



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Universidad de la República
Facultad de Ciencias
Posgrado en Biotecnología



Utilización de residuos del procesamiento de almidón de papa para la producción de biomasa de hongos, obtención de β -glucanos y su uso en el desarrollo de un yogur tipo griego.

Presentado por: M.Sc. Miguel Angel Anchundia Lucas.

Tesis presentada como requisito para la obtención del título de Doctor en Biotecnología

Director de tesis:
Dr. Stalin Santacruz

Director de tesis:
Dr. Tomás López

Tribunal evaluador

Dra. Silvana Alborés, Dra. Paula Rodríguez y Dra. Marcela González

Montevideo, octubre del 2024.

Agradecimientos

A la ilustre Universidad de la República (UdelaR) y al Programa de Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias, por permitirme llevar a cabo esta parte de mi formación profesional.

A la Dirección de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CITT) de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi (UPEC) y al desarrollo del proyecto institucional denominado “Integración de Procesos Biotecnológicos Productores de Alcohol e Inmunoestimulantes en la Cadena de Valor de la Papa (*Solanum tuberosum*), para el Afrontamiento de la Pandemia de la Covid-19 en la Provincia del Carchi” desarrollado entre los años 2021-2023.

A mis directores de tesis, Dr. Tomás López y Dr. Stalin Santacruz por su aporte al desarrollo del trabajo doctoral y por su todo su apoyo.

Al comité evaluador de este trabajo, Dra. Paula Rodríguez y Dra. Silvana Alborés por el tiempo dedicado en la evaluación, corrección y aportes realizados al proyecto de investigación.

Al personal docente y administrativo de la Universidad Tecnológica (UTEC) sede Colonia por todo el apoyo prestado y a sus laboratorios por abrirme sus puertas y desarrollar parte de los ensayos.

Al personal del Laboratorio de Microbiología, Biotecnología y del Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi (UPEC) por su valioso apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Cristian Santacruz de la Escuela Politécnica Nacional (EPN) del Ecuador por la realización del análisis de elucidación estructural mediante la técnica de FT-IR de la muestra de β -glucanos.

A mi familia y en especial a mi hermana Diana, por todo su apoyo durante algunos momentos complicados y por sus palabras de aliento para seguir adelante y a varios ángeles que desde el cielo siempre me acompañan e iluminan.

Resumen

Actualmente la población humana sufre de enfermedades gastrointestinales, diabetes, dislipemia y enfermedades cardiovasculares, cuyas complicaciones pueden conllevar a muchas personas a la muerte, además de ocasionar costos elevados en los sistemas de salud. Por otro lado, los procesos de obtención de almidón de papa requieren de grandes cantidades de agua, que son descargadas al ambiente, creando problemas en los suelos y cuerpos de agua, debido a que contienen cantidades importantes de nutrientes.

Por lo expuesto, los residuos líquidos del proceso de obtención de almidón de papa fueron optimizados mediante la adición de una fuente de carbohidratos (sacarosa, glucosa, almidón y melasa) y una fuente de nitrógeno (urea, extracto de levaduras, sulfato de amonio y cloruro de amonio) para la producción de biomasa y la posterior extracción de β -glucanos de paredes celulares de *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae*. Estos últimos fueron utilizados en el desarrollo de un yogur natural tipo griego.

Los hongos filamentosos fueron identificados molecularmente mediante la amplificación del gen ITS1 e ITS4. El proceso de extracción de β -glucanos fue realizado a una temperatura de 121 °C, 15 PSI y 1 h. Los β -glucanos fueron caracterizados físico, químicamente mediante la metodologías normalizadas, estructuralmente por métodos instrumentales y microbiológicamente de acuerdo a las normas ISO correspondientes. Los yogures formulados fueron evaluados sensorialmente mediante una prueba de aceptación, física y químicamente mediante las metodologías oficiales, reológicamente por pruebas de viscosidad, rotacionales y vibraciones, y la capacidad antioxidante mediante ensayos de DPPH, radical hidroxilo y superóxido de acuerdo a las metodologías descritas.

Entre los resultados, cuatro aislados fueron identificados como *Rhizopus oryzae* y un aislado como *Aspergillus oryzae*. La optimización conllevó a la producción de β -glucanos de 31.19 mg/100 g de biomasa proveniente del aislado M6A5(*Aspergillus oryzae*) y 3218. 67 mg/100 g de biomasa proveniente del aislado M10A1 (*Rhizopus oryzae*). Este último fue seleccionado por su mayor rendimiento para los siguientes estudios. Los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* fueron de calidad microbiológica adecuada, contenían 82.46% de azúcares totales, de los cuales el 61,55% correspondían a β -(1-3)/(1-6)-D-glucanos, con enlaces β -(1-3) y β -(1-6) y su peso molecular fue de 450 kDa. Con respecto a los yogures desarrollados, todas las formulaciones tuvieron características físicas, químicas y microbiológicas adecuadas, mayor capacidad antioxidantes, viabilidad de bacterias ácidas lácticas, capacidad de retención de agua y menor sinéresis. Las propiedades reológicas fueron mejoradas ya que se incrementó la viscosidad. La evaluación sensorial de todas las muestras estuvieron entre “Me gustó un poco” a “Me gusta mucho”.

Se puede concluir que el residuo líquido del proceso de obtención de almidón de papa puede ser suplementado con glucosa como fuente de carbono y cloruro de amonio para la producción de biomasa del aislado M10A1 de *Rhizopus oryzae* y extracción de β -glucanos. Estos polisacáridos pueden ser utilizados en el desarrollo de yogures natural tipo griego, ya que no modifica sus características físicas, químicas y microbiológicas, mejora las propiedades reológicas, antioxidantes, viabilidad de bacterias ácido lácticas y con una aceptación sensorial de “Me gustó un poco” a “Me gusta mucho”.

Palabras claves: residuos líquidos, hongos filamentosos, β -glucanos, yogurt tipo griego, propiedades reológicas, viabilidad de bacterias ácido lácticas.

Abstract

Currently, the human population suffers from gastrointestinal diseases, diabetes, dyslipidemia and cardiovascular diseases, whose complications can lead many people to death, in addition to causing high costs in health systems. On the other hand, the processes for obtaining potato starch require large amounts of water, which are discharged into the environment, creating problems in soils and water bodies because they contain significant amounts of nutrients.

Therefore, the liquid waste from the potato starch production process was optimized by adding a source of carbohydrates (sucrose, glucose, starch and melasse) and a source of nitrogen (urea, yeast extract, ammonium sulfate and ammonium chloride) to produce biomass and the extraction of β -glucans from the walls of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*. The latter were used in the development of a natural Greek style yogurt.

Filamentous fungi were identified molecularly via amplification of the ITS1 and ITS4 genes. The extraction process for the β -glucans was carried out at a temperature of 121 °C, 15 PSI and 1 h. The β -glucans were characterized physically, chemically by standardized methodologies, structurally by instrumental method and microbiologically according to the corresponding ISO standards. The sensory properties of the formulated yogurt were evaluated via an acceptance test. Physically and chemically, by official methodologies, rheologically through viscosity, rotational and vibration tests, and antioxidant capacity through DPPH, hydroxyl radical and superoxide tests were performed according to the described methodology.

Among these results, four isolates were identified as *Rhizopus oryzae*, and one isolate was identified as *Aspergillus oryzae*. The optimization resulted in the production of β -glucans of 31.19 mg/100 g of biomass from isolate M6A5 (*Aspergillus oryzae*) and 3218.67 mg/100 g of biomass from isolate M10A1 (*Rhizopus oryzae*). The latter was selected for its higher performance for the following studies. The β -glucans from *Rhizopus oryzae* were of adequate microbiological quality and accounted for 82.46% of the total sugars, of which 61.55% corresponded to β -(1-3)/(1-6)-D-glucans, with β - bonds (1-3) and β -(1-6) and a molecular weight of 450 kDa. With respect to the developed yogurt, all the formulations had adequate physical, chemical and microbiological characteristics; greater antioxidant capacity; greater viability of lactic acid bacteria; greater water retention capacity; and less syneresis. The rheological properties improved as the viscosity increased. The sensory evaluation of all the samples ranged from "I like it a little" to "I like it a lot".

It can be concluded that the liquid residue from the process of obtaining potato starch supplemented with glucose as a source of carbon and ammonium chloride can be used for the production of biomass from the M10A1 isolate of *Rhizopus oryzae* and extraction of β -glycans. These polysaccharides can be used in the development of natural Greek-type yogurts since they do not modify their physical, chemical or microbiological characteristics; improve the rheological, antioxidant, and viability of lactic acid bacteria; and have a sensory acceptance of "I like a little" to "I like it a lot".

Keywords: liquid waste, filamentous fungi, β -glucans, Greek yogurt, rheological properties, viability of lactic acid bacteria.

Índice

Índice de contenido

Agradecimientos.....	2
Resumen	3
Abstract	4
Índice	5
Índice de contenido.....	5
Índice de Tablas	8
Índice de Figuras.....	15
1. Introducción	25
1.1. Generalidades, métodos de aislamiento y caracterización de los glucanos.....	25
1.2. Efecto biológicos de los glucanos en la salud de los seres humanos.	28
1.3. Aplicaciones de los β -glucanos de hongos filamentosos en el desarrollo de yogures o leches fermentadas.....	29
1.4. Investigaciones sobre la utilización de residuos líquidos provenientes del procesamiento de almidón de papa en procesos biotecnológicos con hongos.....	31
1.5. Planteamiento del problema.....	33
2. Hipótesis de trabajo.....	34
3. Objetivos (Objetivos Generales / Objetivos Específicos).	35
3.1. Objetivo general.	35
3.2. Objetivos específicos.	35
4. Materiales y Métodos.	35
4.1. Materiales.....	35
4.2. Métodos.....	35
4.2.1. Aislamiento e identificación de mohos de la especie <i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Rhizopus</i> <i>oryzae</i>	35
4.2.1.1. Aislamiento de mohos de la especie <i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Rhizopus oryzae</i>	36
4.2.1.2. Identificación de mohos de las especies de interés.	36
4.2.2. Optimización de nutrientes para la producción de biomasa de <i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Rhizopus oryzae</i>	39
2.2.2.1. Preparación del Inóculo.	39
2.2.2.2. Condiciones de la fermentación sumergida.	39
2.2.2.3. Determinación de la composición química del medio de cultivo de los matraces. ..	39
2.2.2.4. Determinación de la concentración de biomasa.	40

4.2.3. Extracción y purificación de los β -glucanos provenientes de las paredes de los mohos cultivados.....	41
4.2.3.1. Extracción de los polisacáridos provenientes de las paredes celulares de los mohos.	41
4.2.3.2. Purificación de los β -glucanos provenientes de las paredes de los mohos cultivados.	41
4.2.4. Caracterización estructural de los β -glucanos purificados.	41
4.2.4.1. Caracterización química.....	41
4.2.4.2. Caracterización estructural.	41
4.2.4.3. Determinación del color.....	42
4.2.4.4. Evaluación de la calidad e inocuidad microbiológica.	42
4.2.5. Desarrollo de un yogur tipo griego utilizando los β -glucanos obtenidos.	43
4.2.6. Caracterización fisicoquímica, reológica y sensorial del yogur fabricado.	44
4.2.6.1. Caracterización química.....	44
4.2.6.2. Caracterización física.	44
4.2.6.3. Viabilidad de bacterias ácido lácticas en el tracto gastrointestinal simulado.	45
4.2.6.4. Capacidad antioxidante.....	45
4.2.6.5. Comportamiento reológico.	46
4.2.6.6. Calidad microbiológica.....	47
4.2.6.7. Evaluación sensorial.....	47
4.2.7. Diseño de experimento y análisis estadístico.....	47
5. Resultados y Discusión	55
5.1. Objetivo 1. Aislamiento e identificación de mohos de las especies <i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Rhizopus oryzae</i>	55
5.2. Objetivo 2. Optimización las condiciones para la producción de β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Rhizopus oryzae</i> utilizando los residuos de la producción de almidón de papa.	175
5.3. Objetivo 3, 4 y 5. Extracción, purificación, determinación del rendimiento y caracterización estructural de los β -glucanos.	196
5.3.1. Rendimiento y caracterización química.	196
5.3.2. Caracterización física.	197
5.3.3. Caracterización estructural.	197
5.3.4. Evaluación microbiológica.	200
5.4. Objetivo 6 y 7. Desarrollo de un yogur tipo griego y caracterización química, física, viabilidad de bacterias ácido lácticas, reológica, antioxidante, microbiológica y sensorial del yogur desarrollado.....	200

5.4.1. Caracterización química.....	201
5.4.2. Caracterización física.	202
5.4.3. Caracterización reológica.....	204
5.4.4. Viabilidad de bacterias ácido lácticas.....	209
5.4.5. Capacidad antioxidante.	211
5.4.6. Caracterización microbiológica.....	213
5.4.7. Aceptación sensorial.....	214
6. Conclusiones	216
7. Perspectivas	221
8. Referencias Bibliográficas	222

Índice de Tablas

Tabla 1. Primers utilizados para la identificación molecular de aislados presuntivos de <i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Rhizopus oryzae</i>	38
Tabla 2. Formulaciones establecidas para la fabricación de yogures tipo griego con la incorporación de los β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	44
Tabla 3. Diseño de experimento para la evaluación del tiempo y temperatura mediante la metodología OVAT para la producción de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i> y <i>Aspergillus oryzae</i>	48
Tabla 4. Diseño de experimento para la evaluación del pH mediante la metodología OVAT para la producción de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	48
Tabla 5. Diseño de experimento para la evaluación del pH mediante la metodología OVAT para la producción de β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i>	49
Tabla 6. Diseño de experimento para la evaluación de la fuente de nitrógeno mediante la metodología OVAT para para la producción de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	49
Tabla 7. Diseño de experimento para la evaluación de la fuente de nitrógeno mediante la metodología OVAT para para la producción de β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i>	49
Tabla 8. Diseño de experimento para la evaluación de la fuente de carbono mediante la metodología OVAT para para la producción de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	50
Tabla 9. Diseño de experimento para la evaluación de la fuente de carbono mediante la metodología OVAT para para la producción de β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i>	50
Tabla 10. Diseño de experimento para la evaluación de la concentración de sulfato de amonio y cloruro de amonio mediante la metodología OVAT para para la producción de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i> y <i>Aspergillus oryzae</i>	50
Tabla 11. Diseño de experimento para la evaluación de la concentración de glucosa mediante la metodología OVAT para para la producción de β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i>	51
Tabla 12. Arreglo experimental del diseño central compuesto en variables codificadas y reales para la optimización de producción de β -glucanos de <i>Rizhopus oryzae</i>	52
Tabla 13. Arreglo experimental del diseño central compuesto en variables codificadas y reales para la optimización de producción de β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i>	53
Tabla 14. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 1 trigo en MEA, CYA, YES, CREA Y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	55

Tabla 15. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 1 trigo en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	56
Tabla 16. Características microscópicas de los aislados A1 al A5 provenientes de la muestra 1 de trigo en MEA cultivados a 25 °C por 7 días.	62
Tabla 17. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 2 avena en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	63
Tabla 18. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 2 avena en MEA, CYA, YES y CREA cultivados a 25 °C durante 7 días.	64
Tabla 19. Características microscópicas de los aislados A1 al A5 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA cultivados a 25 °C durante 7 días.	71
Tabla 20. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A6 a A10 provenientes de la muestra 2 de avena y arroz en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	72
Tabla 21. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A6 a A10 provenientes de la muestra 2 de avena y arroz en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	73
Tabla 22. Características microscópicas de los aislados M2A6 al M2A10 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA cultivados a 25 °C por 7 días.	79
Tabla 23. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados M2A11 a M2A15 provenientes de la muestra 2 de trigo y avena en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	80
Tabla 24. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados M2A11 a M2A15 provenientes de la muestra 2 de trigo y avena en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	81
Tabla 25. Características microscópicas de los aislados M2A11 al M2A15 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA cultivados a 25 °C durante 7 días.	88
Tabla 26. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados M2A16 a M2A20 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	89
Tabla 27. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados M2A16 a M2A20 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	90

Tabla 28. Características microscópicas de los aislados M2A16 a M2A20 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA cultivados a 25 °C durante 7 días.....	97
Tabla 29. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 3 de trigo en MEA, CYA, YES, CREA Y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	98
Tabla 30. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 3 de trigo en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	99
Tabla 31. Características microscópicas de los aislados A1 y A5 provenientes de la muestra 3 de trigo en MEA cultivados a 25 °C por 7 días.....	103
Tabla 32. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A6 a A11 provenientes de la muestra 3 de trigo en MEA, CYA, YES, CREA Y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	104
Tabla 33. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A6 a A11 provenientes de la muestra 3 de trigo en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	105
Tabla 34. Características microscópicas de los aislados A6 a A11 provenientes de la muestra 3 de trigo en MEA cultivados a 25 °C durante 7 días.	109
Tabla 35. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 5 de trigo y arroz en MEA, CYA, YES, CREA Y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.....	110
Tabla 36. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 al A5 provenientes de la muestra 5 de trigo y arroz en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	111
Tabla 37. Características microscópicas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 5 de arroz en MEA cultivados a 25 °C por 7 días.	116
Tabla 38. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A2 a A5 provenientes de la muestra 6 de trigo y avena en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.....	117
Tabla 39. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 6 de trigo y avena en MEA, CYA, YES y CREA cultivados a 25 °C durante 7 días.	118
Tabla 40. Características microscópicas de los aislados A1 al A5 provenientes de la muestra 6 de avena en MEA cultivados a 25 °C por 7 días.	121

Tabla 41. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1, A2 y A3 provenientes de la muestra 7 de trigo y aislados A1 al A3 provenientes de la muestra 10 de arroz y avena, en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días	122
Tabla 42. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1, A2 y A4 provenientes de la muestra 7 de Trigo y aislados A1 al A3 provenientes de la muestra 10 de arroz y avena, en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	123
Tabla 43. Características microscópicas de los aislados A1, A2 y A3 provenientes de la muestra 7 de trigo y aislados A1 al A3 provenientes de la muestra 8 de arroz y avena en MEA cultivados a 25 °C durante 7 días.....	131
Tabla 44. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 al A6 provenientes de la muestra 8 de arroz y trigo, en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.....	132
Tabla 45. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 al A6 provenientes de la muestra 8 de arroz y trigo, en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.	133
Tabla 46. Características microscópicas de los aislados A1 al A6 provenientes de la muestra 9 de trigo y arroz en MEA cultivados a 25 °C durante 7 días.	141
Tabla 47. Aislados presuntivos de <i>Aspergillus oryzae</i> productores y no productores de aflatoxinas.	141
Tabla 48. Características macroscópicas de los aislados M4A1, M4A2, M2A3, M4A4 y M4A5 de la muestra 4 de avena y arroz en MEA, CYA, PDA, y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.	144
Tabla 49. Características macroscópicas de los aislados M4A1, M4A2, M2A3, M4A4 y M4A5 de la muestra 4 de avena y arroz en MEA, CYA, PDA, y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C por 4 días.	145
Tabla 50. Características macroscópicas de los aislados M4A1, M4A2, M2A3, M4A4 y M4A5 de la muestra 4 de avena y arroz en MEA, CYA, PDA, y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.	146
Tabla 51. Características macroscópicas de los aislados M4A6, M4A7, M4A8, M4A9 y M4A10 de la muestra 4 de avena, trigo y arroz en MEA, CYA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.	148
Tabla 52. Continuación de características macroscópicas de los aislados M4A6, M4A7, M4A8, M4A9 y M4A10 de la muestra 4 de avena, trigo y arroz en MEA, CYA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 oC y 45 °C durante 4 días.	149

Tabla 53. Continuación de características macroscópicas de los aislados M4A6, M4A7, M4A8, M4A9 y M4A10 de la muestra 4 de avena, trigo y arroz en MEA, CYA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.....	150
Tabla 54. Características microscópicas del aislado M4A10 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA cultivados a 25 °C durante 4 días.	153
Tabla 55. Características macroscópicas de los aislados M4A11, M4A12, M7A1, M7A2 y M7A3 de la muestra 4 y 7 de avena, trigo y arroz en MEA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.	154
Tabla 56. Continuación de características macroscópicas de los aislados M4A11, M4A12, M7A1, M7A2 y M7A3 de la muestra 4 y 7 de avena, trigo y arroz en MEA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.	155
Tabla 57. Continuación de características macroscópicas de los aislados M4A11, M4A12, M7A1, M7A2 y M7A3 de la muestra 4 y 7 de avena, trigo y arroz en MEA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.	156
Tabla 58. Características microscópicas del aislado M2A31, M2A32, M7A1, M7A2 Y M7A3 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA cultivados a 25 °C por 4 días.	163
Tabla 59. Características macroscópicas de los aislados M8A1, M10A1, M10A2 y M10A3 de la muestra 8 y 10 de arroz y trigo en MEA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.	164
Tabla 60. Continuación de características macroscópicas de los aislados M8A1, M10A1, M10A2 y M10A3 de la muestra 8 y 10 de arroz y trigo en MEA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.	165
Tabla 61. Características microscópicas del aislado M10A1 provenientes de la muestra 2 de trigo en MEA cultivados a 25 °C por 4 días.....	168
Tabla 62. Aislados presuntivos de <i>Rhizopus oryzae</i> con crecimiento a 37 °C y sin crecimiento a 45 °C en agar MEA, PDA, OA durante 4 días.	168
Tabla 63. Efecto del pH sobre la obtención de β -glucanos provenientes de <i>Rhizopus oryzae</i>	176
Tabla 64. Arreglo experimental y respuesta del diseño central compuesto para la optimización de producción de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	180
Tabla 65. Análisis de varianza (ANOVA) del modelo de superficie de respuesta para la optimización de la producción de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	181
Tabla 66. Caracterización de los medios de cultivos formulados para el diseño de superficie de respuesta en la optimización de la producción de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	183

Tabla 67. Continuación de caracterización de los medios de cultivos formulados para el diseño de superficie de respuesta en la optimización de la producción de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	184
Tabla 68. Efecto del pH sobre la obtención de β -glucanos provenientes de <i>Aspergillus oryzae</i>	186
Tabla 69. Arreglo experimental y respuesta del diseño central compuesto para la optimización de producción de β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i>	189
Tabla 70. Análisis de varianza (ANOVA) del modelo de superficie de respuesta para la optimización de la producción de β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i>	190
Tabla 71. Caracterización de los medios de cultivos formulados para el diseño de superficie de respuesta en la optimización de la producción de β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i>	192
Tabla 72. Continuación de caracterización de los medios de cultivos formulados para el diseño de superficie de respuesta en la optimización de la producción de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	193
Tabla 73. Rendimiento y caracterización química de los β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	196
Tabla 74. Color de los β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	197
Tabla 75. Cuantificación de monosacáridos presentes y peso molecular de los β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	198
Tabla 76. Parámetros de calidad e inocuidad de los β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	200
Tabla 77. Características químicas de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	201
Tabla 78. Características químicas de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	202
Tabla 79. Características de flujo de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	205
Tabla 80. Parámetros de la relación entre el módulo de almacenamiento (G') y la frecuencia angular (ω) de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	209
Tabla 81. Viabilidad de bacterias ácido lácticas bajo condiciones gástricas simuladas (pH 2) de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	210
Tabla 82. Viabilidad de bacterias ácido lácticas bajo condiciones intestinales simuladas (pH 7) de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	210

Tabla 83. Continuación de viabilidad de bacterias ácido lácticas bajo condiciones intestinales simuladas (pH 7) de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	211
Tabla 84. Capacidad antioxidante de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	212
Tabla 85. Recuento de mohos y levaduras de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	213
Tabla 86. Evaluación sensorial de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	214

Índice de Figuras

- Figura 1.** Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 1 trigo (columna 1= M1A1, columna 2 = M1A2, columna 3 = M1A3, columna 4 = M1A4 y columna 5 = M1A5), cultivados a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA. 57
- Figura 2.** Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 1 de trigo, cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M1A1. B. Aislado M1A2. C. Aislado M1A3. D. Aislado M1A4. E. Aislado M1A5. El color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxinas. 57
- Figura 3.** Colonias de aislado M1A1 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 µm. H-I barra 20 µm. 58
- Figura 4.** Colonias de aislado M1A2 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 µm. H-I barra 20 µm. 59
- Figura 5.** Colonias de aislado M1A3 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 50 µm. I barra 10 µm. 60
- Figura 6.** Colonias de aislado M1A5 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 20 µm. I barra 10 µm. 61
- Figura 7.** Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena (columna 1= M2A1, columna 2 = M2A2, columna 3 = M2A3, columna 4 = M2A4 y columna 5 = M2A5), cultivados a 25 oC durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA. 65
- Figura 8.** Producción de aflatoxina por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena (aislados 1 al 5), cultivados en CAM a 25 oC durante 7 días. A. Aislado M2A1. B. Aislado M2A2. C. Aislado M2A3. D. Aislado M2A4. E. Aislado M2A5. El color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxinas. 65
- Figura 9.** Colonias de aislado M2A1 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm. 66
- Figura 10.** Colonias de aislado M2A2 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm. 67

- Figura 11.** Colonias de aislado M2A3 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm. 68
- Figura 12.** Colonias de aislado M2A4 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm..... 69
- Figura 13.** Colonias de aislado M2A5 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm. 70
- Figura 14.** Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 y 4 de avena (aislados Columna 1= M2A6, Columna 2 al 5 = M2A7 al M2A10, cultivados a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA. 74
- Figura 15.** Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena (aislados Columna 1= M2A6, Columna 2 al 5 = M2A7-M2A10), cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado 1. B. Aislado 2. C. Aislado 3. D. Aislado 4. E. Aislado 5. El color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxinas. 74
- Figura 16.** Colonias de aislado M2A7 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm. 75
- Figura 17.** Colonias de aislado M2A8 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm. 76
- Figura 18.** Colonias de aislado M2A9 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm. 77
- Figura 19.** Colonias de aislado M2A10 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm. 78
- Figura 20.** Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena (aislados Columna 1= M2A11 a Columna 5 = M2A15), cultivados en MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA. 82
- Figura 21.** Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado

M2A11. B. Aislado M2A12. C. Aislado M2A13. D. Aislado M2A14. E. Aislado M2A15. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxinas.	82
Figura 22. Colonias de aislado M2A11 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	83
Figura 23. Colonias de aislado M2A12 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	84
Figura 24. Colonias de aislado M2A13 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	85
Figura 25. Colonias de aislado M2A14 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	86
Figura 26. Colonias de aislado M2A15 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 10 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	87
Figura 27. Colonias de aislados presuntivos de <i>Aspergillus oryzae</i> provenientes de la muestra 2 de avena (aislados Columna 1= M2A16 a Columna 5 = M2A20), cultivados en MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.	91
Figura 28. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de <i>Aspergillus oryzae</i> provenientes de la muestra 2 de avena cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M2A16. B. Aislado M2A17. C. Aislado M2A18. D. Aislado M2A19. E. Aislado M2A20. El color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxinas.	91
Figura 29. Colonias de aislado M2A16 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC por 7. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 10 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	92
Figura 30. Colonias de aislado M2A17 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	93
Figura 31. Colonias de aislado M2A18 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	94

Figura 32. Colonias de aislado M2A19 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	95
Figura 33. Colonias de aislado M2A20 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	96
Figura 34. Colonias de aislados presuntivos de <i>Aspergillus oryzae</i> provenientes de la muestra 3, trigo (columna 1= M3A1, columna 2 = M3A2, columna 3 = M3A3, columna 4 = M3A4 y columna 5 = M3A5), cultivados a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.	100
Figura 35. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de <i>Aspergillus oryzae</i> provenientes de la muestra 3 de trigo, cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M3A1. B. Aislado M3A2. C. Aislado M3A3. D. Aislado M3A4. E. Aislado M3A5. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxina.	100
Figura 36. Colonias de aislado M3A1 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 µm. H-I barra 20 µm.	101
Figura 37. Colonias de aislado M3A5 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 50 µm. I barra 20 µm.	102
Figura 38. Colonias de aislados presuntivos de <i>Aspergillus oryzae</i> provenientes de la muestra 3, trigo (columna 1= M3A6, columna 2 = M3A7, columna 3 = M3A8, columna 4 = M3A9, columna 5 = M3A10 y columna 6 = M3A11 cultivados en MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.	106
Figura 39. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de <i>Aspergillus oryzae</i> provenientes de la muestra 3 de trigo, cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M3A6. B. Aislado M3A7. C. Aislado M3A8. D. Aislado M3A9. E. Aislado M3A10. F. Aislado M3A11. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxina.	106
Figura 40. Colonias de aislado M3A8 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	107
Figura 41. Colonias de aislado M3A10 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	108

- Figura 42.** Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 5 de Arroz (columna 1= M5A1, columna 2 = M5A2, columna 3 = M5A3, columna 4 = M5A4, columna 5 = M5A5), cultivados en MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA..... 112
- Figura 43.** Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 5 de arroz, cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M5A1. B. Aislado M5A2. C. Aislado M5A3. D. Aislado M5A4. E. Aislado M5A5. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxina que se encuentran en los aislados A. Aislado M5A1 y D. Aislado M5A5. 112
- Figura 44.** Colonias de aislado M5A2 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm..... 113
- Figura 45.** Colonias de aislado M5A3 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 100 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm. 114
- Figura 46.** Colonias de aislado M5A5 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en agar MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm. 115
- Figura 47.** Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 6 de arroz (columna 1 = M6A2, columna 2 = M6A3, columna 3 = M6A4 y columna 4 = M6A5), cultivados a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA. 119
- Figura 48.** Producción de aflatoxina por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 6 de arroz (aislados 2 al 5), cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M6A2. B. Aislado M6A3. C. Aislado M6A4. D. Aislado M6A5. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxina..... 119
- Figura 49.** Colonias de aislado M6A5 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-F. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. G, H barra de 20 µm, I barra de 10 µm. Conidióforo y conidios cultivados en agar MEA. 120
- Figura 50.** Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 7 y 10 de trigo y avena (columna 1= M7A1, columna 2 = M7A2, columna 3 = M7A3, columna 4 = M10A1, columna 5 = M10A2, columna 6 = M10A3), cultivados a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA. 124
- Figura 51.** Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 7 y 10, de trigo y avena, cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M7A1. B. Aislado M7A2. C. Aislado M7A3. D. Aislado M10A1. E. Aislado M10A2. F. Aislado M10A3. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxina. 124

Figura 52. Colonias de aislado M7A1 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G - H barra 20 µm. I barra 20 µm	125
Figura 53. Colonias de aislado M7A2 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 50 µm. I barra 10 µm.	126
Figura 54. Colonias de aislado M7A3 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 50 µm. I barra 10 µm.	127
Figura 55. Colonias de aislado M10A1 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-F. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. G-I. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 50 µm. I barra 10 µm.	128
Figura 56. Colonias de aislado M10A2 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. . G barra 50 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.....	129
Figura 57. Colonias de aislado M10A3 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H- I barra 10 µm.	130
Figura 58. Colonias de aislados presuntivos de <i>Aspergillus oryzae</i> provenientes de la muestra 9 de trigo y arroz (columna 1= M8A1, columna 2 = M8A2, columna 3 = M8A3, columna 4 = M8A4, columna 5 = M8A5, columna 6 = M8A6), cultivados a 25 °C durante7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.....	134
Figura 59. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de <i>Aspergillus oryzae</i> provenientes de la muestra 8, de trigo y arroz, cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M8A1. B. Aislado M8A2. C. Aislado M8A3. D. Aislado M8A4. E. Aislado M8A5. F. Aislado M8A6. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxina.....	134
Figura 60. Colonias de aislado M8A1 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 10 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm.....	135
Figura 61. Colonias de aislado M8A2 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H-I barra 20 µm. I barra 10 µm.	136
Figura 62. Colonias de aislado M8A3 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas	

en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 20 µm. I barra 10 µm.	137
Figura 63. Colonias de aislado M8A4 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-F. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. G-I. Conidióforo y conidios cultivados en agar MEA. G-H barra 20 µm. I barra 10 µm.	138
Figura 64. Colonias de aislado M8A5 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en agar MEA. G barra 50 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.	139
Figura 65. Colonias de aislado M8A6 de <i>Aspergillus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 20 µm. I barra 10 µm.	140
Figura 66. Colonias de aislados presuntivos de <i>Rhizopus oryzae</i> provenientes de la muestra 2 de avena cultivados en MEA, PDA, OAT a 25 °C durante 4 días. Aislados columna 1= M4A1, columna 2 = M4A2, columna 3 = M2A3, columna 4 = M4A4 a Columna 5 = M4A5. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en PDA, fila 3 aislados en OA.....	147
Figura 67. Colonias de aislados presuntivos de <i>Rhizopus oryzae</i> provenientes de la muestra 2 de avena cultivados en MEA, PDA, OAT a 25 oC durante 4 días. Aislados columna 1= M4A6, columna 2 = M4A7, columna 3 = M4A8, columna 4 = M4A9 a Columna 5 = M4A10. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en PDA, fila 3 aislados en OA.....	151
Figura 68. Colonias de aislado M4A10 de <i>Rhizopus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C durante 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C por 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiósporas cultivados en agar MEA a 25 °C. G barra 50 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm.	152
Figura 69. Colonias de aislados presuntivos de <i>Rhizopus oryzae</i> provenientes de la muestra 2 de avena cultivados a 25 °C durante 4 días. Aislados columna 1= M4A11, columna 2 = M4A12, columna 3 = M7A1, columna 4 = M7A2 a Columna 5 = M7A3. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en PDA, fila 3 aislados en OA.	157
Figura 70. Colonias de aislado M4A11 de <i>Rhizopus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C por 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C durante 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiósporas cultivados en agar MEA a 25 °C. G barra 50 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm.....	158
Figura 71. Colonias de aislado M4A12 de <i>Rhizopus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C por 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C durante 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiósporas cultivados en agar MEA a 25 °C. G barra 50 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm.....	159
Figura 72. Colonias de aislado M7A1 de <i>Rhizopus oryzae</i> presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C por 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C durante 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiósporas cultivados en agar MEA a 25 °C durante 4 días. G barra 100 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm.	160

- Figura 73.** Colonias de aislado M7A2 de *Rhizopus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C por 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C durante 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiosporas cultivados en agar MEA a 25 °C. G barra 50 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm..... 161
- Figura 74.** Colonias de aislado M7A3 de *Rhizopus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C por 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C durante 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiosporas cultivados en MEA a 25 °C. G barra 50 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm. 162
- Figura 75.** Colonias de aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena cultivados a 25 °C durante 4 días. Aislados columna 1= M8A1, columna 2 = M10A1, columna 3 = M10A2 y columna 4 = M10A3. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en PDA, fila 3 aislados en OA. 166
- Figura 76.** Colonias de aislado M10A1 de *Rhizopus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C por 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C durante 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiosporas cultivados en agar MEA a 25 °C. G barra 100 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm..... 167
- Figura 77.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de la región ITS1-5.8-ITS2 de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae*. Línea 2 a línea 11, aislados M1A2, M1A5, M2A1, M2A14, M2A15, M2A16, M2A20, M3A1, M3A10 y M6A5; línea 1, control negativo; M, marcador de peso molecular 1Kb. 170
- Figura 78.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de la región de amplificación V9G y LR3 de aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae*. Línea 2 a línea 8, M4A10, M2A31, M2A32, M7A1, M7A2, M7A3, M10A1; línea 1, control negativo; marcador de peso molecular 1Kb. 171
- Figura 79.** Árbol filogenético basado en el método de Neighbor Joining de las secuencias obtenidas para la región ITS1-5.8S-ITS2 de aislados de especies de *Aspergillus* y de cepas de referencia de NCBI. *Aspergillus tamarii* fue utilizado como outgroup. Los valores de probabilidad de los nodos para cada clado indican el porcentaje de las réplicas del análisis de 1000 bootstraps que soportan ese clado. 172
- Figura 80.** Árbol filogenético basado en el método de Neighbor Joining de las secuencias obtenidas para la región ITS1-5.8S-ITS2 de aislados de especies de *Rhizopus* y de cepas de referencia de NCBI. *Rhizopus stolonifer* fue utilizado como outgroup. Los valores de probabilidad de los nodos para cada clado indican el porcentaje de las réplicas del análisis de 1000 bootstraps que soportan ese clado. 172
- Figura 81.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del gen Cyp51A de aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae*. Línea 2 a línea 11, aislados M1A2, M1A5, M2A1, M2A14, M2A15, M2A16, M2A20, M3A1, M3A10 y M6A5; v línea 1, control negativo; M, marcador de peso molecular 1kb..... 173
- Figura 82.** Perfil de restricción del gen Cyp51A por la enzima HincII de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae*. Línea 2 a línea 11, aislados M1A2, M1A5, M2A1, M2A14, M2A15, M2A16, M2A20, M3A1, M3A10 y M6A5; línea 11, control negativo M, marcador de peso molecular 1kb..... 174

Figura 83. Efecto del tiempo de incubación y temperatura sobre la producción de biomasa y β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i> . a) Biomasa producida. b) β -glucanos producidos. Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre las temperaturas de producción de biomasa o β -glucanos a un nivel de confianza del 95%.	175
Figura 84. Efecto de la fuente de carbono y concentración de glucosa sobre la producción de biomasa y β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i> . a) Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de las fuentes de carbono. Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de la concentración de glucosa. Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes o * muestran diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).	177
Figura 85. Efecto de la fuente de nitrógeno y concentración de sulfato de amonio sobre la producción de biomasa y β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i> . a) Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de las fuentes de nitrógeno. b) Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de la concentración de sulfato de amonio. Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes o * muestra diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).	178
Figura 86. Gráfico 2D y 3D del efecto de la concentración de glucosa y sulfato de amonio, mostrando las interacciones más importantes para la producción β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	181
Figura 87. Efecto del tiempo de incubación y temperatura sobre la producción de biomasa y β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i> . a) Biomasa producida. b) β -glucanos producidos. Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre la temperatura donde se obtiene la mayor concentración de biomasa o β -glucanos a un nivel de confianza del 95%.	185
Figura 88. Efecto de la fuente de carbono y concentración de glucosa sobre la producción de biomasa y β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i> . a) Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de las fuentes de carbono. b) Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de la concentración de glucosa. Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes o * muestran diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).	187
Figura 89. Efecto de la fuente de nitrógeno y concentración de cloruro de amonio sobre la producción de biomasa y β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i> . a) Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de las fuentes de nitrógeno. b) Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de la concentración de sulfato de amonio. Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes o * muestra diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).	188
Figura 90. Gráficos 2D y 3D del efecto de la concentración de glucosa y cloruro de amonio, mostrando las interacciones más importantes para la producción β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i>	191
Figura 91. Color de los β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	197
Figura 92. Espectro de reflectancia FT-IR de la muestra de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	199
Figura 93. Color de las formulaciones de yogures formulados, Fórmula control, Fórmula 1 (203), Fórmula 2 (410), Fórmula 3 (125) y Fórmula 4 (625).	204

Figura 94. Curvas de flujo de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos.....	204
Figura 95. Curvas de viscosidad de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos. ...	205
Figura 96. Viscosidad de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i> . Los valores son el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes en las barras indican diferencia estadísticamente significativa entre muestra ($p < 0.05$).....	206
Figura 97. Análisis de barrido de esfuerzo de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i> . Los valores son el promedio de tres determinaciones.....	207
Figura 98. Análisis de barrido de frecuencia de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i> . Los valores son el promedio de tres determinaciones.	208

1. Introducción

Los polisacáridos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo uno de estos los β -glucanos, encontrados en plantas, algas, bacterias, setas, mohos filamentosos y levaduras. Estos compuestos son homoglicanos si están compuestos por un solo tipo de monosacárido y heteroglicanos si su constitución incluye diferentes tipos de monosacáridos (Synytsya & Novak, 2014; Benalaya et al., 2024).

Estos polisacáridos son de importancia ya que tienen propiedades biológicas beneficiosas en la salud humana, tales como, propiedades antioxidantes, inmunoestimulantes, reducción de los niveles de colesterol, triglicéridos, glucosa, además de actuar como fibra dietaria, prebióticos, entre otros. Desde el punto de vista tecnológico, en la industria de alimentos, aportan propiedades, como espesantes, estabilizantes y gelificantes que son importantes para el desarrollo de alimentos (Ahmad, & Khalid, 2018; Bai et al., 2019; Ruthes, Smiderle & Lacomini, 2015; Vaclav, Petr & Luca et al., 2018).

Estas características biológicas y tecnológicas son importantes para el desarrollo de alimentos funcionales que aporten beneficios en la salud de las personas y posean características tecnológicas adecuadas, de tal manera, que surge el interés en el estudio de los β -glucanos de diferentes fuentes, como los extraídos de paredes celulares de mohos filamentosos como *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus oryzae*.

Así mismo, en la actualidad son importantes los temas de economía circular en la industria de alimentos, donde se utilizan desechos que son incorporados en procesos tecnológicos para obtener materias primas y disminuir su descarga en el ambiente. Uno de los desechos generados en el procesamiento de almidón de papa son los residuos líquidos, que contienen cantidades importantes de carbohidratos, proteínas, lípidos y minerales, que cuando son liberados en el ambiente crean problemas en los suelos y cuerpos de agua debido a la utilización de estos componentes por microorganismos, lo que trae como consecuencia eutrofización y acidificación (Kot et al., 2020, Gonçalves & Maximo, 2023).

Por ende, es importante investigar alternativas de usos de estos residuos, teniendo en cuenta el enfoque de economía circular, ya que es una alternativa para el uso de estos residuos líquidos como medios de cultivos para la producción de biomasa y la extracción de β -glucanos para ser incorporado en el desarrollo de un yogur natural tipo griego.

El desarrollo de alimentos lácteos fermentados con β -glucanos provenientes de hongos filamentosos *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae* no existe y pocos son los estudios realizados con polisacáridos provenientes de organismos del reino *Fungi*, por lo cual es importante hacer estudio en este campo y determinar su comportamiento en sistemas alimenticios, así como las propiedades biológicas aportadas por estos polisacáridos.

Los aspectos antes mencionados son desarrollados a continuación:

1.1. Generalidades, métodos de aislamiento y caracterización de los glucanos.

De manera general, los β -glucanos son polisacáridos conformados por monómeros de D-

glucosa unidos por enlaces β -glucósidos, que pueden encontrarse en las paredes celulares de levaduras, mohos, bacterias, algas y cereales, lo cual hace que su estructura molecular y su actividad biológica sea distinta. La estructura de los glucanos provenientes de mohos tienen diferentes estructuras moleculares que van desde enlaces lineales α -(1-3) y α -(1-4) para los α -glucanos, hasta enlaces con ramificaciones β -(1-6) y β -(1-3) para los β -glucanos (Bai et al., 2019; Shi, et al., 2018).

Los β -glucanos pueden dividirse en base a la composición de monosacáridos, en homogluanos, que están formados por el mismo monosacárido y heterogluanos, a los formados por varios tipos de monosacáridos, tales como galactosa, xilosa, manosa, fucosa, fructosa y arabinosa (Benalaya et al., 2024)

En base a su estructura y ramificaciones, los β -glucanos se han clasificados en siete clases, β -glucanos (1-3) no ramificados, β -glucanos (1-3) con ramificaciones ocasionales, β (1-6) formadas de unidades de glucosa, glucanos que contienen enlaces β (1-3) y β (1-4) unidos por moléculas de glucosas, glucanos que contienen enlaces β (1-3), β (1-4) y β (1-6), β (1-3) glucanos fosforilados, β -glucanos (1-3) con cantidades considerables de ramificaciones β (1-6) y glucanos que contienen principalmente enlaces β (1-6) formado por unidades de glucosa (Ruiz & Ortiz, 2019).

Estos polisacáridos cumplen funciones de almacenamiento en el caso de las plantas y forman parte de las paredes celulares en el caso de bacterias, hongos y levaduras. En el caso de *Aspergillus nidulans*, se ha sugerido que su función principal es de reserva de material que se acumula en las paredes celulares durante el crecimiento de las células vegetativas. Algunos son exopolisacáridos excretados por bacterias, hongos y levaduras en el medio de crecimiento (Synytsya & Novak, 2014).

El contenido de glucanos varía dependiendo de la especie de donde se lo obtenga, en el caso de los β -glucanos extraídos de cereales como arroz, trigo, avena, cebada y sorgo se han reportado concentraciones, entre 0.18 a 7.8%. En bacterias como *Agrobacterium sp.* ZX09, *Paenibacillus polymyxa* y bacterias ácido lácticas entre 1.09 hasta 90%. Para miembros del reino *Fungi* como, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sparassis crispa*, *Gyrophora esculenta*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Gyrophora esculenta*, *Ganoderma lucidum* y *Aspergillus niger* entre 0.21 y 65% y para las microalgas, *Durvillaea antarctica*, *Euglena*, *Scenedesmus obtusiusculus* A189 y *Dirvillaea antarctica*, entre 5 a 70% (p/p) (Mykhalevych et al., 2022).

En el caso de los α -glucanos, se han reportado concentraciones para hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii* y *Penicillium crysogenum* entre 6 y 12.5%. En hongos comestibles como *Pleurotus djamor*, *Pleurotus precoce*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotu seryngii* y *Pleurotus citrinopileatus*, las concentraciones varían entre 2 y 6.1% (Złotko et al., 2019).

Un aspecto importante de los β -glucanos es su modificación estructural mediante método de degradación térmica, irradiación, ultrasonido, carboximetilación, fosforilación, sulfatación y degradación biológica. Estas modificaciones tienen impacto sobre su bioactividad, solubilidad, peso molecular y viscosidad intrínseca, al respecto Chioru & Chirsanova (2023) señalan lo

siguiente.

La degradación térmica consiste en someter a los β -glucanos a temperaturas entre 50 y 121 °C durante un periodo de 6 y 48 h. Este tratamiento permite modificar el tamaño molecular. La aplicación de radiación consiste en someter a las muestras a longitudes de ondas correspondientes a los rayos X, gamma y haces de electrones, con la finalidad de modificar su peso molecular y, con ello, mejorar la solubilidad y disminución de la viscosidad. El tratamiento con ultrasonido se basa en la aplicación de bajas y altas frecuencias de ultrasonido, lo cual trae como consecuencia la despolimerización y ruptura de las cadenas moleculares. El efecto observado de la aplicación de microondas es la disminución del peso molecular, aumento de la viscosidad e incremento de la solubilidad en agua.

La sulfatación consiste en reemplazar a los grupos hidroxilos, carboxilos o aminos terminales presentes en los β -glucanos por grupos sulfatos, lo cual mejora su actividad biológica, la solubilidad se incrementa debido a la hidrofiliidad de los grupos fosfatos, lo cual ofrece ventajas para su aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria. La corboximetilación consiste en adicionar ácido cloroacético o monocloroacetato de sodio a los β -glucanos en reacción con 2-propanona en medio básico, incrementando la solubilidad en agua del compuesto. La fosforilación consiste en introducir grupos fosfatos en la cadena de polisacáridos, lo cual mejora la solubilidad en agua, cambio en el peso molecular y modificaciones en la conformación de los polisacáridos, se ha demostrado que sus propiedades son más útiles en el campo de la medicina.

Con respecto a las modificaciones enzimáticas, han sido utilizado las enzimas zimolasas, glucanasas, lisoenzimas, papaína, bromelina y proteasa neutra para la degradación de las cadenas de β -glucanos y componentes acompañantes. Estos de métodos tienen la ventaja de ser específicos y son de mayor eficiencia.

Los glucanos deben ser extraídos, purificados y caracterizados, al respecto se menciona lo siguiente.

Los polisacáridos pueden ser extraídos de la biomasa micelial con agua a diferentes temperaturas, con soluciones alcalinas acuosas o en secuencia de ambos tipos de extracciones. Antes de realizar el proceso de extracción de forma acuosa, se llevan a cabo extracciones con algunos solventes orgánicos, como etanol, acetona, o mezclas de cloroformo y metanol con la finalidad de remover compuestos polares tales como lípidos y terpenos, que permite la separación de los polisacáridos de interés de otros compuestos que pueden estar presentes (Ruthes, Smiderle & Lacomini, 2015).

En el caso de la extracción acuosa, se pueden utilizar temperaturas de 70, 80 y 115 °C , con diferentes tiempos, produciendo mayor rendimiento la temperatura más alta (115 °C) en un tiempo de 1 hora (Gao et al., 2017), posteriormente, son centrifugados para separar los compuestos de interés presente en el sobrenadante y eliminar el precipitado. Este proceso es repetido para incrementar el rendimiento de extracción. Se utiliza etanol al 80% y una temperatura de 4 °C durante 24 horas para precipitar a los glucanos presentes en las fracciones obtenidas. También se han reportado extracciones con solventes presurizados, ultrasonido y

microondas, que suelen ser más eficientes debido a la obtención de un mayor rendimiento, sin embargo, requieren de dispositivos específicos que hace que el proceso de extracción de β -glucanos sea costoso (Gao et al., 2017).

Con respecto a la extracción alcalina y métodos de purificación, Ruthes, Smiderle & Lacomini (2015), mencionan que se utilizan soluciones básicas de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempo, siendo una referencia, la concentración de 2% p/v, 100 °C y 60 min, que son aplicadas a las fracciones obtenidas por el método de extracción acuoso. Los métodos de purificación aplicados en glucano son, ciclos de congelamiento-descongelamiento, tratamientos con solventes orgánicos, tratamiento con solución de Fehling, diálisis, ultrafiltración y fraccionamiento por columna, son aplicados para eliminar compuestos fenólicos, monosacáridos, aminoácidos y otras moléculas que puedan estar presentes.

La caracterización de los glucanos generalmente es realizada por la aplicación de técnicas instrumentales que incluyen cromatografía líquida, cromatografía gaseosa, espectrometría de masa, espectrofotometría de infrarrojo con transformada de Fourier, resonancia magnética nuclear y cromatografía líquida en capa fina.

Los glucanos pueden estar compuestos por diferentes monosacáridos y su composición puede ser determinada mediante cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución, y cromatografía gaseosa. El peso molecular generalmente se analiza mediante la técnica de cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento, cromatografía en gel de permeación, cromatografía de permeación de alto rendimiento, los cuales pueden estar acopladas a detectores de índice reflectivo y detector de dispersión de laser (Synytsya & Novak, 2014).

Compuestos como proteínas, ácidos grasos, carbohidratos, ácidos nucleicos y lipopolisacáridos pueden ser determinados en glucanos, debido a la presencia de grupos químicos característicos, tales como NH, CO, CC, CH, CH₂, OH mediante la técnica de Espectroscopía de infrarrojo con transformado de Fourier (FT-IR). Esta técnica proporciona espectros de absorción, que son utilizados como huellas digitales para la identificación de los compuestos mencionados. Una aplicación de esta metodología es la identificación de α -glucanos y β -glucanos (Bikmurzin et al., 2022).

La configuración anomérica, la conformación de los anillos que forman a los glucanos, la posición de las ramificaciones y su proporción pueden ser determinadas mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C. El resultado es un espectro de RMN, que sirve como huella dactilar para la identificación de glucanos en sus diferentes conformaciones y configuración estructural (Synytsya & Novak, 2014).

1.2. Efectos biológicos de los glucanos en la salud de los seres humanos.

Los glucanos tienen efectos positivos para la salud de los seres humanos, entre los que se incluyen, actividad inmunomoduladora, anticancerígena, el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo de la glucosa, disminución de los triglicéridos, colesterol, y la prevención de la obesidad. Además, actúan como prebióticos, antioxidantes, entre otros (Ahmad, & Khalid,

2018; Bai et al., 2019; Ruthes, Smiderle & Lacomini, 2015; Vaclav, Petr & Luca et al., 2018). Debido a los efectos positivos sobre la salud hay un gran interés en la investigación de estos polisacáridos.

La actividad anticancerígena e inmunomoduladora se debe a la inducción y diferenciación de células inmunes, tales como, macrófagos, leucocitos y células natural killer, que forman partes del sistema inmunológico innato y adaptativo. Así mismo, ocurre la activación de monocitos en la fase inicial de la respuesta inmune por consumo de glucanos, la activación de linfocitos, células dendríticas y células mieloides. En α -(1-4) glucanos se ha reportado la inducción de producción de factores de necrosis de tumores α (TNF- α), óxido nítrico y la producción de prostaglandinas E2 por los macrófagos, linfocitos y otras células inmunocompetentes, la producción de citoquinas pro y antiinflamatoria tales como, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 o INF- γ (Złotko et al., 2019).

La función como prebióticos y fibra dietaria se debe a la resistencia de estos compuestos a los jugos gástricos, por ende, llegan intacto al intesto grueso, donde son utilizados como fuente de carbono por las bacterias en procesos de fermentación, permitiendo estimular el crecimiento de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus* y disminuyen a las especies indeseables de *Clostridium* y *Bacteroides* (Shi, et al., 2018). Los efectos de fibra dietaria incluyen reducción de los niveles de colesterol, prevención de la diabetes, regulación de la microflora gástrica y actividad antioxidante (Bai et al., 2019).

La reducción de los niveles de colesterol por los β -glucanos se atribuye a su habilidad de atrapar las micelas de ácido biliar que contienen grasa, lo cual rompe la interacción con los transportadores de membrana luminales presentes en el epitelio intestinal, lo que incrementa la excreción de grasa, ácido biliar y colesterol en los residuos fecales. También se ha reportado efecto de absorción del colesterol debido a la alta viscosidad desarrollada por los β -glucanos, especialmente aquellos provenientes de cereales, lo cual disminuye la respuesta postprandial de los niveles de glucosa y, por lo tanto, ayuda a prevenir la diabetes (Nakashima et al., 2018).

Los glucanos restablecen el balance microbiano del tracto gastrointestinal y ofrecen varios beneficios fisiológicos que contribuyen al bienestar y la salud de los seres humanos. Entre estos beneficios se incluye la mejora de la integridad estomacal, mejorar el aprovechamiento de la energía y protección contra agente patógenos, debido a la producción de ácidos grasos de cadenas cortas, como, ácido butírico, propiónico y acético, producidos mediante la fermentación de los glucanos por la microflora intestinal (Jayachandran et al., 2018).

El efecto antioxidante de los β -glucanos se debe a los electrones libres del oxígeno presente en los grupos hidroxilo, que se unen a radicales libres, neutralizándolos y evitando causar daños a los carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Estas moléculas han demostrado tener efecto captador de radicales hidroxilos, superóxido, entre otros (Utama et al., 2020).

1.3. Aplicaciones de los β -glucanos de hongos filamentosos en el desarrollo de yogures o leches fermentadas

Los β -glucanos son incluidos dentro de la categoría de GRAS por su siglas en inglés (Generally Recognized As Safe) por la FDA (Administración de Drogas y Medicamento) de los Estados

Unidos y pueden ser utilizados en el desarrollo de alimentos como espesantes, estabilizantes y como gelificantes (Utama et al., 2020).

Debido a las características especiales de estos polisacáridos es necesario realizar estudios donde se utilicen a estos componentes bioactivos para determinar su comportamiento en los sistemas alimenticios de origen lácteo, así como los efectos beneficios para la salud de las personas. Por lo tanto, es relevante la investigación a los polisacáridos extraídos de hongos filamentosos, como una alternativa para el desarrollo de alimentos funcionales, como yogures o leches fermentadas que permitan contribuir o coadyuvar problemas de salud en los seres humanos.

No se encontraron reportes acerca del desarrollo de alimentos funcionales con β -glucanos de *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae*, sin embargo, se han realizado investigaciones de desarrollo de alimentos funcionales con β -glucanos de hongos comestibles y levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae*, los cuales se mencionan a continuación:

Los polisacáridos de *Pleurotus ostreatus* fueron utilizados a una concentración de 10 mg de β -glucanos/mL para el desarrollo de yogures líquidos naturales y saborizados con frutas. Se demostró que su utilización no afectó el proceso de fermentación, los valores de pH y acidez titulable fueron característicos para este tipo de alimentos y las bacterias coliformes totales, mohos y levaduras no estuvieron presentes durante el tiempo de vida útil de los yogures (Hozová, Kuniak & Kelemenová, 2004). Los β -glucanos de *Pleurotus citrinopileatus* fueron utilizados para el desarrollo de yogures líquidos bajo en grasa, suplementados con proteínas lácteas y polisacáridos entre 0.3 y 0.5%. Se concluyó que la adición de 0.3% y 0.4% de β -glucanos no afectó a las características microbiológicas, pH, acidez titulable, cenizas, sinéresis y las características sensoriales fueron similares a la del control (Pappa et al., 2018).

Los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* fueron utilizados para desarrollar un yogur batido en concentraciones de 0 a 1.25%. Los resultados mostraron que la adición no afectó significativamente las propiedades microbiológicas, sensoriales y mejoró el defecto de sinéresis en los yogures después de 21 días de almacenamiento refrigerado. El pH y la acidez no fueron afectados por la adición de β -glucanos y las propiedades viscoelásticas del yogur variaron en función del nivel de concentración de estos polisacáridos. En general, la viscosidad incrementó proporcionalmente a la concentración de β -glucanos (Uriza, 2014). En otro estudio se utilizó el 1% de β -glucano para desarrollar yogures líquidos enriquecidos con polisacáridos y probar su efecto inmunomodulador en niños sanos de entre 3 y 5 años. El desarrollo de este estudio demostró que la adición de β -glucanos incrementó la cantidad de células del sistema inmune en sangre periférica, células que son críticas en la defensa del organismo contra infecciones (Henao et al., 2018).

En cuanto a la utilización de β -glucanos de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se desarrolló un yogur natural con 3% de grasa, utilizando concentraciones entre 0.15 y 0.9% de polisacáridos. Se demostró que su adición afectó significativamente los atributos de consistencia y flavor, y se estableció que concentraciones superiores al 0.3% de β -glucanos mantienen la estabilidad estructural de los yogures formulados, siendo sus características

similares a las del control. Se indicó que una porción de 250 g que contienen 0.7 g de β -glucanos (0.3%) puede ser considerado con un alimento que tiene propiedades promotoras de la salud (Piotrowska, Waszkiewicz & Swiderski, 2009).

Se utilizaron concentraciones de 0.0, 0.5, 1, 1.5 y 2% de β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* como sustituto de grasa en el desarrollo de yogures bajos en grasa. Se demostró que su adición mejoró las propiedades reológicas y la estabilidad física del producto. Se estableció una concentración de 1.5% de estos polisacáridos para obtener un yogur bajo en grasa, con atributos adecuados, como acidez, sinéresis, capacidad de retención de agua, y valores de coordenadas de color en la escala CIELAB, así mismo, se mencionó que el consumo de un yogur bajo en grasa enriquecido con β -glucanos puede proporcionar efectos benéficos en la salud de las personas (Mejri, Bornaz & Sahli, 2014).

En otro estudio, se desarrolló yogur descremado utilizando β -glucanos de levaduras de cerveza comercial denominado Yestimun, con concentración de 0.2 a 0.8% p/p para evaluar su potencial como espesante. Se encontró que la adición de estos compuestos redujo el tiempo de fermentación de 4 a 3 horas. Estos compuestos forman especies de racimos esféricos, mejorando así la capacidad de formar geles. Los parámetros fisicoquímicos de sinéresis, viscosidad, color y acidez titulable no fueron afectados, mientras que las propiedades de textura, como dureza y adhesividad fueron incrementadas. Se determinó que, desde el punto de vista sensorial, concentraciones superiores a 0.8% podrían afectar la aceptación del yogur por parte del panel evaluador, sin embargo, todas las muestras tuvieron una buena aceptación ya que fueron calificadas con valores de 5.0/9.0 (Raikos et al., 2018).

1.4. Investigaciones sobre la utilización de residuos líquidos provenientes del procesamiento de almidón de papa en procesos biotecnológicos con hongos.

Se han utilizado residuos líquidos provenientes del proceso de obtención de almidón de papa en procesos de fermentación en estado líquido para la producción de biomasa, β (1,3/1,6) – glucanos, proteínas, biosíntesis de lípidos, carotenoides y bioetanol con microorganismos perteneciente al reino *Fungi*, los cuales se detallan a continuación.

Se produjo biomasa y β (1,3/1,6) - glucanos de *Candida utilis* ATCC 9950 utilizando residuos líquidos suplementados con 10% de glicerol. El proceso de fermentación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer con agitación y en biorreactores. Se obtuvo biomasa con mayor cantidad de proteínas en cultivo realizados en matraces (26.5%) que en biorreactor (19%). La mayor cantidad de β (1,3)/(1,6) - glucanos fue obtenida por fermentación en biofermentadores (85% de polisacáridos) en 48 horas de cultivo, mientras que la fermentación en matraces Erlenmeyer promovió la biosíntesis de fracciones de β (1,3)/(1,6) - glucanos insolubles en alkali y redujo el contenido de β (1,6)-glucano (Bzducha, et al., 2018). Además, se realizó la extracción de β (1,3)/(1,6) - glucanos por dos métodos de extracción de la misma levadura, cultivada en residuos líquidos de almidón de papa. El primer método consistió en una extracción alcalina con en agua caliente y el segundo método utilizó autoclave para romper las paredes celulares. Los resultados mostraron que el primer método tuvo un rendimiento de 49% en β (1,3)/(1,6) – glucanos, mientras que el segundo método alcanzó un rendimiento de 70% (Bzducha et al., 2020).

También se produjo biomasa y proteína celular de *Candida utilis* ATCC 9950 mediante fermentación utilizando glicerol como fuente de carbono y residuos líquidos desproteinizados de papa como fuentes de nitrógeno y componentes minerales. Los resultados mostraron que la adición de 5% de glicerol produjo 30 g/L de biomasa en base seca y la eficiencia de síntesis de proteínas de 12.2 g/L. El proceso de fermentación consumió el 83% del glicerol, 51% de nitrógeno y 91% de la demanda química de oxígeno (Kurcz et al., 2018)

Las levaduras *Candida inconspicua*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kazachstania unispora*, y *Zygorhynchus florentina* fueron aisladas, caracterizadas e identificadas mediante técnicas de biología molecular y fue evaluada su capacidad de biosíntesis de lípidos como alternativa a los combustibles fósiles y biocombustibles obtenidos a partir de semillas oleaginosas. Se utilizaron residuos líquidos del procesamiento de almidón suplementados con glucosa (50 g/L), lactosa (50 g/L) o glicerol (50 g/L). Los resultados mostraron una acumulación de más del 20% de lípidos en las células y la composición de ácido graso fue dependiente del microorganismo utilizado y de la fuente de carbono (Gientka et al., 2017).

Se cultivó *Rhodotorula glutinis* en medios de cultivos formulados con residuos líquidos de papa, suplementado con 5% de glicerol (p/v) y ajustados a pH 2, 3, 4, 5, 6 y 7 para la producción de biomasa, proteína, lípidos y carotenoides. Entre los resultados, se encontró que la mayor cantidad de biomasa se obtuvo a pH entre 4 a 7 (17.2 a 19.2 g/L en base seca) y no afectó significativamente la producción de proteínas y lípidos. El perfil de ácidos grasos estuvo dominado por ácido oleico (48.1–53.4%), linoleico (21.4–25.1%) y ácido palmítico (13.0–15.8%). En estas condiciones de pH, la levadura sintetizó principalmente toruleno (43.5 - 47.7%) y carotenoides totales (34.7–38.6%) (Kot et al., 2017). Otro estudio fue realizado con el cultivo de las levaduras *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Rhodotorula gracilis* en medio líquido de residuos del procesamiento de almidón, suplementado con glicerol al 30, 50, 100, 150, 200 y 250 g/L para la biosíntesis simultánea de lípidos y carotenoides. Los resultados mostraron que *R. mucilaginosa* y *R. gracilis* produjeron la mayor cantidad de lípidos intracelulares (aproximadamente 15 g/100 g en base seca) (Kot et al, 2019).

Se utilizaron tres cepas de hongos filamentosos, *Aspergillus oryzae* 448, *Aspergillus niger* 334 y *Rhizopus oligosporus* 2710 para la biodegradación de residuos líquidos de la industria de la papa. El proceso de fermentación se realizó en un tiempo de 48 y 75 h en un fermentador de laboratorio de 1.5 L. Los resultados mostraron que, a 72 horas de fermentación, *Aspergillus. oryzae* 448 redujo hasta el 70% en la demanda química de oxígeno, mientras que *A. niger* y *R. oligosporus* 2710 la redujeron a 58 y 52%, respectivamente. En un tiempo de 48 h, hubo una reducción del contenido de fósforo hasta un 82, 6% y *Aspergillus oryzae* 448 produjo la mayor cantidad de compuestos nitrogenados en 72 horas de fermentación. Independientemente del tipo de mohos utilizado, la mayor cantidad de biomasa de moho se obtuvo durante las primeras 48 de fermentación. La biomasa producida se caracterizó por un alto contenido de proteínas (42 - 44%) y un alto valor energético (Nowak, Górna, & Nowak, 2013).

Se produjo bioetanol utilizando *Saccharomyces cerevisiae* S288c utilizando residuos líquidos del procesamiento de almidón de papa como fuente de carbono económica. En esta

investigación se optimizaron la hidrólisis de los residuos líquidos y las condiciones de crecimiento de la levadura. Los resultados mostraron que la máxima productividad de azúcares fermentables fue de 53 mg/g obtenida con 3% de H₂SO₄. El rendimiento de etanol producido fue 51.37 mg/g a pH 5.5, temperatura de 30 °C, tamaño del inóculo del 10 % (v/v) y tiempo de fermentación de 72 horas (Dawood, Taha, & Ali, 2019). Así mismo, se establecieron los valores óptimos de los componentes en los residuos líquidos como 39.7% de almidón, 34.7% de humedad, 34.7% de cenizas, 9.46% de proteínas y 7.33% de grasa. Las condiciones óptimas de cultivo fueron una temperatura de 32.2°C, pH 4.07 y un tiempo de fermentación de 72.1 horas para obtener un rendimiento de 34.5% de etanol (v/v) (Tenkolu, Kuffi & Gindaba, 2022).

1.5. Planteamiento del problema.

Actualmente gran parte de la población mundial tiene problemas de salud relacionados con el tracto gastrointestinal, como inflamación colónica, diarreas por el incremento de bacterias no deseadas, malestar estomacal, entre otras, que generalmente son ocasionados por un desbalance en la microflora intestinal, conocido como disbiosis o microobesidad (Lam & Cheung, 2013; Shi et al, 2018).

Además, se ha reportado una relación directa entre la disbiosis y algunos efectos de salud relacionadas con la diabetes y dislipemia, que pueden conllevar a enfermedades cardiovasculares y otras complicaciones. Otros factores asociados a estas enfermedades son hábitos inadecuados de alimentación y sedentarismo, que pueden conllevar a muchas personas a la muerte, además de ocasionar costos elevados para los sistemas de salud. Por las razones antes mencionadas, estas enfermedades fueron consideradas entre las cuatro primeras causas de muerte en el mundo para el año 2022 (WHO, 2023). En el Ecuador para el año 2022, estuvieron dentro de las primeras cinco causas de muerte enfermedades del corazón, diabetes mellitus, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades hipertensivas (INEC, 2023).

Estas enfermedades provocan un desbalance en el sistema inmunológico que es de relevancia en la actualidad, ya que hace más susceptible al ser humano a enfermedades ocasionadas por microorganismos patógenos, por lo cual merecen especial atención ingredientes y el desarrollo de alimentos que ayuden a fortalecer al organismo y a recobrar el equilibrio en caso de enfermedades no transmisibles como diabetes y dislipemia.

En muchos países en desarrollado o emergentes, las políticas de salud están orientadas en la medicina correctiva. Sin embargo, la investigación en materias primas y alimentos funcionales pueden ofrecer alternativas para preservar y coadyuvar la salud. En este contexto, los β -glucanos han captado interés por su potencial en el desarrollo de alimentos funcionales que además de cumplir con funciones nutricionales, tienen efectos positivos sobre la salud, tanto de prevención y reducción de condiciones patológicas. Este interés es debido a que los consumidores tienen grandes expectativas por alimentos nutritivos y que promuevan efectos positivos sobre la salud (Hammam, et al., 2017).

Se ha investigado en mayor medida los β -glucanos provenientes de hongos comestibles como, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus biporus*, *Coprinus comatus*, *Laetiporus sulphureus*, *Pleurotus ostreatus*, *Ramaria botrytis*, y *Termitomyces eurhizus*, seguido por las levaduras *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y en menor proporción en mohos filamentosos como *Aspergillus*

niger, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii*, y *Fusarium solani* DO7 en aplicaciones de salud y bienestar humano (Wiater, et al., 2015 y Zeng et al., 2019).

No existen investigaciones acerca del uso de β -glucanos de *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae* en el desarrollo de alimentos funcionales, muy probablemente debido a que algunos miembros de estos géneros pueden causar enfermedades en los seres humanos, afectan sembradíos de frutas y hortalizas, otros contaminan alimentos en postcosecha, forrajes, alimentos para animales y producir micotoxinas (Cortés, Guadarrama y Díaz, 2014); Wiater et al., 2015).

A pesar de esto, los hongos filamentosos comestibles con potencial en nutrición, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium venenatum*, *Monascus purpureus*, *Neurospora intermedia* y *Rhizopus oryzae* han sido utilizados para producir proteínas, pudiendo servir sus paredes celulares como fuentes de β -glucanos. En particular, *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae*, dos hongos inocuos, que han sido considerado como probióticos y se utilizan en la fabricación de alimentos fermentados, siendo incluso clasificados por la FDA como Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS por sus siglas en inglés Generally Recognized as Safe) (Cortés, Guadarrama y Díaz, 2014; Souza et al., 2018).

A pesar del interés, pocos son los estudios que se han enfocado en el desarrollo de alimentos funcionales con polisacáridos de hongos, en este sentido, productos de panificación y pastas formulados con β -glucanos extraídos de levaduras, avena y cebada han demostrado que reducen la carga de glucosa en sangre, facilitando el manejo de la diabetes, sus síntomas (polidipsia, polifagia, poliuria y pérdida de peso) y complicaciones. También se han realizados investigaciones en alimentos lácteos como yogures líquidos y helados fabricados con β -glucanos extraídos de levaduras y setas comestibles, por lo cual el desarrollo de alimentos con estos compuestos son un área de interés en ciencia y tecnología de alimentos (Jayachandran et al., 2018).

Además, los procesos de obtención de almidón de distintas fuentes vegetales requieren de una gran cantidad de agua, que generalmente se descargan en el medio ambiente, creando problemas en suelos y cuerpos de agua debido a que contienen cantidades importantes de carbohidratos, restos de proteínas y otros nutrientes. Por lo cual es necesario un buen manejo de los residuos provenientes de la obtención de almidón, utilizándolos en aplicaciones biotecnológicas para contribuir con el cumplimiento los objetivos de desarrollo sostenibles 6, 12, 13, 14 y 15 de la agenda 2030 de la Unesco (Souza, Zamani & Taherzadeh, 2019; UNESCO, 2017). De lo expuesto, los nutrientes que aportan estos residuos pueden ser utilizados para optimizar medios de cultivo que permitan la obtención de biomasa de hongos filamentosos y la posterior extracción de β -glucanos.

Con los antes expuesto, se plantean la siguiente hipótesis y objetivos de trabajo.

2. Hipótesis de trabajo.

Ho: Los β -glucanos provenientes de las paredes celulares de *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae* no podrán ser extraídos mediante el uso de agua caliente con presión y ser utilizados en

el desarrollo de un yogurt tipo griego funcional.

H1: Los β -glucanos provenientes de las paredes celulares de *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae* podrán ser extraídos mediante el uso de agua caliente con presión y ser utilizados en el desarrollo de un yogurt tipo griego funcional.

3. Objetivos (Objetivos Generales / Objetivos Específicos).

3.1. Objetivo general.

Evaluar el uso de los residuos de la producción de almidón de papa para la producción de biomasa de hongos, obtención de β -glucanos y su uso en el desarrollo de un yogurt tipo griego funcional.

3.2. Objetivos específicos.

Aislar e identificar mohos de la especie *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae*.

Optimizar las condiciones para la producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae* utilizando los residuos de la producción de almidón de papa.

Extraer y purificar los β -glucanos provenientes de las paredes celulares de los mohos cultivados.

Determinar el rendimiento de la extracción de β -glucanos.

Caracterizar a los β -glucanos purificados, mediante análisis químicos, estructurales y microbiológicos.

Desarrollar un yogurt tipo griego utilizando los β -glucanos obtenidos.

Caracterizar el yogurt mediante análisis físicos, químicos, reológicos, viabilidad de bacterias ácido lácticas, antioxidante, microbiológicos y sensorial.

4. Materiales y Métodos.

4.1. Materiales.

La investigación fue llevada a cabo en los laboratorios de microbiología y análisis de alimentos de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi (UPEC), ubicada en la ciudad de Tulcán, Provincia del Carchi, Ecuador, así como en los Laboratorios de la Universidad Tecnológica (UTEC), sede Colonia, Uruguay.

Los reactivos fueron de grados analíticos, las cepas de microorganismos fueron aisladas de muestras de granos. Los residuos provenientes del proceso de obtención del almidón utilizado en el diseño del medio de cultivo líquido para la optimización de β -glucanos de paredes celulares los hongos, fueron obtenidos en los laboratorios de la UPEC, en fases previas del proyecto del cual forma parte este trabajo. Se utilizaron 500 gramos de granos de arroz, trigo y de avena comercial para el aislamiento de los hongos los cuales fueron adquiridos en 10 puntos de ventas del mercado local de la ciudad de Tulcán.

4.2. Métodos.

4.2.1. Aislamiento e identificación de mohos de la especie *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae*.

4.2.1.1. Aislamiento de mohos de la especie *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae*.

Los hongos de las especies de interés fueron aislados utilizando el método de plaqueo directo, de acuerdo a lo indicado por Pitt & Hocking (2009) y Zulkifli & Zakaria (2017). Para ello, se sembraron 10 granos de cada cereal equidistantes unas de otras en agar papa dextrosa (PDA). Las placas fueron incubadas a 25°C por 7 días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se seleccionaron las colonias presuntivas que presentaron coloración verde - amarillo para los aislados de *Aspergillus oryzae* (Okayo et al., 2020) y color blanco – gris claro tipo algodonoso para los aislados de *Rhizopus oryzae* (Kwon et al., 2015) para su posterior repique. Una pequeña proporción del micelio de las muestras seleccionadas fueron resembradas e incubadas bajo las condiciones anteriores. Posteriormente, se aplicó la técnica de cultivo monospórico para obtener cultivos puros utilizando el agar mencionado. El cultivo stock de los aislados puros fue preparado utilizando tubos de plásticos de 1.5 mL estériles con 1000 µL de solución de glicerol al 10% y conservados a -4 °C.

4.2.1.2. Identificación de mohos de las especies de interés.

Las características macroscópicas para la identificación preliminar de los aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* se realizó mediante observación macroscópica de las características morfológicas indicadas por Ab Kadir et al. (2016) y por Samson et al (2014) en los medios de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Extracto de Levadura Czapek (CYA), Agar Extracto de Levadura Sacarosa (YES) y Agar Creatina Sacarosa (CREA). En el caso de los aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae*, los medios de cultivos utilizados fueron Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Extracto de Malta (MEA) y Agar Avena (OA), de acuerdo con lo indicado por Samson et al. (2019). Las características morfológicas evaluadas fueron, tamaño, margen, diámetro, color de la colonia en el anverso y reverso de la placa, elevación, textura de la colonia, y en el caso de *Aspergillus oryzae*, la presencia de exudados y esclerocios. Las fotografías de las características mencionadas fueron tomadas con una cámara Nikon modelo 3400 y con microscopio estereoscópico (BOECO, Alemania).

A partir de los cultivos stock, se prepararon suspensiones de esporas a una concentración de 2.0×10^6 esporas/mL en solución Tween 80 al 0.1%, la concentración de esporas inicial fue determinada con una cámara de Neubauer para luego ajustar la concentración en el volumen requerido. De la solución stock se tomó una asada para ser inoculada en tres puntos equidistantes de cada placa con cada uno de los medios de cultivos para los aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* (Abd El-Aziz et al., 2021). En el caso de los aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae*, se sembraron en un punto central de cada medio de cultivo (Hernández et al., 2006). Las placas inoculadas fueron incubadas a 25 °C durante 7 días y a 25 °C, 37 °C y 45 °C por 4 días para los aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae* respectivamente (Varga, Frisvad & Samson, 2011; Kwon et al., 2015; Febriani et al., 2018).

En los aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* se determinó la capacidad de producir aflatoxina en agar coco (CAM) para separarlos de aquellos aislados productores de estos metabolitos. Se tomaron las placas crecidas durante 7 días bajo las condiciones mencionadas para su cultivo y se colocaron dos gotas de amonio en el centro de la tapa de la placa de Petri en posición invertida, se dejó reaccionar 30 segundos y se observó la presencia de color rosado a rojo intenso como indicativo de la producción de aflatoxina (Fani et al., 2014; Saito & Machida, 1999)

Se realizó la técnica de microcultivos utilizando agar MEA para la observación microscópicas de las estructuras vegetativas y reproductivas. Se realizaron preparaciones húmedas utilizando tres gotas de solución Shear's. Las observaciones se llevaron a cabo utilizando un microscopio óptico (Nikon Eclipse E200 MV Series, Japón) acoplado con una cámara (marca MShot, Modelo MS60) y el Software MShot Image Analysis System Versión V1.1 (2019). Para los aislados de *Rhizopus oryzae* se registraron las medidas de los esporangióforos, esporangios, esporangiosporas, columela, clamidosporas y números de esporangios por grupos. En *Aspergillus oryzae* se registraron las medidas del conidióforo, conidio, fiálides y métulas (Samson et al., 2019; Cruz et al., 2017).

Las características macroscópicas y microscópicas fueron utilizadas para la identificación primaria de acuerdo a las claves dicotómicas señalada por Howard (2002) para *Rhizopus oryzae* y por Samson et al (2019) para *Aspergillus flavus/oryzae*. La velocidad de crecimiento fue reportada según lo indicado por Tille (2017). Se clasificaron como hongos de crecimiento lento aquellos que presentaron colonias maduras entre 11 a 21 días, hongos de crecimiento intermedio entre 6 a 10 días y los de crecimiento rápido en 4 días o menos.

Los aislados sometidos a la fase de identificación molecular fueron aquellos no productores de aflatoxinas para el caso de los aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* y aquellos que no crecieron a 45 °C para los aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae*, en ambos casos con características macroscópicas y microscópicas típicas para los microorganismos objeto de identificación de acuerdo a los autores indicados en el párrafo anterior.

La identificación molecular de los aislados presuntivos de los hongos de interés fue llevado a cabo por la metodología indicada por Zulkifli & Zakaria (2017) y Gautam & Bhadauria (2012). En el caso de los aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae*, fueron cultivados en medio líquido YES, en un volumen de 50 mL contenidos en un Erlenmeyer de 250 mL, incubados a 25 °C durante 7 días, con agitación constante de 150 rpm. El micelio obtenido fue retirado con una pinza estéril, secado en papel de filtro estéril y colocado en un tubo de extracción de 1.5 mL para obtener el material genético. Los aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae* fueron cultivados en placas de agar PDA a 25 °C por 4 días; el micelio fue cosechado utilizando una espátula estéril y colocado en un tubo de extracción para obtener el material genético.

El ADN fue extraído siguiendo las indicaciones del kit FastDNATM SPIN de 100 preparaciones (marca MP Biomedical, Estados Unidos de América) el cual es utilizado para la extracción de ADN de tejidos animales, vegetales, cultivos de células, bacterias, hongos, levaduras, insectos, hueso, entre otros. La calidad del ADN extraído fue verificado a través de la relación 260/280, la cual debe estar entre 1.8 y 2.1 y la integridad fue verificada en gel de agarosa al 1%.

Para la amplificación de las regiones del ADN de los aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* y su utilización en la identificación a nivel de género, fueron utilizados los primers de la región ITS1 e ITS4 y para la identificación a nivel de especie se amplificó el gen Cyp51A en conjunto con la enzima de restricción HincII (técnica PCR- RFLP) (Zulkifli & Zakaria, 2017; Baquião et al., 2013; Godet & Munaut, 2010; Nargesi et al., 2021). La identificación de los aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae* fue realizada con los primers V9G y LR3, que incluye la región

completa ITS1-5.8S-ITS2 y la región D1/D2 de la subunidad 28S. Para la secuenciación, fueron utilizados los primer ITS1 y ITS4 (Cruz et al., 2017). Los primers fueron sintetizados en Macrogen, Corea y las secuencias son mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Primers utilizados para la identificación molecular de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae*.

Nombre del Primer	Secuencia
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'
V9G	5'- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA- 3'
LR3	5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC- 3'
Cyp51A Forward	5'-CCAGATTAGGCATACACATTG-3'
Cyp51A Reverse	5'-CGCTAACTATGGTTGACTCTA-3'

El volumen total de la mezcla de reacción de PCR fue de 50 µL, que incluyó 1.5 µL de ADN genómico (20 ng/ µL), 2.5 µL (10 µM) de cada primer, 25 µL de Master Mix marca FastGene® TAQ 2x ReadyMix PCR kit y agua libre de nucleasa para completar el volumen de reacción. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador convencional AllInOneCycler™ marca BiONNER (Corea). En el caso de *Aspergillus oryzae* se aplicaron los siguientes ciclos, un paso de desnaturalización inicial de 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización de 92 °C por 40 s, annealing a 55 °C por 1 min y 30 s, elongación a 55 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C durante 5 min. (Zulkifli & Zakaria, 2017).

Para la amplificación de la región V9G-LR3 de *Rhizopus oryzae*, se aplicaron los siguientes ciclos, un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 1 min, annealing a 53 °C por 1 min, elongación a 72 °C por 2 min, con una extensión final a 72 °C por 7 min (Cruz et al., 2017).

Los ciclos utilizados para la amplificación del gen cyp51A fue, un paso de desnaturalización inicial de 94 °C por 7 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización de 94 °C por 30 s, annealing a 52 °C por 30 s, elongación a 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 7 min (Nargesi et al., 2021).

Para completar la identificación molecular de los aislados de *Aspergillus oryzae* a nivel de especie se utilizó la enzima de restricción HincII, marca Fast Gene, obtenida de *Haemophilus influenzae* Rc. Del producto de PCR del gen cyp51A se tomó 1 µL (1ng/ µL), 1 µL de la enzima (10 U), 5 µL de buffer FastCut (1X) y agua grado biología molecular para completar un volumen final de 50 µL. La mezcla fue incubada a 37 °C por 16 h (Abastabar et al., 2022).

Para visualizar las bandas de ADN amplificadas, las muestras fueron corridas en gel de agarosa al 1.0%, teñido con Safe View™ (Marca ABM). La estimación de los pesos moleculares de los productos amplificados se realizó por comparación con un marcador molecular de 100 pb ó 1 Kb dependiendo del tamaño del amplicón obtenido (Marcador DNA-Opti Plus ABM, Canadá) y la visualización de los productos amplificados fue realizada en un Fotodocumentador Molecular (Major Science Blue View, U.S.A) (Cruz et al., 2017).

El producto de la PCR fue enviado a servicio de secuenciación, las secuencias consenso obtenidas después de realizar control de calidad fueron alineados con secuencias de cepas tipos de referencias obtenidas del NCBI (National Center for Biotechnology Information), sección Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, accesado el 30 de noviembre de 2022) mediante la herramienta ClustalW del paquete MEGA-X (64 bit para Windows). Fue realizado un árbol filogenético concatenado con la herramienta PHYLOGENY mediante el método de Neighbor Joining utilizando 1000 réplicas de bootstraps.

