



Departamento de Biotecnología

Especialización en Biotecnología

**Fisiología de crecimiento de *Geotrichum candidum* en fermentación en
medio sólido**

Tesis

Alumno:

I.B.I. Roberto Daniel Flores Murillo

Director:

Dr. Ernesto Favela Torres

Asesoras:

M. en C. Lorena Pedraza Segura

M. en B. Nohemí López Ramírez



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00199

Matrícula: 2142800022

Fisiología de crecimiento de *Geotrichum candidum* en fermentación en medio sólido.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 17 del mes de enero del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ERNESTO FAVELA TORRES
M. EN B. NOHEMI LOPEZ RAMIREZ

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

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: ROBERTO DANIEL FLORES MURILLO

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

Aprobar

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



R. Flores

ROBERTO DANIEL FLORES MURILLO
ALUMNO

REVISÓ

[Signature]

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

ASESOR

[Signature]

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

LECTORA

[Signature]

M. EN B. NOHEMI LOPEZ RAMIREZ

Agradecimientos

A mis padres por haberme regalado el don de la vida y por su respaldo incondicional.

Al Dr. Ernesto Favela Torres por haber confiado en mí, por su apoyo de índole académico y profesional.

A Nohemi López Ramírez por su enseñanza, amistad y constante apoyo desde el inicio hasta el término de este proyecto, del cual se convirtió en un pilar fundamental.

A la Mtra. Lorena Pedraza Segura por sus observaciones.

A mis amigos y compañeros de la planta piloto cuatro quienes me ayudaron en todo momento desde la forma de arrancar y operar un equipo, hasta sus críticas constructivas y consejos. Especialmente a Goyo, Candi, Kary, Javier, Raziel, Luis Víctor, Alejandra, Oswaldo, Fernando, Laura, Daniela.

Resumen

Se evaluó el crecimiento de una cepa de *G. candidum*, en FMS en reactores estáticos y agitados, se determinó indirectamente por medio de la lectura de producción de CO₂ en línea. En una primera etapa se evaluaron dos medios de cultivo líquido, mediante la comparación de cinéticas de crecimiento. Con el medio WL se obtuvo una concentración celular de 4×10^7 cel/mL, 1.6 veces mayor a la obtenida con el medio mínimo enriquecido con NH₂SO₄.

Posteriormente, se estudió el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *G. candidum* en reactores estáticos en FMS a 28, 30, 32, 34 y 36°C. Se obtuvo un valor promedio de la producción de CO₂ de 47 ± 11.11 mg/gmsi y la tasa máxima promedio de producción de CO₂ para temperaturas fue de 7.3 ± 1.49 mg/gmsi h. En estos parámetros ni en tiempo lag y tasa específica de producción de CO₂ se presentaron diferencias significativas. Por lo tanto, se estableció que los estudios subsecuentes se evaluaran a una temperatura de 30°C, ya que energéticamente es menos costoso comparado con mayores temperaturas.

En una segunda etapa, se realizó una comparación del medio WL con el medio mínimo. En este último se sustituyó el NH₂SO₄ por NaNO₃. Durante el cultivo y al final, el medio WL disminuyó a pH 5 mientras que el medio mínimo se mantuvo en pH 6, por lo que se decidió utilizar este último para los siguientes estudios.

En una siguiente etapa, se estudió el efecto del diámetro en columnas de 1.8, 2.4, 2.7, 3.6 y 4.6 cm de diámetro interior, sobre la acumulación de calor metabólico. A mayor diámetro de columna se presentó mayor acumulación de calor metabólico, obteniendo un aumento de 6°C en la columna de 4.6 cm, así como un mayor valor de tasa máxima de producción de CO₂. Se reportaron valores de 4.5, 6.3 y 9.3 ± 0.35 mg/gmsih para las columnas de 1.8, 2.4 y “2.7, 3.6 y 4.6” cm de diámetro, respectivamente. En el caso de la producción de CO₂, el valor más alto resultó de 140 ± 16.63 mg/gms para las columnas de 2.4 a 4.6 cm diámetro.

Finalmente, se evaluó el efecto de la agitación como una estrategia para contrarrestar el aumento de temperatura en un biorreactor tanque agitado. El valor máximo de la tasa de producción de CO₂, para ambos tipos de biorreactores, fue alrededor de 0.88 mg/gmsi h). Sin embargo, para las columnas, de las 10 a 20 h de incubación, disminuyó exponencialmente. Mientras que, para el reactor agitado, la tasa de producción de CO₂ se mantuvo, de las 10 a 20 h de incubación, en valores cercanos a 0.6 (mg/gmsi h). El reactor agitado presentó acumulación de calor metabólico de hasta 3°C, fluctuó entre 30 y 33°C.

Este es el primer reporte de crecimiento de *G. candidum* en biorreactor agitado en FMS.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Justificación.....	11
3. Hipótesis.....	11
4. Objetivos (general y particulares).....	11
5. Métodos y materiales.....	12
5.1. Microorganismo.....	12
5.2. Conservación de la cepa.....	12
5.2.1. Conservación a corto plazo.....	12
5.2.2. Conservación a largo plazo.....	12
5.3. Propagación del inóculo.....	12
5.4. Soporte.....	13
5.5. Curva estándar.....	13
5.6. Cultivos en medio líquido.....	13
5.6.1. Medio WL modificado.....	14
5.6.2. Medio mínimo.....	14
5.7. Cultivos en medio sólido.....	14
5.7.1. Medio de crecimiento radial.....	14
5.7.2. Cultivos en columnas y reactor agitado.....	14
5.8. Métodos analíticos.....	15
5.8.1. pH.....	16
5.8.2. Humedad.....	16
5.8.3. Actividad de agua.....	16
5.8.4. Glucosa.....	16
6. Resultados y discusión.....	16
6.1. Comparación de cultivos en medio líquido.....	17
6.1.1. Cinética de crecimiento de <i>G. candidum</i> en medio mínimo y medio WL ...	17
6.2. Cultivos en medio sólido.....	17
6.2.1. Estudio de la velocidad radial de crecimiento de <i>G. candidum</i>	17
6.2.2. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de <i>G. candidum</i> en reactores estáticos en FMS.....	18
6.2.3. Comparación de cultivos en medio sólido utilizando medio WL y medio mínimo con NaNO ₃	21
6.2.4. Efecto del diámetro de la columna sobre la acumulación del calor metabólico	23
6.2.5. Efecto de la agitación del reactor sobre el crecimiento de <i>G. candidum</i>	27
7. Conclusión.....	30
8. Bibliografía.....	30

1. Introducción

La fermentación en medio sólido (FMS) implica el crecimiento de microorganismos en partículas sólidas con bajo contenido de humedad, en las que, los espacios entre partículas contienen una fase gaseosa (Berovic y col., 2006). La FMS emerge como una tecnología potencial para la producción de productos microbianos (Tabla 1) tales como, alimentos, biocombustibles, químicos industriales, enzimas, biopesticidas una amplia variedad de metabolitos secundarios y productos farmacéuticos (Pandey, 1999; Figueroa, 2011; Pandey, 2003; Vrije y col., 2001).

La tendencia actual en FMS se ha enfocado en su aplicación para el desarrollo de bioprocesos (Tabla 2) como biorremediación y biodegradación de compuestos peligrosos, desintoxicación de residuos agroindustriales, biotransformación de cultivos y residuos de cultivos para enriquecimiento nutricional y producción de productos de valor agregado como metabolitos secundarios biológicamente activos, como antibióticos, alcaloides; factores de crecimiento para plantas, enzimas, ácidos orgánicos; biopesticidas, incluyendo fungicidas y bioherbicidas, biosurfactantes, biocombustibles, compuestos aromáticos, bioproducción de papel, entre otros. (Pandey, 2003).

Tabla 1. Procesos y productos desarrollados a partir de Fermentación en medio sólido (Prabhakar, 2005).

Proceso/Producto	Sustrato	Microorganismo
Enriquecimiento proteico	Bagazo de yuca Yuca cruda	<i>Rhizopus sp.</i>
Ácido cítrico	Bagazo de yuca	<i>Aspergillus niger</i>
Ácido láctico	Bagazo de caña de azúcar	<i>Rhizopus oryzae</i>
Hongos	Bagazo de yuca	<i>Pleurotus ostreatus</i>
	Residuos de café	<i>Lentinus edodes</i> <i>Flamulina velutipes</i>
Aromatizantes	Bagazo de yuca	<i>Ceratocystis</i>
	Cáscara de café	<i>Rhizopus sp.</i>
Desintoxicación	Cáscara de café	<i>Aspergillus sp.</i>
Biopesticidas	Desperdicio de papa	<i>Bauveria bassiana</i>
Hormonas	Cáscara de café	<i>Gibberella fugikuroi</i>
Goma Xantana	Bagazo de caña de azúcar	<i>Xanthomonas campestris</i>
Cultivo celular de planta	Bagazo de caña de azúcar	<i>Molus prunifolia</i>
Amilasas	Bagazo de caña de azúcar	<i>Rhizopus arrhizus</i>
Proteasas	Pastel de soya sin grasa	<i>Penicillium sp.</i>

Tabla 2. Principales aplicaciones de FMS en diferentes sectores económicos (Sajo, 2011).

Sector Económico	Aplicación	Ejemplos
Fermentación industrial	Producción de enzimas	Amilasas, amiloglucosidasas, celulasas, proteasas, pectinasas, xilanasas, glucoamilasas.
	Productos Bioactivos	Micotoxinas, giberelinas, alcaloides, antibióticos, hormonas.
	Producción de ácidos orgánicos	Ácido cítrico, ácido fumárico, ácido itacónico, ácido láctico.
	Biocombustible	Etanol
	Compuestos misceláneos	Pigmentos, biosurfactantes, vitaminas, Xantana
Industria agroalimentaria	Biotransformación de residuos de cosecha	Alimentos tradicionales fermentados (Koji, sake, ragi, tempeh), enriquecimiento proteico y celular, producción de proteínas, producción de champiñones.
	Aditivos alimentarios	Compuestos aromáticos, colorantes, grasa esencial, ácidos orgánicos.
Control ambiental	Biorremediación y biodegradación de compuestos peligrosos	Residuos cafeinados, pesticidas, bifenilos policlorinados (PCBs).
	Desintoxicación biológica de desperdicios agroindustriales	Pulpa de café, cáscara de yuca, harina de canola, cáscara de café.

La FMS hace uso de residuos agroindustriales como sustratos, considerados desechos, ofreciendo una vía alternativa para la obtención de productos de valor agregado (Figuroa, 2011). Actualmente, con un mejor entendimiento de los aspectos de ingeniería bioquímica; particularmente, sobre el modelamiento matemático y el diseño de biorreactores (fermentadores), es posible escalar los procesos de FMS y se han desarrollado algunos diseños particulares para su comercialización (Pandey, 2003).

La FMS ha sido (Tabla 3) mayormente aplicada para hongos filamentosos, los cuales crecen en la superficie de la partícula y penetran a través de los espacios entre partícula a través de la profundidad del lecho. El proceso, en la mayoría de los casos, es de naturaleza aerobia (Pandey, 2003).

