos serían iguales. Como se puede observar en la formulación 1 se produjo una menor biomasa (2.547 g/L) que en la 5 (2.950 g/L) pero los rendimientos respecto a azúcares se mantuvieron similares (0.186 g/g y 0.183 g/g respectivamente) al igual que el rendimiento respecto al nitrógeno (5.944 y 6.256 g/g respectivamente); pues no representan diferencia estadísticamente significativa (ir a Cuadro 35).

A partir de los resultados analizados, se determinó que la formulación a emplear sería la 1 (5), es decir 40 g/L de sacarosa, 5 g/L de peptona de carne, 5 g/L de peptona de caseína, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ . Con esta formulación final se realizó una curva de crecimiento a escala 100 mL para determinar la cinética de la fermentación de la sacarosa y peptonas a las condiciones mencionadas y su relación con el crecimiento celular. En base a los triplicados de consumo de azúcares totales, nitrógeno total y generación de biomasa respecto al tiempo, se evaluaron los parámetros cinéticos que explican la fermentación. Como se puede observar en la Figura 16 de resultados, la producción de la biomasa depende tanto del consumo de azúcares como de nitrógeno total y a la vez; el consumo de la fuente de carbono depende del consumo de la fuente de nitrógeno.

En la Figura 17 se observa el comportamiento de la concentración de la biomasa con el tiempo, con el objetivo de comprender las fases de crecimiento y facilitar el planteamiento del modelo en Berkley Madonna. En las curvas no hay presente fase de retardo o lag pues, se puede observar que

desde el inicio se presenta una aceleración y posteriormente se alcanza un comportamiento estacionario. En el día uno es donde se observa la mayor aceleración pues para este punto ya se formó el primer pellet de biomasa a partir de las esporas inoculadas, esto requiere una gran cantidad de azúcares pues como se puede observar en el Cuadro 7 se consumen alrededor de 6 g/L y 0.1 g/L del nitrógeno total para producir únicamente 0.32 g/L de biomasa. Esto permite inferir que hay un consumo de azúcares que no se ve reflejado directamente en la generación de biomasa y que es utilizada para la producción de enzimas y demás compuestos que fomentarán la elongación de las hifas. Para el segundo día se observa una fase exponencial, una desaceleración en el tercer día y del cuarto al sexto día se presenta otra fase de crecimiento exponencial para pasar a una desaceleración y posteriormente un comportamiento estacionario.

A partir de esta conclusión, se evaluó el ajuste en Berkley Madonna a partir del modelo de Monod. Inicialmente se realizó un modelo básico en donde únicamente se evaluaba la producción de biomasa a partir del consumo de nitrógeno y azúcares. Es por esta razón que en el Cuadro 8 de resultados se pueden observar 3 velocidades máximas y 3 constantes de afinidad a sustrato. En los primeros 4 días de fermentación se puede observar que el consumo de azúcares totales no se relaciona únicamente con la producción de la biomasa, pues aproximadamente se consumen 9 g/L de la fuente de carbono, pero la cantidad de biomasa es únicamente de 1.5 g/L pero, si se ve relacionado con el consumo de nitrógeno. Esto se debe a que para que se empiece a generar biomasa, se requiere tanto de la fuente de carbono como nitrógeno pues la pared celular de las hifas está compuesta en su mayoría por betaglucanos y quitina (Philipp Fesl, 2015).

Es decir que al inicio de la fermentación el hongo consume la fuente de carbono, pero no se ve reflejado en la producción de biomasa pues, se están generando las proteasas y demás enzimas que, posteriormente le permitirán hidrolizar las cadenas peptídicas para liberar el nitrógeno que se requiere para la formación de las hifas y su elongación. Por estas razones se puede observar que la producción de biomasa se ve afectada por  $\mu_{\max}$  de 0.651 día<sup>-1</sup>,  $K_s$  de 0.15 g/L y  $\mu_{\max 2}$  de 0.560 día<sup>-1</sup> y  $K_{s2}$  de 20.076 g/L, lo que indica que una alta afinidad al nitrógeno y baja afinidad a los azúcares. Además, como se puede observar en la ecuación 7, se presenta un constante  $\alpha$  la cual permite relacionar la biomasa que se produce a partir del consumo de azúcares totales a causa de la concentración de nitrógeno en el medio. A partir del día 4, el consumo de azúcares se ve influenciado únicamente por el crecimiento celular, por lo que se obtuvo una  $\mu_{\max 3}$  de 0.362 día<sup>-1</sup> y la  $K_{s3}$  de 9.069 g/L, lo que indica una mayor afinidad al sustrato, comparada con la observada anteriormente.

Se puede observar que luego de los 6 días de fermentación tanto el consumo de nitrógeno como la producción de biomasa permanece constante mientras que el consumo de azúcares continúa disminuyendo. Esto permite inferir que el hongo, aprovecha a consumir los azúcares para otros procesos metabólicos que no están relacionados con el crecimiento celular. Durante estos 6 días, la producción de la biomasa se ve influenciada por el consumo de nitrógeno y azúcares totales. Por esta razón se hace la relación con el consumo de nitrógeno, como un comportamiento en donde la biomasa se produce a partir de la relación en el consumo de ambos sustratos, por lo que se representó como una suma de ambas (R1+R5). En donde R1 relaciona el consumo de nitrógeno con la producción de biomasa y R5

relaciona la biomasa que se produce a partir del consumo de azúcares totales a causa de la concentración de nitrógeno en el medio.

El consumo de nitrógeno total es independiente del consumo de azúcares totales y únicamente se relaciona con el crecimiento celular. Para este se obtienen  $\mu_{\max}$  de  $0.651 \text{ día}^{-1}$  y  $K_s$  de  $0.15 \text{ g/L}$ , lo que nos indica una alta afinidad y se relaciona con el rendimiento  $Y_{x/n}$  el cuál es de  $5.323$ . Este rendimiento es similar al obtenido con los datos globales para la fermentación (1 y 5, pues son la misma). Igualmente, el rendimiento  $Y_{x/s}$  ( $0.180 \text{ g/g}$ ) es similar al obtenido con los datos globales pues para la formulación 1 fue de  $0.186 \text{ g/g}$  y para la 5 de  $0.183 \text{ g/g}$ .

Con estas modificaciones al modelo y aplicación de distintas constantes de velocidad máxima de crecimiento celular y afinidad al sustrato en los diferentes tiempos de la fermentación, se logró ajustar en su mayoría los datos experimentales de las tres corridas con la predicción de las ecuaciones del modelo matemático. Como se puede observar en la Figura 18 los puntos experimentales se ajustan a las líneas rectas producto de la predicción con el modelo de Monod, pues los  $R^2$  se encuentran entre  $0.98$  y  $0.99$ , lo que permite obtener un modelo explicativo de los factores que influyen durante la fermentación y cómo se lleva a cabo el consumo de los sustratos con el tiempo.

Con el objetivo de encontrar una técnica que permitiera producir la mayor cantidad de biomasa o promoviera el crecimiento celular se compararon dos métodos de cultivo. Con la formulación final se determinó el crecimiento al realizar la fermentación durante 15 días en un cultivo por lotes y alimentado. La alimentación se llevó a cabo según lo observado durante la curva de crecimiento en formulación final que se realizó en triplicado, con esta se observó que en los primeros tres días de fermentación se consumían aproximadamente  $8 \text{ g/L}$  de los azúcares totales y posteriormente se consumían alrededor de  $3.5 \text{ g/L}$  cada tres días. Por esta razón para el triplicado de la fermentación alimentada se restauraban los  $8 \text{ g/L}$  de azúcares consumidos en el día 3 de la fermentación y posteriormente cada tres días se restauraban  $3.5 \text{ g/L}$  que se observó se consumían.

Cómo se puede observar en el cuadro 9. la biomasa producida en la fermentación por lotes fue de  $4.615 \pm 1.071 \text{ g/L}$ , mientras que la alimentada de  $6.385 \pm 0.325 \text{ g/L}$ , a pesar de que se obtuvo una mayor concentración en el cultivo alimentado, no se presenta una diferencia estadísticamente significativa respecto al cultivo por lotes. Tang y Zhong (2002) demostraron que la fermentación de *G.lucidum* (un hongo basidiomiceto al igual que *P.chryso sporium*) en un cultivo alimentado mejoraba la producción de biomasa pero asimismo se incrementaba la producción de exopolisacáridos y ácidos orgánicos; por lo que el sustrato se aprovecha para la producción de estos (Tang & Zhong, 2002). Además, al incrementar la disponibilidad de sustrato se incrementa la concentración de biomasa, pero esto dificulta la transferencia de oxígeno en el medio y por consecuencia se dificulta la elongación de las hifas y por consecuencia el micelio no continúa creciendo (El-Enshasy H. A., 2007).

Asimismo, se puede observar que el rendimiento de biomasa respecto a consumo de azúcares totales de la fermentación alimentada ( $0.188 \pm 0.028 \text{ g/g}$ ) es menor al de la fermentación por lotes ( $0.276 \pm 0.057 \text{ g/g}$ ), mientras que el rendimiento de producción de biomasa respecto a consumo de

nitrógeno total es mayor en la fermentación alimentada ( $10.650 \pm 0.190$  g/g) que por lotes ( $7.774 \pm 0.369$  g/g). Esto concuerda con lo anteriormente mencionado pues, el hongo al tener mayor acceso a sustrato incrementa la biomasa hasta el punto de que se dificulta la elongación de las hifas por la ausencia de oxígeno y se utiliza el sustrato para la generación de subproductos (Tang & Zhong, 2002); (El-Enshasy H. A., 2007).

Es recomendable llevar a cabo estudios genómicos para determinar exactamente el mecanismo de elongación de las hifas y producción de la biomasa. Se podría evaluar la modificación de ciertas rutas para evitar la producción de enzimas y demás proteínas que no son necesarias para el consumo del sustrato y producción de biomasa, con el objetivo de aumentar los rendimientos respecto al crecimiento celular. Asimismo, es recomendable evaluar el efecto de la oxigenación, se sabe que es un factor importante para el crecimiento de los hongos (McCoy, 2016). Para determinar las propiedades mecánicas del micelio se decidió utilizar un método basado en el procedimiento realizado por Appels, en este se hacen pruebas de tensión empleando una Zwick/Roell Z020 (máquina específica para la realización de estas) con muestras de 2 cm de ancho y 8 cm de largo de micelio de *S. commune* cultivado en medio líquido con agitación (Appels F. V., 2020). Por lo que, para mantener la misma relación, pero ajustada al tamaño de las muestras de micelio que se obtuvieron luego de la experimentación, se decidió emplear dimensiones de 1 cm de ancho y 4 cm de largo.

Como se puede observar en el Cuadro 10 de resultados, el micelio puro tiene un módulo de Young entre 0.0021-0.0027 GPa, tensión de rotura entre 0.31 y 0.64 MPa y porcentajes de elongación entre 17.5 y 28.3 %. Eso si se compara con los datos mostrados en el cuadro 1 del marco teórico (propiedades textiles) se puede observar que no es similar a las propiedades de textiles que se utilizan actualmente en la industria. A pesar de esto, si concuerda con las características de micelio elaboradas por la compañía Ecovative Design LLCs (pioneras en implementar micelio de hongo en la industria textil) en la cual, el micelio se produce en un medio sólido, el producto finalizado tiene un módulo de Young de 0.002-0.006 GPa y una tensión de rotura de 0.1-0.3 MPa. Mylea es otra empresa que elabora sustituto de cuero a partir de micelio de *G. lucidum*, el producto final tiene porcentaje de elongación de 22-35%, el cual es similar al obtenido (17.5-28.3%), aunque la tensión a la rotura de este es mayor pues ronda entre los 8 y 11 MPa; es decir que el producto de Mylea presenta elongaciones que entran en el rango del micelio producido, pero soporta mayores tensiones antes de romperse (Jones, Gandia, John, & Bismarck, 2020).

Debido a que el micelio puro no presenta características similares o cercanas a alguna de las fibras textiles expuestas en el marco teórico (ir a Cuadro 1), se trató de mejorar las características del micelio de forma química. Como se puede observar en la Figura 20, las hifas del hongo tienden a formar cadenas largas interconectadas entre sí por enlaces débiles. Por esta razón se trató de imitar el proceso industrial de curtiembre de pieles de animal para la producción de cuero en donde se utilizan taninos vegetales para otorgar resistencia al cuero. Estos taninos forman enlaces con los grupos carboxílicos de las fibras de colágeno, volviendo la piel en cuero al hacerlo más estable químicamente (Covington, 2009). Kanisha y colegas en 2022, utilizan taninos vegetales para el tratamiento de micelio y obtienen

un producto con un módulo de Young de 0.18-0.2 GPa, tensión de rotura de 2.72-6.92 MPa y porcentaje de elongación de 17% (Kanishka, y otros, 2022).

El micelio tratado con taninos vegetales presentó un módulo de Young de 0.0026 GPa, tensión de rotura de 0.18 MPa y porcentaje de elongación de 6.25%. Al compararlo con los resultados obtenidos por Kanisha y colegas en 2022, se puede determinar que el tratamiento realizado al micelio no generó resultados similares. Kanisha y colegas obtuvieron un producto con un mayor porcentaje de elongación, que soporta mayores tensiones antes de romperse y con un módulo de Young similar al del cuero. Estas diferencias pueden deberse a la especie de hongo empleada y el medio en el que se cultivó. Kanisha y colegas cultivan *R. delemar* en un medio elaborado con residuo de pan en un reactor de burbuja con aireación controlada durante toda la fermentación. Estos factores de cultivo y especie empleada hacen imposible comparar entre el micelio producido en este trabajo, cabe resaltar que no existen estudios previos en los que se trate micelio de *P.chrysosporium* con taninos vegetales u otros compuesto para mejorar las propiedades mecánicas por lo que son pocos los estudios con los que se pueden realizar comparaciones.

A partir de los resultados analizados y con el objetivo de continuar mejorando las características del micelio, se optó por tratar el micelio con agar. Actualmente la utilización de agar, alginato de sodio, almidón, etc. se evalúa para la formación de polímeros que sustituyan a los plásticos derivados de petróleo. Estos tienden a tener porcentajes de elongación de 5-30%, módulos de Young entre 0.00023-0.0066 GPa y tensiones de rotura de 2-23 MPa; los valores pueden cambiar dependiendo de la formulación que se utilice (Hernández, y otros, 2022). El micelio tratado con agar presentó un módulo de Young de 0.0037 GPa, una tensión de rotura de 2.26 MPa y un porcentaje de elongación de 57.5%. El tratar el micelio con agar permitió aumentar el porcentaje de elongación, el cual se relaciona con el cuero (ir a Cuadro 1 del marco teórico) y mejoró la tensión a la rotura. Se puede observar en el Cuadro 10 de resultados que el que soporta mayores tensiones antes de romperse es el micelio tratado con agar, luego el micelio puro y por último el micelio tratado con taninos.