4.2.2. Optimización de nutrientes para la producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae*.

4.2.2.1. Preparación del Inóculo.

Se realizó siguiendo la metodología descrita por Costa et al. (2019a) y Souza, Zamani & Taherzadeh (2019), donde se utilizaron las esporas provenientes del cultivo en placa de PDA a 27°C por 5 a 7 días. El preinóculo fue preparado mediante la adición de 6 mL de agua estéril al cultivo, seguido de agitación manualmente con un asa de siembra para liberar las esporas. La suspensión de esporas utilizada para inocular el medio en el que se realizó la fermentación sumergida fue de una concentración de 5×10^6 esporas/mL.

4.2.2.2. Condiciones de la fermentación sumergida.

El crecimiento de las cepas de mohos fue realizado en cultivo sumergido, de acuerdo a lo descrito por Souza, et al. (2018). Se utilizaron matraces aforados tapados con algodón, de un volumen de capacidad de 250 mL, que contenían 50 mL del residuo proveniente de la obtención de almidón sin dilución y sin suplementación, esterilizados a 121 °C por 20 min, una vez frío el medio, fue inoculado con 1 mL de suspensión de esporas a la concentración antes indicada anteriormente en diferentes condiciones de cultivo.

Para realizar la optimización se utilizó el método de una variable a la vez (OVAT por sus siglas en inglés, One Variable at Time) se incluyeron las variables, tiempo de cultivo, pH, temperaturas, fuente de nitrógeno, fuente de carbono. Las condiciones para cada variable son explicados en el apartado 4.2.7. Diseño de experimento y análisis estadístico.

4.2.2.3. Determinación de la composición química del medio de cultivo de los matraces.

Se determinaron sólidos totales, sólidos en suspensión y sólidos solubles. La determinación del contenido de sólidos totales en los medios de cultivo fue determinada secando 10 mL de las muestras homogenizadas a 105 °C en capsulas de porcelana hasta obtener peso constante. El contenido de sólidos suspendidos fue obtenido por la centrifugación de 50 mL de muestra de medio de cultivo homogenizadas a 3000×g por 10 min y secados a 105 °C en capsulas de porcelana hasta obtener peso constante. El contenido de sólidos solubles fue determinado por la diferencia entre los sólidos totales y los sólidos en suspensión. Para la determinación del contenido de cenizas, los sólidos totales fueron colocados en la mufla a 575 °C por 5 horas (Souza, Zamani & Taherzadeh, 2019).

El contenido de nitrógeno fue determinado por el método de Kjeldahl, para lo cual se tomaron

10 mL de los medios de cultivos en tubos de digestión por triplicado, se agregaron 15 mL de H_2SO_4 (ácido sulfúrico), 2 pastillas de Kjeldahl. Los tubos con los reactivos fueron colocados en la unidad de digestión (Marca Tecnal, Brasil) a 420°C por 1 hora. El contenido de nitrógeno fue destilado en la unidad de destilación del equipo (Marca Tecnal, Brasil) utilizando 25 mL de H_3BO_3 (ácido bórico) al 4% p/v y 4 gotas indicador mixto Shiro Tashiro en un matraz Erlenmeyer de 250 mL (Serba et al., 2020).

El contenido almidón total fue determinado por el método de yodo, para lo cual se tomaron 100 μL de cada medios de cultivo homogenizado, se mezcló con 10 mL de HClO_4 (ácido perclórico) al 52%, se mezclaron para disolver y se dejó reposar durante 10 minutos, al cabo de los cuales se enrasaron a 100 mL con agua destilada. En cuatro matraces aforados de 50 mL que contenían 2,5 mL de ácido perclórico al 52% , se dispuso 1.0 mL de la solución que contenía la muestra y se enrasó con agua destilada; se tomaron de cada uno 10 mL se le añadieron 0,5 mL de la solución yodo-yodurada (preparada con 20 g de yoduro potásico, disueltos en 20 mL de agua destilada; y 2.0 g de yodo, diluir a un litro) y se dejó reposar diez minutos en oscuridad; transcurrido este tiempo se midió en el espectrofotómetro frente a un blanco, anotando el valor de la absorbancia a 600 nm. El blanco, se preparó con todos los reactivos, sin disolución de la muestra, se preparó otro blanco utilizando las muestras sin añadirle la solución de yodo yodurada y haciendo una corrección de las lecturas de absorbancia, para corregir la absorbancia que presenta la disolución de yodo yodurada en exceso. Se preparó una curva estándar con 0.1 g de almidón, se mezcló con 10 mL de HClO_4 (ácido perclórico) al 52% y se continuó hasta la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm (Lage, Simal & Salgado, 1983).

Los azúcares totales fueron realizados por el método fenol sulfúrico y los azúcares reductores por el método ácido dinitrosalicílico (DNS). Para la determinación de azúcares totales, se mezclaron 2mL de muestra de medio de cultivo con 2mL de fenol al 5% en tubos de ensayos, se colocaron en una gradilla sumergida en un baño de agua fría. A los tubos se le añadió 5 mL de H_2SO_4 , se dejaron reposar por 15 min y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. El mismo tratamiento se realizó para el blanco con agua destilada. Los azúcares reductores fueron determinados mezclando 0,5 mL de cada uno de los medios con 0,5 mL del reactivo DNS, se colocan a ebullición por 5 min en baño de maría e inmediatamente se detuvo la reacción con baño de agua y hielo. Se reconstruyó las muestras con 5 mL de agua destilada, se agitaron, se dejaron en reposo por 15 min, y se determinó su absorbancia a 540 nm. El mismo tratamiento se realizó para el blanco con agua destilada. Se realizó una curva patrón con glucosa en el rango de concentración de 10-90 mg/L con por lo menos 5 puntos. La concentración de azúcares totales y reductores fueron determinadas utilizando la curva patrón (Gil, Bocourt y Maqueira, 2006).

4.2.2.4. Determinación de la concentración de biomasa.

Este parámetro fue determinado según Osadolor et al. (2018), para lo cual la biomasa fue lavada con agua desionizada repetidamente hasta que estuviera libre del caldo de cultivo, posteriormente fue secada a 105°C cada 24 h hasta tener peso constante, se dejó enfriar a temperatura ambiente y fue pesado. Para el estudio de la cinética de crecimiento de los mohos la biomasa fue cosechada cada 48 horas.

4.2.3. Extracción, purificación y determinación del rendimiento de los β -glucanos provenientes de las paredes de los mohos cultivados.

4.2.3.1. Extracción de los polisacáridos provenientes de las paredes celulares de los mohos.

La extracción de los polisacáridos provenientes de las paredes celulares del micelio fue realizada según Gao et al. (2017) y Zeng et al. (2019). Para ello, el micelio seco obtenido previamente (numeral 4.2.2.4), fue desintegrado en un molino de rotor (Marca Tecnal de rotor R-TE-651/2, Brasil). El material resultante fue sumergido en etanol al 95% y llevado a reflujo durante 3 horas para desengrasar la muestra utilizando un equipo de soxhlet. Posteriormente, fue lavados con hexano. El residuo desengrasado fue secado y extraído con agua en una proporción 1:40 (p/v) a una temperatura de 121 °C, 15 PSI, por 1 h, 3 veces, filtrado a través de un tamiz de nylon de 72 μ m. El filtrado fue centrifugado a 2000g por 15 min en una centrifugadora de mesa (marca HERMLE, modelo Z206A, Alemania), el sobrenadante fue concentrado 1/5 del volumen inicial y precipitado con etanol al 80% en proporción 1:6 (v/v) a 4 °C por 24 h. Posteriormente, los precipitados fueron centrifugados a 2000g por 15 min y recolectados.

4.2.3.2. Purificación de los β -glucanos provenientes de las paredes de los mohos cultivados.

La purificación de los β -glucanos se realizó siguiendo la metodología descrita por Costa et al. (2019a) y Zen et al., (2019), para lo cual los precipitados obtenidos fueron lavados con acetona éter y etanol al 99% en una relación de 1:3 (p/v), en orden sucesivo. Seguidamente, se realizó un proceso de desproteinización con CHCl_3 -n-BuOH (cloroformo n-butanol) en una proporción 5:1 (v/v) por 5 veces y fueron precipitados con etanol al 99% y dializados con una membrana 12-14 KDa contra agua destilada por 72 horas y posteriormente liofilizados.

4.2.3.3. Determinación del rendimiento.

El rendimiento fue calculado con la ecuación (1), de acuerdo a Gao et al. (2017).

$$\text{Rendimiento de extracción (\%)} = \frac{P_1}{P} \times 100 \quad (1)$$

Donde P_1 es el peso seco de β -glucanos extraídos y P es el peso del micelio del hongo filamentoso.

4.2.4. Caracterización de los β -glucanos purificados.

4.2.4.1. Caracterización química.

Las determinaciones químicas se realizaron de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC (2019). Se determinó el contenido de humedad (método 925.10), nitrógeno total mediante el método de Kjeldahl (método 2001.11), el contenido de proteína cruda se calculó multiplicando el contenido total de nitrógeno por 6.25. El contenido de grasa cruda (método 2003.06), el contenido de cenizas (923.03). Los carbohidratos totales fueron cuantificados por diferencia ($100 - (\text{humedad} + \text{grasa total} + \text{proteína total} + \text{cenizas})$).

4.2.4.2. Caracterización estructural.

Se analizaron el peso molecular, la proporción de β -glucanos, la composición de monosacáridos, la elucidación estructural y conformacional, de acuerdo lo indicado por da Silva et al. (2005).

El peso molecular se determinó utilizando un equipo de cromatografía de permeación en gel (GPC, Thermoquest TSP P100, USA), con una columna TSK-G3000 133 PWXL, una bomba TSP P100 y un detector de índice refractivo RI 150. El volumen de las muestras inyectadas fue de 20 μ L al 0,5% en cada corrida a temperatura ambiente, utilizando agua destilada como fase móvil. El peso molecular fue determinado tomando como referencia la curva de calibración hecha con el estándar Dextranas T-series (M_w 5, 12,40, 80, 200, 1000 KDa).

La determinación de la composición de monosacáridos y la proporción de β -glucanos presente en la muestra se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un equipo con un detector PDA 2998 y una columna C18 XBridge (5 μ m x 4,6mm x 150mm), operando a 30 °C con una tasa de flujo de 1,0 mL/min y una fase móvil de buffer fosfato de potasio y acetonitrilo (0,02 mol/mL, pH 6.7, 83:17 v/v). Los estándares fueron fructosa, galactosa, manosa, glucosa, arabinosa y xilosa. El estándar para el peso molecular fue β -(1-3)/(1-6)- glucanos de *Saccharomyces cerevisiae*. La detección fue realizada a 245 nm.

La preparación de la muestra se llevó a cabo tomando 200 μ L de la muestra a una concentración de 10 mg/mL, que se hidrolizó previamente con 200 μ L de ácido trifluoroacético (4,0 M) a 110 °C por 2 horas. Posteriormente, se evaporó hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo hidrolizado fue disuelto en 100 μ L de solución de NaOH 0,6 M, con calentamiento continuo por 1 hora a 70 °C, previa adición de 100 μ L de solución metanol/1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolona (PMP) 0,5 M. La solución se enfrió a temperatura ambiente, neutralizada con 100 μ L de HCl a 0,3 M y disuelto en 1.7 mL de agua destilada y 2 mL de cloroformo. La fase orgánica fue descartada para remover el exceso de reactivo, el proceso de extracción fue repetido tres veces. Finalmente, la fase acuosa se filtró a través de una lámina de filtración con microporos de 0,22 μ m y se almacenó a 4 °C para realizar el análisis de HPLC conforme fue indicado anteriormente.

La identificación estructural y conformacional se realizó por espectroscopia de FT-IR (Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier). Los espectros de absorción IR de reflexión total atenuada (%R) se obtuvieron entre 399.675 cm^{-1} y 4000.12 cm^{-1} utilizando un espectrofotómetro FT/IR-4700 tipo A (Jasco, Easton, MD, USA), con una resolución de 2 cm^{-1} . La rotación específica fue de $[\alpha]$ 45 D (c 1 M, Hidróxido de sodio) y fue medido a 589 nm en un detector TGS (Jasco, Easton, MD, USA) (Wiater et al., 2012).

4.2.4.3. Determinación del color.

La determinación del color fue realizado siguiendo el protocolo de Abdel et al. (2020) para lo cual se utilizó un colorímetro (CR-20, Konica Minolta Sensing Inc., Japan). Los parámetros medidos fueron, L^* = luminosidad (0 = negro, 100 = blanco), a^* ($-a^*$ = verde, $+a^*$ = rojo), y b^* ($-b^*$ = azul, $+b^*$ = amarillo).

4.2.4.4. Evaluación microbiológica.

Las determinaciones microbiológicas se realizaron siguiendo el protocolo indicado en la Normas ISO correspondiente, aerobios mesófilos (ISO 4833-1, 2013), mohos, levaduras (ISO 21527-2, 2008) y *E. coli* (ISO 16649-2, 2010).

Para el caso de los aerobios mesófilos, se sembraron en tres placas de petri vacías y estériles 1 mL de la muestra original si es líquida o 1 mL de la suspensión inicial (10^{-1}) en otros casos. A continuación, se añadió a otro par de placas Petri vacías y estériles 1 ml de la dilución 10^{-1} (en el caso de líquidos) o 1 ml de la dilución 10^{-2} (en el caso de alimentos sólidos). Este proceso se repitió para el resto de las diluciones. Se vertieron en cada placa de 12 a 15 ml de agar para recuento en placa (PCA), enfriado entre 44 y 47 °C.

Se mezcló cuidadosamente con el contenido de la placa. Una vez enfriadas, se añadió una capa de recubrimiento de unos 3 mm de agar fundido y enfriado a 44 – 47 °C. Las placas se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 72 ± 3 h. Se realizó el recuento en placas que contenían entre 15 y 300 colonias.

Para el cultivo de mohos y levaduras, se tomaron tres placas de petri vacías y estériles, se agregaron entre 15 y 17 mL de agar Diclorán Glicerol Cloranfenicol (DG18) atemperado entre 45 y 47 °C y se dejaron solidificar. Posteriormente se transfirió 0.1 mL de la muestra si es líquida ó 0.1 mL de la suspensión inicial en el caso de otros alimentos. Posteriormente, se vertió 0.1 mL de las siguientes diluciones en tres placas de petri estériles con agar DG18 con una pipeta estéril.

Se extendió el líquido sobre la superficie del agar con asa de Drigalski hasta que se absorbió completamente en el medio de cultivo. Se incubó las placas en posición invertida a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 a 7 días. Después del periodo de incubación, se seleccionaron las placas que contenían menos de 150 colonias y fueron contadas. Se preparó suficientes números de controles para chequear la esterilidad que fueron incubados en posición invertida a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 a 7 días.

Para el conteo de *Escherichia coli*, se transfirió con una pipeta a placas petri vacías y estériles 1 mL de la muestra inicial si es líquida o 1 mL de la dilución inicial (10^{-1}) en el caso de otros productos por triplicado en placas estériles de 90 mm estéril. Se adicionaron 15 mL de agar Triptona Bilis X-glucuronido (TBX) atemperado a 44 °C - 47 °C en baño de agua térmico.

Se mezcló cuidadosamente el inóculo con el medio y dejó solidificar las placas Petri en una superficie horizontal. El tiempo transcurrido entre la distribución del inóculo en la placa y el vertido del medio no debe exceder 15 min. Incubar 44 °C por 18 h -24 h en posición invertida. El tiempo total de incubación no debe ser mayor que 24 h. Se contaron las UFC de las colonias típicas de *E. coli* β -glucuronidasa positivas (típica azul o azul-verdosa) en aquellas placas con menos de 150 colonias típicas.

El cálculo de aerobios mesófilos, mohos y levaduras fue realizado de acuerdo a la Norma ISO7218 (2024) y *Escherichia coli* con la Norma ISO 16649-2, 2010.

4.2.5. Desarrollo de un yogur tipo griego utilizando los β -glucanos obtenidos.

El desarrollo del yogur tipo griego se realizó de acuerdo a la formulación de N, Techeira de la Universidad Tecnológica sede Colonia (comunicación personal, 8 de noviembre de 2023), ajustada de acuerdo a las características deseadas para un yogur tipo griego natural. Se utilizó leche bovina comercial pasteurizada, sacarosa (4 % p/v), leche en polvo (3 % p/v) y β -glucanos

en 0.0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8% (p/v) de acuerdo a la proporción establecida por Raikos et al (2018). Los ingredientes sólidos se disolvieron en la leche que fue previamente calentada 50 °C por 15 minutos, se homogenizaron, y se calentaron a 90 ± 1 °C por 20 minutos, luego se enfrió a 42 ± 1 °C en un baño con hielo.

Posteriormente, se adicionó el cultivo láctico marca LYOFAS^T Y456B (mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) en una proporción de 0.8 g/L. La mezcla se incubó a 43 ± 1 °C hasta alcanzar un pH de 4,3-4,6. Posteriormente, se enfrió hasta una temperatura de 4 ± 1 °C por 12 horas. Después de transcurrido el tiempo de refrigeración, los yogures fueron centrifugados a 4500 g durante 15 min con la finalidad de drenar el suero lácteo. El producto final se mezcló y envasó en contenedores de plástico de 1000 mL de capacidad y se almacenó a 4 ± 1 °C hasta realizar la evaluación sensorial y los análisis respectivos. Las formulaciones resultantes son presentadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Formulaciones establecidas para la fabricación de yogures tipo griego con la incorporación de los β -glucanos de *Rhizopus oryzae*.

Ingredientes (g/100mL)	Fórmula control	Fórmula 1 0.2%	Fórmula 2 0.4%	Fórmula 3 0.6%	Fórmula 4 0.8%
Leche entera de vaca	100	100	100	100	100
Leche en polvo	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Sacarosa	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
β -glucanos	0	0.2	0.4	0.6	0.8
Fermento láctico	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08

4.2.6. Caracterización físico, química, viabilidad de bacterias ácido lácticas, reológica, antioxidante, microbiológica y sensorial del yogur desarrollado.

4.2.6.1. Caracterización química.

Se realizaron las determinaciones indicadas en las especificaciones de la Norma CODEX STAN243 (2003), proteína y grasa. Las determinaciones fueron realizadas de acuerdo a las Normas ISO, el contenido de sólidos totales por la ISO13580 (2005), grasa mediante la ISO23318 (2022), contenido de nitrógeno ISO8968-4 (2016), el contenido de proteína cruda fue calculado multiplicando el contenido de nitrógeno total por 6.38, cenizas ISO/CD9877 (2021), carbohidratos totales por diferencia de la suma de los otros componentes y el contenido de energía por el factor de Atwater.

4.2.6.2. Caracterización física.

La acidez titulable y pH fueron realizados de acuerdo al método AOAC N° 947.05 y 981.12 (2019) respectivamente.

La capacidad de retención de agua fue medida según el método indicado por Serra et al. (2009), para ello se tomaron 40 g de leche inoculada en tubos de centrifuga de 50 mL, se incubaron a 43 ± 1 °C durante 4 horas y posteriormente se enfriaron a 4 °C. A continuación, se centrifugaron a 5000g durante 20 min a 20 °C. El suero se pesó, teniendo cuidado de no dejar pasar partículas gruesas.

El color fue determinado mediante la determinación de los parámetros L^* = luminosidad (0 = negro, 100 = blanco), a^* ($-a^*$ = verde, $+a^*$ = rojo), y b^* ($-b^*$ = azul, $+b^*$ = amarillo), de acuerdo a lo indicado en el apartado 4.2.4.3.

4.2.6.3. Viabilidad de bacterias ácido lácticas en el tracto gastrointestinal simulado.

El paso de las bacterias ácido lácticas por el estómago - intestino se realizó utilizando un fluido gástrico e intestinal simulado de acuerdo al método descrito por Nguyen et al. (2020).

Para la primera condición, se preparó fluido gástrico simulado (FGS) utilizando caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS) a pH 2, ajustado con HCL 1 N y pepsina 2X de la mucosa del estómago porcino 2500U/mg a 3g/L (Marca SRL, India). Se disolvió 1 gramo de cada yogur en 9 mL de FGS e incubados a 42 °C en condiciones anaeróbicas de acuerdo al tiempo de ensayo. Se realizaron diluciones seriadas cuando fue necesario. De cada cultivo de FGS fueron tomados 100 µL a 0, 1, 2 y 3 horas y fueron cultivados por siembra en agar MRS, incubadas a 42 °C por 24 horas en condiciones anaeróbicas.

El fluido intestinal simulado (FIS) fue preparado utilizando caldo MRS a pH 7, ajustado con NaOH 1 N y pancreatina 3x de páncrea porcino 75 U/mg (Marca SRL, India) a 1g/L para determinar la tolerancia a la bilis de las bacterias ácido láctica presentes en el yogur. Se disolvió 1 gramo de cada yogur en 9 mL de FGS e incubó a 42 °C en condiciones anaeróbicas de acuerdo al tiempo de ensayo. Se realizaron diluciones seriadas cuando fue necesario. Se tomaron 100 µL de cada cultivo de FGS a 0, 1, 2, 3 y 4 horas, y se cultivaron por siembra en superficie en agar MRS, incubadas a 42 °C por 24 horas en condiciones anaeróbicas.

4.2.6.4. Capacidad antioxidante.

Las muestras fueron preparadas siguiendo el protocolo descrito por Savas & Akan (2021). Se tomaron 10 g de muestra de cada yogur y se mezclaron con 10 mL de metanol, agitando a alta velocidad con vortex por 2 minutos. Luego, los extractos se mantuvieron en refrigeración por 30 min y se centrifugaron a 8600g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de papel de filtro No. 42 (2.5 µm) y fue utilizado para determinar la actividad antioxidante.

Los métodos utilizados fueron, actividad captadora de radicales superóxido, actividad captadora de radicales hidroxilos y actividad captadora de radicales DPPH, de acuerdo a lo reportado por Liu et al. (2014) y se describen brevemente a continuación:

La actividad captadora de radicales superóxido fue medida tomando 0.5 mL de la solución de cada muestra, mezclado con 2 mL de Tris-HCl (50 mM), 2 mL de agua destilada y 0.5 mL de solución de pyrogallol (25 mM) en secuencia. La mezcla se incubó a 25 °C durante 5 min. Después de transcurrida la reacción, se agregó 0.1 mL de ácido clorhídrico (1 N) para terminar la reacción. La absorbancia fue medida a 560 nm, utilizando ácido ascórbico como control positivo. La capacidad captadora de radiales superóxido fue calculada con la ecuación (2):

$$\text{Actividad captadora (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad (2)$$

Donde A_c y A_s son la absorbancia del blanco de la muestra y la muestra/ácido ascórbico respectivamente. El blanco del espectrofotómetro fue metanol.

Para realizar la actividad captadora de radicales hidroxilos, se tomó 1 mL de cada solución de muestra y se mezcló con 1 mL de $FeSO_4$ (9 mM), 1 mL de ácido salicílico (9 mM en etanol) y 1 mL de H_2O_2 (9 mM). La mezcla de reacción fue mezclada e incubada a 37 °C durante 0.5 h. La absorbancia se midió a 510 nm, utilizando ácido ascórbico como control positivo y metanol como control del espectrofotómetro. La capacidad captadora de radicales hidroxilo fue calculada utilizando la siguiente ecuación (3):

$$\text{Actividad captadora (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad (3)$$

Donde A_c y A_s son la absorbancia del blanco de la muestra y la muestra/ácido ascórbico respectivamente.

La actividad captadora de radicales DPPH fue realizada tomando 2.0 mL de la solución que contiene la muestra y mezclándola con 2.5 mL de DPPH (100 μ M en metanol). La mezcla se incubó a 25 °C por 30 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm, utilizando ácido ascórbico como control positivo y metanol como control del espectrofotómetro. La capacidad captadora de radicales DPPH se calculó con la siguiente ecuación (4):

$$\text{Actividad captadora (\%)} = \frac{1 - A_s}{A_c} \times 100 \quad (4)$$

Donde A_s y A_c son la absorbancia de la muestra/ácido ascórbico y solución DPPH respectivamente.

4.2.6.5. Comportamiento reológico.

El comportamiento reológico de los yogures formulados con β -glucanos fue determinado de acuerdo con la metodología descrita por Osorio et al. (2020), utilizando un reómetro MCR 200e (Anton Para, Ostfilden, Alemania) con una configuración plato-plato (PP25/S, diámetro 25 mm).

Los ensayos realizados fueron:

- 1) Barrido de amplitud desde 0.01 a 100% a una frecuencia constantes de 1 rad seg^{-1} .
- 2) Barrido de frecuencia desde 0.2 a 100 rad seg^{-1} a un esfuerzo constante de 0.5%.
- 3) Comportamiento del flujo a una tasa de corte desde 0.1 a 100 s^{-1} .

Los ensayos fueron realizados a una temperatura de 4 °C. Los espectros mecánicos fueron evaluados mediante gráficos del módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdida (G'') en función de la frecuencia (ω) en una escala doble logaritmo. La relación entre G' y ω se caracterizó utilizando la ecuación (5):

$$G' = a. \omega^b \quad (5)$$

Donde a y b son los coeficientes de regresión obtenidos a través de un análisis de regresión lineal realizado en Excel Microsoft utilizando la opción Solver.

El comportamiento de flujo se caracterizó mediante el modelo de Herschel-Buckley, ajustando el flujo ascendente de la curva de viscosidad mediante la ecuación (6):

$$\tau = \tau_0 + k(\dot{\gamma})^n \quad (6)$$

Donde τ_0 representa el límite elástico (Pa), k es el índice de consistencia (Pa.s^n), $\dot{\gamma}$ es la tasa de corte (S^{-1}) y n es el índice de comportamiento del flujo ($n = 1$ para fluidos newtoniano, $n < 1$ para fluidos pseudoplasticos y $n > 1$ para fluidos dilatante).

4.2.6.6. Evaluación microbiológica.

Se realizó la cuantificación de *Escherichia coli*, mohos y levaduras siguiendo las metodologías indicadas en las Normas ISO 16649-2 (2010) e ISO 6611 (2014) respectivamente, de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.2.4.4. Fueron analizadas tres muestras de cada tratamiento y el conteo fue realizado con la norma respectiva.

4.2.6.7. Evaluación sensorial.

Se llevó a cabo de acuerdo a lo indicado por Borrin et al. (2020) y Raikos et al. (2018). Se realizó una prueba afectiva con un panel no entrenado de al menos 50 personas de ambos géneros y distintas edades para determinar la aceptación de las formulaciones de los yogures. Las muestras se entregaron a los panelistas, quienes evaluarán el grado de gusto o disgusto en base a los atributos color, olor, sabor, viscosidad y aceptación general. Se sirvieron 25 g de las muestras de yogur refrigerados a 4 °C en vasos de plásticos con tapas de 30 g de capacidad. Se utilizó una escala hedónica de siete puntos, cuyos extremos fueron 1 “me disgusta extremadamente” y 7 “me gusta extremadamente”, la codificación de las muestras fue de tres dígitos, provenientes de una tabla de números aleatorios y no se proporcionó información acerca de los tratamientos para evitar sesgos. Entre cada muestra, se utilizaron galletas tipo soda sin sal y agua como neutralizador de sabor.

4.2.7. Diseño de experimento y análisis estadístico.

La optimización del proceso de cultivo se realizó mediante la metodología de una variable a la vez y de superficie de respuesta con diseño central compuesto, de acuerdo a lo indicado por Mahapatra, S. & Banerjee (2013) y por Gutiérrez y de la Vara (2012). Mediante la metodología OVAT, se seleccionaron las condiciones de tiempo de cultivo, pH, fuente de carbono, nitrógeno y las concentraciones de la fuente de carbono y nitrógeno para producir mayor cantidad de β -glucanos. Las fuentes de carbohidratos utilizadas fueron, almidón, glucosa, melaza y sacarosa, y las de nitrógeno, hidrolizado de levaduras, urea cloruro de amonio y sulfato de amonio. Las condiciones evaluadas se mencionan en la Tabla 3 a la Tabla 11.

Tabla 3. Diseño de experimento para la evaluación del tiempo y temperatura mediante la metodología OVAT para la producción de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus oryzae*.

Tiempo (h)		Temperatura (°C)			
0	25	30	35	40	
2	25	30	35	40	
4	25	30	35	40	
6	25	30	35	40	
8	25	30	35	40	
10	25	30	35	40	
12	25	30	35	40	
14	25	30	35	40	

Agitación 150 rpm, pH 6, volumen de fermentación 250 mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado en un volumen de 50 mL de residuos líquidos del procesamiento de almidón.

Tabla 4. Diseño de experimento para la evaluación del pH mediante la metodología OVAT para la producción de β -glucanos de *Rhizopus oryzae*.

Tiempo (h)	Producción de β -glucanos					
	pH					
0	2	3	4	5	6	7
2	2	3	4	5	6	7
4	2	3	4	5	6	7

Temperatura 30 °C, tiempo de fermentación 4 días, agitación 150 rpm, volumen de fermentación 250 mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado en un volumen de 50 mL de residuos líquidos del procesamiento de almidón.

Tabla 5. Diseño de experimento para la evaluación del pH mediante la metodología OVAT para la producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae*.

Tiempo (h)	Producción de β -glucanos					
	pH					
0	2	3	4	5	6	7
2	2	3	4	5	6	7
4	2	3	4	5	6	7
6	2	3	4	5	6	7
8	2	3	4	5	6	7
10	2	3	4	5	6	7

Temperatura 35 °C, tiempo de fermentación 10 días, agitación 150 rpm, volumen de fermentación 250 mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado en un volumen de 50 mL de residuos líquidos del procesamiento de almidón.

Tabla 6. Diseño de experimento para la evaluación de la fuente de nitrógeno mediante la metodología OVAT para la producción de β -glucanos de *Rhizopus oryzae*.

Tiempo (h)	Producción de β -glucanos			
	Fuente de nitrógeno (0.3% p/v)			
0	ExLe	Ur	SuAm	ClAm
2	ExLe	Ur	SuAm	ClAm
4	ExLe	Ur	SuAm	ClAm

ExLe (extracto de levaduras), Ur (urea), SuAm (sulfato de amonio), ClAm (cloruro de amonio). Temperatura 30 °C, tiempo de fermentación 4 días, pH 6, agitación 150 rpm, volumen de fermentación 250 mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado en un volumen de 50 mL de residuos líquidos del procesamiento de almidón.

Tabla 7. Diseño de experimento para la evaluación de la fuente de nitrógeno mediante la metodología OVAT para la producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae*.

Tiempo (h)	Producción de β -glucanos			
	Fuente de nitrógeno (0.3% p/v)			
0	ExLe	Ur	SuAm	ClAm
2	ExLe	Ur	SuAm	ClAm
4	ExLe	Ur	SuAm	ClAm
6	ExLe	Ur	SuAm	ClAm
8	ExLe	Ur	SuAm	ClAm
10	ExLe	Ur	SuAm	ClAm

ExLe (extracto de levadura), Ur (urea), SuAm (sulfato de amonio), ClAm (cloruro de amonio). Temperatura 35 °C, tiempo de fermentación 10 días, pH 6, agitación 150 rpm, volumen de fermentación 250 mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado en un volumen de 50 mL de residuos líquidos del procesamiento de almidón.

Tabla 8. Diseño de experimento para la evaluación de la fuente de carbono mediante la metodología OVAT para para la producción de β -glucanos de *Rhizopus oryzae*.

Tiempo (h)	Producción de β -glucanos			
	Fuente de Carbono (1.0 % p/v)			
0	Alm	Glu	Mel	Sac
2	Alm	Glu	Mel	Sac
4	Alm	Glu	Mel	Sac

Alm (almidón), Glu (glucosa), Mel (melasa), Sac (sacarosa). Temperatura 30 °C, tiempo de fermentación 4 días, pH 6, agitación 150 rpm, volumen de fermentación 250 mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado en un volumen de 50 mL de residuos líquidos del procesamiento de almidón.

Tabla 9. Diseño de experimento para la evaluación de la fuente de carbono mediante la metodología OVAT para para la producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae*.

Tiempo (h)	Producción de β -glucanos			
	Fuente de Carbono (1.0 % p/v)			
0	Alm	Glu	Mel	Sac
2	Alm	Glu	Mel	Sac
4	Alm	Glu	Mel	Sac
6	Alm	Glu	Mel	Sac
8	Alm	Glu	Mel	Sac
10	Alm	Glu	Mel	Sac

Alm (almidón), Glu (glucosa), Mel (melasa), Sac (sacarosa). Temperatura 35 °C, tiempo de fermentación 10 días, pH 6, agitación 150 rpm, volumen de fermentación 250 mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado en un volumen de 50 mL de residuos líquidos del procesamiento de almidón.

Tabla 10. Diseño de experimento para la evaluación de la concentración de sulfato de amonio y cloruro de amonio mediante la metodología OVAT para para la producción de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus oryzae*.

Producción de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>		Producción de β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i>	
Sulfato de amonio(%p/v)		Cloruro de amonio (% p/v)	
0.2		0.2	
0.4		0.4	
0.6		0.6	
0.8		0.8	
1		1	
2		2	
3		3	

Temperatura 35 °C (β -glucanos de *Aspergillus oryzae*), 30 °C (β -glucanos de *Rhizopus oryzae*), tiempo de fermentación 4 días (β -glucanos de *Rhizopus oryzae*), 10 días (β -glucanos de *Aspergillus oryzae*), pH 6 (β -glucanos de *Rhizopus oryzae* y β -glucanos de *Aspergillus oryzae*), agitación 150 rpm, volumen de fermentación 250 mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado en un volumen de 50 mL de residuos líquidos del procesamiento de almidón.

Tabla 11. Diseño de experimento para la evaluación de la concentración de glucosa mediante la metodología OVAT para la producción de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus oryzae*.

Producción de β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>	Producción de β -glucanos de <i>Aspergillus oryzae</i>
Glucosa (% p/v)	
0.2	0.2
0.4	0.4
0.6	0.6
0.8	0.8
1	1
2	2
3	3

Temperatura 35 °C (β -glucanos de *Aspergillus oryzae*), 30 °C (β -glucanos de *Rhizopus oryzae*), tiempo de fermentación 4 días (β -glucanos de *Rhizopus oryzae*), 10 días (β -glucanos de *Aspergillus oryzae*), pH 6 (β -glucanos de *Rhizopus oryzae* y β -glucanos de *Aspergillus oryzae*), agitación 150 rpm, volumen de fermentación 250 mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado en un volumen de 50 mL de residuos líquidos del procesamiento de almidón.

Una vez seleccionado el tiempo de cultivo, pH, fuente de carbono, nitrógeno y las concentraciones de la fuente de carbono y nitrógeno, se optimizó el proceso de fermentación para la producción de β -glucanos mediante el modelo de superficie de respuesta con diseño central compuesto. En la fermentación sumergida con *Rhizopus oryzae*, se utilizó glucosa como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, en el caso de *Aspergillus oryzae* se utilizó glucosa como fuente de carbono y cloruro de amonio como fuente de nitrógeno en los niveles indicados en la Tabla 12 y 13.

Tabla 12. Arreglo experimental del diseño central compuesto en variables codificadas y reales para la optimización de producción de β -glucanos de *Rizhopus oryzae*.

Orden de corrida	Variables independientes	
	X ₁ : CG ¹ (g%)	X ₂ : CSA ² (g%)
1	-1 (0.4)	-1 (0.8)
2	1 (0.8)	-1 (0.8)
3	-1 (0.4)	1 (1.2)
4	1 (0.8)	1 (1.2)
5	-1.41 (0.32)	0 (1)
6	1.41 (0.88)	0 (1)
7	0 (0.6)	-1.41 (0.72)
8	0 (0.6)	1.41 (1.28)
9	0 (0.6)	0 (1)
10	0 (0.6)	0 (1)
11	0 (0.6)	0 (1)
12	0 (0.6)	0 (1)
13	-1 (0.4)	-1 (0.8)
14	1 (0.8)	-1 (0.8)
15	-1 (0.4)	1 (1.2)
16	1 (0.8)	1 (1.2)
17	-1.41 (0.32)	0 (1)
18	1.41 (0.88)	0 (1)
19	0 (0.6)	-1.41 (0.72)
20	0 (0.6)	1.41 (1.28)
21	0 (0.6)	0 (1)
22	0 (0.6)	0 (1)
23	0 (0.6)	0 (1)
24	0 (0.6)	0 (1)

El diseño experimental fue realizado con dos factores, doce corridas base y dos réplicas para cada tratamiento. Los ensayos fueron realizados a una temperatura de 30 °C, pH de 6, velocidad de agitación 150 rpm, volumen de medio de cultivo 50 mL y el volumen del Erlenmeyer de 250 mL.

¹. Concentración de glucosa en gramos por cada 100 mL de medio de cultivo.

². Concentración de sulfato de amonio en gramos por cada 100 mL de medio de cultivo.

Tabla 13. Arreglo experimental del diseño central compuesto en variables codificadas y reales para la optimización de producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae*.

Orden de corrida	Variables independientes	
	X ₁ : CG ¹ (g%)	X ₂ : CCA ² (g%)
1	-1 (0.2)	-1 (0.6)
2	1 (0.6)	-1 (0.6)
3	-1 (0.2)	1 (1.0)
4	1 (0.6)	1 (1.0)
5	-1.41 (0.12)	0 (0.8)
6	1.41 (0.68)	0 (0.8)
7	0 (0.4)	-1.41 (0.52)
8	0 (0.4)	1.41 (1.08)
9	0 (0.4)	0 (0.8)
10	0 (0.4)	0 (0.8)
11	0 (0.4)	0 (0.8)
12	0 (0.4)	0 (0.8)
13	-1 (0.2)	-1 (0.6)
14	1 (0.6)	-1 (0.6)
15	-1 (0.2)	1 (1.0)
16	1 (0.6)	1 (1.0)
17	-1.41 (0.12)	0 (0.8)
18	1.41 (0.68)	0 (0.8)
19	0 (0.4)	-1.41 (0.52)
20	0 (0.4)	1.41 (1.08)
21	0 (0.4)	0 (0.8)
22	0 (0.4)	0 (0.8)
23	0 (0.4)	0 (0.8)
24	0 (0.4)	0 (0.8)

El diseño experimental fue realizado con dos factores, doce corridas base y dos réplicas para cada tratamiento. Los ensayos fueron realizados a una temperatura de 35 °C, pH de 6, velocidad de agitación 150 rpm, volumen de medio de cultivo 50 mL y el volumen del Erlenmeyer de 250 mL.

¹. Concentración de glucosa en gramos por cada 100 mL de medio de cultivo.

². Concentración de cloruro de amonio en gramos por cada 100 mL de medio de cultivo.

El modelo cuadrático obtenido en el proceso de optimización de producción de biomasa y β -glucanos fue analizado con el programa Design Expert versión (DX13) (2021).

El diseño de experimento para las formulaciones de los yogures fue de un solo factor con 5 niveles, correspondientes a las concentraciones de 0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 % (p/v) de β -glucanos aislados de las paredes celulares de *Rhizopus oryzae*.

Se realizó un análisis de varianza de una vía para comparar las características fisicoquímicas, viabilidad de bacterias ácido lácticas, propiedades reológicas, de inocuidad y aceptación sensorial de los yogures formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae*. Posteriormente, se utilizó el estadístico de diferencias mínimas significativas para determinar las diferencias entre las medias de los ensayos. El nivel de confianza utilizado fue de 95%. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados fueron reportados como la media más o menos la desviación estándar. Se utilizó el software Statgraphics versión XVI (2013). Los gráficos utilizados para la presentación de los resultados fueron realizados con el programa RStudio versión 2022.02.0+443 (2023).

5. Resultados y Discusión

5.1. Objetivo 1. Aislamiento e identificación de mohos de las especies *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae*.

Un total de 56 aislados presuntivos de *Aspergillus flavus/oryzae* fueron obtenidos de granos de arroz, avena y trigo. Las características macroscópicas y microscópicas de los aislados M1A1 a M1A5 son presentados en las Tablas 14 a 16 y en las Figuras 1 a 6. En los aislados productores de aflatoxinas no fueron descritas estas características.

Tabla 14. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 1 trigo en MEA, CYA, YES, CREA Y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M1A1 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.13 ± 0.25	4.10 ± 0.53	4.09 ± 0.32	2.33 ± 0.29
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Umbonado	Plano	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M1A2 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde oscuro en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.13 ± 0.06	4.37 ± 0.15	4.20 ± 0.27	2.43 ± 0.06
	Margen	Entero	Filiforme	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Plano	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M1A3 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro	Blanco en el borde, verde en el centro	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.33 ± 0.06	4.00 ± 0.35	4.20 ± 0.09	2.53 ± 0.21
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Umbonado	Plano	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 15. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 1 trigo en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M1A4 trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro	Blanco en el borde, verde en el centro	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.93 ± 0.06	4.10 ± 0.13	4.12 ± 0.23	2.60 ± 0.31
	Margen	Filiforme	Entero	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Umbonado	Plano	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M1A5 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro	Blanco en el borde, verde en el centro	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.27 ± 0.16	3.90 ± 0.01	4.10 ± 0.28	3.37 ± 0.16
	Margen	Filiforme	Filamentoso	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Blanco	Crema	Gris
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS



Figura 1. Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 1 trigo (columna 1= M1A1, columna 2 = M1A2, columna 3 = M1A3, columna 4 = M1A4 y columna 5 = M1A5), cultivados a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.

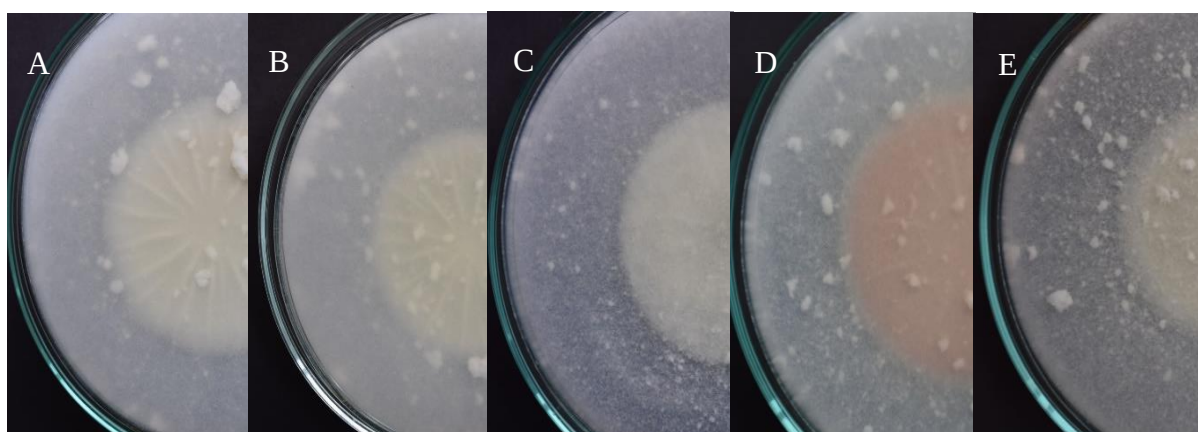


Figura 2. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 1 de trigo, cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M1A1. B. Aislado M1A2. C. Aislado M1A3. D. Aislado M1A4. E. Aislado M1A5. El color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxinas.

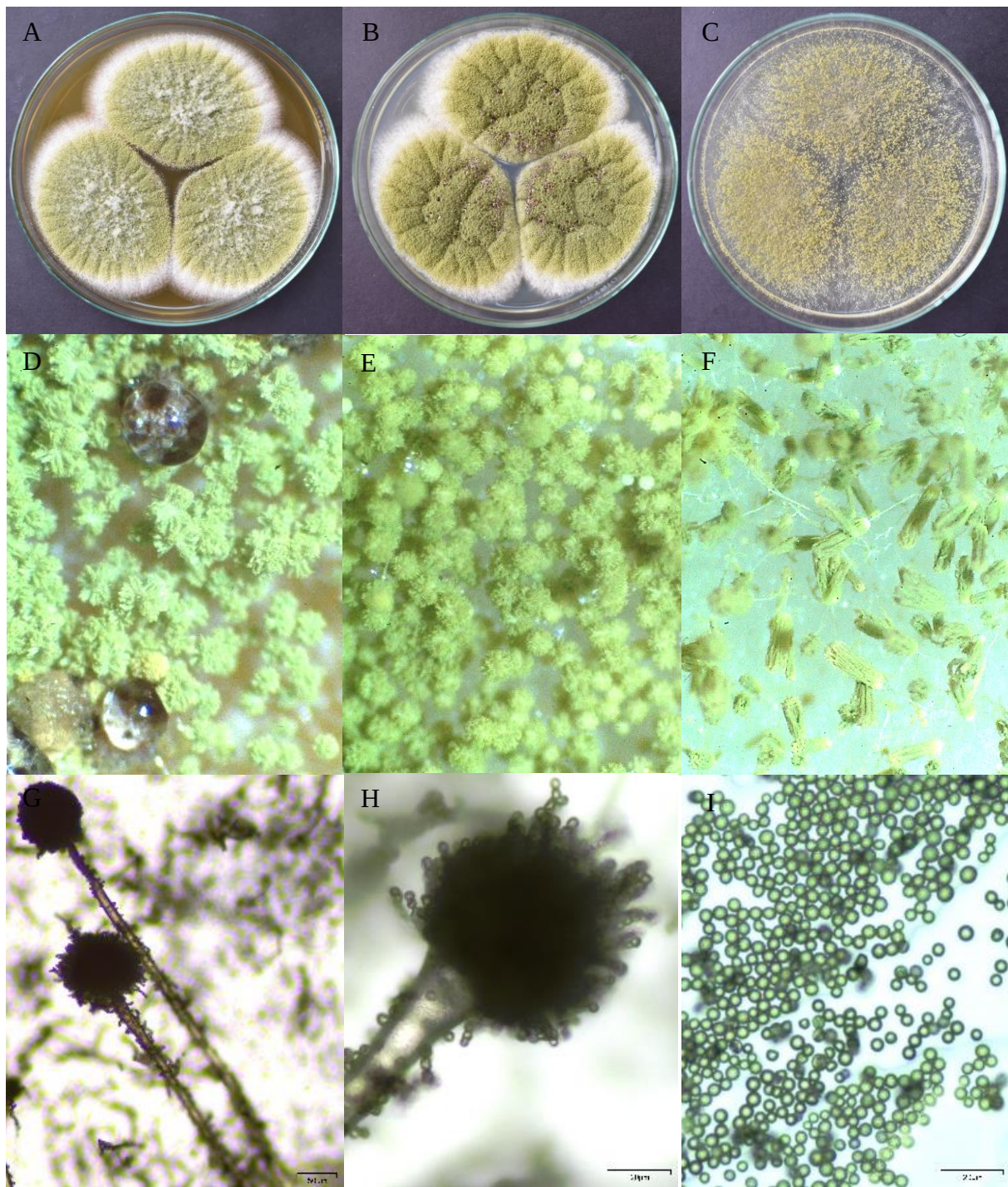


Figura 3. Colonias de aislado M1A1 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 µm. H-I barra 20 µm.

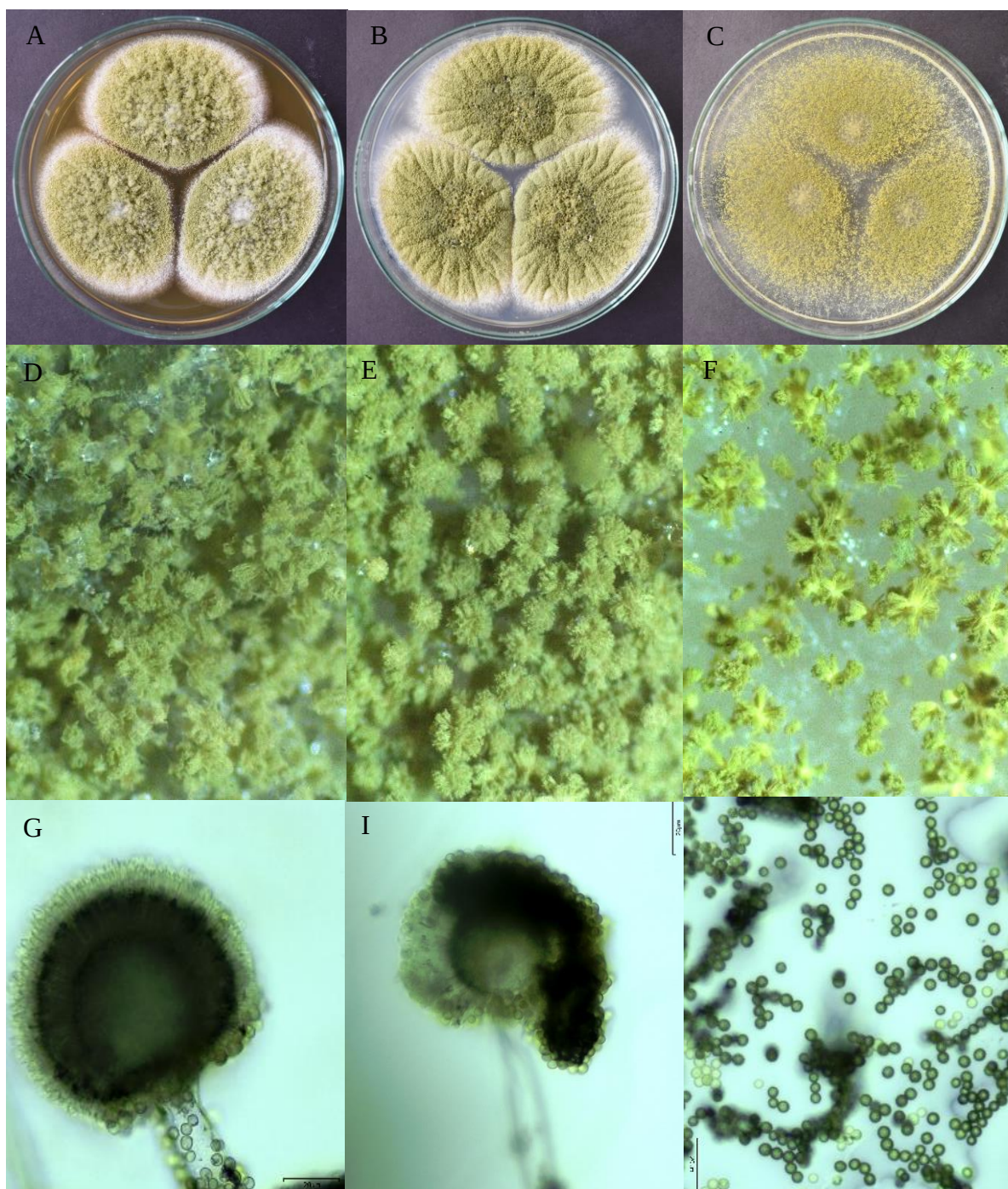


Figura 4. Colonias de aislado M1A2 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 µm. H-I barra 20 µm.

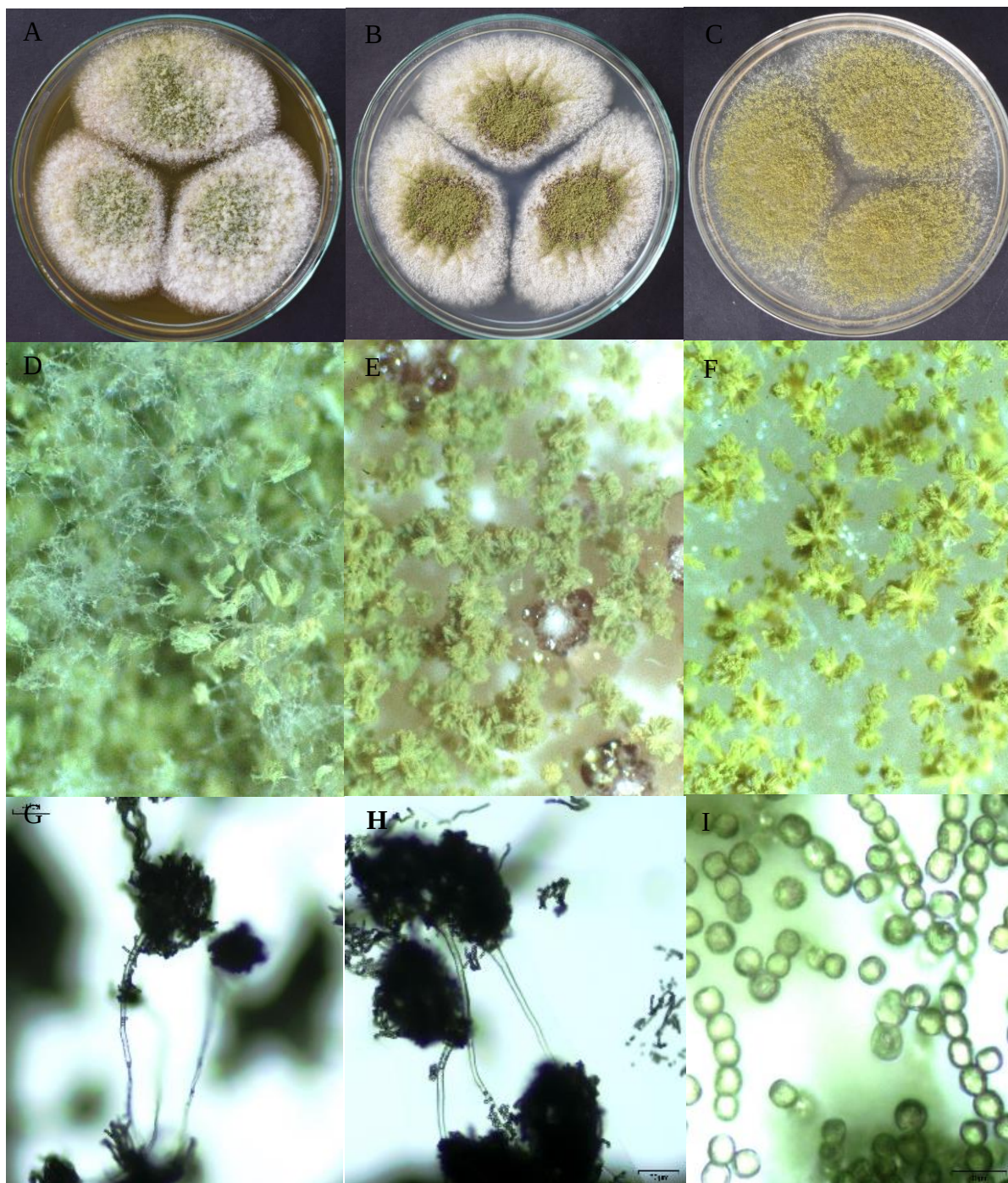


Figura 5. Colonias de aislado M1A3 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 50 µm. I barra 10 µm.

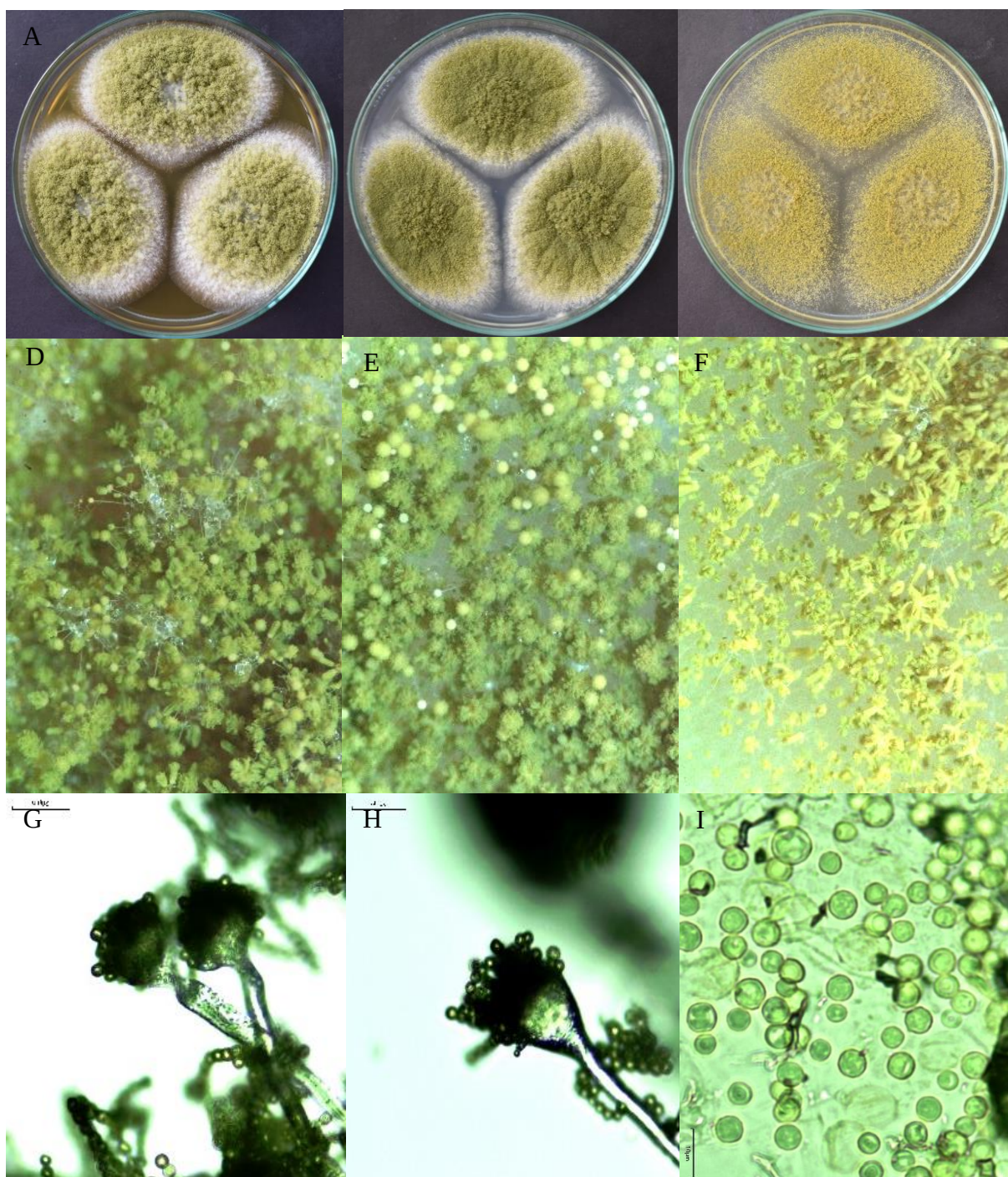


Figura 6. Colonias de aislado M1A5 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 20 µm. I barra 10 µm.

Tabla 16. Características microscópicas de los aislados M1A1 al M1A5 provenientes de la muestra 1 de trigo en MEA cultivados a 25 °C por 7 días.

Características	Aislados No.			
	A1	A2	A3	A5
Hifas	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada
Conidióforo				
a) Longitud ¹	225.60 – 680.10	150.80 – 531.2	73.30 – 451.00	256.30 – 421.20
b) Diámetro ¹	7.50 – 15.50	3.50 – 10.50	2.60 – 8.20	4.60 – 8.40
c) Vesícula	Globoso	Globoso	Globoso	Globoso
Conidio				
a) Cabeza	Globosa-hemisférica de color marrón oscuro	Globoso de color verde y columnar de color marrón oscuro	Columnar de color marrón oscuro	Columnar de color marrón oscuro
b) Diámetro ¹	3.50 – 6.10	5.20 – 8.00	3.80 – 5.00	3.90 – 5.50
c) Ornamentación	Rugosa con espículas	Rugosa con espículas	Rugosa con espículas	Rugosa
Fiálides	Monoseriada cubriendo la parte superior de la vesícula	Biseriada cubriendo la parte superior de la vesícula	Monoseriada cubriendo la parte superior de la vesícula	Directo desde la vesícula
a) Primaria ¹	3.30 – 9.20	5.30 – 12.30	Adherida a la cabeza	-
b) Secundaria ¹	Ausente	8.00 – 16.90	Ausente	Ausente

¹ µm, promedio de 30 medidas

Entre las características utilizadas para la identificación de los hongos perteneciente a la sección *Flavi*, en la que se incluyen *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus flavus*, fue el color, utilizado como criterio inicial de clasificación (Okayo et al., 2020). Las colonias presentaron un color característico verde amarillo o verde oliva con bordes blancos. Las colonias tuvieron un tamaño que osciló entre 3.93 y 4.33 cm en MEA, 3.90 y 4.37 cm en YES, 4.09 y 4.20 cm en CYA, y 2.33 y 3.37 cm en CREA. Fueron de margen filiforme, entero y filamentoso, con elevación umbonada a plana, textura flocosa y granulosa y crecimiento medio. Hubo producción de exudados en MEA y YES, presencia de esclerocios en todos los aislados y producción de aflatoxina en el aislado M1A4.

Con respecto a las características microscópicas, se pudo observar que las hifas eran ramificadas y septadas, con vesículas globosas. Los conidióforos tuvieron una longitud de entre 73.30 y 680.10 µm y un ancho entre 3.50 y 10.50 µm. Los conidios fueron rugosos, con o sin espículas, y un diámetro entre 3.50 y 8.00 µm. Presentaron fiálides monoseriadas cubriendo la parte superior de la vesícula, con tamaño entre 3.30 y 9.20 µm y el aislado M1A2 presentó una disposición biseriada con métulas y fiálides de tamaño 5.30 a 12.30 µm y 8.00 a 16.90 µm respectivamente.

En las Tablas 17 a 19 y en las Figura 7 a 13 se presentan las características macroscópicas y microscópicas de los aislados M2A1 a M2A5. Los colores en el centro de las colonias fueron verde, amarillo verdoso, verde oliva, marrón y con bordes blancos. El tamaño de las colonias estuvo entre 3.67 y 4.07 cm en MEA, 3.97 y 4.10 cm en CYA, 3.63 y 4.40 cm en YES, y 2.17 a 2.50 cm en CREA. Los bordes fueron enteros, con elevación plana y umbunada, textura glabra, granulosa y flocosa, las colonias presentaron un crecimiento medio, sin presencia de esclerocios ni producción de aflatoxinas.

Tabla 17. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 2 avena en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M2A1 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.93 ± 0.12	3.97 ± 0.15	4.40 ± 0.10	2.17 ± 0.29
	Margen	Entero	Entero	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Blanco	Crema	Gris
	Elevación	Plano	Plano	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Glabro	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	No hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M2A2 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde oscuro en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.67 ± 0.15	4.10 ± 0.10	3.63 ± 0.15	2.50 ± 0.20
	Margen	Filamentoso	Entero	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Umbunado	Plano	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M2A3 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, marrón en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.07 ± 0.20	4.20 ± 0.26	4.03 ± 0.15	3.03 ± 0.15
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Umbunado	Umbunado	Crateriforme	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 18. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 2 avena en MEA, CYA, YES y CREA cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M2A4 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, marrón en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.93 ± 0.30	4.03 ± 0.23	4.27 ± 0.25	3.03 ± 0.05
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Plano	Umbunado	Crateriforme	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia
M2A5 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde oscuro en el centro.	Blanco en el borde, marrón en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.93 ± 0.11	4.10 ± 0.26	4.20 ± 0.20	2.33 ± 0.15
	Margen	Entero	Entero	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Plano	Plano	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Glabro	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	No hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS



Figura 7. Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena (columna 1= M2A1, columna 2 = M2A2, columna 3 = M2A3, columna 4 = M2A4 y columna 5 = M2A5), cultivados a 25 oC durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.

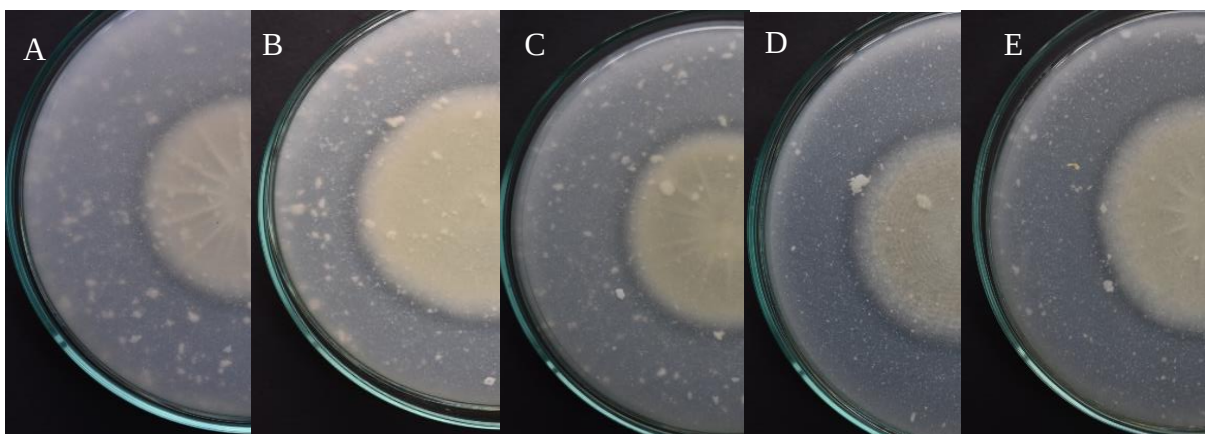


Figura 8. Producción de aflatoxina por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena (aislados 1 al 5), cultivados en CAM a 25 oC durante 7 días. A. Aislado M2A1. B. Aislado M2A2. C. Aislado M2A3. D. Aislado M2A4. E. Aislado M2A5. El color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxinas.

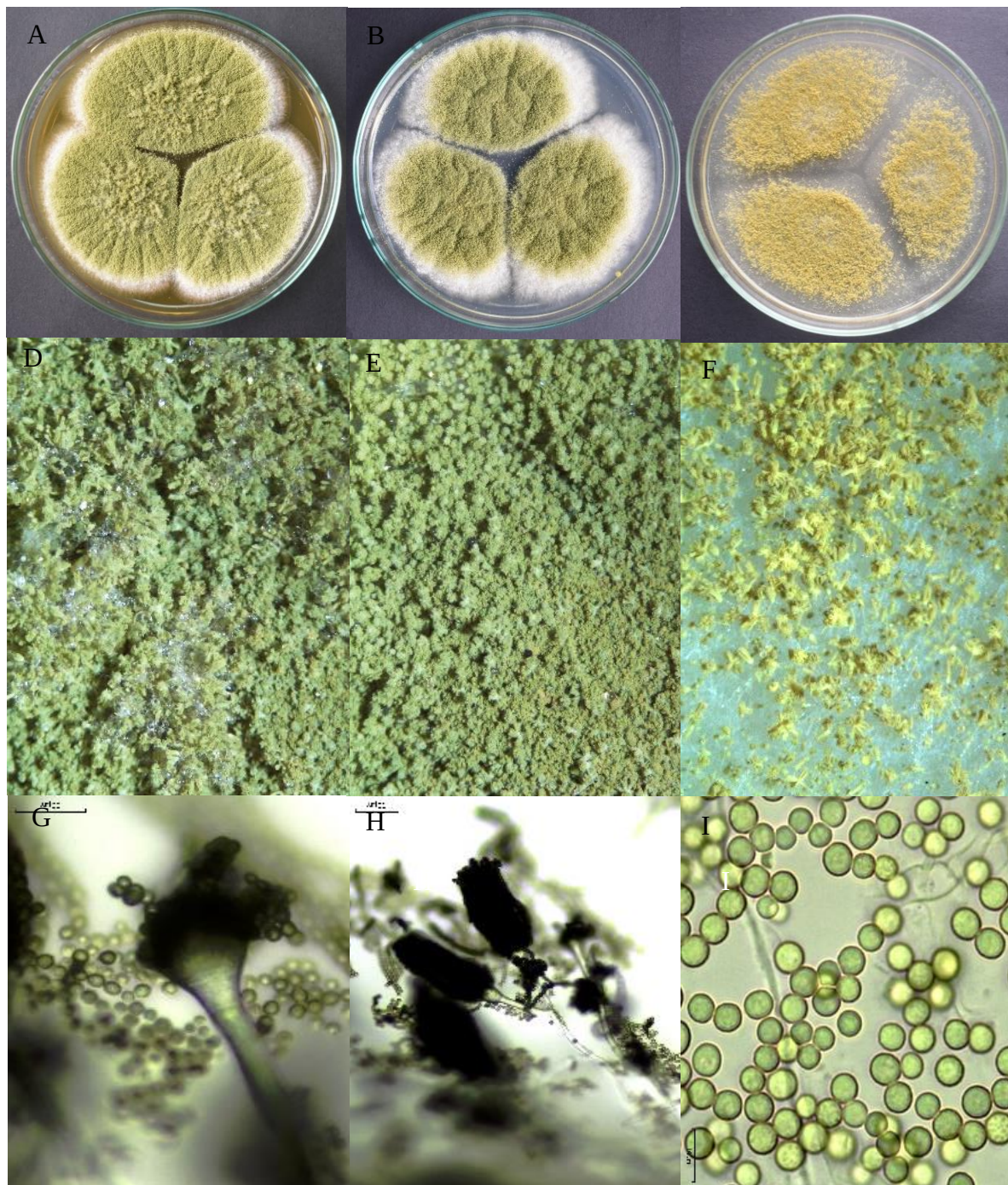


Figura 9. Colonias de aislado M2A1 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H barra 50 μm. I barra 10 μm.

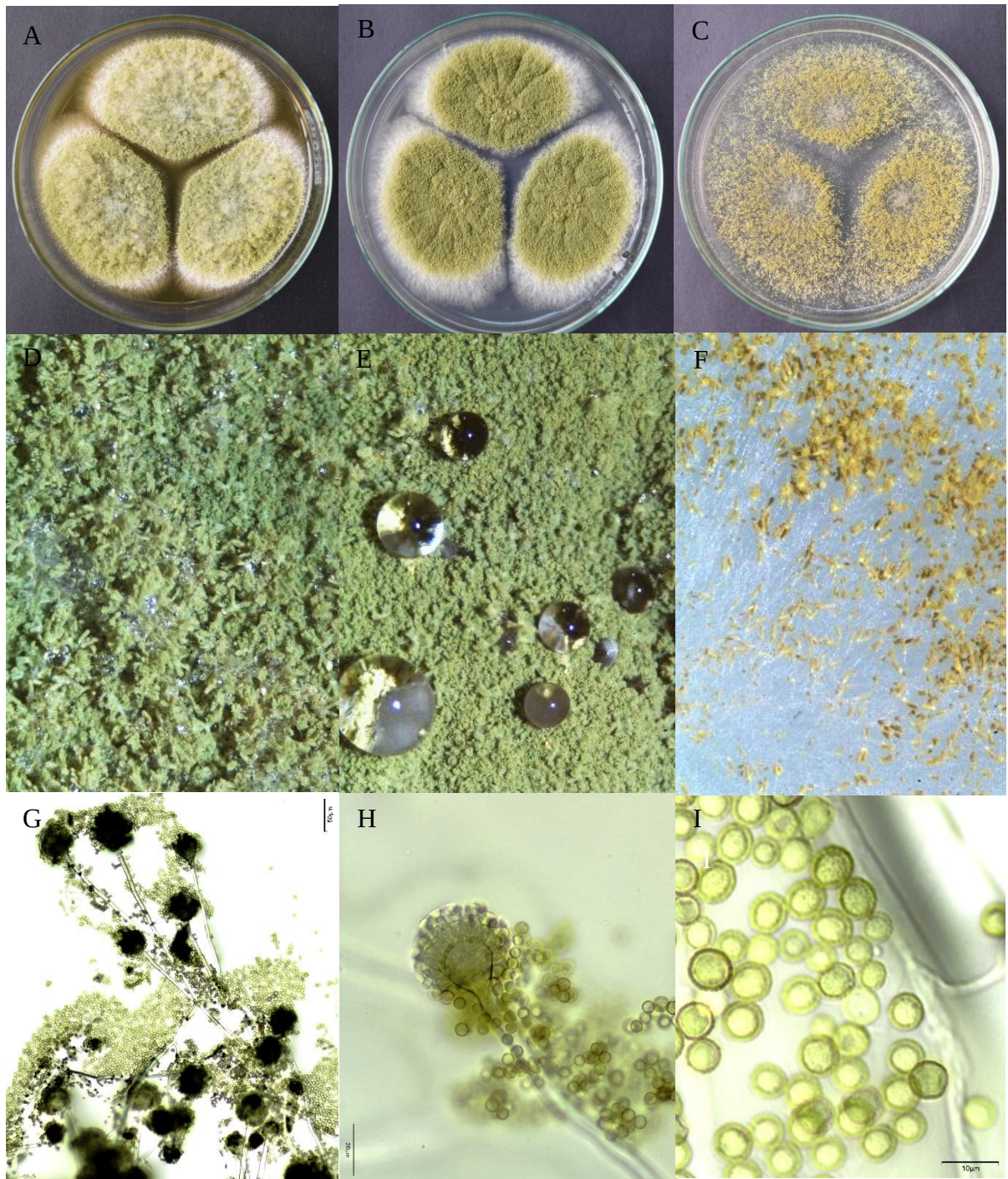


Figura 10. Colonias de aislado M2A2 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm

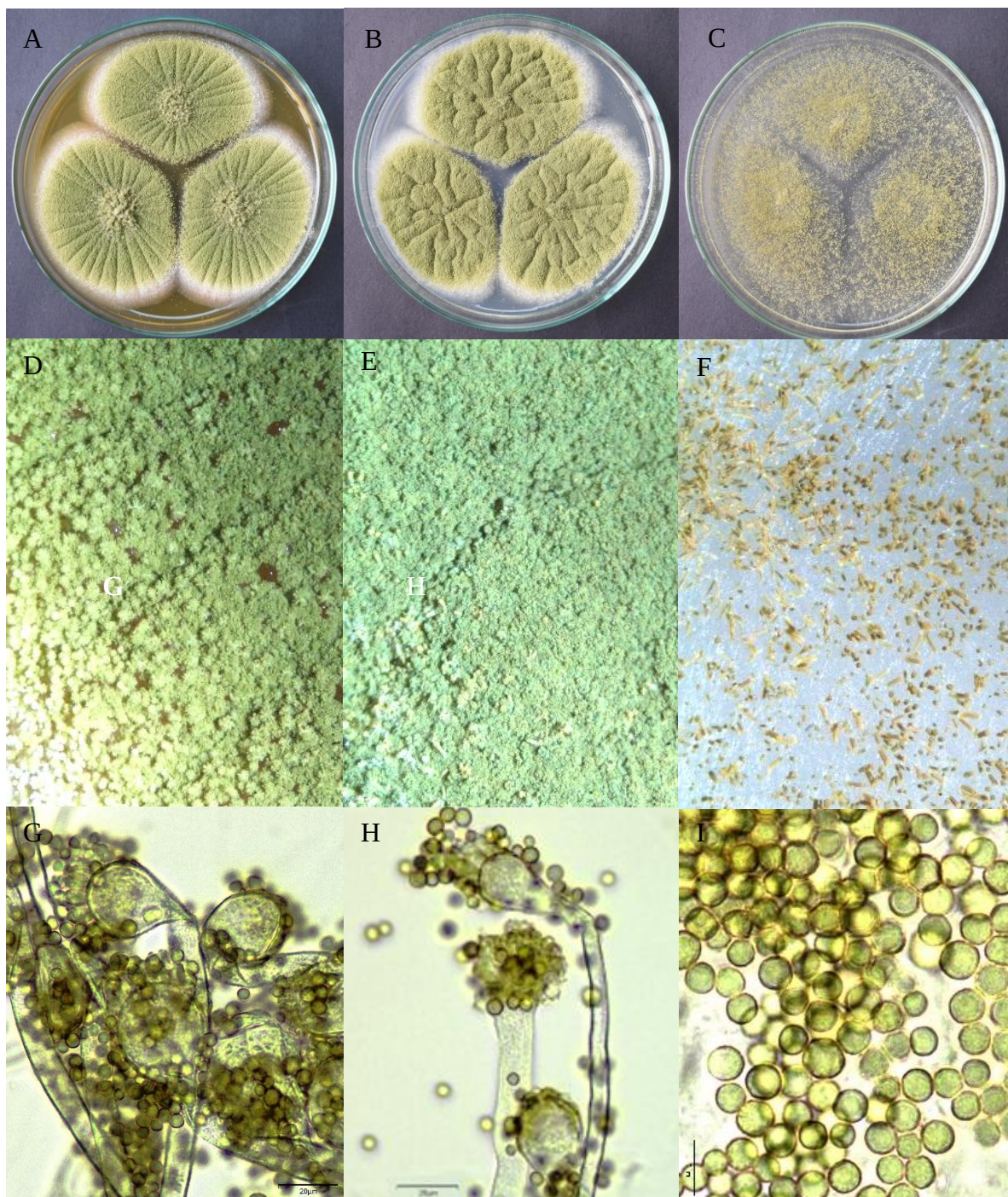


Figura 11. Colonias de aislado M2A3 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC por 7. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

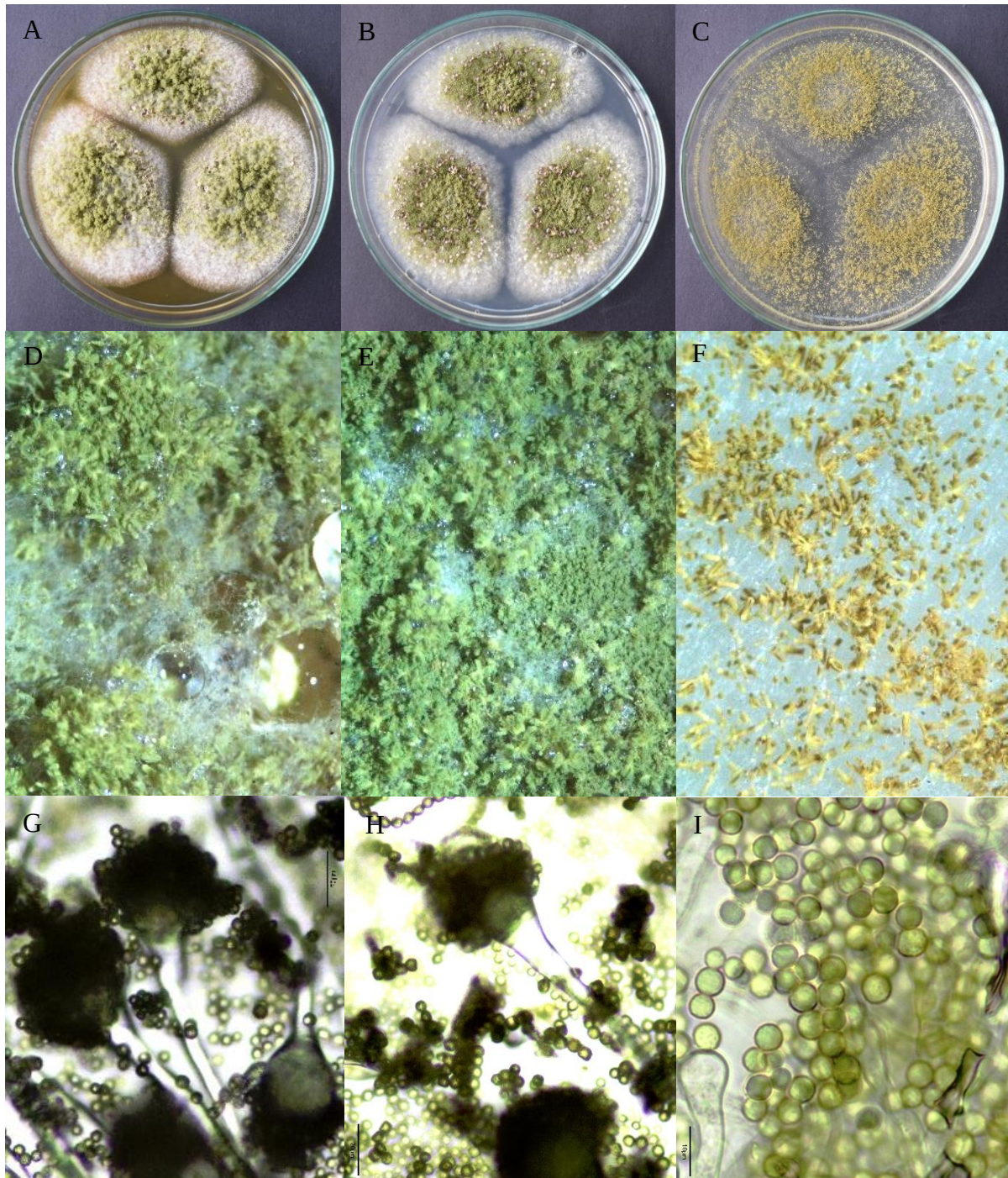


Figura 12. Colonias de aislado M2A4 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm

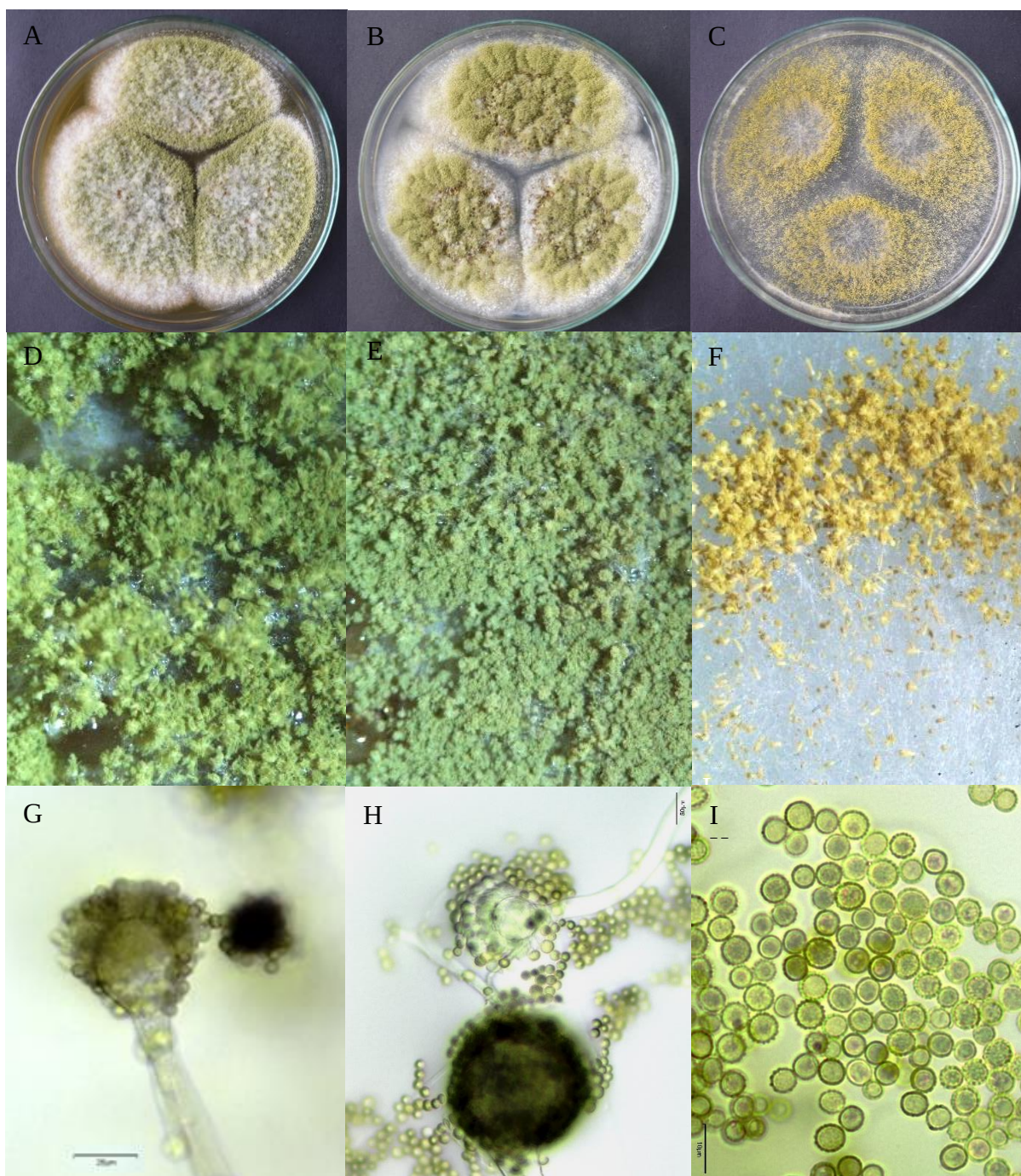


Figura 13. Colonias de aislado M2A5 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H barra 50 μm. I barra 10 μm.