Geotrichum candidum

G. candidum es un hongo que presenta dimorfismo de hongo filamentoso y de levadura, (Hudecová, 2009). Se encuentra en el suelo, agua, leche, productos lácteos, plantas, frutos, en el hombre y otros mamíferos de los cuales ha sido aislado (Kocková-Kratochvílová, 1990). Ha sido sujeto a numerosos estudios bioquímicos y fisiológicos debido a su interés

biotecnológico y su ubicuidad. Resulta importante en la elaboración de quesos pasteurizados con propiedades sensoriales similares a las presentes en los quesos no pasteurizados. También se usa para la producción de enzimas lipolíticas y proteolíticas para el proceso de maduración del queso. *G. candidum*, creciendo en la superficie y dando lugar a el desarrollo de los sabores típicos del queso.

Tabla 3. Principales grupos de microorganismos usados en FMS (Sajo y col., 2011).

Microflora	Proceso FMS
Bacterias	
<i>Clostridium sp.</i>	Ensilado, alimento
<i>Lactobacillus sp.</i>	Ensilado, alimento
<i>Streptococcus sp.</i>	Compostaje
<i>Pseudomonas sp.</i>	Compostaje
<i>Serratia sp.</i>	Compostaje
<i>Bacillus sp.</i>	Compostaje, amilasa
Hongos	
<i>Altemaria sp.</i>	Compostaje
<i>Penicillium notatum, roquefortii</i>	Penicilina, queso
<i>Lentinus edodes</i>	Seta shii-take
<i>Pleurotus oestreatus, sajor-caju</i>	Champiñones
<i>Aspergillus niger</i>	Forraje, proteínas, amilasa, ácido cítrico
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Soya, amilasa, lipasa
<i>Aspergillus oryzae</i>	Koji, alimento, ácido cítrico
<i>Amylomyces rouxii</i>	Yuca, arroz
<i>Beuvaria sp., Metharizium sp.</i>	Control biológico, bioinsecticidas
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Compostaje, degradación de lignina
	Compostaje, alimentación, enzimas, ácidos orgánicos
<i>Rhizopus sp.</i>	Compostaje, alimentación, enzimas
<i>Mucor sp.</i>	Compostaje
<i>Monilia sp.</i>	Compostaje, giberelinas
<i>Fusarium sp.</i>	Compostaje, industrial, alimentación
<i>Aspergillus sp.</i>	
Levaduras	
<i>Endomicopsis burtonii</i>	Yuca de cinta, arroz
<i>Schwanniomyces castelli</i>	Etanol, amilasas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alimentación, etanol

Taxonomía, morfotipos, biotipos y diversidad.

Anteriormente clasificado como hongo filamentoso, *G. candidum* ha sido reclasificado desde hace más de 20 años como levadura. *G. candidum* se encuentra en el límite entre levaduras típicas y hongos filamentosos. Además, entre especies se han descrito dos principales

morfotipos. Uno se caracteriza por tener cepas color crema, hongos pseudo-levaduras, colonias que producen abundantes artrosporas y que generalmente, presentan un ligero crecimiento y baja actividad proteolítica con una temperatura óptima de crecimiento entre 22 y 25°C y con actividad acidificante (Guéguen y Lenoir, 1975; Guéguen y Jacquet, 1982). El otro tipo, forma colonias blancas entrecruzadas con una predominancia de hifas vegetativas y pocas artrosporas, y tiene alta actividad proteolítica, un rápido crecimiento a una temperatura de 25 a 30°C y presenta actividad alcalinizante.

Los métodos de identificación usados para diferenciar entre las cepas de levaduras con importancia industrial se basan, principalmente, en sus propiedades bioquímicas, características morfológicas, o en una combinación de ambas. Los métodos de identificación fenotípica permiten clasificar cepas de *G. candidum* a nivel genético, aunque las cepas puedan ser únicamente identificadas a nivel de especies usando métodos genotípicos (Prillinger et al., 1999).

En lo referente a las condiciones de crecimiento de *G. candidum* se presentan discrepancias entre autores; por ejemplo, Wyder (1998) menciona que puede crecer en un rango de temperatura de 5 a 38°C, con un óptimo de alrededor de 25°C a pH 5.0–5.5, Garrison y Holdar (1961) sugieren que puede crecer en un amplio rango de pH: 3 a 11, de 3.5 a 9 con una importante extensión de fase lag, por arriba de pH 8.5 de acuerdo con Hannan y Boivinet (1983) y por debajo de pH 4.4 de acuerdo con Dale y Guillot (1971). Algunas cepas pueden crecer a pH 3.4 (Hang et al., 1974), aun a pH 2.2 (Butler and Eckert, 1962). Su pH óptimo es alrededor de 5.5–6.0 (Dale y Guillot, 1971; Guéguen et al., 1974; Guéguen, 1984) o de 6.0 a 7.0 (Lecocq, 1991).

El tiempo de generación de *G. candidum* es uno de los menores dentro de los eucariotas, v.g. 1.1 h a 30°C en medio líquido (Trinci, 1972). Sin embargo, *G. candidum* es conocido por su larga fase lag (10 h) así como por alcanzar tiempos de generación de hasta 3.6 h, con una concentración celular máxima de 1×10^6 ufc/g (Wyder, 1998). Estos bajos niveles pueden ser debidos a su habilidad a formar un micelio con una hifa larga que consiste en diferentes números de células, sin embargo, rindiendo únicamente 1 unidad formadora de colonia (ufc) por placa de agar (Wyder, 1998).

Ventajas de la FMS

- Los medios de cultivo son simples, generalmente se emplean subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios. Esto significa que en la FMS el sustrato puede requerir menor pre-tratamiento que en la fermentación en medio líquido (FML).
- La concentración natural del sustrato permite utilizar biorreactores más pequeños, en comparación con los utilizados en la FML. Biorreactores más pequeños significan menores costos. Esto también significa que pueden tener mayor productividad volumétrica.
- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte debido a los espacios inter-partícula, lo que permite una alta transferencia de oxígeno y aire fresco a las delgadas capas de agua en la superficie del sustrato.
- Los procesos de separación o purificación y de disposición de desperdicios son simplificados o minimizados. Varias veces es usado el producto total obtenido de la fermentación, especialmente si tiene por objeto ser empleado como complemento alimenticio. Esto hace que estos procesos puedan ser considerados tecnologías limpias.
- La producción de enzimas degradadoras de carbohidratos es mayor en este tipo de procesos (Nakadai y Nasuno, 1988).
- No se observa represión catabólica o inhibición por productos finales (Shankaranand y col., 1992; Acuña-Argüelles y col., 1995; Montiel-González y col., 2002). Lo que permite el empleo de mayores concentraciones de sustrato (Gautam y col., 2002) y la obtención de productos más concentrados (Robinson y col., 2001).
- Tiene requerimientos energéticos simples como el composteo y los alimentos fermentados tradicionales (koji, quesos, etc.) (Figuroa, 2011).

Desventajas de la FMS

- La FMS está restringida a microorganismos que pueden crecer en reducidos niveles de humedad, y por lo tanto el rango de posibles productos y procesos es más limitado que en FML.
- La remoción del calor metabólico generado durante el crecimiento puede ser un problema, especialmente a grandes escalas.

- La naturaleza sólida del sustrato causa problemas en el monitoreo de parámetros del proceso. Sondeas desarrolladas para procesos de FML son varias veces inadecuadas para FMS. Adicionalmente es difícil garantizar la correcta distribución de cualquier sustancia añadida al proceso, por lo que el control de variables tales como el pH, contenido de humedad y concentración de sustrato es virtualmente imposible.
- La transferencia de masa en la fase sólida es limitada a difusión mientras que en FML la transferencia de masa es facilitada por la agitación del líquido.
- Uno de los mayores problemas de la FMS es que varios de los aspectos básicos científicos y de ingeniería aún están pobremente caracterizados. Mucho del trabajo obtenido a la fecha es cualitativo o empírico debido a las dificultades encontradas en la cuantificación.
- El proceso de fermentación comparado con la FMS es más largo que la FML, debido a las bajas tasas específicas de crecimiento de los microorganismos (Figueroa, 2011).

Las condiciones ambientales tales como temperatura, pH, actividad de agua, niveles de oxígeno y concentración de nutrientes y productos, afectan significativamente el crecimiento microbiano y la formación de productos. Mientras que, en los cultivos agitados sumergidos, el control ambiental es relativamente sencillo debido a las condiciones de homogeneidad de la suspensión de células microbianas y de la solución de nutrientes en la fase líquida.

El bajo contenido de humedad de la fermentación en medio sólido FMS permite que el volumen del biorreactor por masa de sustrato sea más pequeño que en los cultivos sumergidos para el cultivo microbiano y también simplifica la recuperación del producto (Moo-Young y col., 1983). Sin embargo, surgen serios problemas respecto al mezclado, intercambio de calor, transferencia de oxígeno, control de humedad y la localización de gradientes de pH, nutriente y producto, todo esto como una consecuencia de la heterogeneidad del cultivo (Carrizalez y col., 1981; Hesseltine, 1983). Esta última característica de los cultivos sólidos ocasiona que la medición y control de los parámetros antes mencionados sea difícil, laboriosa y varias veces imprecisa, limitando con esto el potencial industrial de esta tecnología (Kim y col., 1985). Debido a estos problemas, los microorganismos que han sido seleccionados para la FMS son más tolerantes a un amplio rango de condiciones de cultivo (Mudgett, 1986).

Un alto contenido de humedad resulta en la disminución de la porosidad del sustrato, lo cual previene la penetración de oxígeno y pudiera provocar contaminación bacteriana. Por el

contrario, una baja humedad puede resultar en una pobre accesibilidad de nutrientes y por consiguiente en bajo crecimiento microbiano (Pandey, 2003).

La aireación del medio sólido húmedo es uno de los factores críticos que gobiernan la productividad ya que no solamente provee O_2 , sino que remueve calor metabólico, productos gaseosos y volátiles de la masa de la fermentación.

La relación de agua en FMS debe de ser críticamente evaluada. Ya que ha sido atribuida como un parámetro fundamental para la transferencia de masa del agua y de los solutos a través de las células microbianas. La actividad del agua (A_w) del sustrato tiene una determinante influencia en la actividad microbiana. Su control, podría ser utilizado para modificar el metabolismo microbiano y favorecer la producción de ciertos metabolitos.

El control del pH por adición de álcali o ácido, que es una práctica común en las fermentaciones sumergidas, es impráctica en la FMS. Puede obtenerse un grado de control del pH en FMS usando diferentes relaciones de sales de amonio y urea en el sustrato. La hidrólisis de la urea libera amoníaco, la cual contrarresta la rápida acidificación que resulta de consumo del ión amonio (Raimbault y Alazard, 1980; Mitchell y col., 1992). Por otro lado, la ausencia del monitoreo y control de varios parámetros, que son de vital importancia para la obtención de una alta productividad en FMS, ha sido, en parte, responsable del abandono de procesos de FMS hasta 1980 en los países europeos y del Oeste. Algunos reportes de procesos de FMS han involucrado el desarrollo de estrategias para la solución de problemas en el monitoreo y control de fermentadores (Saucedo, 1994).

El crecimiento celular de los microorganismos puede ser determinado mediante la medición del cambio de la composición gaseosa en el interior del biorreactor (tasa de consumo de oxígeno y tasa de producción de CO_2). El uso de soportes inertes y medios definidos permite la medición del consumo del sustrato y producción de biomasa (Ooijkaas y col., 2000). El desarrollo microbiano, también puede ser determinado por la digestión del sustrato, el calentamiento, usando luz reflectante, determinación de ADN mediante el nivel de glucosamina y contenido proteico (Pandey, 2003).