Si bien los resultados de las propiedades mecánicas del micelio puro, micelio tratado con taninos y micelio tratado con agar presentan valores inferiores a comparación con fibras utilizadas actualmente en la industria, se pueden observar características parecidas y con potencial uso; pues son similares a las de compañía Ecovative Design LLCs y Mylea las cuales son empresas que actualmente fabrican ropa, carteras y demás accesorios con el micelio que producen. Debido a que es una investigación inicial de la cual hay pocos antecedentes y procedimientos de referencia se recomienda realizar un estudio de la estructura química de la superficie del micelio para poder asegurar un tratamiento químico o fisicoquímico que permita mejorar las propiedades mecánicas. Asimismo, se pueden plantear distintas formulaciones cambiando el agente plastificante por alginato de sodio o empleando taninos de diferentes fuentes (vegetal o sintéticos).

Igualmente se ha demostrado que es posible emplear micelio puro como una fibra textil, pero es necesario realizar modificaciones genéticas. En un estudio realizado por Appels se modificó genéticamente al hongo *S. commune*, en la cual suprimen la expresión del gen de hidrofobina SC3, la

ausencia de esta proteína disminuye el cross-linking entre la quitina y los beta y alfa glucanos presentes en la pared celular del hongo, por lo que se aumenta la movilidad del micelio y mejora la elasticidad, generando un micelio con un módulo de Young entre 1.237-2.727 GPa y tensión de rotura de 15.6-40.4 MPa (Appels F. V., 2020). Estas propiedades se relacionan con las del polipropileno (módulo de Young 1.1-2.0 GPa y tensión de rotura 28-40 MPa). Por lo que es posible emplear el micelio puro y mediante modificación genética generar un micelio con una estructura que pueda soportar mayores tensiones y mejorar así las propiedades mecánicas.

Además de evaluar la tensión de rotura, módulo de Young y porcentaje de elongación con distintos tratamientos, se recomienda realizar un estudio sobre las propiedades específicas como la permeabilidad, resistencia al calor, inflamabilidad, comportamiento de la fibra al someterla a humedad, inocuidad, resistencia a la contaminación por microorganismos, etc. El presente estudio puede tener una alta implicación en la industria textil, pues a las condiciones de fermentación adecuadas y con mayor investigación y experimentación en el área de tratamiento de micelio, se puede lograr producir una fibra textil con características similares a las fibras comerciales convencionales.

Se logró evaluar la producción de micelio de *P.chryso sporium* y sus propiedades mecánicas, como se mencionó anteriormente, estas presentan valores inferiores a comparación con fibras utilizadas actualmente en la industria. Pero, presentó características similares las del micelio producido por las compañías Ecovative Design LLCs y Mylea las cuales son empresas que actualmente fabrican ropa, carteras y demás accesorios con el micelio que producen. El presente estudio permite desarrollar distintas líneas de investigación en donde se evalúen métodos para el tratamiento del micelio cómo podría ser, la obtención de la quitina de la pared celular para crear fibras largas, que mediante estiramiento y torsión puedan convertirse en hilos individuales (Kanishka et al., 2022). Asimismo, abre el campo para la producción de fibras compuestas en donde se podrían emplear las fibras convencionales en conjunto con el micelio y evaluar el cambio en las propiedades mecánicas del textil que se forme al emplear distintas composiciones. A pesar de evaluar, en el presente estudio, la implementación de micelio de *P.chryso sporium* en la industria textil, su utilización no se limita únicamente a esta área. Se puede evaluar su implementación para la producción de envases, empaques, material de construcción, mobiliario y biomédica como andamios para cultivo de tejidos o parches para tratar heridas (Holt et al., 2012); (Banarjee, Paban, & Khamrai, 2018).

La utilización de micelio en la industria contribuye a la disminución de la dependencia de recursos no renovables pues se cultiva en sustratos orgánicos, por la misma razón es un material con potencial de ser biodegradable pues no se utilizan materiales sintéticos para su elaboración, el hongo crece en condiciones controladas lo que permite tener una producción más eficiente a comparación de los cultivos convencionales empleados e implica emisiones de carbono más bajas a comparación con la fabricación de materiales sintéticos (Kjellqvist, 2023). Es una tecnología aún en desarrollo perteneciente a un campo en constante crecimiento e innovación por lo que en un futuro puede llegar a ser parte del día a día.

## IX. CONCLUSIONES

- Se realizaron 6 formulaciones en medio líquido empleando sacarosa como fuente de carbono en concentraciones de 40, 60 y 80 g/L y peptona de caseína y de carne en concentraciones de 2.5, 5 y 10 g/L de cada una y empleando 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$  como elementos trazas para el crecimiento del hongo.
- A partir de las formulaciones de medios de cultivo líquido realizadas empleando sacarosa como fuente de carbono y peptona de carne y caseína como fuente de nitrógeno, se determinó que la formulación que presenta el mayor rendimiento global  $Y_{x/s}$  (0.186 g/g),  $Y_{x/N}$  (6.256 g/g) y menor concentración de subproductos y mantenimiento celular es de 40 g/L de sacarosa, 5 g/L de peptona de carne, 5 g/L peptona de caseína, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ .
- Se determinó que utilizando un modelo de Monod modificado, en función del comportamiento del crecimiento del hongo *P.chrysosporium*, con  $\mu_{\text{max}}$  de 0.651 día<sup>-1</sup>,  $K_s$  de 0.15 g/L,  $\mu_{\text{max}2}$  es de 0.560 día<sup>-1</sup>,  $K_{s2}$  de 20.076 g/L,  $\mu_{\text{max}3}$  de 0.362 día<sup>-1</sup> y  $K_{s3}$  de 9.069 g/L y constante  $\alpha$  de 1.020 permite obtener un modelo explicativo de los factores que influyen durante la fermentación y cómo se lleva a cabo el consumo de los sustratos con el tiempo.
- La biomasa producida en la fermentación por lotes fue de  $4.615 \pm 1.071$  g/L ( $Y_{x/s}$   $0.276 \pm 0.057$ ,  $Y_{x/N}$   $7.774 \pm 0.369$ ) mientras que la alimentada de  $6.385 \pm 0.325$  g/L ( $Y_{x/s}$   $0.188 \pm 0.028$ ,  $Y_{x/N}$   $10.650 \pm 0.190$ ). A pesar de que se obtuvo una mayor concentración en el cultivo alimentado, empleando la prueba t de student con una significancia de 0.05, no se presenta una diferencia estadísticamente significativa respecto al cultivo por lotes.
- El micelio puro tiene un módulo de Young entre 0.0021-0.0027 GPa, tensión de rotura entre 0.31 y 0.64 MPa y porcentajes de elongación entre 17.5 y 28.3 %. El micelio tratado con taninos vegetales presentó un módulo de Young de 0.0026 GPa, tensión de rotura de 0.18 MPa y porcentaje de elongación de 6.25%. El micelio tratado con agar presentó un módulo de Young de 0.0037 GPa, una tensión de rotura de 2.26 MPa y un porcentaje de elongación de 57.5%. El tratar el micelio con agar permitió aumentar el porcentaje de elongación y la tensión a la rotura, respecto al micelio puro y al tratado con taninos. Se puede establecer que el micelio puro y tratado no pueden sustituir directamente a las fibras textiles actuales, sin embargo, presentan características similares a productos comerciales de las empresas Ecovative Design LLCs y Mylea los cuales actualmente aplican el micelio de hongo como sustitutos a textiles.



## X. RECOMENDACIONES

- Es recomendable realizar un estudio que permita evaluar el efecto que distintas fuentes de carbono y nitrógeno tienen en la producción de biomasa y su influencia en las propiedades mecánicas del micelio.
- Estudiar distintas cepas de hongos para determinar su influencia sobre la producción de micelio y sus propiedades mecánicas.
- Estudiar la dependencia de la generación de subproductos, como enzimas y metabolitos secundarios que se generan en la reacción, en función de las condiciones del proceso y concentraciones de las especies en la mezcla reactiva para controlar el escalamiento, determinar si tienen alguna aplicación industrial.
- Desarrollar un modelo que incluya el efecto de la aireación u oxígeno disuelto, temperatura y pH con el objetivo de determinar a nivel industrial las posibles formas de mantener la oxigenación correcta para el crecimiento del micelio.
- Estudiar la composición y relación molecular de los componentes presentes en la pared celular del hongo para proponer mecanismos de modificación genética, química o fisicoquímica que impacten directamente sobre las propiedades mecánicas del micelio y que puedan ser comparables con las fibras textiles actualmente empleadas en la industria.
- Estudiar la dependencia de la biodegradabilidad, permeabilidad, resistencia al calor, inflamabilidad, comportamiento de la fibra al someterla a humedad, resistencia a la contaminación por microorganismos, etc. del micelio producido con las variables de operación, para comparar con las fibras textiles convencionales y determinar su posible aplicación como sustituto de alguna de estas.
- Evaluar métodos para disminuir el olor del biomaterial empleando agentes desodorizantes naturales y seguros que no interfieran con las propiedades del micelio.

## XI. REFERENCIAS

- Appels, F. V. (2020). *The use of fungal mycelium for the production of bio-based materials*. Utrecht, The Netherlands.: Proefschrift.
- Appels, F., & Wösten, H. (2020). *Mycelium Materials*. Utrecht University. The Netherlands: Encyclopedia of Mycology: Reference Module in Life Sciences. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21131-X>.
- Ashby, M. F., Gibson, L. J., Wegst, U., & Olive, R. (1995). *The Mechanical Properties of Natural Materials. I. Material Property Charts*. . USA: Proceedings A. doi:10.1098/rspa.1995.0075.
- ASTM D5035-06. (2008). *Standard Test Method for Breaking Force and Elongation of Textile Fabrics (Strip Method)*. ASTM international.
- Banarjee, S., Paban, P., & Khamrai, M. (2018). A sustainable production method of mycelium biomass using an isolated fungal strain *Phanerochaete chrysosporium* (accession no: KY593186): Its exploitation in wound healing patch formation. *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.013>.
- Bayer, E., & McIntyre, G. (2016). *Method for producing grown materials and products made thereby*. Ecovative Design LLC.
- Bechem, E. E. (2012). *Utilisation of organic and inorganic nitrogen sources by Scleroderma sinnamariense Mont. isolated from Gnetum africanum Welw*. Cameroon: African Journal of Biotechnology Vol. 11(38), pp. 9205-9213.
- Bechem, E. E. (2012). *Utilisation of organic and inorganic nitrogen sources by Scleroderma sinnamariense Mont. isolated from Gnetum africanum Welw*. . Buea, Cameroon: Journal of Biotechnology.
- Bowman, S., & Free, S. (2006). *The structure and synthesis of the fungal cell wall*. The University at Buffalo, NY, USA.: BioEssays, Wiley Periodicals, Inc. doi:10.1002/bies.20441.
- Burkinshaw, S. M. (2016). *Physico-chemical Aspects of Textile Coloration*. United Kingdom: Society of Dyers and Colorists.
- Carlile, M., Watkinson, S., & Gooday, G. (2001). *The Fungi*. London, UK.: Academic Press.
- Covington, A. D. (2009). *Tanning Chemistry: The Science of Leather*. UK. : Royal Society of Chemistry.
- Curran, M. A. (2010). *Biobased Materials*. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. <https://doi.org/10.1002/0471238961.biobcurr.a01>.
- El-Enshasy, H. (2007). Chapter 9-Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. En S.-T. Yang, *Bioprocessing fo value-added products from Renewable Resources*. Alexandria, Egipto: Elsevier.
- El-Enshasy, H. A. (2007). *Filamentous fungal cultures – Process characteristics, products, and applications* 225Chapter 9. *Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications*. Alexandria, Egypt: Bioprocess Development Department,.
- Ellen Macarthur Foundation. (2017). *A new textiles economy: redesigning fashions future*. USA: Circular fibres initiative.
- Elsacker, E. V. (2021). *Mycelium matters - an interdisciplinary exploration of the fabrication and properties of mycelium-based materials*. Vrije Universiteit Brussel: VUBPRESS.
- Gandia, A., Montalti, M., & Babbini, S. (20 de Junio de 2020). *Italia Patente n° WO2020/115690A1*.

- Gungor Gunduz, D. E., & Akka, N. (2005). *Mechanical Properties of Unsaturated Polyester-Isocyanate Hybrid Polymer Network and Its E-Glass Fiber-reinforced Composite*. Turkey: Journal of Composite Materials.
- Harper, C. A. (2000). *Modern Plastics Handbook*. USA: McGraw-Hill.
- Hernández, V., Ibarra, D., Triana, J. F., Martínez-Soto, B., Faúndez, M., Vasco, D. A., . . . Garmulewic, A. (2022). *Agar Biopolymer Films for Biodegradable Packaging: A Reference Dataset for Exploring the Limits of Mechanical Performance*. Chile: Materials.
- Holt, G. A., McIntyre, G., Flagg, D., Bayer, E., Wanjura, J. D., & Pelletier, M. G. (2012). Fungal Mycelium and Cotton Plant Materials in the Manufacture of Biodegradable Molded Packaging Material: Evaluation Study of Select Blends of Cotton Byproducts. *American Scientific Publishers. Journal of Biobased Materials and Bioenergy Vol. 6. No 4.* <https://doi.org/10.1166/jbmb.2012.1241>.
- Ilias, N. J. (2017). *Optimum media compositions for bioprotein production by mixed culture of Phanerochaete chrysosporium and Candida utilis using palm kernel cake and seaweed as substrates*. Malaysia: International Food Research Journal.
- Jones, M., Gandia, A., John, S., & Bismarck, A. (2020). *Leather-like material biofabrication using fungi*. London, UK: Nature Sustainability. <https://www.nature.com/articles/s41893-020-00606-1>.
- Jordi F. Pelkmans, M. B. (2017). *Transcription factors of Schizophyllum commune involved in mushroom formation and modulation of vegetative growth*. Netherlands: Scientific reports.
- Kanishka, E., Wijayarathna, B., Mohammadkhani, G., Soufiani, A. M., Adolfsson, K. H., Ferreira, J. A., . . . Zamani, A. (2022). *Fungal textile alternatives from bread waste with leather-like properties*. Suecia: Resources, Conservation and Recycling Volume 179.
- Kheiralla, Z. H., El-Din, S. M., Malek, S. M., & Aziz, D. H. (2013). *Optimization of cultural conditions for lignin peroxidase production by Phanerochaete chrysosporium and Pleurotus ostreatus*. Cairo, Egipto: Academia Journal of Biotechnology. <http://dx.doi.org/10.15413/ajb.2013.0115>.
- Lee, J. M. (2009). *Biochemical Engineering*. USA: Prentice-Hall Inc. Department of Chemical Engineering, Washington State University.
- Li, J. T.-C.-P. (2022). *The Sugar Metabolic Model of Aspergillus niger Can Only Be Reliably Transferred to Fungi of Its Phylum*. Journal of Fungi 8, no. 12: 1315. <https://doi.org/10.3390/jof8121315>.
- Liu, L., Li, H., Liu, Y., Li, Y., & Wang, H. (2020). *Whole Transcriptome Analysis Provides Insights Into the Molecular Mechanisms of Chlamydospore-Like Cell Formation in Phanerochaete chrysosporium*. Xinxiang, China: Frontiers in Microbiology. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.527389>.
- Liu, G.-Q., Ren, G.-P., & Zhao, X.-L. W. (2011). *Statistical optimization of the key medium components by response surface methodology to promote ganoderic acid formation by medicinal mushroom Ganoderma sinense in submerged culture*. China: Journal of Medicinal Plants Research.
- Liu, Y.-W., Liu, C.-M., Chen, H.-Y., Khumsupan, D., Hsu, H.-Y., Lin, H.-W., . . . Cheng, K.-C. (2023). *Optimal Production of Ganoderma formosanum Mycelium with Anti-Melanogenic Activity*. China: Fermentation.