Tabla 19. Características microscópicas de los aislados A1 al A5 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA cultivados a 25 °C durante 7 días.

Características	Identificación de los aislados				
	M2A1	M2A2	M2A3	M2A4	M2A5
Hifas	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada
Conidióforo					
a) Longitud ¹	155.20 – 560.50	212.40 – 401.10	235.40 – 260.70	150.10 – 431.50	323.80 – 1150.20
b) Diámetro ¹	5.80 – 13.10	4.90 – 10.70	4.90 – 12.20	3.50 – 11.40	3.50 – 12.10
c) Vesícula	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica
Conidio (µm)					
a) Cabeza	Columnar y Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica y columnar	Hemisférica
b) Diámetro ¹	4.10 – 6.40	4.70 – 7.20	4.30 – 7.00	3.50 – 6.50	
Ornamentación	Rugosas	Rugosas	Rugosas	Rugosas	Rugosas con espícula
Fiálides	Directamente desde la vesícula y columnar.	Directamente desde la vesícula y columnar.	Directamente desde la vesícula y columnar.	Directamente desde la vesícula y columnar.	Directamente desde la vesícula y columnar.
a) Primaria ¹	3.30 – 9.20	-	9.10 – 15.10	6.50 – 9.80	4.00 – 5.50
b) Secundaria ¹	Ausente	-	Ausente	Ausente	Ausente

¹ µm, promedio de 30 medidas

Los aislados presentaron hifas ramificadas y septadas, con conidióforo de longitud entre 323.80 a 1150.20 µm y un diámetro entre 3.50 a 13.10 µm. Las vesículas fueron hemisféricas y las cabezas presentaron forma columnar y hemisférica, con un diámetro entre 3.50 y 7.20 µm. Los conidios mostraron ornamentación rugosa y con espículas, y las fiálides primarias tuvieron un tamaño entre 3.30 y 15.10 µm.

Los aislados M2A6 a M2A10 presentaron color verde, verde oliva y amarillo verdoso en el centro, con bordes blancos. El tamaño de la colonia fue de 4.10 a 4.37 cm en MEA, 4.10 a 4.27 cm en CYA, 4.17 a 4.33 en YES, y 2.20 a 2.73 cm en CREA. Presentaron margen entero, filamentoso y filiforme, con elevación umbonada, cerebriforme y plana, textura flocosa, glabra y granulosa. Fueron de crecimiento medio. El aislado M2A6 (avena) no presentó esclerocios y hubo la producción de aflatoxinas, mientras que los otros aislados presentaron estas estructuras y no produjeron aflatoxinas. Todos los aislados mostraron presencia de exudados (Tabla 20 y 21, Figuras 14 a 19). En la Tabla 22 se presenta la descripción de las estructuras microscópicas de los aislados analizados.

Tabla 20. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A6 a A10 provenientes de la muestra 2 de avena y arroz en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M2A6 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.20 ± 0.20	4.27 ± 0.21	4.33 ± 0.21	2.20 ± 0.20
	Margen	Filamentoso	Entero	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Naranja pálido	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Umbunado	Cerebriforme	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Glabro	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M2A7 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde oscuro en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.13 ± 0.12	4.10 ± 0.10	4.26 ± 0.11	2.63 ± 0.06
	Margen	Filamentoso	Entero	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Umbunado	Cerebriforme	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Glabro	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M2A8 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, marrón en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.10 ± 0.17	4.23 ± 0.21	4.27 ± 0.17	2.30 ± 0.10
	Margen	Filamentoso	Entero	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Umbunado	Cerebriforme	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Glabro	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 21. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A6 a A10 provenientes de la muestra 2 de avena y arroz en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M2A9 Arroz	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, marrón en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.37 ± 0.35	4.17 ± 0.15	4.17 ± 0.29	2.50 ± 0.10
	Margen	Filamentoso	Entero	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Umbunado	Cerebriforme	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	crecimiento medio	Crecimiento medio	crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Glabro	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M2A10 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde-blanco en el centro.	Blanco en el borde, verde oscuro en el centro.	Blanco en el borde, marrón en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.30 ± 0.26	4.27 ± 0.31	4.30 ± 0.20	2.73 ± 0.06
	Margen	Filamentoso	Entero	Filamentoso	Filamentoso
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Umbunado	Cerebriforme	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Glabro	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS



Figura 14. Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 y 4 de avena (aislados Columna 1= M2A6, Columna 2 al 5 = M2A7 al M2A10, cultivados a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.

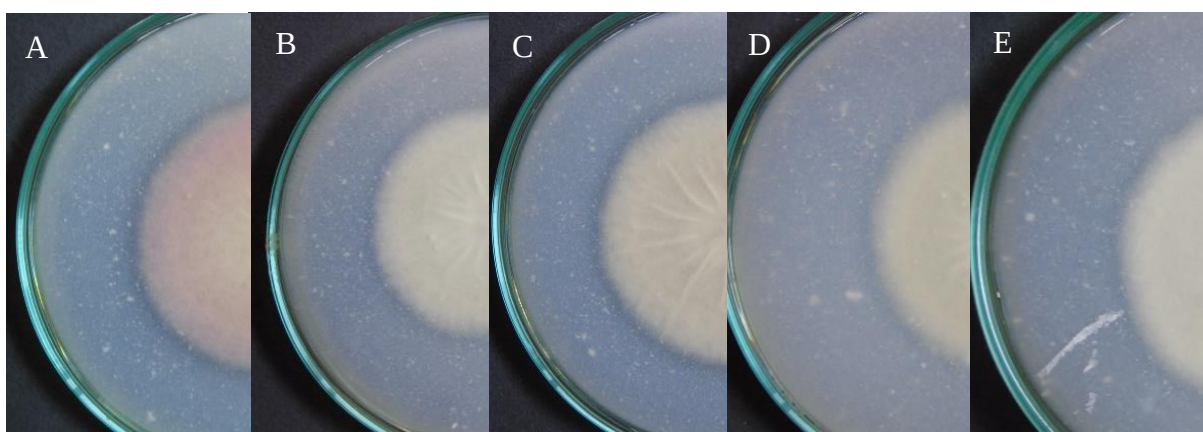


Figura 15. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena (aislados Columna 1= M2A6, Columna 2 al 5 = M2A7-M2A10), cultivados en CAM a 25 oC durante 7 días. A. Aislado 1. B. Aislado 2. C. Aislado 3. D. Aislado 4. E. Aislado 5. El color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxinas.

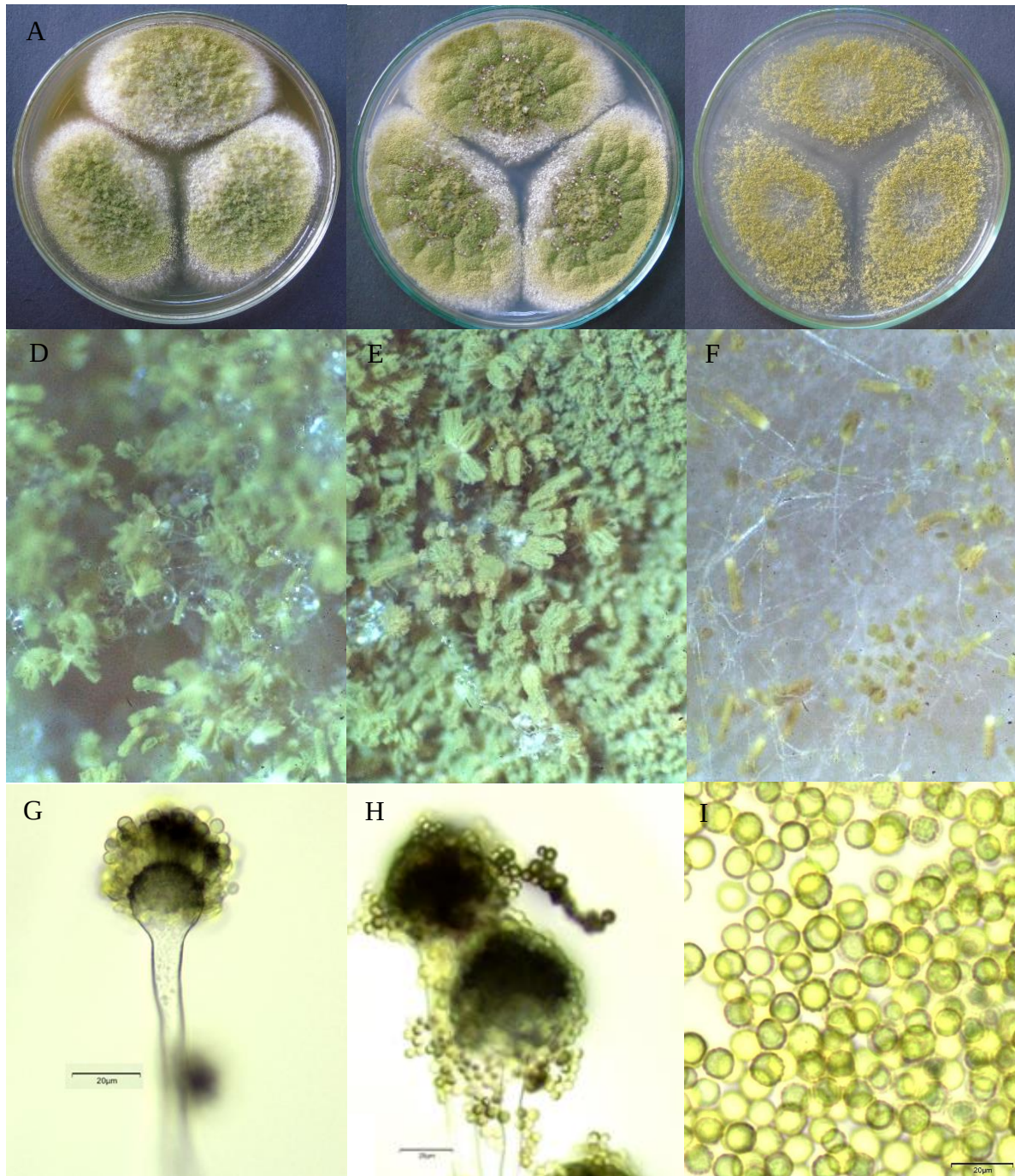


Figura 16. Colonias de aislado M2A7 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

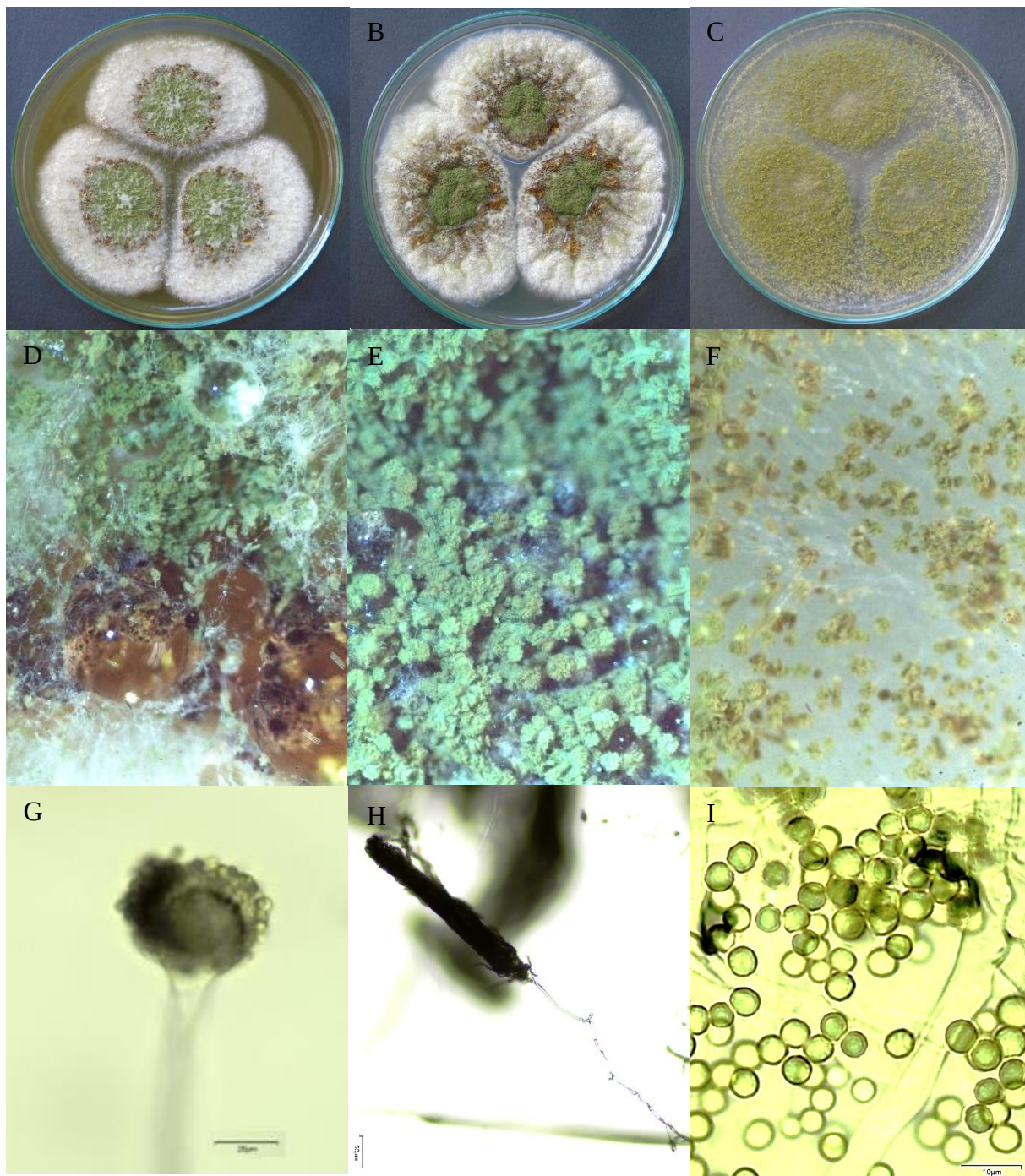


Figura 17. Colonias de aislado M2A8 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H barra 50 μm. I barra 10 μm.

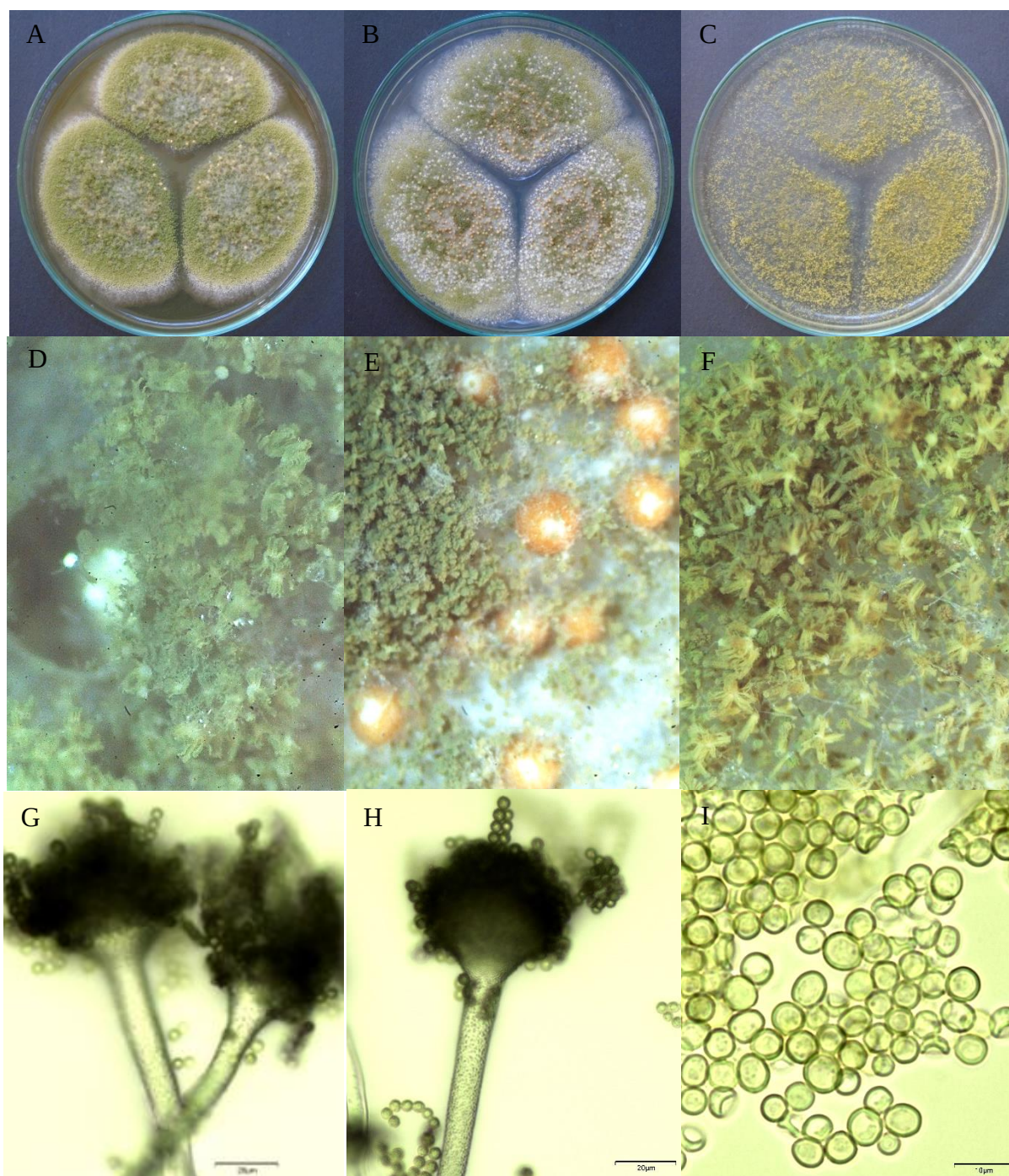


Figura 18. Colonias de aislado M2A9 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

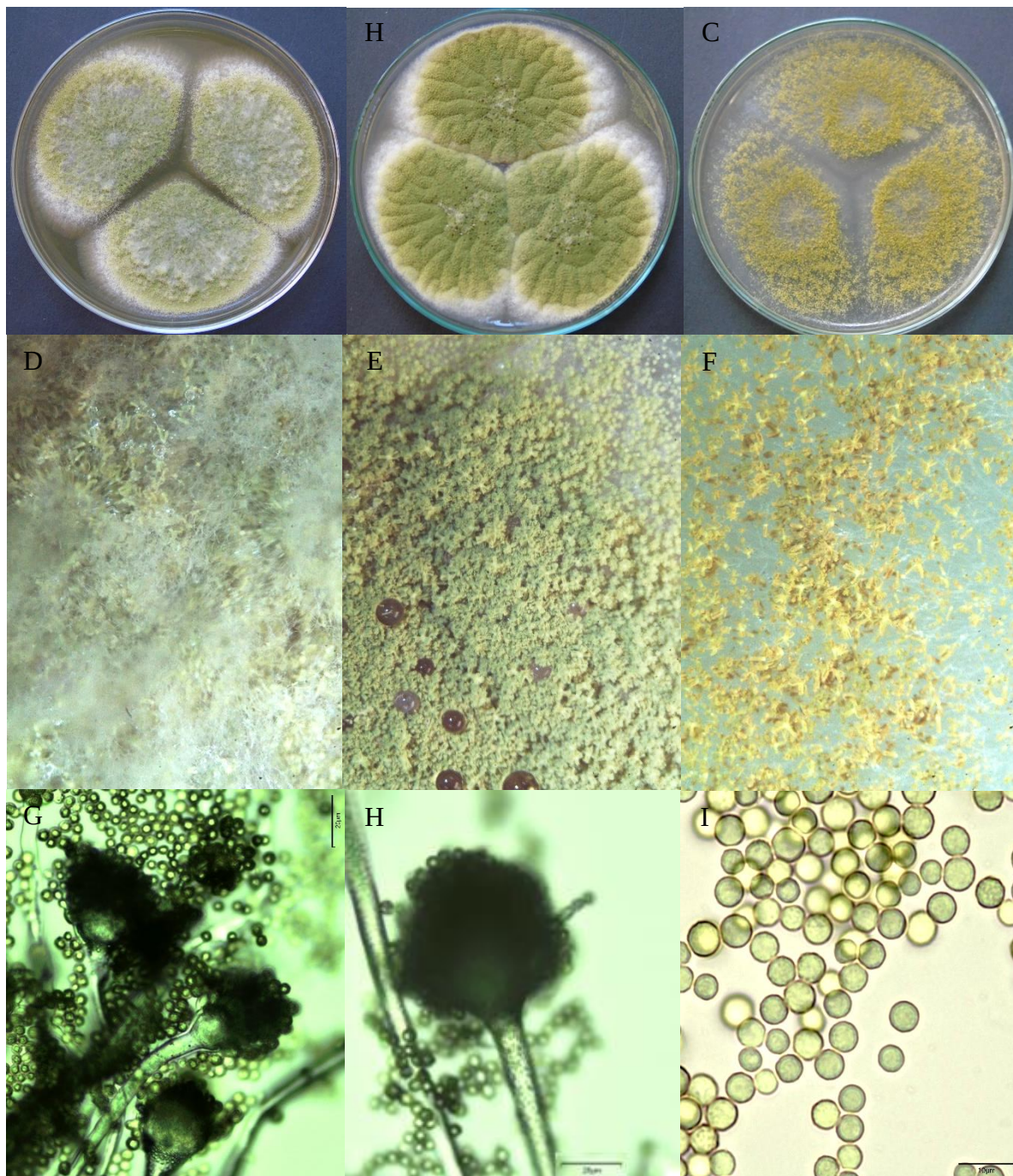


Figura 19. Colonias de aislado M2A10 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm . H barra 20 μm . I barra 10 μm .

Tabla 22. Características microscópicas de los aislados M2A6 al M2A10 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA cultivados a 25 °C por 7 días.

Características	Identificación de los aislados			
	M2A7	M2A8	M2A9	M2A10
Hifas	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada
Conidióforo				
a) Longitud ¹	252.20 – 715.30	243.90 – 518.30	284.30 – 455.90	409.90 – 1706. 10
b) Diámetro ¹	6.60 – 9.50	4.70 – 10.30	7.50 – 10.50	6.10 – 8.90
c) Vesícula	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica
Conidio (µm)				
a) Cabeza	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica
b) Diámetro ¹	4.20 -6.50	4.20 – 6.00	4.20 – 5.90	4.10 – 5.80
c) Ornamentación	Rugosas	Ligeramente rugosas	Ligeramente rugosas	Ligeramente rugosas
Fiálides	Directamente desde la vesícula y columnar	Directamente desde la vesícula y columnar	Directamente desde la vesícula y columnar	Directamente desde la vesícula y columnar
a) Primaria ¹	6.10 – 12.40	-	-	7.50 – 7.90
b) Secundaria ¹	Ausente	-	-	Ausente

¹ µm, promedio de 30 medidas

Todos los aislados presentaron hifas ramificadas y septadas, con conidióforo de longitud en el rango de 243.90 a 1706.10 µm y diámetro desde 4.70 a 10.50 µm. Las vesículas y forma de la cabeza fueron hemisférica. Los conidios presentaron un tamaño de 4.10 a 6.50 µm, con ornamentación rugosas o ligeramente rugosas, y fiálides que se unían directamente desde la vesícula, de forma columnar y con un tamaño entre 6.10 y 12.40 µm.

Las características macroscópicas y microscópicas de los aislados M2A11 a M2A15 se muestran en las Tablas 23 a 24 y las Figuras 20 a 26. Se puede observar que las colonias presentaron color verde, verde oliva y verde amarillo en el centro, con bordes blanco. El tamaño estuvo entre 4.20 y 4.40 cm en MEA, 4.23 a 4.40 cm en CYA, 4.23 a 4.43 cm en YES y 3.27 a 4.40 en CREA. El margen de los aislados fue entero, filamentosos y filiforme, la elevación fue umbonada, cerebriforme y plana, textura granulosa y flocosa. No hubo producción de aflatoxina ni de esclerocios.

Con respecto a las estructuras microscópicas, se evidenció la presencia de conidióforo con longitud de 166.90 a 762.40 µm y un diámetro de 4.70 a 14.90 µm. Las vesículas fueron de forma hemisférica, y los conidios presentaron un diámetro de 3.90 y 6.90 µm, ligeramente rugosas y con espículas. Presentaron fiálides primarias que se insertaban directamente en las vesículas, con un tamaño de 7.10 a 13.00 µm (Tabla 25).

Tabla 23. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados M2A11 a M2A15 provenientes de la muestra 2 de trigo y avena en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M2A11 avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.37 ± 0.12	4.30 ± 0.26	4.37 ± 0.32	3.43 ± 0.15
	Margen	Filamentoso	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Umbunado	Cerebriforme	Elevado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	crecimiento medio	Crecimiento medio	crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M2A12 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde oscuro en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.20 ± 0.30	4.40 ± 0.10	4.43 ± 0.15	3.27 ± 0.21
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Elevada	Umbunado	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Flocoso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M2A13 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, marrón en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.23 ± 0.21	4.30 ± 0.17	4.27 ± 0.15	3.50 ± 0.10
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Gris
	Elevación	Umbunado	Umbunado	Umbunado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 24. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados M2A11 a M2A15 provenientes de la muestra 2 de trigo y avena en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M2A14 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, marrón en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.27 ± 0.32	4.33 ± 0.15	4.43 ± 0.15	4.40 ± 0.20
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema		Crema	Gris
	Elevación	Umbunado	Umbunado	Umbunado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	crecimiento medio
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M2A15 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde-blanco en el centro.	Blanco en el borde, verde oscuro en el centro.	Blanco en el borde, marrón en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.40 ± 0.10	4.23 ± 0.23	4.23 ± 0.31	3.67 ± 0.06
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbunado	Umbunado	Elevado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS



Figura 20. Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena (aislados Columna 1= M2A11 a Columna 5 = M2A15), cultivados en MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.

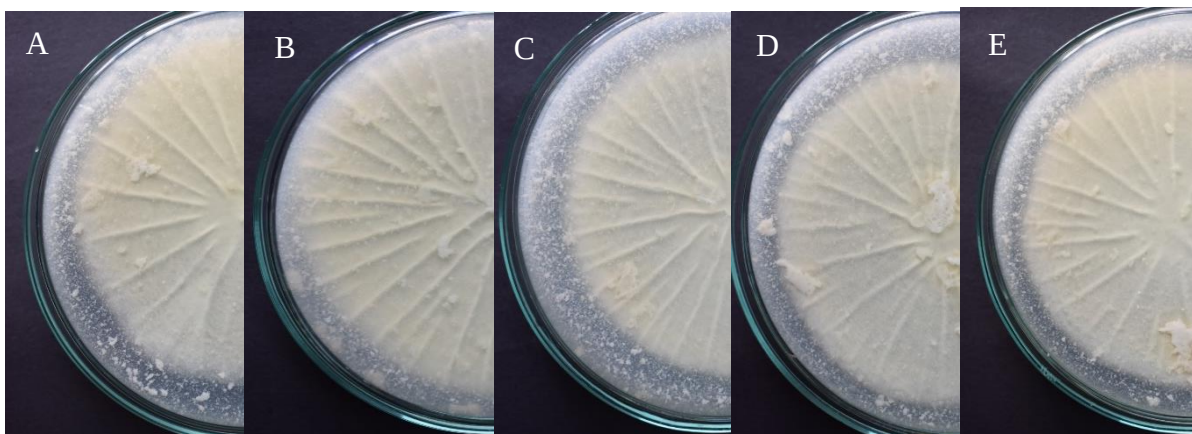


Figura 21. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M2A11. B. Aislado M2A12. C. Aislado M2A13. D. Aislado M2A14. E. Aislado M2A15. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxinas.

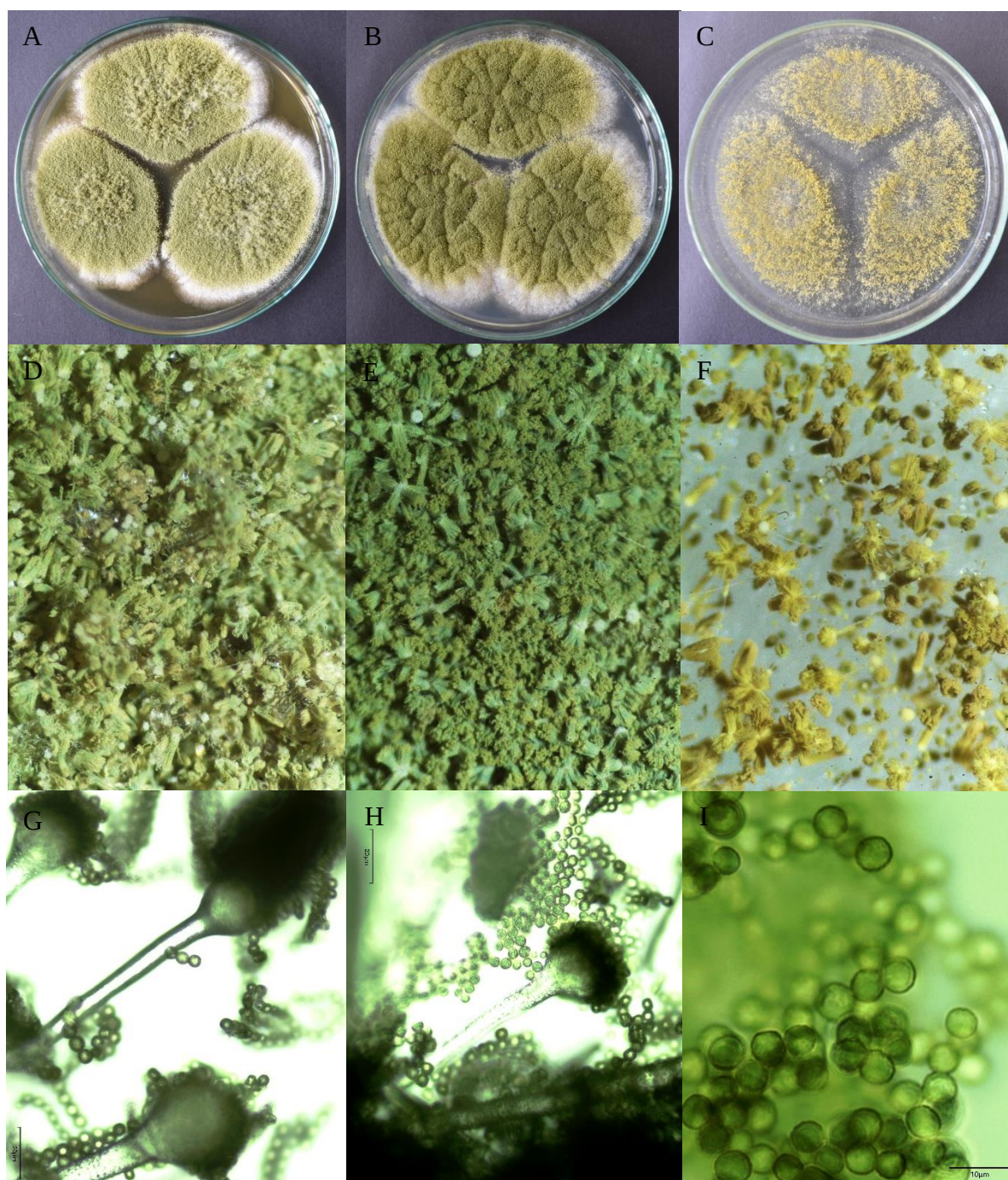


Figura 22. Colonias de aislado M2A11 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

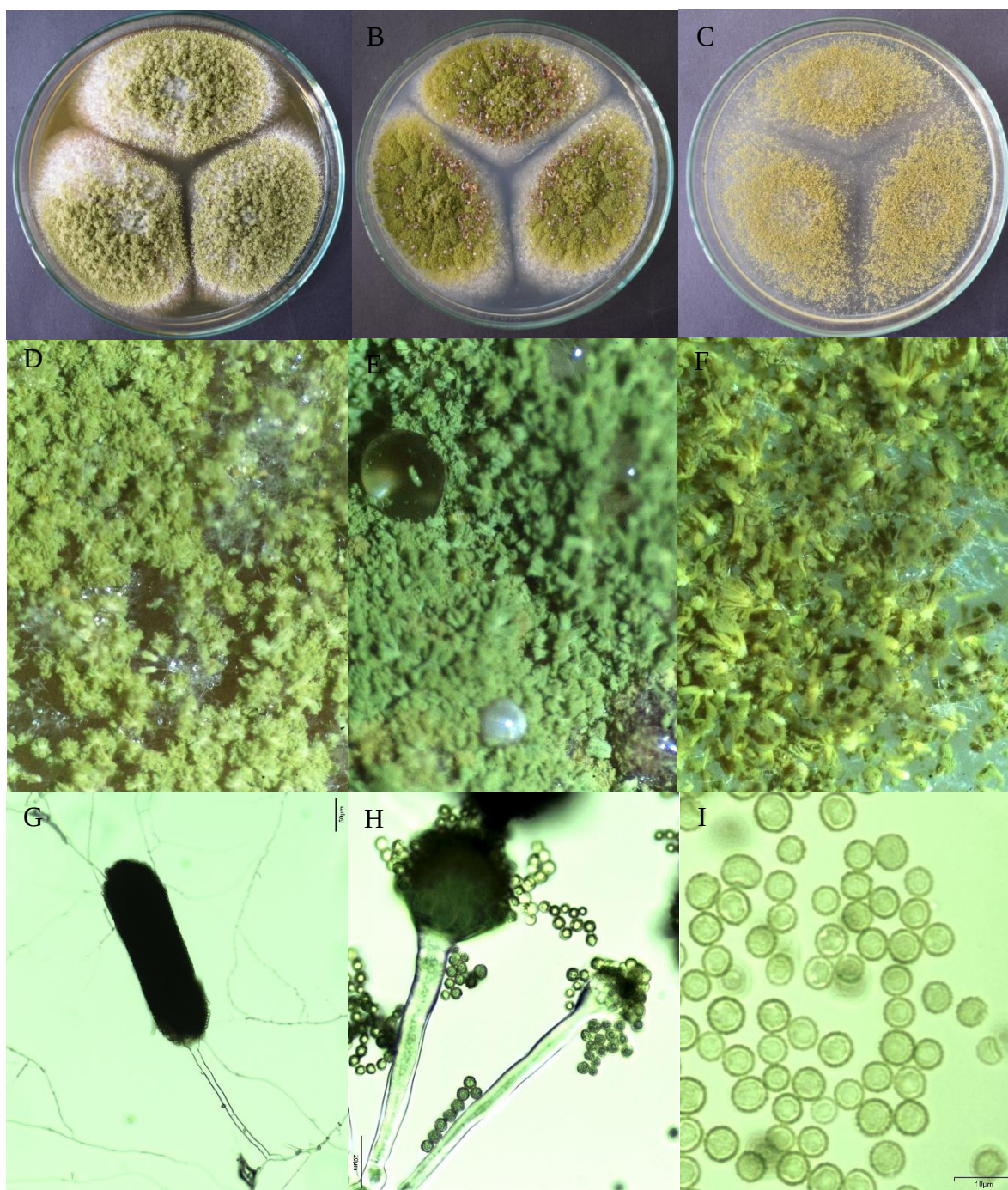


Figura 23. Colonias de aislado M2A12 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.

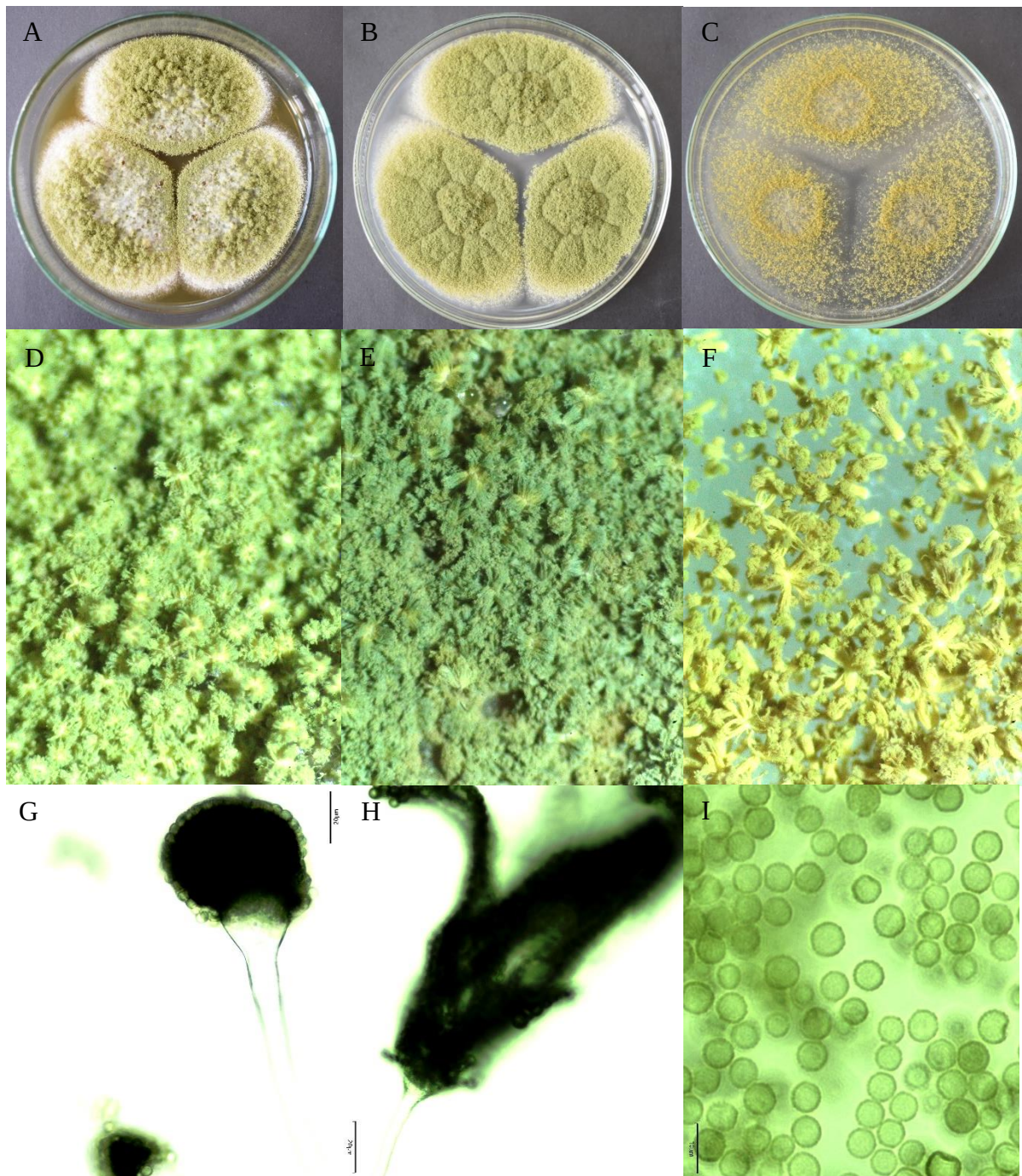


Figura 24. Colonias de aislado M2A13 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

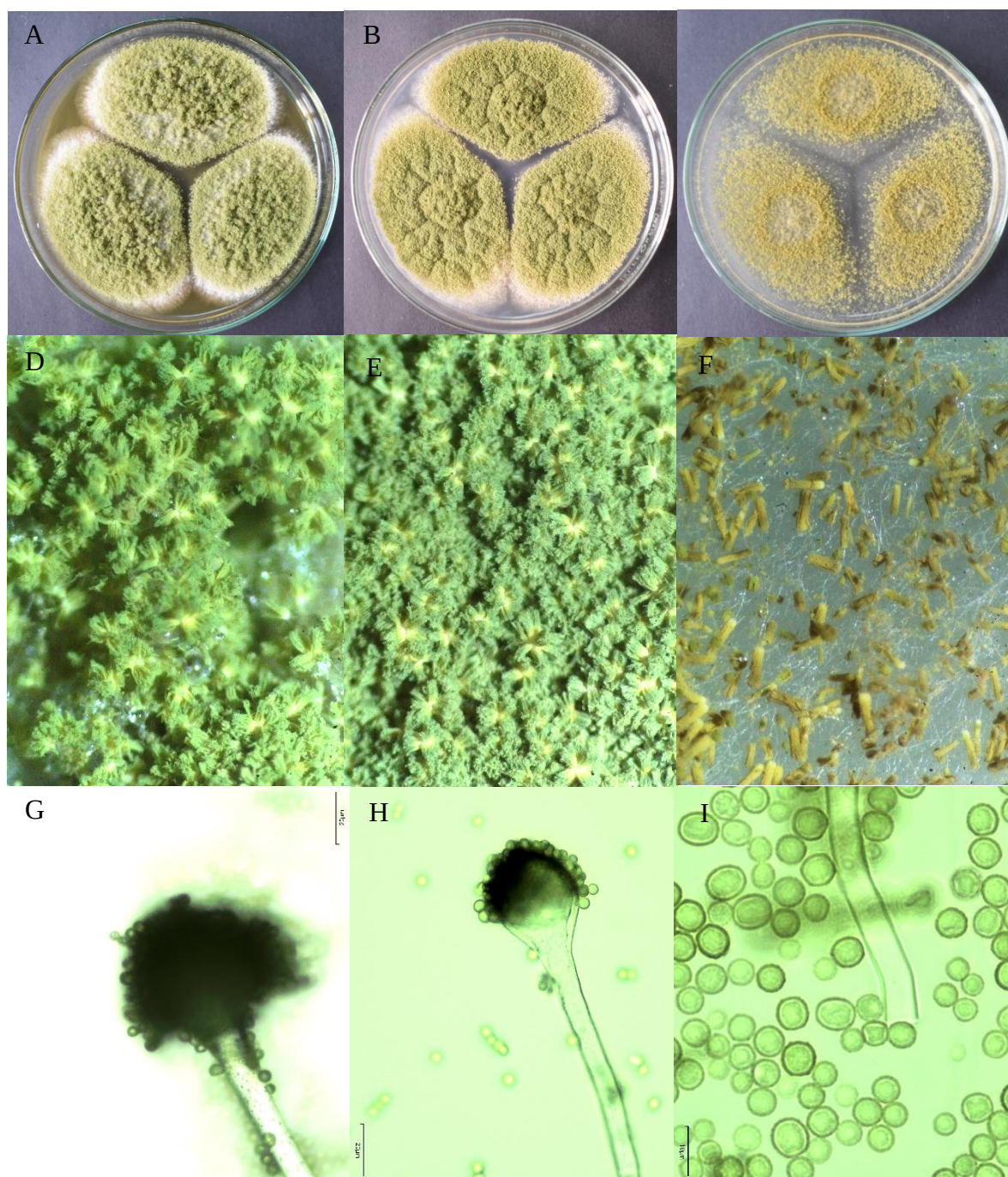


Figura 25. Colonias de aislado M2A14 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

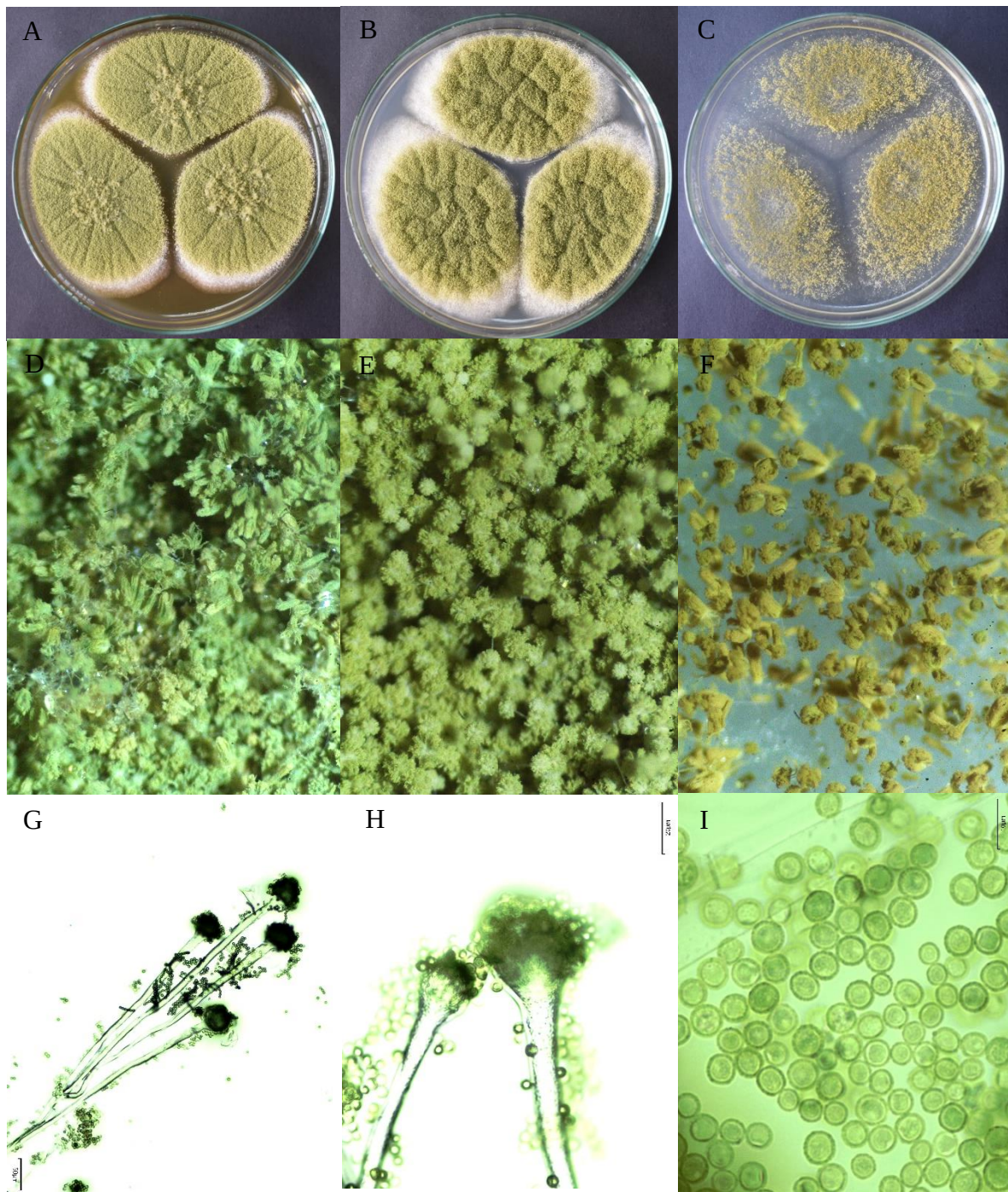


Figura 26. Colonias de aislado M2A15 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 10 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

Tabla 25. Características microscópicas de los aislados M2A11 al M2A15 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA cultivados a 25 °C durante 7 días.

Características	Aislados No.				
	M2A11	M2A12	M2A13	M2A14	M2A15
Hifas	M2A12	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada
Conidióforo					
a) Longitud ¹	271.50 – 579.30	166.90 – 762.40	155.20 – 565.6	265.80 – 512.20	311.50 -581.10
b) Diámetro ¹	4.70 – 13.60	6.50 – 13.40	6.50 -9.90	9.60 -14.90	7.30 – 14.90
c) Vesícula	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica
Conidio (µm)					
a) Cabeza	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica
b) Diámetro ¹	3.90 – 5.80	4.30 -6.40	4.30 – 6.60	4.10 -6.90	4.60 – 6.70
c) Ornamentación	Ligeramente rugosas	Rugosas con espículas	Rugosas con espículas	Rugosas con espículas	Rugosas con espículas
Fiálides	Directamente desde las vesículas	Directamente desde las vesículas	Directamente desde las vesículas	Directamente desde las vesículas	Directamente desde las vesículas
a) Primaria ¹	8.50 – 13.0	7.10 – 9.60	-	-	7.50 – 7.90
b) Secundaria ¹	Ausente	Ausente	-	-	Ausente

¹ µm, promedio de 30 medidas

En las Tablas 26 a 28 y Figuras 27 a 33 son descritas las características macroscópicas y microscópicas de los aislados M2A16 a M2A20. El color presentado en el centro de las colonias aisladas fue de verde, verde oliva y verde amarillo con borde blancos. El tamaño de las colonias estuvo entre 4.10 y 4.40 cm en MEA, 4.20 y 4.43 cm en CYA y YES y 2.27 y 2.60 en CREA. El margen fue entero y filiforme, con elevación umbunada y plana, textura umbunada y flocosa, fueron de crecimiento medio. No hubo producción de aflatoxinas, pero hubo presencia de esclerocios en las muestras M2A16 y M2A20 y de exudados en todas las muestras.

Con referencia a las características microscópicas, los conidióforo presentaron una longitud entre 170.90 y 663.60 µm, y un diámetro 1.90 a 16.30 µm. La vesícula fue de forma hemisférica y los conidios presentaron diámetro desde 3.40 a 5.90 µm, lisos y ligeramente rugosos. Hubo presencia de fiálides primarias con tamaño entre 7.30 y 10.90.

Tabla 26. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados M2A16 a M2A20 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M2A16 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.40 ± 0.10	4.43 ± 0.12	4.43 ± 0.21	2.27 ± 0.20
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbunado	Umbunado	Umbunado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M2A17 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde oscuro en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.27 ± 0.15	4.23 ± 0.31	4.37 ± 0.12	2.40 ± 0.10
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbunado	Umbunado	Umbunado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M2A18 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, marrón en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.27 ± 0.25	4.30 ± 0.10	4.23 ± 0.10	2.43 ± 0.12
	Margen	Filiforme	Entero	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbunado	Umbunado	Umbunado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	crecimiento medio	Crecimiento medio	crecimiento medio
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 27. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados M2A16 a M2A20 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M2A19 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, marrón en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.50 ± 0.10	4.23 ± 0.21	4.20 ± 0.17	2.33 ± 0.06
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbunado	Umbunado	Umbunado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M2A20 avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde-blanco en el centro.	Blanco en el borde, verde oscuro en el centro.	Blanco en el borde, marrón en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.10 ± 0.10	4.20 ± 0.20	4.30 ± 0.10	2.60 ± 0.10
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbunado	Umbunado	Umbunado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	crecimiento medio	Crecimiento medio	crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS



Figura 27. Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena (aislados Columna 1= M2A16 a Columna 5 = M2A20), cultivados en MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C por durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.

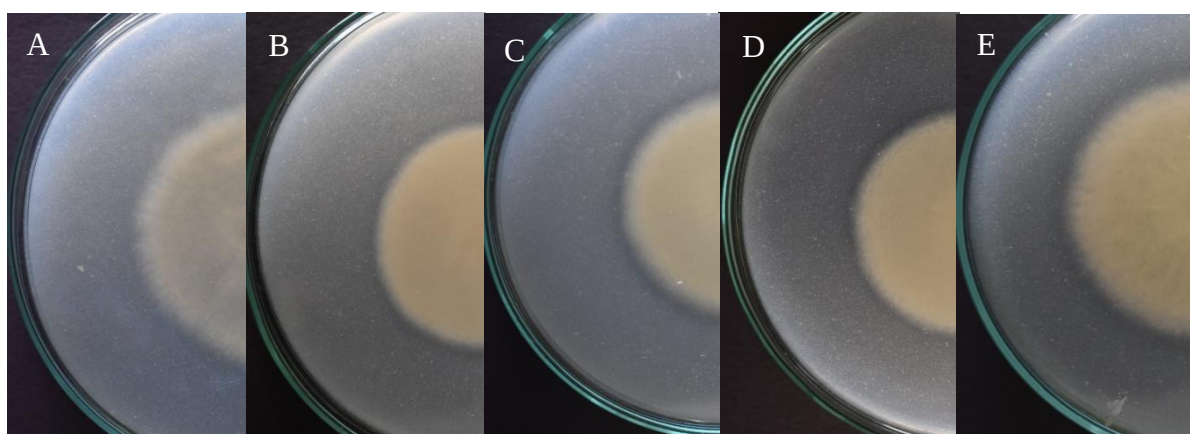


Figura 28. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M2A16. B. Aislado M2A17. C. Aislado M2A18. D. Aislado M2A19. E. Aislado M2A20. El color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxinas.

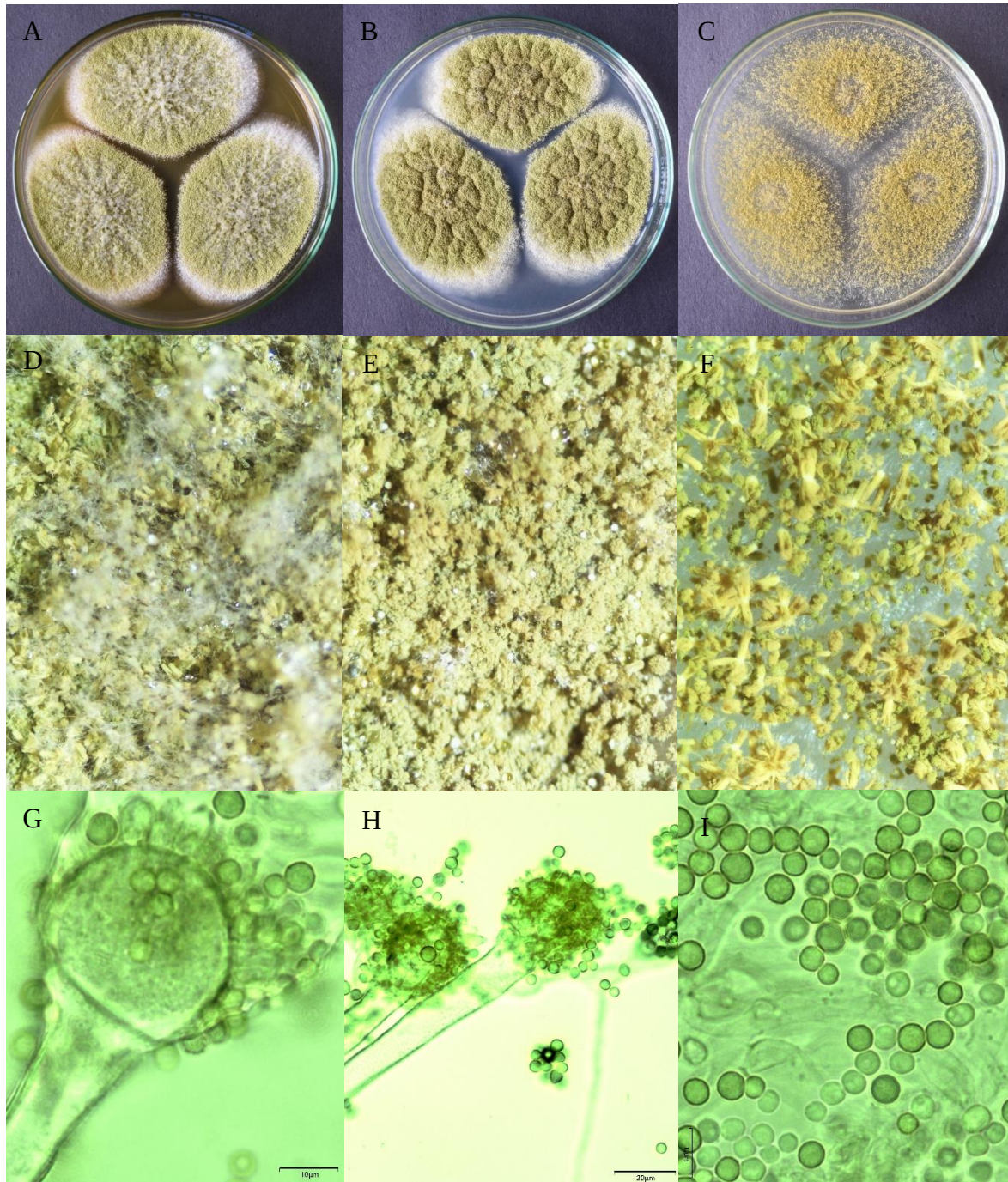


Figura 29. Colonias de aislado M2A16 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC por 7. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 10 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

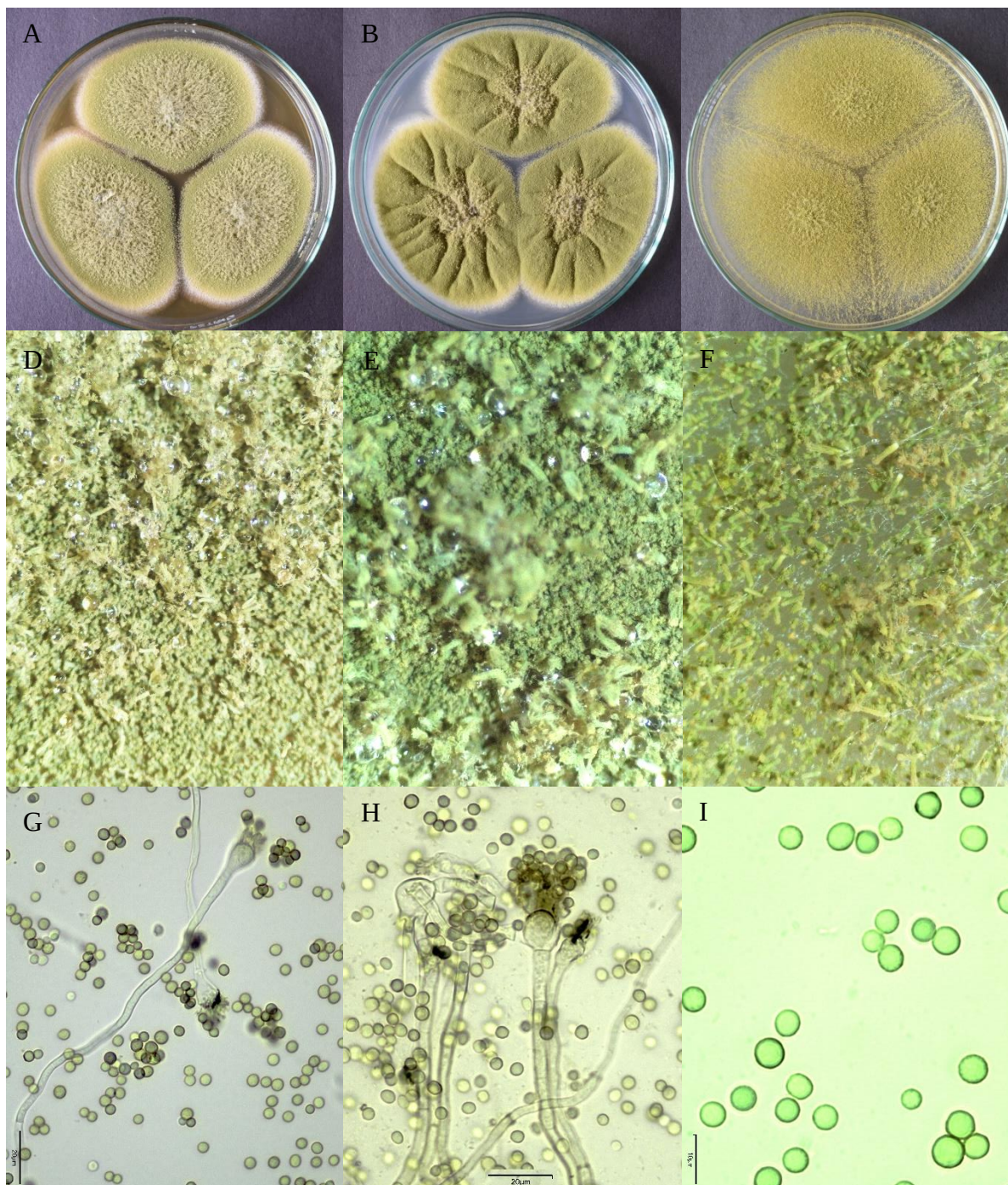


Figura 30. Colonias de aislado M2A17 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

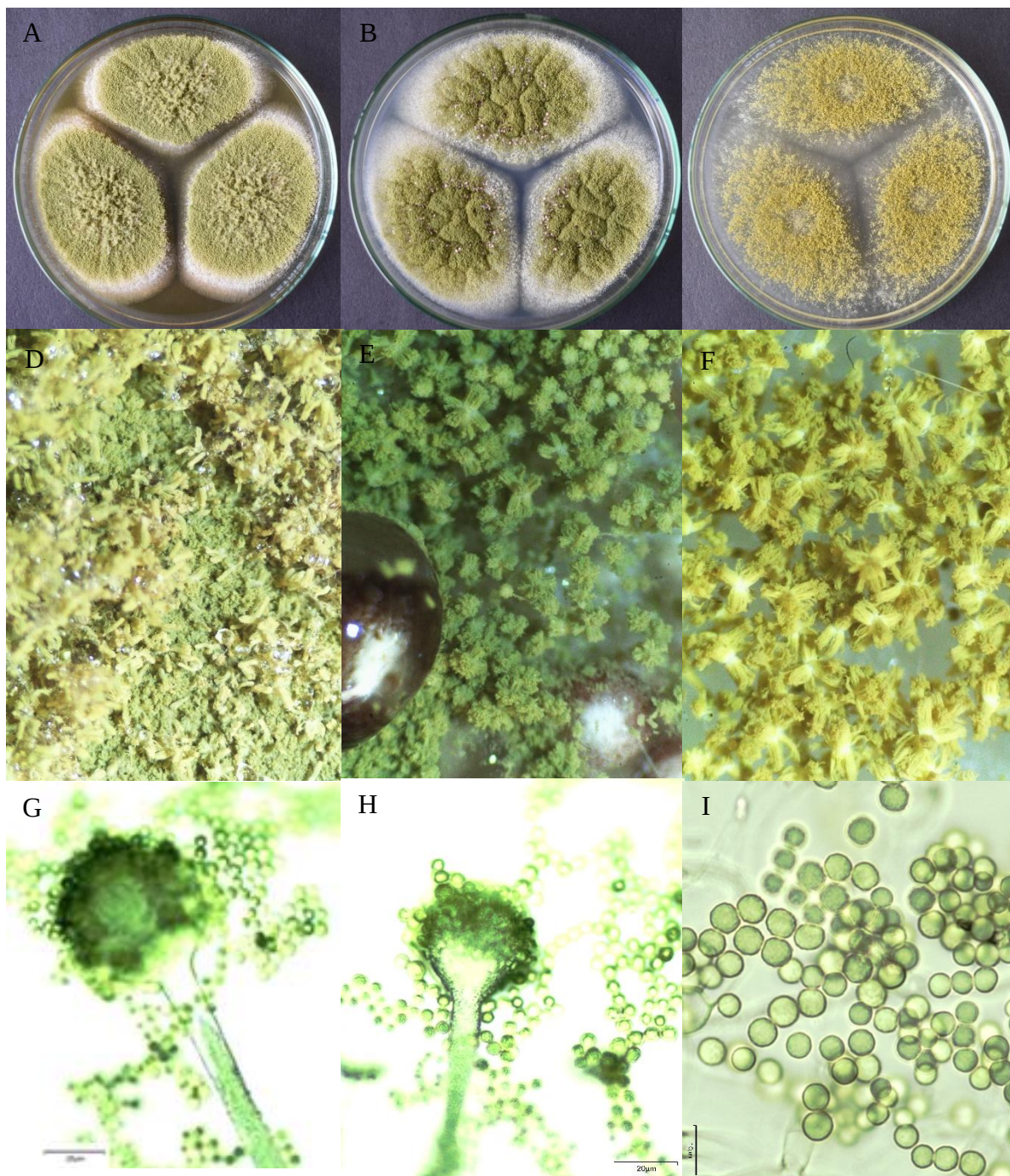


Figura 31. Colonias de aislado M2A18 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.

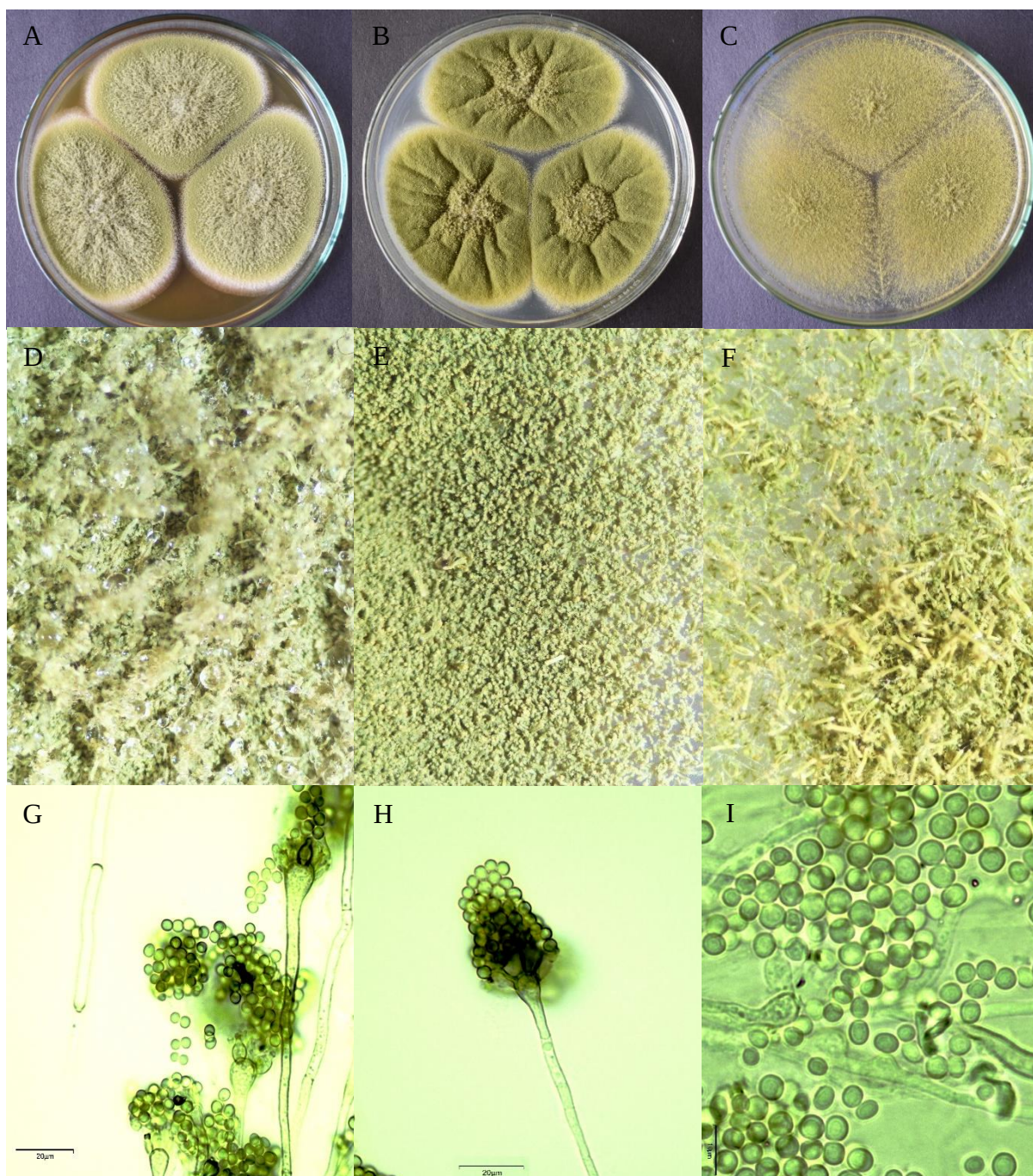


Figura 32. Colonias de aislado M2A19 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

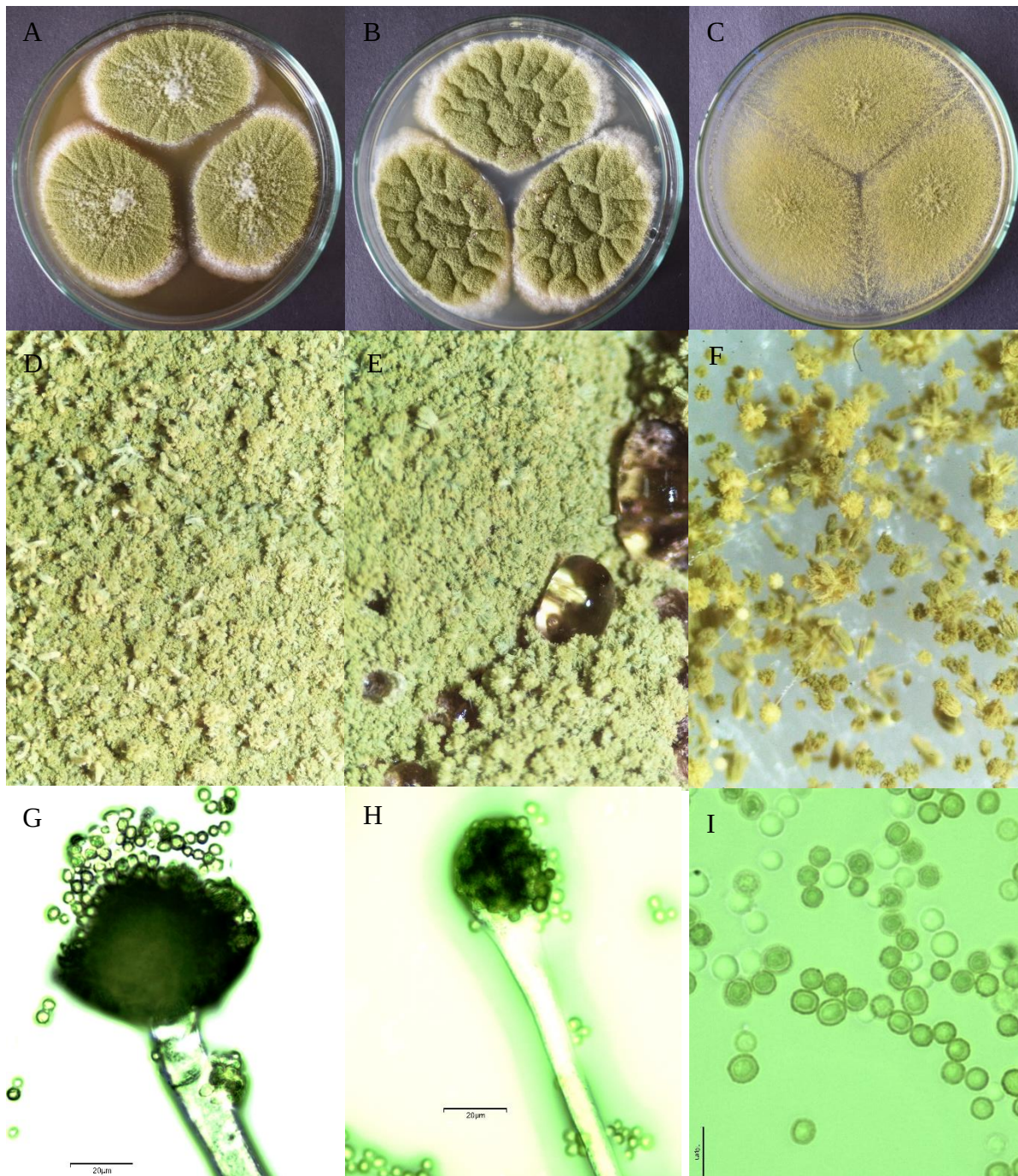


Figura 33. Colonias de aislado M2A20 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

Tabla 28. Características microscópicas de los aislados M2A16 a M2A20 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA cultivados a 25 °C durante 7 días.

Características	Aislados No.				
	M2A16	M2A17	M2A18	M2A19	M2A20
Hifas	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada
Conidióforo					
a) Longitud ¹	180.70 – 371.90	211.70 – 538.80	170.90 – 487.50	184.10 – 663.60.	228.80 – 637.20
b) Diámetro ¹	4.50 – 12.90	2.90 – 4.40	4.30 -10.60	1.90 -3.70	7.60 – 16.30
c) Vesícula	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica
Conidio (µm)					
a) Cabeza	Hemisférica	Columnar	Hemisférica	Columnar	Hemisférica
b) Diámetro ¹	4.10 -5.40	4.40 -5.70	4.30 – 5.60	3.40 – 5.90	3.50 -5.40
c) Ornamentación	Lisas	Lisas	Lisas	Lisas	Ligeramente rugosas
Fiálides	Directo desde la vesícula	Monoseriada	Directo desde la vesícula	Monoseriada	Directo desde la vesícula
a) Primaria ¹	-	9.10 – 9.60	-	7.30 – 10.90	-
b) Secundaria ¹	-	No existe	-	No existe	-

¹ µm, promedio de 30 medidas

En las Tablas 29 a 31 y Figuras 34 a 37 se muestran las características macroscópicas y microscópicas de los aislados M3A1 a M3A5. Las colonias presentaron un color verde oliva y verde amarillo en el centro, todas con bordes blancos. El tamaño fue de 3.86 a 4.20 cm en MEA, 4.01 a 4.20 cm en CYA, 4.06 y 4.43 cm en YES y 2.51 a 3.20 cm en CREA. El margen fue entero y filiforme, con elevación umbonada y plana, de crecimiento lento, textura flocosa y granulosa. Hubo producción de aflatoxinas en los aislados M3A2, M2A3 y M2A4, presencia de esclerocios en todos los aislados y exudados en MEA y CYA.

Los conidióforos presentaron una longitud de 100.50 a 581.70 µm y diámetro 2.40 a 13.30 µm. La forma de la vesícula fue globosa y subglobosa, al igual que la cabeza del conidio. Estos últimos presentaron un tamaño de 3.50 a 6.40 µm, fueron poliédricos y rugosos con espículas. Presentaron fiálides primarias con un tamaño entre 3.90 a 7.90 µm, y no hubo presencia de métulas.

Tabla 29. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 3 de trigo en MEA, CYA, YES, CREA Y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M3A1 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.17 ± 0.15	4.14 ± 0.12	4.23 ± 0.19	3.20 ± 0.15
	Margen	Entero	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	Sí hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M3A2 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva con puntos marrones en el centro.	Blanco en el borde, verde con puntos negros y blancos en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva con puntos marrones en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.
	Tamaño de la colonia ¹	3.86 ± 0.23	4.10 ± 0.20	4.23 ± 0.18	2.51 ± 0.24
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Pequeñas hifas
	Exudados	Si hay presencia	Sí hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M3A3 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blancos en el centro.	Blanco amarillento en el borde, verde en el centro	Amarillo verdoso en el borde, crema en el centro.	Gris
	Tamaño de la colonia ¹	4.03 ± 0.29	4.01 ± 0.28	4.06 ± 0.36	2.66 ± 0.48
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 30. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 3 de trigo en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M3A4 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva con puntos marrones y blancos en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.
	Tamaño de la colonia ¹	4.05 ± 0.35	4.14 ± 0.27	4.15 ± 0.24	2.72 ± 0.24
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M3A5 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blancos en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blancos en el centro.	Verde oliva en el borde y centro, puntos blancos en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.
	Tamaño de la colonia ¹	4.20 ± 0.17	4.20 ± 0.17	4.43 ± 0.29	3.20 ± 0.47
	Margen	Filiforme	Filiforme	Entero	Filamentoso
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Flocoso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

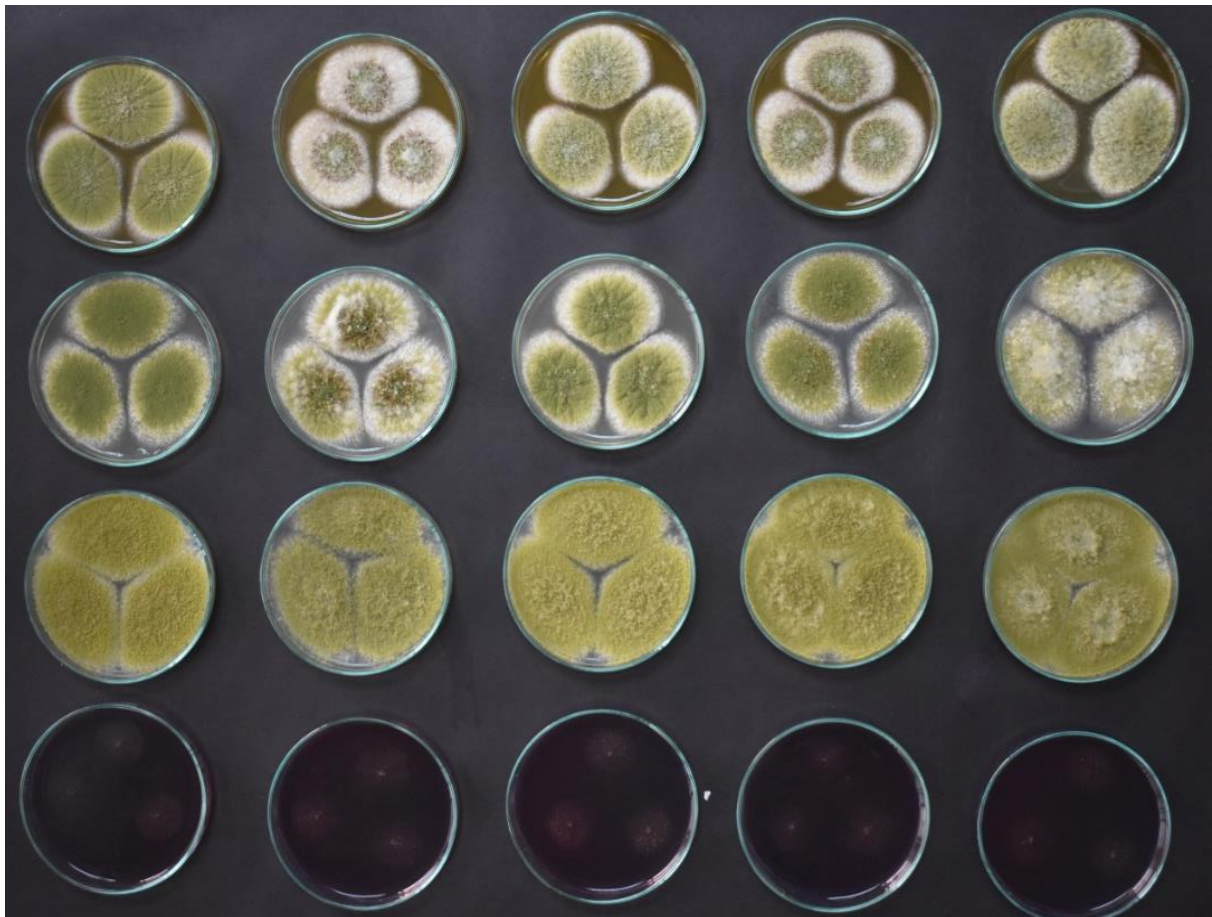


Figura 34. Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 3, trigo (columna 1= M3A1, columna 2 = M3A2, columna 3 = M3A3, columna 4 = M3A4 y columna 5 = M3A5), cultivados a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.

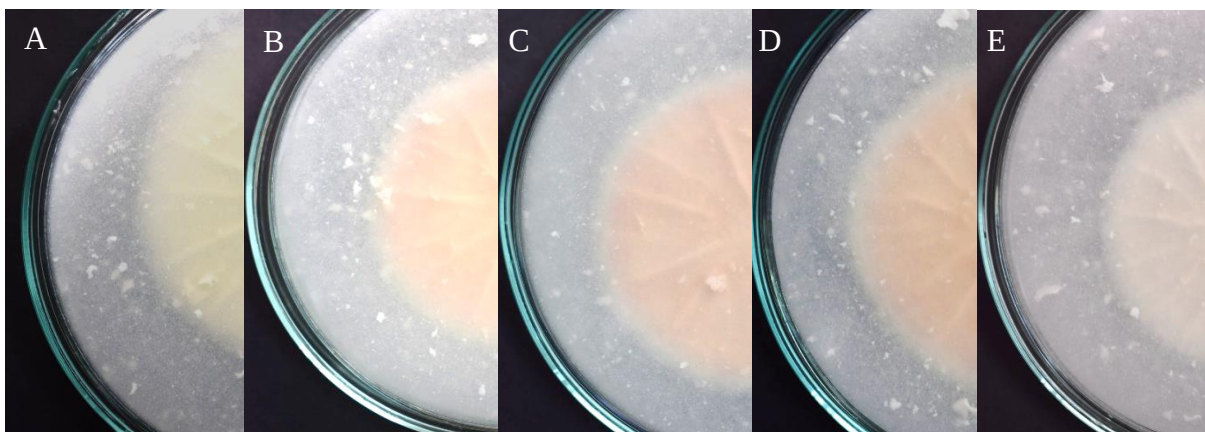


Figura 35. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 3 de trigo, cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M3A1. B. Aislado M3A2. C. Aislado M3A3. D. Aislado M3A4. E. Aislado M3A5. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxina.

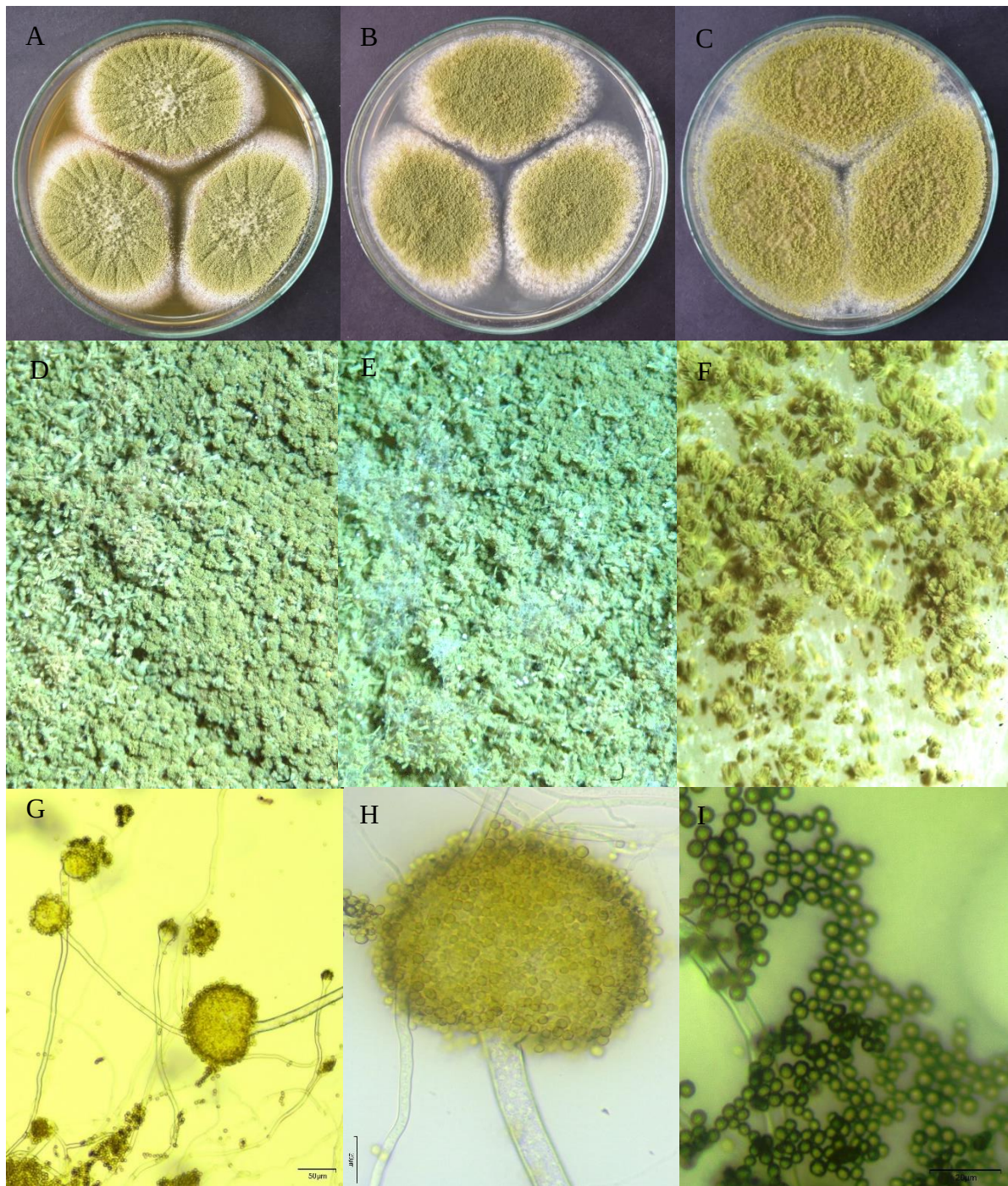


Figura 36. Colonias de aislado M3A1 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 μm. H-I barra 20 μm.