El monitoreo y control de los niveles de O_2 y CO_2 en sistemas FMS puede ser logrado a través de la medición de la salida de gases provenientes de los fermentadores. La necesidad de un sistema simple y eficiente para el monitoreo y/o control de estos niveles en FMS es un prerrequisito para la optimización y el escalamiento de los procesos FMS.

Un sistema automatizado para monitoreo en línea de gases provenientes de fermentación aeróbica y anaeróbica en medio sólido es adecuado para el análisis de gases. Ya que, permite la evaluación en tiempo real de diferentes fases de FMS sin dañar el cultivo. Para cultivos aerobios, la tasa de crecimiento específico (μ) puede ser estimada a partir de la medición de CO_2 . Un sistema para el control automático de CO_2 y O_2 de cultivos aerobios en medio sólido puede mantener los cultivos bajo ilimitadas condiciones con respecto al O_2 (Saucedo, 1994). Dos sistemas versátiles para la automatización en línea de monitoreo y control de estos gases en procesos FMS fueron desarrollados por Saucedo y col, 1994. Su diseño se muestra en las figuras 1 y 2.

La generación de calor metabólico, así como la baja conductividad térmica de los sustratos empleados en FMS, provocan el aumento en la temperatura del lecho de fermentación, afectando el metabolismo microbiano global (Saucedo-Castañeda y col., 1990).

Los biorreactores de FMS involucran dos modos de operación: estáticos (de charolas y lecho empacado o columna) y agitados (horizontal, vertical y tambor rotatorio).

Aunque el fermentador de charolas ha sido considerado el tipo de biorreactor de FMS más simple (Pandey y col., 2003; Durand, 2003; Mitchell y col., 1992), y los biorreactores de tambor han sido los más estudiados y utilizados, en los últimos años, se ha puesto más atención en el desarrollo de fermentadores de lecho empacado ya que pueden proveer un proceso económicamente menos costoso y fácil en su manejo (Pandey, 2003). En un biorreactor de lecho empacado la aireación pasa forzada a través del lecho (Pandey, 2003; Figueroa, 2011).

El adecuado diseño del biorreactor que mitigue los efectos de la transferencia de calor y masa, y facilite la de difusión y extracción de metabolitos se ha convertido en el punto de atención. Se han diseñado pocas estrategias para la remoción del calor metabólico durante la fermentación de los lechos de biorreactor empacado (Figueroa, 2011).

Las posibles variaciones en el diseño de biorreactores agitados pueden ser la inclusión de baffles, un cambio periódico del sentido de la agitación, el uso de un tambor con secciones cruzadas no circulares, la inclinación del eje del tambor, la longitud y el diámetro del biorreactor.

Las variables de operación de los biorreactores agitados, pueden ser la carga de sólidos, la velocidad de rotación en un tambor rotatorio, la velocidad de agitación en un reactor de tanque agitado, la frecuencia, la duración y la velocidad de agitación en el caso de rotación

o agitación intermitente. Asimismo, la tasa de flujo, la temperatura, y la humedad de la aireación en los espacios entre partículas, el tiempo de adición de agua, la temperatura del agua de enfriamiento en el caso de un biorreactor enchaquetado. La carga de sólidos es una variable de operación que se determina al inicio de cada corrida (Berovic y col., 2006).

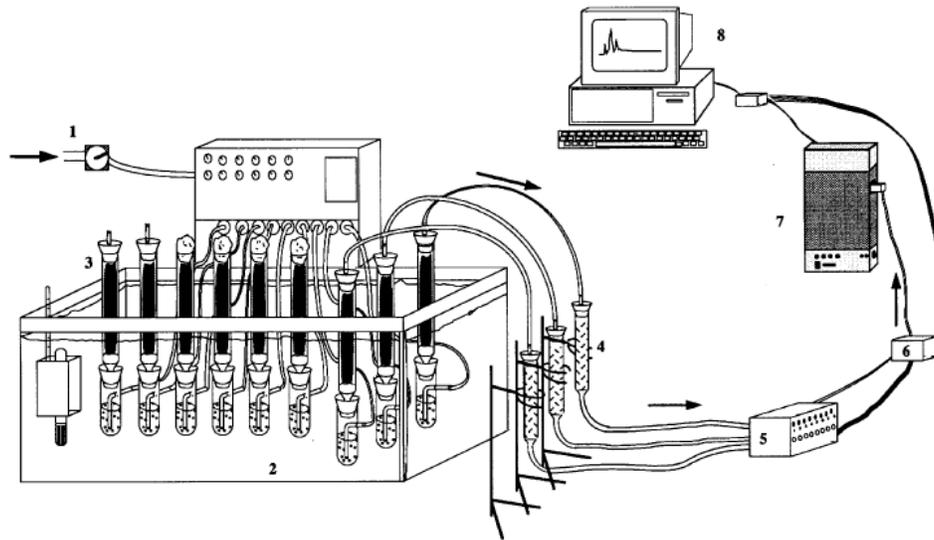


Figura 1. Diagrama de la representación de un sistema prototipo desarrollado para el monitoreo de gases automatizado en línea en FMS. 1: Entrada regulada de aire a presión, 2: baño de agua con control de temperatura, 3: fermentadores de columna, 4: tubo de sílica gel, 5: muestreador de gas, 6: inyector de gas, 7: cromatógrafo de gases, 8: computadora.

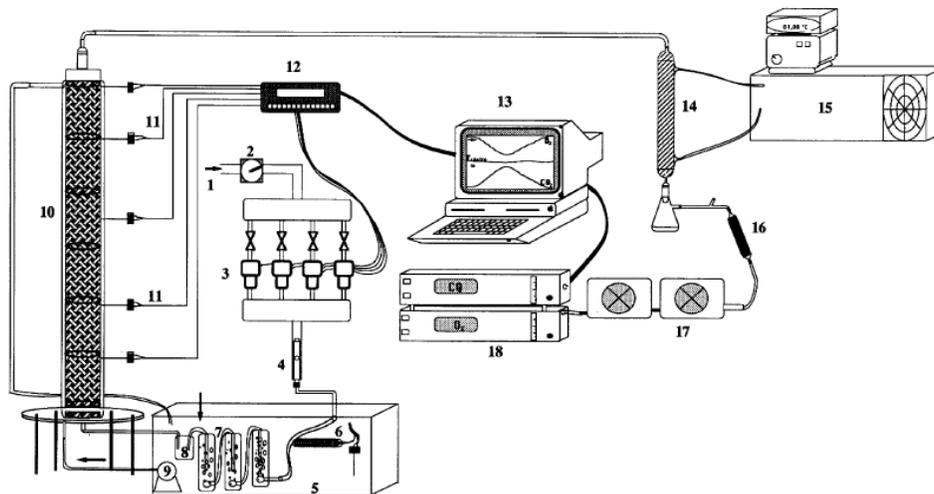


Figura 2. Bosquejo del diagrama de un sistema desarrollado para el monitoreo y control de gases de escape en FMS aerobia. 1: Tubería de aire comprimido, 2: regulador de aire a presión, 3: electro-válvulas, 4: rotámetro, 5: baño de agua con control de temperatura, 6: calentador, 7: columna de humidificador de aire, 8: trampa de agua, bomba para circulación de agua a través de la chaqueta del fermentador, 10: fermentador de columnas segmentado en 6 secciones, 11: sondas de temperatura, 12: interface analógica numérica, 13: computadora, 14: condensador, 15: baño de agua de enfriamiento, 16: tubo con gel de sílica, 17: analizadores de CO₂ y O₂, 18: bombas.

Las variables de diseño y de operación afectan de manera directamente proporcional dependiendo del parámetro de interés, por ejemplo:

La tasa de producción de calor metabólico se verá afectada por la carga del biorreactor, la tasa de aireación y la humedad de la entrada de aire.

La tasa de agitación o rotación, dependiendo el tipo de biorreactor, tendrá un impacto en la producción de calor metabólico y la transferencia de O_2 alrededor del empaque, entre el empaque, los espacios entre partículas y la minimización del daño al microorganismo (Berovic y col., 2006).

Como estrategia para la remoción del calor metabólico, López-Ramírez y col. (2018) demostraron que, mediante el uso de un biorreactor tubular horizontal, equipado con un mecanismo de agitación de doble efecto, conocido como agitación de flujo cruzado, por medio de un sistema de paletas, se puede operar de manera continua a bajas tasas de agitación previniendo la formación de agregados sólidos, el daño celular así como una mejor remoción de calor metabólico y transferencia de CO_2 y O_2 en el sistema.

2. Justificación

La FMS ha sido principalmente usada para hongos filamentosos; sin embargo, los hongos son sensibles a la agitación ya que provoca daños en el micelio. Pero existen pocos estudios de FMS mediante el uso de levaduras, es por ello, el interés de estudiar el crecimiento de *G. candidum* en cultivos estáticos y agitados.

3. Hipótesis

El uso de *G. candidum* en reactores agitados establecerá un antecedente que permitirá la profundización en el estudio de levaduras utilizando este tipo de reactores.

La intensidad y la frecuencia de agitación no tendrán un efecto negativo en el crecimiento de *Geotrichum candidum* mediante biorreactores de FMS.

4. Objetivos

General:

Evaluar el crecimiento de *Geotrichum candidum* en fermentación en medio sólido en reactores estáticos y agitados.

Particulares:

Determinar el crecimiento de *Geotrichum candidum* en medio superficial y líquido.

Determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Geotrichum candidum*.

Determinar el efecto de la geometría del reactor sobre el crecimiento de *Geotrichum candidum*.

Determinar el efecto de la agitación sobre el crecimiento de *Geotrichum candidum*.

5. Métodos y materiales

5.1 Microorganismo

La cepa de *Geotrichum candidum* fue proporcionada por la Mtra. Lorena Pedraza Segura, académica del Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas (ICQ) de la Universidad Iberoamericana Campus Ciudad de México. La cepa fue aislada de materia orgánica de la Central de Abastos de la Ciudad de México.

5.2 Conservación de la cepa

5.2.1 Conservación a corto plazo (Tubos inclinados)

Se realizó sembrando por estría en tubos inclinados con 10 mL de medio agar-papa-dextrosa (PDA). Los tubos se incubaron a 30°C durante 48 h; una vez transcurrido este tiempo se almacenaron a 4°C por un periodo no mayor a 7 días.

5.2.2 Conservación a largo plazo (Criotubos)

Primeramente, se creció *G. candidum* en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio PDA a 30°C durante 48 horas. Transcurridas las 48 h, al matraz se adicionaron 10 mL de tween 80 al 0.05% conteniendo 10 perlas de vidrio con el fin de que éstas actuaran como un medio físico de arrastre de la materia celular al momento de ser agitados. La suspensión fue vertida en un tubo Falcon de 50 mL, al que se agregó una solución de 10 mL de glicerol al 20% y fue agitado para lograr la homogenización. La mezcla fue vertida en un segundo tubo Falcon, evitando que las perlas de ebullición cayeran en éste. Del cual, se tomaron 8 mL que fueron repartidos en 4 criotubos que se almacenaron a -20°C.