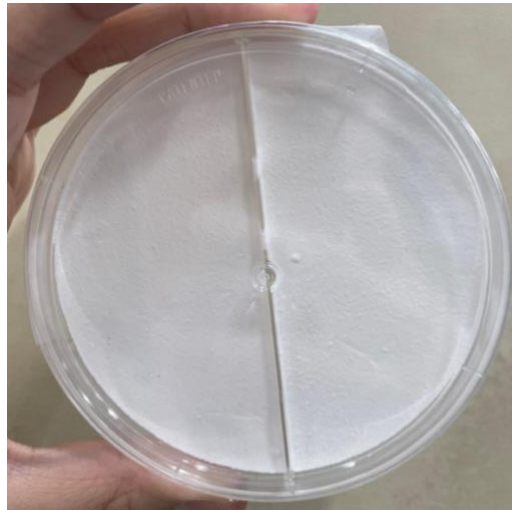
- Mayoral, E., & González, I. (2016). Bacterial Induced Cementation Processes and Mycelium Panel Growth from Agricultural Waste. *Key Engineering Materials*. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.663.42>.
- McCoy, P. (2016). *Radical Mycology: a treatise on seeing and working with fungi*. Portland, Oregon, USA.: Chthaeus Press.
- McKinsey & Company. (2020). *Fashion on climate*. Nueva York, USA.: Global Fashion Agenda. <https://www.mckinsey.com/~media/mckinsey/industries/retail/our%20insights/fashion%20on%20climate/fashion-on-climate-full-report.pdf>.
- Mihai, A., Seul, A., Curteza, A., & Costea, M. (2022). *Mechanical Parameters of Leather in Relation to Technological Processing of the Footwear Uppers*. Romania: Materials (Basel). doi: 10.3390/ma15155107. .
- Money, N. P. (2016). *Fungi: A Very Short Introduction*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.
- Nielsen, J. (2017). *Development of fungal cell factories for the production of secondary metabolites: Linking genomics and metabolism*. Suecia: Synthetic and Systems Biotechnology. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.02.002>
- Noam, A., Ofer, D., Tiffany, A., Ezri, T., Ezov, Nirit, . . . Yasha, G. (2019). Mycelium bio-composites in industrial design and architecture. *Journal of Cleaner Production*. doi:10.1016/j.jclepro.2019.119037.
- Pacheco, J. S., Santana, M., Uscanga, M. G., Garduño, A. C., Niño, J. S., Gómez, H., & Uscanga, B. A. (2015). *Ability of Phanerochaete chrysosporium and Trametes versicolor to remove Zn<sup>2+</sup>, CR<sup>3+</sup>, Pb<sup>2+</sup> metal ions*. México: Terra Latinoamericana. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792015000300189&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792015000300189&lng=es&tlng=en).
- Philipp Fesel, A. Z. (2015). *b-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants*. Cologne, Germany: Fungal Genetics and Biology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.004>.
- Raman, J., Kim, D.-S., Kim, H.-S., & Shin, D.-S. O.-J. (2022). Mycofabrication of Mycelium-Based Leather from Brown-Rot Fungi. *Journal of Fungi*. 10.3390/jof8030317.
- Rana, S., Pichandi, S., Moorthy, S., & Bhattacharya, A. (2015). *Carbon Footprint of Textile and Clothing Products*. Handbook of Sustainable Apparel Production. DOI:10.1201/b18428-10.
- Saiz-Jimenez, C. (1983). *Posibles aplicaciones del hongo Phanerochaete chrysosporium en biotecnología*. Sevilla, España: Dirección General de Medio Ambiente.
- Sato, S., Liu, F., Koc, H., & Tien, M. (2007). *Expression analysis of extracellular proteins from Phanerochaete chrysosporium grown on different liquid and solid substrates*. USA: Microbiology.
- Serra A, T. Q. (2019). *Modeling the Stiffness of Coupled and Uncoupled Recycled Cotton Fibers Reinforced Polypropylene Composites*. . Spain: Polymers (Basel). doi: 10.3390/polym11101725.
- Shanmugapriya M, L. M. (2013). *Optimization and xenobiotics degradation of newly isolated white rot fungi*. India: Discovery Publication.

- Sośnicka, A., Kózka, B., Makarova, K., Giebułtowicz, J., Klimaszewska, M., & Turło, J. (2022). *Optimization of White-Rot Fungi Mycelial Culture Components for Bioremediation of Pharmaceutical-Derived Pollutants*. Warsaw, Poland: Advances in Environmental Biotechnology.
- SpecialChem. (2019). *Modulus of Elasticity*. Omnexus.
- Stewart, B. A., Alegria, L. A., Totman, R. J., & vniel, Y. C. (23 de Septiembre de 2020). *USA Patente n° 11,118,305B2*.
- Tang, Y., & Zhong, J. (2002). *Fed-batch fermentation of Ganoderma lucidum for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid*. Enzyme Microbiology.
- Textile Exchange. (2021). *Preferred Fiber & Materials*. USA: Textile Exchange. Creating material exchange. [https://textileexchange.org/wp-content/uploads/2021/08/Textile-Exchange\\_PREFERRED-Fiber-and-Materials-Market-Report\\_2021.pdf](https://textileexchange.org/wp-content/uploads/2021/08/Textile-Exchange_PREFERRED-Fiber-and-Materials-Market-Report_2021.pdf).
- Textile Institute. (2008). *Fabric Testing*. Manchester, England: Jinlian Hu. Elsevier Science.
- UNIDO. (2017). *Leather Carbon Footprint*. United Nations Industrial Development Organization. [https://leatherpanel.org/sites/default/files/publications-attachments/leather\\_carbon\\_footprint\\_p.pdf](https://leatherpanel.org/sites/default/files/publications-attachments/leather_carbon_footprint_p.pdf).
- Water Footprint. (2017). *Water footprint: product gallery*. <https://waterfootprint.org/en/resources/interactive-tools/product-gallery/>.
- Zipser, J. (2018). *Textile raw materials and their conversion into yarns*. Forgotten Books.
- ZwickRoell. (2018). *Testing Machines and Testing Systems for Textile Materials. Testing on Textile Fabrics; Coated Textiles and Geotextiles*. Alemania: ZwickRoell. [https://www.zwickroell.com/fileadmin/content/Files/SharePoint/user\\_upload/Brochures\\_EN/Industry\\_Brochures/99\\_415\\_Testing\\_Machines\\_and\\_Testing\\_Systems\\_for\\_Textile\\_Materials\\_EN.pdf](https://www.zwickroell.com/fileadmin/content/Files/SharePoint/user_upload/Brochures_EN/Industry_Brochures/99_415_Testing_Machines_and_Testing_Systems_for_Textile_Materials_EN.pdf).
- Zárate, C., Romero, M., Niño, F., Robles, J., Linares, M., Rodríguez, M., & Gutiérrez, I. (2012). *Optimizing a culture medium for biomass and phenolic compounds production using Ganoderma lucidum*. Colombia: Universidad Javeriana.

## XII. ANEXOS

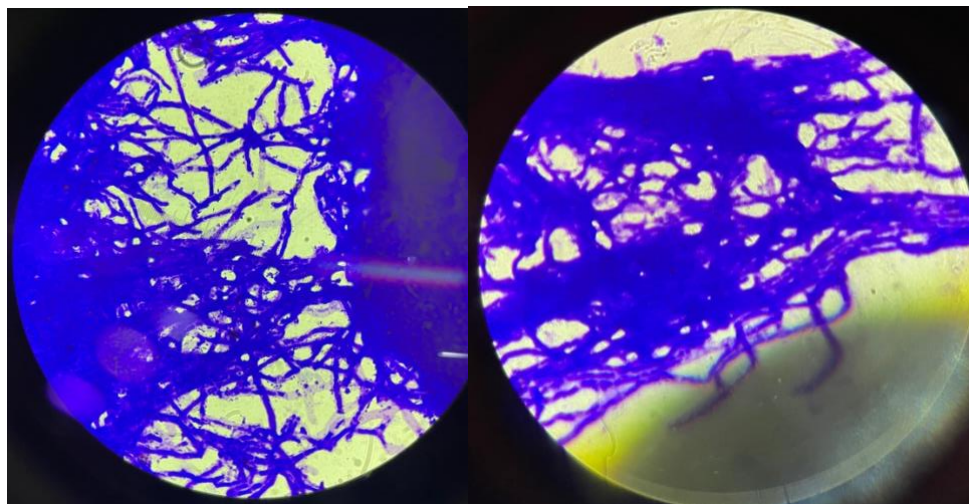
### A. Imágenes de experimentación

Figura 19. Crecimiento del hongo en placa de agar PDA.



Elaboración propia. Ubicación: Laboratorio de Bioprocesos industriales en la Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 20. Crecimiento del hongo observado en microscopio



Se pueden observar las hifas del hongo, aumento x100. Elaboración propia. Ubicación: Laboratorio de Bioprocesos industriales en la Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 21. Medio de cultivo empleando peptona de carne, peptona de caseína y sacarosa



Se puede observar los pellets que conforma el micelio al desarrollarse en el medio. Elaboración propia. Ubicación: Laboratorio de Bioprocesos industriales en la Universidad del Valle de Guatemala.

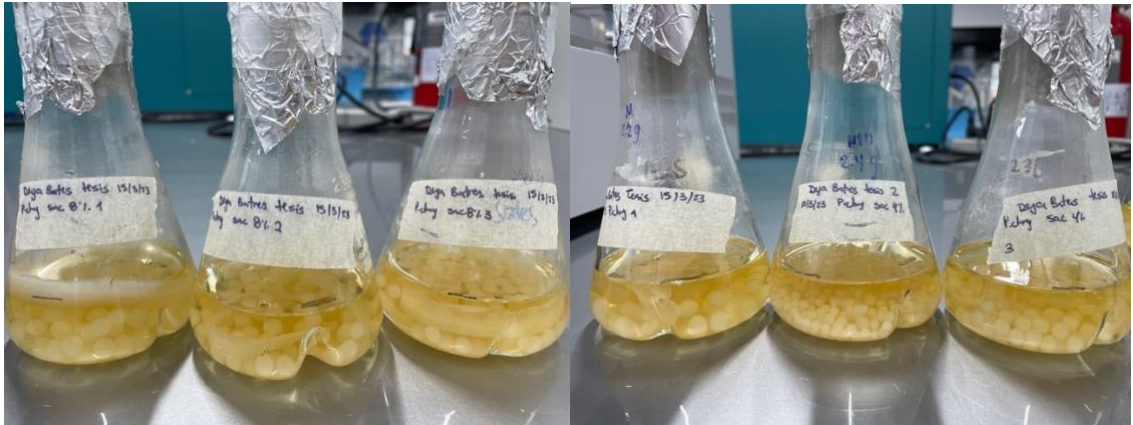
Figura 22. Curva de crecimiento inicial.



Se realizó una curva de crecimiento en formulación inicial de 60 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ , para tener una noción inicial del comportamiento del hongo en el medio. Elaboración propia. Ubicación: Laboratorio de Bioprocesos industriales en la Universidad del Valle de Guatemala.

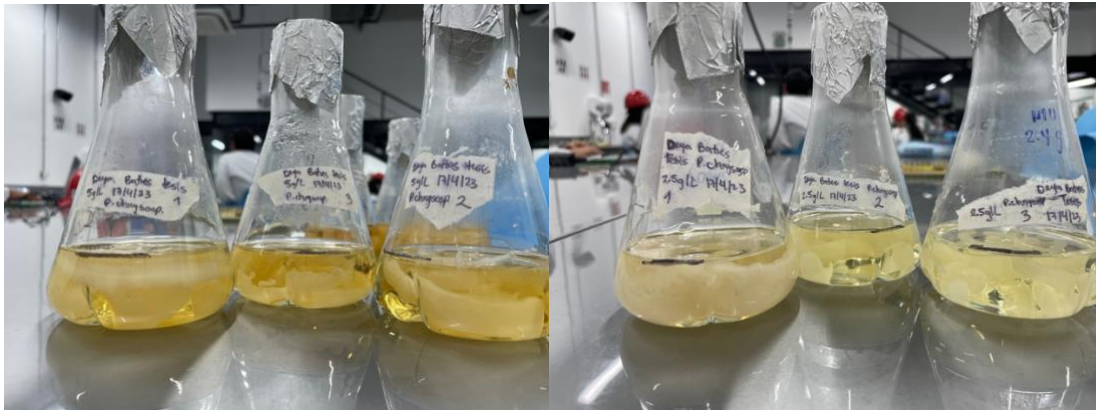


Figura 23. Fermentación de *P.chrysosporium* en medio de cultivo, variando la concentración de la fuente de carbono.



Elaboración propia. Ubicación: Laboratorio de Bioprocesos industriales en la Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 24. Fermentación de *P.chrysosporium* en medio de cultivo, variando la concentración de la fuente de nitrógeno.

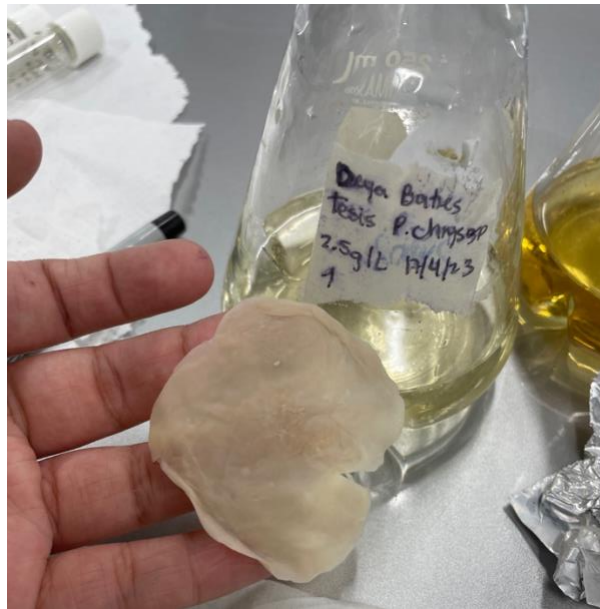






Elaboración propia. Ubicación: Laboratorio de Bioprocesos industriales en la Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 25. Micelio de *P. chrysosporium* luego de filtrar del medio de fermentación.