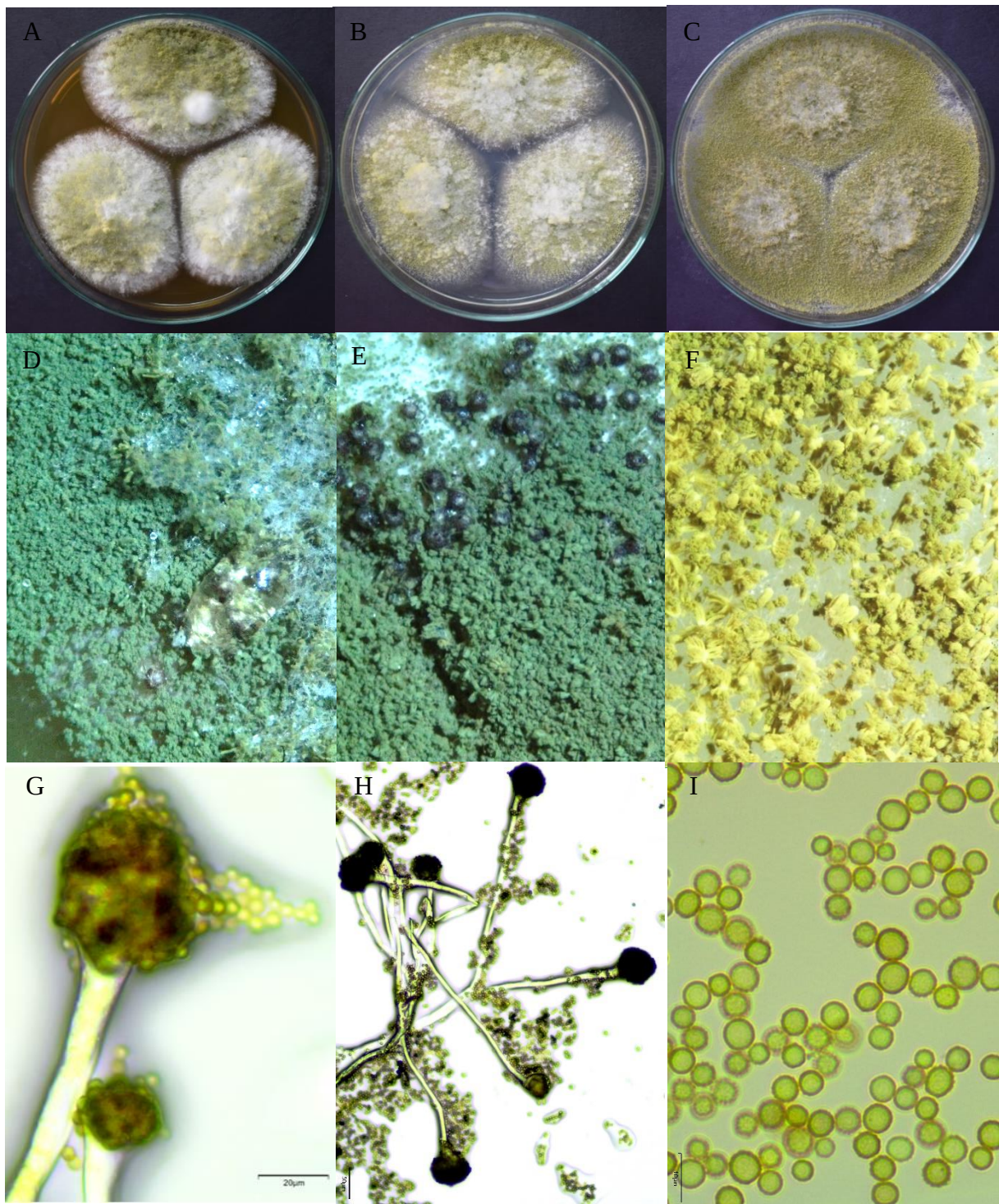


Figura 37. Colonias de aislado M3A5 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 50 µm. I barra 20 µm.

Tabla 31. Características microscópicas de los aislados A1 y A5 provenientes de la muestra 3 de trigo en MEA cultivados a 25 °C por 7 días.

Características	Aislados No.	
	A1	A5
Hifas	Ramificada septada	Ramificada septada
Conidióforo		
a) Longitud ¹	100.50 – 581.70	150.90 – 435.60
b) Diámetro ¹	6.50 – 13.30	2.40 – 10.30
c) Vesícula	Globoso-subgloboso	Subgloboso
Conidio		
a) Cabeza	Subgloboso de color verdoso	Globoso de color verdoso
b) Diámetro (µm)	3.50 – 5.80	3.70- 6.40
c) Ornamentación	Poliédricas, rugosas con espículas	Rugosas con espículas
Fiálides	Monoseriada cubriendo la parte superior de la vesícula	Monoseriada cubriendo la parte superior de la vesícula
a) Primaria ¹	3.90 – 6.50	5.80 – 7.90
b) Secundaria ¹	Ausente	Ausente

¹ µm, promedio de 30 medidas

En las Tablas 32 a 34 y Figuras 38-41 son mostradas las características macroscópicas y microscópicas de los aislados M3A6 a M3A11. El color presentado en el centro de las colonias fue verde olivo y verde amarillo con bordes blancos. El tamaño de las colonias estuvo entre 3.90 a 4.41 cm en MEA, 3.98 a 4.22 cm en CYA, 4.14 a 4,50 en YES, 2.58 a 3,44 en CREA. El margen fue filiforme, con elevación umbonada y plana, textura granulosa y flocosa, de crecimiento medio. Hubo producción de aflatoxinas en los aislados M3A6, M3A7, M3A9 y M3A11, presencia de esclerocios y exudado en todos los aislados.

Presentaron hifas ramificadas y septadas, conidióforo de longitud entre 185.30 y 605.00, diámetro 2.40 y 10.50. Los conidios fueron rugosos con espículas y las fiálides monoseriadas cubriendo las 3/4 parte superior de la vesícula, con un tamaño entre 2.70 y 9.70 µm.

Tabla 32. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A6 a A11 provenientes de la muestra 3 de trigo en MEA, CYA, YES, CREA Y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M3A6 trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.90 ± 0.25	3.98 ± 0.21	4.14 ± 0.25	2.58 ± 0.12
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M3A7 trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blancos y marrones en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.21 ± 0.23	4.13 ± 0.18	4.50 ± 0.20	3.44 ± 0.13
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Flocoso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M3A8 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.18 ± 0.22	4.17 ± 0.21	4.45 ± 0.10	3.25 ± 0.17
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	no hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Flocoso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 33. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A6 a A11 provenientes de la muestra 3 de trigo en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
	Color de la superficie	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
M3A9 trigo	Tamaño de la colonia¹	4.22 ± 0.23	4.22 ± 0.22	4.30 ± 0.12	3.23 ± 0.15
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Flocoso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
M3A10 trigo	Tamaño de la colonia¹	4.41 ± 0.62	4.13 ± 0.18	4.35 ± 0.21	3.40 ± 0.20
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filamentoso	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva con puntos marrones en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
M3A11 Trigo	Tamaño de la colonia¹	4.25 ± 0.22	4.13 ± 0.18	4.21 13 ± 0.22	3.44 ± 0,3
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS



Figura 38. Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 3, trigo (columna 1= M3A6, columna 2 = M3A7, columna 3 = M3A8, columna 4 = M3A9, columna 5 = M3A10 y columna 6 = M3A11 cultivados en MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.

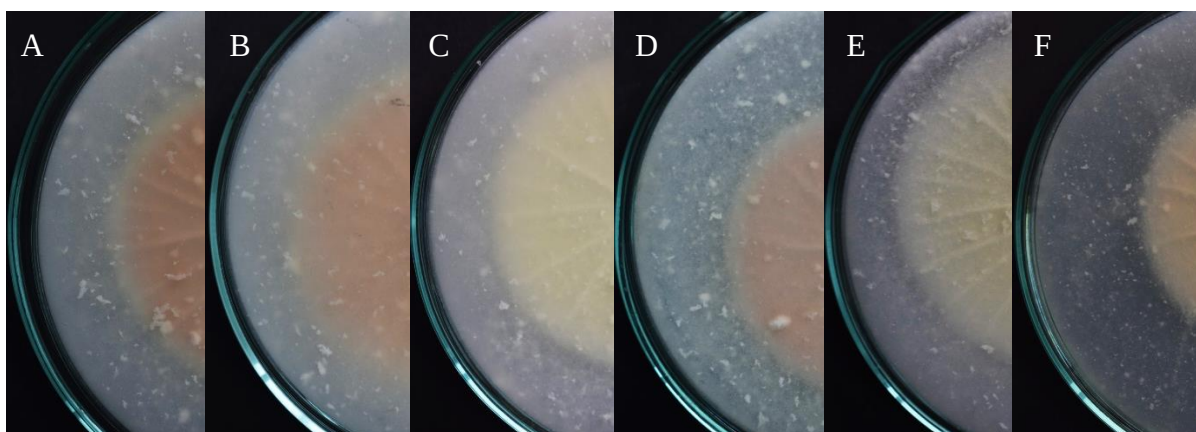


Figura 39. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 3 de trigo, cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M3A6. B. Aislado M3A7. C. Aislado M3A8. D. Aislado M3A9. E. Aislado M3A10. F. Aislado M3A11. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxina.

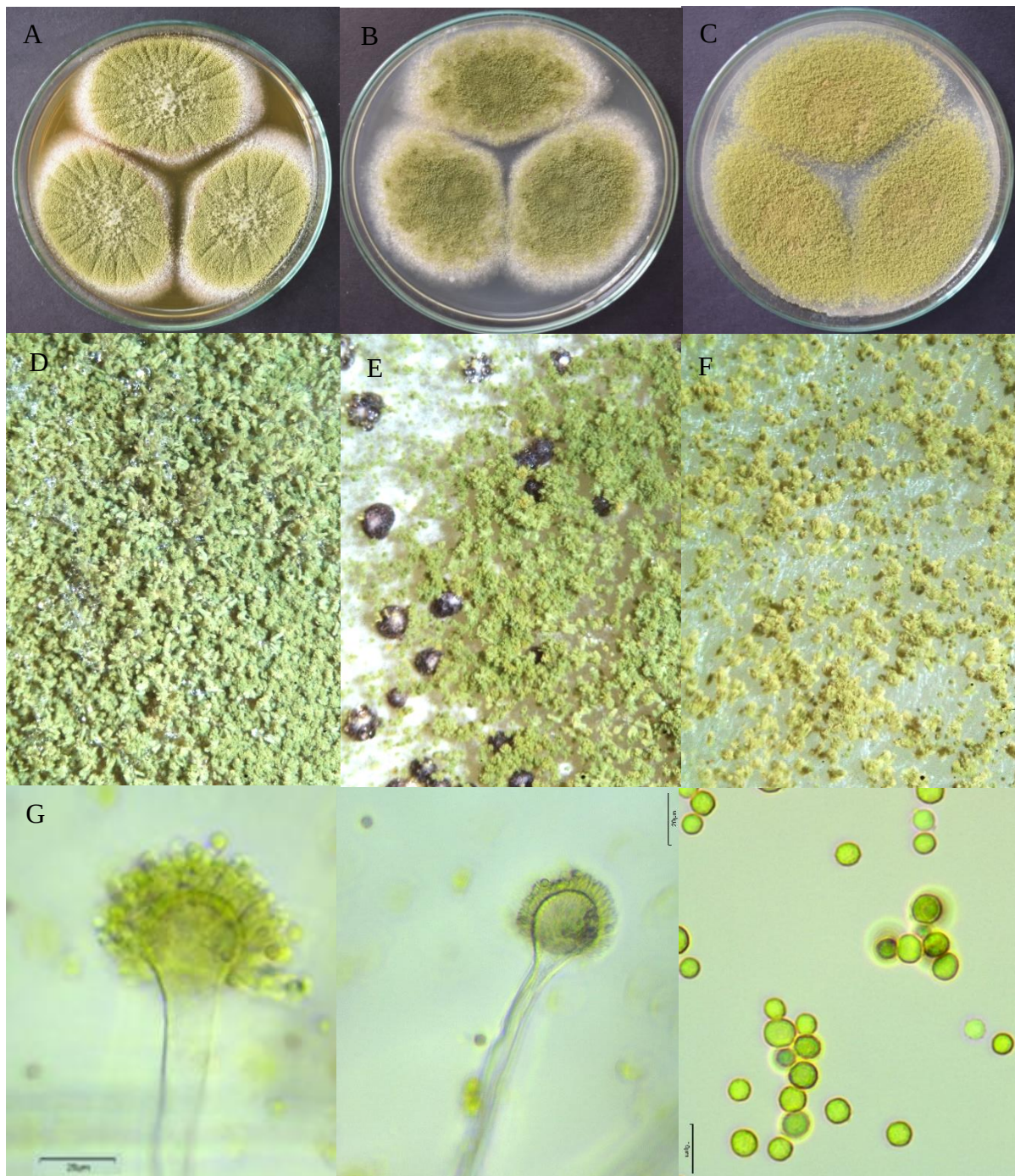


Figura 40. Colonias de aislado M3A8 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

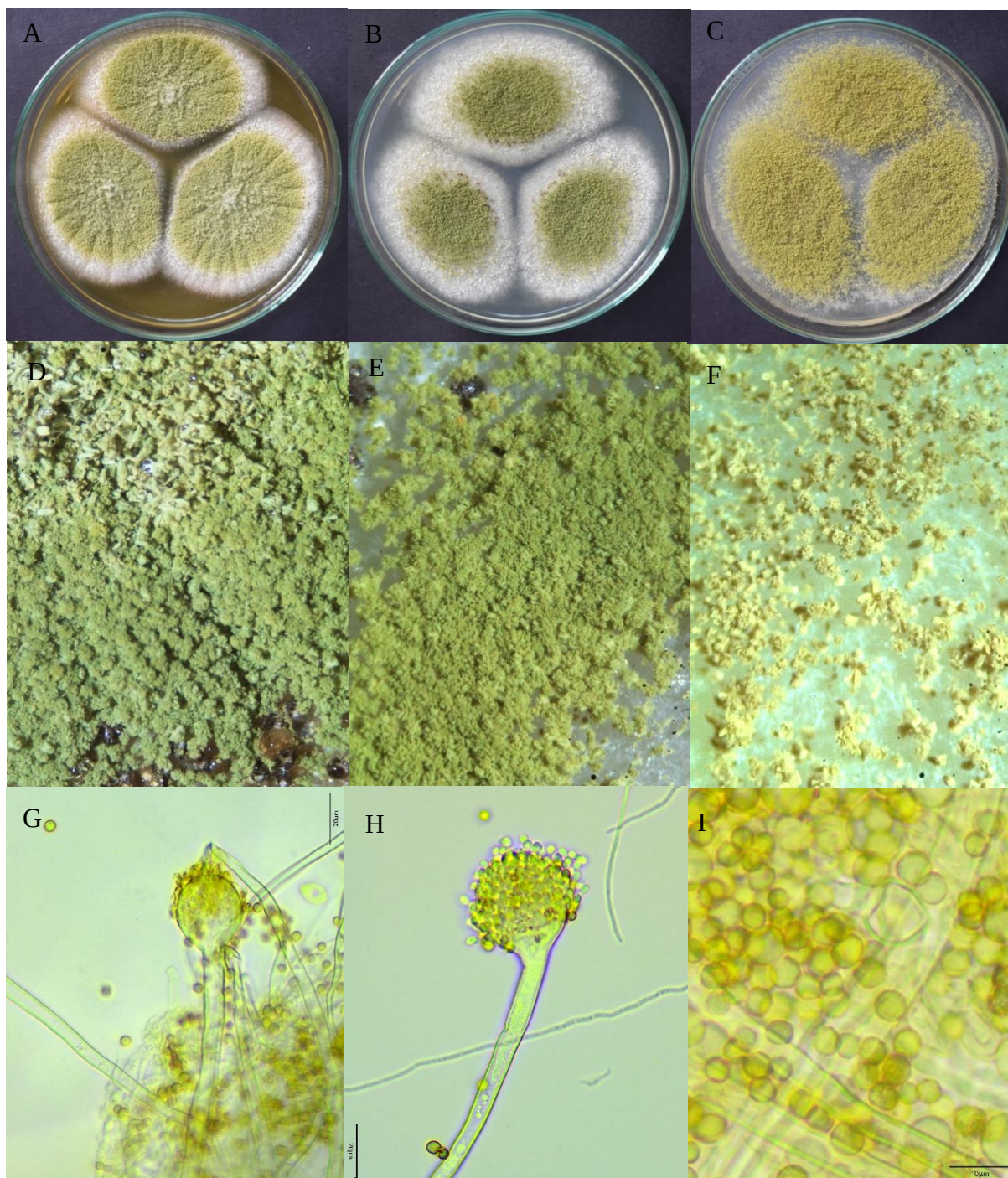


Figura 41. Colonias de aislado M3A10 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.

Tabla 34. Características microscópicas de los aislados A6 a A11 provenientes de la muestra 3 de trigo en MEA cultivados a 25 °C durante 7 días.

Características	Aislados No.	
	A8	A10
Hifas	Ramificada septada	Ramificada septada
Conidióforo		
a) Longitud ¹	336.50 – 528.50	185.30 – 605.00
b) Diámetro ¹	2.40 – 8.70	7.00 – 10.50
c) Vesícula	subgloboso	Subgloboso
Conidio		
a) Cabeza	Hemisférica de color verdoso	Hemisférica de color verdoso
b) Diámetro (µm)	3.50 – 5.50	3.90 – 6.10
c) Ornamentación	Rugosas con espículas	Rugosas con espículas
Fiálides	Monoseriada cubriendo la ¾ parte superior de la vesícula	Monoseriada cubriendo la ¾ parte superior de la vesícula
a) Primaria ¹	6.30 – 9.70	2.70 – 8.40
b) Secundaria ¹	Ausente	Ausente

¹ µm, promedio de 30 medidas

En las Tablas 35 a 37 y Figuras 42-46 se muestran las características macroscópicas y microscópicas de los aislados M5A1 a M5A5. El color presentado en el centro de las colonias fue verde oliva y verde amarillo, con bordes blancos. El tamaño de las colonias estuvo entre 3.71 y 3.97 cm en agar MEA, 3.88 y 4.15 cm en agar CYA, 4.06 y 4,30 en agar YES y 2.20 a 3,26 cm en agar CREA. Presentaron margen entero y filiforme, elevación umbonada y plana, textura granulosa y flocosa, y crecimiento medio. Hubo producción de aflatoxinas en los aislados M5A1 y M5A4, presencia de esclerocios en todos los aislados y ausencia de exudados en el aislado M5A3.

Dentro de las características microscópicas presentaron hifas ramificadas y septadas, con conidióforo de longitud entre 219.70 y 2055.90 µm y un diámetro 2.50 y 27.50 µm. Los conidios fueron rugosos con espículas y las fiálides monoseriadas cubriendo la parte superior de la vesícula, con un tamaño entre 8.10 y 15.20 µm.

Tabla 35. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 5 de trigo y arroz en MEA, CYA, YES, CREA Y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M5A1 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.90 ± 0.12	3.93 ± 0.14	4.30 ± 0.17	2.20 ± 0.26
	Margen	Entero	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbunado	Umbunado	Umbunado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	No hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M5A2 Arroz	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.97 ± 0.18	4.12 ± 0.22	4.06 ± 0.22	3.17 ± 0.26
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	no hay presencia
M5A3 Arroz	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.97 ± 0.32	4.15 ± 0.19	4.23 ± 0.22	3.10 ± 0.22
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbunado	Plano	Umbunado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 36. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 al A5 provenientes de la muestra 5 de trigo y arroz en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M5A4 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.71 ± 0.25	4.08 ± 0.26	4.12 ± 0.25	2.39 ± 0.31
	Margen	Entero	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Plano	Plano	Plano	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	No hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M5A5 Arroz	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.97 ± 0.28	3.88 ± 0.28	4.30 ± 0.22	3.26 ± 0.21
	Margen	Filiforme	Filiforme	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS



Figura 42. Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 5 de Arroz (columna 1= M5A1, columna 2 = M5A2, columna 3 = M5A3, columna 4 = M5A4, columna 5 = M5A5), cultivados en MEA, CYA, YES y CREA a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.

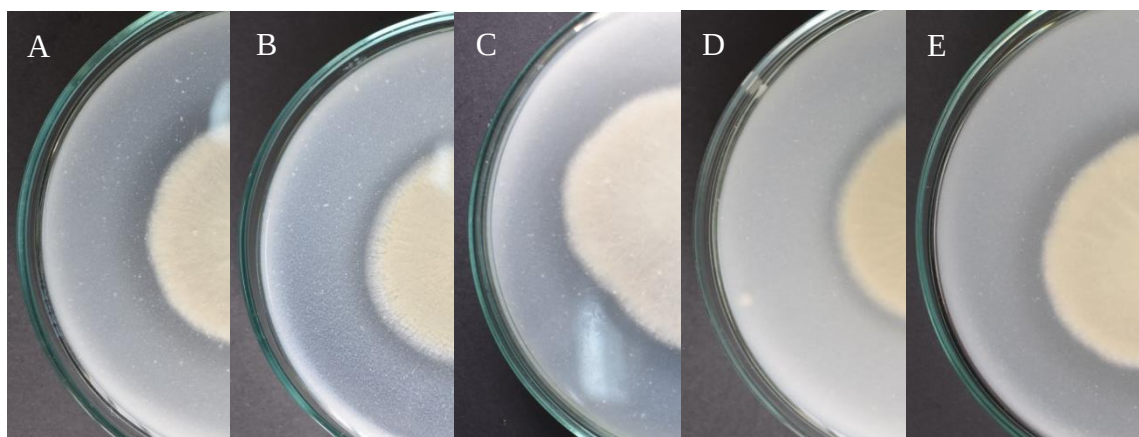


Figura 43. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 5 de arroz, cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M5A1. B. Aislado M5A2. C. Aislado M5A3. D. Aislado M5A4. E. Aislado M5A5. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxina que se encuentran en los aislados A. Aislado M5A1 y D. Aislado M5A5.

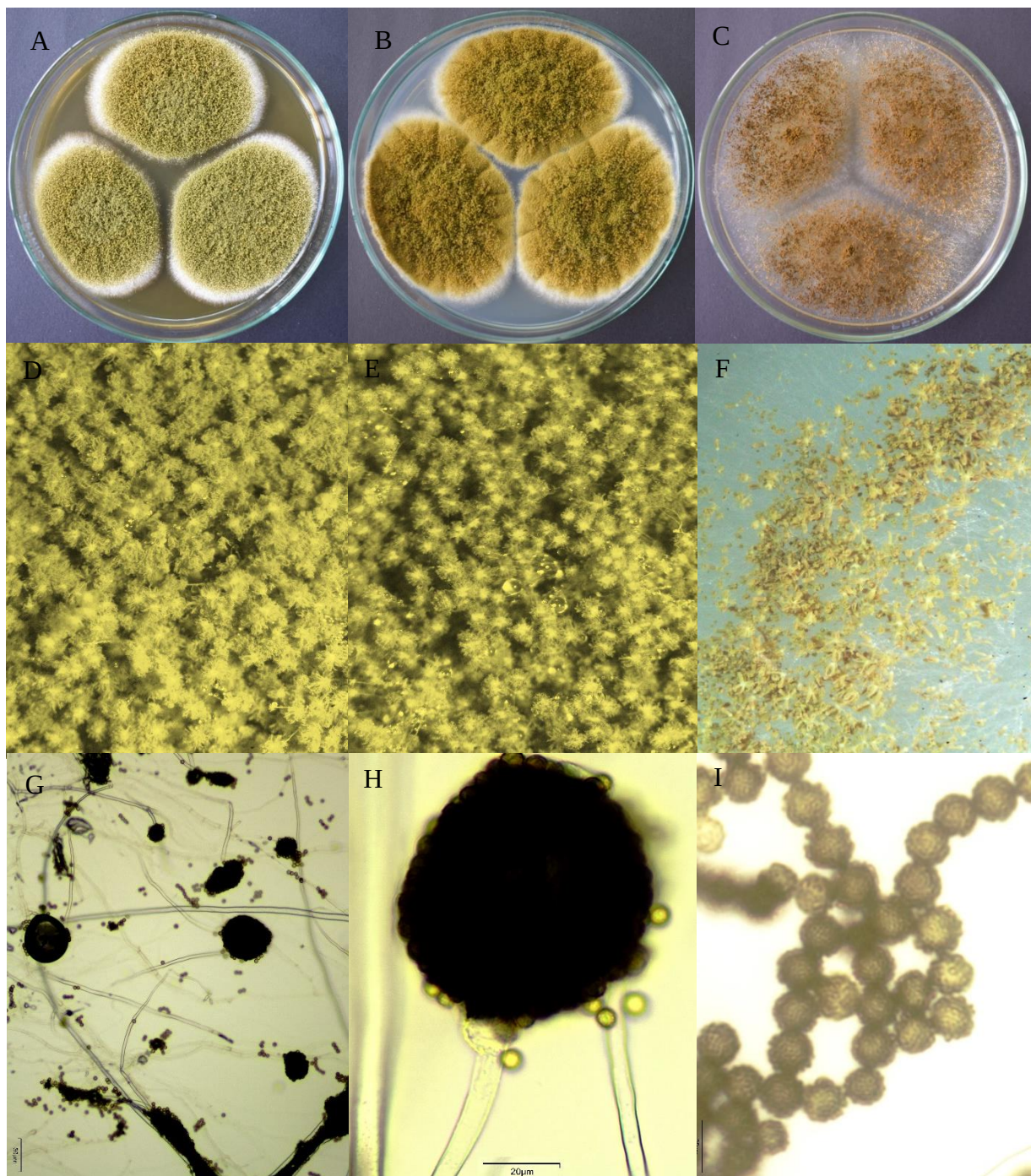


Figura 44. Colonias de aislado M5A2 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 50 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm

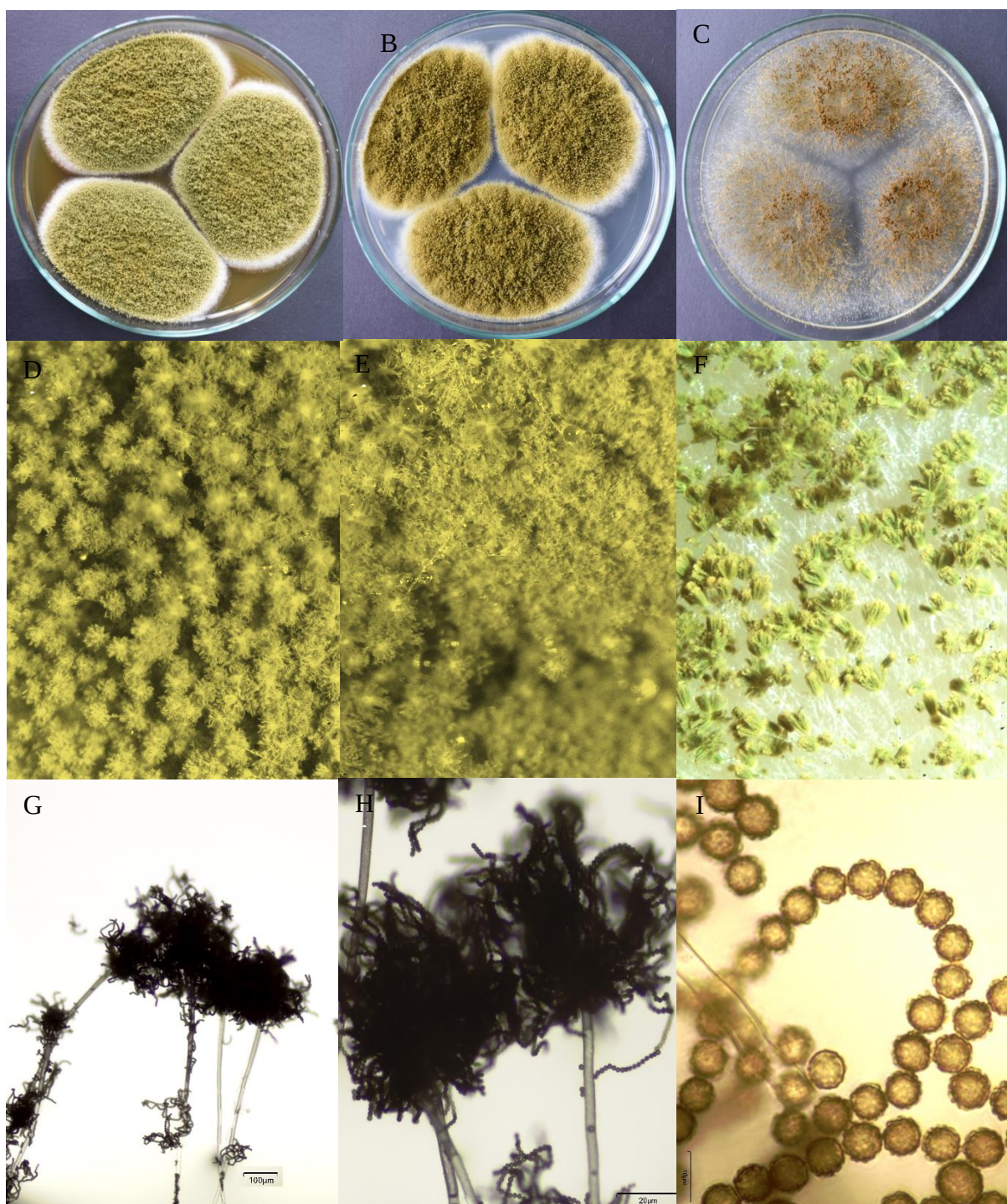


Figura 45. Colonias de aislado M5A3 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 100 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.

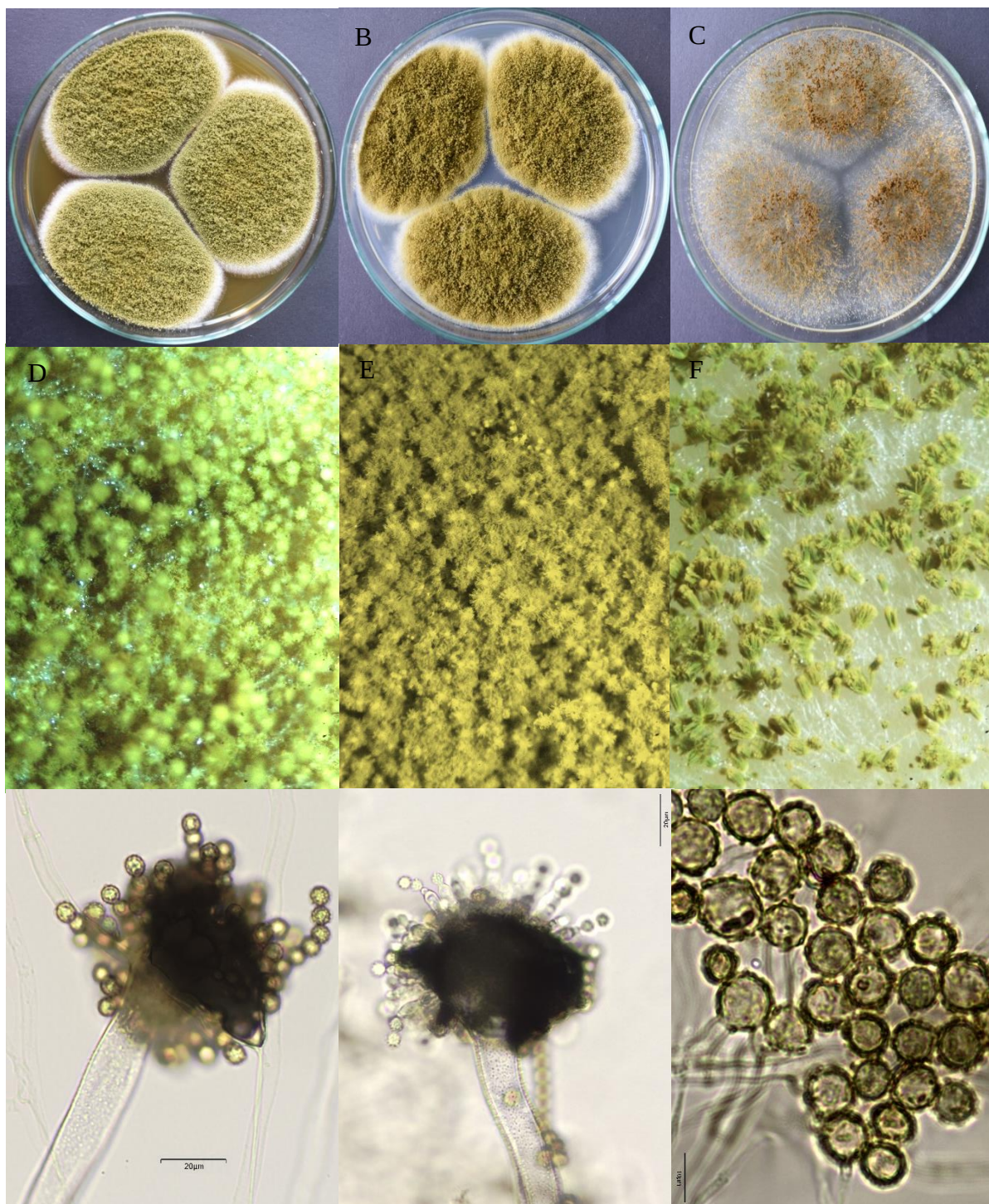


Figura 46. Colonias de aislado M5A5 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en agar MEA. G barra 20 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.

Tabla 37. Características microscópicas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 5 de arroz en MEA cultivados a 25 °C por 7 días.

Características	Aislados No.		
	A2	A3	A5
Hifas	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada
Conidióforo			
a) Longitud ¹	243.70 – 1387.70	562.10 – 2055.90	219.70 – 1647.10
b) Diámetro ¹	4.50 – 11.2	5.30 – 27.50	3.50 – 14.50
c) Vesícula	Globoso	Columnar	Hemisférica
Conidio			
a) Cabeza	Globoso de color verde y columnar de color marrón oscuro	Columnar de color marrón oscuro	Columnar de color marrón oscuro
b) Diámetro ¹	6.70 – 9.20	6.50 – 7.20	6.10 – 12.10
c) Ornamentación	Rugosa con espículas	Rugosa con espículas	Rugosas con espículas
Fiálides	Monoseriada cubriendo la parte superior de la vesícula	Monoseriada cubriendo la parte superior de la vesícula	Monoseriada cubriendo la parte superior de la vesícula
a) Primaria ¹	-	-	8.10 – 15.20
b) Secundaria ¹	-	-	Ausente

¹ µm, promedio de 30 medidas

En las Tablas 38 a 40 y Figuras 47 a 49 se presentan las características macroscópicas y microscópicas de los aislados M6A1 a M6A5. El color que presentaron las colonias en el centro fue verde oliva, verde oliva con puntos blancos y verde amarillo con bordes blancos, el tamaño de las colonias estuvo entre 3.92 y 4.20 cm en MEA, 4.06 y 4.27 cm en CYA, 3.94 y 4.18 en YES, 2.40 y 2.73 cm en CREA. El margen fue entero y filiforme, elevación umbonada y plana, textura granulosa y flocosa y de crecimiento medio. Hubo producción de aflatoxinas en los aislados M6A2 y M6A3, ausencia de esclerocios en el aislado M6A5 y producción de exudado presente en todos los aislados.

Entre las características microscópicas, presentaron hifas ramificadas y septadas, con conidióforo de longitud entre 124.00 y 2645.20 µm y un diámetro entre 3.80 y 14.70 µm. Los conidios presentaron un diámetro entre 3.80 y 6.10 µm y fueron lisos y rugosos. Las fiálides monoseriadas se desprendieron directamente desde la vesícula, cubriendo la parte superior, con un tamaño entre 3.40 y 12.40 µm

Tabla 38. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A2 a A5 provenientes de la muestra 6 de trigo y avena en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M6A1 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blancos en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blanco en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.92 ± 0.19	4.06 ± 0.19	3.94 ± 0.20	2.73 ± 0.19
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema con puntos marrones	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Flocoso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M6A2 trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blancos en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blanco en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.20 ± 0.17	4.14 ± 0.35	4.17 ± 0.16	2.57 ± 0.14
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema con puntos marrones	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbunado	Umbonado	Umbunado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Flocoso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M6A3 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blancos en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blanco en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.07 ± 0.20	4.06 ± 0.14	4.18 ± 0.16	2.64 ± 0.11
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema con puntos marrones	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbunado	Umbonado	Umbunado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Flocoso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 39. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 a A5 provenientes de la muestra 6 de trigo y avena en MEA, CYA, YES y CREA cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M6A5 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva con punto blanco en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva con punto blanco en el centro.	Verde en el borde, verde claro en el centro.	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.10 ± 0.29	4.27 ± 0.26	4.13 ± 0.17	2.40 ± 0.14
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema con puntos marrones	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbunado	Umbunado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Flocoso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

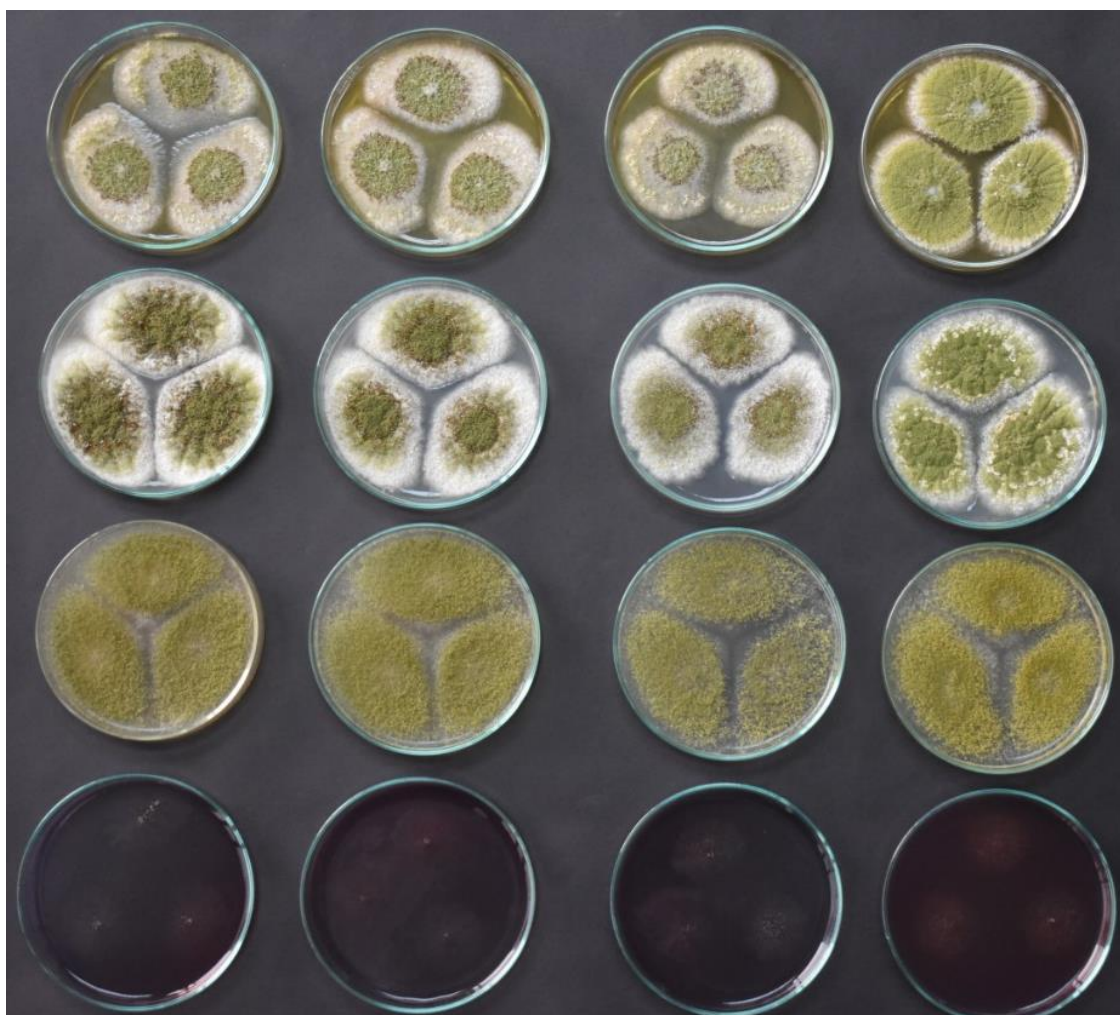


Figura 47. Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 6 de arroz (columna 1 = M6A2, columna 2 = M6A3, columna 3 = M6A4 y columna 4 = M6A5), cultivados a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.

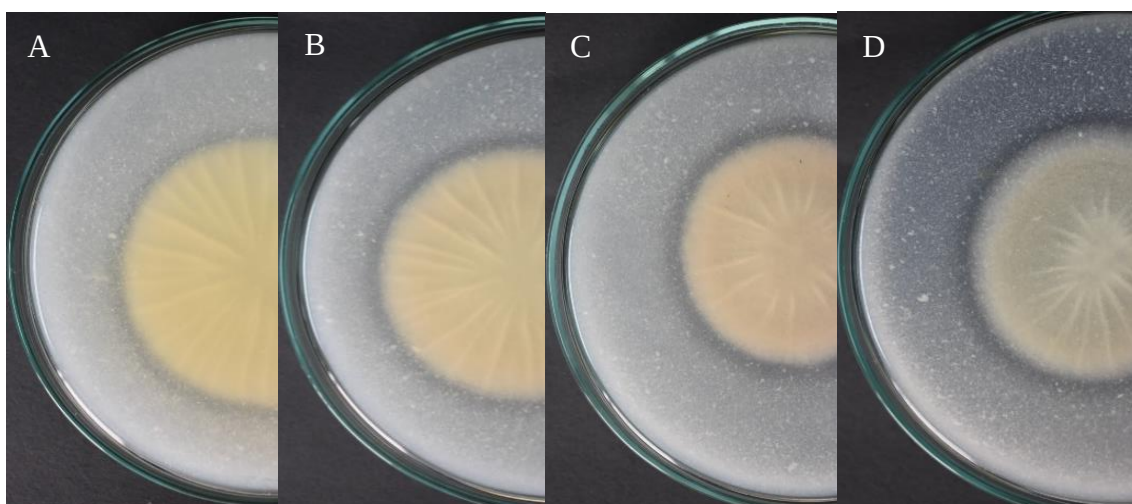


Figura 48. Producción de aflatoxina por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 6 de arroz (aislados 2 al 5), cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M6A2. B. Aislado M6A3. C. Aislado M6A4. D. Aislado M6A5. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxina

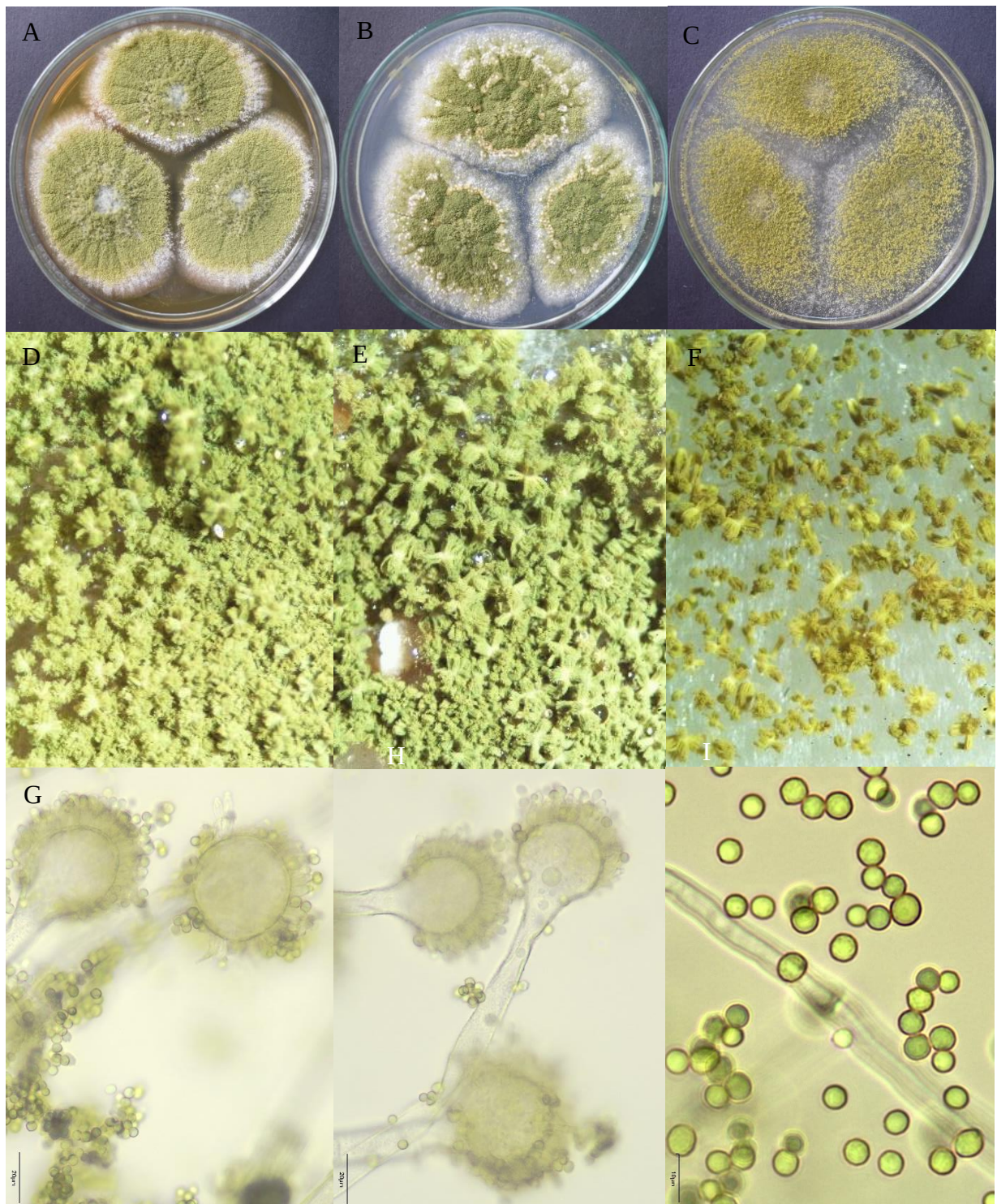


Figura 49. Colonias de aislado M6A5 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-F. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. G, H barra de 20 μm, I barra de 10 μm. Conidióforo y conidios cultivados en agar MEA.

Tabla 40. Características microscópicas de los aislados A1 al A5 provenientes de la muestra 6 de avena en MEA cultivados a 25 °C por 7 días.

Características	Aislados No.
	A5
Hifas	Ramificada septada
Conidióforo	
a) Longitud ¹	4.00 – 2645.20
b) Diámetro ¹	7.60 – 14.70
c) Vesícula	Globoso
Conidio (µm)	
a) Cabeza	Hemisférica
b) Diámetro ¹	3.30 – 6.10
c) Ornamentación	Lisas
Fiálides	Directamente desde la vesícula y cubriendo la parte superior.
a) Primaria ¹	6.70 – 12.40
b) Secundaria ¹	Ausente

¹ µm, promedio de 30 medidas

En las Tablas 41 a 43 y Figuras 50 a 57 se muestran las características macroscópicas y microscópicas de los aislados A1, A2 y A3 de la muestra 7 de trigo, así como de los aislados A1 al A3 de la muestra 10 de arroz y avena. El color en el centro de las colonias fue verde oliva y verde amarillo, con bordes blancos. El tamaño de las colonias estuvo entre 3.81 y 4.05 cm en MEA, 3.96 y 4.11 cm en CYA, 3.85 y 4.15 en YES y 2.61 y 3.32 cm en CREA. El margen fue entero y filiforme, con elevación umbonada, umbunada, verrugoso, plana, cerebriforme y crateriforme, textura granulosa y flocosa, de crecimiento medio. No hubo producción de aflatoxinas, pero se observó la presencia de exudado en todos los aislados y esclerocios en los aislados M7A2 y M7A3.

Entre las características microscópicas, presentaron hifas ramificadas y septadas, con conidióforo de longitud entre 114.10 y 1268.40 µm y diámetro entre 3.30 y 12.50 µm. Los conidios fueron de forma globosa, hemisférica y columnar, rugosas, ligeramente lisos y rugosos, con un diámetro entre 3.30 y 7.70 µm. Las fiálides monoseriadas se desprendieron directamente desde la vesícula.

Tabla 41. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1, A2 y A3 provenientes de la muestra 7 de trigo y aislados A1 al A3 provenientes de la muestra 10 de arroz y avena, en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M7A1 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blanco en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia¹	4.14 ± 0.21	3.96 ± 0.47	3.98 ± 0.33	2.61 ± 0.09
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Plano	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granular	Granular	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M7A2 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blanco en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia¹	4.05 ± 0.24	4.11 ± 0.28	4.15 ± 0.28	2.76 ± 0.24
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema anaranjada	Crema	Amarillo pálido	Gris
	Elevación	Umbonado verrugoso	Cerebriforme Umbonado	Crateriforme	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	no hay presencia	no hay presencia
M7A3 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blanco y marrones en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia¹	3.81 ± 0.26	4.11 ± 0.26	3.86 ± 0.29	2.66 ± 0.16
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Plano	Umbonado	Umbonado
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Granuloso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 42. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1, A2 y A4 provenientes de la muestra 7 de Trigo y aislados A1 al A3 provenientes de la muestra 10 de arroz y avena, en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M10A1 Arroz	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.97 ± 0.29	4.02 ± 0.29	4.08 ± 0.26	3.42 ± 0.28
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M10A2 Avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.86 ± 0.20	4.01 ± 0,24	4.06 ± 0.22	3.20 ± 0.18
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M10A3 avena	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.83 ± 0.21	4.11 ± 0.17	3.85 ± 0.39	3.32 ± 0.13
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS



Figura 50. Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 7 y 10 de trigo y avena (columna 1= M7A1, columna 2 = M7A2, columna 3 = M7A3, columna 4 = M10A1, columna 5 = M10A2, columna 6 = M10A3), cultivados a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.

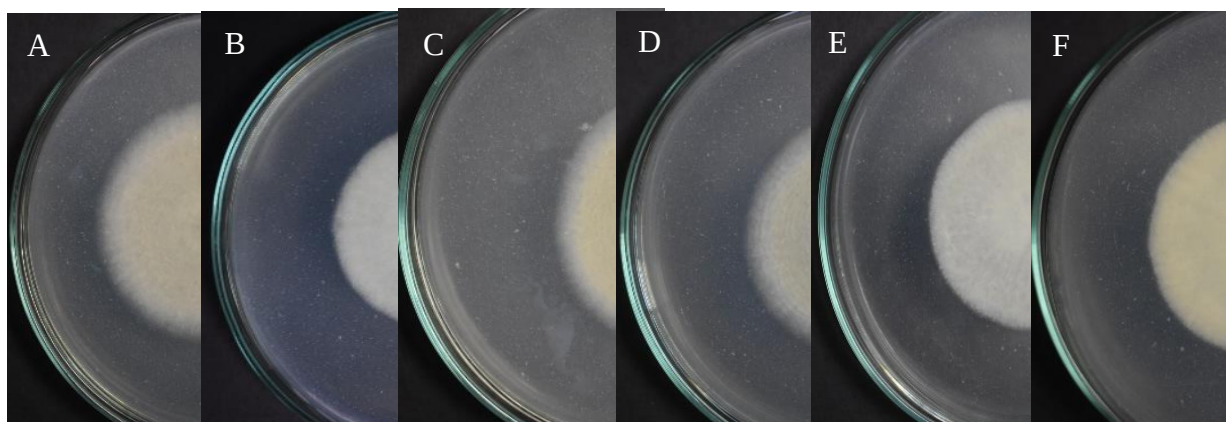


Figura 51. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 7 y 10, de trigo y avena, cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M7A1. B. Aislado M7A2. C. Aislado M7A3. D. Aislado M10A1. E. Aislado M10A2. F. Aislado M10A3. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxina.

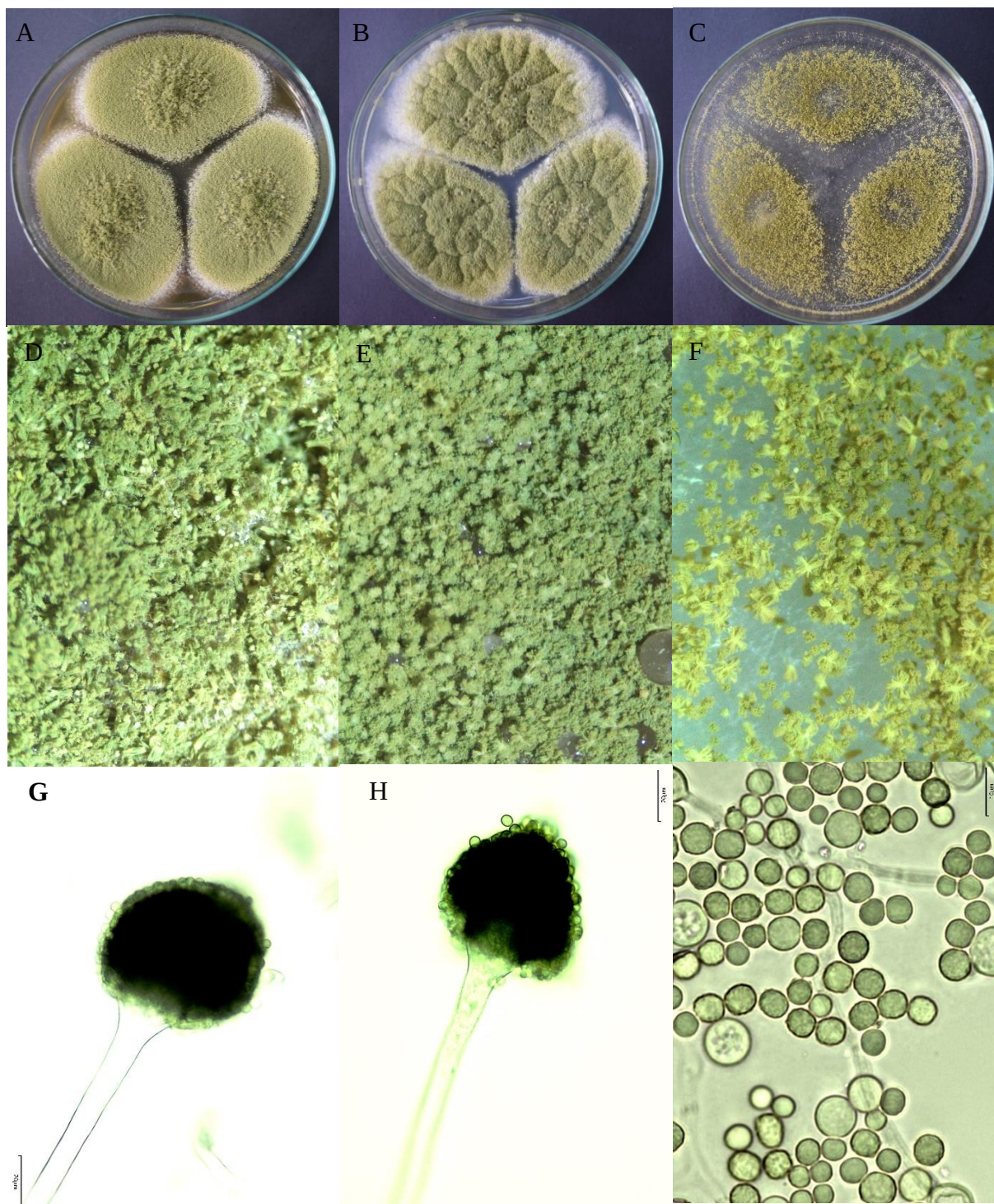


Figura 52. Colonias de aislado M7A1 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G - H barra 20 μm. I barra 20 μm

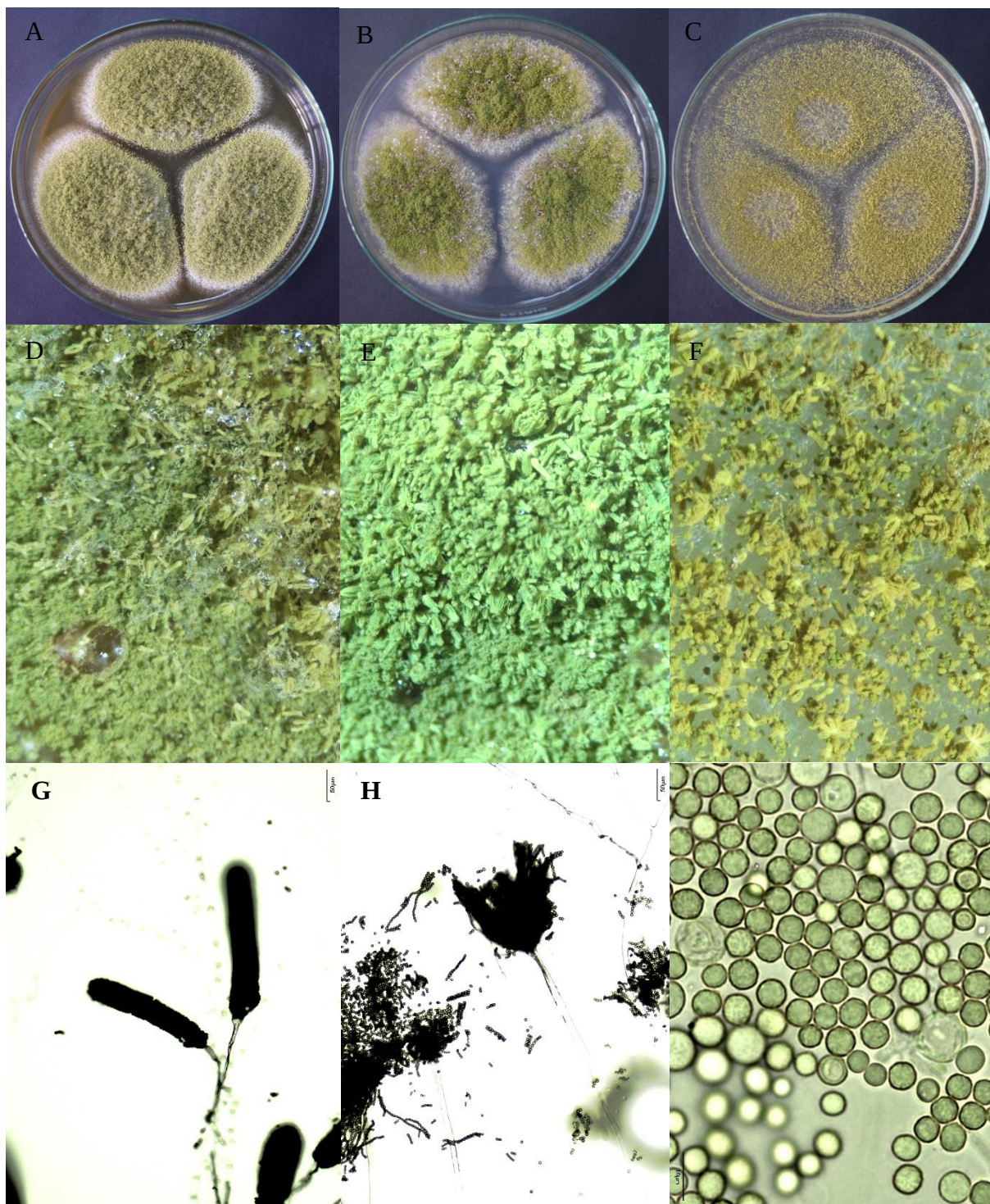


Figura 53. Colonias de aislado M7A2 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 50 μ m. I barra 10 μ m.

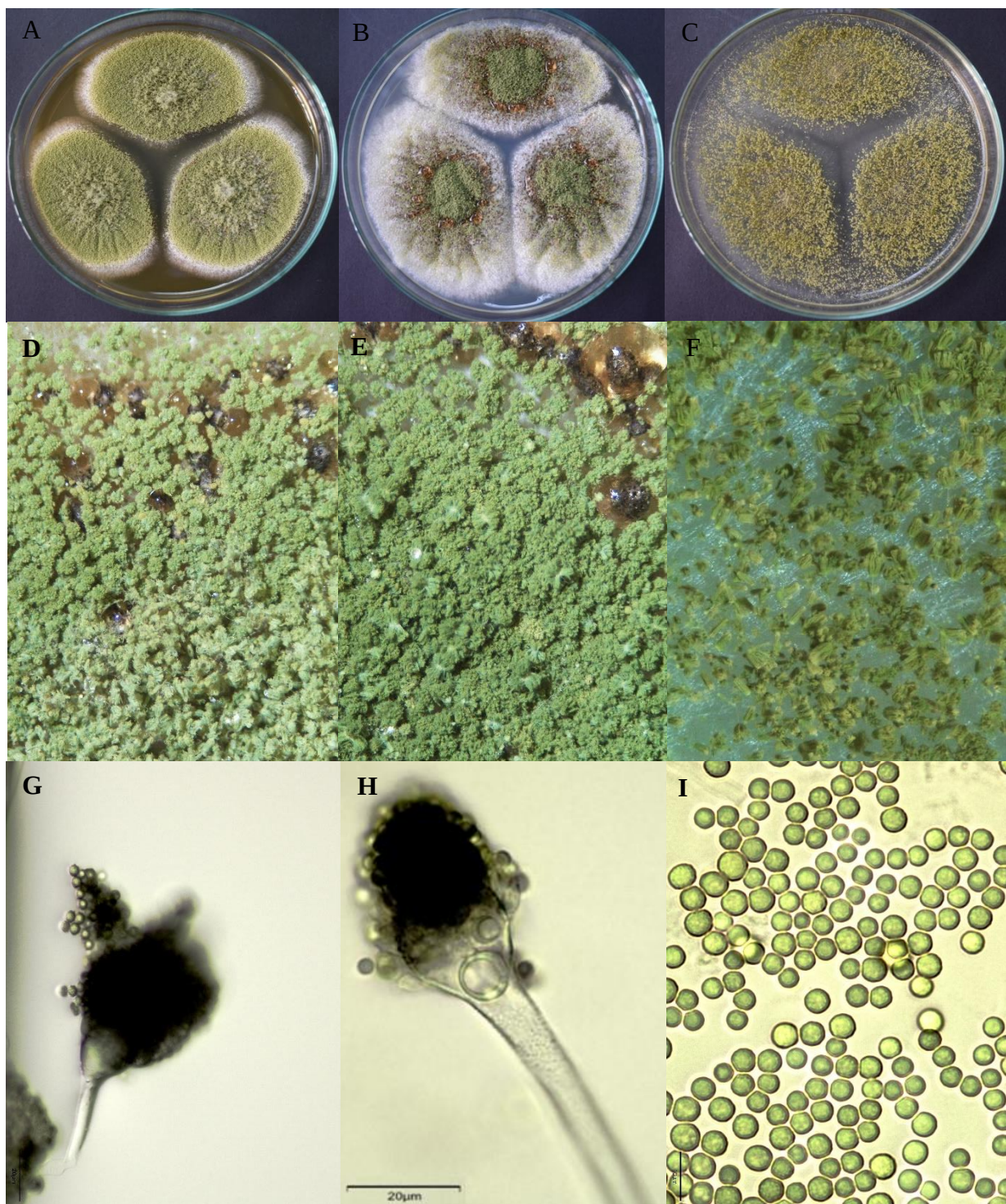


Figura 54. Colonias de aislado M7A3 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 50 µm. I barra 10 µm.

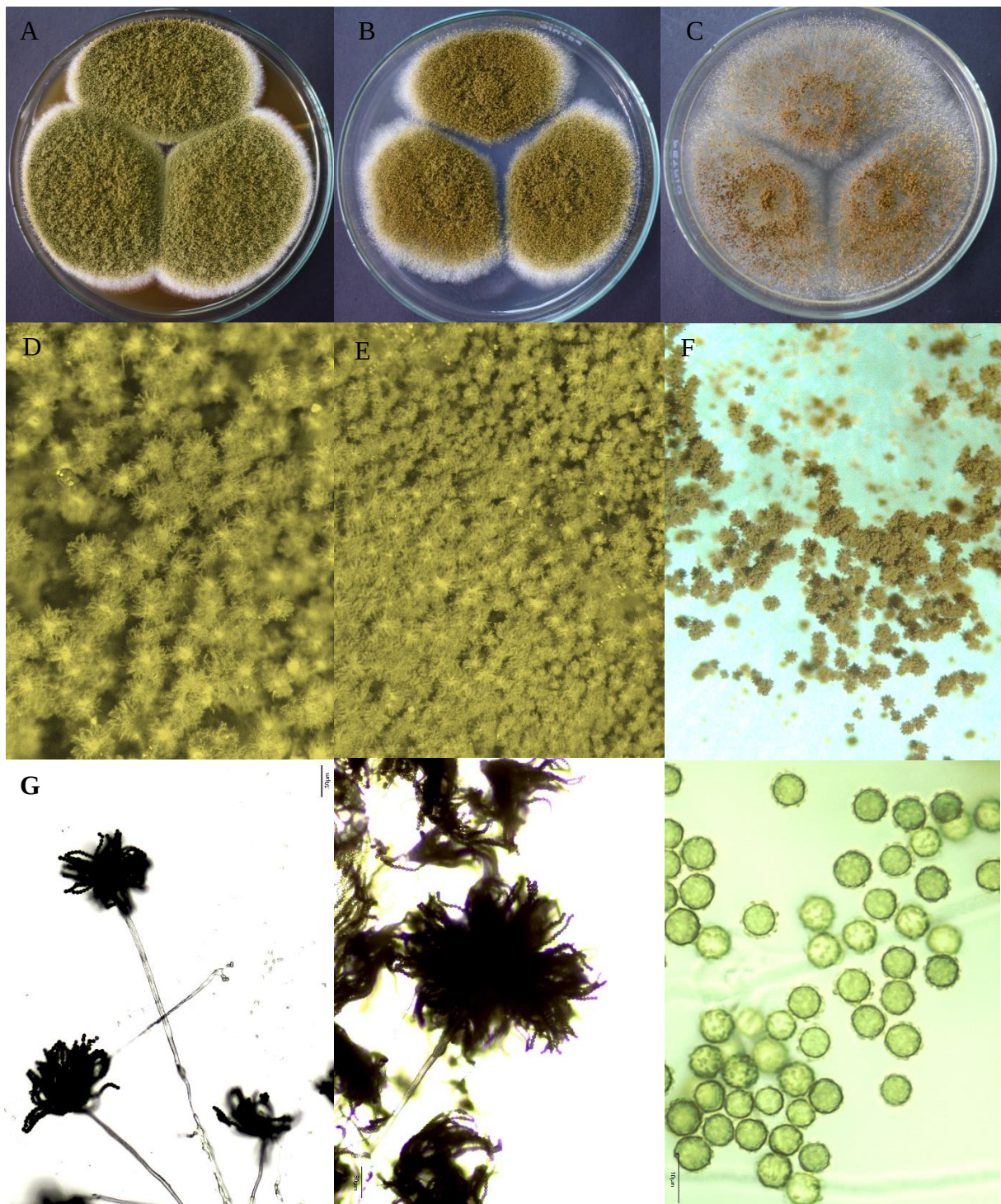


Figura 55. Colonias de aislado M10A1 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-F. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. G-I. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 50 μm. I barra 10 μm.

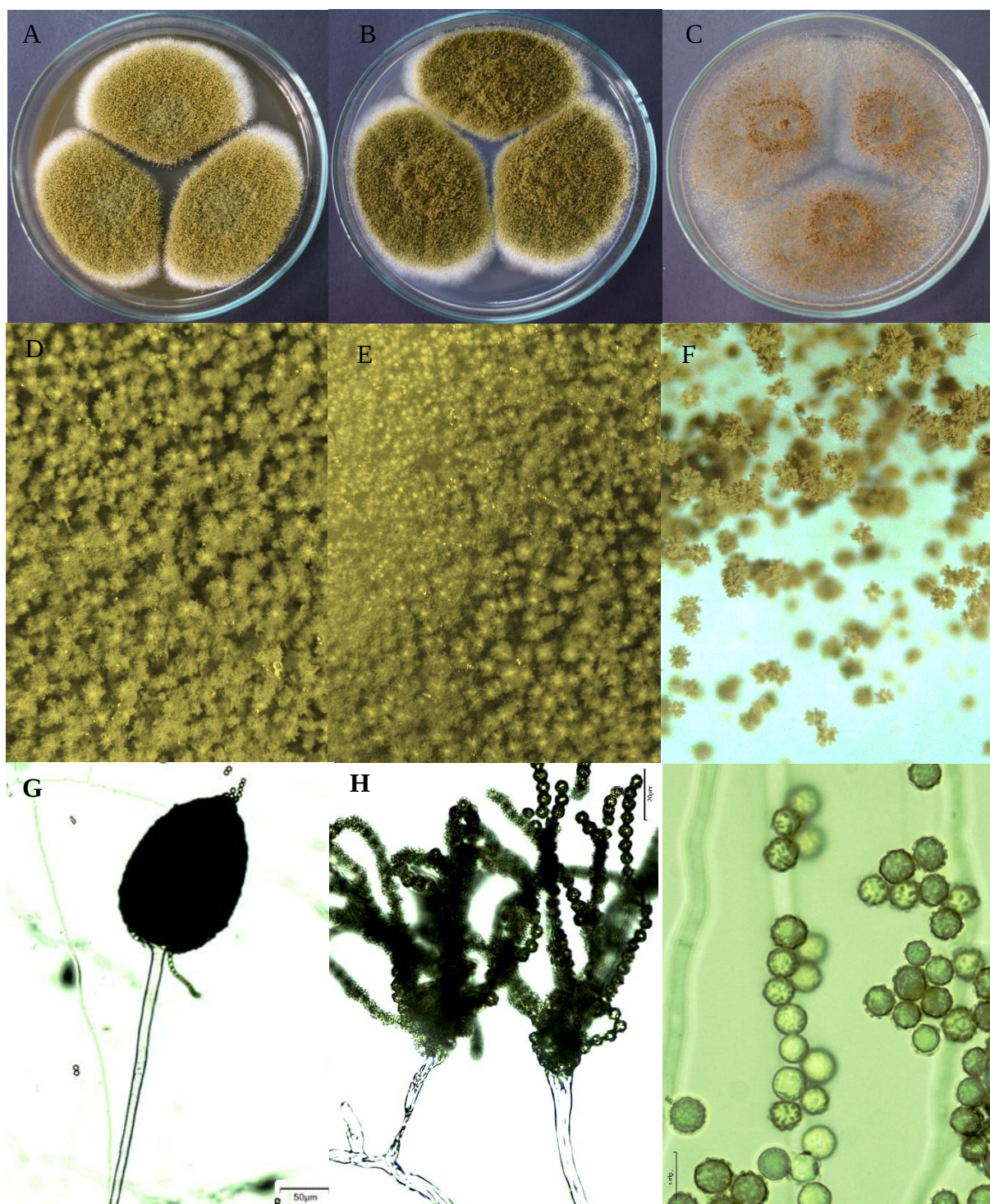


Figura 56. Colonias de aislado M10A2 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC por 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. . G barra 50 µm. H barra 20 µm. I barra 10 µm.

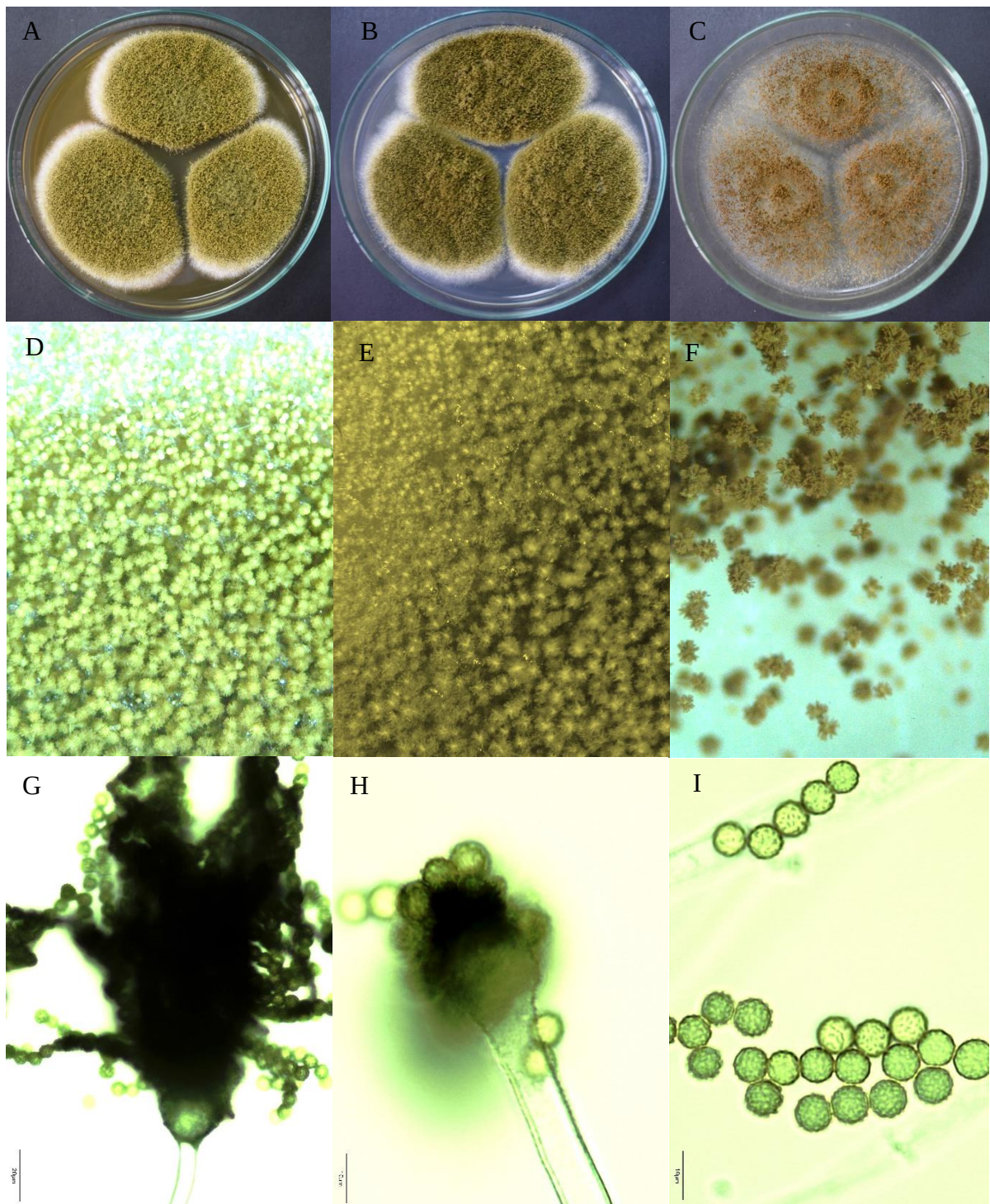


Figura 57. Colonias de aislado M10A3 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μm. H- I barra 10 μm.

Tabla 43. Características microscópicas de los aislados A1, A2 y A3 provenientes de la muestra 7 de trigo y aislados A1 al A3 provenientes de la muestra 8 de arroz y avena en MEA cultivados a 25 °C durante 7 días.

Características	Aislados muestra 7 No.			Aislados muestra 10 No.		
	A1	A2	A3	A1	A2	A3
Hifas	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada
Conidióforo						
a) Longitud ¹	114.10 – 639.60	160.20 – 328.90	130.90 – 635.10	269.90 – 723.30	517.20 – 1268.40	261.20 – 1168.30
b) Diámetro ¹	6.30 – 10.70	6.10 – 10.80	3.30 – 8.10	6.00 – 10.50	3.60 – 12.50	5.20 – 7.20
c) Vesícula	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica	Hemisférica
Conidio						
a) Cabeza	Globosa	Globosa	hemisférica y columnares	Columnar	Columnar y globosa	Columnar y globosa
b) Diámetro ¹	3.50 – 6.10	4.80 -7.40	3.30 – 5.70	5.20 – 8.00	5.30 – 6.90	5.70 – 7.80
c) Ornametación	Rugosa con espículas	Rugosa	Ligeramente rugosa	Rugosa con espículas	Rugosa con espículas	Rugosa con espículas
fiálides	Directo desde la vesícula	Directo desde la vesícula	Directo desde la vesícula	Directo desde la vesícula	Directo desde la vesícula	Directo desde la vesícula
a) Primaria ¹	-	-	-	-	-	-
b) Secundaria ¹	-	-	-	-	-	-

¹ µm, promedio de 30 medidas

En las Tablas 44 a 46 y Figuras 58-65 se muestran las características macroscópicas y microscópicas de los aislados M8A1 a M8A6 de arroz y trigo. El color en el centro de las colonias fue verde oliva, verde claro y verde amarillo, con bordes blancos. El tamaño de las colonias estuvo entre 3.91 y 4.82 cm en MEA, entre 3.94 y 4.60 cm en CYA, desde 4.05 a 5.63 en YES y entre 2.07 y 2.65 cm en CREA. Presentaron margen entero y filiforme, con elevación umbonada y plana, textura granulosa y flocosa, de crecimiento medio. No hubo producción de aflatoxinas, pero si presencia de exudado en todos los aislados y ausencia de esclerocios en el aislado M8A5 arroz.

Entre las características microscópicas, se encontraron hifas ramificadas y septadas, con conidióforo de longitud entre 98.20 y 528.00 µm y un diámetro 2.30 a 14.70 µm. Los conidios fueron de forma globosa, columnar, hemisférica y subglobosa, rugosos y rugosos con espículas, con un diámetro entre 3.60 y 7.00 µm. Las fiálides monoseriadas cubrieron la parte superior de la vesícula, mientras que algunas biseriada cubrieron toda la vesícula. El tamaño de las métulas estuvo entre 4.80 y 22.70 µm y el de las fiálides entre 6.50 y 11.70 µm.

Tabla 44. Características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 al A6 provenientes de la muestra 8 de arroz y trigo, en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M8A1 Arroz	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blancos y marrones en el centro.	Blanco en el borde, verde oliva con puntos blancos y marrones en el centro.	Verde claro en el borde, verde en el centro	Blanco en el borde, amarillo verdoso en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.82 ± 0.42	4.50 ± 1.13	4.63 ± 0.15	2.65 ± 0.21
	Margen	Filiforme	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Umbonado	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia
	Textura	Flocoso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M8A2 Trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro	Blanco en el borde, verde oliva en el centro	Blanco en el borde, verde oliva en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	3.91 ± 0.70	4.60 ± 1.10	5.43 ± 1.88	2.15 ± 0.10
	Margen	Entero	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Plano	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granular	Granular	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	no hay presencia	no hay presencia
M8A3 arroz	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro	Blanco en el borde, verde oliva en el centro	Blanco en el borde, verde oliva en el centro
	Tamaño de la colonia ¹	4.23 ± 0.36	3.94 ± 0.57	4.05 ± 0.69	2.36 ± 0.18
	Margen	Entero	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Plano	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 45. Continuación de características macroscópicas y producción de aflatoxinas de los aislados A1 al A6 provenientes de la muestra 8 de arroz y trigo, en MEA, CYA, YES, CREA y CAM cultivados a 25 °C durante 7 días.

Número de muestra	Características	Aislamiento en MEA	Aislamiento en CYA	Aislamiento en YES	Aislamiento en CREA
M8A4 Arroz	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro	Blanco en el borde, verde oliva en el centro	Blanco en el borde, verde oliva en el centro
	Tamaño de la colonia¹	3.97 ± 0.53	3.97 ± 0.40	4.20 ± 0.34	2.26 ± 0.42
	Margen	Entero	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Plano	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	no hay presencia	no hay presencia
M8A5 arroz	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro	Blanco en el borde, verde oliva en el centro	Blanco en el borde, verde oliva en el centro
	Tamaño de la colonia¹	4.24 ± 0.59	4.41 ± 0.58	4.15 ± 0.29	2.07 ± 0.24
	Margen	Entero	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Plano	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
M8A6 trigo	Color de la superficie	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro.	Blanco en el borde, verde amarillo en el centro	Blanco en el borde, verde oliva en el centro	Blanco en el borde, verde oliva en el centro
	Tamaño de la colonia¹	4.15 ± 0.32	3.97 ± 0.28	4.40 ± 0.14	2.28 ± 0.42
	Margen	Entero	Entero	Filiforme	Filiforme
	Color del lado reverso	Crema	Crema	Crema	Crema
	Elevación	Umbonado	Plano	Umbonado	Plano
	Crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento medio	Crecimiento lento
	Producción de aflatoxina en CAM	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Esclerocios	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia	No hay presencia
	Textura	Granuloso	Granuloso	Flocoso	Flocoso
	Exudados	Si hay presencia	Si hay presencia	No hay presencia	No hay presencia

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS



Figura 58. Colonias de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 9 de trigo y arroz (columna 1= M8A1, columna 2 = M8A2, columna 3 = M8A3, columna 4 = M8A4, columna 5 = M8A5, columna 6 = M8A6), cultivados a 25 °C durante 7 días. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en CYA, fila 3 aislados en YES y fila 4 en CREA.

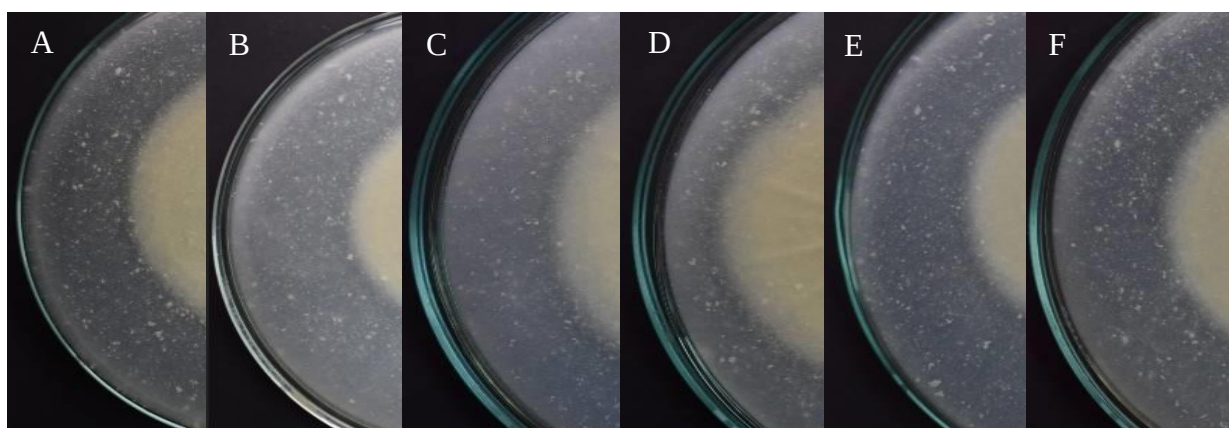


Figura 59. Producción de aflatoxinas por aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* provenientes de la muestra 8, de trigo y arroz, cultivados en CAM a 25 °C durante 7 días. A. Aislado M8A1. B. Aislado M8A2. C. Aislado M8A3. D. Aislado M8A4. E. Aislado M8A5. F. Aislado M8A6. Presencia de color rosado oscuro, rojo y naranja indican la presencia de aflatoxina.