5.3 Propagación del inóculo

El inóculo se obtuvo como se describe a continuación. Se prepararon dos tubos inclinados con medio PDA, una vez solidificado el PDA, se adicionó una cuenta de cerámica en cada tubo proveniente de uno de los criotubos (5.2.2). Los tubos inclinados se incubaron a 30°C durante 48 horas. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de agua destilada con 10 perlas de vidrio (estéril) a uno de los tubos inclinados previamente inoculado con *G. candidum*. Se agitó el tubo hasta lograr la suspensión de las levaduras. Una vez lograda la suspensión, se agregó la misma al segundo tubo inclinado. De la suspensión obtenida (inóculo) se utilizaron 0.5 mL para inocular los diferentes tipos de medios (matraces con medio PDA, medio mínimo o medio WL modificado) dependiendo del estudio realizado.

5.4 Soporte

Para los estudios de FMS se utilizó aserrín de pino marca “Multiusos” obtenido en tiendas comerciales el cual, fue tratado mediante el siguiente procedimiento:

- 1) El aserrín fue tamizado en mallas número 6 y 40. Se ocupó el aserrín que pasó por la malla 6 y se retuvo en la 40. El tamaño de partícula utilizado fue de 0.42 a 3.3 mm.
- 2) Se sometió a un prelavado utilizando agua fría, en seguida fue lavado con agua caliente. Por último, con el fin de secarlo, fue esparcido en charolas de acero inoxidable y expuesto a radiación solar. Para un secado más rápido se removió el aserrín durante 2 minutos por intervalos de media hora. Cuando las condiciones climatológicas no fueron favorables, se utilizó un secador de charolas a 60°C durante 48 horas.

5.5 Curva estándar

Con la finalidad de determinar la concentración celular contenida en una suspensión se realizó una curva estándar de absorbancia (Abs) vs concentración celular (Células/mL).

- 1) En 10 matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio PDA se adicionaron 0.5 mL de suspensión de *G. candidum* (sección 5.5), los matraces fueron agitados de manera vigorosa en 3 ocasiones para favorecer la dispersión de la suspensión en cada matraz.
- 2) Se numeraron del 1 al 5 por duplicado y se incubaron a 30°C durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas respectivamente. Una vez retirados del cuarto de temperatura controlada, los matraces se pusieron en refrigeración (4°C).
- 3) Se extrajeron las células del agar añadiendo a cada matraz 10 mL de agua destilada, con ayuda de un agitador magnético y una parrilla de agitación, se agitó durante un minuto hasta remover toda la biomasa de la superficie del agar.
- 4) De la suspensión de células obtenida se realizaron diluciones 1:5 y 1:25 para hacer el conteo de células en la cámara de Neubauer y medir la densidad óptica (D.O.) a 600 nm.

5.6 Cultivos en medio líquido

Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio estéril (Medio WL modificado y medio mínimo). El tamaño de inóculo fue de 10% v/v. Los matraces se incubaron 48 h a 30°C y 150 rpm. Se siguió el siguiente procedimiento:

- 1) La cinética en medio mínimo se corrió por duplicado con tiempos de muestreo a las 0, 7, 24, 32, 48 y 56 h, cada unidad experimental fue usada para análisis.
- 2) El volumen contenido en los matraces Erlenmeyer de 125 mL fue vertido, por separado, en tubos Falcon de 50 mL, éstos se centrifugaron a 3,750 rpm durante 20 min a 20°C, el sobrenadante fue separado y refrigerado. El precipitado fue lavado con 30 mL de agua destilada y nuevamente centrifugado. El sobrenadante obtenido fue desechado y la biomasa suspendida en 30 mL de agua y refrigerada.
- 3) Las suspensiones se prepararon en tubos de ensaye diluciones 1:3 y 1:9.
- 4) Se tomó la lectura en el espectrofotómetro a 600 nm.
- 5) Se midió el pH.
- 6) Para el medio WL, el muestreo se realizó durante 72 h de cultivo. La cinética se corrió siguiendo la metodología descrita en los párrafos previos.

5.6.1 Medio WL modificado

Para determinar la cinética de crecimiento de *G. candidum* se tomó como base el Medio WL (Wallerstein Laboratories Medium). En su composición original el medio WL contiene, además de los compuestos mencionados en la Tabla A2, agar-agar, cloruro de potasio, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, cloruro férrico, sulfato de manganeso y verde de bromocresol (Tabla A1).

5.6.2 Medio mínimo

El medio mínimo que se muestra en la Tabla A2, fue sugerido por la Mtra. Pedraza como el óptimo para el crecimiento de ésta cepa.

5.7 Cultivos en medio sólido

5.7.1 Medio de crecimiento radial

Se creció *G. candidum* en cajas Petri de 90 mm de diámetro que contenían 30 mL de medio PDA en tubos inclinados.

5.7.2 Cultivos en columnas y reactor agitado

Los cultivos en medio sólido fueron realizados en aserrín de pino impregnado con medio de cultivo líquido (sección 5.6). Se utilizaron 140 mL de medio por cada 84 g de aserrín hasta obtener una humedad inicial cercana al 60% (p/p).

Se utilizaron dos tipos de biorreactores: columnas y reactor de tanque agitado, que fueron descritos por López-Ramírez (2014) como:

- 1) Biorreactor tubular vertical (BRTV): son columnas de vidrio de 2.3 cm a 4.5 cm de diámetro y 20 cm de altura, cuentan con entrada y salida de aire. Estos se incubaron en un baño con agua a temperatura controlada o en un cuarto de incubación a 30°C.
- 2) Biorreactor tubular horizontal agitado (BRTH): biorreactor de 6 L de capacidad, equipado con un sistema de agitación de flujo cruzado, chaqueta de enfriamiento, entrada y salida de aire, cuatro termopares (colocados en la pared del biorreactor y en la entrada y salida de aire) y un puerto para muestreo, carga y descarga del biorreactor. El biorreactor tiene un mecanismo de agitación de doble efecto, conocido como agitación de flujo cruzado. Cuatro engranes, generan el movimiento de los agitadores. El sistema de agitación permite la mezcla de la materia sólida húmeda con movimientos en el sentido y contrasentido de las manecillas del reloj, considerando una vista lateral del biorreactor. El sistema de paletas ejerce movimiento ascendente mientras que las fuerzas centrales ejercen movimiento descendente (López-Ramírez y col., 2018).

Para definir el periodo de agitación del biorreactor, se calculó el valor de tiempo de duplicación a partir de la tasa específica de producción de CO₂ (López-Ramírez, 2014). Con base en lo anterior, la velocidad de agitación en el biorreactor fue de 3 rpm con una frecuencia de 2 min/h.

5.8 Métodos analíticos

Los métodos analíticos se realizaron sobre las muestras obtenidas en cada ensayo. En la mayoría de los estudios las muestras se tomaron al final del cultivo. En el caso de los estudios donde se realizaron cinéticas de crecimiento, las muestras fueron tomadas en cada uno de los tiempos de muestreo. En todos los casos las muestras fueron tratadas como se describe a continuación. Inmediatamente después de la toma de muestra, la columna y la muestra del reactor agitado se mantuvieron a 4°C durante 30 minutos para detener el metabolismo microbiano. Previa a la realización de los análisis que se describen a continuación, las muestras fueron homogenizadas por medio de una espátula o bien por agitación de la bolsa en las que fueron contenidas las muestras.

- 1) Fueron montadas 5 peceras a 28, 30, 32, 34 y 36°C cada una con dos columnas.
- 2) La lectura del metabolímetro se tomó a las 41 h, hasta que se registró la mayor producción de CO₂.

3) Se realizó una réplica en el tiempo, la lectura del metabolómetro se tomó a las 21 horas.

5.8.1 pH

Se midió sobre 1 g de materia húmeda con 10 mL de agua utilizando un potenciómetro Conductronic pH 120, previamente se calibró el electrodo con soluciones buffer estándar (J.T. Baker) a pH 7 y pH 4.

5.8.2 Humedad

Se midió la humedad sobre la materia húmeda homogenizada, donde se colocaron más de 0.5 g en una termobalanza marca OHAUS modelo MB 45 a una temperatura de 130°C.

5.8.3 Actividad de agua

La actividad de agua (a_w) se midió sobre aproximadamente 1 g de materia húmeda previamente homogenizada, utilizando un medidor de actividad de agua Aqualab modelo CX-2 calibrado con agua destilada a un valor de 1.

5.8.4 Glucosa

La glucosa se determinó mediante un kit enzimático de glucosa (Glucose-LQ SPINREACT) donde, a 1 mL del reactivo Glucose-LQ se le adicionaron 0.1 mL de extracto (los cuales fueron obtenidos a partir de la adición y agitación de 10 mL de agua destilada a 1 g de muestra húmeda), se incubó a temperatura ambiente durante media hora y finalmente determinó la absorbancia a una longitud de 505 nm, en un equipo Shimadzu modelo UV-1800.

6. Resultados y discusión

Inicialmente, se evaluaron dos medios de cultivo líquido, el medio WL y medio mínimo con NH_2SO_4 , mediante la comparación de cinéticas de crecimiento. Asimismo, se creció *G. candidum* en medio sólido. Los medios de cultivo, previamente evaluados en cultivo líquido también fueron evaluados en medio sólido. Se determinó la velocidad radial de crecimiento en medio sólido.

Posteriormente, se estudió el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *G. candidum* en reactores estáticos en FMS y el efecto del diámetro de la columna sobre la acumulación de calor metabólico.

Finalmente, se estudió el efecto de la agitación del reactor sobre el crecimiento de *G. candidum*.

6.1 Comparación de cultivos en medio líquido (FML)

Para establecer el crecimiento de *G. candidum* se evaluaron dos medios de cultivo (mínimo y WL) en FML.

6.1.1 Cinética de crecimiento de *G. candidum* en medio mínimo y medio WL

La máxima concentración celular en el medio WL fue 1.6 veces mayor que la obtenida en el medio mínimo (Fig. 3), manteniéndose prácticamente constante durante casi 40 h de incubación.

6.2 Cultivos en medio sólido

6.2.1 Estudio de la velocidad radial de crecimiento de *G. candidum*

G. candidum presentó una velocidad radial de crecimiento de 6.3 cm/día, cercana a la reportada por Wurzel y Becker (1990) para *I. Obliquus* (6.0 cm/día). Sin embargo, la velocidad radial de *G. candidum* obtenida en este estudio es 1.5 veces mayor que la reportada por Hudecová y col. ((2009) Tabla 4). Por su parte, Hudecová y col. (2009) utilizando agar leche, obtuvieron una velocidad radial menor a la obtenida en este trabajo.

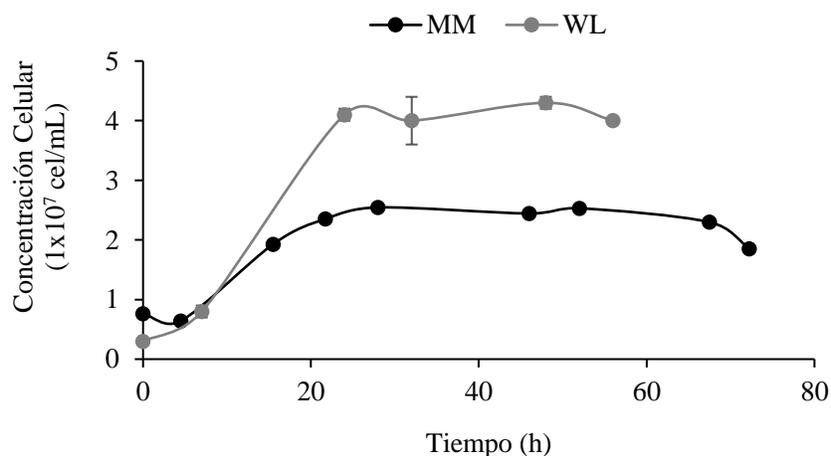


Figura 3. Concentración celular (cel/mL) de *G. candidum* por hora para medio mínimo y medio WL con pH final de 2.35 y 4.68 respectivamente.