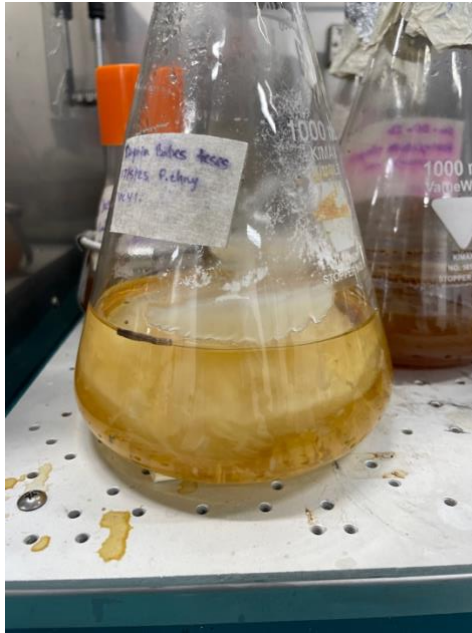
Elaboración propia. Ubicación: Laboratorio de Bioprocesos industriales en la Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 26. Micelio de *P.chrysosporium* luego de 6 días de fermentación en medio de cultivo final.



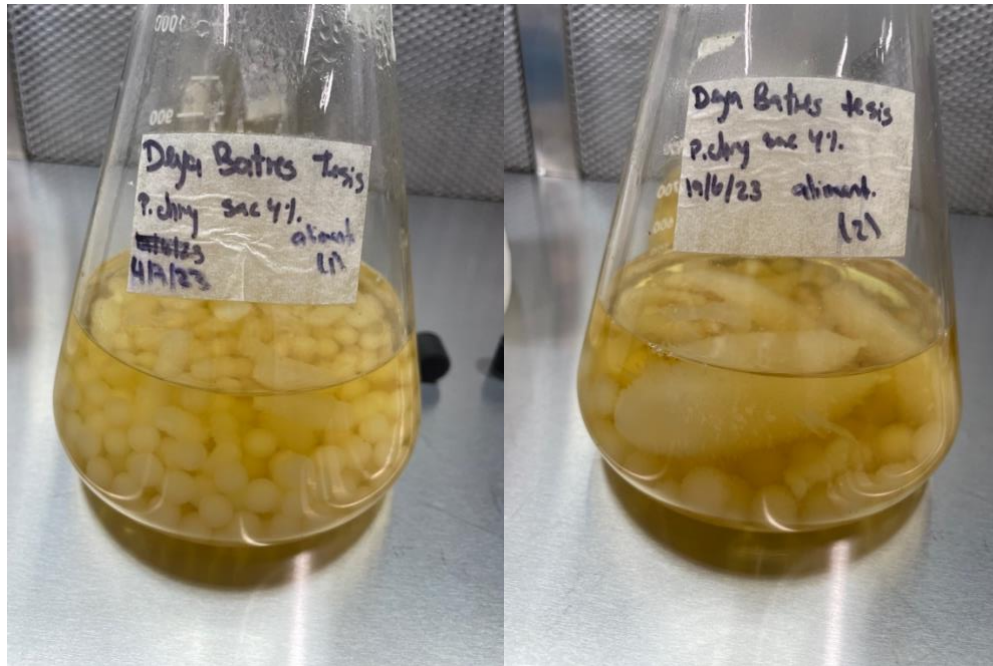
Elaboración propia. Ubicación: Laboratorio de Bioprocesos industriales en la Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 27. Fermentación de *P.chrysosporium* en medio de cultivo con formulación final empleando técnica de cultivo por lotes.



Elaboración propia. Ubicación: Laboratorio de Bioprocesos industriales en la Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 28. Fermentación de *P.chrysosporium* en medio de cultivo con formulación final empelando técnica de cultivo alimentada.



Elaboración propia. Ubicación: Laboratorio de Bioprocesos industriales en la Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 29. Micelio de *P.chrysosporium* luego del tratamiento con taninos.



Elaboración propia. Ubicación: Laboratorio de Bioprocesos industriales en la Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 30. Micelio de *P.chrysosporium* luego del tratamiento con agar.



Elaboración propia. Ubicación: Laboratorio de Bioprocesos industriales en la Universidad del Valle de Guatemala.

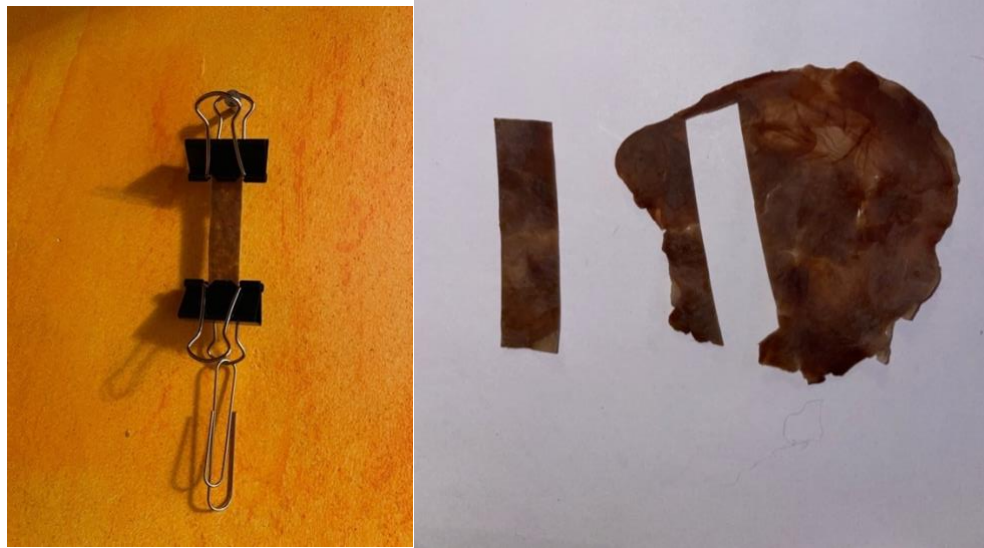
Figura 31. Pruebas de tensión a micelio de *P.chrysosporium* puro.



Elaboración propia



Figura 32. Pruebas de tensión a micelio de *P.chrysosporium* tratado con taninos.



Elaboración propia

Figura 33. Pruebas de tensión a micelio de *P.chrysosporium* tratado con agar.



Elaboración propia

## B. Datos originales

Cuadro 11. Datos originales para curva de crecimiento en formulación inicial

día	Biomasa (± 0.0001 g)	Sacarosa (± 0.00001% m/v)	Glucosa (± 0.00001% m/v)	Fructosa (± 0.00001% m/v)	Azúcares totales (± 0.000017% m/v)
0	0.003	5.721	0.722	0.217	6.66
1	0.011	2.751	0.173	0.187	3.11
2	0.028	2.688	0.183	0.185	3.06
3	0.055	2.031	0.354	0.178	2.56
4	0.097	1.515	0.313	0.153	1.98
5	0.273	1.257	0.404	0.140	1.80
6	0.315	0.310	1.000	0.401	1.71
7	0.310	1.130	0.000	0.027	1.16
8	0.179	0.096	0.000	1.022	1.12

Condiciones: 60 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ . pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C.

Cuadro 12. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando la formulación 1 en triplicado.

Triplicado	Biomasa (± 0.0001 g)	Sacarosa (± 0.00001% m/v)	Glucosa (± 0.00001% m/v)	Fructosa (± 0.00001% m/v)	Azúcares totales (± 0.000017% m/v)	Nitrógeno total (± 0.1 mg/L)
inicio	0.003	0.000	0.000	3.739	3.739	-*
1	0.249	2.417	0.000	0.000	2.417	9.8
2	0.252	0.000	2.358	0.000	2.358	9.8
3	0.263	1.811	0.579	0.000	2.391	9.7

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ . pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Los resultados obtenidos son para las tres corridas realizadas en donde se tomó el dato final luego de 6 días de incubación. \*No se cuantificó nitrógeno total inicial empleando el HACH, se tomó el dato teórico indicado por el producto (la peptona de carne contiene un 14% de nitrógeno total al igual que la de caseína).

Cuadro 13. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando la formulación 2 en triplicado.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa</b> (± 0.0001 g)	<b>Sacarosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Glucosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Fructosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Azúcares totales</b> (± 0.000017% m/v)	<b>Nitrógeno total</b> (± 0.1 mg/L)
inicio	0.003	1.849	3.987	0.000	5.836	-*
1	0.331	0.149	0.703	1.362	2.214	9.3
2	0.286	1.840	0.546	0.000	2.386	9.6
3	0.289	0.000	2.558	0.000	2.558	9.4

Condiciones: 60 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Los resultados obtenidos son para las tres corridas realizadas en donde se tomó el dato final luego de 6 días de incubación. \*No se cuantificó nitrógeno total inicial empleando el HACH, se tomó el dato teórico indicado por el producto (la peptona de carne contiene un 14% de nitrógeno total al igual que la de caseína).

Cuadro 14. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando la formulación 3 en triplicado.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa</b> (± 0.0001 g)	<b>Sacarosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Glucosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Fructosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Azúcares totales</b> (± 0.000017% m/v)	<b>Nitrógeno total</b> (± 0.1 mg/L)
inicio	0.003	3.234	5.280	0.000	8.514	-*
1	0.347	2.673	1.284	0.000	3.957	9.0
2	0.356	1.938	1.865	0.000	3.803	9.0
3	0.454	0.326	0.000	3.049	3.374	8.8

Condiciones: 80 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Los resultados obtenidos son para las tres corridas realizadas en donde se tomó el dato final luego de 6 días de incubación. \*no se cuantificó nitrógeno total inicial empleando el HACH, se tomó el dato teórico indicado por el producto (la peptona de carne contiene un 14% de nitrógeno total al igual que la de caseína)

Cuadro 15. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando la formulación 4 en triplicado.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa</b> (± 0.0001 g)	<b>Sacarosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Glucosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Fructosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Azúcares totales</b> (± 0.000017% m/v)	<b>Nitrógeno total</b> (± 0.1 mg/L)
inicio	0.003	2.718	0.708	0.228	3.653	-*
1	0.267	1.141	0.470	0.168	1.779	2.2
2	0.246	1.805	0.000	0.000	1.805	2.3
3	0.231	0.934	0.898	0.000	1.833	2.3

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 2.5 g/L peptona de caseína, 2.5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Los resultados obtenidos son para las tres corridas realizadas en donde se tomó el dato final luego de 6 días de incubación. \*no se cuantificó nitrógeno total inicial empleando el HACH, se tomó el dato teórico indicado por el producto (la peptona de carne contiene un 14% de nitrógeno total al igual que la de caseína)

Cuadro 16. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando la formulación 5 en triplicado.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa</b> (± 0.0001 g)	<b>Sacarosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Glucosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Fructosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Azúcares totales</b> (± 0.000017% m/v)	<b>Nitrógeno total</b> (± 0.1 mg/L)
inicio	0.003	2.794	0.695	0.211	3.699	-*
1	0.285	1.259	0.611	0.205	2.075	9.4
2	0.303	1.337	0.423	0.175	1.934	9.3
3	0.297	1.953	0.320	0.000	2.273	9.3

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Los resultados obtenidos son para las tres corridas realizadas en donde se tomó el dato final luego de 6 días de incubación. \*no se cuantificó nitrógeno total inicial empleando el HACH, se tomó el dato teórico indicado por el producto (la peptona de carne contiene un 14% de nitrógeno total al igual que la de caseína)



Cuadro 17. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando la formulación 6 en triplicado.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa (± 0.0001 g)</b>	<b>Sacarosa (± 0.00001% m/v)</b>	<b>Glucosa (± 0.00001% m/v)</b>	<b>Fructosa (± 0.00001% m/v)</b>	<b>Azúcares totales (± 0.000017% m/v)</b>	<b>Nitrógeno total (± 0.1 mg/L)</b>
inicio	0.003	2.875	0.738	0.235	3.847	-*
1	0.261	1.395	0.552	0.014	1.961	17.2
2	0.264	1.879	0.000	0.000	1.879	17.2
3	0.277	1.270	0.399	0.171	1.841	17.1

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 10 g/L peptona de caseína, 10 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Los resultados obtenidos son para las tres corridas realizadas en donde se tomó el dato final luego de 6 días de incubación. \*no se cuantificó nitrógeno total inicial empleando el HACH, se tomó el dato teórico indicado por el producto (la peptona de carne contiene un 14% de nitrógeno total al igual que la de caseína)

Cuadro 18. Curva de crecimiento en formulación final en triplicado

<b>día</b>	<b>Biomasa (± 0.0001 g)</b>	<b>Sacarosa (± 0.00001% m/v)</b>	<b>Glucosa (± 0.00001% m/v)</b>	<b>Fructosa (± 0.00001% m/v)</b>	<b>Azúcares totales (± 0.000017% m/v)</b>	<b>Nitrógeno total (± 0.1 mg/L)</b>
	0.003	2.795	0.913	0.000	3.709	
0	0.003	3.872	0.000	0.000	3.872	-*
	0.003	3.669	0.050	0.000	3.719	
	0.036	1.986	1.044	0.000	3.030	
1	0.033	0.249	1.528	1.617	3.394	13.9
	0.028	0.255	1.533	1.335	3.123	
	0.090	1.815	1.017	0.000	2.833	
2	0.071	0.233	1.449	1.414	3.096	13.5
	0.072	0.259	1.501	1.314	3.073	
	0.111	1.867	0.632	0.237	2.736	
3	0.098	0.226	1.434	1.393	3.054	13.2
	0.088	0.224	1.445	1.385	3.054	

día	Biomasa (± 0.0001 g)	Sacarosa (± 0.00001% m/v)	Glucosa (± 0.00001% m/v)	Fructosa (± 0.00001% m/v)	Azúcares totales (± 0.000017% m/v)	Nitrógeno total (± 0.1 mg/L)
4	0.179	1.765	0.939	0.000	2.704	11.6
	0.144	0.202	1.383	1.419	3.005	
	0.124	0.246	1.455	1.320	3.020	
5	0.243	1.907	0.567	0.000	2.474	11.0
	0.241	0.188	1.369	1.412	2.970	
	0.244	0.240	1.460	1.112	2.813	
6	0.283	1.867	0.581	0.000	2.448	9.4
	0.248	0.169	1.234	1.221	2.623	
	0.262	0.233	1.446	1.038	2.717	
7	0.283	1.102	0.897	0.204	2.203	9.0
	0.269	0.164	1.212	1.090	2.466	
	0.259	0.187	1.063	1.106	2.356	
8	0.280	0.975	0.909	0.256	2.139	9.0
	0.271	0.173	1.175	1.115	2.463	
	0.265	0.224	1.094	1.025	2.343	
9	0.284	0.912	1.210	0.000	2.122	8.1
	0.282	0.167	1.086	1.001	2.255	
	0.265	0.186	1.087	1.036	2.309	

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ . pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. \*no se cuantificó nitrógeno total inicial empleando el HACH, se tomó el dato teórico indicado por el producto (la peptona de carne contiene un 14% de nitrógeno total al igual que la de caseína)

Cuadro 19. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando fermentación por lotes.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa</b> (± 0.0001 g)	<b>Sacarosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Glucosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Fructosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Azúcares totales</b> (± 0.000017% m/v)	<b>Nitrógeno total</b> (± 0.1 mg/L)
inicio	0.015	3.633	0.247	0.000	3.880	-*
1	1.827	0.654	0.458	1.346	2.458	9.2
2	2.885	0.000	1.420	0.000	1.420	7.0
3	2.210	0.000	0.045	2.544	2.589	8.2

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. \*no se cuantificó nitrógeno total inicial empleando el HACH, se tomó el dato teórico indicado por el producto (la peptona de carne contiene un 14% de nitrógeno total al igual que la de caseína). Datos obtenidos de la fermentación de *P. chrysosporium* en el medio mencionado durante 15 días a escala de 500 mL.