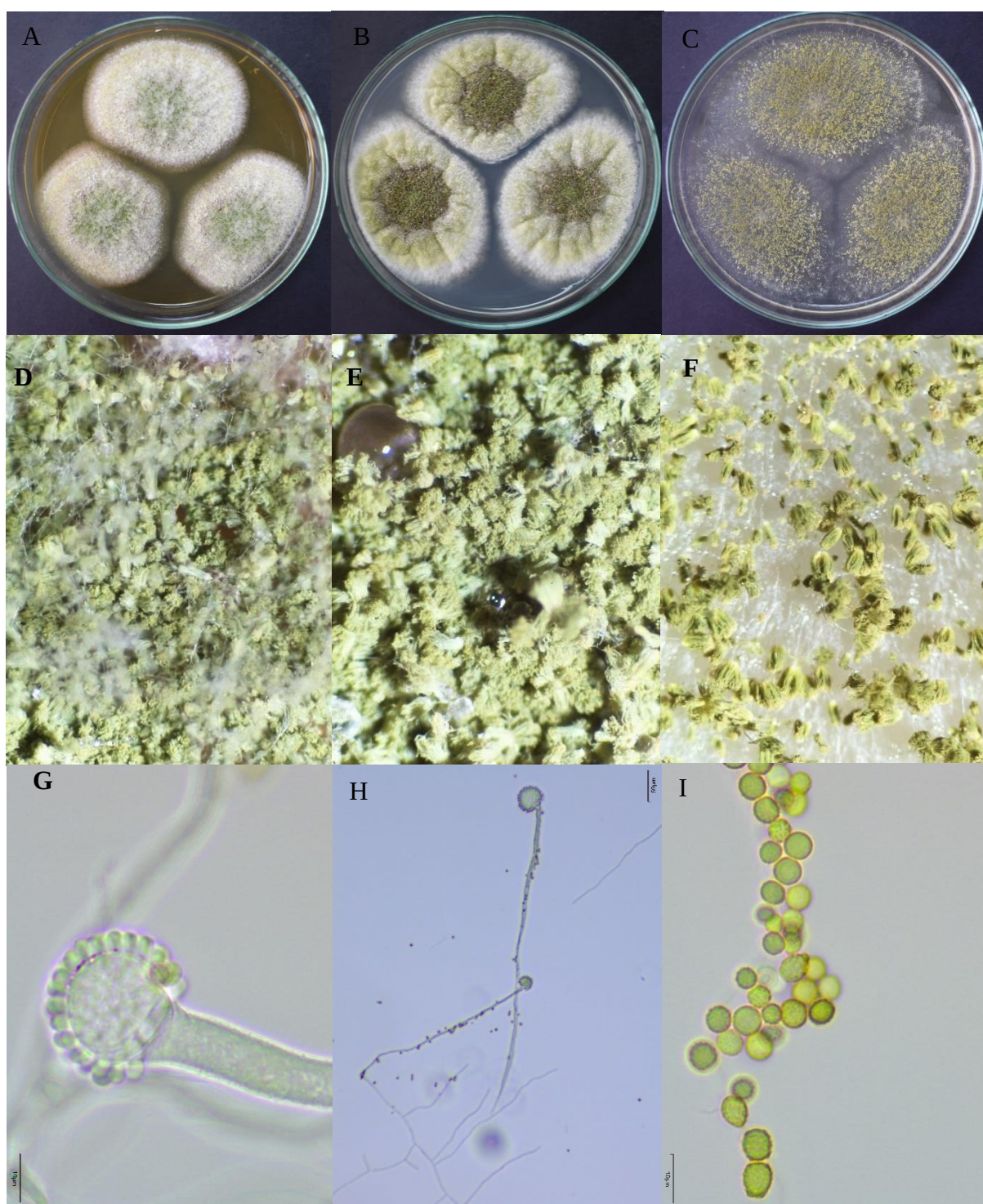


Figura 60. Colonias de aislado M8A1 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 10 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm.

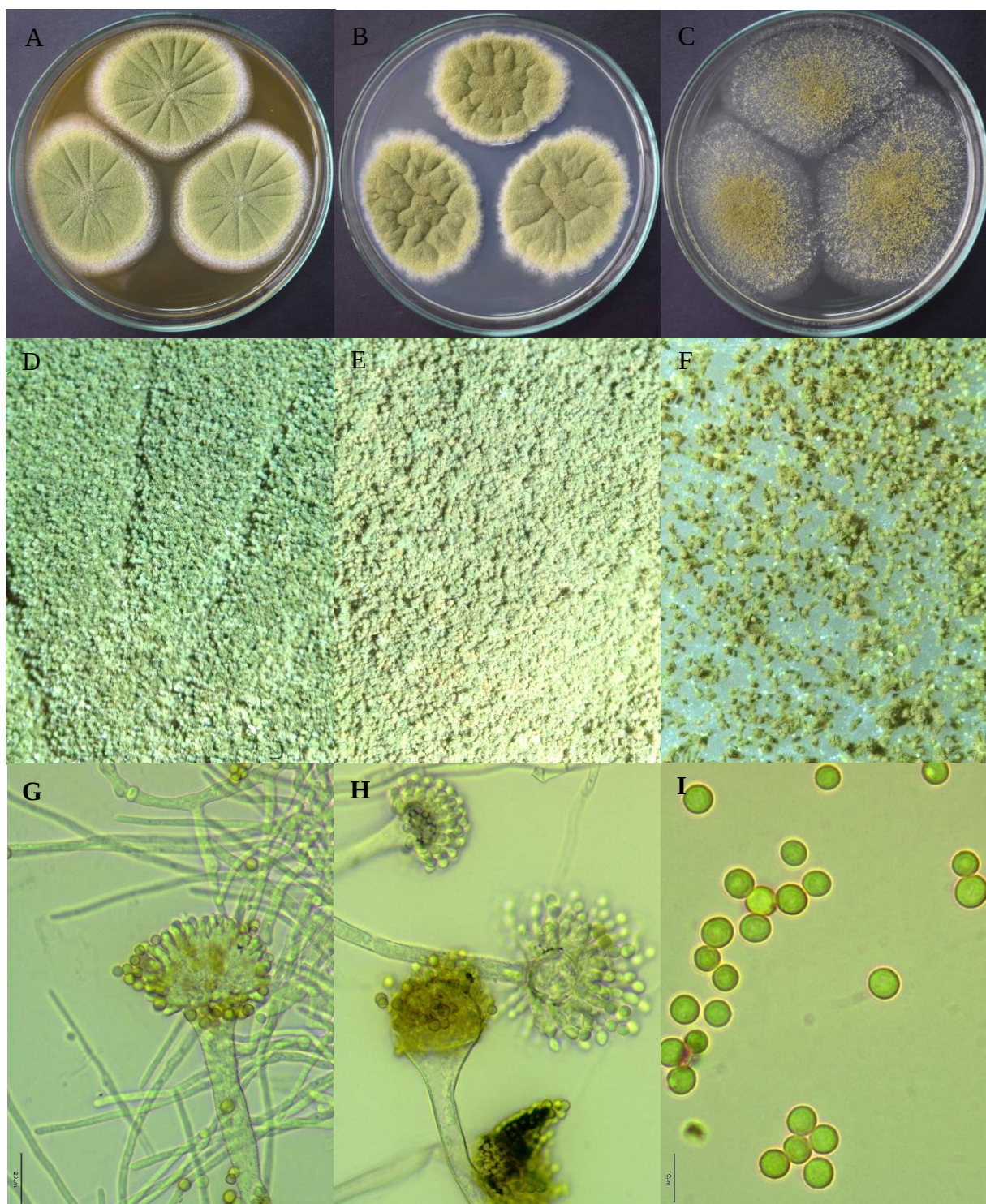


Figura 61. Colonias de aislado M8A2 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 oC por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G barra 20 μ m. H-I barra 20 μ m. I barra 10 μ m.

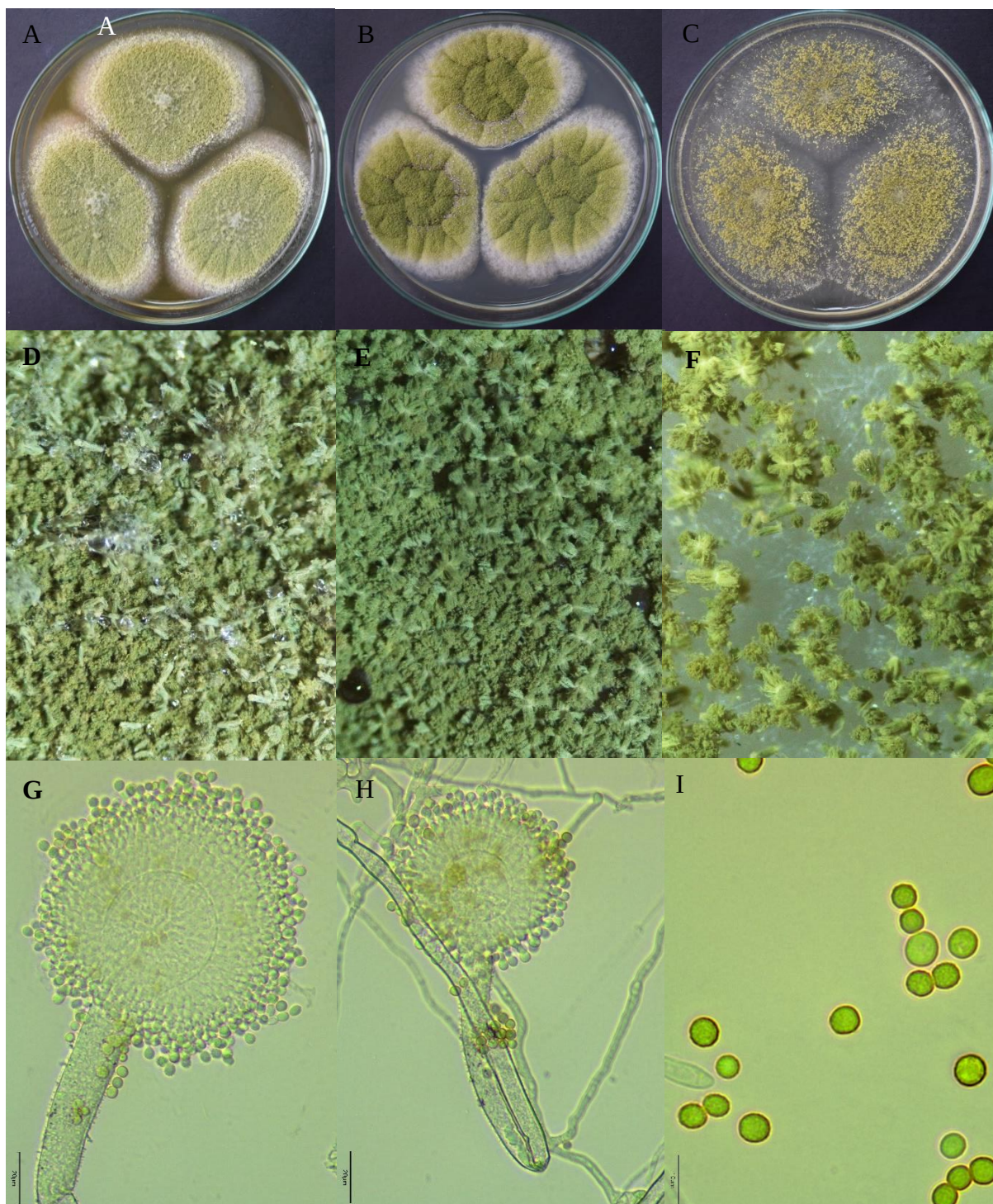


Figura 62. Colonias de aislado M8A3 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 20 µm. I barra 10 µm.

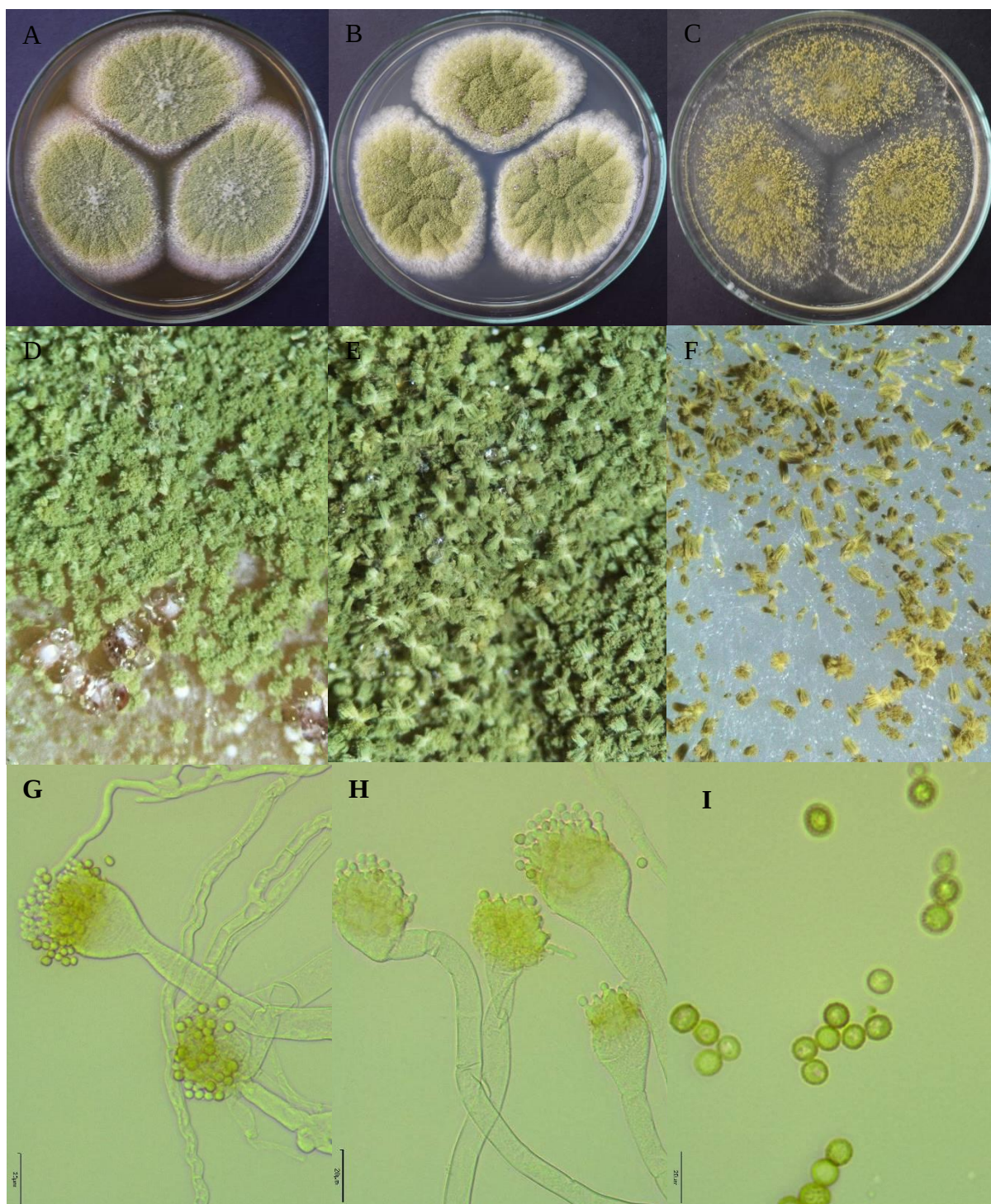


Figura 63. Colonias de aislado M8A4 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. D-F. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. G-I. Conidióforo y conidios cultivados en agar MEA. G-H barra 20 μm. I barra 10 μm.

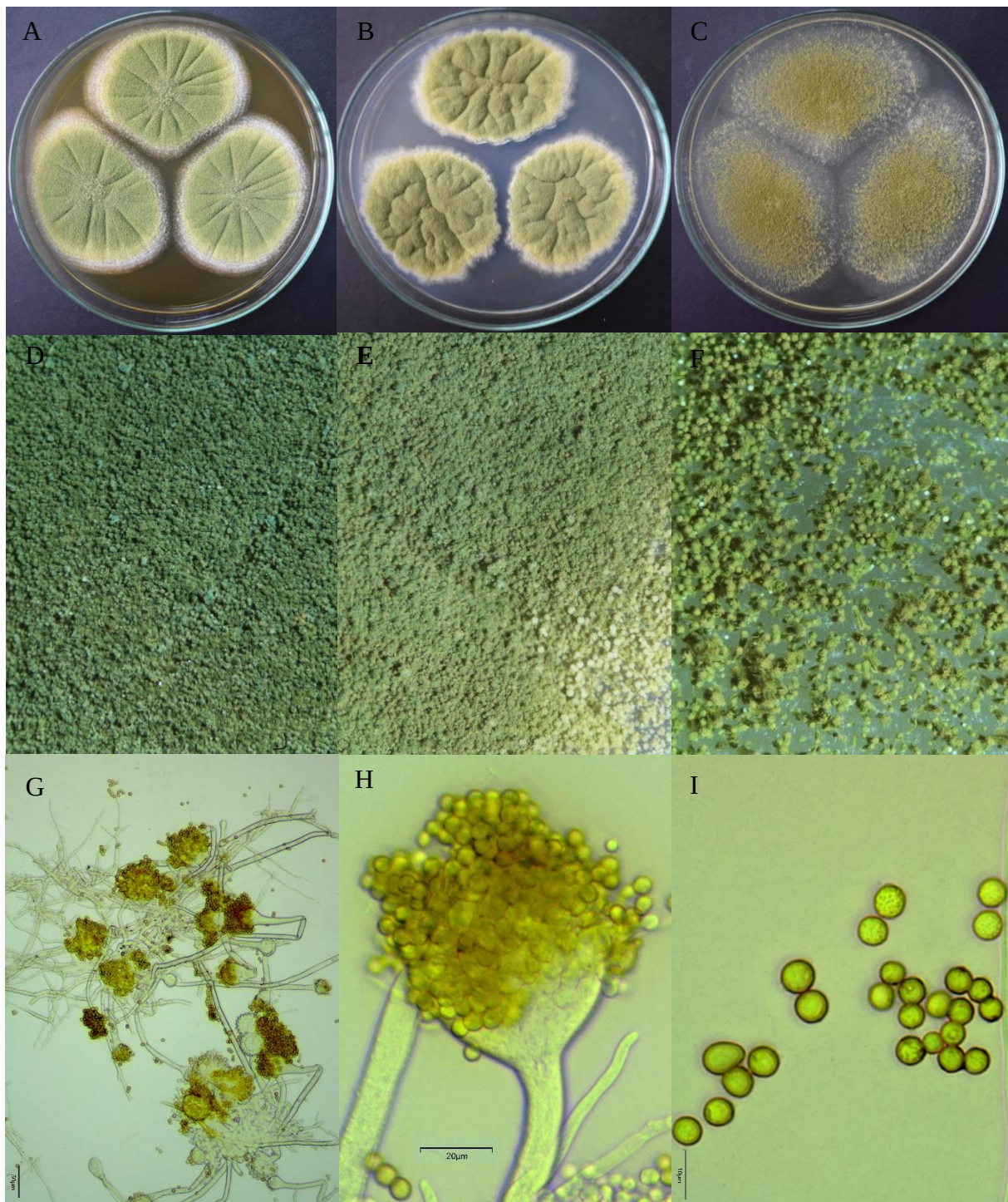


Figura 64. Colonias de aislado M8A5 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en agar MEA. G barra 50 μm. H barra 20 μm. I barra 10 μm.

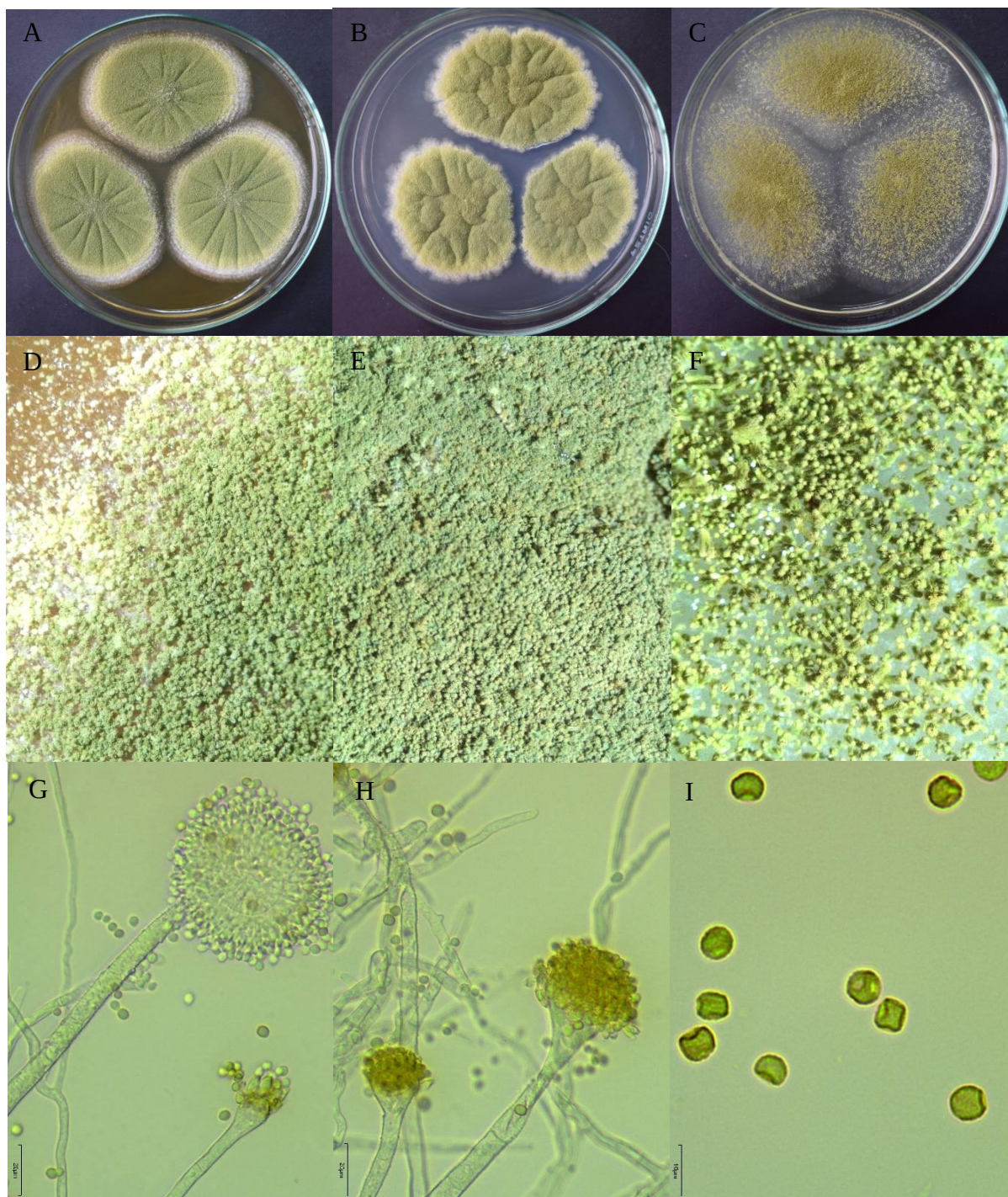


Figura 65. Colonias de aislado M8A6 de *Aspergillus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C por 7 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, CYA y YES a 25 °C durante 7 días. F-H. Conidióforo y conidios cultivados en MEA. G-H barra 20 µm. I barra 10 µm.

Tabla 46. Características microscópicas de los aislados A1 al A6 provenientes de la muestra 9 de trigo y arroz en MEA cultivados a 25 °C durante 7 días.

Características	Aislados muestra 8 No.					
	A1	A2	A3	A4	A5	A6
Hifas	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada	Ramificada septada
Conidióforo						
a) Longitud ¹	107.0 – 365.80	98.2 – 245.0	411.60 – 528.0	184.40 – 476.70	178.50 – 370.60	187.60 – 519.7
b) Diámetro ¹	2.30 – 8.80	5.40 – 11.0	5.10 – 11.60	7.80 – 14.70	7.0 – 10.30	5.0 – 9.6
c) Vesícula	Globoso – subgloboso	Globoso – subgloboso	Globoso – subgloboso	Globoso – subgloboso	Globoso – subgloboso	Globoso – subgloboso
Conidio						
a) Cabeza	Columnar Hemisférica	Globosa	Globosa, columnar	Globosa, columnar	Globosa	Globosa, subgloboso
b) Diámetro ¹	3.60 – 6.90	5.0 – 6.80	4.0 – 7.0	3.60 – 5.90	3.80 – 6.40	5.0 – 6.7
c) Ornamentación	Rugosa con espículas	Rugosa con espículas	Rugosa con espículas	Rugosa con espículas	Rugosa con espículas	Poliédricas con espículas
fiálides	Monoseriada cubriendo la parte superior de la vesícula.	Biseriada cubriendo toda la vesícula	Biseriada cubriendo toda la vesícula	Monoseriada, cubriendo toda la vesícula	Monoseriada, cubriendo la parte superior de la vesícula	Biseriada cubriendo toda la vesícula
a) Primaria ¹	5.90 – 22.70	5.90 – 22.70	4.80 – 11.40	7.0 – 11.20	9.0 – 14.10	5.0 – 13.60
b) Secundaria ¹	Ausente	6.50 – 9.50	6.80 – 11.7	Ausente	Ausente	7.30 – 10.5

¹ μm, promedio de 30 medidas

Uno de los criterios para la identificación de hongos pertenecientes a la sección *Flavi* es la producción de extrolitos, tales como aflatoxina, ácido ciclopiazónico y ácido aspergílico. Debido a que *Aspergillus oryzae* tiene una mutación presentada en el clúster de genes que controlan la ruta de síntesis de esta micotoxina, no produce aflatoxinas (Kiyota et al., 2011; Nakamura et al., 2011, Khan et al., 2020). Los aislados que producían este compuesto químico no fueron utilizados para la identificación molecular, así como aquellos que no tenían características macroscópicas y microscópicas típicas. De un total de 56 aislados con una coloración verde oliva-verde amarillo, 42 no produjeron aflatoxinas tal como se muestra en la Tabla 47.

Tabla 47. Aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* productores y no productores de aflatoxinas.

Muestra	Presencia de aflatoxina	Ausencia de aflatoxina
M1	A4	A1, A2, A3, A5 A1, A2, A3, A4, A5, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A19, A20
M2	A6	
M3	A2, A3, A4, A6, A7, A9, A11	A1, A5, A8, A10
M5	A1, A4	A2, A3, A5
M6	A2, A3, A4	A5
M7	-	A1, A2, A3
M10	-	A1, A2, A3
M8	-	A1, A3, A4, A5, A6
TOTAL	14	42

En términos generales, de los 42 aislados no productores de aflatoxinas obtenidos de las muestras de arroz, avena y trigo, las colonias tuvieron un rango de tamaño entre 3.67 y 4.33 cm en MEA, 3.88 y 4.60 cm en CYA, 3.63 y 5.63 cm en YES y 2.07 y 4.40 cm en CREA. Mostraron margen filiforme, entero y filamentoso, elevación umbonada a plana, textura flocosa y granulosa, y fueron de crecimiento medio. Algunos produjeron esclerocios y no hubo producción de aflatoxina en los aislados.

Con respecto a las características microscópicas, los aislados presentaron hifas ramificadas y septadas, vesículas globosas, subglobosas, hemisféricas y columnar hemisférica. Los conidióforos tuvieron una longitud entre 73.30 a 2645,20 μm , ancho entre 1.20 y 27.50 μm y los conidios fueron lisos, ligeramente rugosos y rugosos con espículas, con o sin espículas, con un diámetro variable entre 3.40 y 8.00 μm . Algunos aislados presentaron fiálides monoseriadas cubriendo la parte superior de la vesícula, mientras que otros presentaron disposición biseriada con métulas y fiálides.

En base a las características presentadas por Samson et al. (2019) en la clave de identificación a nivel de especie de *Aspergillus* fueron seleccionadas los aislados, M1A2, M1A5, M2A1, M2A14, M2A15, M2A16, M2A20, M3A1, M3A10 y M6A5. Las características indicadas en esta clave fueron las siguientes, diámetro de la colonia en MEA mayor que 30mm después de 7 días de cultivo a 25 °C, color verde amarillo del conidio, cabeza conidial uniseriada o biseriada, ambas presentes en el cultivo, conidios equinulados, irregularmente rugoso o suaves, colonias de color amarillo verde o verde oliva.

La presencia de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae* se justifica en las muestras de avena, arroz y trigo ya que son ubicuos y tienen una distribución global, de tal manera que se han encontrado en diversos tipos de fuentes, tales como, maíz, maní, alimentos para animales, pistachos, pescado seco, arroz, trigo, avena, tripala, castañas, nueces, semillas de girasol, semillas de algodón, salsa de soja, papaya, guisantes secos, frutas, entre otros. (Klich & Pitt, 1998; Gautam & Bhadauria, 2012; Baquião et al., 2013; Priya et al., 2016; Prencipe et al., 2018; Salem, 2019; Abd El-Aziz et al., 2021)

Las características macroscópicas observadas están en concordancia con las reportados por Baquião et al. (2013) quienes describieron a las colonias de color verde amarillo, biseriadas, con un diámetro de 6.00 a 7.00 cm, Mangal, Bansal & Sharma, (2014) describieron colonias de *Aspergillus flavus* en MEA con tamaño entre 2.00 y 2.50 cm, textura inicialmente tipo peluda que llegan a ser polvosa y seca con el tiempo, márgenes regulares, color de las colonias en el centro verde oliva y bordes blancos, con el reverso de color marrón pálido. *Aspergillus oryzae* según estos autores presentaron tamaños entre 3.00 y 4.00 cm en cinco días de cultivo, con el centro ligeramente umbonado, márgenes circulares regulares, color de las colonias en el centro verde oliva y bordes blancos, con el reverso de color marrón pálido, así mismo describieron características similares a las encontradas en CYA. Prencipe et al. (2018), describieron a *Aspergillus oryzae* con superficie plana, márgenes irregulares en MEA y YES y flocoso con micelio aéreo verde en CYA, con tamaños de 3.24 cm en YES, 3.45 cm en CYA y 3.61 cm en MEA.

Otros autores describieron a las colonias de color verde a marrón rojizo, marrón a verde amarillo y verde oliva para el caso de *Aspergillus oryzae* y verde amarillo, amarillo y verde grisáceo para *A. flavus*, con presencia de esclerocios en ambos microorganismos (Lozada, 1995; Varga, Frisvad & Samson, 2011; Gautam & Bhadauria, 2012; Priya et al., 2016, Saif et al., 2021).

El tamaño de los conidios para *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae* está dentro del rango reportado por Kim et al. (2017) quienes encontraron valores de 3.50 a 4.70 μm y 3.50 a 4.20 μm respectivamente, con formas ovalada y suaves. Lozada (1995) encontró formas equinuladas, globosas y subglobosas. Las vesículas fueron globosas y las fiálides se desprendieron directamente desde la superficie de la vesícula (Gonu et al., 2015). Con respecto al conidióforo, Gautam & Bhadauria (2012) reportaron una longitud de 600 a 800 μm y un diámetro de 15 a 20 μm .

Con respecto a la longitud de los conidióforos Daba, Mostafa & Elkhateeb (2021) mencionaron que *Aspergillus oryzae* tienen mayor longitud que los de *Aspergillus flavus*, el cual emerge del sustrato con paredes rugosas. En este caso el aislado con longitud más larga fue la M6A5.

Como se observa por lo descrito anteriormente, las características macroscópicas tanto para *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus flavus* son muy similares, por lo cual no es conveniente hacer una clasificación a nivel de especie basándose solo en estas características.

Al respecto Yazdani et al., (2011) señalan que los aislados de la especie *Aspergillus* descritos en base a características fenotípicas tienen inmerso algunos factores entre los que se mencionan el solapamiento de las características morfológicas de especies relacionadas tales como *A. flavus* y *Aspergillus oryzae*, y recomiendan el uso de técnicas moleculares para la identificación y diferenciación a nivel de género y especie.

Salem (2019) indica que una adecuada clasificación de los hongos es importante desde el punto de vista fisiológico, bioquímico y económico y que, aunque técnicas macro y microscópicas tradicionales para su estudio, consumen tiempo, son costosas, requieren de experticia y de instrumentos como microscopios adecuados para una correcta identificación.

Baquião et al. (2013) recomiendan el uso de enfoques polifásicos para una correcta identificación, considerando características microscópicas, macroscópicas, bioquímicas, producción de extrolitos, molecular y de contexto, ya que la sección *Flavi* tiene una taxonomía compleja y cambiante.

Posteriormente, se describen los resultados obtenidos mediante la utilización de herramientas de biología molecular para la identificación correcta de los aislados presuntivos de *Aspergillus flavus/oryzae*, ya que las características obtenidas no permiten una buena identificación.

En las Tablas 48, 49, 50 y en la Figura 66 se presentan las características macroscópicas de los aislados M4A1, M4A2, M2A3, M4A4 y M4A5 de la muestra 4 de avena y arroz. Presentaron color gris oscuro en el centro y borde blanco, todos de textura algodonosa, el aislado M4A2 creció a la temperatura 25 °C, 37 °C y 45 °C en MEA, PDA y OA.

Tabla 48. Características macroscópicas de los aislados M4A1, M4A2, M2A3, M4A4 y M4A5 de la muestra 4 de avena y arroz en MEA, CYA, PDA, y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.

Número de Muestra	Características		MEA			PDA			OA		
	Temperatura de cultivo (°C)	25	37	45	25	37	45	25	37	45	
M4A1 Arroz	Color de la superficie	Gris oscuro en el centro, blanco - gris claro en los bordes	Gris oscuro	Marrón	Gris oscuro en el centro, blanco - gris claro en los bordes			Gris oscuro en el centro, blanco en los bordes			
	Color del reverso	Crema	Crema	Crema	Blanco			Blanco			
	Tamaño de la colonia ¹	8.83 ± 0.29	9.00 ± 0.01	9.00 ± 0.01	7.00 ± 0.20	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	4.40 ± 0.10	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	
	Margen	Entero	Entero	Entero	Entero			Entero			
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido			Crecimiento medio			
	Elevación	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado			Elevado			
	Textura	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso			Algodonoso			
M4A2 Avena	Temperatura de cultivo (°C)	25	37	45	25	37	45	25	37	45	
	Color de la superficie	Gris oscuro en el centro, blanco en el borde	Gris oscuro	Marrón	Gris oscuro en el centro, blanco en el borde	Gris oscuro	Marrón oscuro	Gris oscuro en el centro, blanco en el borde	Gris oscuro en el centro, blanco en el borde	Marrón	
	Color del reverso	Crema	Crema	Crema	Blanco	Blanco	Rojo	Blanco	Blanco	Crema	
	Tamaño de la colonia ¹	7.60 ± 0.26	9.00 ± 0.00	7.40 ± 0.10	7.90 ± 0.26	9.40 ± 0.00	8.83 ± 0.29	4.27 ± 0.25	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	
	Margen	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero	Ondulado	Entero	Entero	Entero	
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	Crecimiento medio	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	Crecimiento medio	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	
	Elevación	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	
	Textura	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 49. Características macroscópicas de los aislados M4A1, M4A2, M2A3, M4A4 y M4A5 de la muestra 4 de avena y arroz en MEA, CYA, PDA, y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C por 4 días.

Número de Muestra	Características		MEA			PDA			OA		
	Temperatura de cultivo (°C)										
		25	37	45	25	37	45	25	37	45	
M4A3 Avena	Color de la superficie	Gris oscuro en el centro, blanco en el borde	Gris oscuro		Gris oscuro en el centro, blanco en el borde	Gris oscuro		Gris claro en el centro, blanco en el borde	Gris oscuro		
	Color del reverso	Crema	Crema		Blanco	Blanco		Blanco	Blanco		
	Tamaño de la colonia¹	8.67 ± 0.29	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento	4.90 ± 0.10	7.55 ± 0.10	No hubo crecimiento	5.40 ± 0.10	7.40 ± 0.10	No hubo crecimiento	
	Margen	Entero	Entero		Entero	Entero		Entero	Entero		
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		
	Elevación	Elevado	Elevado		Elevado	Elevado		Elevado	Elevado		
	Textura	Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso		
M4A4 Avena	Temperatura de cultivo (°C)	25	37	45	25	37	45	25	37	45	
	Color de la superficie	Gris oscuro en el centro, blanco - gris claro en los bordes	Gris oscuro		Gris oscuro en el centro, blanco - gris claro en los bordes	Gris oscuro		Gris claro en el centro, blanco en el borde	Gris claro en el centro, blanco en el borde		
	Color del reverso	Crema	Crema	No hubo crecimiento	Blanco	Blanco	No hubo crecimiento	Blanco	Blanco	No hubo crecimiento	
	Tamaño de la colonia¹	7.60 ± 0.10	8.90 ± 0.00		6.53 ± 0.24	9.00 ± 0.00		5.53 ± 0.15	7.25 ± 0.19		
	Margen	Ondulado	Entero		Ondulado	Entero		Entero	Entero		
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento rápido		Crecimiento medio	Crecimiento rápido		Crecimiento lento	Crecimiento lento		
	Elevación	Elevado	Elevado		Elevado	Elevado		Elevado	Elevado		
	Textura	Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso		

¹ µm, promedio de 30 medidas

Tabla 50. Características macroscópicas de los aislados M4A1, M4A2, M2A3, M4A4 y M4A5 de la muestra 4 de avena y arroz en MEA, CYA, PDA, y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.

Número de Muestra	Características		MEA			PDA			OA	
	Temperatura de cultivo (°C)									
	25	37	45	25	37	45	25	37	45	
M4A5 Avena	Color de la superficie	Blanco en el centro, gris-negro en el borde			Blanco en el centro, gris-negro en el borde			Blanco		
	Color del reverso	Crema	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	Crema	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	Crema	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento
	Tamaño de la colonia ¹	9.00 ± 0.00			9.00 ± 0.00			9.00 ± 0.00		
	Margen	Entero			Entero			Entero		
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento rápido			Crecimiento rápido			Crecimiento rápido		
	Elevación	Elevado			Elevado			Elevado		
	Textura	Algodonoso			Algodonoso			Algodonoso		

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

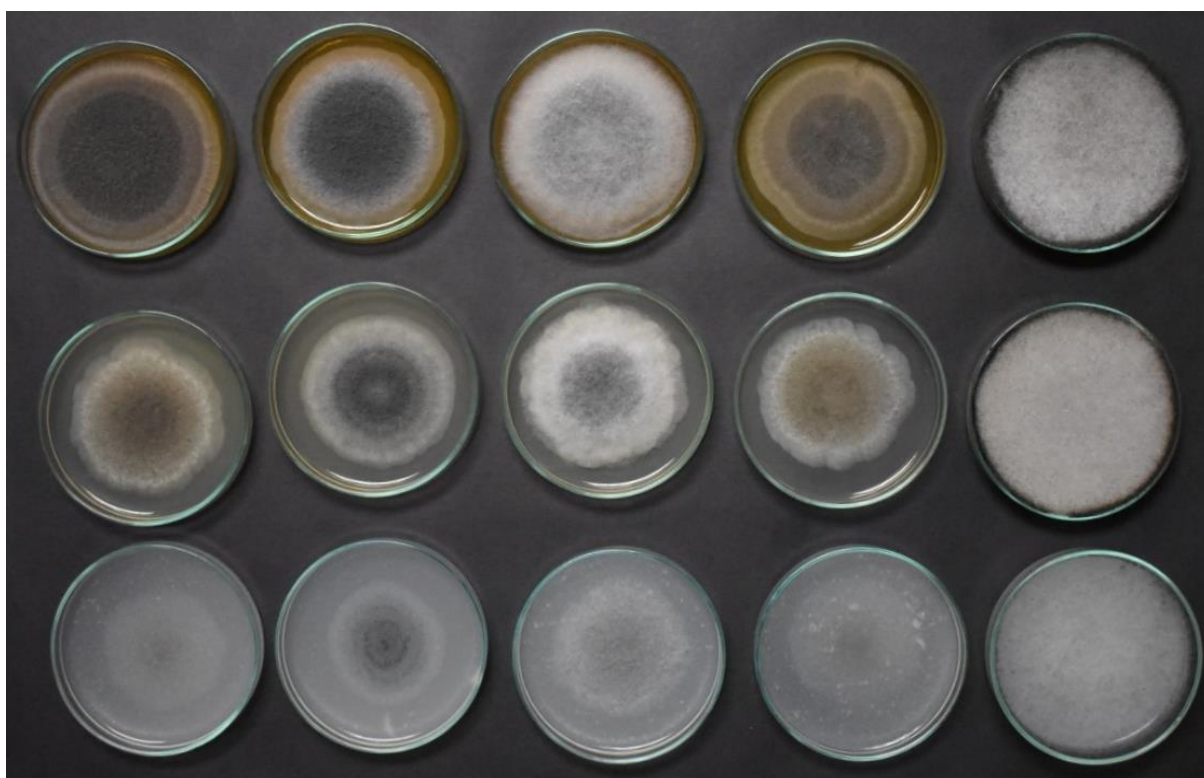


Figura 66. Colonias de aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena cultivados en MEA, PDA, OAT a 25 °C durante 4 días. Aislados columna 1= M4A1, columna 2 = M4A2, columna 3 = M2A3, columna 4 = M4A4 a Columna 5 = M4A5. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en PDA, fila 3 aislados en OA.

Los aislados M4A1, M4A3, M4A4, no crecieron en PDA ni en OA a temperatura de 37 °C y 45 °C, mientras que el aislado M4A5 no creció a 37 °C y 45 °C en ninguno de los agares utilizados. Las colonias fueron de crecimiento rápido en MEA y PDA, presentaron margen entero y el micelio tuvo crecimiento elevado en las placas. A pesar de presentar características macroscópicas de *Rhizopus oryzae*, el aislado M4A5 no creció a 37 °C.

En las Tablas 51, 52, 53 y en la Figura 67, se presentan las características macroscópicas de los aislados M4A6, M4A7, M4A8, M4A9 y M4A10, y en la Tabla 54 y Figura 68 se presentan las características microscópicas del aislado M4A10. Las colonias mostraron color gris claro, gris oscuro, blanco-gris, marrón claro en el centro y gris oscuro, blanco o marrón claro, todos de textura algodonosa, margen entero y ondulado. El aislado M4A9 creció a las temperaturas de 25 °C, 37 °C y 45 °C en MEA, PDA y OA. Los aislados M4A6, M4A7 y M4A8 no presentaron crecimiento a 37 °C y 45 °C en ninguno de los agares. El aislado M4A10 no creció a 45 °C en MEA, PDA y OA y las colonias presentaron un tamaño de 9 cm.

Con respecto a las estructuras microscópicas, el aislado M4A10 presentó dos esporangios por grupos. El esporangióforo tuvo una longitud de 180.00 – 574.30 µm, diámetro desde 2.10 a 10.60 µm y de color marrón. Las esporas tuvieron un tamaño de 6.70 a 9.50 µm y fueron alargadas con estrías.

Tabla 51. Características macroscópicas de los aislados M4A6, M4A7, M4A8, M4A9 y M4A10 de la muestra 4 de avena, trigo y arroz en MEA, CYA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.

Número de Muestra	Características		MEA			PDA			OA		
	Temperatura de cultivo (°C)		25	37	45	25	37	45	25	37	45
M4A6 Avena	Color de la superficie		Gris claro en el centro, blanco en el borde			Gris oscuro en el centro, blanco en el borde			Gris claro en el centro, blanco-gris en el borde		
	Color del reverso		Marrón oscuro			Blanco			Blanco		
	Tamaño de la colonia ¹		8.00 ± 0.00			6.73 ± 0.15			5.83 ± 0.47		
	Margen		Entero			Entero			Entero		
	Velocidad de crecimiento		Crecimiento rápido			Crecimiento medio			Crecimiento medio		
	Elevación		Elevado			Elevado			Elevado		
	Textura		Algodonoso			Algodonoso			Algodonoso		
M4A7 Trigo	Temperatura de cultivo (°C)		25	37	45	25	37	45	25	37	45
	Color de la superficie		Gris claro en el centro, blanco en el borde			Gris oscuro en el centro, blanco en el borde			Gris oscuro claro en el centro, blanco en el borde		
	Color del reverso		Marrón oscuro			Blanco			Blanco		
	Tamaño de la colonia ¹		9.00 ± 0.00			6.63 ± 0.12			5.70 ± 0.00		
	Margen		Entero			Entero			Entero		
	Velocidad de crecimiento		Crecimiento rápido			Crecimiento medio			Crecimiento medio		
	Elevación		Elevado			Elevado			Elevado		
	Textura		Algodonoso			Algodonoso			Algodonoso		

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 52. Continuación de características macroscópicas de los aislados M4A6, M4A7, M4A8, M4A9 y M4A10 de la muestra 4 de avena, trigo y arroz en MEA, CYA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 oC y 45 °C durante 4 días.

Número de Muestra	Características		MEA			PDA			OA		
	Temperatura de cultivo (°C)										
		25	37	45		25	37	45	25	37	45
M4A8 Arroz	Color de la superficie					Marrón claro en el centro, blanco en el borde			Gris claro en el centro, blanco en el borde		
	Color del reverso		Blanco gris			Blanco			Blanco		
	Tamaño de la colonia ¹		Naranja								
			8.95 ± 0.21	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	7.40 ± 0.10			5.00 ± 0.00		
	Margen		Entero			Entero			Entero		
	Velocidad de crecimiento		Crecimiento rápido			Crecimiento medio			Crecimiento medio		
	Elevación		Elevado			Elevado			Elevado		
M4A9 Avena	Textura		Algodonoso			Algodonoso			Algodonoso		
	Temperatura de cultivo (°C)		25	37	45	25	37	45	25	37	45
	Color de la superficie		Gris claro en el centro, blanco - gris claro en los bordes	Blanco-gris claro	Blanco	Blanco-gris claro	Blanco -gris claro	Blanco	Blanco - gris claro	Blanco - gris claro	No hubo crecimiento
	Color del reverso		Naranja	Naranja	Crema	blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
	Tamaño de la colonia ¹		3.31 ± 0.31	9.00 ± 0.00	3.40 ± 0.21	3.63 ± 0.14	9.00 ± 0.00	3.13 ± 0.31	2.20 ± 0.00	8.50 ± 0.00	2.00 ± 0.00
	Margen		Entero	Entero	Entero	Ondulado	Entero	Ondulado	Ondulado	Entero	Entero
	Velocidad de crecimiento		Crecimiento lento	Crecimiento rápido	Crecimiento lento	Crecimiento lento	Crecimiento rápido	Crecimiento lento	Crecimiento lento	Crecimiento rápido	Crecimiento lento
	Elevación		Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado
	Textura		Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 53. Continuación de características macroscópicas de los aislados M4A6, M4A7, M4A8, M4A9 y M4A10 de la muestra 4 de avena, trigo y arroz en MEA, CYA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.

Número de Muestra	Características		MEA			PDA			OA		
	Temperatura de cultivo (°C)										
			25	37	45	25	37	45	25	37	45
M4A10 Arroz	Color de la superficie		Blanco- gris en el centro, gris-negro en el borde	Gris		Blanco- gris en el centro, gris-negro en el borde	Gris		Blanco- gris	Blanco- gris	
	Color del reverso		Crema	Crema	No hubo crecimiento	Blanco	Blanco	No hubo crecimiento	Blanco	Blanco	No hubo crecimiento
	Tamaño de la colonia ¹		9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00		9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00		9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	
	Margen		Entero	Entero		Entero	Entero		Entero	Entero	
	Velocidad de crecimiento		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	
	Elevación		Elevado	Elevado		Elevado	Elevado		Elevado	Elevado	
	Textura		Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso	

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

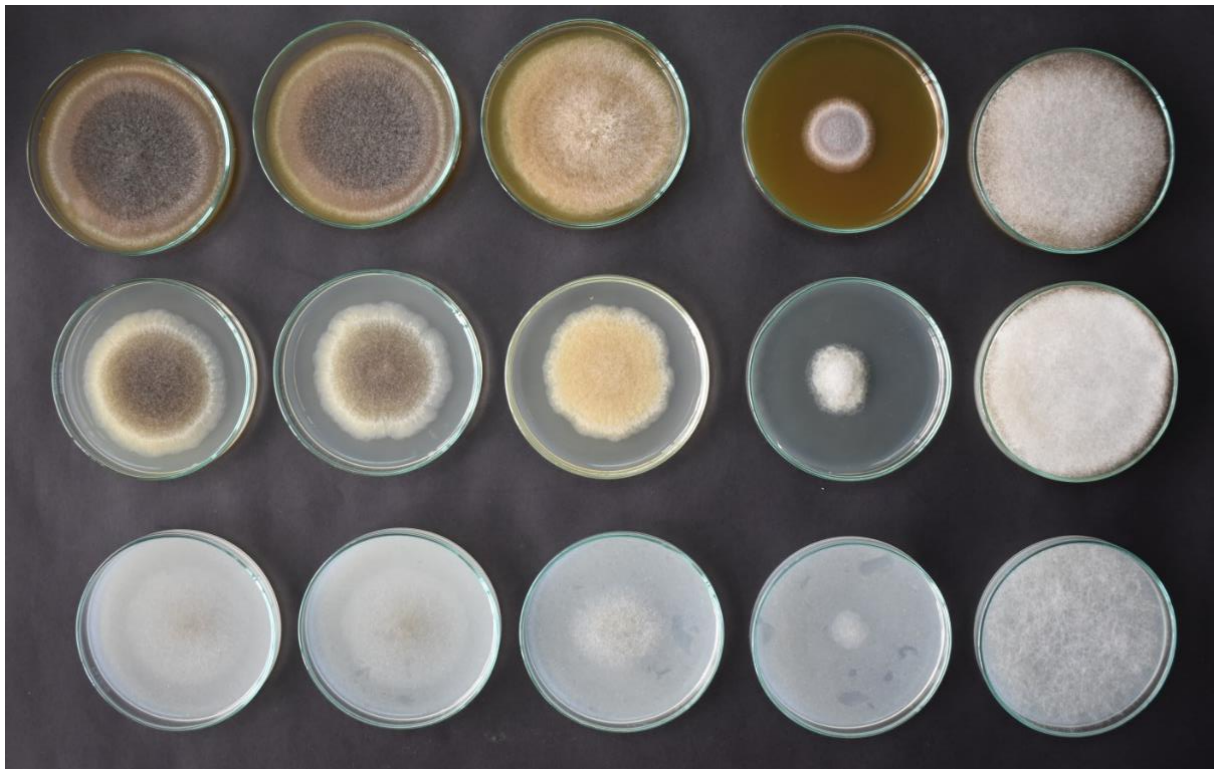


Figura 67. Colonias de aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena cultivados en MEA, PDA, OAT a 25 oC durante 4 días. Aislados columna 1= M4A6, columna 2 = M4A7, columna 3 = M4A8, columna 4 = M4A9 a Columna 5 = M4A10. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en PDA, fila 3 aislados en OA.

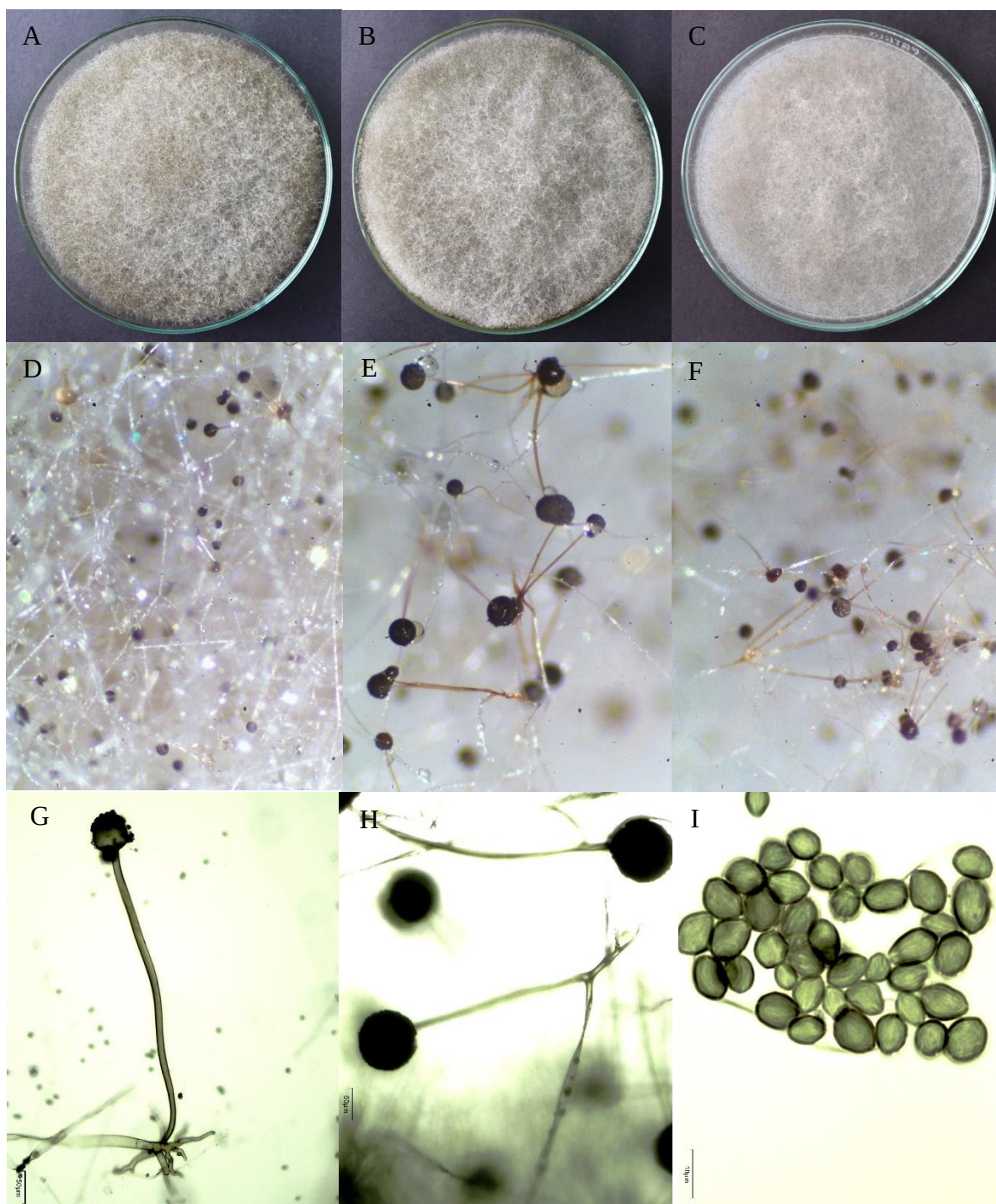


Figura 68. Colonias de aislado M4A10 de *Rhizopus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C durante 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C por 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiósporas cultivados en agar MEA a 25 °C. G barra 50 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm.

Tabla 54. Características microscópicas del aislado M4A10 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA cultivados a 25 °C durante 4 días.

Características microscópicas	Aislado M4A10
Números de esporangios por grupos	2
largo del esporangióforo (µm)	180, 00 - 574,30
Diámetro del esporangióforo (µm)	2,10 - 10,60
Diámetro de la columela (µm)	28,00 - 35,00
Diámetro del esporangio (µm)	6,00 - 38,40
Existencia de clamidosporas existentes	NO
Tamaño de las clamidosporas existentes (ancho X largo µm)	NO
Tamaño de las esporas ¹	6,70 - 9,50
ornamentación de las esporas	Alargadas con estrías
¹ µm, promedio de 30 medidas	

En las Tablas 55 a 57 y en la Figuras 69 a 74, se muestran las características macroscópicas y microscópicas de los aislados M4A11, M4A12, M7A1, M7A2 y M7A3. Las colonias presentaron color gris claro, gris oscuro, blanco-gris, blanco en el centro y gris oscuro, gris claro y blanco en el borde, con textura algodonosa y margen entero. Todos los aislados crecieron a 25 y 37 °C, pero no crecieron a 45 °C en MEA, PDA y OA y presentaron un tamaño de 9 cm. En base a esta característica, se consideraron a todos los aislados como presuntivos de *Rhizopus oryzae*.

Con respecto a las estructuras microscópicas, presentaron entre 2 y 3 esporangios por grupos. El esporangióforo tuvo una longitud de 213.10 a 2894.40 µm, un diámetro entre 4.70 a 18.60 µm y fue de color marrón. Hubo presencia de clamidosporas en el aislado M7A1, con esporas de tamaño entre 6.50 a 26.60 µm, alargadas con estrías (Tabla 58).

Tabla 55. Características macroscópicas de los aislados M4A11, M4A12, M7A1, M7A2 y M7A3 de la muestra 4 y 7 de avena, trigo y arroz en MEA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.

Número de Muestra	Características		MEA			PDA			OA	
	Temperatura de cultivo (°C)	25	37	45	25	37	45	25	37	45
M4A11 avena	Color de la superficie	Gris claro en el centro, gris oscuro-negro en el borde	Gris oscuro en el centro, negro en el borde		Blanco en el centro, gris claro en el borde	Gris oscuro en el centro, negro en el borde		Blanco	Blanco-gris	
	Color del reverso	Naranja	Naranja		Blanco	Blanco		Blanco	Blanco	
	Tamaño de la colonia ¹	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento	9.00 ± 0,00	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento
	Margen	Entero	Entero		Entero	Entero		Entero	Entero	
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	
	Elevación	Elevado	Elevado		Elevado	Elevado		Elevado	Elevado	
	Textura	Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso	
M4A12 arroz	Temperatura de cultivo (°C)	25	37	45	25	37	45	25	37	45
	Color de la superficie	Gris claro en el centro, gris oscuro-negro en el borde	Gris oscuro en el centro, negro en el borde		Blanco en el centro, gris claro en el borde	Gris oscuro en el centro, negro en el borde		Blanco	Blanco-gris	
	Color del reverso	Naranja	Naranja	No hubo crecimiento	Blanco	Blanco	No hubo crecimiento	Blanco	Blanco	No hubo crecimiento
	Tamaño de la colonia ¹	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00		9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00		9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	
	Margen	Entero	Entero		Entero	Entero		Entero	Entero	
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	
	Elevación	Elevado	Elevado		Elevado	Elevado		Elevado	Elevado	
	Textura	Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso	

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 56. Continuación de características macroscópicas de los aislados M4A11, M4A12, M7A1, M7A2 y M7A3 de la muestra 4 y 7 de avena, trigo y arroz en MEA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.

Número de Muestra	Características		MEA			PDA			OA	
	Temperatura de cultivo (°C)	25	37	45	25	37	45	25	37	45
M7A1 trigo	Color de la superficie	Gris claro en el centro, gris oscuro-negro en el borde	Gris oscuro en el centro, negro en el borde		Blanco en el centro, gris claro en el borde	Gris oscuro en el centro, negro en el borde		Blanco	Blanco-gris	
	Color del reverso	Naranja	Naranja		Blanco	Blanco		Blanco	Blanco	
	Tamaño de la colonia ¹	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento
	Margen	Entero	Entero		Entero	Entero		Entero	Entero	
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	
	Elevación	Elevado	Elevado		Elevado	Elevado		Elevado	Elevado	
	Textura	Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso	
M7A2 arroz	Temperatura de cultivo (°C)	25	37	45	25	37	45	25	37	45
	Color de la superficie	Gris claro en el centro, gris oscuro-negro en el borde	Gris oscuro en el centro, negro en el borde		Blanco	Blanco en el centro, gris claro en el borde		Blanco	Blanco	
	Color del reverso	Naranja	Naranja	No hubo crecimiento	Blanco	Blanco	No hubo crecimiento	Blanco	Blanco	No hubo crecimiento
	Tamaño de la colonia ¹	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00		9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00		9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	
	Margen	Entero	Entero		Entero	Entero		Entero	Entero	
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	
	Elevación	Elevado	Elevado		Elevado	Elevado		Elevado	Elevado	
	Textura	Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso	

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 57. Continuación de características macroscópicas de los aislados M4A11, M4A12, M7A1, M7A2 y M7A3 de la muestra 4 y 7 de avena, trigo y arroz en MEA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.

Número de Muestra	Características		MEA			PDA			OA	
	Temperatura de cultivo (oC)	25	37	45	25	37	45	25	37	45
M7A3 trigo	Color de la superficie	Blanco- gris	Blanco- gris		Blanco	Blanco- gris		Blanco	Blanco	
	Color del reverso	Crema	Crema		Blanco	Blanco		Blanco	Blanco	
	Tamaño de la colonia (cm ± Ds)	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento
	Margen	Entero	Entero		Entero	Entero		Entero	Entero	
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	
	Elevación	Elevado	Elevado		Elevado	Elevado		Elevado	Elevado	
	Textura	Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso	

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

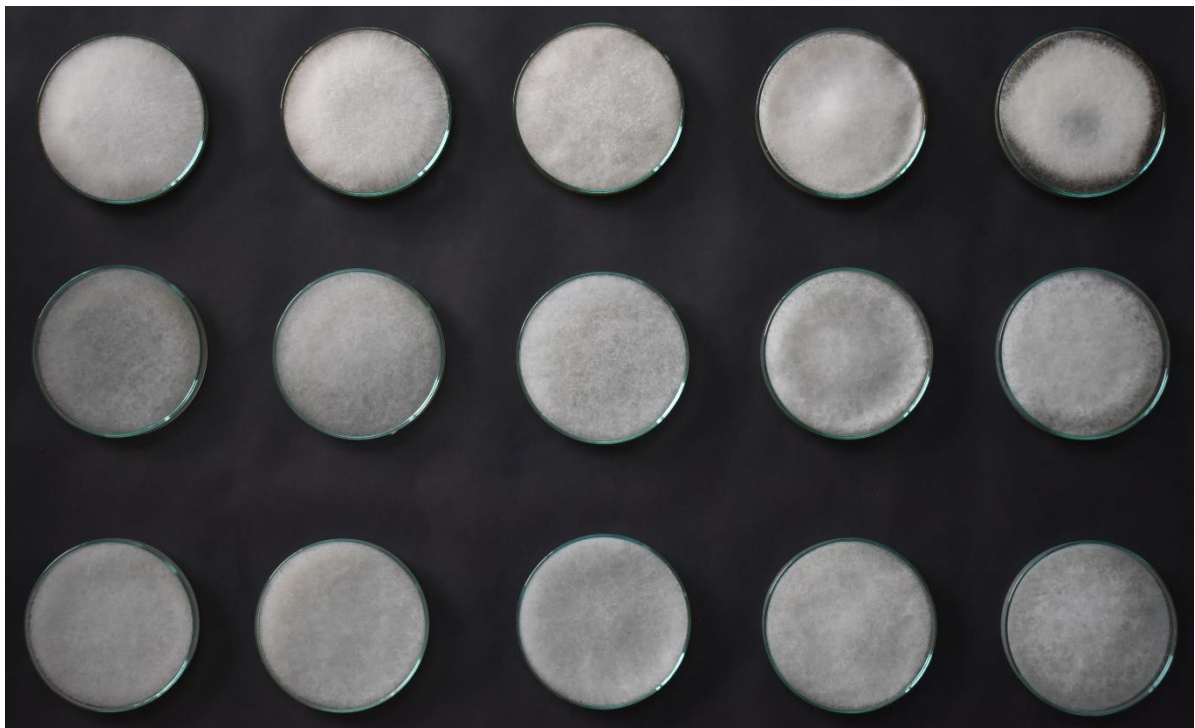


Figura 69. Colonias de aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena cultivados a 25 °C durante 4 días. Aislados columna 1= M4A11, columna 2 = M4A12, columna 3 = M7A1, columna 4 = M7A2 a Columna 5 = M7A3. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en PDA, fila 3 aislados en OA.

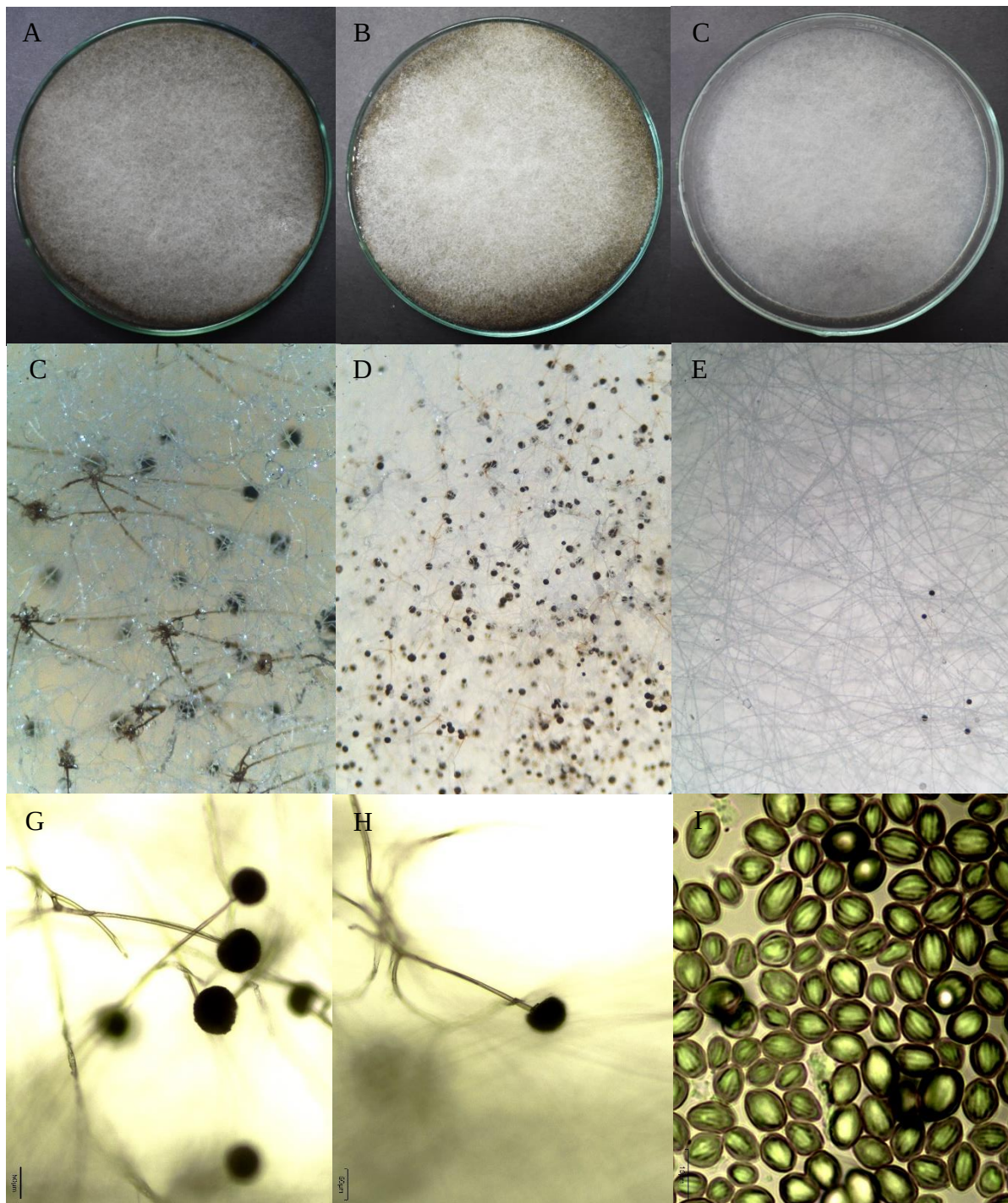


Figura 70. Colonias de aislado M4A11 de *Rhizopus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C por 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C durante 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiosporas cultivados en agar MEA a 25 °C. G barra 50 μ m. H barra 50 μ m. I barra 10 μ m.

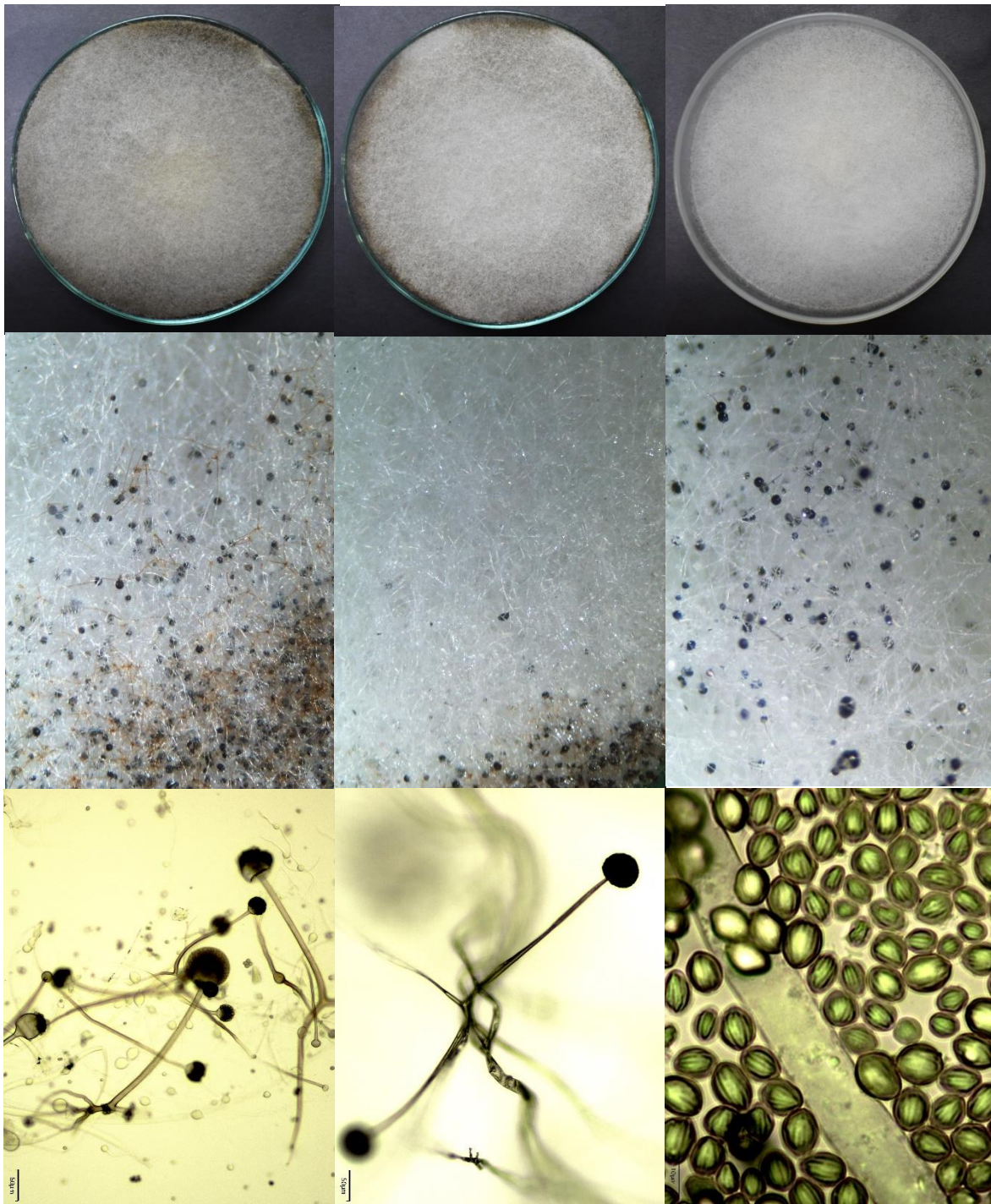


Figura 71. Colonias de aislado M4A12 de *Rhizopus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C por 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C durante 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiosporas cultivados en agar MEA a 25 °C. G barra 50 μ m. H barra 50 μ m. I barra 10 μ m.

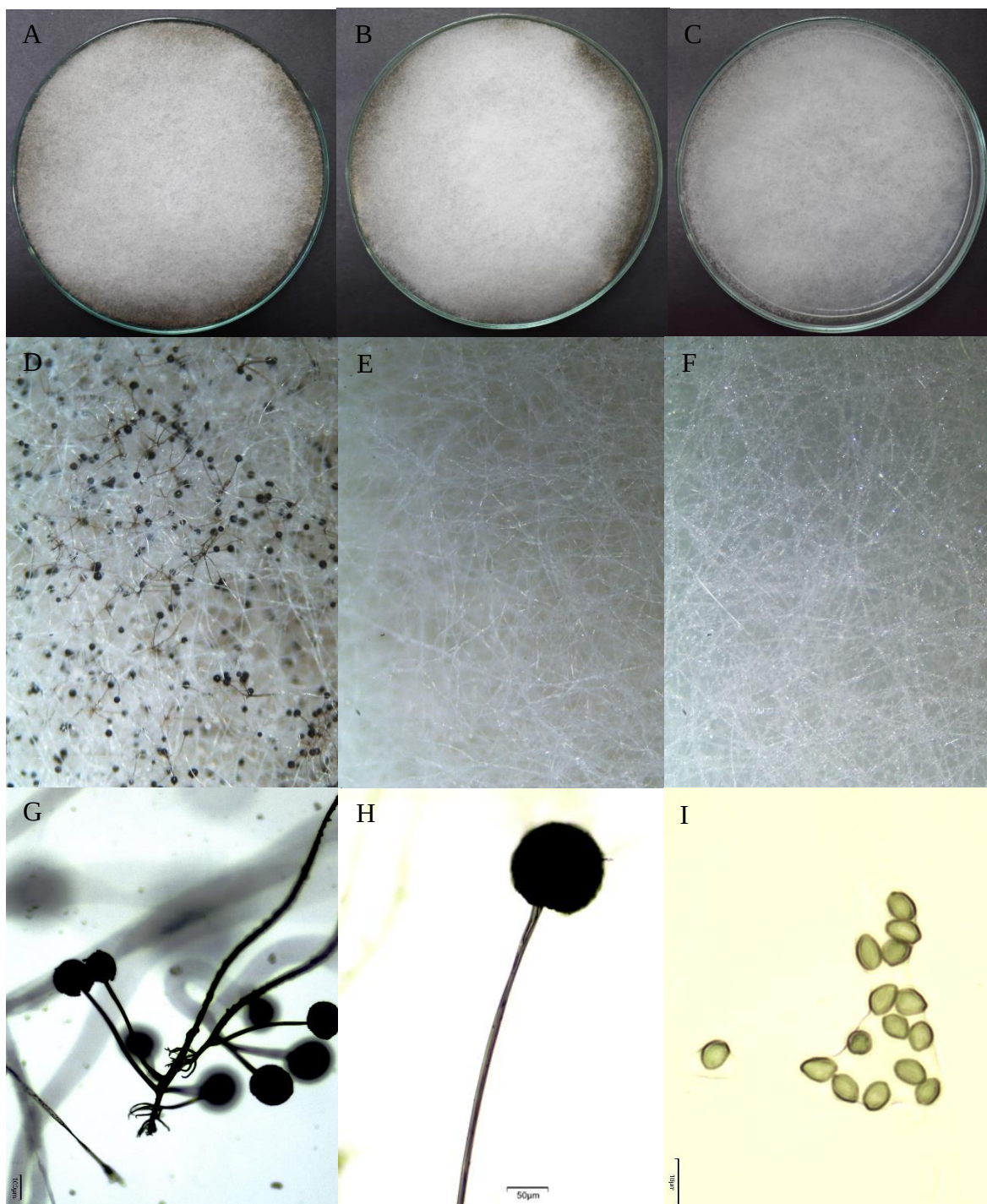


Figura 72. Colonias de aislado M7A1 de *Rhizopus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C por 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C durante 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiosporas cultivados en agar MEA a 25 °C durante 4 días. G barra 100 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm.

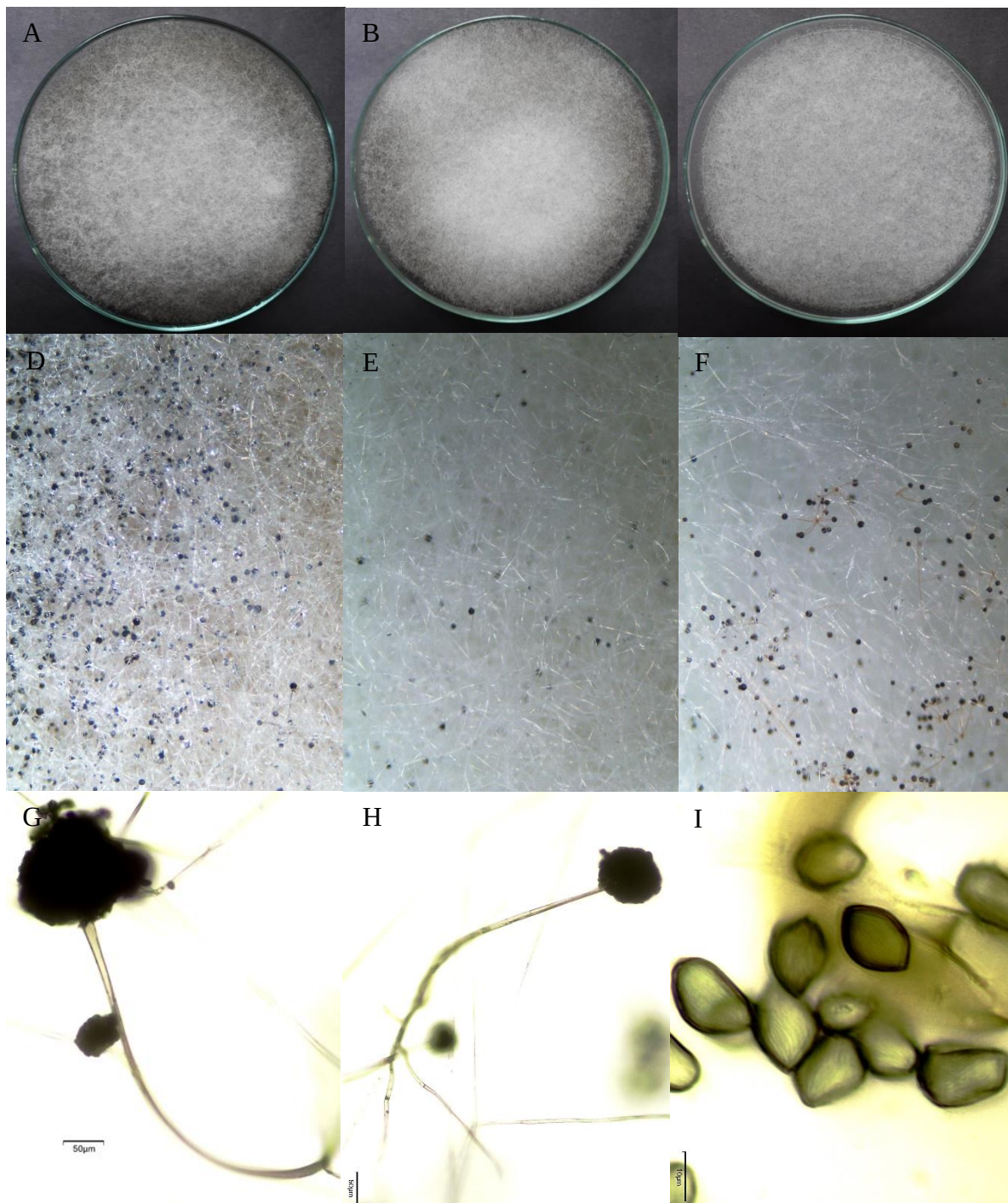


Figura 73. Colonias de aislado M7A2 de *Rhizopus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C por 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 oC durante 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiósporas cultivados en agar MEA a 25 °C. G barra 50 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm.

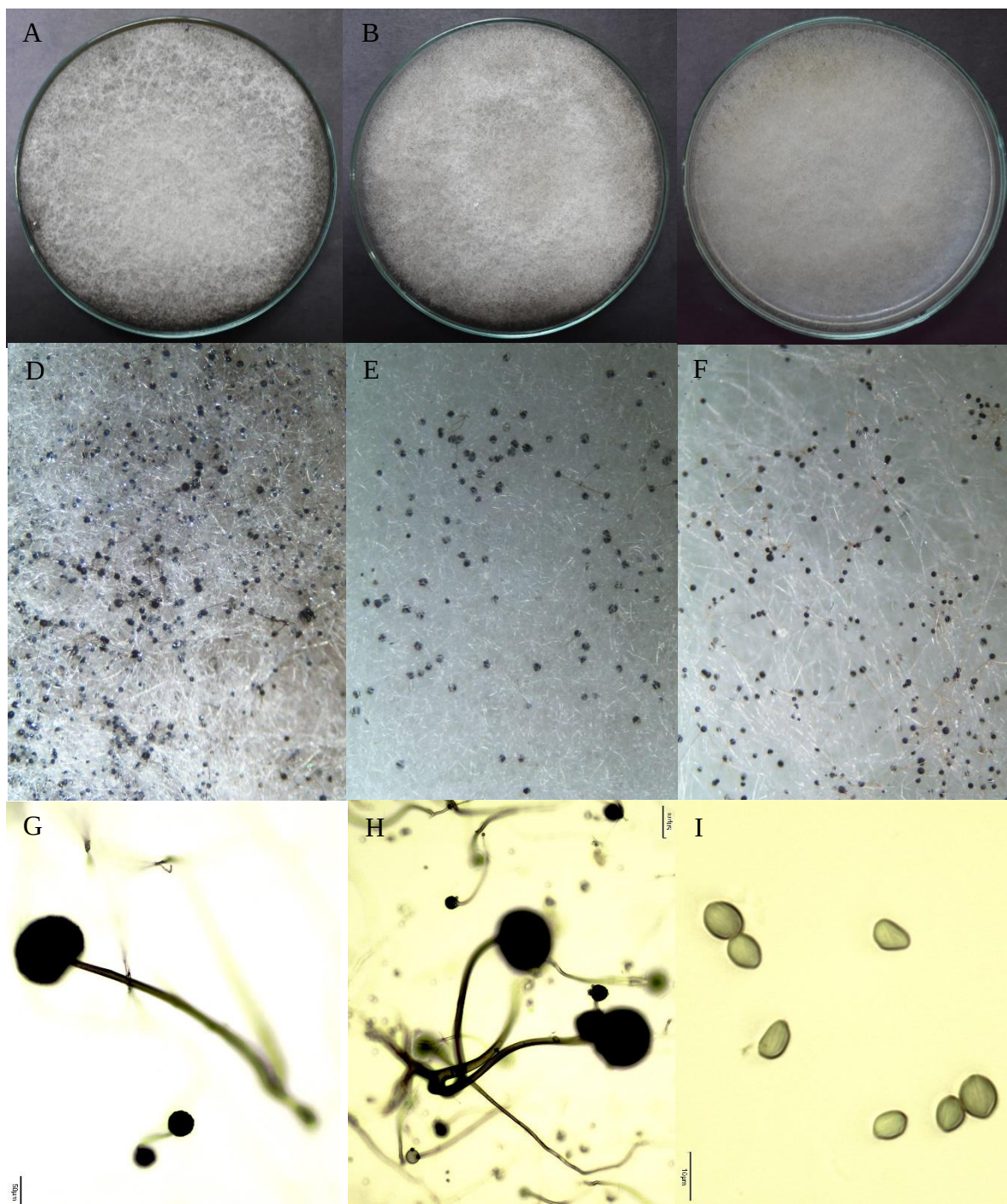


Figura 74. Colonias de aislado M7A3 de *Rhizopus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C por 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C durante 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiosporas cultivados en MEA a 25 °C. G barra 50 µm. H barra 50 µm. I barra 10 µm.