Tabla 4. Velocidad radial de *G. candidum* con otros microorganismos.

Microorganismo	Velocidad radial (cm/día)	Referencia
<i>G. candidum</i>	4.5	Hudecová y col., 2009
<i>Ampelomyces sp.</i>	3.4	Griffin, 1994
<i>Inonotus obliquus</i>	6.0	Wurzel y Becker, 1990
<i>G. candidum</i>	6.3 ± 0.86	Este trabajo

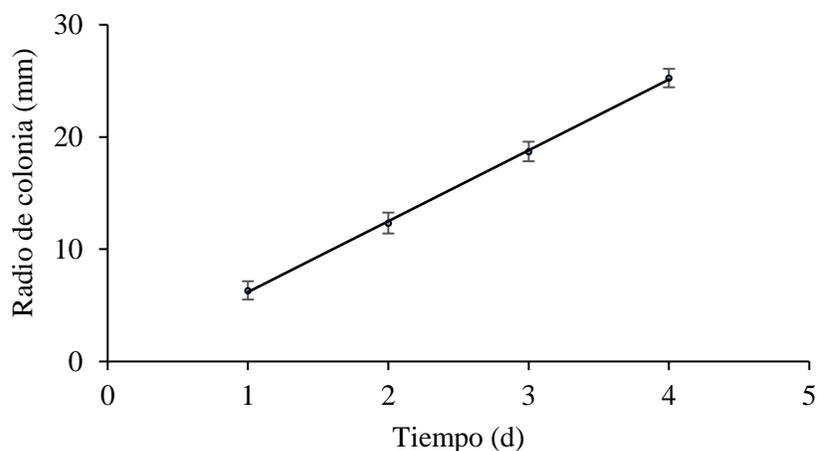


Figura 4. Tasa de crecimiento radial promedio de *G. candidum* en mm por día.

6.2.2 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *G. candidum* en reactores estáticos en FMS

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *G. candidum*; para ello, se realizaron cultivos en medio sólido con aserrín como soporte inerte e incubando a diferentes temperaturas. Para evitar acumulación de calor metabólico se usaron columnas de 2.4 cm de diámetro incubadas en baños con agua con temperatura constante, como fuente de nitrógeno se utilizó NH_2SO_4 .

El tiempo lag promedio resultó de 7.2 ± 0.81 horas para temperaturas de cultivo de 28 a 36°C , no se presentó diferencia significativa (Fig. 5a). Sin embargo, fue en promedio, al menos, 2 h menor al tiempo lag reportado por Wyder (1998). Asimismo, la tasa máxima promedio de producción de CO_2 para temperaturas de 28 a 36°C fue 7.3 ± 1.49 mg/gmsi h, la mayor tasa fue de 9 mg/gmsi h a 32°C . Sin embargo, no se muestra diferencia significativa con respecto a los 8.5 ni a los 8 mg/gmsi h obtenidos a 30 y 34°C y a 28 y 36°C , respectivamente (Fig. 5b). La producción de CO_2 promedio, resultó con un valor de 47 ± 11.11 mg/gmsi. Aunque la mayor se obtuvo a los 36°C , no se observa diferencia significativa (Fig. 5c).

El valor promedio de la tasa específica de producción de CO_2 de *G. candidum*, en un rango de temperaturas de 28 a 36°C fue de 0.63 ± 0.14 h^{-1} . La tasa específica de producción de CO_2 de *G. candidum* a 32°C fue de 0.7 h^{-1} (Fig. 5d) casi el doble al reportado por Trinci (1971) para *G. lactis* a 25°C de 0.35 h^{-1} (Tabla 5). Esto quiere decir que la cepa de *G. candidum* utilizada en este trabajo creció más rápido al utilizar medio mínimo y aserrín de pino como soporte en comparación con el medio DM utilizado por Trinci (1971). Esto se puede atribuir a la diferencia como especies del género *Geotrichum*, así como a diferentes medios de cultivo

(los reportados en la literatura se crecieron en medio líquido) y temperaturas de incubación. En comparación con las tasas específicas de crecimiento de otros microorganismos, los valores obtenidos en este trabajo son al menos del doble (Tabla 5). Al igual que en los parámetros anteriores tampoco se presentó diferencia significativa en la tasa específica de producción de CO₂.

Tabla 5. Tasa específica de crecimiento (h⁻¹) reportadas en la literatura (medio líquido).

Microorganismo	Tasa específica de producción de CO ₂ (h ⁻¹)	T (°C)	Referencia
<i>Geotrichum lactis</i>	0.353	25	Trinci, 1971
<i>Aspergillus wenti</i>	0.147	25	Trinci, 1971
<i>Aspergillus niger</i>	0.119	25	Trinci, 1971
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.164	25	Trinci, 1971
<i>Neurospora crassa</i>	0.353	30	Zalokar, 1959
<i>Geotrichum candidum</i>	0.72 ± 0.10	32	Este trabajo

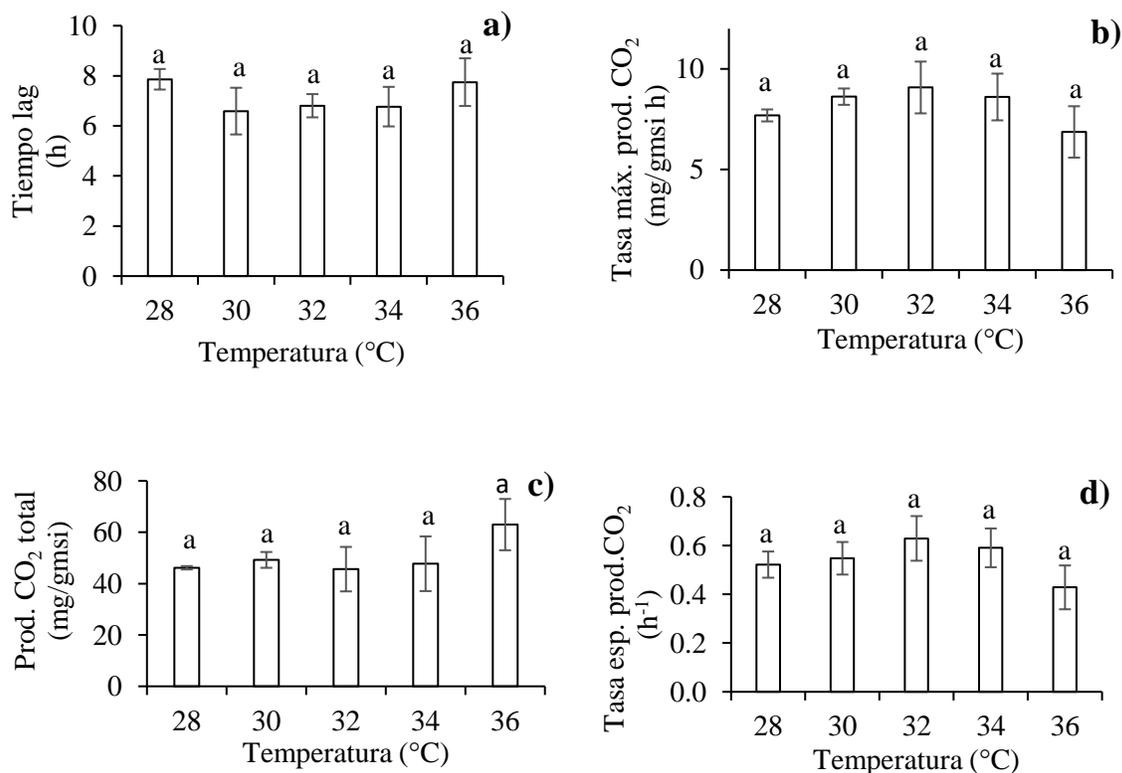


Figura 5. Variables de crecimiento de *G. candidum* evaluadas a diferentes temperaturas de incubación (28, 30, 32, 34 y 36°C en cultivo sólido durante 41 h. a) Tiempo lag. b) Tasa máxima de producción de CO₂. c) Producción de CO₂ total. d) Tasa específica de producción de CO₂.

Por consiguiente, estos resultados nos indican que *G. candidum* creció en un rango de temperaturas de 28 a 36°C no habiendo diferencias significativas en términos de tiempo lag, tasa máxima de producción de CO₂, producción total de CO₂ y tasa específica de producción de CO₂. Esta información concuerda con lo reportado por Wyder (1998) donde se menciona que *G. candidum* puede crecer en un amplio rango de temperaturas (5 a 38°C).

En la tabla 6 se muestran los valores de pH, actividad de agua (a_w) y humedad de las muestras iniciales y finales de la fermentación. El pH es el parámetro que cambió considerablemente en las temperaturas estudiadas (28 a 36°C), ya que disminuyó a valores de hasta 2.6. La actividad de agua (a_w) aumentó ligeramente en todas las temperaturas con valores de 0.005 a 0.008. La humedad presentó una mayor variación que los de la a_w , disminuyó en las temperaturas de 28 a 34°C de 62.19 ± 2.21 inicial a valores entre 60.99 ± 1.68 a 58.89 ± 0.34 , a excepción de los 36°C, temperatura en la que aumentó la humedad de 62.19 ± 2.21 inicial a 63.51 ± 6.64 .

Con base en lo mencionado en los párrafos previos, al no haber diferencia significativa en los parámetros evaluados (tiempo lag, tasa máxima de producción de CO₂, producción de CO₂ y tasa específica de producción de CO₂) en un rango de temperaturas de 28 a 36°C, se estableció que los estudios subsecuentes se evaluaran a una temperatura de 30°C, ya que energéticamente es menos costoso comparado con mayores temperaturas.

Tabla 6. Efecto de la temperatura de incubación sobre los valores finales de pH, a_w y humedad en cultivos en FMS.

T (°C)	pH	a_w	Humedad
T ₀	5.9 ± 0.20	0.983 ± 0.000	62.19 ± 2.21
28	2.67 ± 0.01	0.991 ± 0.002	58.89 ± 0.34
30	2.75 ± 0.01	0.991 ± 0.000	59.84 ± 2.88
32	2.78 ± 0.01	0.988 ± 0.002	60.81 ± 2.36
34	2.68 ± 0.12	0.990 ± 0.001	60.99 ± 1.68
36	2.58 ± 0.11	0.992 ± 0.001	63.51 ± 6.64

T₀: Tiempo inicial.

Además, los valores de pH obtenidos al final de cada cultivo fueron 3 veces menor que el pH ajustado inicialmente, éste pudo haber sido un factor importante por el cual no haya habido diferencias significativas en parámetros de CO₂ evaluados, por esta razón se decidió evaluar

un medio de cultivo variando la fuente de nitrógeno. En lugar del NH_2SO_4 se propuso utilizar NaNO_3 con la finalidad de mantener un pH similar al inicial.

6.2.3 Comparación de cultivos en medio sólido utilizando medio WL y medio mínimo con NaNO_3

- 1) Se utilizó el medio WL modificado y en el medio mínimo se ocupó como fuente de nitrógeno NaNO_3 en lugar de NH_2SO_4 .
- 2) Se tomó muestra por duplicado a las 8, 12 y 21 horas.