Cuadro 20. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando fermentación alimentada.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa</b> (± 0.0001 g)	<b>Sacarosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Glucosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Fructosa</b> (± 0.00001% m/v)	<b>Azúcares totales</b> (± 0.000017% m/v)	<b>Nitrógeno total</b> (± 0.1 mg/L)
inicio	0.015	2.181	0.869	0.684	3.734	-*
1	3.372	1.409	0.000	0.000	1.409	7.8
2	3.150	0.153	1.123	1.116	2.392	8.0
3	3.056	0.032	1.599	0.000	1.631	8.3

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. \*no se cuantificó nitrógeno total inicial empleando el HACH, se tomó el dato teórico indicado por el producto (la peptona de carne contiene un 14% de nitrógeno total al igual que la de caseína). Datos obtenidos de la fermentación de *P. chrysosporium* en el medio mencionado durante 15 días a escala de 500 mL.

Cuadro 21. Datos originales de las pruebas de tensión aplicadas a micelio en triplicado.

	<b>Masa (<math>\pm 0.0001</math> g)</b>	<b>largo (<math>\pm 0.05</math> cm)</b>
		4.10
1	3.543	4.00
		4.00
		4.15
2	13.687	4.00
		4.00
		4.20
3	23.814	4.05
		4.02
		4.25
4	33.560	4.05
		4.02
		4.30
5	43.537	4.10
		4.05
		4.60
6	93.583	4.35
		4.08
		4.65
7	143.495	4.45
		4.20
		4.98
8	243.562	4.75
		4.35

	<b>Masa (<math>\pm 0.0001</math> g)</b>	<b>largo (<math>\pm 0.05</math> cm)</b>
		5.10
9	293.562	4.80
		4.55
		5.15
10	303.496	4.86
		4.70

Longitud de micelio a someterlo a tensión con distintas masas. El micelio empleado para la primera corrida era de 4x1x0.047 cm (largo x ancho x grosor), el de la segunda corrida era de 4x1x0.063 cm y el de la tercera de 4x1x0.097 cm.

Cuadro 22. Datos originales de las pruebas de tensión aplicadas a micelio tratado con taninos

	<b>Masa (<math>\pm 0.0001</math> g)</b>	<b>largo (<math>\pm 0.05</math> cm)</b>
1	3.543	4.00
2	13.687	4.05
3	23.814	4.10
4	33.560	4.15
5	43.537	4.18
6	93.583	4.25

Longitud de micelio a someterlo a tensión con distintas masas. El micelio empleado era de 4x1x0.05 cm (largo x ancho x grosor).

Cuadro 23. Datos originales de las pruebas de tensión aplicadas a micelio tratado con agar

	<b>Masa (<math>\pm 0.0001</math> g)</b>	<b>largo (<math>\pm 0.05</math> cm)</b>
1	3.543	4.02
2	13.687	4.05
3	23.814	4.05
4	33.560	4.10
5	43.537	4.30
6	93.583	4.35
7	143.495	4.50
8	243.562	4.80
9	293.562	5.00
10	303.496	5.15
11	347.033	5.35
12	440.616	5.47
13	584.111	5.75
14	827.673	6.10
15	971.168	6.15
16	1014.705	6.30

Longitud de micelio a someterlo a tensión con distintas masas. El micelio empleado era de 4x1x0.044 cm (largo x ancho x grosor).

## C. Cálculos de muestra

### Cálculo 1. Concentración de biomasa

Para determinar la concentración de biomasa se utiliza la siguiente ecuación:

Ecuación 10. Determinación de la concentración de biomasa a partir del peso seco

$$X = \frac{m}{v}$$

Donde:

X= concentración de biomasa (g/L)

m= peso seco de la biomasa (g)

v= volumen de fermentación (L)

Empleando los datos del Cuadro 12 (corrida 2) de datos originales se obtiene:

$$X = \frac{0.252 \text{ g}}{0.100 \text{ L}} = 2.49 \text{ g/L}$$

### Cálculo 2. Concentración de azúcares

Para determinar la concentración de azúcares se utiliza la siguiente ecuación:

Ecuación 11. Determinación de la concentración de azúcares a partir del porcentaje m/v obtenido mediante HPLC

$$S = \frac{\% m/v}{100} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}}$$

Donde:

S= concentración de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa) (g/L)

% m/v = porcentaje masa-volumen (g/mL)

Empleando los datos del Cuadro 13 (corrida 1) de datos originales se obtiene:

$$S = \frac{0.149269 \% \frac{m}{v} \text{ sacarosa}}{100} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 1.49269 \text{ g/L}$$

### Cálculo 3. Concentración de azúcares totales

Para determinar la concentración de azúcares se utiliza la siguiente ecuación:

Ecuación 12. Determinación de la concentración de azúcares totales

$$S_T = S_{sacarosa} + S_{glucosa} + S_{fructosa}$$

Donde:

$S_T$  = concentración azúcares totales (g/L)

$S_{sacarosa}$  = concentración sacarosa (g/L)

$S_{glucosa}$  = concentración glucosa (g/L)

$S_{fructosa}$  = concentración fructosa (g/L)

Empleando los datos del Cuadro 13 (corrida 1) de datos originales se obtiene:

$$S_T = 1.49269 \text{ g/L} + 7.03143 \text{ g/L} + 13.618 \text{ g/L} = 22.14212 \text{ g/L}$$

### Cálculo 4. Concentración de nitrógeno total

Para determinar la concentración de nitrógeno total se utiliza la siguiente ecuación:

Ecuación 13. Determinación de la concentración de nitrógeno total a partir de cuantificación por colorimetría con una dilución 1:100

$$N_T = N_{HACH} * 100 * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}}$$

Donde:

$N_T$  = concentración nitrógeno total (g/L)

$N_{HACH}$  = concentración nitrógeno total cuantificado por colorimetría (mg/L)

Empleando los datos del Cuadro 13 (corrida 1) de datos originales se obtiene:

$$N_T = 9.3 \text{ mg N/L} * 100 * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0.93 \text{ g N/L}$$



**Cálculo 5. Determinación del rendimiento de concentración de biomasa (micelio) respecto al consumo de fuente de carbono ( $Y_{x/s}$ )**

Para determinar del rendimiento de concentración de biomasa (micelio) respecto al consumo de fuente de carbono se utiliza la siguiente ecuación:

Ecuación 14. Rendimiento de concentración de biomasa (micelio) respecto al consumo de fuente de carbono ( $Y_{x/s}$ )

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S_T}$$

Donde:

$\Delta X$  = cambio de concentración de biomasa (g/L)

$\Delta S_T$  = cambio de concentración de sustrato, es decir, cambio de concentración de los azúcares totales (g/L)

Empleando los datos del Cuadro 13 (corrida 1) de datos originales se obtiene:

$$Y_{x/s} = \frac{(3.31 - 0.03) \text{ g biomasa /L}}{(22.14 - 58.36) \text{ g azúcares totales /L}} = 0.091 \frac{\text{g biomasa}}{\text{g azúcares totales}}$$

**Cálculo 6. Determinación del rendimiento de concentración de biomasa (micelio) respecto al consumo de nitrógeno total ( $Y_{x/N}$ )**

Para determinar del rendimiento de concentración de biomasa (micelio) respecto al consumo de fuente de nitrógeno se utiliza la siguiente ecuación:

Ecuación 15. Rendimiento de concentración de biomasa (micelio) respecto al consumo de nitrógeno total ( $Y_{x/s}$ )

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta N_T}$$

Donde:

$\Delta X$  = cambio de concentración de biomasa (g/L)

$\Delta N_T$  = cambio de concentración de nitrógeno total (g/L)

Empleando los datos del Cuadro 13 (corrida 1) de datos originales se obtiene:

$$Y_{x/s} = \frac{(3.31 - 0.03) \text{ g biomasa /L}}{(0.93 - 1.40) \text{ g azúcares totales /L}} = 6.978 \frac{\text{g biomasa}}{\text{g azúcares totales}}$$

### **Cálculo 7. Balance de masa global**

Para determinar el balance de masa global para cada formulación se empleó la siguiente ecuación:

Ecuación 16. Determinación de balance global

$$A = E - S$$

Donde:

A = Acumulación en el sistema (g/L)

E = entradas al sistema (g/L)

S = salidas del sistema (g/L)

Empleando los datos del Cuadro 16 de resultados se obtiene:

Entradas = sustrato alimentado al sistema e inóculo inicial

$$E = 37.392 \text{ g/L azúcares totales} + 1.400 \text{ g/L nitrógeno total} + 0.030 \text{ g/L biomasa} = 38.822 \text{ g/L}$$

Salidas = sustrato no consumido + biomasa

$$S = 23.884 \text{ g/L azúcares totales} + 0.977 \text{ g/L nitrógeno total} + 2.547 \text{ g/L biomasa} = 27.407 \text{ g/L}$$

Acumulado = mantenimiento celular + subproductos

$$A = 38.822 \text{ g/L} - 27.407 = 11.414 \text{ g/L}$$

### **Cálculo 8. Determinación de la tensión**

Para calcular la tensión se utiliza la ecuación 1 presentada en el marco teórico.

Ecuación 1. Cálculo para determinar la tensión

$$\sigma = \frac{F (N)}{A (mm^2 \text{ o } m^2)}$$

Donde:

F = fuerza

A = área transversal de la muestra (grosor\*ancho)

Empleando los datos del Cuadro 21 se obtiene:

$$\sigma = \frac{0.003543 \text{ kg} * 9.80665 \text{ m/s}^2 (N)}{0.00047 * 0.01 (m^2)} = 7392.54 \text{ Pa ó } (N/m^2)$$

### **Cálculo 9. Determinación de la extensión por unidad de longitud**

Para calcular la tensión se utiliza la ecuación 2 presentada en el marco teórico.

Ecuación 2. Cálculo para determinar la extensión por unidad de longitud

$$\varepsilon = \frac{L_f - L_o}{L_o}$$

Donde:

$L_f$  = Longitud luego de la aplicación de la fuerza al material

$L_o$  = Longitud del material antes de aplicar la fuerza

Empleando los datos del Cuadro 21 se obtiene:

$$\varepsilon = \frac{(4.15 - 4.1) \text{ cm}}{4.1 \text{ cm}} = 0.0375$$

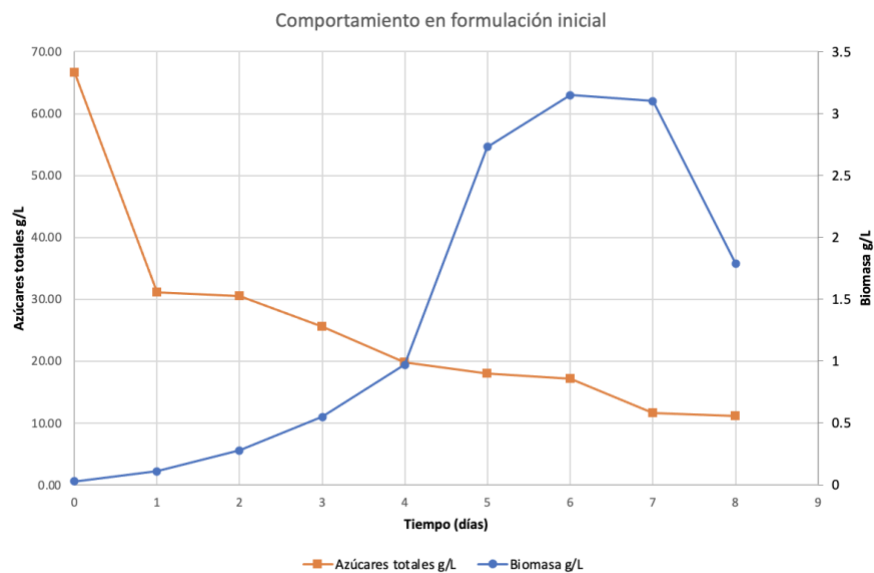
## D. Datos calculados

Cuadro 24. Curva de crecimiento en formulación inicial

día	Biomasa (g/L)	Sacarosa ( $\pm 0.0001$ g/L)	Glucosa ( $\pm 0.0001$ g/L)	Fructosa ( $\pm 0.0001$ g/L)	Azúcares totales ( $\pm 0.00017$ g/L)
0	0.03 $\pm$ 0.002	57.21	7.22	2.17	66.60
1	0.11 $\pm$ 0.006	27.51	1.73	1.87	31.12
2	0.28 $\pm$ 0.014	26.88	1.83	1.85	30.56
3	0.55 $\pm$ 0.028	20.31	3.54	1.78	25.63
4	0.97 $\pm$ 0.049	15.15	3.13	1.53	19.81
5	2.73 $\pm$ 0.137	12.57	4.04	1.40	18.01
6	3.15 $\pm$ 0.158	3.10	10.00	4.01	17.11
7	3.10 $\pm$ 0.155	11.30	0.00	0.27	11.56
8	1.79 $\pm$ 0.090	0.96	0.00	10.22	11.18

Condiciones: 6 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ . pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C.

Figura 34. Curva de crecimiento empleando formulación inicial



Condiciones: 6 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ . pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Se elaboró la curva empleando

los datos del cuadro anterior. Las líneas representan una tendencia suavizada, los puntos corresponden a los datos experimentales.

Cuadro 25. Azúcares fermentables y nitrógeno total consumido durante la formulación 1 en triplicado.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>	<b>Sacarosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Glucosa (±0.0001 g/L)</b>	<b>Fructosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Azúcares totales (± 0.00017 g/L)</b>	<b>Nitrógeno total (± 0.01 g/L)</b>	<b>Y<sub>x/s</sub> (g/g)</b>	<b>Y<sub>x/N</sub> (g/g)</b>
inicio	0.03 ± 0.002	0.00	0.00	37.39	37.39	1.40	-	
1	2.49 ± 0.125	24.17	0.00	0.00	24.17	0.98	0.186 ± 0.009	5.857 ± 0.323
2	2.52 ± 0.126	0.00	23.58	0.00	23.58	0.98	0.180 ± 0.009	5.928 ± 0.332
3	2.63 ± 0.132	18.11	5.79	0.00	23.91	0.97	0.193 ± 0.010	6.046 ± 0.337

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Los resultados obtenidos son para las tres corridas realizadas en donde se tomó el dato final luego de 6 días de incubación.