Tabla 58. Características microscópicas del aislado M2A31, M2A32, M7A1, M7A2 Y M7A3 provenientes de la muestra 2 de avena en MEA cultivados a 25 °C por 4 días.

Características Microscópicas	Identificación del aislado				
	M2A31	M2A32	M7A1	M7A2	M7A3
Números de esporangios por grupos	2	3	2	3	3
largo del esporangióforo	650.00 – 1495.00	213.10 – 394.50	249.20 – 2894.40	223.20 – 823.80	262.30 -650.70
Diámetro del esporangióforo	7.50 – 12.10	5.70 – 10.00	8.00 – 18.60	4.70 – 12.80	4.70 – 13.00
Diámetro de la columela	-	-	-	-	-
Diámetro del esporangio	78.10 – 205.70	64.50 – 120.30	76.4 – 81.8	91.00 – 130.80	49.20 – 115.50
Existencia de clamidosporas existentes	No	No	Si, pocas	No	No
Tamaño de las clamidosporas existentes (ancho X LARGO)	-	-	10.00 X 8.00 – 15.20 X 10.30	-	-
Tamaño de las esporas ¹	7.80 – 13.20	7.80 – 12.00	8.10 – 10.30	10.20 – 26.60	6.50 – 9.00
ornamentación de las esporas	Alargadas con estrías	Alargadas con estrías	Alargadas con estrías	Alargadas con estrías	Alargadas con estrías

¹ µm, promedio de 30 medidas

En las Tablas 59, 60 y en la Figura 75 se muestran las características macroscópicas de los aislados M8A1, M10A1, M10A2 y M10A3. En la Tabla 61 y en la Figura 76 se presentan las características microscópicas del aislado M10A1. Las colonias presentaron colores gris claro, blanco-gris, marrón claro en el centro, gris oscuro-negro, gris oscuro, negro en el borde, textura algodonosa, margen entero y ondulado. Los aislados M8A1 y M3A10 no crecieron a las temperaturas de 37 °C y 45 °C en MEA, PDA y OA. El aislado M10A2 creció en todas las temperaturas y todos los agares utilizados. Las colonias del aislado M10A1 crecieron a 25 y 37 °C, presentaron un tamaño de 10 cm en todos los agares utilizados y se las consideraron presuntivos de *Rhizopus oryzae*.

En cuanto a las estructuras microscópicas, el aislado M10A1 presentó 2 esporangios por grupos. El esporangióforo tuvo una longitud de 1003.30 a 1862.60 µm, diámetro de 7.50 a 9.80 µm y fueron de color marrón. No hubo presencia de clamidosporas y el tamaño de las esporas estuvo entre 6.20 a 10.70 µm y fueron alargadas con estrías.

Tabla 59. Características macroscópicas de los aislados M8A1, M10A1, M10A2 y M10A3 de la muestra 8 y 10 de arroz y trigo en MEA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.

Número de Muestra	Características		MEA			PDA			OA	
	Temperatura de cultivo (°C)	25	37	45	25	37	45	25	37	45
M8A1 Arroz	Color de la superficie	Gris claro en el centro, negro en el borde			Gris claro en el centro, negro en el borde			Blanco en el centro, gris oscuro-negro en el borde		
	Color del reverso	Naranja			Crema			Blanco		
	Tamaño de la colonia ¹	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	9.00 ± 0.00	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento
	Margen	Entero			Entero			Entero		
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento rápido			Crecimiento rápido			Crecimiento rápido		
	Elevación	Elevado			Elevado			Elevado		
	Textura	Algodonoso			Algodonoso			Algodonoso		
M10A1 trigo	Temperatura de cultivo (°C)	25	37	45	25	37	45	25	37	45
	Color de la superficie	Gris claro en el centro, gris oscuro-negro en el borde	Gris claro en el centro, marrón en el borde		Gris claro en el centro, gris oscuro-negro en el borde	Gris claro en el centro, gris oscuro en el borde		Gris claro en el centro, gris oscuro-negro en el borde	Gris claro en el centro, gris oscuro en el borde	
	Color del reverso	Naranja	Naranja	No hubo crecimiento	Blanco	Blanco	No hubo crecimiento	Blanco	Blanco	No hubo crecimiento
	Tamaño de la colonia ¹	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00		9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00		9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	
	Margen	Entero	Entero		Entero	Entero		Entero	Entero	
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido		Crecimiento rápido	Crecimiento rápido	
	Elevación	Elevado	Elevado		Elevado	Elevado		Elevado	Elevado	
	Textura	Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso		Algodonoso	Algodonoso	

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS

Tabla 60. Continuación de características macroscópicas de los aislados M8A1, M10A1, M10A2 y M10A3 de la muestra 8 y 10 de arroz y trigo en MEA, PDA, Y OA cultivados a 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 4 días.

Número de Muestra	Características	MEA			PDA			OA		
	Temperatura de cultivo (°C)	25	37	45	25	37	45	25	37	45
M10A2 arroz	Color de la superficie	Gris claro en el centro, gris oscuro-negro en el borde	Blanco -gris claro	Marrón claro	Blanco- gris claro	Blanco- gris claro	Blanco- gris claro	Blanco- gris claro	Blanco- gris claro	Blanco- gris claro
	Color del reverso	Naranja	Naranja	Naranja	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
	Tamaño de la colonia ¹	5.50 ± 0.30	9.00 ± 0.00	7.50 ± 0.88	3.23 ± 0.06	9.00 ± 0.00	3.13 ± 0.06	2.93 ± 0.51	9.00 ± 0.00	2.93 ± 0.16
	Margen	Ondulado	Entero	Ondulado	Ondulado	Entero	Ondulado	Ondulado	Entero	Ondulado
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento medio	Crecimiento rápido	Crecimiento medio	Crecimiento lento	Crecimiento rápido	Crecimiento lento	Crecimiento lento	Crecimiento rápido	Crecimiento lento
	Elevación	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado
	Textura	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso	Algodonoso
M10A3 arroz	Temperatura de cultivo (°C)	25	37	45	25	37	45	25	37	45
	Color de la superficie	Blanco -gris claro en el centro, negro en el borde			Blanco en el centro, negro en el borde			Blanco- gris claro		
	Color del reverso	Naranja	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	Blanco	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	Blanco	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento
	Tamaño de la colonia ¹	9.00 ± 0.00			9.00 ± 0.00			9.00 ± 0.00		
	Margen	Entero			Entero			Entero		
	Velocidad de crecimiento	Crecimiento rápido			Crecimiento rápido			Crecimiento rápido		
	Elevación	Elevado			Elevado			Elevado		
	Textura	Algodonoso			Algodonoso			Algodonoso		

¹ cm, promedio de 9 colonias ± DS



Figura 75. Colonias de aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae* provenientes de la muestra 2 de avena cultivados a 25 °C durante 4 días. Aislados columna 1= M8A1, columna 2 = M10A1, columna 3 = M10A2 y columna 4 = M10A3. Fila 1 aislados en MEA, fila 2 aislados en PDA, fila 3 aislados en OA.

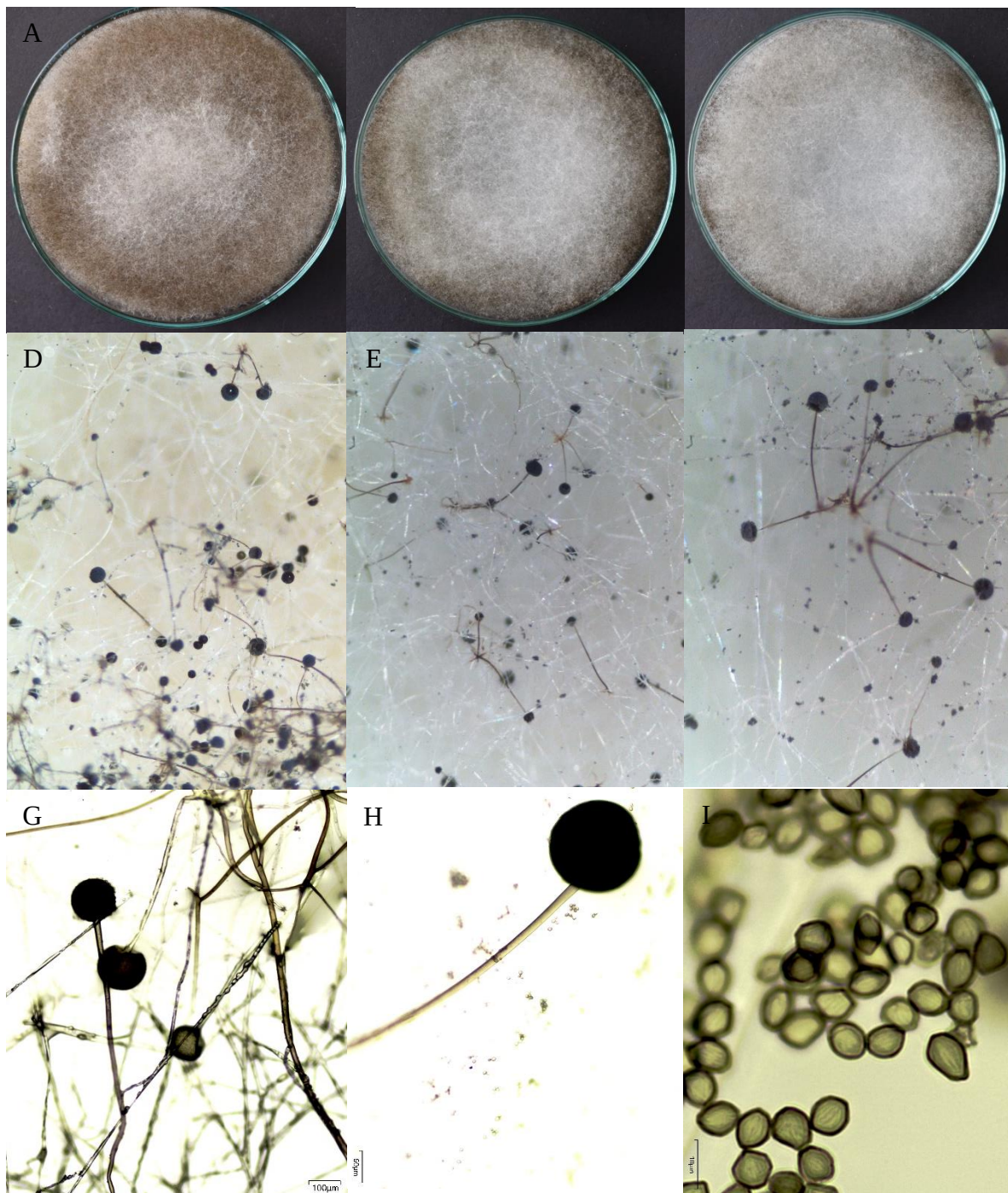


Figura 76. Colonias de aislado M10A1 de *Rhizopus oryzae* presuntivos. A-C. Colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 37 °C por 4 días. D-E. Textura de las colonias cultivadas en MEA, PDA y OA a 25 °C durante 4 días. F-H. Esporangióforo y esporangiosporas cultivados en agar MEA a 25 °C. G barra 100 μm. H barra 50 μm. I barra 10 μm.

Tabla 61. Características microscópicas del aislado M10A1 provenientes de la muestra 2 de trigo en MEA cultivados a 25 °C por 4 días.

Características microscópicas	Aislado M10A1
Números de esporangios por grupos	2
largo del esporangióforo (µm)	1003.30 – 1862.60
Diámetro del esporangióforo (µm)	7.50- 9.80
Diámetro de la columela (µm)	7.50 – 10.00
Diámetro del esporangio (µm)	104.90 – 118.90
Existencia de clamidosporas existentes	No
Tamaño de las clamidosporas existentes (ancho X Largo µm)	No
Tamaño de las esporas ¹	6.20 – 10.70
ornamentación de las esporas	Alargadas con estrías

¹ µm, promedio de 30 medidas

De 14 aislados obtenidos de arroz, avena y trigo, 7 presentaron características macroscópicas y microscópicas típica de *Rhizopus oryzae*, así mismo crecieron a 37 °C y no crecieron a 45 °C (Tabla 62).

Al respecto, Kwon et al. (2015) y Febriani et al. (2018) indican que la temperatura es una forma de distinguir a *Rhizopus oryzae* de *Rhizopus stolonifer*, ya que el primer hongo es capaz de crecer entre 37 y 40 °C, pero no a 45 °C, mientras que el segundo crece en el rango de 25 a 30 °C y no a 37 °C. Por esta razón, se utilizó esta característica fisiológica como distintiva.

Tabla 62. Aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae* con crecimiento a 37 °C y sin crecimiento a 45 °C en agar MEA, PDA, OA durante 4 días.

Muestra	Crecimiento a 37 °C	Crecimiento a 45 °C
M4A10 Arroz	X	-
M2A11 avena	X	-
M2A12 arroz	X	-
M7A1 trigo	X	-
M7A2 arroz	X	-
M7A3 trigo	X	-
M10A1 arroz	X	-
Total	7	7

Los siete aislados con características macroscópicas, microscópicas y fisiológicas presentaron un tamaño de las colonias de 9 cm en agar PDA, MEA y AO, con margen entero, textura algodonosa, crecimiento rápido y color gris claro, gris oscuro y blanco en el borde.

En lo que refiere a las características microscópicas, los aislados presuntivos mostraron entre 2 y 3 esporangios por grupos. El esporangióforo tuvo un rango de longitud entre 180.00 y 2894.40 μm , con un diámetro de 2.10 a 18.60 μm , de color marrón. Los esporangios alcanzaron un diámetro de 205.70 μm . Las esporas tenían un tamaño de 6.20 a 26.60 μm y eran alargadas con estrías.

Los 7 aislados presuntivos presentaron características que coinciden con las indicadas por Howard (2002), en la clave de identificación a nivel de género para la especie *Rhizopus oryzae* de Schipper (1984) y por Schipper y Stalpers (1984). Las características tomadas en cuenta en esta clave de identificación fueron, esporangióforo de más de 1000 μm de longitud, esporangio por arriba de 100 μm de diámetro, no crecen a 45 °C y crecen a 37 °C.

Rhizopus oryzae tiene una distribución amplia y ha sido aislado de diversas muestras, tales como tempeh, frutos como, pepino, guayaba, cereales tales como avena, trigo, arroz y avena, leguminosas y es utilizado en diversos tipos de alimentos fermentados, que sirven como fuente de aislamiento, entre otros (Kwon et al., 2015; Kurniawati, Indrati & Sardjono, 2014; Cantabrana, Perise, & Hernández, 2015; Hartanti, Rahayu & Hidayat, 2015; Londoño et al., 2017; Febriani et al., 2018) en consecuencia, los aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae* estuvieron presente en arroz, avena y trigo utilizados para su aislamiento.

En referencia a las características macroscópicas encontradas, son similares a las descritas por Pit & Hocking (2022) en MEA y PDA, quienes indican que las colonias llenan completamente las placas y que el micelio es de color de gris con esporangios de color gris a negro, lo cual les da su color característico. Tienen texturas algodonosas y bordes enteros, con una tasa de crecimiento de 45 mm/día a 25 °C (Kwon et al., 2015; Cruz et al., 2017; Khokhar et al., 2019a)

Las características microscópicas de los aislados de *Rhizopus oryzae* coinciden con los reportes de Hernández et al. (2006), Kurniawati, Indrati & Sardjono (2014) ; Kwon et al. (2015) y Khokhar et al. (2019b), quienes indican que longitud del esporangióforo está entre 612 y 2337 μm , con un diámetro desde 7.0 a 20.0 μm , y se agrupan de 3 a 5 esporangios. El diámetro de las esporas fue mayor que lo reportado, encontrándose medidas entre 5.0 y 14.40. Estos autores reportaron esporangios de color negro, gris-negro y marrón.

En la Figura 77 se observan los geles de electroforesis obtenidos para los aislados presuntivos M1A2, M1A5, M2A1, M2A14, M2A15, M2A16, M2A20, M3A1, M3A10 y M6A5 de *Aspergillus flavus/oryzae*, los amplicones obtenidos, utilizando la región ITS tuvieron un tamaño molecular de aproximadamente 600 pb. Estos aislados fueron elegidos ya que no produjeron aflatoxinas y presentaron características macroscópicas y microscópicas de la especie de interés.

En la figura 78 se observa el gel de electroforesis obtenido para los aislados presuntivos M4A10, M2A31, M2A32, M7A1, M7A2, M7A3 y M10A1 de *Rhizopus oryzae*. Los amplicones obtenidos tuvieron un tamaño de aproximadamente de 1500 pb.

El tamaño del amplicón de la región ITS1-5.8-ITS2 obtenido coincide con lo reportado por Yazdani et al (2011), quienes obtuvieron un tamaño de amplicón en el rango 550 a 597 pb para *A. flavus* y 602pb para *Aspergillus oryzae*. Así mismo, Lee et al. (2014) lograron identificar a nivel de género los aislados de *Aspergillus* provenientes de pasta de soja (Doenjang Koji) con un tamaño de amplicón de 578 bp.

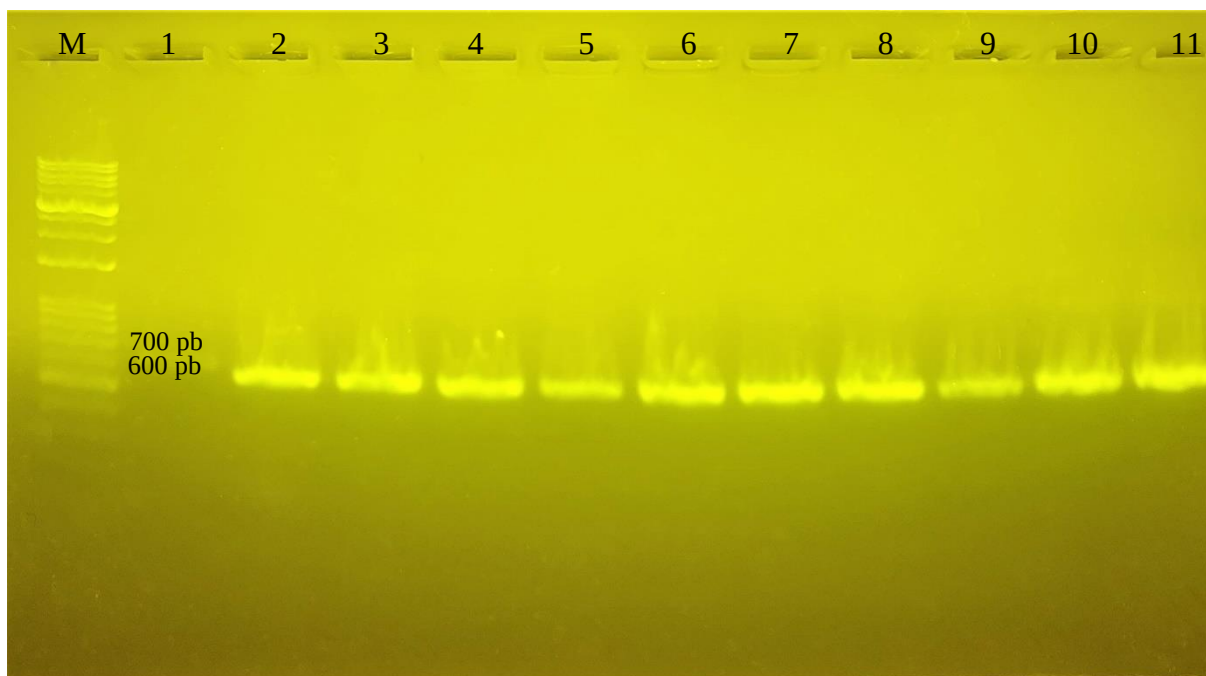


Figura 77. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de la región ITS1-5.8-ITS2 de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae*. Línea 2 a línea 11, aislados M1A2, M1A5, M2A1, M2A14, M2A15, M2A16, M2A20, M3A1, M3A10 y M6A5; línea 1, control negativo; M, marcador de peso molecular 1Kb.

Riaz et al. (2018) reportaron un tamaño de amplicón de *Aspergillus sp* de 538 pb, para *Aspergillus flavus* de 556 pb y para *Aspergillus oryzae* de 568 pb. De igual manera, Magnani et al., (2005) y Al aayadi et al. (2020) obtuvieron una banda de aproximadamente 600 bp para todos los *Aspergillus spp* estudiados.

Los resultados que refieren al tamaño de la banda amplificada utilizando los primer V9G y LR3 están de acuerdo con lo reportado por Cruz et al. (2017), quienes encontraron un tamaño de fragmento de 1500 pb aproximadamente. Este fragmento incluye la región completa ITS1-5.8S-ITS2 y la región D1/D2 de la subunidad 28S (LSU) ribosomal. Las secuencias consenso obtenidas para la región ITS1-5.8S-ITS2 estuvieron alrededor de las 600 pb.

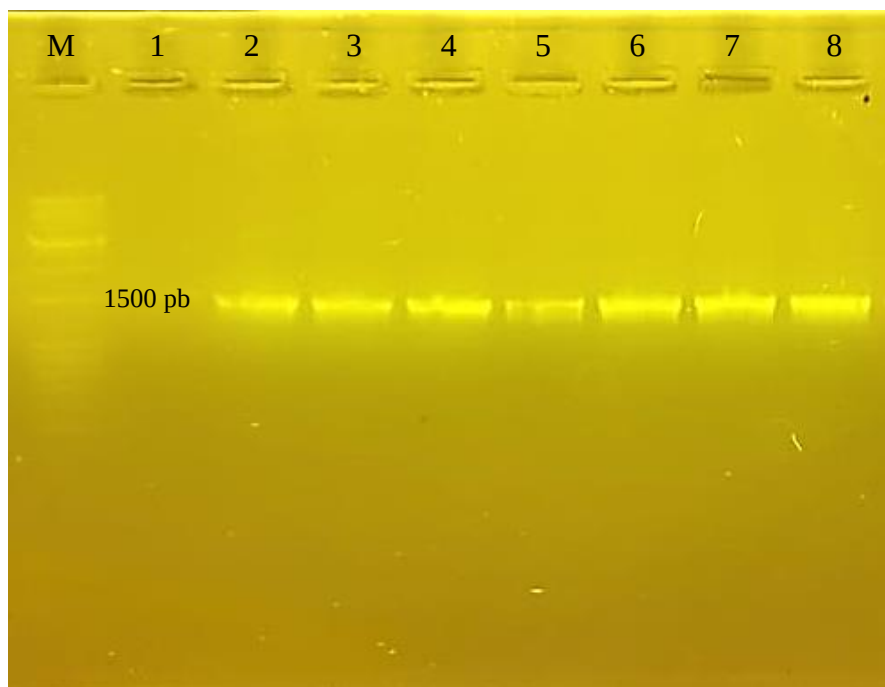


Figura 78. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de la región de amplificación V9G y LR3 de aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae*. Línea 2 a línea 8, M4A10, M2A31, M2A32, M7A1, M7A2, M7A3, M10A1; línea 1, control negativo; marcador de peso molecular 1Kb.

Los árboles filogenéticos construidos para cada grupo de aislados utilizando la región ITS1-5.8S-ITS2 se muestran en la Figura 79 y 80. Se puede observar que los aislados M1A2, M1A5, M3A1 y M6A5 alinearon con *Aspergillus oryzae* CBS 466.91 y con *Aspergillus fasciculatus* CBS 110.55, sinónimo de *Aspergillus flavus* (Barbosa et al., 2022), formando un clado. En consecuencia, no se puede resolver la identificación con el árbol filogenético. Con respecto a los aislados M7A1, M7A3 y M10A1, se alinearon con *Rhizopus oryzae* NRRL 1469, por ende, se identifican con esta especie de hongo.

Es de hacer notar que los aislados presuntivos de *Aspergillus flavus/oryzae* M2A14, M2A15, M2A16, M2A20 y M3 A10 y de *Rhizopus oryzae* M4A10, M2A31 y M2A32 no fueron incluidos en los árboles filogenéticos respectivos debido a que el porcentaje de coincidencia utilizado para la Región ITS1-ITS4 estuvo por debajo de 99.6, considerándose no óptimos para su clasificación.

Los árboles filogenéticos de aislados presuntivos de *Aspergillus flavus/oryzae* están acorde a los reportados por Prencipe et al. (2018) quienes encontraron una identificación a nivel de especie inconsistente, ya que sus aislados se agrupaban en un clado con *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus oryzae* var. *Effusus*. Así mismo, Varga Frisvad & Samson (2011) y Frisvad et al. (2019) encontraron agrupados en un clado las alineaciones de *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fasciculatus*.

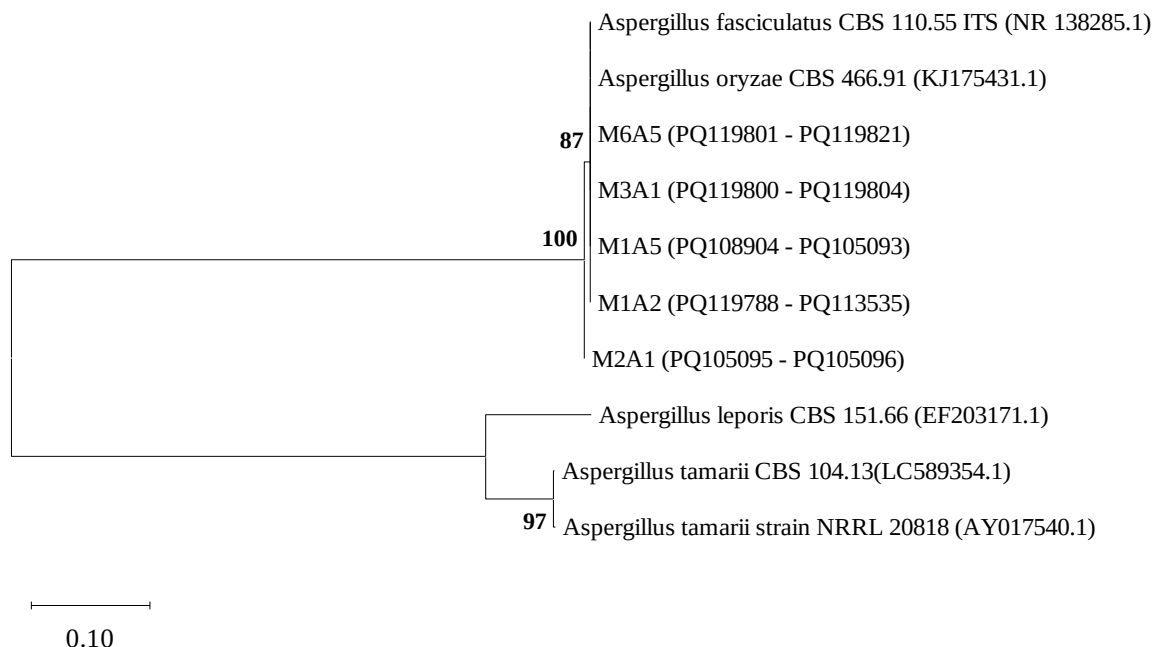


Figura 79. Árbol filogenético basado en el método de Neighbor Joining de las secuencias obtenidas para la región ITS1-5.8S-ITS2 de aislados de especies de *Aspergillus* y de cepas tipos de referencia de NCBI. *Aspergillus tamarii* fue utilizado como outgroup. Los valores de probabilidad de los nodos para cada clado indican el porcentaje de las réplicas del análisis de 1000 bootstraps que soportan ese clado.

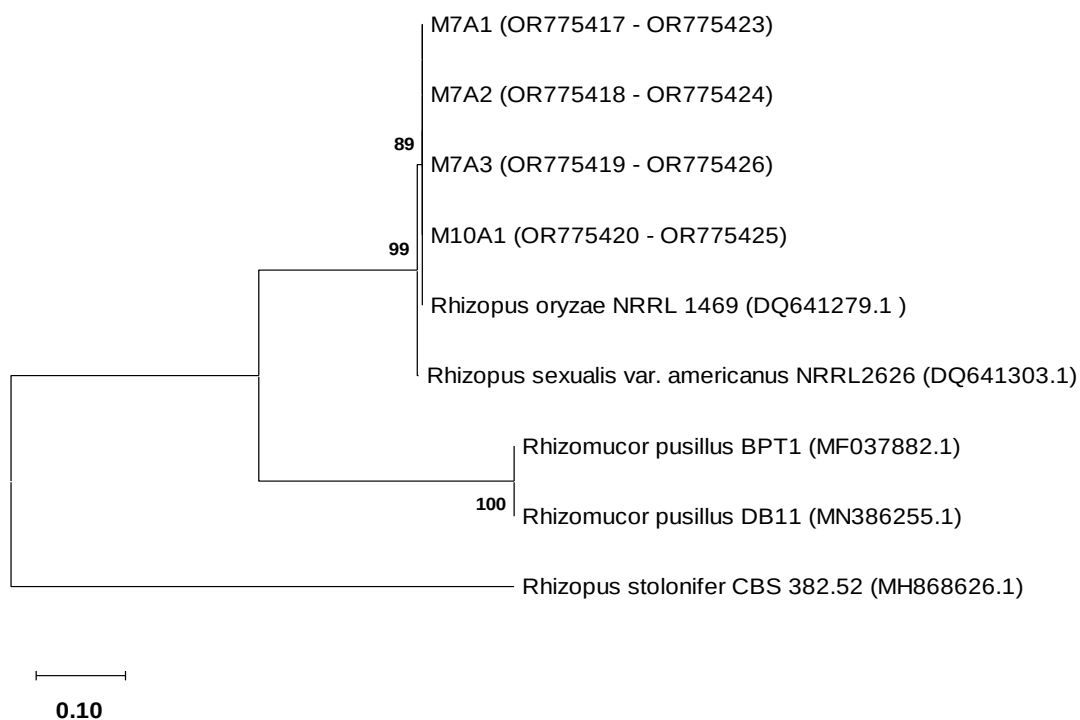


Figura 80. Árbol filogenético basado en el método de Neighbor Joining de las secuencias obtenidas para la región ITS1-5.8S-ITS2 de aislados de especies de *Rhizopus* y de cepas tipos de referencia de NCBI. *Rhizopus stolonifer* fue utilizado como outgroup. Los valores de probabilidad de los nodos para cada clado indican el porcentaje de las réplicas del análisis de 1000 bootstraps que soportan ese clado.

Varios trabajos han sido reportados acerca de la clasificación de aislados de hongos presuntivos de *Rhizopus oryzae*, logrando clasificarlos a nivel de especie en clados bien diferenciados, los cuales concuerdan con la clasificación llevado a cabo. (Dolatabadi et al., 2014; Kwon et al., 2015; Hartanti, Rahayu & Hidayat, (2015); Febriani et al., 2018)

Walther, Wagner & Kursai (2019) mencionan que la identificación molecular basada en secuencias ITS son los métodos elegidos para la identificación de los organismos pertenecientes al orden *Mucorales*, ya que es un método confiable para la identificación a nivel de especies. En consecuencia, los aislados M7A1, M7A2, M7A3 y M10A1 fueron identificados como cepas nativas de *Rhizopus oryzae*.

En lo que respecta a los aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae*, debido a la poca resolución en la identificación de los aislados M1A2, M1A5, M2A1, M2A14, M2A15, M2A16, M2A20, M3A1, M3A10 y M6A5, se procedió a utilizar el gen CYP51A. Los resultados obtenidos de los amplicones de este gen están de acuerdo a los señalado por Abastabar et al. (2022), quienes consiguieron que la enzima de restricción HincII realizó cuatro puntos de corte para *A. flavus* con tamaños de 15, 99, 272 y 1465 pb, no observándose el fragmento de 15 pb debido a su pequeño tamaño. En *Aspergillus oryzae*, HincII produjo tres fragmentos de 15, 372 y 1465 pb siendo estos patrones específicos para distintas muestras provenientes de diferentes fuentes.

Debido a la no resolución en la identificación de los aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae*, se amplificó el gen cyp51A y se obtuvo un amplicón de un tamaño de aproximado de 2000 pb tal como se observa en la Figura 81.

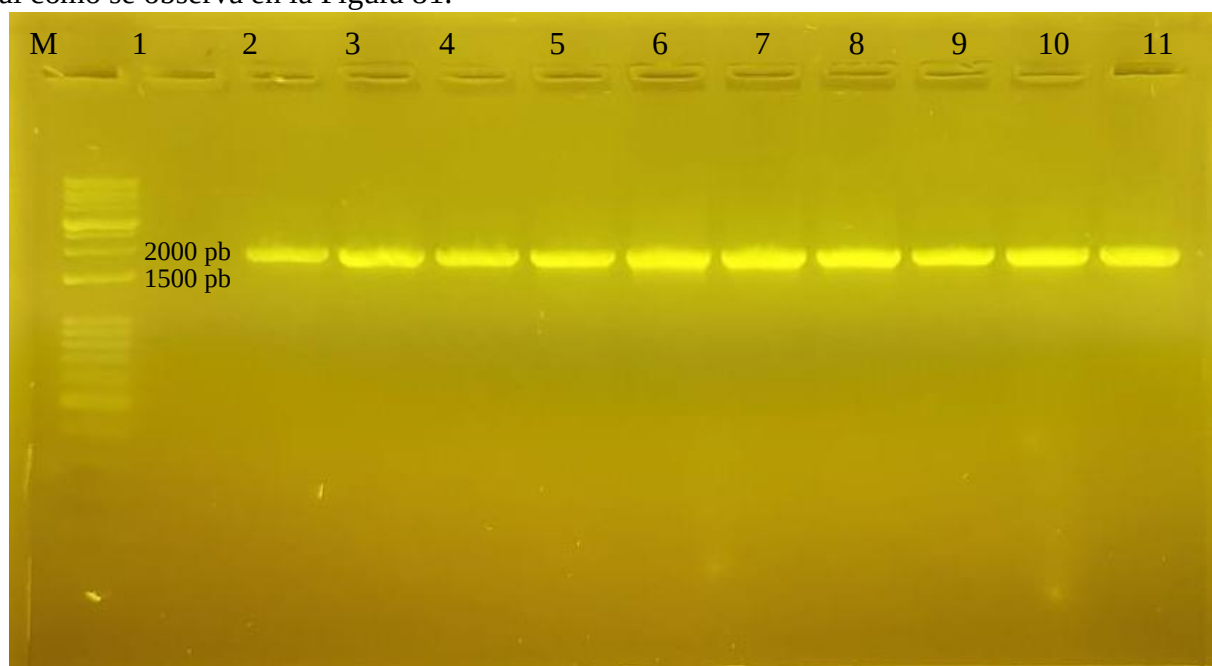


Figura 81. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del gen Cyp51A de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae*. Línea 2 a línea 11, aislados M1A2, M1A5, M2A1, M2A14, M2A15, M2A16, M2A20, M3A1, M3A10 y M6A5; v línea 1, control negativo; M, marcador de peso molecular 1kb.

Posteriormente se realizó la digestión con enzima de restricción HincII obteniéndose un perfil de amplicones como los mostrados en la Figura 82, donde se observa que los aislados M1A2, M1A5, M2A1, M2A14, M2A15, M2A16, M2A20, M3A1 y M3A10 tienen un amplicón de tamaño aproximado de 1500, 300 y 100 pb, mientras que el aislado M6A5 presenta un tamaño de 1465 y 372 pb. Por ende, los aislados mostrados en el árbol filogenético (M1A2, M1A5, M2A1 y M3A1) pueden ser clasificados como *Aspergillus fasciculatus* y M6A5 como *Aspergillus oryzae*.

Los resultados obtenidos de los amplicones de este gen están de acuerdo con lo señalado por Abastabar et al. (2022), quienes consiguieron que la enzima de restricción HincII realizó cuatro puntos de corte para *A. flavus* con tamaños de 15, 99, 272 y 1465 pb y para *Aspergillus oryzae* produjo tres fragmentos de 15, 372 y 1465 pb. Así mismo, el tamaño del amplicón del gen CYP51A está acorde con lo reportado por el autor mencionado y por Nargesi et al. (2021), quienes consiguieron un tamaño de 1852 pb para *Aspergillus oryzae*.

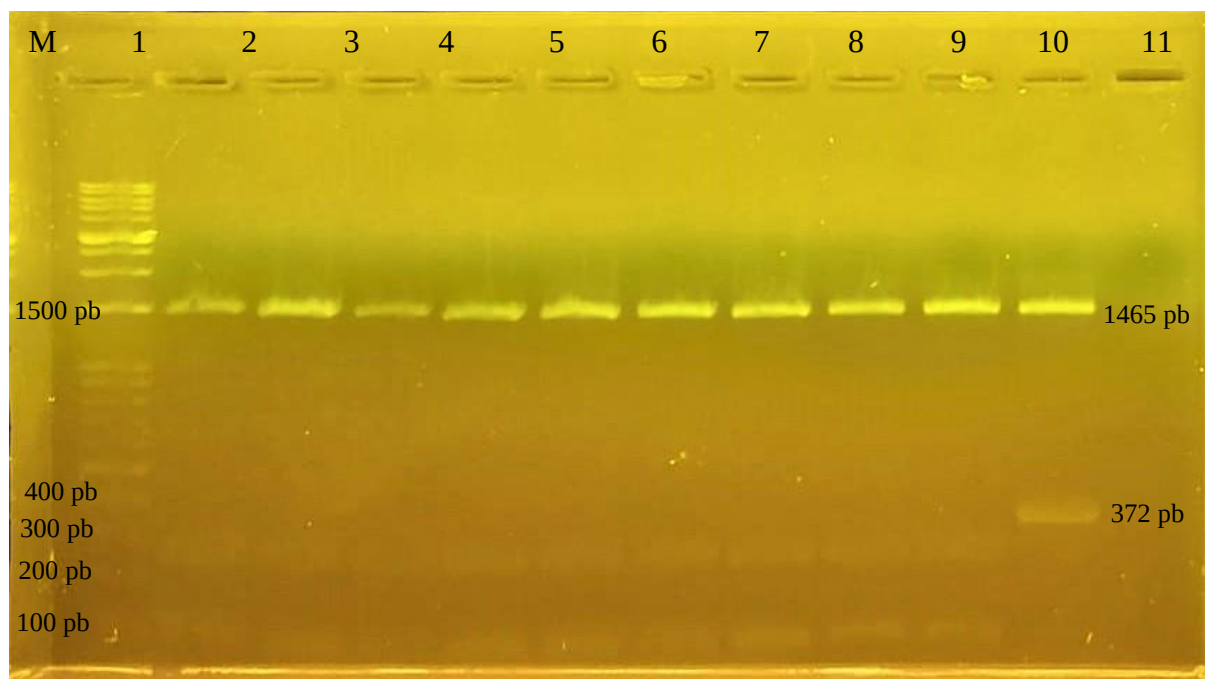


Figura 82. Perfil de restricción del gen Cyp51A por la enzima HincII de aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae*. Línea 2 a línea 10, aislados M1A2, M1A5, M2A1, M2A14, M2A15, M2A16, M2A20, M3A1, M3A10 y M6A5; línea 11, control negativo M, marcador de peso molecular 1kb.

Basado en la identificación a nivel de especie, los aislados utilizados en el proceso de optimización fueron M10A1 para *Rhizopus oryzae* además de que produjo mayor cantidad de β -glucanos en los residuos líquidos provenientes del procesamiento de almidón de papa sin suplementar determinado previamente (Anchundia et al., 2024) y M6A5 para *Aspergillus oryzae* ya que fue el único aislado de la especie de interés.

5.2. Objetivo 2. Optimización de las condiciones para la producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5 y *Rhizopus oryzae* M10A1 utilizando los residuos de la producción de almidón de papa.

En la Figura 83 se muestran los resultados que refieren al tiempo de incubación y temperatura para la producción de biomasa y β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. Se observa que la mayor cantidad de biomasa (6.29 g/L) se obtuvo a una temperatura de 35 °C y 2 días de cultivo, mientras que la menor cantidad (1.26 g/L) se obtuvo a una temperatura de 40 °C y 14 días de cultivo.

En relación con los β -glucanos, la mayor cantidad se produjo a 30 °C y 4 días de fermentación sumergida, con 413.16 mg/100g de biomasa, mientras que la menor cantidad (81.12 mg/100g de biomasa) se obtuvo a 40 °C y 14 días de cultivo.

En el caso de la producción de biomasa a 35 °C, una vez alcanzado el máximo de producción a los 2 días empezó a disminuir con el tiempo hasta los 14 días. El mismo comportamiento se observó para las otras temperaturas posteriormente a los 4 días de cultivo. En lo que respecta a la producción de β -glucanos, se obtuvo el máximo a los 4 días de cultivo, disminuyendo posteriormente en el tiempo. Mahapatra & Banerjee (2013) estudiaron el efecto de la temperatura para la producción de polisacárido por *Fusarium solani* entre 20 y 30 °C, encontrando que la temperatura óptima fue de 28 °C, esto confirma que la temperatura juega un rol importante en la inducción enzimática para la producción de biomasa y polisacárido.

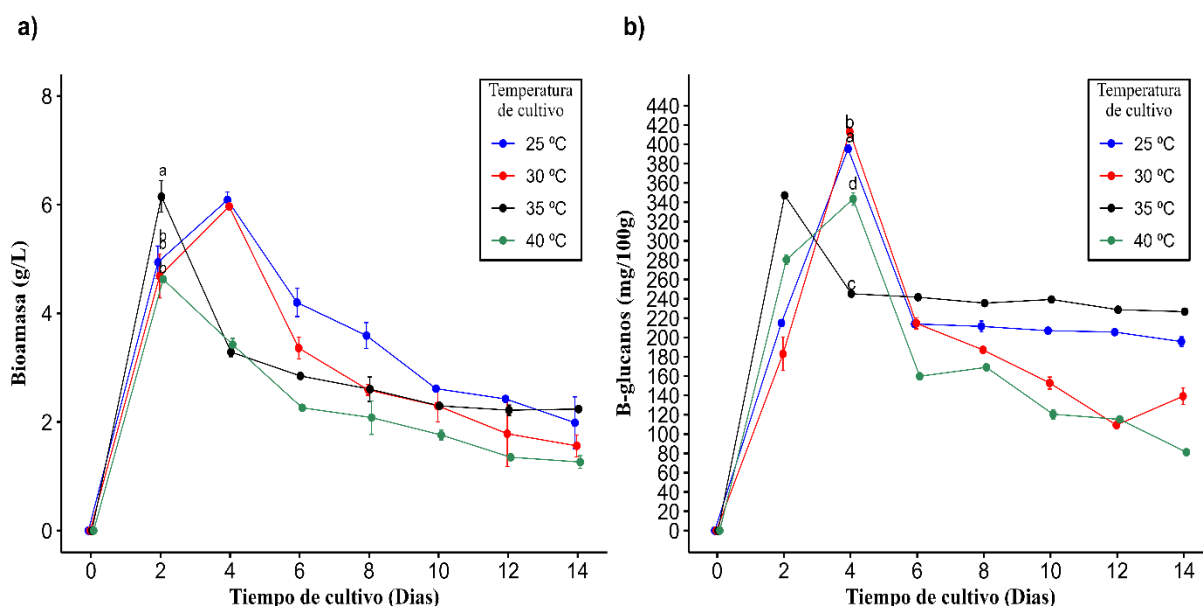


Figura 83. Efecto del tiempo de incubación y temperatura sobre la producción de biomasa y β -glucanos de *Rhizopus oryzae*. a) Biomasa producida. b) β -glucanos producidos. Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre las temperaturas de producción de biomasa o β -glucanos a un nivel de confianza del 95%.

Mahapatra & Banerjee (2013) reportaron tiempos de 10 y 14 días para la mayor producción de polisacáridos y de biomasa por *Fusarium solani*, siendo estos tiempos mayores a los obtenidos en el presente estudio. Souza, Zamani & Taherzadeh (2019) establecieron 2 días como tiempo óptimo de fermentación para obtener valores de biomasa entre 9.55 y 13.33 g/L, mientras que Huang, Jin & Lant (2005) encontraron una mayor producción de biomasa a 30 °C y 2 días de cultivo. En ambos casos la biomasa producida fue mayor a la del presente trabajo. Dichas diferencias pueden deberse al uso de diferentes microorganismos y de sustratos.

En la Tabla 63 se muestran los resultados para la obtención de biomasa y β -glucanos por efecto de pH. Se observa que la mayor cantidad de biomasa se obtuvo a un pH de 4, con un valor de 6.66 g/L, mientras que la mayor cantidad de β -glucanos se obtuvo a pH 6 con un valor de 86.62 mg/100 g de biomasa.

Tabla 63. Efecto del pH sobre la obtención de β -glucanos provenientes de *Rhizopus oryzae* M10A1.

pH inicial	pH final	Biomasa (g/L) ¹	β -glucanos (mg/100g) ²
2	3.66	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a
3	3.05	6.43 $\pm$ 0.32b	83.30 $\pm$ 0.74b
4	7.36	6.66 $\pm$ 0.16b	83.74 $\pm$ 0.89c
5	7.49	5.25 $\pm$ 0.25b	74.64 $\pm$ 1.58d
6	7.05	5.89 $\pm$ 0.66b	86.62 $\pm$ 1.00e
7	7.15	5.78 $\pm$ 0.02fb	65.52 $\pm$ 1.44f

Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas entre los pH de producción de biomasa o β -glucanos a un nivel de confianza del 95%.

¹. Gramos de biomasa obtenida por cada litro de medio de cultivo.

². Miligramos de β -glucanos obtenidos por cada 100 gramos de biomasa de hongo.

Mahapatra & Banerjee (2013) reportaron valores de pH en el rango de 4.0 a 8.0 para el crecimiento de biomasa y β -glucanos de *Fusarium solani*, siendo el pH óptimo de 6.50 para la producción de la mayor concentración de ambos tipos de compuestos. El valor de pH obtenido es ligeramente menor que los reportados por estos autores. En ambos casos, valores de pH por debajo y por arriba del óptimo disminuyen la concentración de dichos compuestos, ya que se afecta a la actividad de la maquinaria enzimática y la disponibilidad de canales metabólicos.

Huang, Jin y Lant (2005) reportaron valores inferiores de biomasa para *Rhizopus oryzae* a un pH de 6.0, con 0.57 g/L, mientras que Souza, Zamani & Taherzadeh (2019) reportaron valores superiores de biomasa (25.89 g/L) para un pH de 5.50, aunque, encontraron el óptimo de producción de biomasa a un pH de 3.85 (49.16 g/L) en *Aspergillus oryzae*, *Fusarium venenatum*, *Monascus purpureus*, *Neurospora intermedia* y en *Rhizopus oryzae*.

En relación con la fuente de carbono, se obtuvo mayor concentración de biomasa y β -glucanos utilizando glucosa como fuente de carbono, con valores de 9.99 g/L y 244.94 mg/100 g de biomasa, respectivamente, en comparación con el control, donde se obtuvieron valores de 5.97 g/L y 203.97 mg/100 g de biomasa. La concentración de glucosa que permitió obtener mayor cantidad de biomasa y de β -glucanos fue a 0.6%, con valores de 3.96 g/L y 128.77 mg/100 g

de biomasa respectivamente (Figura 84). A concentraciones más altas de glucosa, la producción de polisacáridos disminuye.

Feng et al. (2010) indicaron que la glucosa como fuente de carbono promovió el crecimiento de micelio de *Lentinus edodes* para obtener una biomasa de 2.75 g/L y 737 mg/100g de polisacárido en el proceso de optimización de estos compuestos. En contraste, al utilizar maltosa obtuvieron la mayor concentración de estos compuestos (250 mg/L). Estos autores lograron obtener una concentración de 200 mg/L de polisacáridos con un 4% de glucosa suplementada en los medios.

Mahapatra & Banerjee (2013) encontraron que la glucosa les permitió obtener una mayor concentración de polisacáridos, mientras que ramnosa permitió obtener la mayor cantidad de biomasa al probar varias fuentes de carbono. La concentración de glucosa donde obtuvo la mayor cantidad del polisacárido fue del 10% alcanzando 1.72 g/L de medio de cultivo.

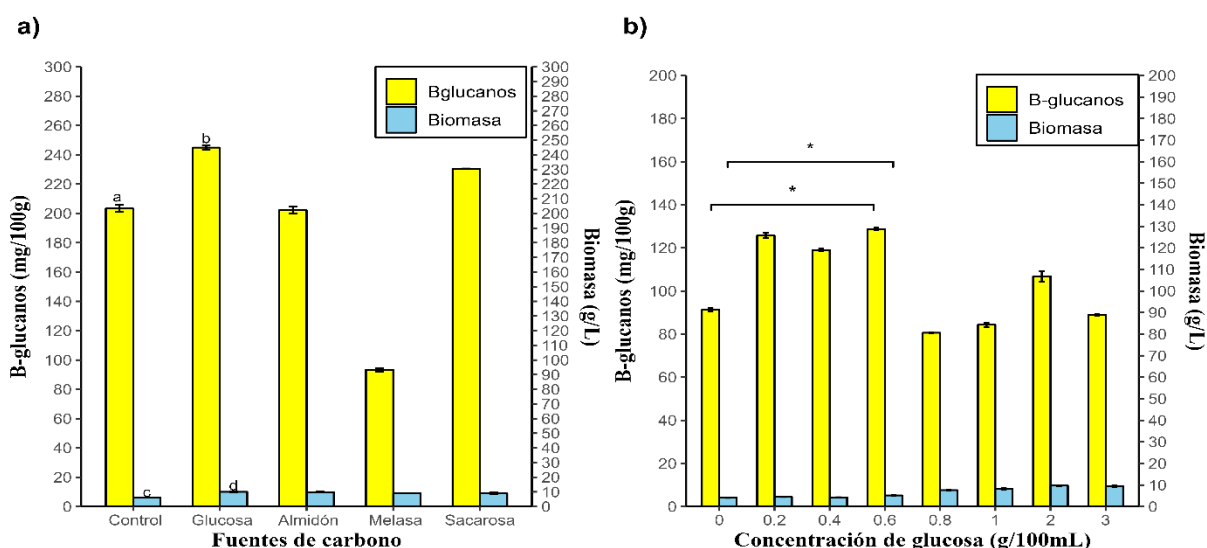


Figura 84. Efecto de la fuente de carbono y concentración de glucosa sobre la producción de biomasa y β-glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. a) Biomasa y β-glucanos producidos por efecto de las fuentes de carbono. Biomasa y β-glucanos producidos por efecto de la concentración de glucosa. Los valores muestran el promedio de tres determinaciones ± la desviación estándar. Letras diferentes o * muestran diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

Nair et al (2017) utilizaron glucosa proveniente de la hidrólisis de residuos de harina y para obtener la mayor concentración de biomasa de *Rhizopus oryzae* a las 24 horas de cultivo, con un valor de 55 g/L de glucosa. Ishibashi et al (2010) encontraron un crecimiento medio al utilizar glucosa como suplemento de los medios de cultivos en su estudio.

Con respecto a la fuentes de carbono y la utilización en determinadas concentraciones por los microorganismos se puede mencionar que los carbohidratos son la principal fuente de energía y constituyen un componente esencial del citoesqueleto celular, está directamente relacionado con el crecimiento, desarrollo de los hongos y la producción de metabolitos.

La glucosa es biológicamente más efectiva como fuente de energía ya que puede ser metabolizada más eficientemente. Además, es más económica en comparación con galactosa y rafinosa, lo que hace más viable para su uso en medios de cultivos diseñados con residuos proveniente de procesos agroindustriales. En consecuencia, se prefiere a esta fuente de carbono para suplementar los medios de cultivos destinados a la producción de biomasa y polisacáridos.

El uso de concentraciones de carbohidratos superiores al óptimo puede tener efectos negativos sobre el metabolismo de los carbohidratos, como la represión catabólica y la reducción en la síntesis de las enzimas involucradas en el catabolismo de azúcares (Feng et al., 2010; Mahapatra & Banerjee, 2013).

Lo antes mencionado puede ayudar a explicar el comportamiento de *Rhizopus oryzae* M10A1 en cuanto fuente de carbohidrato utilizado, así como la reducción en las cantidades de β -glucanos obtenidos, cuando se suplementa al medio de cultivo con glucosa a concentraciones mayores al 0.6%

Rhizopus oryzae M10A1 creció en distintas fuentes de nitrógeno, siendo sulfato de amonio la fuente que permitió obtener una mayor cantidad de β -glucanos y biomasa, con valores de 8.35 g/L y 244.83 mg/100g respectivamente. El menor contenido de polisacárido se obtuvo con extracto de levadura, obteniéndose un valor de 82.21 mg/100g. Por otro lado, la concentración más eficiente de sulfato de amonio para producir una mayor cantidad de biomasa y β -glucanos fue de 1.0 %, donde se obtuvo un valor de 24.31 g/L y 388.67 mg/100g respectivamente (Figura 85).

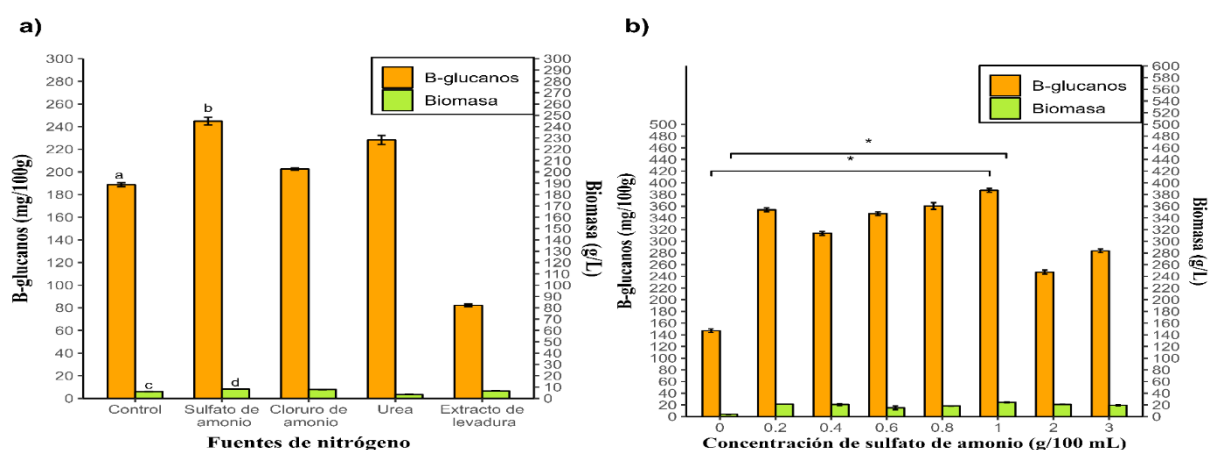


Figura 85. Efecto de la fuente de nitrógeno y concentración de sulfato de amonio sobre la producción de biomasa y β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. **a)** Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de las fuentes de nitrógeno. **b)** Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de la concentración de sulfato de amonio. Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes o * muestra diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

La suplementación de medios de cultivo con diversas fuentes de nitrógeno ha mostrado un efecto positivo en el crecimiento de biomasa y la producción de polisacáridos en hongos. Se ha utilizado fuentes como sulfato de amonio, extracto de carne, peptona, extracto de levadura, levadura en polvo, nitrato de amonio, glicina, cloruro de amonio y urea. El extracto de levadura

a una concentración de 0.5% y 0.7% ha sido reportado como la fuente de nitrógeno más eficiente para varios tipos de hongos, permitiendo obtener valores de biomasa entre 4.30 y 7.14 g/L y de polisacárido entre 0.32 y 1.87g/L (Feng et al., 2010; Mahapatra & Banerjee, 2013). Sin embargo, Ibarruri & Hernández (2018) encontraron una mayor producción de biomasa (29.50 g/L) utilizando sulfato de amonio como suplemento.

Los resultados obtenidos en este estudio, difieren a los dos autores antes mencionado y son consistente con los reportados por Ibarruri & Hernández (2018), donde el sulfato de amonio resultó ser la fuente de nitrógeno más eficiente para *Rhizopus oryzae*. Esto sugiere que el nitrógeno es un nutriente crucial para la producción de biomasa y de polisacáridos y su efecto está condicionado por varios factores tales como, tipo de microorganismo, fuente de nitrógeno, concentración y tipo de cultivo. También se menciona que a concentraciones elevadas de nitrógeno, puede reducir el uso de otras fuentes de carbono y la acumulación de metabolitos (Feng et al., 2010).

En la Tabla 64 se presenta el arreglo experimental para la optimización de la producción de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 basado en el modelo de diseño central compuesto y el método de escala ascendente. Los mayores valores de β -glucanos se obtuvieron en dos puntos del cubo y dos puntos axiales (corridas 2, 6, 14 y 18). En la corrida 2 se logró obtener 3218.67 mg/100g de β -glucanos.

Los valores p de cada coeficiente evaluado son mostrados en la Tabla 65, debido a que estos tienen valores menores a 0.05, indican que los coeficientes son significativos para el modelo cuadrático evaluado. Por lo tanto, se incluyeron en la ecuación de optimización dos coeficientes lineales, dos cuadrados y una interacción.

Basado en la Tabla 65, la respuesta que predice la producción de β -glucanos ($Y_{\beta\text{-glucano}}$) está dada por la siguiente ecuación de regresión en unidades codificadas:

$$Y_{\beta\text{-glucano}} = 1206.20 + 406.40X_1 - 3.10.5X_2 + 619.70 X_1 * X_1 + 246.80 X_2 * X_2 - 465.0 X_1 * X_2$$

Debido a que el valor de la prueba f fue de 56.28 con un valor de p menor que 0.05, se infiere que el modelo de regresión cuadrático es significativo. El coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}) fue de 92.32%, lo cual demuestra una buena bondad de ajuste de los valores predichos a la regresión cuadrática, indicando un alto grado de correlación entre los valores experimentales y predichos.

Lo anterior, sugiere que el 92.32% de la variación en el contenido de β -glucanos extraídos de *Rhizopus oryzae* M10A1 puede ser explicada por la ecuación de predicción polinomial de segundo orden. El valor del índice de precisión obtenido fue de 20.69, superior a 4.00, lo que indica que el modelo puede ser utilizado para navegar en el espacio del diseño de experimento. El valor f de la falta de ajuste fue de 2.10 con un valor de p de 0.143 lo cual implica que la perdida de ajuste debido al error no fue significativa. Esto demuestra una alta exactitud y consistencia de los valores experimentales, confirmando que modelo es adecuado.

Tabla 64. Arreglo experimental y respuesta del diseño central compuesto para la optimización de producción de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Orden de corrida	Variables independientes		Respuesta: β -glucanos (mg/100g)	
	X1: CG ¹ (g%)	X2: CSA ² (g%)	Medidos	Predichos
1	-1 (0.4)	-1 (0.8)	1575.62	1511.67
2	1 (0.8)	-1 (0.8)	3218.67	3254.56
3	-1 (0.4)	1 (1.2)	1940.92	1820.64
4	1 (0.8)	1 (1.2)	1588.21	1703.44
5	-1.41 (0.32)	0 (1)	1787.30	1870.73
6	1.41 (0.88)	0 (1)	3143.80	3020.27
7	0 (0.6)	-1.41 (0.72)	1869.96	2138.82
8	0 (0.6)	1.41 (1.28)	1406.14	1260.49
9	0 (0.6)	0 (1)	1571.65	1206.15
10	0 (0.6)	0 (1)	1223.27	1206.15
11	0 (0.6)	0 (1)	1130.00	1206.15
12	0 (0.6)	0 (1)	1201.72	1206.15
13	-1 (0.4)	-1 (0.8)	1709.51	1511.67
14	1 (0.8)	-1 (0.8)	3128.55	3254.56
15	-1 (0.4)	1 (1.2)	2021.93	1820.64
16	1 (0.8)	1 (1.2)	1716.58	1703.44
17	-1.41 (0.32)	0 (1)	1574.73	1870.73
18	1.41 (0.88)	0 (1)	3116.48	3020.27
19	0 (0.6)	-1.41 (0.72)	2370.12	2138.82
20	0 (0.6)	1.41 (1.28)	992.709	1260.49
21	0 (0.6)	0 (1)	1311.49	1206.15
22	0 (0.6)	0 (1)	1192.96	1206.15
23	0 (0.6)	0 (1)	1081.01	1206.15
24	0 (0.6)	0 (1)	937.131	1206.15

El diseño experimental fue realizado con dos factores, doce corridas base y dos réplicas para cada tratamiento. Los ensayos fueron realizados a una temperatura de 30 °C, pH de 6, velocidad de agitación 150 rpm, volumen de medio de cultivo 50 mL y el volumen del Erlenmeyer de 250 mL.

¹. Concentración de glucosa en gramos por cada 100 mL de medio de cultivo.

². Concentración de sulfato de amonio en gramos por cada 100 mL de medio de cultivo.

Tabla 65. Análisis de varianza (ANOVA) del modelo de superficie de respuesta para la optimización de la producción de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrado	Contribución	Cuadrados medios	Valor-f	Valor-p
Modelo	5	11032001	93.99%	2206400	56.28	0.000
Lineal	2	4185813	35.66%	2092907	53.39	0.000
Con_glucosa	1	2642877	22.52%	2642877	67.42	0.000
Con_sulfato	1	1542936	13.15%	1542936	39.36	0.000
Cuadrado	2	5116250	43.59%	2558125	65.26	0.000
Con_glucosa*Con_glucosa	1	4336913	36.95%	4915134	125.38	0.000
Con_sulfato*Con_sulfato	1	779337	6.64%	779337	19.88	0.001
Interacción de 2 factores	1	1729938	14.74%	1729938	44.13	0.000
Con_glucosa*Con_sulfato	1	1729938	14.74%	1729938	44.13	0.000
Error	18	705635	6.01%	39202		
Falta de ajuste	3	208582	1.78%	69527	2.10	0.143
Error puro	15	497053	4.23%	33137		
Total	23	11737636	100.00%			

R-cuadrado (R^2): 93.90%, R-cuadrado ajustado (R^2_{adj}): 92.32%, índice de precisión (precisión adecuada): 20.69.

En la Figura 86 se muestran los gráfico 2D y 3D del efecto de la concentración de glucosa y sulfato de amonio en la producción β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. Se observa que la mayor concentración del polisacárido (3218.67 mg/100g de biomasa) se obtuvo a 0.8% de glucosa y 0.8% de sulfato de amonio. A concentraciones distintas de fuentes de carbono y nitrógeno, se obtuvieron concentración de β -glucanos menores, como la obtenido a 0.6% de glucosa y 1% de sulfato de amonio (937.131 mg/100 g de biomasa). Además, se puede visualizar que la superficie obtenida es cuadrática y no un plano lineal.

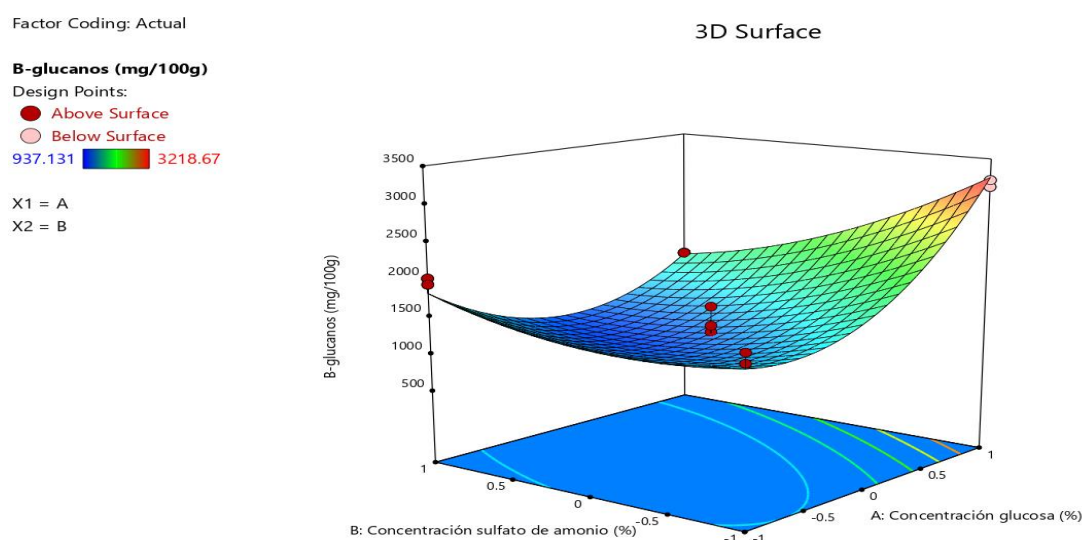


Figura 86. Gráfico 2D y 3D del efecto de la concentración de glucosa y sulfato de amonio, mostrando las interacciones más importantes para la producción β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

La validación del modelo se llevó a cabo bajo las condiciones establecidas, produciendo una concentración de β -glucanos de 3200 mg/100 g de biomasa. Se observó una buena correlación entre los valores esperados y los predichos por el modelo.

En las Tablas 66 y 67 se muestran los resultados de la caracterización de los componentes de los medios de cultivos utilizados en la optimización de la producción de β -glucanos, tanto antes como después de la fermentación con *Rhizopus oryzae* M10A1. Se observa que el contenido de almidón es el componente más representativo de los medios, con valores que varían entre 3107.52 y 4342.11 mg/100 mL antes del cultivo y 400.58 a 756.04 mg/100 mL después del cultivo.

Posteriormente le siguen los sólidos totales con valores que van desde 2.70 y 3.48 g/100 mL antes del cultivo y 1.20 y 1.84 g/100 mL después del cultivo. Los sólidos en suspensión estuvieron en una concentración de 1.56 y 2.96 g/100mL antes del cultivo y 0.82 y 1.81 g/100 mL después del cultivo y sólidos solubles entre 0.36 y 1.73 g/100 mL antes del cultivo y 0.07 y 0.87 g/100 mL después del cultivo.

Con respecto al contenido de cenizas se encontraron entre los valores 0.23 y 0.38 g/100 mL antes del cultivo y 0.11 y 0.35 g/100 mL después del cultivo. Las concentraciones de nitrógeno varían entre 0.29 y 0.47 g/100 mL antes del cultivo y entre 0.04 y 0.30 g/100 mL después del cultivo.

Tabla 66. Caracterización de los medios de cultivos formulados para el diseño de superficie de respuesta en la optimización de la producción de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Corridas	Sólidos totales (g/100mL)		Sólidos en suspensión (g/100mL)		Sólidos solubles (g/100mL)		Cenizas (g/100mL)	
	Antes del cultivo	Después del cultivo	Antes del cultivo	Después del cultivo	Antes del cultivo	Después del cultivo	Antes del cultivo	Después del cultivo
1	2.84 ± 0.08a	1.20 ± 0.08b	2.40 ± 0.02a	0.82 ± 0.09b	0.44 ± 0.06a	0.38 ± 0.06b	0.35 ± 0.00a	0.30 ± 0.02b
2	3.28 ± 0.07a	1.25 ± 0.02b	1.56 ± 0.10a	0.89 ± 0.18b	1.72 ± 0.03a	0.36 ± 0.03b	0.34 ± 0.04a	0.32 ± 0.02b
3	3.27 ± 0.07a	1.38 ± 0.01b	2.76 ± 0.13a	1.40 ± 0.04b	0.51 ± 0.05a	0.87 ± 0.01b	0.30 ± 0.02a	0.24 ± 0.00b
4	3.48 ± 0.05a	1.65 ± 0.03b	2.95 ± 0.15a	1.50 ± 0.08b	0.53 ± 0.07a	0.15 ± 0.10b	0.31 ± 0.04a	0.26 ± 0.00b
5	2.71 ± 0.31a	1.35 ± 0.01b	2.53 ± 0.11a	1.28 ± 0.06b	0.18 ± 0.02a	0.07 ± 0.02b	0.30 ± 0.03a	0.32 ± 0.01b
6	3.45 ± 0.05a	1.68 ± 0.11b	2.38 ± 0.11a	1.60 ± 0.02b	1.07 ± 0.09a	0.08 ± 0.03b	0.35 ± 0.02a	0.35 ± 0.00b
7	3.04 ± 0.05a	1.37 ± 0.04b	2.67 ± 0.24a	1.19 ± 0.01b	0.37 ± 0.04a	0.18 ± 0.01b	0.23 ± 0.01a	0.13 ± 0.02b
8	3.27 ± 0.01a	1.84 ± 0.08b	2.90 ± 0.03a	1.71 ± 0.01b	0.37 ± 0.02a	0.13 ± 0.05b	0.35 ± 0.02a	0.30 ± 0.03b
9	3.33 ± 0.07a	1.48 ± 0.07b	2.78 ± 0.05a	1.26 ± 0.08b	0.55 ± 0.01a	0.22 ± 0.05b	0.36 ± 0.01a	0.33 ± 0.04b
10	3.34 ± 0.05a	1.46 ± 0.08b	2.77 ± 0.03a	1.23 ± 0.02b	0.57 ± 0.02a	0.23 ± 0.01b	0.38 ± 0.02a	0.32 ± 0.02b
11	3.32 ± 0.08a	1.47 ± 0.09b	2.76 ± 0.08a	1.20 ± 0.00b	0.56 ± 0.10a	0.27 ± 0.00b	0.37 ± 0.03a	0.31 ± 0.00b
12	3.31 ± 0.06a	1.46 ± 0.03b	2.75 ± 0.04a	1.25 ± 0.08b	0.56 ± 0.06a	0.21 ± 0.04b	0.36 ± 0.02a	0.32 ± 0.05b
13	2.83 ± 0.01a	1.16 ± 0.07b	2.40 ± 0.09a	0.80 ± 0.12b	0.44 ± 0.00a	0.39 ± 0.01b	0.34 ± 0.05a	0.29 ± 0.00b
14	3.25 ± 0.08a	1.26 ± 0.05b	1.56 ± 0.01a	0.85 ± 0.03b	1.73 ± 0.04a	0.35 ± 0.45b	0.35 ± 0.02a	0.32 ± 0.02b
15	3.25 ± 0.02a	1.35 ± 0.04b	2.74 ± 0.17a	1.38 ± 0.09b	0.50 ± 0.78a	0.86 ± 0.50b	0.31 ± 0.01a	0.23 ± 0.09b
16	3.46 ± 0.09a	1.65 ± 0.03b	2.96 ± 0.19a	1.51 ± 0.04b	0.52 ± 0.34a	0.16 ± 0.20b	0.32 ± 0.04a	0.27 ± 0.00b
17	2.70 ± 0.04a	1.33 ± 0.88b	2.54 ± 0.18a	1.29 ± 0.06b	0.16 ± 0.01a	0.06 ± 0.01b	0.30 ± 0.01a	0.24 ± 0.04b
18	3.46 ± 0.05a	1.68 ± 0.09b	2.37 ± 0.11a	1.58 ± 0.02b	1.08 ± 0.02a	0.09 ± 0.01b	0.36 ± 0.00a	0.32 ± 0.01b
19	3.02 ± 0.01a	1.29 ± 0.05b	2.67 ± 0.24a	1.18 ± 0.03b	0.37 ± 0.01a	0.16 ± 0.01b	0.24 ± 0.01a	0.11 ± 0.09b
20	3.25 ± 0.09a	1.80 ± 0.09b	2.88 ± 0.32a	1.65 ± 0.03b	0.36 ± 0.09a	0.12 ± 0.08b	0.36 ± 0.03a	0.29 ± 0.05b
21	3.30 ± 0.00a	1.48 ± 0.09b	2.76 ± 0.10a	1.26 ± 0.04b	0.54 ± 0.09a	0.20 ± 0.01b	0.37 ± 0.01a	0.30 ± 0.02b
22	3.46 ± 0.03a	1.67 ± 0.02b	2.39 ± 0.01a	1.58 ± 0.05b	1.07 ± 0.04a	0.09 ± 0.00b	0.35 ± 0.06a	0.35 ± 0.00b
23	3.03 ± 0.02a	1.39 ± 0.01b	2.68 ± 0.04a	1.15 ± 0.01b	0.39 ± 0.02a	0.18 ± 0.05b	0.24 ± 0.01a	0.12 ± 0.04b
24	3.27 ± 0.00a	1.85 ± 0.09b	2.92 ± 0.05a	1.70 ± 0.02b	0.37 ± 0.04a	0.11 ± 0.02b	0.36 ± 0.01a	0.28 ± 0.01b

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes para los parámetros evaluados antes y después de la fermentación muestran diferencia significativa a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 67. Continuación de caracterización de los medios de cultivos formulados para el diseño de superficie de respuesta en la optimización de la producción de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Corridas	Nitrógeno (g/100mL)		Azúcares totales (mg/100mL)		Azúcares reductores (mg/100mL)		Almidón total (mg/100mL)	
	Antes del cultivo	Después del cultivo	Antes del cultivo	Después del cultivo	Antes del cultivo	Después del cultivo	Antes del cultivo	Después del cultivo
1	0.35 $\pm$ 0.00a	0.04 $\pm$ 0.00b	177.16 $\pm$ 0.35a	6.58 $\pm$ 0.24b	54.65 $\pm$ 0.72a	15.67 $\pm$ 0.70b	4342.11 $\pm$ 0.61a	461.15 $\pm$ 0.58b
2	0.47 $\pm$ 0.01a	0.21 $\pm$ 0.01b	166.25 $\pm$ 0.01a	13.22 $\pm$ 0.11b	52.18 $\pm$ 0.60a	13.02 $\pm$ 0.48b	3931.08 $\pm$ 0.30a	530.08 $\pm$ 0.53b
3	0.34 $\pm$ 0.01a	0.26 $\pm$ 0.01b	340.03 $\pm$ 0.05a	5.75 $\pm$ 0.47b	67.29 $\pm$ 0.36a	12.93 $\pm$ 0.81b	3621.55 $\pm$ 0.30a	436.09 $\pm$ 0.58b
4	0.44 $\pm$ 0.00a	0.24 $\pm$ 0.00b	351.97 $\pm$ 0.95a	10.07 $\pm$ 0.10b	63.28 $\pm$ 0.35a	18.13 $\pm$ 0.14b	3615.29 $\pm$ 0.17a	517.54 $\pm$ 0.72b
5	0.33 $\pm$ 0.00a	0.30 $\pm$ 0.00b	115.38 $\pm$ 0.07a	38.82 $\pm$ 0.99b	58.92 $\pm$ 0.72a	10.87 $\pm$ 0.30b	3418.13 $\pm$ 0.19a	663.74 $\pm$ 0.47b
6	0.32 $\pm$ 0.00a	0.30 $\pm$ 0.01b	389.88 $\pm$ 0.40a	57.68 $\pm$ 0.55b	44.76 $\pm$ 0.36a	7.71 $\pm$ 0.12b	3940.27 $\pm$ 0.35a	755.64 $\pm$ 0.00b
7	0.29 $\pm$ 0.00a	0.22 $\pm$ 0.00b	226.73 $\pm$ 0.40a	67.39 $\pm$ 0.23b	43.91 $\pm$ 0.73a	4.61 $\pm$ 0.36b	4024.10 $\pm$ 0.30a	411.03 $\pm$ 0.86b
8	0.31 $\pm$ 0.00a	0.28 $\pm$ 0.01b	236.42 $\pm$ 0.70a	90.12 $\pm$ 0.54b	43.11 $\pm$ 0.60a	9.73 $\pm$ 0.14b	3107.52 $\pm$ 0.71a	659.57 $\pm$ 0.09b
9	0.37 $\pm$ 0.01a	0.29 $\pm$ 0.01b	233.66 $\pm$ 0.35a	6.25 $\pm$ 0.71b	55.11 $\pm$ 0.97a	10.12 $\pm$ 0.05b	3940.31 $\pm$ 0.31a	400.58 $\pm$ 0.23b
10	0.36 $\pm$ 0.05a	0.27 $\pm$ 0.00b	232.01 $\pm$ 0.55a	6.20 $\pm$ 0.10b	54.12 $\pm$ 0.99a	10.01 $\pm$ 0.09b	3243.10 $\pm$ 0.09a	410.34 $\pm$ 0.45b
11	0.35 $\pm$ 0.05a	0.26 $\pm$ 0.02b	234.87 $\pm$ 0.15a	6.30 $\pm$ 0.05b	55.01 $\pm$ 0.35a	10.13 $\pm$ 0.10b	3145.09 $\pm$ 0.42a	435.98 $\pm$ 0.01b
12	0.36 $\pm$ 0.04a	0.28 $\pm$ 0.04b	231.10 $\pm$ 0.66a	6.24 $\pm$ 0.03b	54.09 $\pm$ 0.45a	10.09 $\pm$ 0.05b	3228.74 $\pm$ 0.26a	401.45 $\pm$ 0.00b
13	0.34 $\pm$ 0.09a	0.03 $\pm$ 0.00b	175.09 $\pm$ 0.25a	6.55 $\pm$ 0.04b	55.01 $\pm$ 0.00a	14.47 $\pm$ 0.17b	4339.11 $\pm$ 0.11a	401.50 $\pm$ 0.68b
14	0.45 $\pm$ 0.05a	0.20 $\pm$ 0.01b	162.25 $\pm$ 0.18a	12.99 $\pm$ 0.31b	51.69 $\pm$ 0.20a	12.59 $\pm$ 0.38b	3939.20 $\pm$ 0.99a	519.98 $\pm$ 0.55b
15	0.32 $\pm$ 0.09a	0.27 $\pm$ 0.01b	339.99 $\pm$ 0.50a	5.85 $\pm$ 0.09b	66.99 $\pm$ 0.16a	11.98 $\pm$ 0.01b	3611.05 $\pm$ 0.31a	433.00 $\pm$ 0.18b
16	0.42 $\pm$ 0.03a	0.22 $\pm$ 0.00b	350.99 $\pm$ 0.65a	10.00 $\pm$ 0.51b	64.00 $\pm$ 0.35a	18.03 $\pm$ 0.18b	3615.19 $\pm$ 0.17a	516.99 $\pm$ 0.72b
17	0.31 $\pm$ 0.00a	0.29 $\pm$ 0.09b	116.08 $\pm$ 0.15a	37.99 $\pm$ 0.02b	58.12 $\pm$ 1.12a	10.79 $\pm$ 0.10b	3399.99 $\pm$ 0.66a	660.67 $\pm$ 0.67b
18	0.31 $\pm$ 0.09a	0.29 $\pm$ 0.02b	390.01 $\pm$ 0.55a	56.98 $\pm$ 0.75b	45.00 $\pm$ 0.19a	7.70 $\pm$ 0.19b	3941.01 $\pm$ 0.15a	756.04 $\pm$ 0.10b
19	0.28 $\pm$ 0.03a	0.23 $\pm$ 0.05b	225.91 $\pm$ 0.63a	68.01 $\pm$ 0.13b	44.00 $\pm$ 0.22a	4.60 $\pm$ 0.16b	4023.10 $\pm$ 0.09a	412.02 $\pm$ 0.99b
20	0.30 $\pm$ 0.09a	0.27 $\pm$ 0.01b	237.12 $\pm$ 0.89a	90.02 $\pm$ 0.10b	43.01 $\pm$ 0.30a	8.99 $\pm$ 0.19b	3108.02 $\pm$ 0.01a	650.97 $\pm$ 0.01b
21	0.35 $\pm$ 0.09a	0.27 $\pm$ 0.03b	232.01 $\pm$ 0.25a	6.22 $\pm$ 0.00b	54.01 $\pm$ 0.55a	10.04 $\pm$ 0.04b	3335.61 $\pm$ 0.45a	415.78 $\pm$ 0.08b
22	0.36 $\pm$ 0.05a	0.28 $\pm$ 0.01b	234.00 $\pm$ 0.19a	6.26 $\pm$ 0.10b	54.99 $\pm$ 0.01a	10.16 $\pm$ 0.04b	3939.99 $\pm$ 0.21a	401.02 $\pm$ 0.03b
23	0.34 $\pm$ 0.07a	0.25 $\pm$ 0.01b	235.01 $\pm$ 0.05a	6.29 $\pm$ 0.15b	54.96 $\pm$ 0.65a	10.19 $\pm$ 0.25b	3146.99 $\pm$ 0.12a	435.49 $\pm$ 0.09b
24	0.36 $\pm$ 0.06a	0.29 $\pm$ 0.09b	231.10 $\pm$ 0.66a	6.25 $\pm$ 0.67b	54.09 $\pm$ 0.15a	10.09 $\pm$ 0.23b	3228.74 $\pm$ 0.16a	401.45 $\pm$ 0.00b

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes para los parámetros evaluados antes y después de la fermentación muestran diferencia significativa a un nivel de confianza del 95%.

Los azúcares totales mostraron concentraciones de 115.38 a 390.01 mg/100 mL antes de cultivo y 5.85 y 90.12 mg/100 mL después del cultivo. Los azúcares reductores se encontraban en un rango de 43.11 a 67.29 mg/100 mL antes del cultivo y 4.60 a 18.13 mg/100 mL después del cultivo.

Con respecto al medio de cultivo de la corrida No. 2, en el que se obtuvo la mayor concentración de β -glucanos, se consumió el 88.27% de almidón, el 61.89% de sólidos totales, el 42.95% de sólidos en suspensión, 79.07% de sólidos solubles, 5.88% de cenizas, 44.68% de nitrógeno, 92.07% de azúcares totales y 75.05% de azúcares reductores.

Los valores de almidón y azúcares reductores encontrados son menores que los reportados por Huang, Jin & Lant (2005), quienes indicaron concentraciones entre 12.50 y 62.7 mg/L y 0.25 y 2.29 g/L, respectivamente, en residuos líquidos del proceso de obtención de almidón de papa. Los sólidos totales, en suspensión y solubles también son menores que los reportados por Souza, Zamani & Taherzadeh (2019) en residuos líquidos de la industria de almidón de trigo. Además, los valores del contenido de cenizas y nitrógeno son menores que los reportados por Souza et al. (2018), quienes encontraron 2.91 y 2.98%, respectivamente, en residuos líquidos del procesamiento de guisantes. Las diferencias observadas pueden deberse a los distintos procesos industriales de donde se obtuvieron los residuos líquidos, así como a las variaciones en el contenido de nutrientes de las fuentes vegetales utilizadas (Souza, Zamani & Taherzadeh (2019); Serba et al., 2020).

Con respecto al proceso de optimización de *Aspergillus oryzae* M6A5, en la Figura 87 se presentan los resultados obtenidos del tiempo de incubación y temperatura para la producción de biomasa y β -glucanos. Se observa que a una temperatura de 25 °C y 4 días de cultivo, se obtuvo la mayor cantidad de biomasa, con 10.28 g/L. La mayor concentración de β -glucanos se logró con un tiempo de cultivo de 10 días a 35 °C, alcanzando un valor de 15.67 mg/100 g de biomasa.