En la figura 6 se puede observar que con el medio definido de NaNO_3 el pH se mantuvo constante (pH 6) durante las 21 h del cultivo. Durante las primeras 10 h de haber iniciado el cultivo, el pH del medio WL disminuyó de pH 6 a pH 5 el cual, se mantuvo en este valor hasta el término del cultivo a las (21 h). En ambos casos el pH obtenido se asemeja al pH óptimo de 5.5 a 7 reportado, por Dale y Guillot (1971), Guéguen et al. (1974) y Lecocq (1971). En la Figura 7a se observa que el medio de cultivo WL presentó una fase lag de 4.5 horas, resultó 2.5 h menor al enriquecido con NaNO_3 que, al igual que el tiempo promedio en un rango de temperaturas de 28 a 32°C, fue de 7 horas (Fig. 7a). La tasa específica de producción de CO_2 del medio mínimo (0.4 h^{-1}) resultó 1.5 veces mayor en comparación con la del medio WL (0.6 h^{-1}) (Fig. 7b).

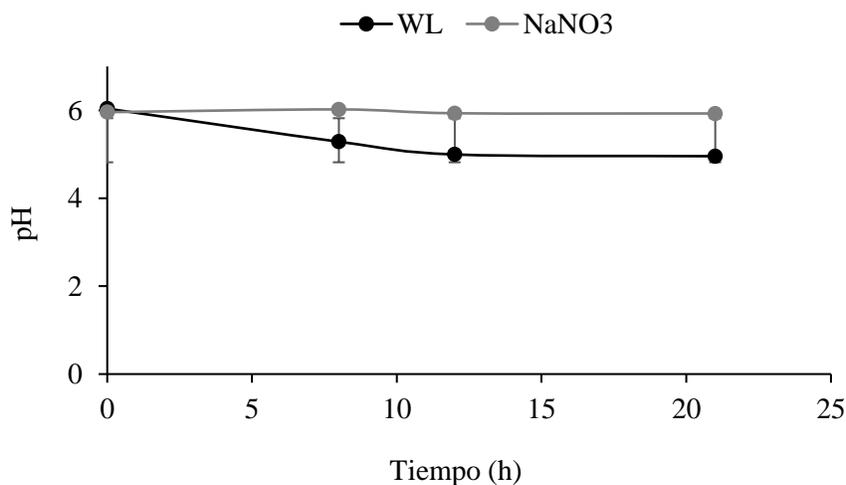


Figura 6. Efecto del medio de cultivo (WL y medio mínimo NaNO_3) sobre el pH en función del tiempo.

La tasa máxima de producción de CO_2 del medio WL (8.5 mg/gmsi h) obtuvo un valor mayor a 4 veces, comparados con los 2 mg/gmsi h obtenidos con el medio enriquecido con NaNO_3 (Fig. 7c). Asimismo, como se muestra en la Figura 7d, la producción total de CO_2 fue mayor,

cercano al doble, en el medio WL (85 mg CO₂/gmsi) que en el medio con NaNO₃ (45 mg CO₂/gmsi). Esto quiere decir que a pesar de que el crecimiento fue más rápido con el medio enriquecido con NaNO₃ considerando la tasa específica de producción de CO₂, el crecimiento en general fue mayor con el medio WL, probablemente al medio mínimo le faltó más tiempo de incubación, ya que el tiempo lag fue mayor, lo que pudo haber retrasado el cultivo.

Sin embargo, los resultados de glucosa residual mostraron que el medio definido (NaNO₃) comenzó con 150 mg/gmsi y el medio WL con 120 mg/gmsi, como se observa en la Figura 8, hasta las 9 h de iniciado el cultivo, ambos medios presentaron un consumo decreciente constante.

Después de las 9 h, la glucosa residual del medio WL se encontró en 90 mg/gmsi, y permaneció constante hasta las 21 h, es decir no hubo consumo. La glucosa residual del medio con NaNO₃, a las 9 h se encontró en 70 mg/gmsi. Por consiguiente, se mantuvo la relación cercana a las 1.3 veces de mayor cantidad de glucosa para el medio con NaNO₃ con relación al medio WL desde que se inició el estudio.

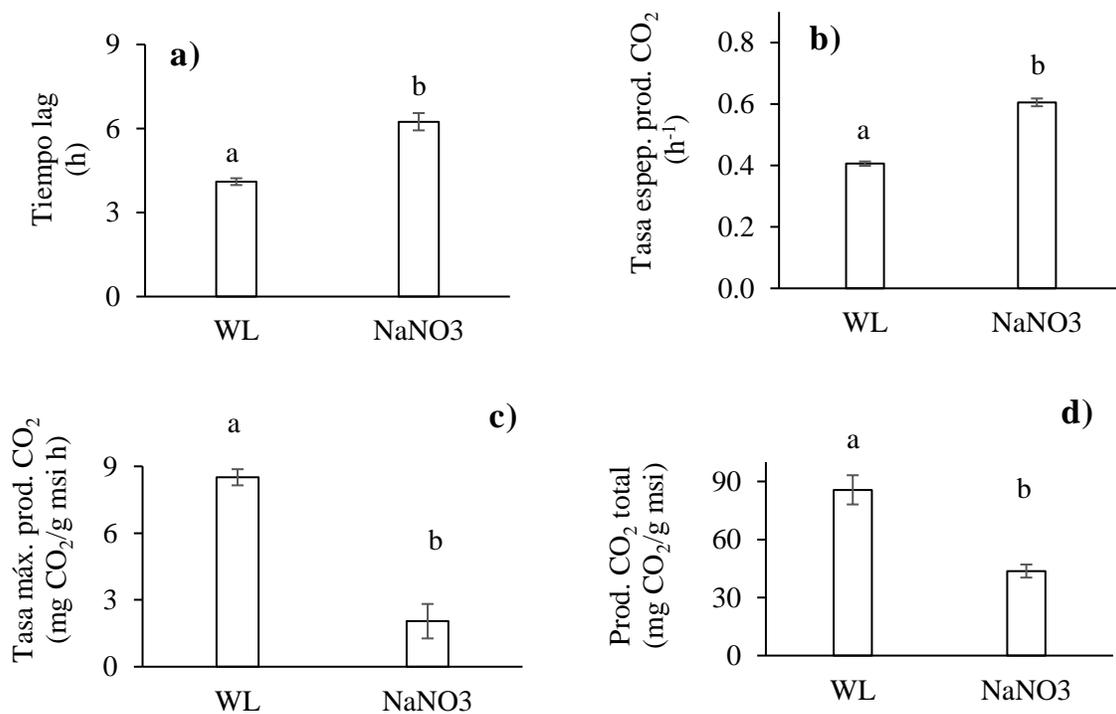


Figura 7. Variables de crecimiento de *G. candidum* evaluadas en medio sólido utilizando medios WL y mínimo con NaNO₃. a) Tiempo lag. b) Tasa específica de producción de CO₂. c) Tasa máxima de producción de CO₂. d) Máxima producción de CO₂.

Sin embargo, al final de cultivo (21h) con el medio WL el consumo de glucosa continuó con la tendencia decreciente hasta un valor de glucosa residual de 13 mg/gmsi (Fig. 8) teniendo un consumo del 89% por otro lado para el medio mínimo el consumo sólo fue del 40%.

Con base en los resultados obtenidos en esta sección, se mostró que *G. candidum* tuvo una mejor asimilación de glucosa con el medio WL el cual se reflejó en un mayor crecimiento (Fig. 7d). Sin embargo, para los estudios posteriores se decidió utilizar el medio mínimo enriquecido con NaNO_3 que mantuvo un pH más estable que el medio WL y considerablemente mejor que el medio mínimo con NH_2SO_4 , como fuente de nitrógeno.

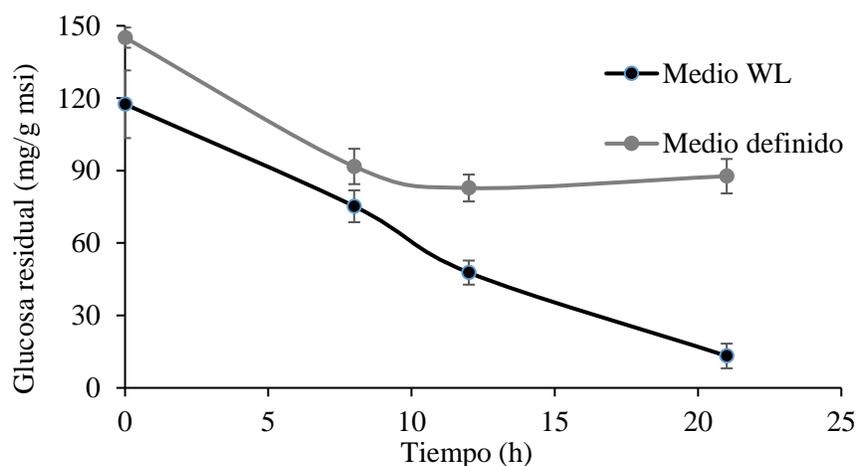


Figura 8. Glucosa residual en función del tiempo (h) en los medios WL y mínimo con NaNO_3 .

Una vez determinado el medio de cultivo y la temperatura que favoreciera el crecimiento se decidió evaluar el tamaño del reactor, ya que como se ha mencionado, uno de los principales inconvenientes de la FMS es la acumulación de calor metabólico, este resulta un factor importante ya que se espera que conforme se aumenta el tamaño del biorreactor de la misma manera lo harán los gradientes de temperatura.

6.2.4 Efecto del diámetro de la columna sobre la acumulación de calor metabólico

Una vez determinado el efecto de la temperatura de incubación sobre los parámetros asociados al crecimiento de *G. candidum*, se evaluó el efecto del diámetro del biorreactor tubular; para ello:

- 1) Se empacaron proporcionalmente las columnas, de diámetro interior 1.8, 2.4, 2.7, 3.6 y 4.6 cm, respetando la altura de empaque de 11 cm, la humedad del 65% (Fig. 9).
- 2) Se dispusieron 3 columnas por diámetro, dos fueron conectadas al metabolímetro para medir la respirometría, a la columna restante, por diámetro, se le colocaron dos

termopares uno a los 0 cm del empaque de la columna y el segundo a 9 cm del empaque, ambos de forma axial (Figs. 10a y 10b).

3) Las 15 columnas fueron incubadas en atmósfera gaseosa a 30°C durante 35 h.

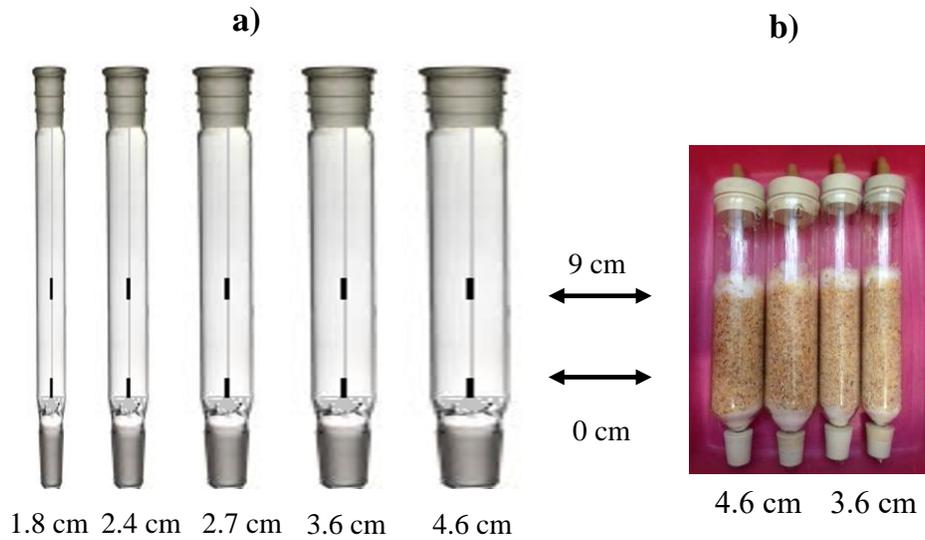


Figura 9. Altura de colocación del termopar a 0 cm y 9 cm en columnas. a) Representación de columnas con un diámetro de 1.8 a 4.6 cm. b) Columnas de 4.6 y 3.6 cm, empacadas con aserrín de pino e inoculadas con *G. candidum*.