Cuadro 26. Azúcares fermentables y nitrógeno total consumido durante la formulación 2 en triplicado.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>	<b>Sacarosa (±0.0001 g/L)</b>	<b>Glucosa (±0.0001 g/L)</b>	<b>Fructosa (±0.0001 g/L)</b>	<b>Azúcares totales (±0.00017 g/L)</b>	<b>Nitrógeno total (± 0.01g/L)</b>	<b>Y<sub>x/s</sub> (g/g)</b>	<b>Y<sub>x/N</sub> (g/g)</b>
inicio	0.03 ± 0.002	18.49	39.87	0.00	58.36	1.40	-	
1	3.31 ± 0.166	1.49	7.03	13.62	22.14	0.93	0.091 ± 0.005	6.979 ± 0.382
2	2.86 ± 0.143	18.40	5.46	0.00	23.86	0.96	0.082 ± 0.004	6.432 ± 0.356
3	2.89 ± 0.145	0.00	25.58	0.00	25.58	0.94	0.087 ± 0.004	6.217 ± 0.342

Condiciones: 60 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Los resultados obtenidos son para las tres corridas realizadas en donde se tomó el dato final luego de 6 días de incubación.

Cuadro 27. Azúcares fermentables y nitrógeno total consumido durante la formulación 3 en triplicado.

Triplicado	Biomasa (g/L)	Sacarosa ( $\pm 0.0001$ g/L)	Glucosa ( $\pm 0.0001$ g/L)	Fructosa ( $\pm 0.0001$ g/L)	Azúcares totales ( $\pm 0.00017$ g/L)	Nitrógeno total ( $\pm 0.01$ g/L)	Yx/s (g/g)	Yx/N (g/g)
inicio	0.03 $\pm$ 0.002	32.34	5.280	0.00	85.14	1.40	-	
1	3.47 $\pm$ 0.174	26.73	12.84	0.00	39.57	0.90	0.075 $\pm$ 0.004	6.880 $\pm$ 0.373
2	3.56 $\pm$ 0.178	19.38	18.65	0.00	38.03	0.90	0.075 $\pm$ 0.004	7.060 $\pm$ 0.383
3	4.54 $\pm$ 0.227	3.26	0.00	30.49	33.74	0.88	0.088 $\pm$ 0.004	8.673 $\pm$ 0.467

Condiciones: 80 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $\text{ZnSO}_4$ . pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Los resultados obtenidos son para las tres corridas realizadas en donde se tomó el dato final luego de 6 días de incubación.

Cuadro 28. Análisis estadístico por prueba F para varianza de dos muestras para determinar si la varianza igual o desigual con significancia de 0.05, en las fermentaciones donde se varia la concentración de la fuente de carbono.

Comparación de concentraciones de sacarosa g/L	Biomasa (g/L)			Fcrítico	F	P	Conclusión
40	2.49	2.52	2.63	0.053	0.086	0.079	D
60	3.31	2.86	2.89				
40	2.49	2.52	2.63	0.053	0.015	0.015	D
80	3.47	3.56	4.54				
60	3.31	2.86	2.89	0.053	0.18	0.15	D
80	3.47	3.56	4.54				

\*D: varianzas desiguales. La determinación de varianzas iguales o desiguales entre los datos se utiliza para realizar el análisis estadístico por prueba t de Student. Se puede observar que las varianzas son desiguales.

Cuadro 29. Análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias obtenidas en las fermentaciones donde se varia la concentración de la fuente de carbono para evaluar el efecto de estas sobre la producción de biomasa con significancia de 0.05.

<b>Comparación de concentraciones de sacarosa g/L</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>			<b>Terítico</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>Conclusión</b>
40	2.49	2.52	2.63	4.303	3.123	0.088	NDS
60	3.31	2.86	2.89				
40	2.49	2.52	2.63	4.303	3.794	0.063	NDS
80	3.47	3.56	4.54				
60	3.31	2.86	2.89	3.182	2.248	0.110	NDS
80	3.47	3.56	4.54				

\*NDS: No presenta diferencia estadísticamente significativa. En los tres análisis se empleó la configuración de prueba t de Student para dos muestras suponiendo varianzas desiguales debido al resultado obtenido en el cuadro anterior. Se puede observar que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los datos en triplicado obtenidos para cada una de las formulaciones, en donde se modifica la fuente de carbono, respecto cantidad de biomasa producida.

Cuadro 30. Azúcares fermentables y nitrógeno total consumido durante la formulación 4 en triplicado.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>	<b>Sacarosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Glucosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Fructosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Azúcares totales (± 0.00017 g/L)</b>	<b>Nitrógeno total (± 0.01 g/L)</b>	<b>Yx/s (g/g)</b>	<b>Yx/N (g/g)</b>
inicio	0.03 ± 0.002	27.18	7.08	2.28	36.53	0.70	-	-
1	2.67 ± 0.134	11.41	4.70	1.68	17.79	0.22	0.141 ± 0.007	5.500 ± 0.301
2	2.46 ± 0.123	18.05	0.00	0.00	18.05	0.23	0.131 ± 0.007	5.170 ± 0.284
3	2.31 ± 0.116	9.34	8.98	0.00	18.33	0.24	0.125 ± 0.006	4.957 ± 0.273

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 2.5 g/L peptona de caseína, 2.5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Los resultados obtenidos son para las tres corridas realizadas en donde se tomó el dato final luego de 6 días de incubación.

Cuadro 31. Azúcares fermentables y nitrógeno total consumido durante la formulación 5 en triplicado.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>	<b>Sacarosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Glucosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Fructosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Azúcares totales (± 0.00017 g/L)</b>	<b>Nitrógeno total (± 0.01 g/L)</b>	<b>Yx/s (g/g)</b>	<b>Yx/N (g/g)</b>
inicio	0.03 ± 0.002	27.94	6.95	2.11	36.99	1.4	-	-
1	2.85 ± 0.143	12.59	6.11	2.05	20.75	0.94	0.174 ± 0.009	6.130 ± 0.337
2	3.03 ± 0.152	13.37	4.23	1.75	19.34	0.93	0.170 ± 0.009	6.383 ± 0.350
3	2.97 ± 0.149	19.53	3.20	0.00	22.73	0.93	0.206 ± 0.010	6.255 ± 0.343

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Los resultados obtenidos son para las tres corridas realizadas en donde se tomó el dato final luego de 6 días de incubación.

Cuadro 32. Azúcares fermentables y nitrógeno total consumido durante la formulación 6 en triplicado.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>	<b>Sacarosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Glucosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Fructosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Azúcares totales (± 0.00017 g/L)</b>	<b>Nitrógeno total (± 0.01 g/L)</b>	<b>Yx/s (g/g)</b>	<b>Yx/N (g/g)</b>
inicio	0.03 ± 0.002	28.75	7.38	2.35	38.47	2.8	-	-
1	2.61 ± 0.131	13.95	5.52	0.14	19.61	1.72	0.137 ± 0.007	2.389 ± 0.123
2	2.64 ± 0.132	18.79	0.00	0.00	18.79	1.72	0.133 ± 0.007	2.417 ± 0.124
3	2.77 ± 0.139	12.70	3.99	1.71	18.41	1.71	0.137 ± 0.007	2.514 ± 0.129

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 10 g/L peptona de caseína, 10 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. Los resultados obtenidos son para las tres corridas realizadas en donde se tomó el dato final luego de 6 días de incubación.



Cuadro 33. Análisis estadístico por prueba F para varianza de dos muestras para determinar si la varianza igual o desigual con significancia de 0.05, en las fermentaciones donde se varia la concentración de la fuente de nitrógeno.

<b>Comparación de concentraciones de nitrógeno g/L</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>			<b>Fcritico</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>Conclusión</b>
2.5 5.0	2.67 2.85	2.46 3.03	2.31 2.97	19	3.893	0.204	I
2.5 10.0	2.67 2.61	2.46 2.64	2.31 2.77	19	4.521	0.181	I
5.0 10.0	2.85 2.61	3.03 2.64	2.97 2.77	19	1.161	0.463	I

\*I: varianzas iguales. La determinación de varianzas iguales o desiguales entre los datos se utiliza para realizar el análisis estadístico por prueba t de Student. Se puede observar que las varianzas son iguales.

Cuadro 34. Análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias obtenidas en las fermentaciones donde se varia la concentración de la fuente de nitrógeno para evaluar el efecto de estas sobre la producción de biomasa con significancia de 0.05.

<b>Comparación de concentraciones de nitrógeno g/L</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>			<b>Tcritico</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>Conclusión</b>
2.5 5.0	2.67 2.85	2.46 3.03	2.31 2.97	2.776	3.123	0.016	DS
2.5 10.0	2.67 2.61	2.46 2.64	2.31 2.77	2.776	3.794	0.169	NDS
5.0 10.0	2.85 2.61	3.03 2.64	2.97 2.77	2.776	0.018	0.110	DS

\*NDS: No presenta diferencia estadísticamente significativa. DS: Si presenta diferencia estadísticamente significativa. Para los tres análisis se empleó la configuración de prueba t de Student para dos muestras suponiendo varianzas iguales debido al resultado obtenido en el cuadro anterior.

Cuadro 35. Análisis estadístico por prueba F para varianza de dos muestras para determinar si la varianza igual o desigual con significancia de 0.05, al emplear la formulación 1 y 5.

				<b>Fcrítico</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>Conclusión</b>
Yx/s (g/g) formulación 1	0.186	0.180	0.193	0.053	0.099	0.090	D
Yx/s (g/g) formulación 5	0.174	0.170	0.206				
Yx/N (g/g) formulación 1	5.857	5.929	6.147	0.053	0.573	0.364	D
Yx/N (g/g) formulación 5	6.130	6.383	6.255				
Biomasa(g/L)formulación 1	2.490	2.520	2.630	0.053	0.647	0.392	D
Biomasa(g/L)formulación 5	2.850	3.030	2.970				

\*D: varianzas desiguales. La determinación de varianzas iguales o desiguales entre los datos se utiliza para realizar el análisis estadístico por prueba t de Student. Se puede observar que las varianzas son iguales.

Cuadro 36. Análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias obtenidas en los rendimientos de las fermentaciones 1 y 5

	<b>Rendimiento (g/g)</b>			<b>Tcrítico</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>Conclusión</b>
Yx/s formulación 1	0.186	0.180	0.193	4.30	0.253	0.824	NDS
Yx/s formulación 5	0.174	0.170	0.206				
Yx/N formulación 1	5.857	5.929	6.147	2.77	2.45	0.069	NDS
Yx/N formulación 5	6.130	6.383	6.255				
Biomasa(g/L)formulación1	2.490	2.520	2.630	2.77	5.939	0.004	DS
Biomasa(g/L)formulación5	2.850	3.030	2.970				

\*NDS: No presenta diferencia estadísticamente significativa. DS: Si presenta diferencia estadísticamente significativa. Para los tres análisis se empleó la configuración de prueba t de Student para dos muestras suponiendo varianzas iguales debido al resultado obtenido en el cuadro anterior.

Cuadro 37. Curva de crecimiento en formulación final en triplicado

día	Biomasa (± 0.0001 g)	Sacarosa (± 0.0001 g/L)	Glucosa (± 0.0001 g/L)	Fructosa (± 0.0001 g/L)	Azúcares totales (± 0.00017 g/L)	Nitrógeno total (± 0.01 g/L)
	0.03	27.95	9.13	0.000	37.09	
0	0.03	38.72	0.000	0.000	38.72	.*
	0.03	36.69	0.50	0.000	37.19	
	0.36	19.86	10.44	0.000	30.30	
1	0.33	2.49	15.28	16.17	33.94	1.39
	0.28	2.55	15.33	13.35	31.23	
	0.90	18.15	10.17	0.000	28.33	
2	0.61	2.33	14.49	14.14	30.96	1.35
	0.72	2.59	15.01	13.14	30.73	
	1.11	18.67	6.32	2.37	27.36	
3	0.98	2.26	14.34	13.93	30.54	1.32
	0.88	2.24	14.45	13.85	30.54	
	1.79	17.65	9.39	0.000	27.04	
4	1.44	2.02	13.83	14.19	30.05	1.16
	1.24	2.46	14.55	13.20	30.20	
	2.43	19.07	5.67	0.000	24.74	
5	2.41	1.88	13.69	14.12	29.70	1.10
	2.44	2.40	14.60	11.12	28.13	
	2.83	18.67	5.81	0.000	24.48	
6	2.48	1.69	12.34	12.21	26.23	0.94
	2.62	2.33	14.46	10.38	27.17	
	2.83	11.02	8.97	2.04	22.03	
7	2.69	1.64	12.12	10.90	24.66	0.90
	2.59	1.87	10.63	11.06	23.56	

día	Biomasa (± 0.0001 g)	Sacarosa (± 0.0001 g/L)	Glucosa (± 0.0001 g/L)	Fructosa (± 0.0001 g/L)	Azúcares totales (± 0.00017 g/L)	Nitrógeno total (± 0.01 g/L)
8	2.80	9.75	9.09	2.56	21.39	0.90
	2.71	1.73	11.75	11.15	24.63	
	2.65	2.24	10.94	10.25	23.43	
9	2.84	9.12	12.10	0.000	21.22	0.81
	2.82	1.67	10.86	10.01	22.55	
	2.65	1.86	10.87	10.36	23.09	

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. \*no se cuantifico nitrógeno total inicial empleando el HACH, se tomó el dato teórico indicado por el producto (la peptona de carne contiene un 14% de nitrógeno total al igual que la de caseína)

Cuadro 38. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando fermentación por lotes.

Triplicado	Biomasa (g/L)	Sacarosa (± 0.0001 g/L)	Glucosa (± 0.0001 g/L)	Fructosa (± 0.0001 g/L)	Azúcares totales (± 0.00017 g/L)	Nitrógeno total (± 0.01 g/L)	Yx/s (g/g)	Yx/N (g/g)
inicio	0.03 ± 0.0004	36.33	2.47	0.000	38.80	1.4	-	-
1	3.65 ± 0.037	6.54	4.58	13.46	24.58	0.92	0.255 ± 0.003	7.551 ± 0.175
2	5.77 ± 0.058	0.00	14.20	0.00	14.20	0.7	0.233 ± 0.002	8.199 ± 0.143
3	4.42 ± 0.044	0.00	0.45	25.44	25.89	0.82	0.340 ± 0.003	7.570 ± 0.151

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. \*no se cuantificó nitrógeno total inicial empleando el HACH, se tomó el dato teórico indicado por el producto (la peptona de carne contiene un 14% de nitrógeno total al igual que la de caseína). Datos obtenidos de la fermentación de *P. chrysosporium* en el medio mencionado durante 15 días a escala de 500 mL.

Cuadro 39. Concentraciones finales obtenidas para la cuantificación de azúcares fermentables empleando fermentación alimentada.