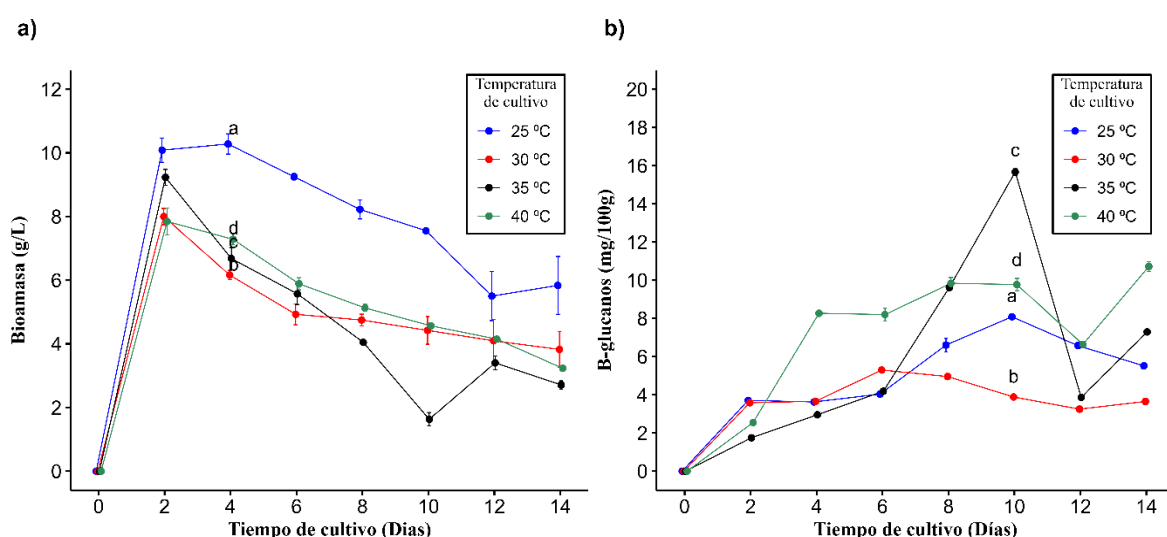


Figura 87. Efecto del tiempo de incubación y temperatura sobre la producción de biomasa y β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5. **a)** Biomasa producida. **b)** β -glucanos producidos. Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre la temperatura donde se obtiene la mayor concentración de biomasa o β -glucanos a un nivel de confianza del 95%.

Los resultados encontrados son menores que los reportados por Mahapatra & Banerjee (2013) y Feng et al. (2010), quienes encontraron la mayor producción de polisacárido en *Fusarium solani* a los 12 días de cultivo a una temperatura de 28 °C; mientras que para *Lentinus edodes* a 10 días y 28 °C. Estos resultados son similares a las concentraciones de polisacáridos reportadas por Costa et al. (2019a), quienes cultivaron *Aspergillus terreus* durante 8 días a 28 °C para obtener la mayor concentración de polisacáridos.

Asimismo, los resultados obtenidos son mayores en comparación con estudios previos que reportaron valores de biomasa cultivada entre 3.00 y 6.00 días a temperaturas entre 28 °C y 35 °C para medios de cultivo provenientes de distintos residuos agroindustriales (Oshoma & Ikenebomeh, 2004; Djekrif et al., 2006; Jin et al., 1998; Cortés, Guadarrama y Díaz, 2014).

El efecto del pH sobre la producción de β -glucanos en *Aspergillus oryzae* M6A5 se muestra en la Tabla 68. Se observa que la mayor cantidad de biomasa se produjo a un pH de 3 (6.50 g/L, mientras que la mayor concentración de β -glucanos se obtuvo a un pH de 6, con un valor de 19.64 mg/100 g de biomasa.

Tabla 68. Efecto del pH sobre la obtención de β -glucanos provenientes de *Aspergillus oryzae* M6A5.

pH inicial	pH final	Biomasa (g/L) ¹	β -glucanos (mg/100g) ²
2	2.09	1.16 $\pm$ 0.03a	8.25 $\pm$ 0.38a
3	8.27	6.50 $\pm$ 0.18b	9.45 $\pm$ 0.19b
4	8.54	5.26 $\pm$ 0.27c	15.78 $\pm$ 0.51c
5	8.59	5.41 $\pm$ 0.55c	13.14 $\pm$ 0.61d
6	8.80	6.43 $\pm$ 0.56b	19.64 $\pm$ 0.91e
7	8.79	4.61 $\pm$ 0.52d	13.45 $\pm$ 0.36d

Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% con respecto a pH 6.

¹. Gramos de biomasa obtenida por cada litro de medio de cultivo.

². Miligramos de β -glucanos obtenidos por cada 100 gramos de biomasa de hongo.

El pH desempeña un papel importante en la inducción enzimática del metabolismo de los nutrientes, de manera que cada microorganismo tiene un pH óptimo para su crecimiento y producción de metabolitos. En el caso de *Aspergillus oryzae* M6A5, el pH óptimo fue de 6, valores por arriba o por debajo de este óptimo pueden provocar una disminución en la producción de biomasa y distintos tipos de metabolitos, ya que afecta la superficie celular, los canales iónicos y por ende la disponibilidad de nutriente (Abubakar et al., 2013). El incremento del pH puede deberse a la actividad metabólica de asimilación e hidrólisis de las fuentes de nitrógeno, que pueden liberar compuestos aminados, lo que conlleva al aumento del pH (Cortés, Guadarrama, Díaz, 2014).

Los resultados de pH son similares a los reportados por Mahapatra & Banerjee (2013), quienes cultivaron a *Fusarium solani* a pH 6 para obtener una concentración de biomasa y polisacáridos de 3.5 g/L y 990 mg/L, respectivamente, a los 14 días de cultivo. Los valores encontrados son mayores que los reportados por Feng et al. (2010), quienes a pH 5.00 obtuvieron una mayor cantidad de polisacáridos y menor que los resultados de Costa et al. (2019a), quienes encontraron la mayor concentración de polisacáridos a pH 8.79.

Los resultados para la obtención de la mayor concentración de biomasa están dentro del rango de pH de 3.0 a 7.0 reportados en varios estudios para *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* (Jin, et al., 1998; Oshoma & Ikenebomeh, 2004; Cortés, Guadarrama y Díaz, 2014).

En la Figura 88 se muestra el efecto de la fuente de carbono y la concentración de glucosa sobre la producción de biomasa y β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5. Se observa que la fuente de carbono más eficiente para la producción de biomasa fue sacarosa, que permitió obtener 10.39 g/L.

Para la producción β -glucanos, la glucosa fue la más eficiente ya que permitió obtener una concentración de 5.61 mg/100 g de biomasa. Una vez seleccionada la fuente de carbohidratos y ensayados a distintas concentraciones de glucosa para la mayor producción de β -glucanos se encontró que a 0.40 g/100 mL de medio de cultivo se obtuvieron valores de 6.38 g/L de biomasa y 13.91 mg/100 g de β -glucanos.

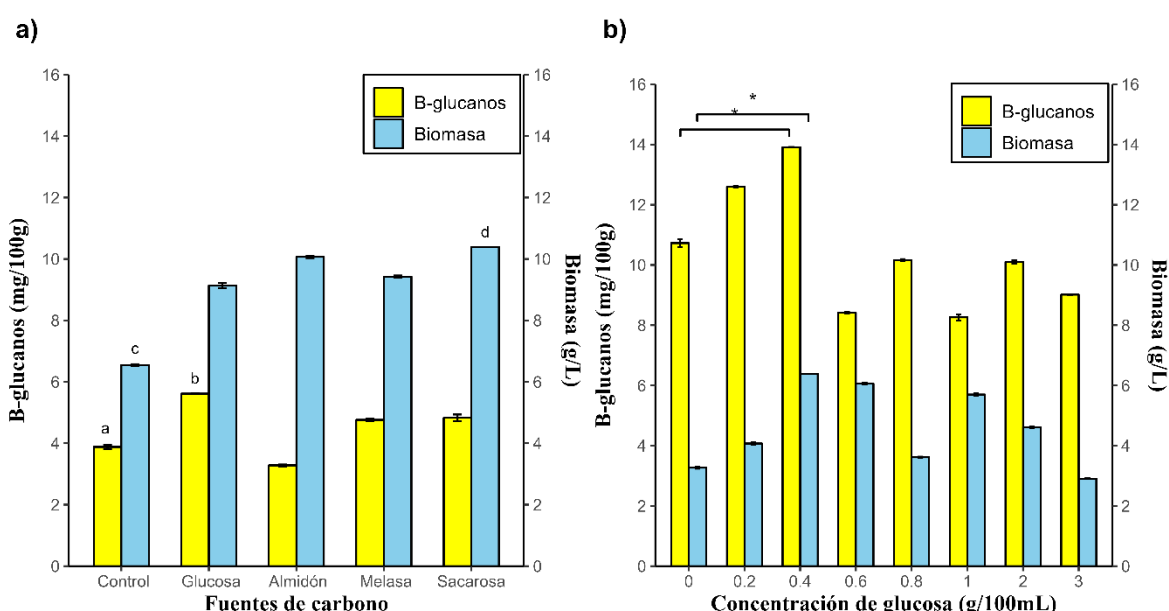


Figura 88. Efecto de la fuente de carbono y concentración de glucosa sobre la producción de biomasa y β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5. **a)** Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de las fuentes de carbono. **b)** Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de la concentración de glucosa. Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes o * muestran diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos respecto a la fuente de carbono para una mayor producción de biomasa difieren a los reportados por Feng et al. (2010), quienes encontraron una mayor producción de biomasa con glucosa y difieren en la fuente de carbohidratos para la producción de polisacáridos, ya que lograron una mayor producción con maltosa en *Lentinus edodes*. Sin embargo, estos resultados son similares a los reportados por Mahapatra & Banerjee (2013), quienes lograron producir una mayor cantidad de biomasa y polisacáridos con glucosa en *Fusarium solani*.

La concentración de polisacáridos obtenida es menor a los reportados por Feng et al. (2010), quienes obtuvieron 320 mg/L y que Mahapatra & Banerjee (2013), quienes reportaron 990

mg/L. Por otro lado, los valores de biomasa obtenidos se encuentran en el rango de 0.05 g/L y 49.16 g/L, reportados por Souza et al. (2018), Souza, Zamani & Taherzadeh (2019); Cortés, Guadarrama, Díaz (2014), Jin et al. (1998) y Uwineza et al. (2021), utilizando otros medios de cultivos.

En lo que respecta a la utilización de fuente de nitrógeno por *Aspergillus oryzae* M6A5, sulfato de amonio resultó ser la fuente que permitió obtener la mayor cantidad de biomasa (6.61 g/L), mientras que cloruro de amonio fue más eficiente para obtener mayor producción de β -glucanos (7.10 mg/L). Así mismo, la concentración de cloruro de amonio más eficiente para producir mayor cantidad de ambos compuestos fue de 0.8%, permitiendo obtener 7.53 g/L de biomasa y 17.11 mg/100 g de β -glucanos (Figura 89).

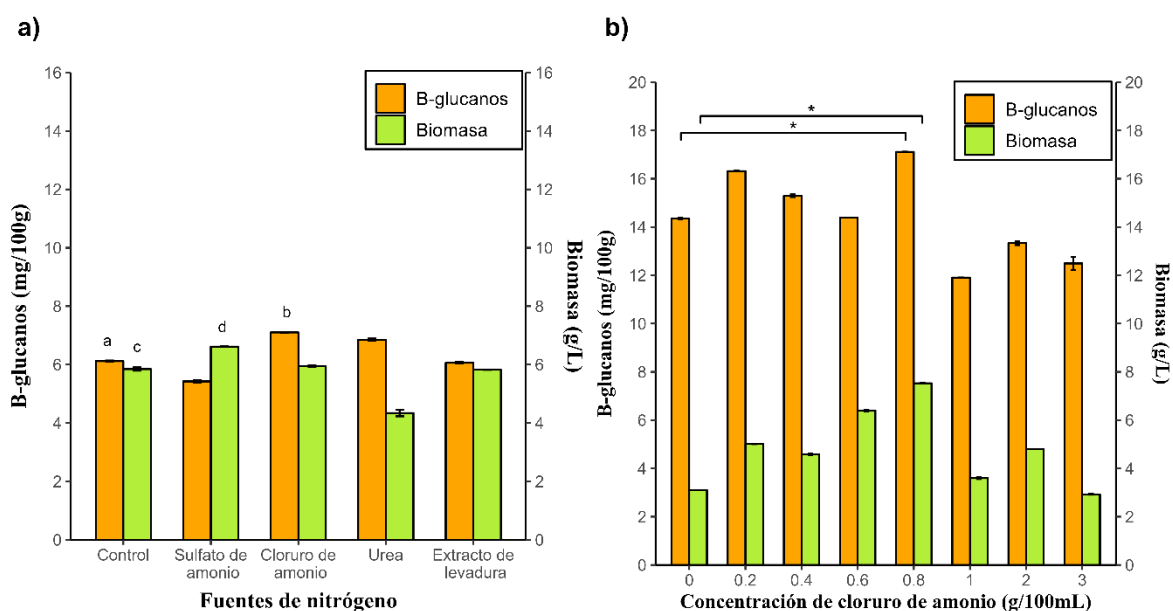


Figura 89. Efecto de la fuente de nitrógeno y concentración de cloruro de amonio sobre la producción de biomasa y β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5. **a)** Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de las fuentes de nitrógeno. **b)** Biomasa y β -glucanos producidos por efecto de la concentración de sulfato de amonio. Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes o * muestra diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

Los resultados encontrados con referencia a la fuente de nitrógeno difieren de los de Mahapatra & Banerjee (2013) y por Feng et al. (2010), quienes encontraron que el extracto de levadura fue la mejor fuente para la producción de mayor cantidad de biomasa y polisacáridos. Estos autores observaron que la utilización de cloruro de amonio conlleva a una producción de ambos compuestos cercano al control en *Fusarium solani* SD5 y *Lentinus edodes*. Por su parte, Costa et al. (2019a) encontraron que nitrato de amonio era más eficiente para la producción de biomasa y de polisacáridos. La concentración que permitió obtener la mayor cantidad de β -glucanos se encuentra dentro del rango reportado por estos autores, quienes utilizaron concentraciones de entre 0.50% y 0.96% en *Aspergillus terreus*.

Los valores de biomasa obtenidos son mayores que los reportados por Oshoma & Ikenebomeh (2004) y por Djekrif et al. (2006), quienes utilizaron sulfato de amonio y extracto de levadura, respectivamente.

En la Tabla 69 se presenta el arreglo experimental para la optimización de la producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5, basado en el modelo de diseño central compuesto. Se muestra que en la corrida 14 se obtuvo la mayor cantidad de β -glucanos (31.17 mg/100g), mientras que el menor valor de β -glucanos se obtuvo en la corrida 20, con 10.35 mg/100g.

Tabla 69. Arreglo experimental y respuesta del diseño central compuesto para la optimización de producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5.

Orden de corrida	Variables independientes		Respuesta: β -glucanos (mg/100g)	
	X1: CG ¹ (g%)	X2: CCA ² (g%)	Medidos	Predichos
1	-1 (0.2)	-1 (0.6)	16.99	15.52
2	1 (0.6)	-1 (0.6)	30.98	31.18
3	-1 (0.2)	1 (1.0)	20.79	19.26
4	1 (0.6)	1 (1.0)	16.02	16.45
5	-1.41 (0.12)	0 (0.8)	17.99	19.47
6	1.41 (0.68)	0 (0.8)	30.98	28.56
7	0 (0.4)	-1.41 (0.52)	17.99	21.07
8	0 (0.4)	1.41 (1.08)	14.00	13.30
9	0 (0.4)	0 (0.8)	17.89	13.48
10	0 (0.4)	0 (0.8)	14.12	13.48
11	0 (0.4)	0 (0.8)	11.46	13.48
12	0 (0.4)	0 (0.8)	12.68	13.48
13	-1 (0.2)	-1 (0.6)	18.00	15.52
14	1 (0.6)	-1 (0.6)	31.17	31.18
15	-1 (0.2)	1 (1.0)	21.98	19.26
16	1 (0.6)	1 (1.0)	16.99	16.45
17	-1.41 (0.12)	0 (0.8)	16.00	19.47
18	1.41 (0.68)	0 (0.8)	27.02	28.56
19	0 (0.4)	-1.41 (0.52)	22.34	21.07
20	0 (0.4)	1.41 (1.08)	10.35	13.30
21	0 (0.4)	0 (0.8)	15.23	13.48
22	0 (0.4)	0 (0.8)	13.46	13.48
23	0 (0.4)	0 (0.8)	12.57	13.48
24	0 (0.4)	0 (0.8)	10.46	13.48

El diseño experimental fue realizado con dos factores, doce corridas base y dos réplicas para cada tratamiento. Los ensayos fueron realizados a una temperatura de 35 °C, pH de 6, velocidad de agitación 150 rpm, volumen de medio de cultivo 50 mL y el volumen del Erlenmeyer de 250 mL.

¹. Concentración de glucosa en gramos por cada 100 mL de medio de cultivo.

². Concentración de cloruro de amonio en gramos por cada 100 mL de medio de cultivo.

Los valores p de cada coeficiente evaluado son mostrados en la Tabla 70, debido a que estos valores son menores a 0.05, son significativos para el modelo cuadrático evaluado. Por ende, se incluyeron dentro del modelo dos coeficientes lineales, dos cuadráticos y una interacción,

con la finalidad de plantear una ecuación de optimización para la producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5.

Tabla 70. Análisis de varianza (ANOVA) del modelo de superficie de respuesta para la optimización de la producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrado	Contribución	Cuadrados medios	Valor-f	Valor-p
Modelo	5	820.03	89.22%	164.006	29.79	0.000
Lineal	2	285.95	31.11%	142.974	25.97	0.000
Con_glucosa	1	165.10	17.96%	165.104	29.98	0.000
Con_cloruro	1	120.84	13.15%	120.843	21.95	0.000
Cuadrado	2	363.64	39.56%	181.822	33.02	0.000
Con_glucosa*Con_glucosa	1	319.76	34.79%	355.151	64.50	0.000
Con_cloruro*Con_cloruro	1	43.88	4.77%	43.883	7.97	0.011
Interacción de 2 factores	1	170.44	18.54%	170.440	30.95	0.000
Con_glucosa*Con_cloruro	1	170.44	18.54%	170.440	30.95	0.000
Error	18	99.11	10.78%	5.506		
Falta de ajuste	3	33.72	3.67%	11.240	2.58	0.092
Error puro	15	65.39	7.11%	4.360		
Total	23	919.14	100.00%			

R-cuadrado: 89.22%

R-cuadrado ajustado: 86.22%

Basado en las Tabla 70, la ecuación para la predicción de la producción de β -glucanos ($Y_{\beta\text{-glucano}}$) en unidades codificadas es la siguiente:

$$Y_{\beta\text{-glucano}} = 13.483 + 3.212X_1 - 2.748X_2 + 5.267 X_1 * X_1 + 1.852 X_2 * X_2 - 4.616 X_1 * X_2$$

Debido a que el valor de la prueba f para el modelo cuadrático fue de 33.02 con p valor menor a 0.05, se infiere que el modelo de regresión cuadrático es significativo. El coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}) fue de 86.22%, superior que 70%, lo que demuestra una buena bondad de ajuste de los valores predichos y la regresión cuadrática, por ende, existe un alto grado de correlación entre los valores experimentales y predichos.

Así mismo, sugiere que el 86.22% de la variación en el contenido de β -glucanos extraídos de *Aspergillus oryzae* M6A5 puede ser explicada por la ecuación de predicción polinomial de segundo orden. El valor del índice de precisión fue de 15.24, valor superior a 4.00, lo que indica que el modelo es adecuado para navegar en el espacio del diseño del experimento. El valor f para la falta de ajuste fue de 2.58 con un valor p de 0.092, lo cual implica que la perdida de ajuste debido al error no es significativo. En consecuencia, el modelo muestra una alta exactitud y consistencia en los valores experimentales, por ende, el modelo es adecuado.

En la Figura 90 se muestran los gráficos 2D y 3D del efecto de la concentración de glucosa y cloruro de amonio en la producción β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5, se observa que la mayor concentración del polisacárido se obtiene a 0.6% de glucosa y 0.6% de sulfato de amonio (31.17 mg/100g de biomasa), a concentración distintas de la fuente de carbono y nitrógeno se obtienen concentración de β -glucanos menores como la obtenido a 0.4% de glucosa y 1.08% de cloruro de amonio (10.35 mg/100 g de biomasa), así mismo, se observa que la superficie obtenida fue cuadrática y no un plano lineal.

La validación del modelo fue llevada a cabo bajo las condiciones antes señaladas, produciendo 31 mg/100 g de β -glucanos. Esto confirma una buena correlación entre los valores de β -glucanos esperados y los predichos por el modelo.

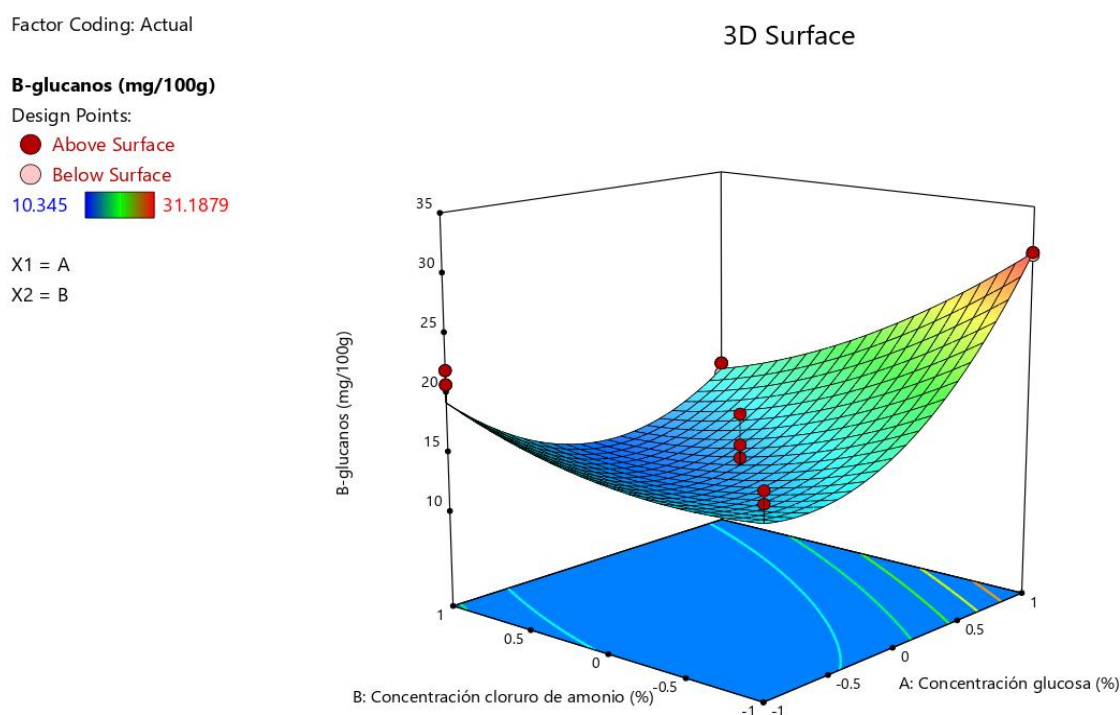


Figura 90. Gráficos 2D y 3D del efecto de la concentración de glucosa y cloruro de amonio, mostrando las interacciones más importantes para la producción β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5.

En las Tablas 71 y 72 se muestran los resultados para la caracterización de los componentes de los medios de cultivos utilizados en la optimización de la producción de β -glucanos, tanto antes como después del cultivo de *Aspergillus oryzae* M6A5. Se observa que el contenido de almidón es el componente más representativo de los medios, con valores que van desde 3100.09 hasta 4340.01 mg/100 mL antes del cultivo y 312.01 a 655.14 mg/100 mL después del cultivo.

Tabla 71. Caracterización de los medios de cultivos formulados para el diseño de superficie de respuesta en la optimización de la producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5.

Corridas	Sólidos totales (g/100mL)		Sólidos en suspensión (g/100mL)		Sólidos solubles (g/100mL)		Cenizas (g/100mL)	
	Antes del cultivo	Después del cultivo	Antes del cultivo	Después del cultivo	Antes del cultivo	Después del cultivo	Antes del cultivo	Después del cultivo
1	2.80 ± 0.01a	1.01 ± 0.31b	2.41 ± 0.66a	0.52 ± 0.59b	0.45 ± 0.03a	0.31 ± 0.05b	0.36 ± 0.00a	0.25 ± 0.03b
2	3.30 ± 0.08a	1.23 ± 0.45b	1.55 ± 0.09a	0.89 ± 0.28b	1.73 ± 0.03a	0.35 ± 0.04b	0.36 ± 0.03a	0.23 ± 0.05b
3	3.27 ± 0.17a	1.08 ± 0.31b	2.77 ± 0.13a	1.27 ± 0.42b	0.54 ± 0.03a	0.27 ± 0.04b	0.33 ± 0.01a	0.14 ± 0.01b
4	3.46 ± 0.55a	1.35 ± 0.03b	2.97 ± 0.14a	1.30 ± 0.45b	0.55 ± 0.04a	0.12 ± 0.02b	0.32 ± 0.06a	0.16 ± 0.00b
5	2.75 ± 0.34a	1.25 ± 0.11b	2.55 ± 0.45a	1.19 ± 0.17b	0.20 ± 0.03a	0.15 ± 0.08b	0.35 ± 0.07a	0.22 ± 0.07b
6	3.44 ± 0.45a	1.38 ± 0.61b	2.39 ± 0.45a	1.30 ± 0.23b	1.10 ± 0.00a	0.04 ± 0.02b	0.37 ± 0.02a	0.15 ± 0.05b
7	3.06 ± 0.05a	1.25 ± 0.03b	2.68 ± 0.24a	1.10 ± 0.13b	0.38 ± 0.05a	0.10 ± 0.09b	0.25 ± 0.05a	0.10 ± 0.02b
8	3.28 ± 0.33a	1.54 ± 0.43b	2.95 ± 0.53a	1.51 ± 0.01b	0.36 ± 0.06a	0.11 ± 0.01b	0.34 ± 0.02a	0.14 ± 0.03b
9	3.32 ± 0.90a	1.29 ± 0.17b	2.77 ± 0.55a	1.09 ± 0.06b	0.43 ± 0.00a	0.12 ± 0.04b	0.37 ± 0.00a	0.13 ± 0.03b
10	3.33 ± 0.45a	1.26 ± 0.91b	2.75 ± 0.43a	1.10 ± 0.37b	0.47 ± 0.02a	0.13 ± 0.01b	0.37 ± 0.02a	0.12 ± 0.01b
11	3.33 ± 0.12a	1.27 ± 0.32b	2.76 ± 0.26a	1.13 ± 0.50b	0.45 ± 0.00a	0.16 ± 0.00b	0.38 ± 0.00a	0.12 ± 0.03b
12	3.32 ± 0.32a	1.27 ± 0.33b	2.77 ± 0.71a	1.12 ± 0.27b	0.46 ± 0.06a	0.14 ± 0.08b	0.38 ± 0.05a	0.12 ± 0.04b
13	2.81 ± 0.22a	0.99 ± 0.33b	2.42 ± 0.09a	0.51 ± 0.61b	0.44 ± 0.02a	0.30 ± 0.05b	0.35 ± 0.05a	0.23 ± 0.01b
14	3.29 ± 0.21a	1.22 ± 0.04b	1.56 ± 0.02a	0.87 ± 0.07b	1.73 ± 0.02a	0.35 ± 0.01b	0.35 ± 0.05a	0.22 ± 0.05b
15	3.26 ± 0.34a	1.05 ± 0.04b	2.74 ± 0.97a	1.28 ± 0.04b	0.55 ± 0.09a	0.26 ± 0.03b	0.32 ± 0.01a	0.13 ± 0.01b
16	3.46 ± 0.59a	1.35 ± 0.23b	2.76 ± 0.19a	1.31 ± 0.12b	0.53 ± 0.05a	0.13 ± 0.03b	0.32 ± 0.04a	0.17 ± 0.00b
17	2.73 ± 0.24a	1.23 ± 0.12b	2.54 ± 0.88a	1.19 ± 0.09b	0.19 ± 0.21a	0.06 ± 0.05b	0.36 ± 0.00a	0.21 ± 0.04b
18	3.46 ± 0.55a	1.38 ± 0.09b	2.38 ± 0.05a	1.33 ± 0.47b	1.09 ± 0.01a	0.04 ± 0.01b	0.36 ± 0.08a	0.22 ± 0.02b
19	3.04 ± 0.51a	1.27 ± 0.33b	2.67 ± 0.67a	1.11 ± 0.10b	0.37 ± 0.01a	0.11 ± 0.03b	0.24 ± 0.01a	0.11 ± 0.04b
20	3.26 ± 0.66a	1.60 ± 0.76b	2.98 ± 0.09a	1.55 ± 0.14b	0.36 ± 0.03a	0.11 ± 0.03b	0.35 ± 0.03a	0.19 ± 0.01b
21	3.31 ± 0.20a	1.28 ± 0.19b	2.76 ± 0.30a	1.06 ± 0.13b	0.48 ± 0.09a	0.10 ± 0.01b	0.37 ± 0.03a	0.13 ± 0.00b
22	3.35 ± 0.15a	1.27 ± 0.05b	2.79 ± 0.25a	1.07 ± 0.35b	0.50 ± 0.04a	0.09 ± 0.02b	0.35 ± 0.06a	0.15 ± 0.01b
23	3.30 ± 0.12a	1.29 ± 0.19b	2.78 ± 0.45a	1.10 ± 0.11b	0.51 ± 0.01a	0.10 ± 0.05b	0.34 ± 0.01a	0.12 ± 0.04b
24	3.27 ± 0.20a	1.25 ± 0.22b	2.72 ± 0.09a	1.11 ± 0.09b	0.55 ± 0.04a	0.11 ± 0.03b	0.36 ± 0.03a	0.16 ± 0.02b

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones ± la desviación estándar. Letras diferentes para los parámetros evaluados antes y después de la fermentación muestran diferencia significativa a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 72. Continuación de caracterización de los medios de cultivos formulados para el diseño de superficie de respuesta en la optimización de la producción de β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5.

Corridas	Nitrógeno (g/100mL)		Azúcares totales (mg/100mL)		Azúcares reductores (mg/100mL)		Almidón total (mg/100mL)	
	Antes del cultivo	Después del cultivo	Antes del cultivo	Después del cultivo	Antes del cultivo	Después del cultivo	Antes del cultivo	Después del cultivo
1	0.37 $\pm$ 0.10a	0.03 $\pm$ 0.20b	178.25 $\pm$ 0.65a	5.25 $\pm$ 0.19b	55.05 $\pm$ 0.52a	15.60 $\pm$ 0.90b	4340.01 $\pm$ 0.19a	461.15 $\pm$ 0.58b
2	0.45 $\pm$ 0.11a	0.15 $\pm$ 0.31b	166.00 $\pm$ 0.01a	10.01 $\pm$ 0.71b	52.54 $\pm$ 0.10a	9.07 $\pm$ 0.28b	3932.99 $\pm$ 0.76a	430.32 $\pm$ 0.13b
3	0.36 $\pm$ 0.22a	0.17 $\pm$ 0.21b	342.33 $\pm$ 0.15a	3.15 $\pm$ 0.19b	68.11 $\pm$ 0.22a	10.12 $\pm$ 1.81b	3619.45 $\pm$ 0.12a	425.54 $\pm$ 0.59b
4	0.45 $\pm$ 0.40a	0.14 $\pm$ 0.70b	350.99 $\pm$ 0.99a	10.07 $\pm$ 0.41b	64.78 $\pm$ 0.15a	15.05 $\pm$ 0.14b	3620.09 $\pm$ 0.97a	501.05 $\pm$ 0.22b
5	0.35 $\pm$ 0.09a	0.20 $\pm$ 0.15b	117.02 $\pm$ 0.05a	28.12 $\pm$ 0.632b	60.12 $\pm$ 0.54a	5.01 $\pm$ 0.70b	3412.08 $\pm$ 0.14a	450.22 $\pm$ 0.89b
6	0.32 $\pm$ 0.75a	0.12 $\pm$ 0.29b	393.54 $\pm$ 0.11a	36.88 $\pm$ 0.99b	45.16 $\pm$ 0.90a	5.12 $\pm$ 0.78b	3939.79 $\pm$ 0.03a	655.14 $\pm$ 0.39b
7	0.30 $\pm$ 0.30a	0.15 $\pm$ 0.10b	227.15 $\pm$ 0.60a	58.18 $\pm$ 0.01b	43.91 $\pm$ 0.73a	3.25 $\pm$ 0.45b	4026.25 $\pm$ 0.30a	311.98 $\pm$ 0.12b
8	0.33 $\pm$ 0.20a	0.18 $\pm$ 0.23b	237.03 $\pm$ 0.90a	79.34 $\pm$ 0.93b	44.01 $\pm$ 0.55a	7.03 $\pm$ 0.94b	3110.02 $\pm$ 0.21a	649.59 $\pm$ 0.91b
9	0.38 $\pm$ 0.11a	0.22 $\pm$ 0.15b	235.06 $\pm$ 0.50a	6.25 $\pm$ 0.91b	56.10 $\pm$ 0.36a	5.10 $\pm$ 0.15b	3240.31 $\pm$ 0.91a	340.12 $\pm$ 0.03b
10	0.36 $\pm$ 0.22a	0.20 $\pm$ 0.12b	233.01 $\pm$ 0.95a	6.10 $\pm$ 0.50b	55.11 $\pm$ 0.45a	5.09 $\pm$ 0.79b	3242.09 $\pm$ 0.99a	342.14 $\pm$ 0.93b
11	0.34 $\pm$ 0.67a	0.21 $\pm$ 0.60b	233.17 $\pm$ 0.05a	6.15 $\pm$ 0.22b	55.00 $\pm$ 0.87a	5.10 $\pm$ 0.50b	3245.01 $\pm$ 0.91a	343.99 $\pm$ 0.50b
12	0.35 $\pm$ 0.33a	0.23 $\pm$ 0.54b	232.19 $\pm$ 0.76a	6.09 $\pm$ 0.93b	55.29 $\pm$ 0.65a	5.09 $\pm$ 0.53b	3243.79 $\pm$ 0.11a	344.25 $\pm$ 0.99b
13	0.36 $\pm$ 0.15a	0.04 $\pm$ 0.43b	177.99 $\pm$ 0.23a	5.30 $\pm$ 0.24b	55.03 $\pm$ 0.30a	15.47 $\pm$ 0.09b	4338.09 $\pm$ 0.10a	461.00 $\pm$ 0.90b
14	0.45 $\pm$ 0.05a	0.14 $\pm$ 0.05b	165.07 $\pm$ 0.08a	11.01 $\pm$ 0.01b	52.39 $\pm$ 0.32a	10.01 $\pm$ 0.21b	3935.00 $\pm$ 0.30a	429.66 $\pm$ 0.10b
15	0.35 $\pm$ 0.78a	0.17 $\pm$ 0.66b	341.38 $\pm$ 0.23a	3.09 $\pm$ 0.99b	66.12 $\pm$ 0.29a	10.88 $\pm$ 0.09b	3616.54 $\pm$ 0.21a	423.90 $\pm$ 0.08b
16	0.44 $\pm$ 0.29a	0.13 $\pm$ 0.79b	350.19 $\pm$ 0.05a	10.00 $\pm$ 0.51b	65.31 $\pm$ 0.32a	13.29 $\pm$ 0.19b	3617.99 $\pm$ 0.98a	506.29 $\pm$ 0.23b
17	0.34 $\pm$ 0.20a	0.21 $\pm$ 0.45b	118.15 $\pm$ 0.15a	28.45 $\pm$ 0.03b	58.92 $\pm$ 0.10a	9.20 $\pm$ 0.99b	3415.10 $\pm$ 0.12a	448.52 $\pm$ 0.31b
18	0.31 $\pm$ 0.70a	0.15 $\pm$ 0.39b	392.91 $\pm$ 0.06a	36.99 $\pm$ 0.66b	45.100 $\pm$ 0.99a	5.00 $\pm$ 0.25b	3940.98 $\pm$ 0.40a	656.07 $\pm$ 0.45b
19	0.29 $\pm$ 0.10a	0.16 $\pm$ 0.15b	229.99 $\pm$ 0.22a	58.01 $\pm$ 5.09b	44.00 $\pm$ 0.12a	3.29 $\pm$ 0.61b	4024.91 $\pm$ 0.22a	312.01 $\pm$ 0.09b
20	0.32 $\pm$ 0.95a	0.17 $\pm$ 0.26b	237.45 $\pm$ 0.89a	80.01 $\pm$ 0.10b	43.91 $\pm$ 0.58a	7.19 $\pm$ 0.36b	3100.09 $\pm$ 0.01a	650.27 $\pm$ 0.23b
21	0.37 $\pm$ 0.20a	0.23 $\pm$ 0.23b	234.10 $\pm$ 0.92a	6.23 $\pm$ 0.89b	55.16 $\pm$ 0.45a	5.05 $\pm$ 0.45b	3239.91 $\pm$ 0.65a	415.78 $\pm$ 0.01b
22	0.35 $\pm$ 0.22a	0.22 $\pm$ 0.33b	234.05 $\pm$ 0.20a	6.25 $\pm$ 0.90b	55.01 $\pm$ 0.96a	5.16 $\pm$ 0.11b	3239.99 $\pm$ 0.23a	341.11 $\pm$ 0.22b
23	0.36 $\pm$ 0.08a	0.23 $\pm$ 0.45b	233.12 $\pm$ 0.01a	6.27 $\pm$ 0.67b	55.16 $\pm$ 0.05a	5.09 $\pm$ 0.95b	3240.10 $\pm$ 0.33a	343.01 $\pm$ 0.34b
24	0.36 $\pm$ 0.33a	0.21 $\pm$ 0.34b	232.50 $\pm$ 0.07a	6.15 $\pm$ 0.89b	54.98 $\pm$ 0.56a	5.07 $\pm$ 0.64b	3238.74 $\pm$ 0.16a	341.65 $\pm$ 0.95b

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes para los parámetros evaluados antes y después de la fermentación muestran diferencia significativa a un nivel de confianza del 95%.

Posteriormente, se encuentran los sólidos totales, con valores de 2.73 y 3.46 g/100 mL antes del cultivo y entre 0.99 y 1.60 g/100 mL después del cultivo. Los sólidos en suspensión tuvieron concentraciones de 1.55 a 2.98 g/100mL antes del cultivo y 0.51 a 1.55 g/100 mL después del cultivo. Los sólidos solubles se encontraron en un rango de 0.19 y 1.73 g/100 mL antes del cultivo y 0.04 a 0.35 g/100 mL después del cultivo.

Con respecto al contenido de cenizas se encontró entre los valores de 0.24 y 0.38 g/100 mL antes del cultivo y 0.11 y 0.35 g/100 mL después del cultivo. El contenido de nitrógeno se halló en concentraciones de 0.29 y 0.45 g/100 mL antes del cultivo y 0.03 y 0.23 g/100 mL después del cultivo.

Los azúcares totales estuvieron en una concentración de 165.07 y 393.54 mg/100 mL antes de cultivo y de 3.09 y 80.01 mg/100 mL después del cultivo. Los azúcares reductores presentaron valores de 43.91 y 68.11 mg/100 mL antes del cultivo y de 3.25 y 15.60 mg/100 mL después del cultivo.

En cuanto al medio de cultivo de la corrida No. 14, se consumió el 89.08% de almidón, el 62.92% de sólidos totales, el 44.23% de sólidos en suspensión, 79.77% de sólidos solubles, 38.89% de cenizas, 68.89% de nitrógeno, 93.33% de azúcares totales, 80.89% de azúcares reductores.

Los valores de los distintos componentes determinados en los medios de cultivos son menores que reportados por Huang, Jin & Lant (2005), Souza et al. (2018) y por Souza, Zamani & Taherzadeh (2019) en residuos líquidos del proceso de obtención de almidón de papa, de la industria de extracción de almidón de trigo y líquidos del procesamiento de guisantes respectivamente.

Todos los parámetros determinados en los residuos del proceso de obtención de almidón de papa son menores que los reportados en otras investigaciones. A pesar de encontrarse estos componentes en pequeñas proporciones y con la suplementación de 0.80% de glucosa y de sulfato de amonio, *Rhizopus oryzae* M10A1 fue capaz de producir 10.55 g/L de β -glucanos consumiendo como fuentes de carbohidratos el 88.27% de almidón, 92.07% de azúcares totales, 75.05% de azúcares reductores y el 44.68% de nitrógeno.

En el caso de *Aspergillus oryzae* M6A5, con los nutrientes del medio, fue capaz de producir 12.49 g/L y 31.17 mg/100g de polisacáridos, consumiendo el 89.08% de almidón, 93.33% de azúcares totales, 80.89% de azúcares reductores y el 68.89% de nitrógeno. De los valores obtenidos, *Aspergillus oryzae* M6A5 utiliza mayor cantidad de fuente de carbono y nitrógeno para producir mayor cantidad de biomasa.

Es de notar que *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae* son hongos que pertenecen a la división *Ascomycota* y *Mucormycota* respectivamente, por ende, sus características biológicas y fisiológicas son distintas, lo cual puede explicar la diferencia en la producción de biomasa y β -glucanos. Al respecto, se menciona que la biomasa y polisacáridos en cultivo sumergido depende del microorganismo, así como del tiempo de cultivo, la temperatura, pH, composición química del medio, fuente de nitrógeno, fuente de carbono, entre otros factores. Tal como se observó, los resultados obtenidos para las distintas condiciones estudiadas fueron diferentes para ambos tipos de hongos utilizados.

Al respecto, El-Enshasy (2007), Fazenda et al. (2008) y Vongsangnak, & Nielsen (2013), mencionan los siguientes argumentos que pueden explicar la variación en biomasa y β -glucanos por efecto de los parámetros estudiados:

El tiempo de cultivo determina la calidad y cantidad del producto final, en tal sentido, la cantidad y tipos de β -glucanos pueden verse afectados por las enzimas β -glucanasas, que son sintetizadas a medida que transcurre el tiempo y se agotan las fuentes de carbono.

La temperatura es un factor clave que afecta la tasa de crecimiento de los hongos, la tensión de oxígeno disuelto, tasa de evaporación del medio de cultivo y la formación del pellets debido a una mayor tasa metabólica, de tal forma que cada hongo tendrá una temperatura óptima para la producción de biomasa y la formación de distintos tipos de metabolitos.

En relación, al pH de los cultivos sumergidos, afecta la función de la membrana, morfología celular y estructuras, solubilidad de sales, estado iónico del sustrato, tasa de toma del sustrato, producción de bicarbonato a partir del CO_2 disuelto, formación de biomasa y de metabolitos. Este factor depende de la composición del medio y cambia debido a la toma de nutrientes para el crecimiento del hongo, así como la secreción de desechos metabólicos. Muchos hongos crecen a pH por debajo de 4, y la producción de polisacáridos se potencia a un pH de 6. Este factor depende del microorganismo utilizado en la fermentación sumergida y cambio del catabolismo por la fuente de carbono y de nitrógeno utilizados.

El medio de cultivo es un factor clave para el crecimiento del micelio de los hongos. Cada sustrato tiene múltiple efecto interconectados en el sistema de cultivo y, en consecuencia, no existe un medio de cultivo ideal. En tal sentido, se puede utilizar medio sintéticos definidos, medios complejos y residuos agroindustriales. Todos estos sustratos pueden soportar el crecimiento y la producción de metabolitos y algunas especies de hongos puede aprovecharlos mejor que otros debido a la producción de enzimas.

En caso de sustratos provenientes de residuos, estos deben ser suplementado con cantidades importantes de carbohidratos para obtener una alta productividad de biomasa y con fuentes de nitrógeno para influenciar la productividad y eficiencia de producción de biomasa, metabolitos y polisacáridos.

Las fuentes de carbono son importantes para el metabolismo de los hongos ya que los carbohidratos son el principal componente del citoesqueleto y son nutrientes importantes para el crecimiento y desarrollo. La utilización de las fuentes de carbono va a depender de la especie de hongo, y la fuente de carbono, así como de su concentración, pueden tener un efecto complejo sobre el metabolismo de los organismos vivos. Entre las fuentes más utilizadas están la glucosa, sacarosa, maltosa y fuentes complejas como melaza, sirop de malta, almidón y bagazo.

El nitrógeno utilizado en fermentación sumergida afecta la producción de metabolitos, la morfología de los hongos y la producción de biomasa. En el caso de fuente inorgánicas, conlleva a una baja producción de biomasa, mientras que las fuentes orgánicas pueden potenciar su producción. Estas características dependen también del metabolismo de los hongos utilizados en los procesos de fermentación.

De los resultados que hacen referencia a la optimización de los medios de cultivo para la producción de β -glucanos, se puede evidenciar que se obtuvo un incremento para los

polisacáridos de *Rhizopus oryzae* M10A1 desde 1206.23 a 3218.67 mg/100g de biomasa y para *Aspergillus oryzae* M6A5 desde 13.48 a 31.17 mg/100g de biomasa. En consecuencia, la mayor producción del polisacárido la produjo el primer hongo cultivado a una temperatura de 30 °C, pH de 6, tiempo de cultivo de 4 días, velocidad de agitación 150 rpm y un volumen de medio de cultivo de 50 mL, suplementado con 0.8% de glucosa y de sulfato de amonio. Los valores de β -glucanos están dentro del rango reportado por Nitschke et al. (2011) para varios cuerpos fructíferos y micelios de diversos tipos de hongos.

Esto hace que el hongo a utilizar en las otras etapas experimentales sea *Rhizopus oryzae* M10A1 cultivado por fermentación sumergida en las condiciones señaladas.

5.3. Objetivo 3, 4 y 5. Extracción, purificación, determinación del rendimiento y caracterización estructural de los β -glucanos.

Después de realizar la extracción y purificación con las metodologías indicadas en el apartado 4.2.3.1 y 4.2.3.2, se obtuvieron β -glucanos, los cuales fueron caracterizados y los resultados son mostrados a continuación.

5.3.1. Rendimiento y caracterización química.

En la Tabla 73 se muestran los resultados del rendimiento y de la caracterización química de los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. El rendimiento del proceso de extracción de β -glucanos extraídos de las paredes celulares de *Rhizopus oryzae* fue de 3.42% y los de *Aspergillus oryzae* fue de 0.03%.

Los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 presentaron un alto valor de carbohidratos totales (82.46%), seguido por el contenido de humedad (11.21%). Los menores valores correspondieron a los componentes de cenizas, nitrógeno, proteína y grasa total. Estos valores sugieren que los β -glucanos obtenidos están compuestos mayoritariamente por azúcares.

Tabla 73. Rendimiento y caracterización química de los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Parámetros	β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i> M10A1
Rendimiento	3.42 $\pm$ 0.51
Humedad	11.21 $\pm$ 0.68
Cenizas	1.25 $\pm$ 0.05
Nitrógeno	0.14 $\pm$ 0.01
Proteínas	0.89 $\pm$ 0.04
Grasas	0.63 $\pm$ 0.08
Carbohidratos totales	82.46 $\pm$ 0.04

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Valores expresados en porcentaje (g/100g).

El rendimiento obtenido para la extracción de β -glucanos es comparable con la información reportada por Złotko et al. (2019), quienes obtuvieron valores entre 1.53 y 57% para hongos pertenecientes al género *Aspergillus*, *Ganoderma* y *Pleurotus*. Por otro lado, Kyanko et al. (2013) reportaron valores en el rango de 0.7 y 23.8% en hongos filamentosos y un contenido inferior (0.9%) de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* obtenido de las paredes celulares del micelio. En esta investigación, se logró incrementar 3 veces más la cantidad de estos

polisacáridos mediante la optimización del medio de cultivo a base de residuo líquido de almidón de papa suplementado con glucosa y sulfato de amonio.

Diferencias en los rendimiento de extracción podrían deberse a factores como, la especie de donde se extraen, composición química, metabolismo de síntesis, y a la presencia de otros compuestos (Gao et al., 2017; Nakashima et al., 2018; Ruiz & Ortiz, 2019; Garcia et al., 2020; Utama et al., 2020).

El contenido de azúcares totales, de nitrógeno, proteínas y lípidos son similares a los reportados en β -glucanos extraídos de *Laminaria japonica* y *Fusarium solani* (Gao et al., 2017; Zeng et al., 2019). Se menciona que el contenido de estos componentes son indicadores de pureza, y en este sentido, el contenido de azúcares totales debe ser superior al 80% y otros componentes en concentraciones mínimas (Synytsya & Novak, 2014). De acuerdo a esa información, los β -glucanos obtenidos tienen una pureza adecuada.

5.3.2. Caracterización física.

En lo que respecta a las características físicas, el color de los β -glucanos es marrón claro, tal como se observa en la Figura 91. Las coordenadas de color en la escala CIELAB son L: 33.42, a: 3.67 y b: 17.44 (Tabla 74). En esta escala el color tiende más hacia el rojo y al amarillo y a ser más luminoso.



Tabla 74. Color de los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Parámetros	β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>
Color	
L	33.42 $\pm$ 0.40
a	3.67 $\pm$ 0.06
b	17.44 $\pm$ 0.33

Figura 91. Color de los β -glucanos de *Rhizopus oryzae*. Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Las unidades del color son adimensionales.

Se ha reportado el color marrón claro como característico de los β -glucanos de *Laminaria japonica*, *Fusarium solani* y *Avena sativa* (León, 2021). El valor de luminosidad (L) fue menor y los de cromaticidad similares a los reportados en β -glucanos de cebada y de *Agaricus bisporus* (Abdel et al., 2020; Fraga & Nunes, 2020). Este color no impediría su uso, a nivel industrial, en alimentos colores claros o transparentes, por no producir mayores cambios (Ahmad et al., 2010).

5.3.3. Caracterización estructural.

En la Tabla 75 se presentan los resultados de los monosacáridos presentes en los β -glucanos extraídos de *Rhizopus oryzae* M10A1. Los monosacáridos más abundantes fueron glucosa (59.84%), galactosa (9.01%) y fructosa (8.61%) y el menos abundante fue arabinosa

(4.80%). La relación molar de los monosacáridos que conforman a los β -glucanos fue 8.12:4.80:59.84:7.21:9.01:8.61. El peso molecular de los polisacáridos fue de 450 Kilodalton (kDa).

Tabla 75. Cuantificación de monosacáridos presentes y peso molecular de los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Monosacáridos	Valor
Xilosa	8.12
Arabinosa	4.80
Glucosa	59.84
Manosa	7.21
Galactosa	9.01
Fructosa	8.61
Otros	2.41
Peso molecular	450
Proporción de β -glucanos	61.55

Los valores de composición de monosacáridos y β -glucanos son expresados en porcentaje y el peso molecular en kiloDalton (kDa).

Se ha reportado a la glucosa como el principal monosacárido en β -glucanos de hongos filamentosos tales como *Aspergillus spp*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus wentii*, con valores superiores al 93,6%, en menor proporción manosa y como elementos traza, galactosa (Choma et al., 2013; Wiater et al., 2015 y Costa et al., 2019a). Los resultados encontrados difieren en el perfil de monosacáridos ya que los β -glucanos aislados tienen una composición heterogénea y por ende puede ser clasificado con un heteroglicano.

Los β -glucanos heterogéneos, que tienen una composición diversa en monosacáridos, son denominados heteroglicanos, Santra & Banerjee, (2022) y Santra & Banerjee, (2023) encontraron este tipo de compuestos en β -glucanos aislados de *Colletotrichum alatae* LCS1 y *Pestalotiopsis chamaeropsis* CEL6, cuya componente principal era glucosa, seguida de manosa, ramnosa, arabinosa, galactosa y fucosa.

La composición de monosacáridos es importante ya que determina la actividad biológica. Se debe tomar en cuenta que la presencia de arabinosa y manosa, glucosa y arabinosa aportan con capacidad antioxidantes al β -glucano (He et al., 2012). Por lo tanto, debido a la heterogeneidad en composición de monosacáridos y a la presencia de los monosacáridos que aportan actividad biológica, estos compuestos presentan la posibilidad de proporcionar actividad antioxidante a los sistemas alimenticios donde se los incorpore.

El peso molecular es mayor a los reportados por Gastebois et al., (2010) y por Zeng et al., (2019), quienes encontraron valores de entre 25 y 50 kDa y 133.60 a 139.10 kDa respectivamente. Así mismo el peso molecular determinado es menor a 850 kDa reportados por Choma et al., (2013).

Convencionalmente los β - D- glucanos con peso molecular de hasta 500 kDa son clasificados como de bajo peso molecular (LMW), mientras que los 1000 kDa o más como polímeros de alto peso molecular (HMW). También se reconocen a la gama intermedia de peso molecular, que comprende valores entre 500 y 1000 kDa (Sushytskyi et al., 2013)

El peso molecular es un factor importante en los β -glucanos ya que influencia su actividad biológica. Al respecto, se ha mencionado que los polisacáridos con alto peso molecular (> 1000 kDa) tienen menor capacidad antioxidante, posiblemente debido a la poca capacidad de penetración en las membranas celulares, mientras que los de peso molecular bajo tienen una alta capacidad antioxidante (Zhang et al., 2018). Los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1, por tanto, podrían tener una capacidad antioxidante entre alta e intermedia. Así mismo se ha reportado actividad antitumoral de β -glucanos con peso molecular por arriba de 100 kDa (Synytsya & Novák, 2013).

Otro aspecto importante desde el punto de vista industrial es la relación entre el peso molecular, viscosidad, solubilidad y formación de gel. Se ha reportado que β -glucanos de alto peso molecular desarrollan altas viscosidades, son menos solubles y su efecto a nivel fisiológico es de fibra dietaria, siendo no tan benéficos desde el punto de vista de salud y tampoco tienen la capacidad de formar geles. (Lazaridou, Biliaderisa & Izydorczyk, 2003). Los β -glucanos con peso molecular bajo tienen la capacidad de reducir la respuesta glicémica, bajar los niveles de colesterol LDL, bajar la presión sanguínea y prevenir la obesidad (Bai et al., 2019). Estos efectos sobre la salud, pueden conseguirse con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* de peso bajo y que pueden ser evaluados en futuras investigaciones.

La Figura 92 muestra el espectro de reflectancia FT-IR de los β -glucanos extraídos de *Rhizopus oryzae*. Se observan bandas en la región 1102.6, 1076.08, 1047.16, 918.91 y 864.92 cm^{-1} . Otra banda en la región de los compuestos de carbohidratos puede observarse a 1153.71 y 1025.94 cm^{-1} .

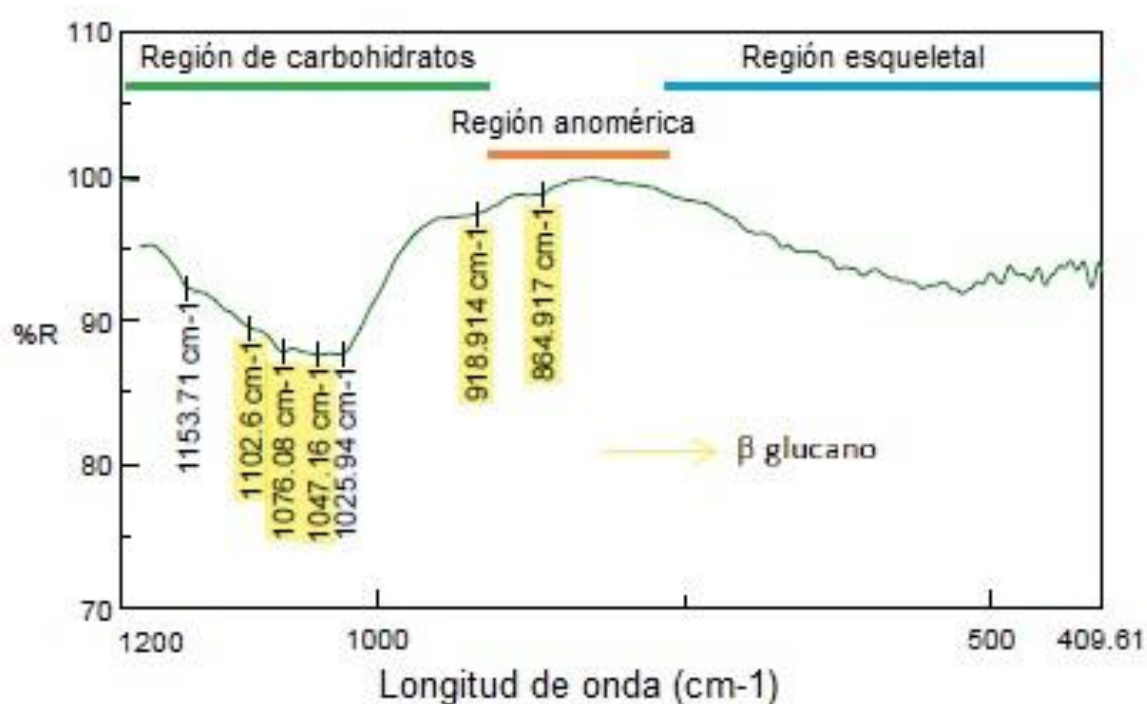


Figura 92. Espectro de reflectancia FT-IR de la muestra de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Se menciona que la región correspondiente a los carbohidratos se encuentra entre 1200 a 900 cm^{-1} y la región anomérica entre 950 y 750 cm^{-1} . Las bandas cercanas a 1.160, 1.078, 1.044 cm^{-1} , tales como las mencionadas, son características de β -(1-3)/(1-6)-D-glucanos. La banda cercana a 890 y 920 cm^{-1} representan a los enlaces glicosídicos β -(1-3) y β -(1-6) respectivamente. A pesar de lo observado, se presentan las bandas 1025.94 y 1153.71 cm^{-1} (cercanas a 1023 y 1155 cm^{-1}) que son característica de α -(1-4)(1-6)-D-glucanos (Synytsya & Novak, 2014 Bikmurzin et al., 2022).

Por lo tanto, a pesar de tener bandas características de β -(1-3)/(1-6)-D-glucanos, con enlaces β -(1-3) y β -(1-6), que corresponde al 61.55% de la muestra analizada (Tabla 75), pueden estar presentes moléculas de α -(1-4)/(1-6)-D-glucanos en el extracto analizado que pueden corresponder al 20.91% del total de carbohidratos determinado (82.46%).

5.3.4. Evaluación microbiológica.

Con respecto a los indicadores microbiológicos de calidad y de contaminación fecal, la muestra evaluada tuvo un recuento de *E. coli* $< 1.0 \times 10^1$ UFC/g, de aerobios mesófilos estimado de 3.3×10^1 UFC/g y mohos y levaduras estimado 1.0×10^1 UFC/g (Tabla 76).

Tabla 76. Parámetros de calidad e inocuidad de los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Parámetros	β -glucanos de <i>Rhizopus oryzae</i>
Aerobios mesófilos	Estimado 3.3×10^1
Mohos y levaduras	Estimado 1.0×10^1
<i>Escherichia coli</i>	$< 1.0 \times 10^1$

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones. Los valores son expresados en unidades formadoras de colonias (UFC)/g.

Los resultados de aerobios mesófilos, mohos y levadura fueron menores que los reportados en otras investigaciones (Kim et al., 2016; Ludewig et al., 2024), mientras que el indicador de contaminación fecal, *E. coli* es igual a lo reportado por estos autores. Al respecto se menciona que en productos alimenticios que no requieren cocción, las UFC/g de aerobios mesófilos, mohos y levaduras no deben sobrepasar a 10^3 , sin embargo, estos polisacáridos serán utilizados como materia y serán utilizados en un proceso donde se aplicará tratamiento térmico. *E. coli* es un indicador de contaminación fecal y debe tener un conteo de $< 1.0 \times 10^1$ UFC/g ya que su presencia en alimentos y materias primas indican la posible presencia de patógenos entéricos que pueden afectar la salud de los consumidores (Ballata, Shabani, & Dharmo, 2019).

Los resultados obtenidos evidencian la calidad e inocuidad microbiológica de los β -glucanos como materia prima para el desarrollo de un yogur tipo griego y en otras aplicaciones.

5.4. Objetivo 6 y 7. Desarrollo de un yogur tipo griego y caracterización química, física, viabilidad de bacterias ácido lácticas, reológica, antioxidante, microbiológica y sensorial del yogur desarrollado.

El desarrollo de los yogures fue realizado de acuerdo a las proporciones de ingredientes indicados en la Tabla 2. Se utilizó leche entera de vaca, leche en polvo, sacarosa, fermento

láctico y los β -glucanos en las proporciones de 0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8%. Los yogures desarrollados fueron caracterizados y los resultados se muestran a continuación.

5.4.1. Caracterización química.

En la Tabla 77 se presentan los resultados de las características químicas de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. Los componentes mayoritarios fueron, sólidos totales, con una tendencia de incremento a medida que se incrementaba el contenido de β -glucanos. Si se compara con la fórmula control, el mayor contenido se encontró en la fórmula 4 (30.64%) que contiene 0.8% de β -glucanos. Existe diferencia estadísticamente significativa en los valores de sólidos totales entre las fórmulas con distintas concentraciones de β -glucanos y la fórmula control ($p < 0.05$).

Tabla 77. Características químicas de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Parámetros	Fórmula control	Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3	Fórmula 4
Sólidos totales	25.62 $\pm$ 0.21a	26.74 $\pm$ 0.06b	28.07 $\pm$ 0.04d	29.16 $\pm$ 0.02c	30.64 $\pm$ 0.06e
Cenizas	1.28 $\pm$ 0.05a	1.40 $\pm$ 0.01b	1.47 $\pm$ 0.04b	1.44 $\pm$ 0.09b	1.60 $\pm$ 0.04c
Grasa total	5.33 $\pm$ 0.58a	5.33 $\pm$ 0.58a	5.33 $\pm$ 0.58a	5.00 $\pm$ 0.00a	5.00 $\pm$ 0.00a
Proteína total	9.11 $\pm$ 0.07a	9.14 $\pm$ 0.22a	9.22 $\pm$ 0.20a	9.12 $\pm$ 0.02a	9.29 $\pm$ 0.29a
Carbohidratos totales	9.89 $\pm$ 0.33a	10.67 $\pm$ 0.30a	11.45 $\pm$ 0.55c	13.19 $\pm$ 0.10b	13.96 $\pm$ 0.42d
Energía	518.47 $\pm$ 1.49a	532.02 $\pm$ 1.17b	546.42 $\pm$ 1.30c	561.47 $\pm$ 1.35c	576.87 $\pm$ 1.23d

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Los valores son expresados en % (gramos/100g de yogur). El valor de la energía es expresado en Kilojoules/100g (kJ/100g). Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre muestras ($p < 0.05$).

Posteriormente le sigue el contenido de carbohidratos totales, con tendencia al incremento cuando se compara con la fórmula control, a excepción de la fórmula 1. La fórmula 4 es la que contiene la mayor proporción de carbohidratos totales (14.76%). El contenido de cenizas, grasa y proteína total estuvieron en menor cantidad, no existiendo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en estos dos últimos parámetros, cuando se comparan las fórmulas con β -glucanos y la fórmula control. El contenido energético muestra una tendencia de incremento a media que se incrementa la concentración de β -glucanos, la mayor cantidad de energía lo aportó la fórmula 4 (576.87 kJ/100g).

Las tendencias mostradas son similares a las obtenidas por Santos et al. (2019) en yogures adicionado con β -glucanos de levaduras. El contenido de sólidos y de carbohidratos totales incrementaron con la adición de estos polisacáridos, mientras que el contenido de grasa, cenizas y proteínas permanecieron constantes. La modificación de los parámetros mencionados se deben a la incorporación de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1, polímeros de monosacáridos que no incorporan otros componentes debido a su grado de purificación, en consecuencia, los otros parámetros estudiados no fueron modificados.

El contenido de proteínas y grasas están dentro de los parámetros señalados en la Norma del CODEX (CODEX STAN 243-2003) y por el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.79:23) para leches fermentadas, quienes establecen valores de proteínas mínimo 2.7%, 6.5% para leches fermentadas concentradas y de grasa mayor o igual al 3% y menos del 10% en yogures enteros.

Las formulaciones con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 aportan entre 6.36 a 6.89 % del requerimiento diario energético para un adulto sano que al consumir 100 g de yogur tipo griego con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 ya que contiene una cantidad considerable de proteínas, baja cantidad de carbohidratos y grasa total. Al respecto se menciona que, al consumir esta cantidad de energía, la dieta debe tener una distribución cercana de nutrientes de 50-55% de hidratos de carbono, 15% - 20% de proteínas y 30% - 35% de grasas (Fuster y Marín, 2007).

5.4.2. Caracterización física.

Las características físicas de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 son mostrados en la Tabla 78. El pH se encontró entre 4.50 a 4.61, siendo superior en la fórmula 2, 3 y 4, cuando se compara con la formula control y fórmula 1, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos de muestras ($p < 0.05$). Los valores de acidez titulable se encuentran entre 1.45 y 1.54 g de ácido láctico/100 g de yogur y tuvo el mismo comportamiento que el pH.

Tabla 78. Características físicas de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Parámetros	Fórmula control	Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3	Fórmula 4
pH	4.51 $\pm$ 0.01a	4.50 $\pm$ 0.05a	4.60 $\pm$ 0.02b	4.61 $\pm$ 0.03b	4.60 $\pm$ 0.01b
Acidez titulable	1.45 $\pm$ 0.03a	1.46 $\pm$ 0.01a	1.50 $\pm$ 0.04b	1.54 $\pm$ 0.02b	1.53 $\pm$ 0.06b
Capacidad de retención de agua	74.30 $\pm$ 0.26a	82.79 $\pm$ 0.99b	84.42 $\pm$ 0.20c	89.42 $\pm$ 0.14c	77.94 $\pm$ 0.38d
Color					
L	40.93 $\pm$ 0.72a	38.84 $\pm$ 0.25b	36.30 $\pm$ 0.69c	29.19 $\pm$ 0.57d	24.72 $\pm$ 0.63e
a	- 1.28 $\pm$ 0.06a	- 1.97 $\pm$ 0.02b	- 1.14 $\pm$ 0.06bc	- 0.90 $\pm$ 0.29c	- 1.11 $\pm$ 0.05c
b	9.76 $\pm$ 0.28a	9.77 $\pm$ 0.22a	10.37 $\pm$ 0.09c	10.69 $\pm$ 0.18c	11.38 $\pm$ 0.33d

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Los valores de acidez titulable y capacidad de retención de agua son expresados en % (gramos/100g de yogur). Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre muestras ($p < 0.05$).

En lo que refiere a la capacidad de retención de agua, si se compara con la fórmula control, esta tiende a incrementar hasta la Fórmula 3 (89.42 g de agua/100 g de yogur) y disminuye en la fórmula 4, sin embargo, en esta última su valor fue 3.64 % mayor que la fórmula control. Con respecto al color, el parámetro luminosidad va disminuyendo con el incremento de β -glucanos, la misma tendencia se observa en el parámetro a iniciando desde la Fórmula 1 y una tendencia de incremento se observó en el parámetro b. La fórmula 4 fue menos luminosa y tuvo una tendencia más hacia el verde y al amarillo, en comparación con la fórmula control y a las otras formulaciones con β -glucanos. Hubo diferencia estadísticamente significativa en los parámetros L, a y b en todas las muestras evaluadas ($p < 0.05$).

El pH y la acidez titulable son dos características de calidad en bebidas fermentadas, tales como yogures. El valor óptimo de la acidez titulable debe estar entre 0,6 y 1,5% mientras que el $\text{pH} \leq 4.6$. Los valores encontrados están de acuerdo a los indicado con la Norma del CODEX (CODEX STAN 243-2003) y por el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.79:23) para leches fermentadas enteras, por ende, pueden ser considerados como de óptima calidad y no fueron modificados negativamente por la adición de β -glucanos.

La tendencia del ligero incremento en el pH y acidez en los yogures con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 fue similar a lo reportado por Vyrova & Selezneva (2019), Kaur & Riar (2020) y por Antontceva et al., (2019) en yogures formulados con β -glucanos de levaduras, cebada y *Pleurotus ostreatus* respectivamente. El incremento en la acidez puede deberse a la producción de ácido láctico como principal metabolito y menor proporción, ácido acético y propiónico. El cambio en el pH puede ser atribuido a la metabolización de los azúcares presentes en el proceso de fermentación para producir los ácidos ya mencionados (Vasiljevic, Kealy & Mishra, 2007).

Los valores de retención de agua difieren a los reportados por Dos Santos et al. (2019) en yogures formulados con β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae*. Estos autores mostraron una tendencia de incremento cuando se utilizaron concentraciones de hasta 0.5% de estos polisacáridos, sin embargo, a una concentración de 1.0 % la capacidad de retención de agua disminuyó. El máximo valor encontrado fue de 52.08% de capacidad de retención de agua. Por lo cual los polisacáridos utilizados aportan a estos sistemas alimenticios una mayor capacidad de retención de agua y por ende menor sinéresis en comparación con otras fuentes de β -glucanos, haciendo que estos alimentos sean más estables.

El parámetro de retención es importante en alimentos lácteos refrigerados ya que la exudación de suero es considerada un defecto principal de calidad, este fenómeno generalmente es debido a la reordenación de las moléculas de caseínas que forman el gel y por ende no son capaces de retener el suero. Desde el punto de vista industrial se incorporan sólidos lácteos y estabilizantes tales como gomas y almidones para evitar o reducir la exudación de suero lácteo (Kaur & Riar, 2020), siendo los polisacáridos extraídos de las paredes celulares de *Rhizopus oryzae* M10A1 una alternativa de estabilizantes para evitar el fenómeno físico de sinéresis.

Así mismo se menciona, que la estabilización del gel se debe a la formación de puentes de hidrogeno de las estructura que conforman a estos polisacáridos, al peso molecular y las moléculas de agua del yogur, entre una mayor heterogeneidad de polisacáridos y peso molecular bajo, tal como los mencionado anteriormente, les confiere capacidad de retención de agua hasta una determinada concentración, a concentraciones altas hay interferencia en la formación de la red que conforma el gel y por ende la capacidad de retención de agua se pierde (Chiozzi et al., 2021).

Los resultados encontrados muestran que los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 mejoran la capacidad de retención de agua y por ende ocurre menor exudación de suero lácteo, lo cual hace que puedan ser utilizados como un estabilizante para evitar o reducir la pérdida de suero en yogures tipo griego hasta máximo una concentración de 0.8%.

Los valores encontrados para los parámetros de color difieren de los mostrados por Gulzar, Benjakul & Hozzein (2020) quienes obtuvieron yogures más brillantes, más rojos y amarillos (L: 70.14 -73.24, a: 26.95 – 30.33, b: 32.83 – 36.36). Los autores atribuyeron la reducción de la luminosidad y el incremento de las tonalidades rojas debido a la adición de β -glucanos de levaduras de color marrón.

Las variaciones encontradas en los parámetros de color de los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 no modificaron marcadamente a las tonalidades rojas y amarillas, pero redujeron (67.73%) la luminosidad en la Formula 4 que contiene 0.8% de estos polisacáridos. A pesar

de estos cambios, los colores permanecieron agradables a la vista y fueron aceptados desde el punto de vista sensorial (Figura 93).



Figura 93. Color de los yogures formulados, Fórmula control, Fórmula 1 (203), Fórmula 2 (410), Fórmula 3 (125) y Fórmula 4 (625).

5.4.3. Caracterización reológica.

Las curvas de flujo de los yogures tipo griego formulados con diferentes proporciones de β -glucanos son mostrados en la Figura 94. Se observa un incremento en el esfuerzo de corte hasta 15.80 s^{-1} (Fórmula control), 20.50 s^{-1} (Fórmula 1), 12.80 s^{-1} (Fórmula 2), 13.10 s^{-1} (Fórmula 3) y 12.80 s^{-1} (Fórmula 4), con una disminución rápida de la viscosidad, posteriormente, seguida de una disminución lenta de la misma (Figura 95), lo cual indica un adelgazamiento por corte (shear thinning). La tendencia observada indica que no existe una relación lineal entre la tasa de corte y esfuerzo de corte en el intervalo de estudio.

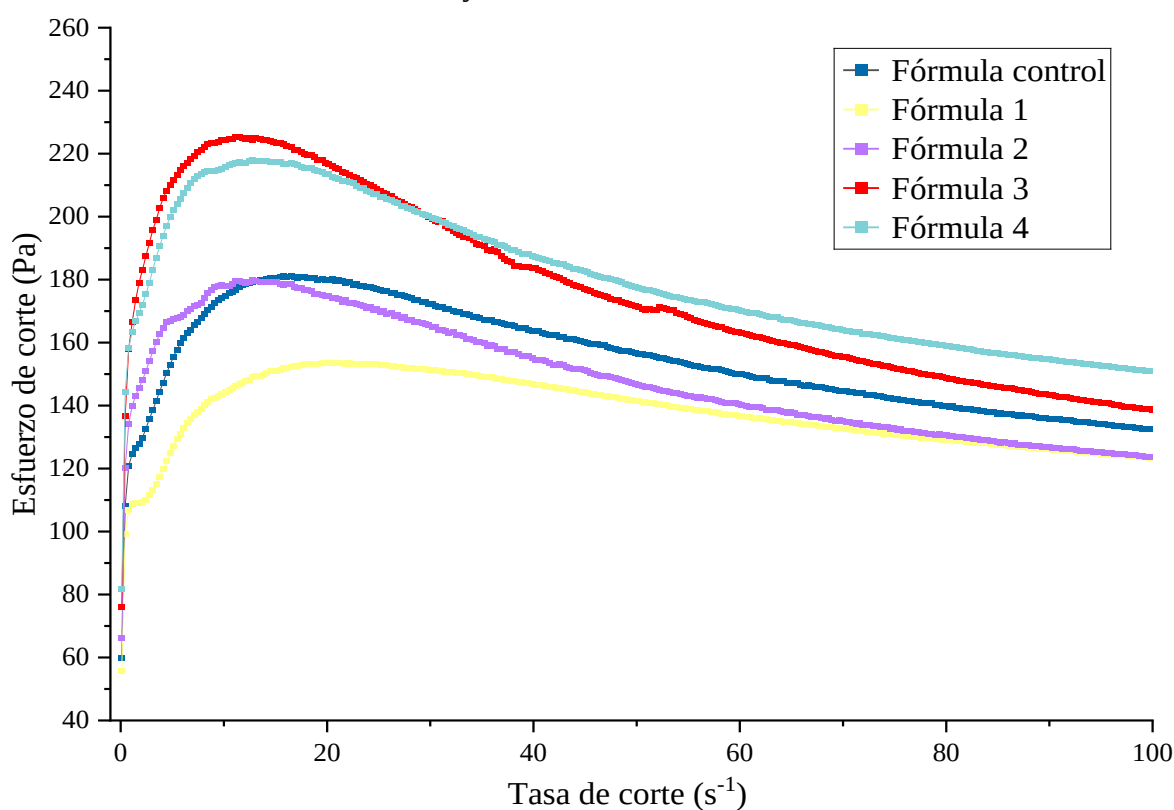


Figura 94. Curvas de flujo de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos

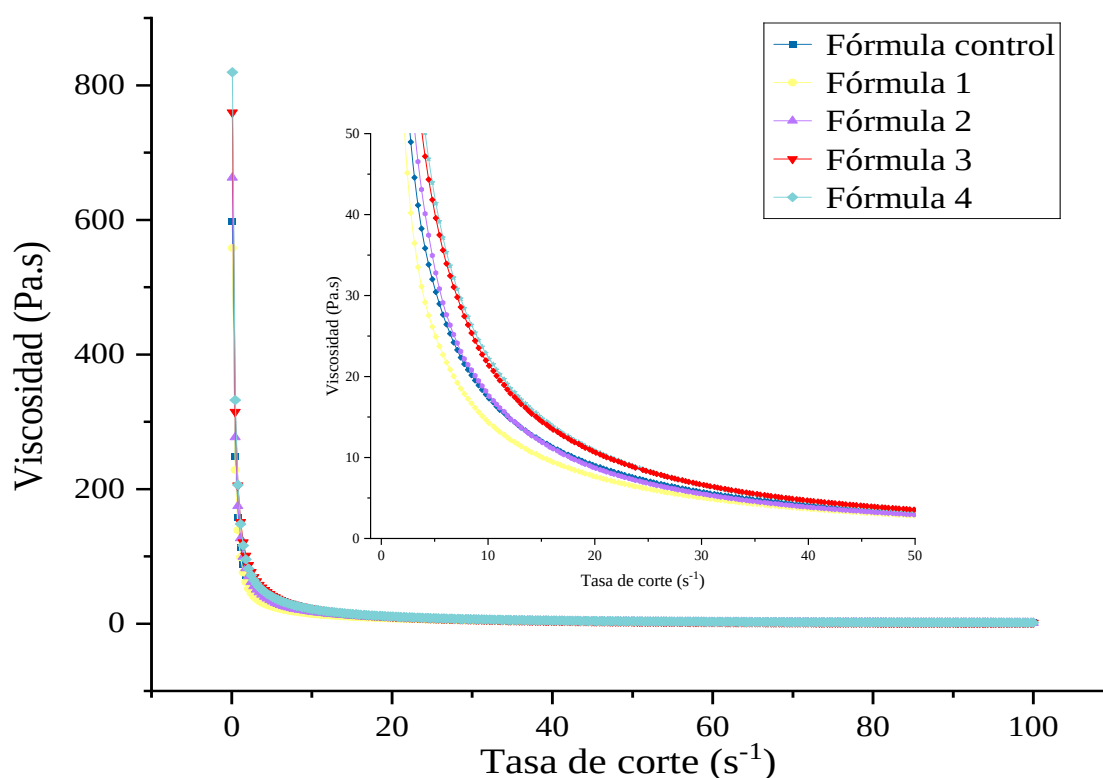


Figura 95. Curvas de viscosidad de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos.

Resultados similares fueron encontrados por Kaur & Riar (2020) en yogures firme adicionados con β -glucanos de cebada, quienes mencionan que la curva indica un comportamiento típico de fluidos pseudoplástico por la adición de β -glucanos en yogur y tienen un comportamiento adelgazante típico de soluciones de polímeros (Mezger, 2021).

En la Tabla 79 se presenta el comportamiento flujo de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 estimado con la ecuación del modelo de Herschell-Buckley. Los valores de índice de flujo (n) estuvieron entre 0.15 (Fórmula 1, 2 y 3) y 0.19 (Fórmula 4), siendo ligeramente superior al índice de la fórmula control (0.13) ($p < 0.05$). El índice de consistencia (K) aumentó por efecto de adición β -glucanos, a excepción de la fórmula 1. El mayor valor de K , fue para la fórmula 4 (163.40 Pa s^n).

Tabla 79. Características de flujo de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Muestra	n	$K (\text{Pa s}^n)$	R^2
Formula control	$0.13 \pm 0.00a$	$130.90 \pm 0.79a$	0.963
Fórmula 1	$0.15 \pm 0.01b$	$100.50 \pm 1.01b$	0.967
Fórmula 2	$0.15 \pm 0.00b$	$145.86 \pm 4.88c$	0.940
Fórmula 3	$0.15 \pm 0.01b$	$158.43 \pm 1.06d$	0.947
Fórmula 4	$0.19 \pm 0.00c$	$163.40 \pm 0.62e$	0.938

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre muestras ($p < 0.05$).

Los valores de n son menores que 1 en todas las muestras, lo cual corrobora lo antes expuesto, de que los yogures tipo griego son fluidos pseudoplásticos con adelgazamiento por corte. Los valores de índice de consistencia aumentaron con la adición de hasta 0.8% de β -glucanos, probablemente por la interacción molecular entre las proteínas y las partículas que forman al polímero, lo cual mejoran la capacidad de retención de agua, limitan la movilidad de la matriz de proteína e incrementan la consistencia (Costa et al., 2019b, Osorio, 2020).

La Figura 96, muestra el efecto de la adición de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 sobre la viscosidad en la formulación de los yogures tipo griego. Se observa que la adición de β -glucanos a las formulaciones de yogur tipo griego hace que la viscosidad incremente a excepción de la fórmula 1. Se encontraron valores de viscosidad, desde 558.04 Pa.s (Fórmula 1) hasta 819.49 Pa.s (Fórmula 4) a una tasa de corte de 0.1 s^{-1} debido a la adición de β -glucanos.

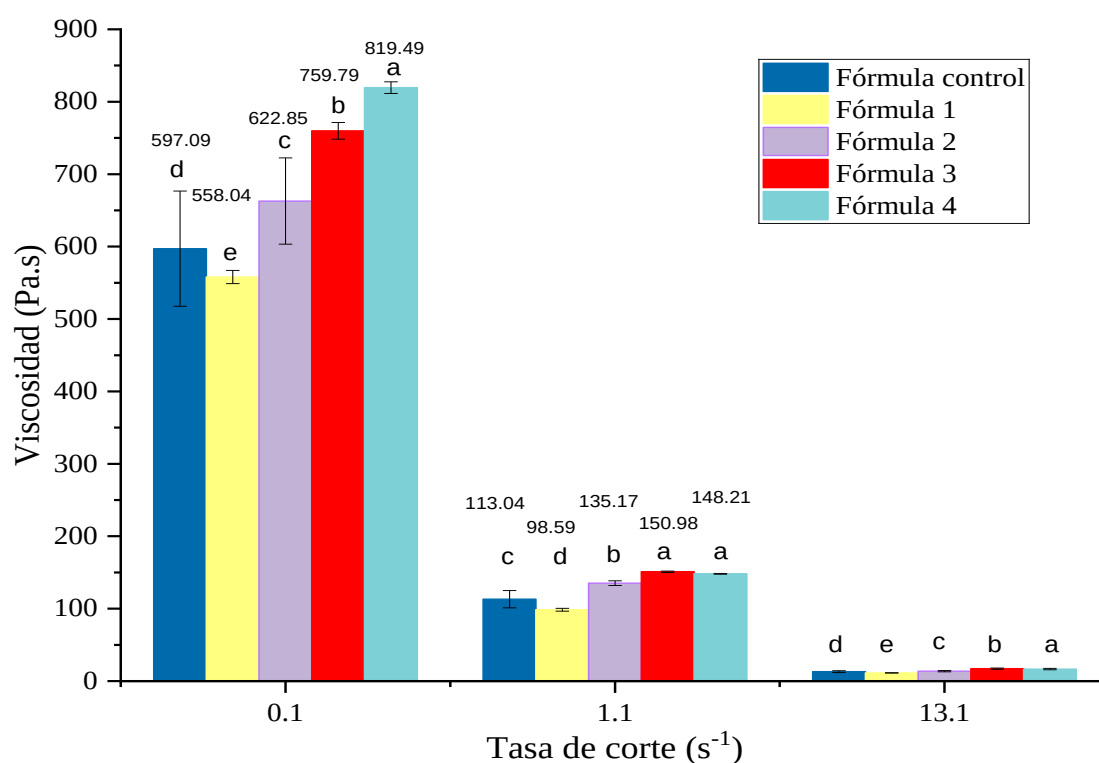


Figura 96. Viscosidad de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. Los valores son el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes en las barras indican diferencia estadísticamente significativa entre muestra ($p < 0.05$).

Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones ($p < 0.05$) en cada tasa de corte, desde la fórmula 2 (0.4% de β -glucanos) hasta la fórmula 4 (0.8% de β -glucanos). La viscosidad disminuyó a medida que incrementó la tasa de corte en cada formulación.

Los resultados encontrados para la viscosidad fueron similares a los reportados por Antontceva et al., (2019), cuando agregaron β -glucanos de *Pleurotus ostreatus*, quienes encontraron que a una baja tasa corte (0.1 s^{-1}), la viscosidad se incrementó debido a la adición de β -glucanos y tasa de cortes superiores ($13.1, 50$ y 100 s^{-1}) la viscosidad disminuyó. La

variación de la viscosidad puede deberse a la incorporación de los polisacáridos provenientes de *Rhizopus oryzae* M10A1 que tienden a interactuar con las moléculas de proteínas y agua.

Así mismo se menciona que la disminución de la viscosidad a lo largo del rango de esfuerzo de corte en estudio y los mayores valores de viscosidad entre las muestras puede ser explicado debido a que en reposo la estructura del gel formado interaccionan con las moléculas de agua inmovilizadas. La aplicación de fuerza de corte, conlleva a que la estructura se desintegre en partículas y pedazos pequeños (ambos denominados agregados). Debido a que los agregados tienen menor resistencia al flujo y al líquido que puede moverse libremente, el fluido presentará menor viscosidad a medida que se incremente la velocidad de corte. Los valores más altos de viscosidad en las muestras con polisacáridos, puede deberse a la adición de β -glucanos que absorben agua del medio y por ende se forme una estructura de gel rígido o ligeramente rígido (Mezger, 2021).