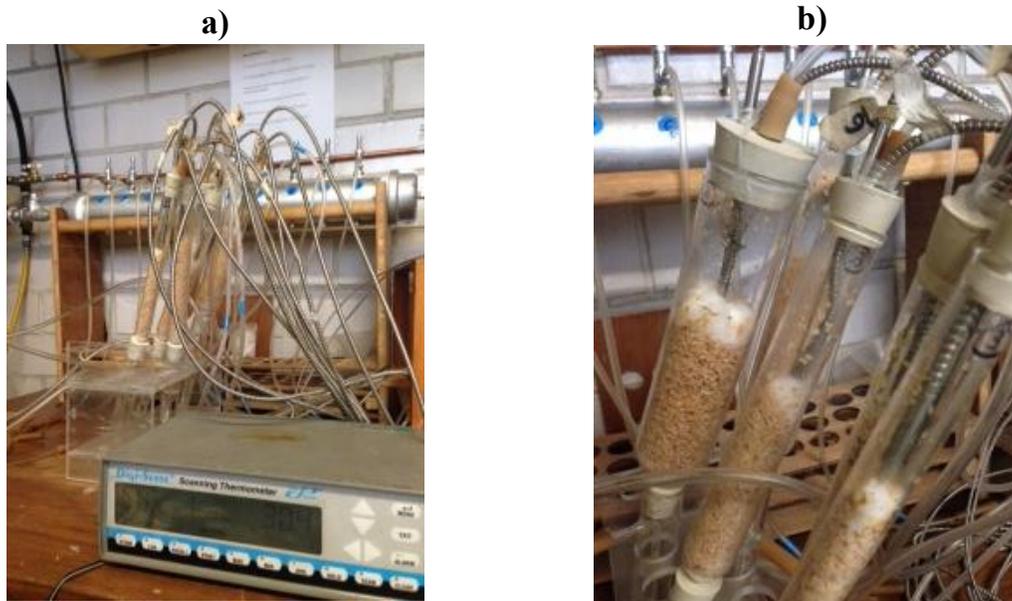


Figura 10. Incubación de columnas, en atmósfera gaseosa, con termopares a 0 y 9 cm. a) Columnas con termopares y medidor de temperatura en línea. b) Columnas con termopares (acercamiento).

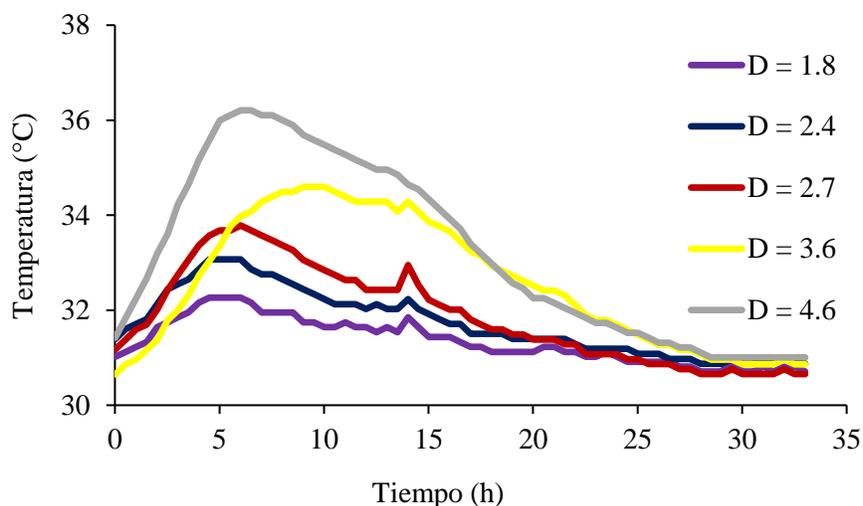


Figura 11. Perfil de temperaturas obtenido con un termopar colocado a una altura de 0 cm en columnas con un diámetro de 1.8 a 4.6 cm.

Como se observó en los perfiles de temperaturas (Fig. 11) a mayor diámetro de columna se presentó mayor acumulación de calor metabólico, obteniendo un aumento de 6°C en la columna de mayor diámetro (4.6 cm). En todos los casos, la máxima temperatura se obtuvo a las 5 h de haber iniciado el cultivo, a excepción de la columna de 3.6 cm de diámetro que se presentó a las 8 h.

En términos generales, el tiempo lag resultó inversamente proporcional en función del diámetro de columna, a mayor diámetro menor tiempo lag, con valores de 4.5 ± 0.07 , 2.5 ± 0.59 y 2 ± 0.40 h (Fig. 12a). A diferencia de los estudios del “Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *G. candidum* en reactores estáticos” y “Comparación de cultivos en medio sólido utilizando medio WL y medio mínimo con NaNO_3 ”, para el caso del NaNO_3 el tiempo lag resultó 2.5 h menor con respecto a la columna de 1.8 cm de diámetro, 4.5 h menor en comparación con las columnas de diámetro “2.4, 2.7 y 3.6 cm” y 5 h menor con respecto a las columnas de diámetro “2.7, 3.6 y 4.6 cm”. Con relación al medio WL también fue menor, de 1.5 h a 2 h para las columnas de diámetros “2.4, 2.7, 3.6 y 4.6 cm” a excepción de la columna de menor diámetro (1.8 cm) que resultó 0.5 h mayor con valores decrecientes. Los valores obtenidos de tasa específica de producción de CO_2 resultaron directamente proporcionales al tamaño de diámetro de columna, a mayor diámetro de columna mayor tasa específica de producción de CO_2 , resultaron con valores de 0.21 ± 0.026 y 0.25 ± 0.02 h^{-1} (Fig. 12b), es decir de poco menos de la mitad de lo obtenido para el medio WL (0.4 h^{-1}) y cercano a la tercera parte comparado, en primer lugar, con el medio con NaNO_3 (0.6 h^{-1}) y

en segundo lugar, en un rango de temperaturas de 28 a 36°C (0.63 h⁻¹). Los valores de tasa máxima de producción de CO₂, presentaron un resultado similar a los de tasa específica de producción de CO₂. A mayor diámetro de columna se obtuvo un mayor valor de tasa máxima de producción de CO₂. Sin embargo, el análisis estadístico indica que no existe diferencia significativa entre las columnas de “2.7, 3.6 y 4.6 cm”. Se reportaron valores de 4.5, 6.3 y 9.3 ± 0.35 mg/gmsi h para las columnas de 1.8, 2.4 y “2.7, 3.6 y 4.6” cm de diámetro, respectivamente (Fig. 12c). En el caso de la producción de CO₂, el valor más alto resultó de 140 ± 16.63 mg/gms, se obtuvo para las columnas de 2.4 a 4.6 cm, las de mayor diámetro, que no presentaron diferencia significativa. Por consiguiente, son las óptimas para el crecimiento de *G. candidum* (Fig. 12d).

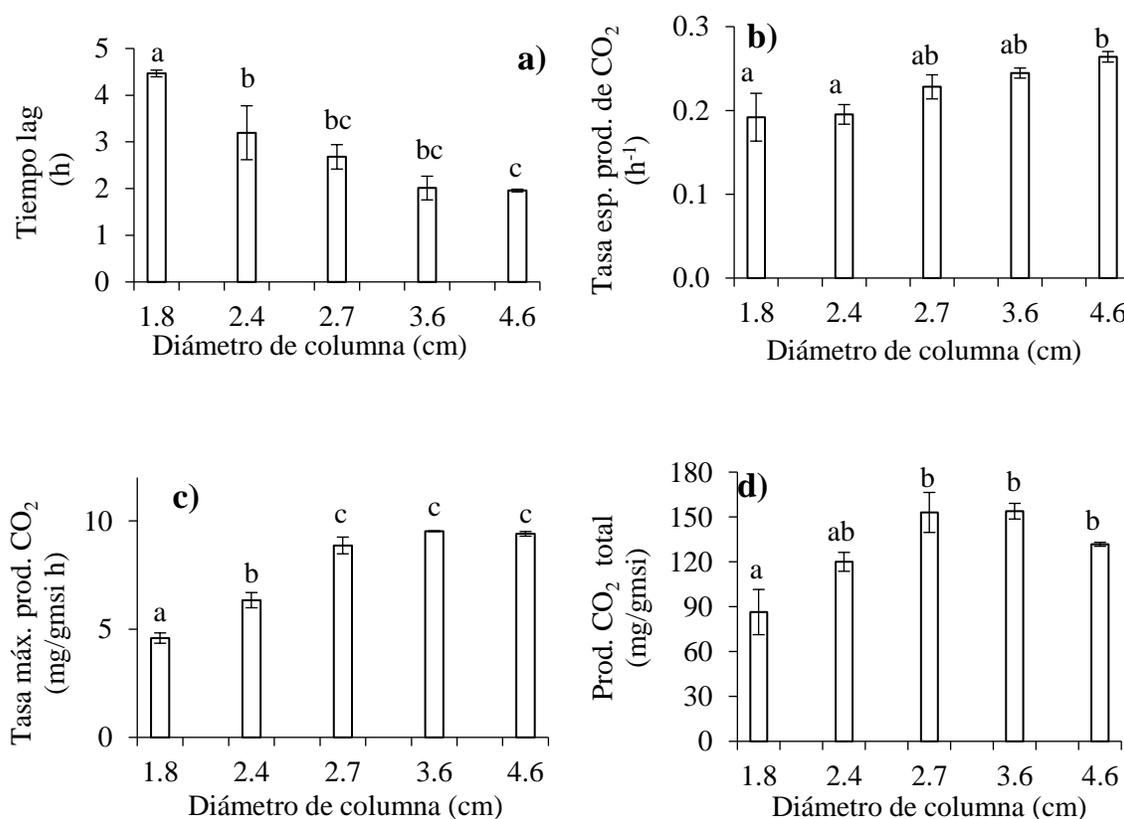


Figura 12. Comparación de variables de crecimiento de *G. candidum* en función del diámetro de columna (cm). a) Tiempo lag. b) Tasa específica de producción de CO₂. c) Tasa máxima de producción de CO₂. d) Producción total de CO₂.

En comparación con los estudios “Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *G. candidum* en reactores estáticos” y “Comparación de cultivos en medio sólido utilizando medio WL y medio mínimo con NaNO₃” (para el caso del NaNO₃), las columnas de 1.8 y

2.4 cm de diámetro obtuvieron un valor de más del doble, 103 ± 23.74 mg/gmsi, con relación a los 47 y 45 mg/gmsi respectivamente. Las columnas de 2.4 a 4.6 cm, más del triple. Con respecto al medio WL que obtuvo valores mayores a los del NaNO_3 , estos resultaron cercanos a poco menos de la mitad con respecto a los 140 ± 16.63 mg/gmsi obtenidos por las columnas de 2.4 a 4.6 cm. Estos resultados nos indican que la acumulación de calor metabólico en atmósfera gaseosa partiendo de una temperatura de cultivo a 30°C para *G. candidum*, no afecta su crecimiento y por el contrario lo favorece en comparación con cultivos incubados en baño con agua que propicia la remoción de calor.