<b>Triplicado</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>	<b>Sacarosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Glucosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Fructosa (± 0.0001 g/L)</b>	<b>Azúcares totales (± 0.00017 g/L)</b>	<b>Nitrógeno total (± 0.01 g/L)</b>	<b>Yx/s (g/g)</b>	<b>Yx/N (g/g)</b>
inicio	0.03 ± 0.0004	21.81	8.69	6.84	37.34	1.4	-	-
<b>se añaden 15 g/L de azúcares totales</b>								
1	6.744 ± 0.067	14.09	0.000	0.000	14.09	0.78	0.176 ± 0.002	10.829 ± 0.206
2	6.30 ± 0.063	1.53	11.23	11.16	23.92	0.80	0.221 ± 0.002	10.450 ± 0.203
3	6.11 ± 0.061	0.32	15.99	0.000	16.31	0.83	0.169 ± 0.002	10.670 ± 0.216

Condiciones: 40 g/L de sacarosa, 5 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de carne, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L ZnSO<sub>4</sub>. pH inicial de 6.20, 100 rpm, 37°C. \*no se cuantificó nitrógeno total inicial empleando el HACH, se tomó el dato teórico indicado por el producto (la peptona de carne contiene un 14% de nitrógeno total al igual que la de caseína). Datos obtenidos de la fermentación de *P. chrysosporium* en el medio mencionado durante 15 días a escala de 500 mL, alimentando luego de los primeros 3 días 8 g/L, al día 6 3.5 g/L y al día 9 3.5 g/L de azúcares totales.

Cuadro 40. Análisis estadístico por prueba F para varianza de dos muestras para determinar si la varianza igual o desigual con significancia de 0.05, al utilizar una fermentación por lotes y una alimentada en medio líquido.

<b>Fermentación</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>			<b>Fcrítico</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>conclusión</b>
Por lotes	3.655	5.769	4.615	19	10.624	0.086	I
alimentada	6.744	6.300	6.111				

\*I: varianzas iguales. La determinación de varianzas iguales o desiguales entre los datos se utiliza para realizar el análisis estadístico por prueba t de Student. Se puede observar que las varianzas son iguales.

Cuadro 41. Análisis estadístico por prueba t de Student para determinar diferencias significativas de medias obtenidas en las fermentaciones por lotes y alimentadas para evaluar el efecto de estas sobre la producción de biomasa con significancia de 0.05.

<b>Fermentación</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>			<b>Tcrítico</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>conclusión</b>
Por lotes	3.655	5.769	4.615	2.77	2.66	0.056	NDS
alimentada	6.744	6.300	6.111				

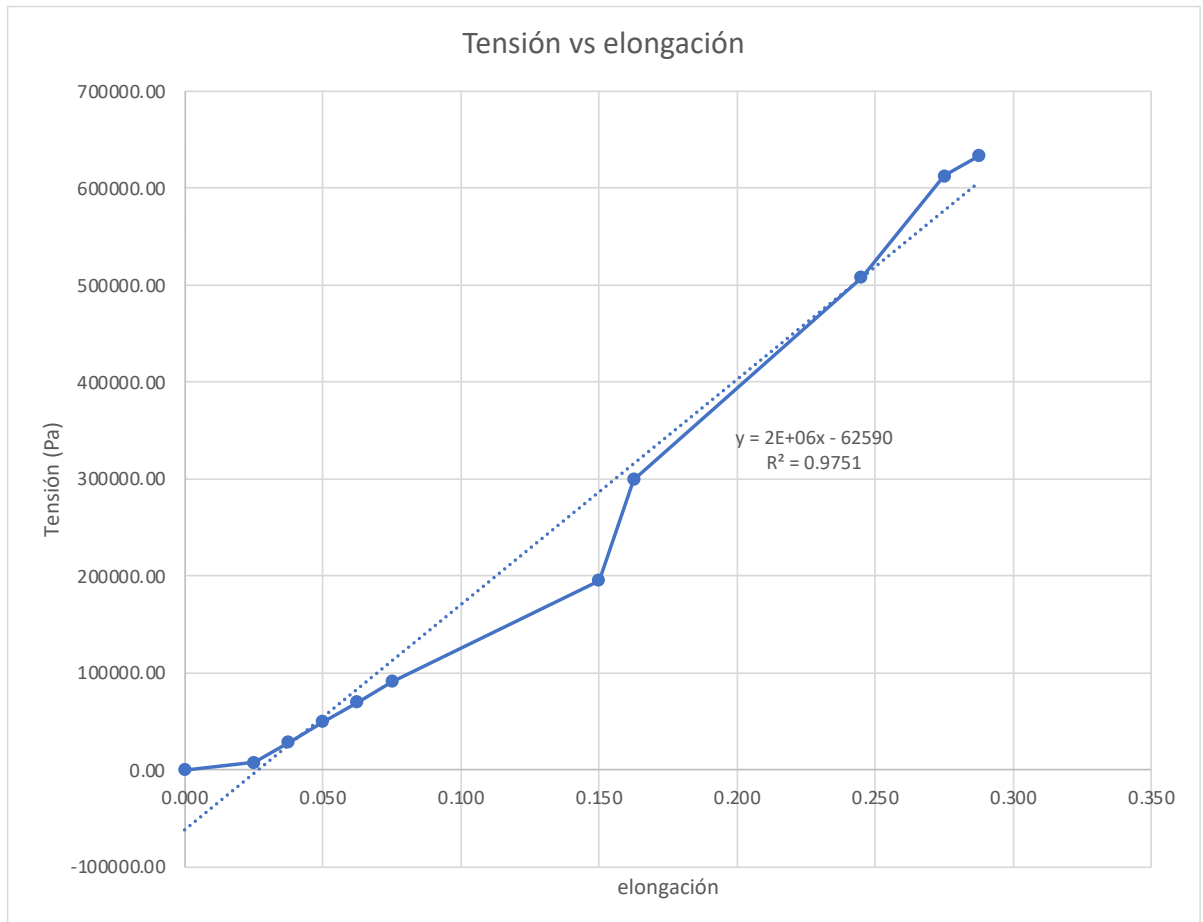
\*NDS: No presenta diferencia estadísticamente significativa. DS: Si presenta diferencia estadísticamente significativa. Para los tres análisis se empleó la configuración de prueba t de Student para dos muestras suponiendo varianzas iguales debido al resultado obtenido en el cuadro anterior.

Cuadro 42. Pruebas de tensión aplicadas a micelio en triplicado corrida 1.

	<b>Masa</b> ( $\pm 1.00E-7$ Kg)	<b>Peso</b> ( $\pm 9.81E-7$ N)	<b><math>\epsilon</math></b> ( $\pm 0.018$ )	<b><math>\sigma</math></b> (Pa o N/m <sup>2</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.00
1	0.004	0.035	0.025	7392.54 $\pm$ 1.57E+03
2	0.014	0.134	0.038	28558.22 $\pm$ 6.08E+03
3	0.024	0.234	0.050	49688.42 $\pm$ 1.06E+04
4	0.034	0.329	0.063	70023.65 $\pm$ 1.49E+04
5	0.044	0.427	0.075	90840.88 $\pm$ 1.93E+04
6	0.094	0.918	0.150	195262.92 $\pm$ 4.16E+04
7	0.143	1.407	0.163	299405.37 $\pm$ 6.38E+04
8	0.244	2.389	0.245	508197.30 $\pm$ 1.08E+05
9	0.294	2.879	0.275	612523.36 $\pm$ 1.30E+05
10	0.303	2.976	0.288	633250.86 $\pm$ 1.35E+05

$\sigma$ : tensión,  $\epsilon$ : extensión por unidad de longitud (elongación).

Figura 35. Tensión vs elongación del micelio sometido a pruebas de tensión corrida 1



La pendiente de la gráfica representa el Módulo de Young (Pa). Las líneas representan una tendencia suavizada, los puntos corresponden a los datos experimentales.

Cuadro 43. Pruebas de tensión aplicadas a micelio en triplicado corrida 2.

	<b>Masa</b> ( $\pm 1.00E-7$ Kg)	<b>Peso</b> ( $\pm 9.81E-7$ N)	$\epsilon$ ( $\pm 0.018$ )	$\sigma$ ( $\pm$ Pa o N/m <sup>2</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.004	0.035	0.000	5515.073 $\pm$ 8.77E+02
2	0.014	0.134	0.000	21305.336 $\pm$ 3.39E+03
3	0.024	0.234	0.013	37069.137 $\pm$ 5.90E+03
4	0.034	0.329	0.013	52239.869 $\pm$ 8.31E+03
5	0.044	0.427	0.025	67770.178 $\pm$ 1.08E+04
6	0.094	0.918	0.088	145672.338 $\pm$ 2.32E+04
7	0.143	1.407	0.113	223365.911 $\pm$ 3.55E+04
8	0.244	2.389	0.188	379131.315 $\pm$ 6.03E+04
9	0.294	2.879	0.200	456961.871 $\pm$ 7.27E+04
10	0.303	2.976	0.215	472425.246 $\pm$ 7.51E+04

$\sigma$ : tensión,  $\epsilon$ : extensión por unidad de longitud (elongación).



Figura 36. Tensión vs elongación del micelio sometido a pruebas de tensión corrida 2



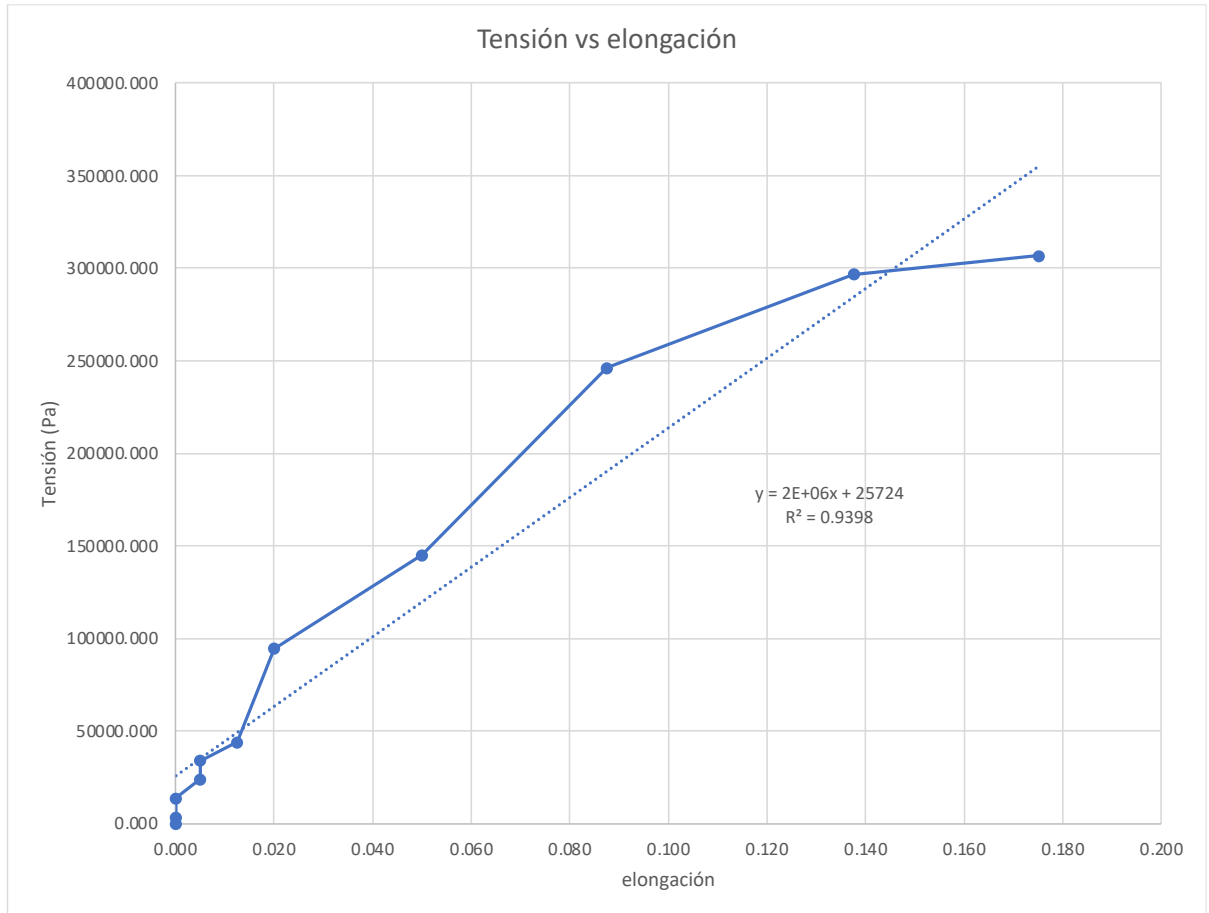
La pendiente de la gráfica representa el Módulo de Young (Pa). Las líneas representan una tendencia suavizada, los puntos corresponden a los datos experimentales.

Cuadro 44. Pruebas de tensión aplicadas a micelio en triplicado corrida 3.

	<b>Masa</b> ( $\pm 1.00E-7$ Kg)	<b>Peso</b> ( $\pm 9.81E-7$ N)	$\epsilon$ ( $\pm 0.018$ )	$\sigma$ ( $\pm$ Pa o N/m <sup>2</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.004	0.035	0.000	3581.955 $\pm$ 3.71E+02
2	0.014	0.134	0.000	13837.486 $\pm$ 1.43E+03
3	0.024	0.234	0.005	24075.831 $\pm$ 2.49E+03
4	0.034	0.329	0.005	33928.987 $\pm$ 3.51E+03
5	0.044	0.427	0.013	44015.683 $\pm$ 4.56E+03
6	0.094	0.918	0.020	94611.931 $\pm$ 9.80E+03
7	0.143	1.407	0.050	145072.705 $\pm$ 1.50E+04
8	0.244	2.389	0.087	246239.927 $\pm$ 2.55E+04
9	0.294	2.879	0.138	296789.669 $\pm$ 3.07E+04
10	0.303	2.976	0.175	306832.892 $\pm$ 3.18E+04

$\sigma$ : tensión,  $\epsilon$ : extensión por unidad de longitud (elongación).

Figura 37. Tensión vs elongación del micelio sometido a pruebas de tensión corrida 3



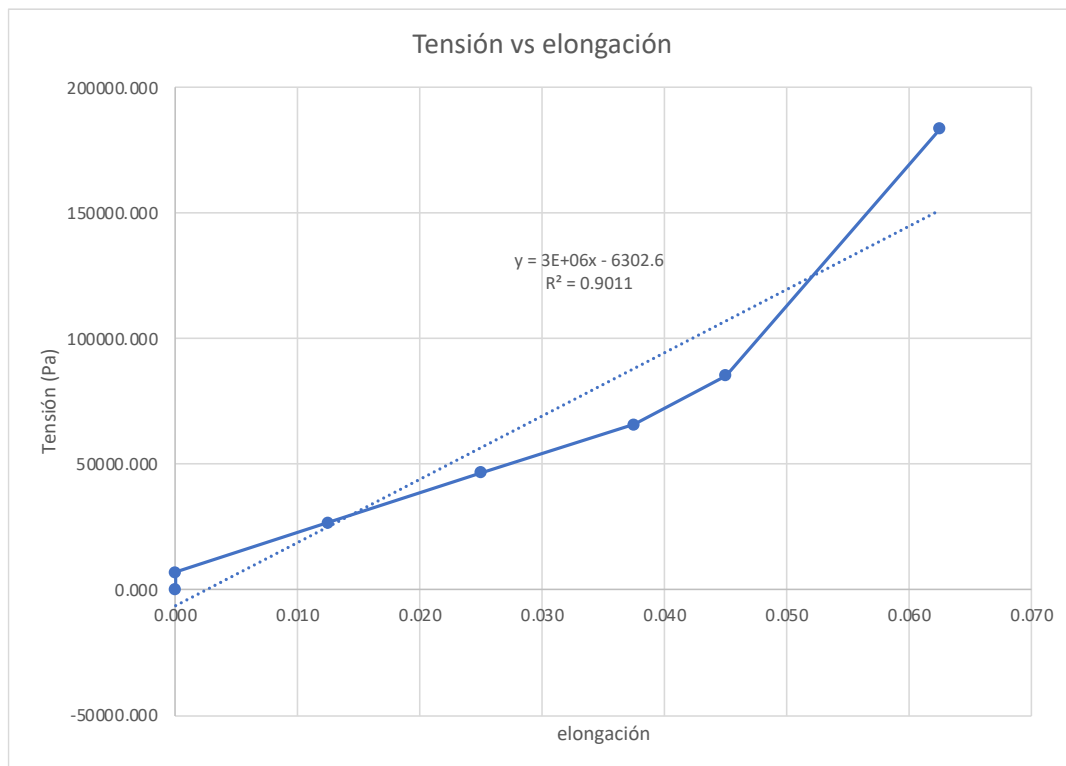
La pendiente de la grafica representa el Módulo de Young (Pa). Las líneas representan una tendencia suavizada, los puntos corresponden a los datos experimentales.