La Figura 97 muestra el análisis de barrido de esfuerzo de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. Todas las formulaciones de yogur tipo griego muestran dos regiones diferentes, una región lineal y una región no lineal. En la región viscoelástica lineal, se observa el módulo de almacenamiento (G') constante y mayor que el módulo de pérdida (G''). En la región no lineal, G' disminuye con el incremento de la deformación de corte. El valor del límite de la región lineal viscoelástica para la Fórmula control fue 0.25%, disminuyó ligeramente en la Fórmula 1, Fórmula 2 (0.24%) y Fórmula 4 (0.23%) y se incrementó en la Fórmula 3 (0.27%). También se observa que los valores de G' son menores en las formulaciones que contienen β -glucanos (G' Fórmula 1= 990. 48 Pa, Fórmula 2 = 1105. 33 Pa, Fórmula 3= 1101.77 Pa, Fórmula 4= 1312.06 Pa) cuando se compara con la Fórmula control (1652. 59 Pa).

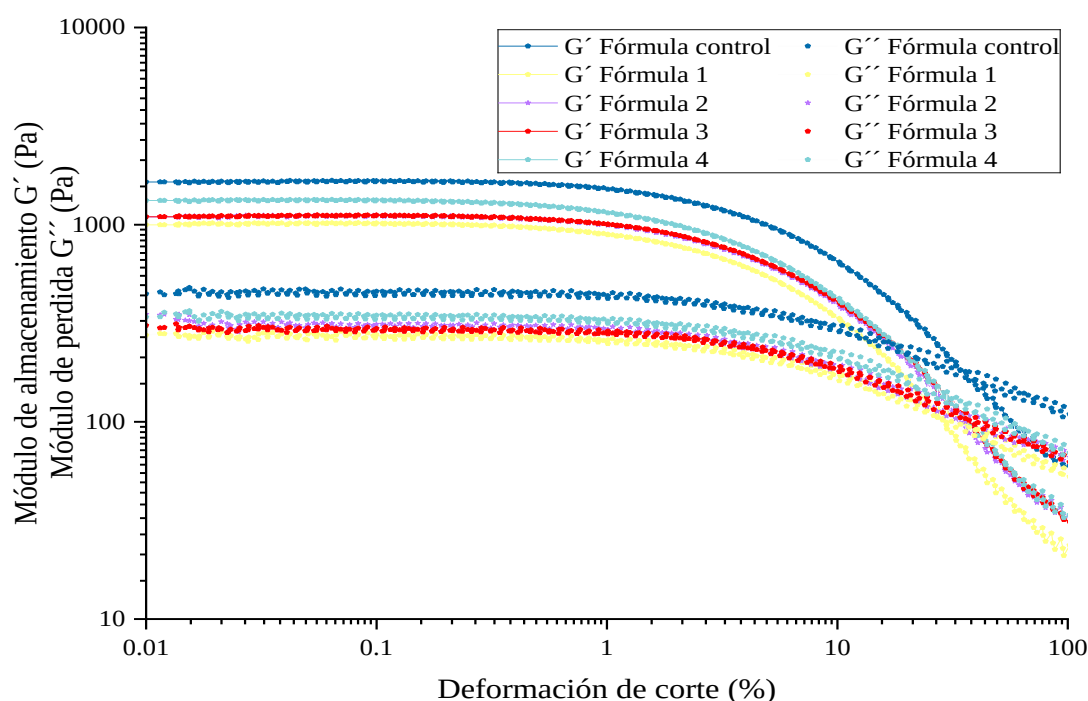


Figura 97. Análisis de barrido de esfuerzo de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. Los valores son el promedio de tres determinaciones.

Los valores de G' muestran que la Fórmula 1, 2 y 4 son menos estables a la deformación por corte mientras que la Fórmula 3 fue más estable a la deformación de corte, cuando se comparan con la Fórmula control.

Los yogures tipo griego pueden ser clasificados como geles cuando se cumple que $G' > G''$ en el rango viscoelástico lineal, lo cual ocurre en todas las muestras, por ende, la adición de hasta 0.8% de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 no modifica esta clasificación.

Similar comportamiento fue obtenido por Zhao, Fu & Li (2020) al adicionar β -glucanos de *Sacharomyces cerevisiae* y Curdlan, señalan que estos polisacáridos pueden afectar a la fase lineal viscoelástica y que su adición está relacionada de manera directamente proporcional a la fragilidad del gel. A menor longitud de la fase lineal de la formulaciones que contienen β -glucanos implica una menor estabilidad del gel a la deformación de corte. Posterior a la fase lineal prosigue una fase tixotrópica debido a que ocurren cambios estructurales irreversibles a altas tasas de corte que conlleva a una transformación de la estructura tipo gel a una tipo sol por fractura.

Se menciona que alimentos tipos geles que llevan en su formulación polisacáridos presentan valores de G' menores y tienden a ser de textura más cremosa al batirse, mejor facilidad de uso de la cuchara y más fácil de dosificar (Mezger, 2021), sin embargo, tienden a presentar mayor fragilidad, probablemente por interferencia en la formación de un red más compacta. De acuerdo, a lo planteado todas las formulaciones que llevaron β -glucanos fueron más cremosas que la formulación a los que no se adicionaron estos polisacáridos.

En la Figura 98 se muestra el análisis de barrido de frecuencia de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. El módulo de almacenamiento(G') y el módulo de pérdida (G'') incrementan con la frecuencia angular. Los valores de G' en todos los ensayos fueron mayor que G'' ($G' > G''$).

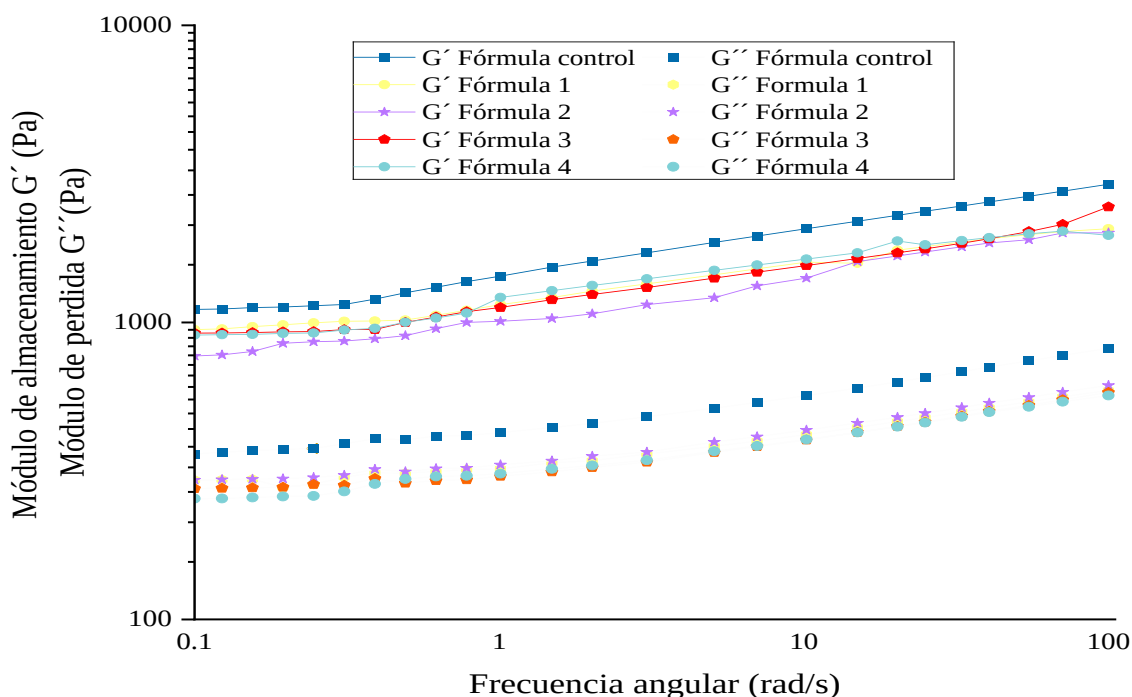


Figura 98. Análisis de barrido de frecuencia de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. Los valores son el promedio de tres determinaciones.

En la Tabla 80 se presentan los parámetros de la relación entre el módulo de almacenamiento (G') y la frecuencia angular (ω) de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 estimado con la ecuación (4). El valor de b para la Formula control fue menor (0.11) en comparación con las formulaciones que contienen β -glucanos (0.15) ($p < 0.05$).

Tabla 80. Parámetros de la relación entre el módulo de almacenamiento (G') y la frecuencia angular (ω) de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Muestra	a	b	R ²
Formula control	1398.73 $\pm$ 1,81a	0.11 $\pm$ 0,00a	0.995
Formula 1	1202.4 $\pm$ 1,52b	0.14 $\pm$ 0,01b	0.989
Formula 2	1113.03 $\pm$ 1,50c	0.15 $\pm$ 0,00b	0.993
Formula 3	1097.67 $\pm$ 1,67d	0.15 $\pm$ 0.00b	0.995
Formula 4	1087.2 $\pm$ 3,87e	0.14 $\pm$ 0,02b	0.989

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre muestras ($p < 0.05$).

Similar comportamiento para el análisis de barrido de frecuencia fueron encontrados por Osorio et al. (2020), quienes indican que $G' > G''$, es un indicativo característico de fluidos con comportamiento elástico y los valores bajos del parámetro b son característicos de geles elástico (Hesarinejad, Koocheki & Razabi, 2014), debido a la poca variación de estos valores entre los distintos yogures que contienen β -glucanos, se puede inferir que su adición, no modifico las características de estos tipos de geles, en consecuencia, los yogures formulados mostraron características de geles elásticos.

Debido a que el módulo de almacenamiento (G') es mayor que el módulo de pérdida (G'') en todo el intervalo de frecuencia angular estudiado, es indicativo de que hay entrecruzamiento entre las partículas para formar geles, además entre mayor sea el valor de G' hay mayor grado de entrecruzamiento y más rígido será el gel (Mezger, 2021). Este análisis corrobora lo mencionado anteriormente, que la adición de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 interfiere en la formación de una estructura tipo gel más compacta por entrecruzamiento entre las molecular de proteínas y agua. Este efecto puede ser deseable ya que hace que el gel sea más cremoso y por ende realce este atributo sensorial de importancia para el consumo de este tipo de alimentos.

5.4.4. Viabilidad de bacterias ácido lácticas.

La Tabla 81 muestra los resultados de la viabilidad de bacterias ácido lácticas bajo condiciones gástricas simuladas (pH 2) de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. Al inicio del ensayo de viabilidad el conteo para las formulaciones que contenía β -glucanos estuvo entre 6.86 a 6.97 Log UFC/g, siendo la Formulación 4 la de mayor valor (6.97 Log UFC/g) cuando se compara con la Fórmula control (6.72 Log UFC/g). Al final del ensayo hubo una tasa de supervivencia para las formulaciones con β -glucanos entre 39.66% (2.73 Log UFC/g) y 52.37% (3.64 Log UFC/g) en comparación con la Fórmula control de 35.74% (2.40 Log UFC/g). Así mismo, se observa

que la adición de β -glucanos en los yogures tipo griego incrementó la tasa de viabilidad, siendo la fórmula 4, la de mayor en supervivencia si se compara con la fórmula control. Hubo diferencias estadísticamente significativas en la tasa de supervivencia por muestra y efecto del tiempo ($p < 0.05$).

Tabla 81. Viabilidad de bacterias ácido lácticas bajo condiciones gástricas simuladas (pH 2) de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Muestra	Tiempo de exposición				Tasa de supervivencia a las 3 h (%)
	0 h	1 h	2 h	3 h	
Fórmula control	6.72 $\pm$ 0.02Aa	6.04 $\pm$ 0.04Ab	5.15 $\pm$ 0.03Ac	2.40 $\pm$ 0.04Ad	35.74 $\pm$ 0.75A
Fórmula 1	6.86 $\pm$ 0.02Ba	6.34 $\pm$ 0.05Cb	5.37 $\pm$ 0.02Bc	2.73 $\pm$ 0.03Bd	39.79 $\pm$ 0.31B
Fórmula 2	6.90 $\pm$ 0.01Ca	6.27 $\pm$ 0.02BCb	5.17 $\pm$ 0.06Cc	2.73 $\pm$ 0.01Bd	39.66 $\pm$ 0.14B
Fórmula 3	6.93 $\pm$ 0.01Da	6.27 $\pm$ 0.05Bb	5.20 $\pm$ 0.03Cc	3.11 $\pm$ 0.01Cd	44.88 $\pm$ 0.11C
Fórmula 4	6.97 $\pm$ 0.01Ea	6.72 $\pm$ 0.02Db	5.73 $\pm$ 0.01Dc	3.64 $\pm$ 0.02Dd	52.37 $\pm$ 0.35D

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Los valores de viabilidad son expresados en Log UFC/g. Letras mayúsculas indican diferencia estadísticamente significativa en una columna y letras minúsculas en una fila ($p < 0.05$).

Los resultados de la viabilidad de bacterias ácido lácticas bajo condiciones gástricas simuladas (pH 7) de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* son presentado en la Tabla 82 y 83. En el tiempo 0h del ensayo de viabilidad, el conteo para las formulaciones que contenía β -glucanos estuvo entre 6.86 a 6.97, siendo la fórmula 4 la de mayor valor (6.97 Log UFC/g) comparado con la fórmula control (6.72 Log UFC/g). A las 4h de ensayo, hubo una mayor tasa de supervivencia para la fórmula 4 con 92.53% (6.44 Log UFC/g) en comparación con la fórmula control de 89.87 % (6.04 Log UFC/g).

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la fórmula control y la Fórmula 1, 2 y 3 ($p > 0.05$), por el contrario, si se observó diferencias entre el control y la fórmula 4 ($p < 0.05$).

Tabla 82. Viabilidad de bacterias ácido lácticas bajo condiciones intestinales simuladas (pH 7) de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Muestra	Tiempo de exposición		
	0h	1h	2h
Fórmula control	6.72 $\pm$ 0.02Aa	6.70 $\pm$ 0.02Aa	6.39 $\pm$ 0.03Ab
Fórmula 1	6.86 $\pm$ 0.02Ba	6.82 $\pm$ 0.01Ba	6.34 $\pm$ 0.02ABb
Fórmula 2	6.90 $\pm$ 0.01Ca	6.81 $\pm$ 0.01Bb	6.37 $\pm$ 0.03Bc
Fórmula 3	6.93 $\pm$ 0.01Da	6.87 $\pm$ 0.01Cb	6.71 $\pm$ 0.01Cc
Fórmula 4	6.97 $\pm$ 0.01Aa	6.90 $\pm$ 0.01Bb	6.82 $\pm$ 0.01Bc

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Los valores de viabilidad son expresados en Log UFC/g. Letras mayúsculas indican diferencia estadísticamente significativa entre muestras por cada tiempo y letras minúsculas indican diferencia estadísticamente significativa entre muestra en cada hora de ensayo ($p < 0.05$).

Tabla 83. Continuación de viabilidad de bacterias ácido lácticas bajo condiciones intestinales simuladas (pH 7) de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Muestra	Tiempo de exposición		
	3 h	4 h	Tasa de supervivencia a las 4 h (%)
Fórmula control	6.18 $\pm$ 0.01Ac	6.04 $\pm$ 0.04Ad	89.87 $\pm$ 0.55A
Fórmula 1	6.21 $\pm$ 0.01Ac	6.15 $\pm$ 0.04Bd	89.73 $\pm$ 0.47A
Fórmula 2	6.24 $\pm$ 0.05Ad	6.19 $\pm$ 0.02Bd	89.74 $\pm$ 0.27A
Fórmula 3	6.34 $\pm$ 0.05Bd	6.25 $\pm$ 0.02Ce	90.20 $\pm$ 0.41A
Fórmula 4	6.47 $\pm$ 0.00Cd	6.44 $\pm$ 0.01De	92.53 $\pm$ 0.18B

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Los valores de viabilidad son expresados en Log UFC/g. Letras mayúsculas indican diferencia estadísticamente significativa en una columna y letras minúsculas en una fila ($p < 0.05$).

Los resultados difieren de los encontrados por Dos Santos et al., (2019), debido a que estos investigadores no encontraron diferencias en sus resultados por la adición de β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae*. Por otro lado, Vasiljevic, Kealy & Mishra (2007) lograron mejorar la viabilidad intestinal de algunas cepas de *Lactobacillus* mediante la adición de β -glucanos de avena.

Se menciona que una de las principales propiedades de los probióticos que se adiciona a alimentos funcionales como los yogures, es la capacidad de tolerar las condiciones de estrés gastrointestinal, tales como jugo gástrico, presencia de sales biliares, enzimas pancreáticas y asentamiento en el epitelio del tracto intestinal. Los resultados obtenidos mediante la adición de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 incrementan la tasa de supervivencia, sugiriendo la protección de los microorganismos bajo las condiciones gastrointestinales simuladas. Sin embargo, parte de la población de bacterias ácido lácticas presentes, son más sensibles a condiciones ácidas, así mismo, se ha reportado que *Lactobacillus delbrueckii* son sensibles a condiciones gástricas simuladas (Pacheco et al., 2010; Nguyen et al., 2020).

Las bacterias utilizadas en la fabricación de yogur tipo griego (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) son más resistentes a condiciones intestinales *in vitro*, además de que los β -glucanos pueden servir como barreras de protección, pueden tener efecto prebiótico, de tal manera que cuando llegan al intestino grueso pueden ser fermentados, ser utilizados como fuentes de carbono y producir ácido butírico, propiónico y acético que tienen efectos positivos sobre la salud. También se menciona que los alimentos que tienen alta viscosidad proporcionan efecto protector físico sobre las células de *Lactobacillus delbrueckii* (Pacheco et al., 2010; Sridhar & Mahadevakumar, 2022), por lo que es probable que la mayor viscosidad desarrollada en los yogures con β -glucanos ejerza este efecto protector.

5.4.5. Capacidad antioxidante.

La Tabla 84 muestra los resultados de la capacidad antioxidante de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. La actividad captadora de radicales superóxido para los yogures que contienen β -glucanos estuvo entre 72.42 y 88.49% en

comparación con la Formula control (39.39 %), siendo el mayor valor para la Formula 4 (88.49%).

Tabla 84. Capacidad antioxidante de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Muestra	Actividad captadora de radicales superóxidos (%)	Actividad captadora de radicales hidroxilos (%)	Actividad captadora de radicales DPPH (%)
Fórmula control	39.39 $\pm$ 1.24a	56.22 $\pm$ 1.15a	58.86 $\pm$ 1.16a
Fórmula 1	72.42 $\pm$ 1.39b	73.55 $\pm$ 0.30b	74.29 $\pm$ 1.37b
Fórmula 2	79.09 $\pm$ 0.90c	75.60 $\pm$ 0.16c	83.17 $\pm$ 0.79c
Fórmula 3	81.81 $\pm$ 0.00d	77.60 $\pm$ 0.31d	88.51 $\pm$ 0.86d
Fórmula 4	88.49 $\pm$ 1.05e	70.47 $\pm$ 0.21e	91.56 $\pm$ 0.98e

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa entre muestras ($p < 0.05$).

La actividad captadora de radicales hidroxilo de los yogures que contienen β -glucanos estuvo entre 73.55 y 77.60% en comparación con la Formula control (56.22), disminuyendo el porcentaje de actividad en la Formula 4 (70.47 %).

La actividad captadora de radicales DPPH en las formulaciones que contienen β -glucanos estuvo entre 74.29 y 91.56% en comparación con el control (58.86%), siendo la actividad antioxidante mayor en la Formula 4 (91.56%).

La tendencia de ambos tipos de indicadores de capacidad antioxidante fue hacia el incremento conforme incrementaba el contenido de β -glucanos, a excepción de la actividad captadora de radicales hidroxilo, en este sentido, la Fórmula 4 tuvo mayor capacidad antioxidante in vitro con dos de los ensayos realizados. Hubo diferencia estadísticamente significativa para todas las muestras en comparación con el control ($p < 0.05$). De tal manera que el incremento en la concentración de β -glucanos conlleva a un incremento en la capacidad antioxidante de los ensayos realizados.

Resultados similares en cuanto a la capacidad antioxidantes fueron encontrados en estudios realizados por Qu et al. (2022), Vital et al (2015) y Radzki et al. (2023) en yogures suplementados con β -glucanos provenientes de *Phellinus spp*, *Avena sativa* y *Pleurotus ostreatus* respectivamente. Estos autores atribuyeron el incremento de la capacidad antioxidante de los alimentos formulados a la adición de los β -glucanos de las fuentes mencionadas. Por ende, los polisacáridos añadidos a los yogures tipos griegos potenciaron la capacidad antioxidante.

La generación excesiva de especies reactivas de oxígeno, como el oxígeno singlete, radicales hidroxilo, radical anión superóxido y peróxido de hidrogeno, pueden causar daños en macromoléculas biológicas y está relacionada con la patogénesis de diversas enfermedades como cáncer, envejecimiento y enfermedades crónicas. La intervención de antioxidantes naturales como los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* pueden jugar un rol importante en la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas, así como en el mantenimiento de la

salud, mediante la actividad captadora de radicales libres e inhibición de la oxidación lipídica (Zhang et al., 2012).

En este contexto, los aniones superóxidos son precursores de radicales libres activos que, a pesar de no ser altamente reactivos, pueden dar lugar a radicales hidroxilos y oxígeno singlete. Los radicales hidroxilos son considerados los principales radicales oxígeno que pueden atravesar las membranas celulares y reaccionar rápidamente con carbohidratos, proteínas, lípidos y ADN provocando daños en células, tejidos y causar la muerte celular (Gao et al., 2013).

Por lo tanto, investigar la actividad antioxidante mediante diversos ensayos y conocer la actividad promisorio de diversos tipos de compuestos naturales que puedan tener efecto benéficos sobre la salud y utilizarse en la formulación de alimentos es importante. En este caso, los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 aportan importante actividad antioxidante *in vitro* en los yogures tipo griego formulado.

5.4.6. Caracterización microbiológica.

En la Tabla 85 se presentan los resultados del recuento de mohos y levaduras de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1. El conteo de mohos y levaduras en las formulaciones con β -glucanos osciló entre 3.1×10^1 y 4.8×10^1 UFC/g, siendo ligeramente superior al de la fórmula control, con excepción de la fórmula 1. El contenido de *Escherichia coli* para todas las formulaciones, incluida a la fórmula control fue de $< 1.0 \times 10^1$ UFC/g (no hubo crecimiento de colonias típicas).

Los mohos y levaduras son importantes desde el punto de vista de calidad, debido al deterioro de los alimentos, a la producción de micotoxinas y por los riesgos asociados a su consumo, al respecto El Reglamento Bromatológico Nacional (2012) establece valores entre 100 y 500 UFC/g. Debido a que los valores de recuento están por debajo del límite inferior, se puede inferir que los yogures se encuentran en condiciones óptimas para su consumo.

Tabla 85. Recuento de mohos y levaduras de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Muestra	Mohos y levaduras	<i>Escherichia coli</i>
Fórmula control	$3.8 \times 10^1 \pm 7.5a$	$< 1.0 \times 10^1 \pm 0.0a$
Fórmula 1	$3.1 \times 10^1 \pm 5.3b$	$< 1.0 \times 10^1 \pm 0.0a$
Fórmula 2	$4.0 \times 10^1 \pm 5.3c$	$< 1.0 \times 10^1 \pm 0.0a$
Fórmula 3	$4.8 \times 10^1 \pm 5.3d$	$< 1.0 \times 10^1 \pm 0.0a$
Fórmula 4	$4.3 \times 10^1 \pm 5.8e$	$< 1.0 \times 10^1 \pm 0.0a$

Los valores muestran el promedio de tres determinaciones en tres muestras. El conteo de los indicadores microbiológicos fue expresado en UFC/g.

A pesar de no estar establecido *Escherichia coli* como un criterio microbiológico en La Norma (CODEX STAN 243-2003) o el Reglamento Bromatológico Nacional (2012), al ser *Escherichia coli* un indicador de contaminación fecal, que implica riesgo de encontrar microorganismos patógenos entérico en los alimentos es importante su determinación, en consecuencia, en alimentos listo para consumir no debe contener cargas de este tipo de

microorganismos. En vista de que estos indicadores se encontraron en niveles adecuados, la adición de β -glucanos a los yogures tipo griego no modificó las características microbiológicas y son de óptima calidad para su consumo (Doyle, Diez-González & Hill, 2019).

5.4.7. Aceptación sensorial.

Los resultados de la evaluación sensorial de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 son presentados en la Tabla 86. La Fórmula 1, presentó una mayor aceptación en los parámetros color (5.69) y olor (5.27), mientras que la Fórmula 3 tuvo una mayor puntuación en los atributos viscosidad (5.60) y aceptación global (5.62). Hubo diferencia estadísticamente significativa en los parámetros color, viscosidad y aceptación global ($p < 0.05$) mientras que el olor y el sabor estadísticamente fueron iguales para todos los yogures evaluados ($p > 0.05$). La evaluación sensorial de todas las muestra estuvo entre “Me gusto un poco” a “Me gusta mucho”.

Tabla 86. Evaluación sensorial de los yogures tipo griego formulados con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1.

Atributos	Fórmula control	Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3	Fórmula 4
Color	5.61 $\pm$ 1.03a	5.69 $\pm$ 0.92a	5.27 $\pm$ 1.19b	5.64 $\pm$ 0.93cd	5.44 $\pm$ 1.17cd
Olor	5.50 $\pm$ 1.56a	5.27 $\pm$ 1.24a	4.96 $\pm$ 1.12a	5.18 $\pm$ 1.16a	5.15 $\pm$ 1.20a
Sabor	5.05 $\pm$ 1.96a	5.00 $\pm$ 1.49a	5.07 $\pm$ 1.29a	5.29 $\pm$ 1.20a	5.20 $\pm$ 1.54a
Viscosidad	4.98 $\pm$ 1.58a	5.18 $\pm$ 1.22ab	4.93 $\pm$ 1.50c	5.60 $\pm$ 1.21d	5.42 $\pm$ 1.49a
Aceptación global	5.00 $\pm$ 1.99a	5.47 $\pm$ 1.02ab	5.16 $\pm$ 1.17a	5.62 $\pm$ 1.03b	5.13 $\pm$ 1.32a

Los valores muestran el nivel de aceptación de 55 evaluadores $\pm$ la desviación estándar.

Por los valores encontrados, la fórmula 3 que contiene 0.6% de β -glucanos fue la más aceptada por los panelistas, resultados similares fueron encontrados por Zhao, Fu & Li (2020) y por Kaur & Riar (2020) al incorporar β -glucanos de *Alcaligenes faecalis* var. *Mixogenes* en una proporción de 0.5% en yogures firmes naturales y 0.5% de β -glucanos de cebada en yogures líquidos naturales respectivamente.

Por el contrario, Dos Santos et al (2019) encontraron una disminución de la aceptabilidad de los yogures formulados a medida que se incrementó la concentración de β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae*. Así mismo se mejoraron las propiedades del gel y con efectos benéficos sobre la salud. La aceptabilidad de estos alimentos estuvo relacionada con el tipo de β -glucanos y la concentración utilizada.

Se conoce que la aceptación de un alimento por un panel sensorial es de importancia en el diseño, innovación y renovación de un alimento y poder complementar el proceso de desarrollo de un alimento. En este caso, la incorporación de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 con promisorio y combinada actividad probiótica, efecto antioxidante, con una mejor viscosidad, desarrollo del gel y menor sinéresis puede tener efectos positivos sobre la salud y ventajas desde el punto de vista de industrialización ya que fue bien aceptado por el panel evaluador.

Si un alimento tiene mejoradas características físicas, químicas, reológicas y biológicas y no es aceptado sensorialmente, el desarrollo del alimento es infructuoso ya que no habrá aceptación por potenciales consumidores.

6. Conclusiones

Se obtuvieron 42 aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* no productores de aflatoxinas y 7 de *Rhizopus oryzae* que no crecieron a 45 °C, a partir de muestras de arroz, trigo y avena, demostrando su amplia distribución en la naturaleza y su presencia en cereales.

Los 42 aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* presentaron colonias con tamaño entre 3.67 y 4.33 cm en MEA, 3.88 y 4.60 cm en CYA, 3.63 y 5.63 cm en YES y 2.07 y 4.40 cm en CREA. El margen fue filiforme, entero y filamentoso, con elevación umbonada a plana, textura flocosa y granulosa, y de crecimiento medio. Algunos produjeron esclerocios y no se detectó producción de aflatoxina.

Entre las características microscópicas de los aislados presuntivos de *Aspergillus oryzae* se observaron, hifas ramificadas y septadas, vesículas globosas, subglobosas, hemisféricas y columnar hemisférica. Los conidióforos tuvieron una longitud entre 73.30 a 2645,20 µm, ancho entre 1.20 y 27.50 µm. Los conidios fueron lisos, ligeramente rugosos y rugosos con espículas, con o sin espículas, con un diámetro variable entre 3.40 y 8.00 µm. Algunos aislados presentaron fiálides monoseriadas cubriendo la parte superior de la vesícula, mientras que otros presentaron disposición biseriada con métulas y fiálides.

Los 7 aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae* presentaron colonias de 9 cm en agar PDA, MEA y AO, margen entero, textura algodonosa, crecimiento rápido y color gris claro, gris oscuro y blanco en el borde. Estos aislados crecieron a 27 y 35 °C, sin embargo, no crecieron a 45 °C. Esta característica fisiológica es de importancia ya que permitió diferenciarlos de otros miembros perteneciente a la división *Mucormycota*.

En lo que refiere a las características microscópicas, los aislados presuntivos de *Rhizopus oryzae* mostraron entre 2 y 3 esporangios por grupos. El esporangióforo tuvo una longitud entre 180.00 y 2894.40 µm, con un diámetro de 2.10 a 18.60 µm, de color marrón. Las esporas midieron entre 6.20 a 26.60 µm y fueron alargadas con estrías.

Se logró identificar molecularmente a 4 aislados nativos de *Rhizopus oryzae*, que agruparon en un clado bien definido con la cepa tipo *Rhizopus oryzae* NRRL 1469 y a 1 aislado de *Aspergillus oryzae* utilizando la técnica PCR-RFLP, con la enzima de restricción HincII debido a que es especie críptica con *Aspergillus flavus* y por ende sus características macroscópica, microscópica y genéticamente son similares.

Rhizopus oryzae y *Aspergillus oryzae* nativos fueron aislados de granos de cereales provenientes de Tulcán, Ecuador, descritas sus características macroscópicas, microscópicas, fisiológicas y moleculares para darle un uso no tradicional a la biomasa en la extracción de β-glucanos de paredes celulares que tradicionalmente han sido utilizados en la fermentación de alimentos y bebidas en países asiáticos.

El residuo líquido estuvo caracterizado por contener almidón como el componente más representativo, con concentraciones desde 3100.09 hasta 4342.11 mg/100 mL, posteriormente le siguen los sólidos totales con valores que van desde 2.70 y 3.48 g/100. Los

componentes minoritarios incluyeron azúcares totales, en concentraciones entre 115.38 y 393.54 g/100 mL y azúcares reductores en un rango de 43.11 a 68.11 mg/100 mL.

El proceso de fermentación sumergida con *Rhizopus oryzae* M10A1 y *Aspergillus flavus* M6A5 consumió almidón en un 88.27% y 89.08%, sólidos totales en un 61.89% y 62.92%, sólidos en suspensión en un 42.95% y 44.23%, sólidos solubles en un 79.07% y 79.77%, cenizas en un 5.88% y 38.89%, nitrógeno en un 44.68% y 68.89%, azúcares totales en un 92.07% y 93.33%, y azúcares reductores en un 75.05% y 80.89%, respectivamente. Estos cambios permitieron reducir el contenido de nutrientes en el residuo, contribuyendo así al manejo adecuado y produciendo menos contaminación en el ambiente.

Se optimizó el medio líquido proveniente de los residuos del procesamiento de almidón de papa con la suplementación de 0.8% (p/v) de glucosa y 0.8% (p/v) de sulfato de amonio para obtener β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 en una concentración de 3254.56 mg/100 de biomasa. La suplementación para el caso de *Aspergillus oryzae* M6A5 fue con 0.6% (p/v) de glucosa y 0.6% (p/v) de cloruro de amonio para producir 31.18 mg/100 de biomasa, de β -glucanos.

El rendimiento obtenido de los β -glucanos de *Aspergillus oryzae* M6A5 fue de 0.03% y 3.42% para *Rhizopus oryzae* M10A1, utilizando como medio de cultivo a los residuos líquidos del procesamiento de almidón, proporcionando una alternativa de uso para el manejo adecuado de estos residuos agroindustriales, por ende, estos residuos líquidos pueden ser utilizados como sustrato para el cultivo de biomasa y la posterior obtención de estos polisacáridos.

Se obtuvieron β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 con alto contenido de azúcares totales (82.46%), contenido de humedad de 11.21%, el cual lo hace estable en el tiempo y con contenido de cenizas, nitrógeno, proteínas y grasa total menores al 1%. Por ende, fue efectivo el proceso de centrifugación, filtración, desproteinización, desengrasado y diálisis. Los β -glucanos obtenidos tienen una adecuada pureza para su utilización en la aplicación del desarrollo de un yogur tipo griego u otras aplicaciones.

El color presentado por los β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 fue de color marrón claro, cuyas coordenadas en la escala CIELAB fueron, L: 33.42, a: 3.67 y b: 17.44, lo cual los hace adecuado para el desarrollo de alimentos, ya que no incorporan tonalidad diferentes u oscuras en los sistemas alimenticios donde se los pueda utilizar.

Se obtuvieron β -glucanos con un peso molecular de 450 kDa y una composición heterogénea de monosacáridos, siendo los principales componentes glucosa y galactosa con 39.84 y 16.61% respectivamente. Los monosacáridos menos abundantes fueron galactosa, fructosa, manosa y arabinosa. La composición heterogénea de monosacáridos hace que estos compuestos sean promisorios en varias actividades biológicas reportadas, como antioxidantes, antitumoral, modulación del sistema inmune, modulación del metabolismo de los carbohidratos, lípidos, entre otros.

Los β -glucanos obtenidos son de calidad e inocuos, debido a que los valores de los indicadores microbiológicos fueron, *E. coli*, $< 1.0 \times 10^1$ UFC/g y aerobios mesófilos, 3.3×10^1 UFC/g estimado. Los β -glucanos como materia prima son de la calidad e inocuidad y pueden ser utilizados en el desarrollo de un yogur tipo griego y en otras aplicaciones.

Los aislados nativos de hongos tales como *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus oryzae*, presentes en ciertas regiones geográficas, están adaptados a condiciones ambientales específicas y es de los cuales se obtuvieron β -glucanos para hacer aplicaciones biotecnológicas en el área de desarrollo de alimentos.

Se formularon yogures tipo griego natural con la adición de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8% de β -glucanos, cuyos componentes mayoritarios fueron sólidos y carbohidratos totales, con una tendencia de incremento de acuerdo al contenido de β -glucanos utilizados en las formulaciones. El contenido de cenizas, grasa y proteína total estuvieron en menor cantidad, no existiendo diferencia estadísticamente significativa en estos dos últimos parámetros por la adición de los polisacáridos, en consecuencia, la adición de β -glucanos *Rhizopus oryzae* M10A1 puede ser utilizado en el desarrollo de estos tipos de alimentos.

En el desarrollo de los yogures tipo griego natural, la fórmula 4 fue la más prominente en los atributos nutricionales evaluados ya que aportó, 13.96% de carbohidratos, 9.29% de proteínas, 5.0% de grasa total y 576.87 kJ/100g. Esto hace, que el prototipo desarrollado pueda ser consumido por adultos sanos, ya que aporta el 7.06% del requerimiento diario energético y es cercano a los límites de la distribución de nutrientes recomendada por la OMS, el cual contempla 50-55% de hidratos de carbono, 15 -20% de proteínas y 30 -35% de grasas.

Los parámetros físicos de calidad de los yogures tipo griego desarrollados no cambiaron por la adición de β -glucanos, ya que el pH estuvo entre 4.50 y 4.61 y la acidez titulable entre 1.46 y 1.54%, y estuvieron dentro de los límites establecidos por la Norma CODEX para leche fermentada, CODEX STAN 243-2003 y el Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 67.04.79:23. La adición de hasta 0.6% de polisacáridos incrementó la capacidad de retención de agua hasta 89.42%, probablemente debido a la formación de puentes de hidrogeno de las estructura que conforman a estos polisacáridos, al peso molecular y las moléculas de agua del yogur.

El efecto observado en la capacidad de retención de agua, hace que los polisacáridos de paredes celulares extraídos de *Rhizopus oryzae* M10A1 sea una fuente alternativa de estabilizante a los tradicionalmente utilizados como gomas y almidones, en alimentos refrigerados que pueden evidenciar exudación de líquidos, el cual es considerado como un defecto de calidad.

El color fue modificado ligeramente a medida que se incrementó el contenido de β -glucanos, ya que la luminosidad disminuyó y el color cambio hacia el verde y al amarillo sobre todo en la fórmula 4, lo cual pudiera limitar su uso en alimentos de colores claros y brillantes. Sin embargo, el color aún es agradable a la vista como un atributo sensorial.

La viscosidad fue modificada por la adición de β -glucanos, ya que se observó un incremento de este parámetro, siendo la muestra de mayor viscosidad la fórmula 4 con un valor de 819.49 Pa.s a 0.1 s, siendo positiva esta modificación en yogures tipo griego que requieren de viscosidad para que sea cuchareable y de fácil manejo al momento de su consumo. Este incremento puede deberse a las interacciones entre las moléculas de proteínas, agua y β -glucanos.

Los valores de índice de flujo (n) evaluados por el modelo Herschell-Buckley estuvieron entre 0.15 y 0.19, valores menores que 1, lo cual es característico de fluidos pseudoplásticos, en consecuencia, la adición de β -glucanos no modificó a estos tipos de fluidos, siendo viable su utilización en el desarrollo de alimentos que requieren de desarrollo de viscosidad.

Los yogures tipo griego son considerados alimentos tipos geles, condición corroborada, con el análisis de barrido de esfuerzo, ya que el módulo de almacenamiento G' fue mayor que el módulo de pérdida G'' , ($G' > G''$) el cual no fue modificado por la adición de estos polisacáridos. Un aspecto a tener en cuenta es que la adición de β -glucanos a concentraciones altas puede hacer que los geles formados fueran más frágiles a la deformación por corte, en este sentido la fórmula 3 que contenía 0.6%, por ende, puede ser utilizado hasta esta concentración, en el desarrollo de estos tipos de alimentos.

El análisis de barrido de frecuencia evidencio valores de $G' > G''$ lo cual es indicativo de geles con comportamiento elástico, los cuales fueron modificados ligeramente entre los distintos yogures desarrollados con la adición de β -glucanos, asimismo indican entrecruzamiento entre las partículas para formar geles. Debido a que los valores G' de las distintas formulaciones con polisacáridos son menores que la formulación control, indican menor grado de entrecruzamiento, por ende, menor rigidez en los geles, efecto que puede ser deseable ya que hace que el gel sea más cremoso y por ende realce este atributo sensorial, de importancia para el consumo de este tipo de alimentos.

Mediante los ensayos de viabilidad, se pudo evidenciar que la adición de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 incrementó el conteo de bacterias ácido lácticas bajo condiciones gástricas (pH 7) e intestinales (pH 2) simuladas, en cada hora de ensayo, así como el aumento de la tasa de supervivencia al final de cada ensayo. La fórmula 4 que contiene 0.8% de β -glucanos fue la que presentó una mayor tasa de supervivencia, con 52.37 y 92.53% a pH 2 y pH 7 respectivamente. Esto sugiere que la adición de las partículas de β -glucanos de *Rhizopus oryzae* M10A1 y el desarrollo de viscosidad en el yogur tipo griego natural, ejercen efecto de protección de los microorganismos bajo las condiciones simuladas.

La adición de β -glucanos tuvo efecto sinérgico en la capacidad antioxidante de los yogures obtenidos, ya que se incrementó la actividad captadora de radicales superóxido desde 39.39 hasta 88.49%, la actividad captadora de radicales hidroxilo desde 56.22 hasta 77.60% y la actividad captadora de radicales DPPH desde 58.86 hasta 91.56%. En consecuencia, los polisacáridos utilizados en el desarrollo de los yogures tipos griegos, potenciaron la capacidad antioxidante y pueden ser consumidos para reducir el efecto sobre los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y las consecuencias sobre la salud.

La evaluación microbiológica de los yogures tipo griego estuvo acorde con los criterios establecidos en las normativas utilizadas como referencia. El conteo de mohos y levaduras estuvo entre 3.0×10^1 y 5.5×10^1 UFC/g y el contenido de *Escherichia coli* para todas las formulaciones fue de $< 1.0 \times 10^1$ UFC/g. Debido a que los valores encontrados están en el nivel de 10^1 para el primer indicador y $< 1.0 \times 10^1$ UFC/g para el segundo, los yogures se encuentran en condiciones microbiológicas óptimas para su consumo.

La evaluación sensorial puso en evidencia que la fórmula 3 tuvo una mayor puntuación en los atributos viscosidad (5.60) y aceptación global (5.62), siendo la más aceptada por el panel sensorial, las otras muestras estuvieron entre una puntuación de “Me gusta un poco” a “Me gusta mucho”. Por lo tanto, la adición de β -glucanos permitió el desarrollo de viscosidad que fue percibida positivamente en la evaluación de los yogures tipo griego naturales.

En base a los resultados obtenidos se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa que hace referencia a que los β -glucanos provenientes de las paredes celulares de *Rhizopus oryzae* M10A1 podrán ser extraídos y utilizados en el desarrollo de un yogurt tipo griego funcional.

Lo anterior, es debido a que la biotransformación de residuos líquidos llevado a cabo por *Rhizopus oryzae* en estado líquido, lo cual permitió reusar y revalorizar los nutrientes presentes, de tal manera que sirvieron para la extracción de polisacáridos y ser usados en el desarrollo de yogures naturales tipo griego debido a que no modifica sus características físicas, químicas y microbiológicas, mejora las propiedades reológicas, antioxidantes, viabilidad de bacterias ácido lácticas y con una aceptación sensorial de entre “Me gusta un poco” a “Me gusta mucho”.

7. Perspectivas

En cuanto a las perspectivas de la investigación se puede mencionar lo siguiente:

Utilizar a los β -glucanos obtenidos en el desarrollo de otros tipos de alimentos, para evaluar su efecto en las propiedades antioxidantes y reológicas.

Evaluar el efecto del consumo de yogur con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* sobre la microbiota y microbioma a través de técnicas de metagenómicas.

Estudiar la actividad biológica por efecto del consumo de yogur con β -glucanos de *Rhizopus oryzae* tales como la actividad antitumoral, modulación del sistema inmune, modulación del metabolismo de los carbohidratos, lípidos, entre otros, a nivel de tejidos y con ratones.

Evaluar la actividad antioxidante y de viabilidad en ratones de laboratorio para determinar su efecto en un sistema vivo, dada las limitaciones de los ensayos in vitro.

Evaluar la utilidad de los hongos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* y *Rhizopus oryzae* aislados en otras aplicaciones como biorremediación, producción de enzimas y fermentaciones para la producción de otros metabolitos.

Evaluar la utilización de los residuos líquidos como sustratos para la producción de otros tipos de metabolito como lípidos, pigmentos, exopolisacáridos y biomasa de otros microorganismos.

Escalar a fase de planta piloto la producción de β -glucanos obtenidos con la finalidad de obtenerlo en concentraciones mayores que faciliten el desarrollo de aplicaciones para la industria de alimentos.

Evaluar la modificación física, química o biológicamente de los β -glucanos obtenidos dada su baja solubilidad a bajas temperaturas, evaluarlos en otras aplicaciones de desarrollo de alimentos y su efecto biológico en la salud de las personas.

8. Referencias Bibliográficas

Ab Kadir, S., Wan, W., Mohammad, R., Abdul Halim Lim, S., Sabo Mohammed, A., & Saari, N. (2016). Evaluation of commercial soy sauce koji strains of *Aspergillus oryzae* for γ -aminobutyric acid (GABA) production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(10), 1387-1395. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1828-5>

Abastabar, M., Shabanzadeh, S., Valadan, R., Mayahi, S., Haghani, I., Khojasteh, S., ... & Hedayati, M. T. (2022). Development of RFLP method for rapid differentiation of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*, two species with high importance in clinical and food microbiology. *Journal of Medical Mycology*, 32(3): 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2022.101274>

Abd El-Aziz, A., Shehata, S., Hisham, S., & Alobathani, A. (2021). Molecular profile of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* isolated from stored maize. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(2): 1383-1391. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.073>

Abdel, A. M. H., Agwa, A. M., Mahgoub, S. A., & Shehata, W. M. (2020). Characterization of β -glucan gum for food applications as influenced by genotypic variations in three hullless barley varieties. *Journal of food science*, 85(6), 1689-1698.

Abubakar, A., Suberu, H., Bello, I., Abdulkadir, R., Dausu, O., & Lateef, A. A. (2013). Effect of pH on mycelial growth and sporulation of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Plant Sciences*. 1(4): 64-67. doi: 10.11648/j.jps.20130104.13

Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., & Ahmed, Z. (2010). Extraction and characterization of β -d-glucan from oat for industrial utilization. *International journal of biological macromolecules*, 46(3), 304-309. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.01.002>

Ahmad, A.; Khalid, N. (2018). Dietary fibers in modern food production: a special perspective with β -glucans. In *Biopolymers for Food Design* (pp. 125-156). Academic Press. Cambridge, USA. 513p

AL AAYADI, A., Safa, A. L. İ., BAŞBUĞA, S., Omar, A. T. İ. K., & Canan, C. A. N. (2020). PCR-RFLP analyses of *Aspergillus* spp. Isolated from Pistachio in Turkey. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 49(2), 25-33. Disponible en <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/1238360>

Anchundia, M., León-Revelo, G., Santacruz, S., & Torres, F. (2024). Polyphasic identification of *Rhizopus oryzae* and evaluation of physical fermentation parameters in potato starch processing liquid waste for β -glucan production. *Scientific Reports*, 14(1), 14913. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-66000-5>

Antontceva, E., Sorokin, S., Sedykh, V., Krasnikova, L., & Shamtsyan, M. (2019). Influence of fortification of dairy products by pleurotus ostreatus beta-glucans on product characteristics. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 20(3), 353-364.

Association of official Analytical Chemists (AOAC). 2019. Official Methods of Analysis. Vol I y II. 20th ed. AOAC International. Maryland, USA.

Bai, J., Ren, Y., Li, Y., Fan, M., Qian, H., Wang, L., Wu, G., Zhang, H., Qi, X., Xu, M., Rao, Z. (2019). Physiological functionalities and mechanisms of β -glucans. *Trends in food science & technology*, 88: 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.023>

Ballata, A., Shabani, L., & Dharmo, K. (2019). Impact of microbiological quality of the raw material and the technological process in the microflora of final product (confectionery products). *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 1(1): 1-6.

Baquião, A., de Oliveira, M., Reis, T., Zorzete, P., Atayde, D., & Correa, B. (2013). Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chemistry*, 139(1-4): 1127-1132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.007>

Barbosa, R. D. N., Santos, J. E. F. D., Bezerra, J. D. P., Istel, L., Houbraken, J., Oliveira, N. T., & Souza-Motta, C. M. D. (2022). Brazilian Atlantic Forest and Pampa Biomes in the spotlight: an overview of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* (*Eurotiales*) species and the description of *Penicillium nordestinense* sp. nov. *Acta Botanica Brasilica*, 36(1): 1-26. <https://doi.org/10.1590/0102-33062021abb0390>

Benalaya, I., Alves, G., Lopes, J., & Silva, L. R. (2024). A review of natural polysaccharides: Sources, characteristics, properties, food, and pharmaceutical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 1322. <https://www.preprints.org/manuscript/202312.1862/v1>

Bikmurzin, R., Bandzevičiūtė, R., Maršalka, A., Maneikis, A., & Kalėdienė, L. (2022). FT-IR method limitations for β -glucan analysis. *Molecules*, 27(14), 4616. <https://doi.org/10.3390/molecules27144616>

Borin, T., Georges, E., Brito-Oliveira, T., Moraes, I. & Pinho, S. (2018). Technological and sensory evaluation of pineapple ice creams incorporating curcumin-loaded nanoemulsions obtained by the emulsion inversion point method. *International journal of dairy technology*, 71(2), 491-500. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12451>

Bzducha-Wróbel, A., Koczoń, P., Błażej, S., Kozera, J., & Kieliszek, M. (2020). Valorization of deproteinated potato juice water into β -glucan preparation of *C. utilis* origin: comparative study of preparations obtained by two isolation methods. *Waste and biomass valorization*, 11, 3257-3271. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00641-w>

- Bzducha-Wróbel, A., Pobiega, K., Błażej, S., & Kieliszek, M. (2018). The scale-up cultivation of *Candida utilis* in waste potato juice water with glycerol affects biomass and β (1, 3)/(1, 6)-glucan characteristic and yield. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 9131-9145. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9357-y>
- Cantabrana, I., Perise, R., & Hernández, I. (2015). Uses of *Rhizopus oryzae* in the kitchen. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2(2): 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2015.01.001>
- Chioru, A., & Chirsanova, A. (2023). β -Glucans: Characterization, Extraction Methods, and Valorization. *Food and Nutrition Sciences*, 14(10), 963-983. <https://doi.org/10.4236/fns.2023.1410061>
- Chiozzi, V., Eliopoulos, C., Markou, G., Arapoglou, D., Agriopoulou, S., El Enshasy, H. A., & Varzakas, T. (2021). Biotechnological addition of β -glucans from cereals, mushrooms and yeasts in foods and animal feed. *Processes*, 9(11), 1889. <https://doi.org/10.3390/pr9111889>
- Choma, A., Wiater, A., Komaniecka, I., Paduch, R., Pleszczyńska, M., & Szczodrak, J. (2013). Chemical characterization of a water insoluble (1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glucan from an alkaline extract of *Aspergillus wentii*. *Carbohydrate polymers*, 91(2), 603-608. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.060>
- Cortés, A., Guadarrama, L., Díaz, M. (2014). Producción de biomasa a partir de *Aspergillus oryzae* en cultivo sumergido. *Biocencia*, 16(3): 11-15. <https://doi.org/10.18633/bt.v16i3.106>
- Costa, C., Menolli, R., Osaku, E., Tramontina, R., do Amaral, A., Duarte, P., Mazetto, M., Smiderle, F., Silva, J.; Mello, R. (2019a). Exopolysaccharides from *Aspergillus terreus*: Production, chemical elucidation and immunoactivity. *International journal of biological macromolecules*, 139: 654-664. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.039>
- Costa, M., Pimentel, T. C., Guimaraes, J. T., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Cavalcanti, R. N., ... & Cruz, A. G. (2019b). Impact of prebiotics on the rheological characteristics and volatile compounds of Greek yogurt. *Lwt*, 105, 371-376. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.007>
- Cruz, I., Márquez, I., García, R., Carrillo, J., León, J., & Allende, R. (2017). Identification of mucoralean fungi causing soft rot in papaya (*Carica papaya* L.) fruit in Mexico. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(3): 397-417. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1611-3
- da Silva, M., Izeli, N., Martinez, P. Silva, I., Constantino, C., Cardoso, M., ... & da Silva, G. (2005). Purification and structural characterisation of (1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. *Carbohydrate polymers*, 61(1), 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.01.002>

Daba, G. M., Mostafa, F. A., & Elkhateeb, W. A. (2021). The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00408-z>

Dawood, M. A. M., Taha, M. G. A. E., & Ali, H. E. (2019). Production of Bio-Ethanol from Potato Starch Wastes by *Saccharomyces cerevisiae*. *Egyptian Journal of Applied Science*, 34(issue, 12), 256-267. Available at https://journals.ekb.eg/article_92092_493afd597cba0319316d85bfa93c940c.pdf

Djekrif, S., Gheribi, Z., Meraihi, Z., & Bennamoun, L. (2006). Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of food Engineering*, 73(2): 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.021>

Dolatabadi, S., de Hoog, G. S., Meis, J. F., & Walther, G. (2014). Species boundaries and nomenclature of *Rhizopus arrhizus* (syn. *R. oryzae*). *Mycoses*, 57, 108-127. <https://doi.org/10.1111/myc.12228>

Dos Santos, J. S., de França, V. R., Venâncio, R. L., Hasegawa, P. H., de OLIVEIRA, A. G., & Costa, G. A. N. (2019). β -Glucan from *saccharomyces cerevisiae* in skim yogurt production. *Biosci. J*, 35, 620-628. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v35n2a2019-42109>

Doyle, M. P., Diez-Gonzalez, F., & Hill, C. (Eds.). (2019). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. John Wiley & Sons.

El-Enshasy, H. A. (2007). Filamentous fungal cultures—process characteristics, products, and applications. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*, 63(1): 225-261. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50010-4>

Fani, S. R., Moradi, M., Probst, C., Zamanizadeh, H. R., Mirabolfathy, M., Haidukowski, M., & Logrieco, A. F. (2014). A critical evaluation of cultural methods for the identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates for aflatoxin mitigation in pistachio orchards of Iran. *European journal of plant pathology*, 140, 631-642. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0499-1>

Fazenda, M. L., Seviour, R., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008). Submerged culture fermentation of “higher fungi”: the macrofungi. *Advances in applied microbiology*, 63(1): 33-103. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)00002-0)

Febriani, R., Sjamsuridzal, W., Oetari, A., Santoso, I., & Roosheroe, I. G. (2018, October). ITS regions of rDNA sequence and morphological analyses clarify five *Rhizopus* strains from tempeh as *Rhizopus oryzae*. In *AIP Conference Proceedings*. 2023(1): 020159-1-020159-5. <https://doi.org/10.1063/1.5064156>

Feng, Y., Li, W., Wu, X., Cheng, J., & Ma, S. (2010). Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model

study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal*, 49(1): 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.002>

Fraga, S. M., & Nunes, F. M. (2020). Agaricus bisporus by-products as a source of Chitin-Glucan complex enriched dietary fibre with potential bioactivity. *Applied Sciences*, 10(7), 2232. <https://doi.org/10.3390/app10072232>

Frisvad, J., Hubka, V., Ezekiel, C., Hong, S., Nováková, A., Chen, A., ... & Houbraken, J. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in mycology*, 93(1): 1-63. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>.

Fuster, G. O., & Marín, M. G. (2007). Update on nutritional requirements. *Endocrinología y Nutrición*, 54, 17-29. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(07\)71523-1](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(07)71523-1)

Gao, C., Wang, Y., Wang, C., & Wang, Z. (2013). Antioxidant and immunological activity in vitro of polysaccharides from *Gomphidius rutilus* mycelium. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 2187-2192. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.011>

Gao, J., Lin, L., Sun, B., & Zhao, M. (2017). A comparison study on polysaccharides extracted from *Laminaria japonica* using different methods: structural characterization and bile acid-binding capacity. *Food & function*, 8(9), 3043-3052. <https://doi.org/10.1039/C7FO00218A>

Godet, M., & Munaut, F. (2010). Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS Microbiology Letters*, 304(2), 157-168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01890.x>

Garcia, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. *Frontiers in microbiology*, 10, 492056. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>

Gastebois, A., Mouyna, I., Simenel, C., Clavaud, C., Coddeville, B., Delepierre, M., ... & Fontaine, T. (2010). Characterization of a new β (1–3)-glucan branching activity of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(4), 2386-2396. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077545>

Gautam, A. K., & Bhadauria, R. (2012). Characterization of *Aspergillus* species associated with commercially stored triphala powder. *African journal of Biotechnology*, 11(104): 16814-16823.

Gientka, I., Kieliszek, M., Jermacz, K., & Błażej, S. (2017). Identification and characterization of oleaginous yeast isolated from kefir and its ability to accumulate intracellular fats in deproteinated potato wastewater with different carbon sources. *BioMed Research International*, 2017(1), 6061042. <https://doi.org/10.1155/2017/6061042>

Gil, D. B., Bocourt, E. C., & Maqueira, Y. D. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 40(2), 45-50.

Gonçalves, M. L. M., & Maximo, G. J. (2023). Circular economy in the food chain: production, processing and waste management. *Circular Economy and Sustainability*, 3(3), 1405-1423. <https://doi.org/10.1007/s43615-022-00243-0>

Gonu, H., Opoku, N., Appiah-Opong, R., Oppong, K. G., Asirifi, I., & Ofori-Attah, E. (2015). Morphological Characteristics of Some Microfungal Species Isolated From Spontaneously Fermented *Jatropha curcas* Seed Meal. *Elix. Res. Int*, 85, 34286-34290.

Gulzar, S., Benjakul, S., & Hozzein, W. N. (2020). Impact of β -glucan on debittering, bioaccessibility and storage stability of skim milk fortified with shrimp oil nanoliposomes. *International journal of food science & technology*, 55(5), 2092-2103. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14452>

Gutiérrez, H., de la Vara, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. Segunda edición. Editorial MacGraw Hill, México, Ciudad de México. Pp 506.

Hammam, A.; Tammam, A.; Elderwy, Y, & Hassan, A. (2017). Functional peptides in milk whey: An overview. *Assiut Journal of Agricultural Sciences*, 48(4), 77-91. <https://doi:10.21608/ajas.2017.19875>

Hartanti, A. T., Rahayu, G., & Hidayat, I. (2015). Rhizopus species from fresh tempeh collected from several regions in Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(3): 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2015.10.004>

He, J. Z., Ru, Q. M., Dong, D. D., & Sun, P. L. (2012). Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules*, 17(4), 4373-4387. <https://doi.org/10.3390/molecules17044373>

Henao, S. L. D., Urrego, S. A., Cano, A. M., & Higueta, E. A. (2018). Randomized clinical trial for the evaluation of immune modulation by yogurt enriched with β -glucans from lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), in children from Medellin, Colombia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20(8). [doi:10.1615/IntJMedMushrooms.2018026986](https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2018026986).

Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Trejo-Espino, J. L. (2006). Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., causal agent of *Rhizopus* rot disease of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1): 65-69. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/612/61224110.pdf>

Hesarinejad, M. A., Koocheki, A., & Razavi, S. M. A. (2014). Dynamic rheological properties of *Lepidium perfoliatum* seed gum: Effect of concentration, temperature and

heating/cooling rate. *Food Hydrocolloids*, 35, 583-589.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.017>

Houbraken, J., de Vries, R., & Samson, R. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in applied microbiology*, 86, 199-249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>

Howard, D. H. (Ed.). (2002). *Pathogenic fungi in humans and animals*. Marcel Dekker, Inc. New York. 804 pp.

Huang, L., Jin, B., & Lant, P. (2005). Direct fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 27: 229-238. <https://doi.org/10.1007/s00449-005-0398-0>

Ibarruri, J., & Hernández, I. (2018). *Rhizopus oryzae* as fermentation agent in food derived sub-products. *Waste and Biomass Valorization*, 9:2107-2115.
<https://doi.org/10.1007/s12649-017-0017-8>

Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC] (2023). Registro Estadístico de Defunciones Generales 2022. Quito, Ecuador. Disponible en https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Poblacion_y_Demografia/Defunciones_Generales_2022/Principales_resultados_EDG_2022.pdf

Ishibashi, K. I., Kurone, Y., Motoi, M., Miura, N. N., Adachi, Y., Shirasu, Y., & Ohno, N. (2010). The influence of β -glucan on the growth and cell wall architecture of *Aspergillus* spp. *Microbiology and immunology*, 54(11): 666-672. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00264.x>

ISO 13580-2-2010.

ISO 16649-2005. (2005). Yogurt - Determination of total solids content (Reference method).

ISO 21527-2-2008 (2008). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95.

ISO 23318:2022. (2022). Milk, dried milk products and cream — Determination of fat content - Gravimetric method.

ISO 4833-1-2013. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique.

ISO 6611-2012. Milk and milk products - Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds - Colony-count technique at 25 °C.

ISO 7218 – 2024. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 8968-4: 2016. (2016). Milk and milk products - Determination of nitrogen content - Part 4: Determination of protein and non-protein nitrogen content and true protein content calculation (Reference method)

ISO/CD 9877. (2021). Milk and milk products — Determination of ash.

Jayachandran, M., Chen, J., Chung, S., Xu, B. (2018). A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. *The Journal of nutritional biochemistry*, 61, 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.010>

Jin, B., Van Leeuwen, H. J., Patel, B., & Yu, Q. (1998). Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource technology*, 66(3), 201-206. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00060-1)

Kaur, R., & Riar, C. S. (2020). Sensory, rheological and chemical characteristics during storage of set type full fat yoghurt fortified with barley β -glucan. *Journal of food science and technology*, 57(1), 41-51. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04027-7>

Khan, R., Mohamad Ghazali, F., Mahyudin, N. A., & Samsudin, N. I. P. (2020). Morphological characterization and determination of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolated from sweet corn kernels and soil in Malaysia. *Agriculture*, 10(10):1-13. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100450>

Khokhar, I., Jia, Y., Mukhtar, I., Wang, J. H., Ruth, N., Eltoukhy, A., ... & Yan, Y. C. (2019a). First report of *Rhizopus oryzae* causing postharvest fruit rot on pear in China. *Plant Disease*, 103(6), 1423-1423. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1993-PDN>

Khokhar, I., Wang, J., Jia, Y., & Yan, Y. (2019b). First report of rhizopus soft rot on tomato (*Lycopersicon esculentum*) caused by *Rhizopus oryzae* in China. *Plant Disease*, 103(5): 1041-1041. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1848-PDN>

Kim, C., Nartea, T. J., Pao, S., Li, H., Jordan, K. L., Xu, Y., ... & Sismour, E. N. (2016). Evaluation of microbial loads on dried and fresh shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) as obtained from internet and local retail markets, respectively. *Food Safety*, 4(2), 45-51. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2016005>

Kim, K., Lim, J., Lee, J., Hurh, B., & Lee, I. (2017). Characterization of *Aspergillus sojae* isolated from Meju, Korean traditional fermented soybean brick. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(2), 251-261. <https://doi.org/10.4014/jmb.1610.10013>

Klich, M. A., & Pitt, J. I. (1988). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society*, 91(1): 99-108. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(88\)80010-X](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(88)80010-X)

Kiyota, T., Hamada, R., Sakamoto, K., Iwashita, K., Yamada, O., & Mikami, S. (2011). Aflatoxin non-productivity of *Aspergillus oryzae* caused by loss of function in the aflJ gene product. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(5), 512-517. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.12.022>

Kot, A. M., Błażej, S., Kieliszek, M., Gientka, I., & Bryś, J. (2019). Simultaneous production of lipids and carotenoids by the red yeast *Rhodotorula* from waste glycerol fraction and potato wastewater. *Applied biochemistry and biotechnology*, 189, 589-607. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03023-z>

Kot, A. M., Błażej, S., Kurcz, A., Bryś, J., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., ... & Reczek, L. (2017). Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.01.007>

Kot, A. M., Pobiega, K., Piwowarek, K., Kieliszek, M., Błażej, S., Gniewosz, M., & Lipińska, E. (2020). Biotechnological methods of management and utilization of potato industry waste—a review. *Potato Research*, 63, 431-447. <https://doi.org/10.1007/s11540-019-09449-6>

Kurcz, A., Błażej, S., Kot, A. M., Bzducha-Wróbel, A., & Kieliszek, M. (2018). Application of industrial wastes for the production of microbial single-cell protein by fodder yeast *Candida utilis*. *Waste and Biomass Valorization*, 9, 57-64. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9782-z>

Kurniawati, T., Indrati, R., & Sardjono, S. (2014). Isolation of *Rhizopus oryzae* from rotten fruit and its potency for lactic acid production in glucose medium with and without addition of calcium carbonate. *AgriTech*, 34(2): 170-176. <https://doi.org/10.22146/agritech.9507>

Kwon, J. H., Kang, D. W., Lee, S. D., & Kim, J. (2015). Outbreak of Rhizopus Rot Caused by *Rhizopus oryzae* on Seedlings of Grafted Cucumber on Pumpkin Rootstock in South Korea. *Journal of Phytopathology*, 163(7-8): 670-674. <https://doi.org/10.1111/jph.12304>

Kyanko, M. V., Canel, R. S., Ludemann, V., Pose, G., & Wagner, J. R. (2013). β -Glucan content and hydration properties of filamentous fungi. *Applied biochemistry and microbiology*, 49, 41-45. <https://doi.org/10.1134/S0003683813010080>

Lage, M. A., Simal, J., & Salgado, G. (1983). DETERMINACION DE ALMIDONEN ALIMENTOS. *Trabajos Compostelanos de Biología*, 10: 15-25. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Jesus-Simal-Lozano/publication/235700249_Determinacion_de_almidon_en_alimentos/links/02bfe513dc78894e15000000/Determinacion-de-almidon-en-alimentos.pdf

- Lam, K.; Cheung, P. (2013). Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre*, 2(1): 45-64. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.09.001>
- Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., & Izydorczyk, M. S. (2003). Molecular size effects on rheological properties of oat β -glucans in solution and gels. *Food Hydrocolloids*, 17(5), 693-712. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00036-5)
- Lee, J. H., Jo, E. H., Hong, E. J., Kim, K. M., & Lee, I. (2014). Safety evaluation of filamentous fungi isolated from industrial doenjang koji. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10): 1397-1404. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1403.03007>
- León Avendaño, L. (2021). *Caracterización fisicoquímica y funcional de β -glucanos extraídos a partir de Pleurotus ostreatus* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma Chapingo). Disponible en <https://repositorio.chapingo.edu.mx/items/d470752f-4cff-4d6e-bfe4-006cd287737c>
- Liu, Y., Du, Y. Q., Wang, J. H., Zha, X. Q., & Zhang, J. B. (2014). Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from Jinqian mushroom. *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 63-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.11.029>
- Londoño-Hernández, L., Ramírez-Toro, C., Ruiz, H. A., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar-Gonzalez, M. A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2017). *Rhizopus oryzae*—Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International journal of food microbiology*, 257(1): 110-127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.012>
- Lozada, A. F. (1995). Isolation and identification of mycotoxigenic fungi in selected foods and feeds. *Food Additives & Contaminants*, 12(3), 509-514. <https://doi.org/10.1080/02652039509374337>
- Ludewig, M.; Rattner, J.; Künz, J.J.; Wagner, M.; Stessl, B. (2024). Quality and Safety of Dried Mushrooms Available at Retail Level. *Appl. Sci.* 14, 2208. <https://doi.org/10.3390/app14052208>
- Magnani, M., Fernandes, T., Prete, C. E. C., Homechim, M., Ono, E. Y. S., Vilas-Boas, L. A., ... & Fungaro, M. H. P. (2005). Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Scientia Agricola*, 62(1): 45-49. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162005000100009>
- Mahapatra, S., & Banerjee, D. (2013). Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydrate polymers*, 97(2): 627-634. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.039>

Mangal, M., Bansal, S., & Sharma, M. (2014). Macro and micromorphological characterization of different *Aspergillus* isolates. *Legume Research-An International Journal*, 37(4): 372-378. DOI: [0.5958/0976-0571.2014.00646.8](https://doi.org/10.5958/0976-0571.2014.00646.8)

Mejri, W., Bornaz, S., & Sahli, A. (2014). Formulation of non-fat yogurt with β -glucan from spent brewer's yeast. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 1(1). 1-11. Disponible en <https://keypublishing.org/jhed/wp-content/uploads/2020/07/09.-Wided-Mejri.pdf>

Mezger, T. (2021). *Applied Rheology With Joe Flow on Rheology Road*. Anton Paar: Graz, Austria. 196 pp.

Mykhalevych, A., Polishchuk, G., Nassar, K., Osmak, T., & Buniowska-Olejnik, M. (2022). β -Glucan as a techno-functional ingredient in dairy and milk-based products—a review. *Molecules*, 27(19), 6313. <https://doi.org/10.3390/molecules27196313>

Nair, R. B., Eh-Hser Nay, T., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. (2017). Waste bread valorization using edible filamentous Fungi. In *EUBCE 2017–25th European Biomass Conference and Exhibition, Stockholm Sweden, June*. 1(2015): 12-15. Disponible en <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1152625/FULLTEXT01.pdf>

Nakamura, H., Narihiro, T., Tsuruoka, N., Mochimaru, H., Matsumoto, R., Tanabe, Y., ... & Hanada, S. (2011). Evaluation of the aflatoxin biosynthetic genes for identification of the *Aspergillus* section *Flavi*. *Microbes and environments*, 26(4): 367-369. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME11201>

Nakashima, A., Yamada, K., Iwata, O., Sugimoto, R., Atsuji, K., Ogawa, T., ... & Suzuki, K. (2018). β -Glucan in foods and its physiological functions. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 64(1), 8-17. <https://doi.org/10.3177/jnsv.64.8>

Nargesi, S., Abastabar, M., Valadan, R., Mayahi, S., Youn, J. H., Hedayati, M. T., & Seyedmousavi, S. (2021). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae* targeting the *cyp51A* gene. *Pathogens*, 10(10): 1-9. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101279>

Nguyen, T. H., Kim, Y., Kim, J. S., Jeong, Y., Park, H. M., Kim, J. W., ... & Kang, C. H. (2020). Evaluating the cryoprotective encapsulation of the lactic acid bacteria in simulated gastrointestinal conditions. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 25(2), 287-292. <https://doi.org/10.1007/s12257-019-0406-x>

Nitschke, J., Modick, H., Busch, E., Von Rekowski, R. W., Altenbach, H. J., & Mölleken, H. (2011). A new colorimetric method to quantify β -1, 3-1, 6-glucans in comparison with total β -1, 3-glucans in edible mushrooms. *Food chemistry*, 127(2): 791-796. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.149>

Norma del CODEX para leches fermentadas. CODEX STAN 243-2003, Revisada en 2008, 2010, 20181-8. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh->

https://proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B243-2003%252FCXS_243s.pdf

Nowak, J., Górna, B., & Nowak, W. (2013). Wykorzystanie grzybów strzępkowych do biodegradacji ścieków z przemysłu ziemniaczanego z jednoczesną produkcją biomasy pleśniowej na cele paszowe. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 20(6). Available at <https://bibliotekanauki.pl/articles/826799.pdf>

Okayo, R. O., Andika, D. O., Dida, M. M., K'Otuto, G. O., & Gichimu, B. M. (2020). Morphological and molecular characterization of toxigenic *Aspergillus flavus* from groundnut kernels in Kenya. *International Journal of Microbiology*, 2020(1): 1-10. <https://doi.org/10.1155/2020/8854718>

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura [UNESCO]. (2017). La UNESCO Avanza. La Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. Paris, Francia. http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/FIELD/Hanoi/2030_Brochure_SP.pdf

Osadolor, O., Jabbari, M., Nair, R., Lennartsson, P., Taherzadeh, M. (2018). Effect of media rheology and bioreactor hydrodynamics on filamentous fungi fermentation of lignocellulosic and starch-based substrates under pseudoplastic flow conditions. *Bioresource technology*, 263: 250-257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.093>

Oshoma, C. E., & Ikenebomeh, M. J. (2004). Production of *Aspergillus niger* biomass from rice bran. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(1): 32-36. DOI: 10.3923/pjn.2005.32.36

Osorio, J., Pérez-Martínez, A., Vega-Castro, O., & Martínez-Monteagudo, S. I. (2020). Rheological, texture, structural, and functional properties of Greek-style yogurt fortified with cheese whey-spent coffee ground powder. *LWT*, 129, 109523. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109523>

Pacheco, K. C., del Toro, G. V., Martínez, F. R., & Durán-Páramo, E. (2010). Viability of *Lactobacillus delbrueckii* under human gastrointestinal conditions simulated in vitro. *Am J Agric Biol Sci*, 5, 37-42.

Pappa, E. C., Kondyli, E., MacNaughtan, W., Kakouri, A., Nesseris, K., & Israilides, C. (2018). Quality and sensory properties of reduced fat yoghurt made with addition of β -glucans. *Food and Nutrition Sciences*, 9(4), 390-402. <https://doi.org/10.4236/fns.2018.94031>

Piotrowska, A., Waszkiewicz-Robak, B., & Swiderski, F. (2009). Possibility of beta-glucan from spent brewer's yeast addition to yoghurts. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 59(4).

Pitt, H and Hocking, A. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. New York, USA: Springer.

- Pitt, H and Hocking, A. (2022). *Fungi and Food Spoilage*. New York, USA: Springer.
- Prencipe, S., Siciliano, I., Contessa, C., Botta, R., Garibaldi, A., Gullino, M., & Spadaro, D. (2018). Characterization of *Aspergillus section Flavi* isolated from fresh chestnuts and along the chestnut flour process. *Food microbiology*, 69, 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.004>
- Priya, T. D., Mahendra, C., Phadnis, S., & Peter, A. (2016). Morphological and molecular identification of *Aspergillus flavus* isolated from rice (*Oryza sativa* L.) grain samples in Karnataka and Tamil Nadu in Southern India. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(1): 535-546. Disponible en <https://microbiologyjournal.org/morphological-and-molecular-identification-of-aspergillus-flavus-isolated-from-rice-oryza-sativa-l-grain-samples-in-karnataka-and-tamil-nadu-in-southern-india/>
- Qu, X., Li, B., Yang, W., & Nazarenko, Y. (2022). Effect of oat β -glucan on in vitro digestion characteristics of set-type yogurt. *Acta Innovations*.
- Radzki, W., Skrzypczak, K., Sołowiej, B., Jabłońska-Ryś, E., & Gustaw, W. (2023). Properties of Yogurts Enriched with Crude Polysaccharides Extracted from *Pleurotus ostreatus* Cultivated Mushroom. *Foods*, 12(21), 4033. <https://doi.org/10.3390/foods12214033>
- Raikos, V., Grant, S., Hayes, H., Ranawana, V. (2018). Use of β -glucan from spent brewer's yeast as a thickener in skimmed yogurt: Physicochemical, textural, and structural properties related to sensory perception. *Journal of dairy science*, 101(7): 5821-5831. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14261>
- Reglamento Bromatológico Nacional. Quinta Edición (2012). República Oriental del Uruguay. Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales. 652 pp.
- Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.79:23). PRODUCTOS LÁCTEOS. YOGUR (YOGURT, YOGURTH, YOGHURT, YOGOURT). ESPECIFICACIONES. Disponible en <https://sde.gob.hn/wp-content/uploads/2023/07/RTCA-Yogur-vf-CPI.pdf>
- Riaz, A., Rasib, K., Aslam, H., & Raza, S. (2018). Molecular identification of *Aspergillus flavus* using inter transcribed spacers (ITS). *Biotechnology Journal International*, 20(4): 1-8. DOI: [10.9734/BJI/2017/33951](https://doi.org/10.9734/BJI/2017/33951)
- Ruiz-Herrera, J., & Ortiz-Castellanos, L. (2019). Cell wall glucans of fungi. A review. *The Cell Surface*, 5, 100022. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100022>
- Ruthes, A., Smiderle, F., Iacomini, M. (2015). D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate polymers*, 117: 753-761. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.051>

- Saif, F. A., Yaseen, S. A., Alameen, A. S., Mane, S. B., & Undre, P. B. (2021). Identification and characterization of *Aspergillus* species of fruit rot fungi using microscopy, FT-IR, Raman and UV–Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246(1): 1-36. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119010>
- Saito, M., & Machida, S. (1999). A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience*, 40(2), 205-208. <https://doi.org/10.1007/BF02464300>
- Salem, S. (2019). Identification and Phylogenetic Analysis of Nine Plant Pathogenic Fungi by Application of ITS marker. *Bioscience Research*. 16(2): 2063-2075. Disponible en [https://www.isisn.org/BR16\(2\)2019/2063-2075-16\(2\)2019BR18-753.pdf](https://www.isisn.org/BR16(2)2019/2063-2075-16(2)2019BR18-753.pdf)
- Samson, R., Visagie, C., Houbraeken, J., Hong, S., Hubka, V., Klaassen, C., ... & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78, 141-173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Samson, R. A., Houbraeken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., & Andersen, B. (2019). *Food and indoor fungi*. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. 359 pp.
- Santra, H. K., & Banerjee, D. (2022). Production, optimization, characterization and drought stress resistance by β -Glucan-Rich heteropolysaccharide from an endophytic fungi *Colletotrichum alatae* LCS1 isolated from clubmoss (*Lycopodium clavatum*). *Frontiers in Fungal Biology*, 2, 796010. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03620-x>
- Santra, H. K., & Banerjee, D. (2023). Broad spectrum bioactivity of a novel β -glucan rich heteropolysaccharide, Pestalopine isolated from endophytic fungi *Pestalotiopsis chamaeropsis* CEL6. *Archives of Microbiology*, 205(8), 284. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03620-x>
- Savas, B. S., & Akan, E. (2021). Oat bran fortified raspberry probiotic dairy drinks: Physicochemical, textural, microbiologic properties, in vitro bioaccessibility of antioxidants and polyphenols. *Food Bioscience*, 43, 101223. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101223>
- Serba, E., Pimenov, N., Mochalina, P., Overchenko, M., Borscheva, Y., Sharikov, A., & Rimareva, L. (2020). Production of *Aspergillus oryzae* RCAM 01133 biomass with increased protein and polysaccharides content using by-products of food industry. 18(1): 200-298. <https://doi.org/10.15159/ar.20.026>
- Serra, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., & Ferragut, V. (2009). Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. *Food hydrocolloids*, 23(1), 82-91. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.11.015>

- Shi, Y., Liu, J., Yan, Q., You, X., Yang, S., Jiang, Z. 2018. In vitro digestibility and prebiotic potential of curdlan (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucan oligosaccharides in *Lactobacillus* species. *Carbohydrate polymers*, 188: 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.085>.
- Souza, P., Nair, R., Andersson, D., Lennartsson, P, & Taherzadeh, M. (2018). Vegan-mycoprotein concentrate from pea-processing industry byproduct using edible filamentous fungi. *Fungal biology and biotechnology*, 5(1),1-10.<https://doi.org/10.1186/s40694-018-0050-9>
- Souza, P., Zamani, A., & Taherzadeh, M. (2019). Edible protein production by filamentous fungi using starch plant wastewater. *Waste and Biomass Valorization*, 10(9), 2487-2496. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0265-2>
- Sridhar, K. R., & Mahadevakumar, S. (2022). Fungal Probiotics and Prebiotics. In *Fungal Biotechnology* (pp. 260-279). CRC Press.
- Sushytskyi, L., Synytsya, A., Čopíková, J., Lukáč, P., Rajsiglová, L., Tenti, P., & Vannucci, L. E. (2023). Perspectives in the Application of High, Medium, and Low Molecular Weight Oat β -d-Glucans in Dietary Nutrition and Food Technology—A Short Overview. *Foods*, 12(6), 1121. <https://doi.org/10.3390/foods12061121>
- Synytsya, A., & Novák, M. (2013). Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate polymers*, 92(1), 792-809. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.077>
- Synytsya, A., & Novak, M. (2014). Structural analysis of glucans. *Annals of translational medicine*, 2(2). doi: [10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07](https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07)
- Tenkolu, G. A., Kuffi, K. D., & Gindaba, G. T. (2022). Optimization of fermentation condition in bioethanol production from waste potato and product characterization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(4), 5205-5223. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02974-4>
- Tille, P. (2017). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Uriza, J. (2014). Evaluación de la inclusión de los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* en yogur. Tesis de Maestría para optar al título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Pp 67.
- Utama, G. L., Dio, C., Lembong, E., Cahyana, Y., & Balia, R. L. (2020). Microorganism-based β -glucan production and their potential as antioxidant. *Sys. Rev. Pharm*, 11, 868-873.
- Uwineza, C., Mahboubi, A., Atmowidjojo, A., Ramadhani, A., Wainaina, S., Millati, R., ... & Taherzadeh, M. J. (2021). Cultivation of edible filamentous fungus *Aspergillus oryzae* on volatile fatty acids derived from anaerobic digestion of food waste and cow manure. *Bioresource Technology*, 337(125410):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125410>

Vaclav, V., Petr, S., Luca, V. 2018. Beta glucan as therapeutic food. In *Therapeutic Foods* (pp. 239-256). Academic Press. Cambridge, USA. 511p.

Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69(1): 57-80. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.05>

Vasiljevic, T., Kealy, T., & Mishra, V. K. (2007). Effects of β -glucan addition to a probiotic containing yogurt. *Journal of food science*, 72(7), C405-C411. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00454.x>

Vital, A. C. P., Goto, P. A., Hanai, L. N., Gomes-da-Costa, S. M., de Abreu Filho, B. A., Nakamura, C. V., & Matumoto-Pinto, P. T. (2015). Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1028-1035. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.003>

Vongsangnak, W., & Nielsen, J. (2013). Systems biology methods and developments of filamentous fungi in relation to the production of food ingredients. In *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* (pp. 19-41). Woodhead Publishing.

Vyrova, D. V., & Selezneva, I. S. (2019, December). Isolation of beta-glucan from yeast and its use as a dietary supplement for low-fat yoghurt manufacturing. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2174, No. 1). AIP Publishing. <https://doi.org/10.1063/1.5134417>

Walther, G., Wagner, L., & Kurzai, O. (2019). Updates on the taxonomy of Mucorales with an emphasis on clinically important taxa. *Journal of Fungi*, 5(4): 1-23. <https://doi.org/10.3390/jof5040106>

Wiater, A., Paduch, R., Choma, A., Pleszczyńska, M., Siwulski, M., Dominik, J., ... & Szczodrak, J. (2012). Biological study on carboxymethylated (1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glucans from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 1014-1023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.017>

Wiater, A., Paduch, R., Choma, A., Sylwia, S., Pleszczynska, M., Tomczyk, M., Locatelli, M., Janusz, S. (2015). (1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Glucans from *Aspergillus* spp.: Structural Characterization and Biological Study on their Carboxymethylated Derivatives. *Current drug targets*, 16(13): 1488-1494. DOI: [10.2174/1389450116666150120105133](https://doi.org/10.2174/1389450116666150120105133)

World health statistics (WHO) 2023. monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at <https://www.who.int/publications/i/item/9789240074323>

- Yazdani, D., Zainal Abidin, M. A., Tan, Y. H., & Kamaruzaman, S. (2011). Molecular identification of *Aspergillus* and *Eurotium* species isolated from rice and their toxin-producing ability. *Microbiology*, 80(1): 720-727. DOI: [10.1134/S0026261711050195](https://doi.org/10.1134/S0026261711050195)
- Zeng, Y., Yang, H., Wu, X., Peng, F., Huang, Z., Pu, L., Zong, M., Yang, J., Lou, W. (2019). Structure and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Fusarium solani* DO7 by solid-state fermentation. *International journal of biological macromolecules*, 137, 568-575. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.019>
- Zhang, L., Hu, Y., Duan, X., Tang, T., Shen, Y., Hu, B., ... & Liu, Y. (2018). Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from thirteen boletus mushrooms. *International journal of biological macromolecules*, 113, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.084>
- Zhang, Y., Dai, L., Kong, X., & Chen, L. (2012). Characterization and in vitro antioxidant activities of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus*. *International journal of biological macromolecules*, 51(3), 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.05.003>
- Zhao, Y., Fu, R., & Li, J. (2020). Effects of the β -glucan, curdlan, on the fermentation performance, microstructure, rheological and textural properties of set yogurt. *LWT*, 128, 109449. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109449>
- Złotko, K., Wiater, A., Waśko, A., Pleszczyńska, M., Paduch, R., Jaroszuk-Ściseł, J., & Bieganski, A. (2019). A report on fungal (1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glucans: Properties, functions and application. *Molecules*, 24(21), 3972. <https://doi.org/10.3390/molecules24213972>
- Zulkifli, N., & Zakaria, L. (2017). Morphological and molecular diversity of *Aspergillus* from corn grain used as livestock feed. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(1): 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2017.05.002>