Cuadro 45. Pruebas de tensión aplicadas a micelio tratado con taninos

	<b>Masa</b> (± 1.00E-7 Kg)	<b>Peso</b> (± 9.81E-7 N)	<b>ε</b> (± 0.018)	<b>σ</b> (± Pa o N/m <sup>2</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.004	0.035	0.000	6948.992 ± 1.39E+03
2	0.014	0.134	0.013	26844.724 ± 5.38E+03
3	0.024	0.234	0.025	46707.113 ± 9.35E+03
4	0.034	0.329	0.038	65822.235 ± 1.32E+04
5	0.044	0.427	0.045	85390.424 ± 1.71E+04
6	0.094	0.918	0.063	183547.145 ± 3.68E+04

σ: tensión, ε: extensión por unidad de longitud (elongación).

Figura 38. Tensión vs elongación del micelio tratado con taninos sometido a pruebas de tensión



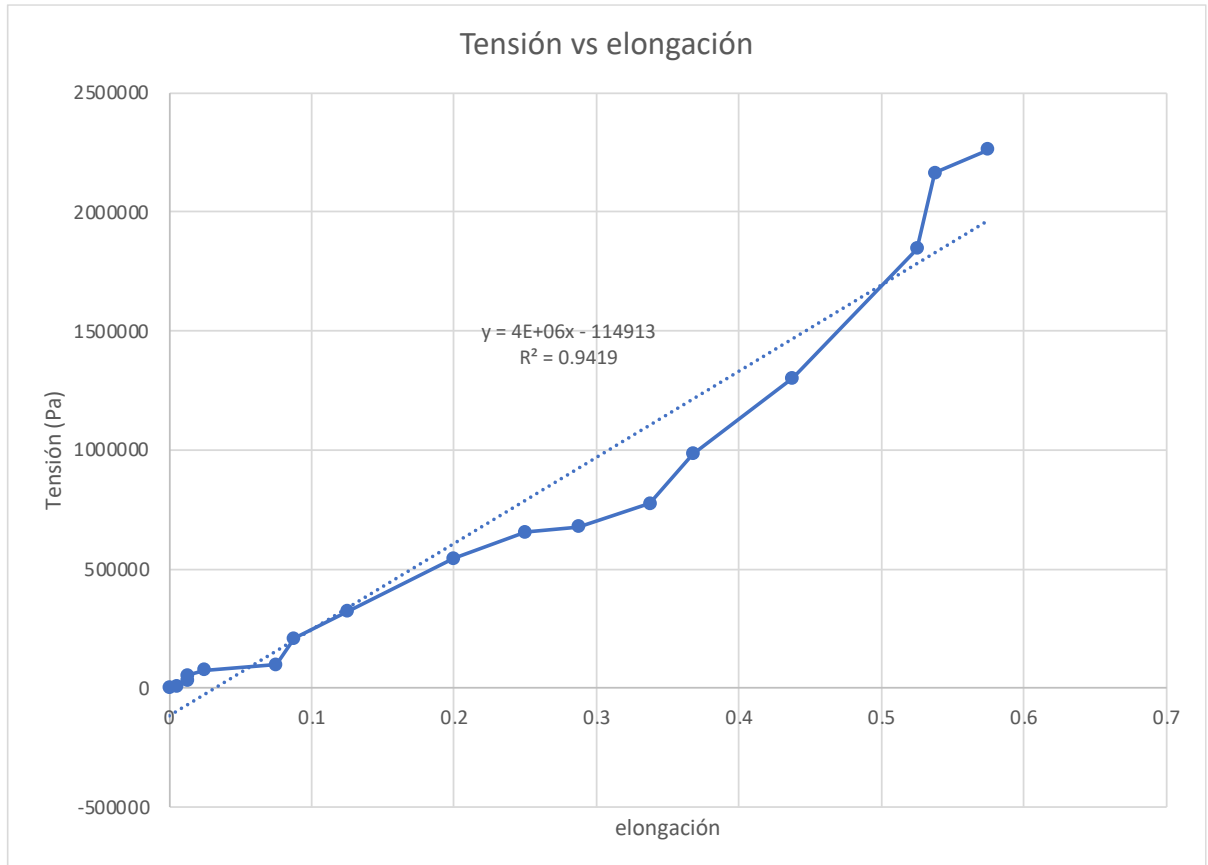
La pendiente de la grafica representa el Módulo de Young (Pa). Las líneas representan una tendencia suavizada, los puntos corresponden a los datos experimentales.

Cuadro 46. Pruebas de tensión aplicadas a micelio tratado con agar

	<b>Masa</b> ( $\pm 1.00E-7$ Kg)	<b>Peso</b> ( $\pm 9.81E-7$ N)	$\epsilon$ ( $\pm 0.018$ )	$\sigma$ ( $\pm$ Pa o N/m <sup>2</sup> )
1	0.000	0.000	0.005	0.000
2	0.004	0.035	0.013	7896.582 $\pm$ 1.80E+03
3	0.014	0.134	0.013	30505.368 $\pm$ 6.94E+03
4	0.024	0.234	0.025	53076.264 $\pm$ 1.21E+04
5	0.034	0.329	0.075	74797.994 $\pm$ 1.70E+04
6	0.044	0.427	0.087	97034.573 $\pm$ 2.21E+04
7	0.094	0.918	0.125	208576.302 $\pm$ 4.74E+04
8	0.143	1.407	0.200	319819.373 $\pm$ 7.28E+04
9	0.244	2.389	0.250	542847.111 $\pm$ 1.23E+05
10	0.294	2.879	0.288	654286.315 $\pm$ 1.49E+05
11	0.303	2.976	0.338	676427.056 $\pm$ 1.54E+05
12	0.347	3.403	0.368	773461.629 $\pm$ 1.76E+05
13	0.441	4.321	0.438	982037.931 $\pm$ 2.23E+05
14	0.584	5.728	0.525	1301857.304 $\pm$ 2.96E+05
15	0.828	8.117	0.538	1844704.415 $\pm$ 4.20E+05
16	0.971	9.524	0.575	2164523.788 $\pm$ 4.92E+05

$\sigma$ : tensión,  $\epsilon$ : extensión por unidad de longitud (elongación).

Figura 39. Tensión vs elongación del micelio tratado con agar sometido a pruebas de tensión



La pendiente de la gráfica representa el Módulo de Young (Pa). Las líneas representan una tendencia suavizada, los puntos corresponden a los datos experimentales.

## E. Análisis de error

### Cálculo 10. Propagación de error azúcares totales

Ecuación 17. Incertidumbre sumas y restas

$$\Delta Y = \sqrt{(\Delta A)^2 + (\Delta B)^2 + (\Delta C)^2}$$

Donde:

$\Delta Y =$  incertidumbre de la suma o resta

$\Delta A =$  incertidumbre medida A

$\Delta B =$  incertidumbre medida B

$\Delta C =$  incertidumbre medida C

Empleando los datos de incertidumbre mostrados en el cuadro 12 (datos originales corrida 1)

$$\Delta Y = \sqrt{(0.00001)^2 + (0.00001)^2 + (0.00001)^2} = 0.000017$$

### Cálculo 11. Propagación de error rendimiento de concentración de biomasa respecto a consumo de sustrato

Ecuación 18. Incertidumbre multiplicación y división

$$\Delta Y = Y * \sqrt{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C}{C}\right)^2}$$

Donde:

$\Delta Y =$  incertidumbre de la multiplicación o división

$\Delta A =$  incertidumbre medida A

$\Delta B =$  incertidumbre medida B

$\Delta C =$  incertidumbre medida C

$Y =$  multiplicación o división

$A =$  medida A

$B =$  medida B

$C =$  medida C

Empleando los datos de incertidumbre mostrados en el Cuadro 25.

$$\Delta Y = 0.186 * \sqrt{\left(\frac{0.125}{2.49 - 0.03}\right)^2 + \left(\frac{0.000173}{37.392 - 24.167}\right)^2} = 0.00$$

### Cálculo 12. Promedio de triplicados

Ecuación 19. Promedio

$$x = \frac{A + B + C}{3}$$

Donde:

$A = \text{medida } A$

$B = \text{medida } B$

$C = \text{medida } C$

Empleando los datos de rendimiento  $Y_{x/s}$  en el Cuadro 25 (datos calculados corrida 1,2 y 3 sacarosa 4%)

$$x = \frac{0.186 + 0.180 + 0.193}{3} = 0.186$$

### Cálculo 13. Desviación estándar de triplicados

Ecuación 20. Desviación estándar

$$S = \pm \sqrt{\frac{(x - A)^2 + (x - B)^2 + (x - C)^2}{n - 1}}$$

Donde:

$x = \text{promedio triplicado}$

$A = \text{medida } A$

$B = \text{medida } B$

$C = \text{medida } C$

Empleando los datos de rendimiento  $Y_{x/s}$  en el Cuadro 25 (datos calculados corrida 1,2 y 3)

$$S = \pm \sqrt{\frac{(0.186 - 0.186)^2 + (0.186 - 0.180)^2 + (0.186 - 0.193)^2}{2}} = 0.0063$$



#### Cálculo 14. Error estadístico

Ecuación 21. Error estadístico

$$\text{Error estadístico} = 3 * S$$

Donde:

$$S = \text{desviación estándar}$$

Empleando los datos de rendimiento  $Y_{X/S}$  en el Cuadro 25 (datos calculados corrida 1,2 y 3)

$$\text{Error estadístico} = 3 * \pm \sqrt{\frac{(0.186 - 0.186)^2 + (0.186 - 0.180)^2 + (0.186 - 0.193)^2}{2}} = 0.019$$

## F. Especificaciones reactivos y equipo

Cuadro 47. Incubadora Lab Line Laboratorio Procesos Bioindustriales empleada para crecimiento del hongo en cajas Petri

Marca	Lab-Line
Modelo	310
Amperaje	5

Cuadro 48. Incubadora Laboratorio Procesos Bioindustriales empleada para crecimiento del hongo en los Erlenmeyers

Marca	New Brunswick Scientific
Serie	25
Temperatura	4-60 °C
Agitación	40-400 rpm

Cuadro 49. Autoclave Laboratorio Procesos Bioindustriales empleada para esterilización de medios de cultivo

Marca	
Modelo	25
Temperatura	121- °C
Presión	0-500 rpm

Cuadro 50. Colorímetro HACH y método cuantificación de Nitrógeno

Marca	HACH
Modelo	DR/890
Temperatura	37-185 °C
Método	10071
Rango	0.5-25 mg/L N

Cuadro 51. Estufa empleada para preparación de medios

Marca	Thermo Scientific
Modelo	Cimarec +
Temperatura	0-540 °C
Agitación	50-1500 rpm

Cuadro 52. Campana de extracción empleada para preparación de inóculos

Marca	Labconco
Número de serie	070469118
Amperaje	12 A
Voltaje	115 V

Cuadro 53. Balanza analítica empleada para pesaje de reactivos, biomasa, inóculo inicial.

Marca	OHAUS Pioneer
Modelo	PA114
Capacidad	0.001-110 g
Incetridumbre	0.0001 g

Cuadro 54. Especificaciones HPLC del Laboratorio de Análítica Instrumental Avanzada

Marca	Agilent Technologies
Modelo	Serie 1200
Voltaje	100-120 V
Frecuencia	50-60 Hz

Cuadro 55. Reactivos empleados durante experimentación

<b>Reactivo</b>	<b>Fórmula química</b>	<b>Marca</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>No. CAS</b>
Sacarosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Caña Real	342.3	-
Peptona de carne	-	Merck	-	1.07214.1000
Peptona de caseína	-	Merck	-	1.07213.1000
Fosfato monopotásico	$KH_2PO_4$	Fisher Scientific	136.09	F.W.136.09
Sulfato de magnesio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Merck	246.5	1.05886.0500
Sulfato de Zinc heptahidratado	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Merck	287.54	1.08883.0500
Ácido clorhídrico	HCl	Merck	36.36	1.00317.2500
Hidróxido de Sodio	NaOH	Merck	40.0	1.06498.1000
Potato Dextrosa Agar	-	Merck	-	1.10130.5007

## G. Glosario

**Constante de afinidad al sustrato:** describe la tasa de crecimiento de microorganismo en función de la concentración de sustrato. Si la  $K_s$  (constante de afinidad a sustrato) es baja, significa que el microorganismo puede crecer a bajas concentraciones de sustrato.

**Curva de crecimiento:** representación gráfica de cómo cambia la concentración de sustratos y biomasa con el tiempo.

**Elongación:** el cambio en la longitud de un material al someterse a una tensión.

**HPLC:** cromatografía líquida de alta resolución que permite separar componentes mediante una columna y cuantificarlos.

**Micelio:** red de hifas entrelazadas que forman una estructura la cual permite la absorción de nutrientes.

**Módulo de Young:** módulo de elasticidad longitudinal, propiedad mecánica que indica rigidez o capacidad de resistir deformaciones mecánicas debido a tensiones o fuerzas de

**Peptonas:** derivados de la hidrólisis parcial de proteínas, son fragmentos peptídicos empleados como fuente de nitrógeno fácilmente asimilables por microorganismos

***Phanerochaete chrysosporium*:** hongo basidiomiceto muy estudiado por su capacidad de degradar la lignina.

**Rendimiento de biomasa respecto al sustrato:** parámetro que indica que tanta biomasa se produce a partir del consumo de sustrato.

**Sacarosa:** disacárido compuesto por glucosa y fructosa.

**Sustrato:** compuesto que consume el microorganismo para la obtención de energía para el crecimiento y formación de productos.

**Tensión de rotura:** máxima tensión que soporta un material antes de romperse.

**Velocidad máxima:** tasa máxima de crecimiento específico.