Una vez corroborado el aumento de temperatura conforme se aumentó el tamaño del biorreactor se decidió evaluar el efecto de la agitación como una estrategia para contrarrestar el aumento de temperatura en un biorreactor tanque agitado con un diámetro de 23 cm.

6.2.5 Efecto de la agitación del reactor sobre el crecimiento de *G. candidum*

Una vez que se determinó el efecto de la temperatura de incubación y la ocasionada por acumulación de calor metabólico en biorreactores estáticos tubulares, se procedió a evaluar los parámetros asociados a la producción de CO_2 por *G. candidum* en biorreactores agitados con una velocidad de agitación de 3 rpm y una frecuencia de 2 min/h. El pH inicial en el reactor agitado fue de 6.10 ± 0.04 y la humedad de 67.83 ± 0.74 %. Para las columnas, el pH inicial fue de 6 y la humedad de 65.04 ± 1.01 . El valor final de pH, en ambos casos, resultó mayor al inicial (Tabla 7). Caso contrario al de todos los estudios previos que presentaron decremento.

Tabla 7. Valores finales de pH y humedad (%) en reactores estáticos y agitado al inicio y final del cultivo.

Biorreactor	Tiempo (h)	pH	Humedad (%)
Agitado	0	6.10 ± 0.04	67.83 ± 0.74
	36	6.32 ± 0.05	67.80 ± 2.27
Columnas	0	6	65.04 ± 1.01
	36	6.18 ± 0.05	61.85 ± 1.25

Para el reactor agitado se incrementó a 6.32 ± 0.05 . Para las columnas, fue un aumento un poco menor, de 0.18 unidades. Se reportó un valor de 6.18 ± 0.05 . En la Figura 13a se observó que las columnas tuvieron un tiempo lag cercano a las 4 h, el tiempo lag del reactor agitado

fue de 3.2 h. La tasa específica de producción de CO₂ resultó 1.4 veces mayor en las columnas que en el reactor agitado (Fig. 13b).

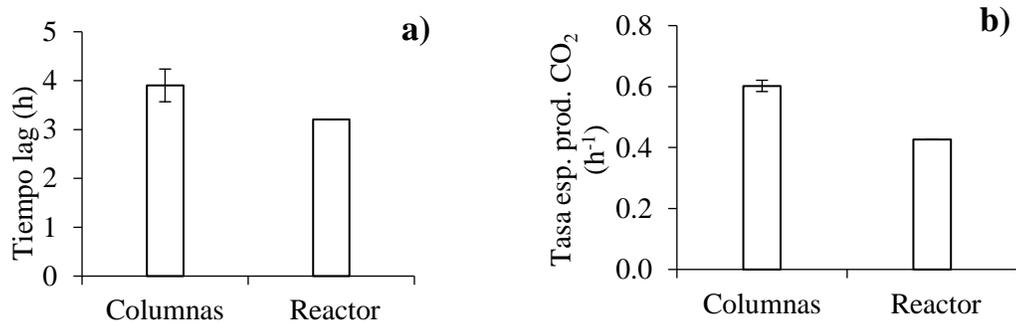


Figura 13. Comparación de variables de crecimiento de *G. candidum* en función de la agitación del reactor. a) Tiempo lag. b) Tasa específica de producción de CO₂.

En la Figura 14 se presenta la cinética de tasa de producción de CO₂ para ambos tipos de biorreactores. El valor máximo de la tasa de producción de CO₂ fue similar para ambos tipos de biorreactores (alrededor de 0.88 mg/gmsi h) y se obtuvo prácticamente al mismo tiempo de cultivo (6.7 h). Sin embargo, en el reactor agitado la tasa de producción de CO₂ se mantuvo, de las 10 a 20 h de incubación, en valores cercanos a 0.6 (mg/gmsi h). Para las columnas, de las 10 a 20 h de incubación, disminuyó exponencialmente, posiblemente, como consecuencia de ausencia de agitación o de un sistema que permita la remoción de calor. La temperatura en el reactor agitado durante las primeras 10 h fluctuó entre 30 y 33°C.

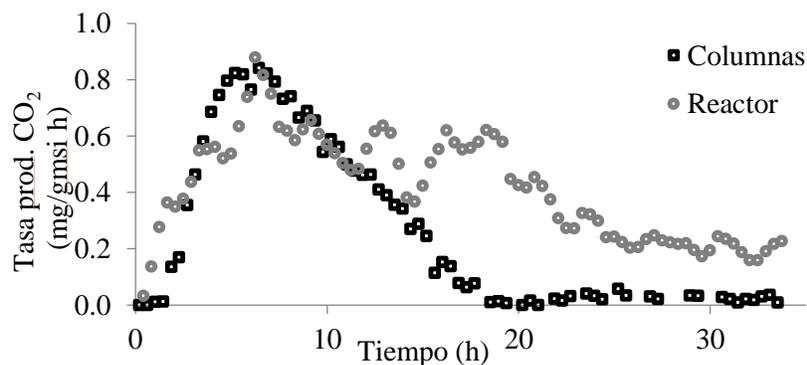


Figura 14. Tasa de producción de CO₂ de *G. candidum* en función del tiempo para columnas y reactor agitado.

Es decir, hubo una acumulación de calor metabólico de hasta 3°C. De las 10 h hasta el final del cultivo fluctuó de 30 a 32°C, hasta 2°C de acumulación de calor metabólico. Si bien con

el estudio previo, “Efecto del diámetro de columna sobre la acumulación de calor metabólico”, se demostró que para *G. candidum*, la acumulación de calor metabólico no afecta en su crecimiento, en un rango de temperaturas de 30 a 36°C, no sabíamos cuál sería el comportamiento en presencia de agitación y, por consiguiente, de remoción de calor. Asimismo, se esperaba una acumulación de calor metabólico mucho mayor a la obtenida, con base en lo demostrado que a mayor diámetro mayor acumulación de calor metabólico. Con este estudio se demuestra que la agitación favorece el crecimiento de *G. candidum* al disipar el calor metabólico.

En la Figura 15 se muestra la producción total de CO₂ en función del tiempo, para columnas y reactor agitado. Desde el inicio del cultivo en ambos casos se observa una producción de CO₂ similar, hasta las 15 h de incubación. Tiempo en que, para las columnas, inicia la fase estacionaria. Caso opuesto al reactor agitado, que continúa su crecimiento hasta las 36 h (duración del cultivo). El reactor al estar equipado con un sistema de paletas, que permiten mantener en movimiento al soporte sin dañar el inóculo aunado a la chaqueta de enfriamiento le favorece disipar el calor y disuadir su acumulación. Esto le permite al cultivo mantener una temperatura constante, o bien, evitar un incremento considerable y prolongado de temperatura. Por consiguiente, estos resultados demuestran que el uso de un reactor agitado en fermentación en medio sólido para *G. candidum* favorece su crecimiento en comparación de la ausencia de agitación.

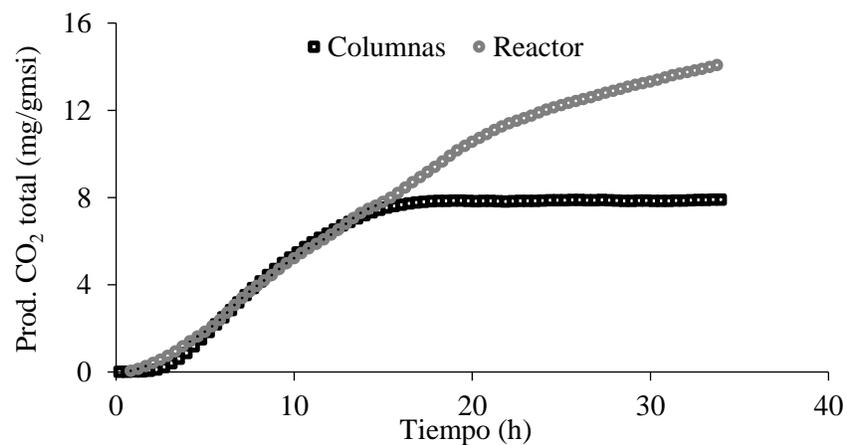


Figura 15. Producción total de CO₂ de *G. candidum* en función del tiempo para columnas y reactor agitado.

7. Conclusión

Se demostró que en un rango de temperaturas de incubación de 28 a 36°C no se presenta un efecto significativo sobre el tiempo lag, tasa máxima de producción de CO₂, producción total de CO₂ y tasa específica de producción de CO₂.

La acumulación de calor metabólico no afecta el crecimiento de *G. candidum*, en un rango de temperaturas de 30 a 36°C.

El uso de un reactor agitado en fermentación en medio sólido para *G. candidum* favorece su crecimiento al disipar el calor metabólico, en comparación de la ausencia de agitación.

8. Bibliografía

Acuña-Argüelles, M.E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 43. p.p. 808-814.

Berovic, M., Mitchell, D.A., M., Krieger, N., Agosin, E., 2006. *Solid-State Fermentation Bioreactors*, Springer, Berlin, Heidelberg. pp: 117-144.

Butler, E.E., Eckert, J.M. 1962. Taxonomy and physiological properties of fungus causing sour rot of citrus fruit. *Phytopathology* 52, 5.

Carrizalez, V., Rodríguez, H., Sardiña, I., 1981. Determination of the specific growth rate of molds on semi-solid cultures. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 23, p.p. 321-333.

Durand, A., 2003. Bioreactors design for solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* Vol. 13, p.p. 113-125.

Dale, G., Guillot, J., 1971. Contribution à l'étude de la microflore du fromage de Saint Nectaire et de la physiologie de *Geotrichum candidum* link. *Compte-rendu de la Société Biologique de Clermont-Ferrand*. 165 309-316.

Figuroa, A., 2011. Modelamiento de la transferencia de calor y masa (agua) en un biorreactor de charolas para fermentación en medio sólido, Tesis para obtener el grado de doctor en biotecnología, Departamento de Biotecnología, Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana.

Guéguen, M., y Jaquet, J., 1982. Etudes sur les caractères culturaux et la morphologie de *Geotrichum candidum* Link. *Lait* 62: 625-644.

Guéguen, M., y Lenoir, J., 1975. Aptitude de l'espèce *Geotrichum candidum* à la production d'enzymes proteolytiques. *Lait* 55: 145-162.

Garrison, E.R., Holdar, M.A., 1961. Variation in cultures of *G. candidum* isolated from cream. *Journal of Dairy Science*. p.p. 44, 972

Gautam, P., Sabu, A., Pandey, A., Szakacs. G., Soccol, C.R., 2002. Microbial production of extra-cellular phytase using polystyrene as inert solid support. Vol. 83. p.p. 229, 233.

- Hang, Y.D., Spittstoesser, D.F., Landshoot, R.L., 1974. Propagation of *Geotrichum candidum* in acid brine. *Applied Microbiology*. Vol. 27. p.p. 807, 808.
- Hannan, Y., Bovinet, P., 1983. La germination des spores de *Geotrichum candidum*, Etude calorimétrique. *Calorimétrie et Analyse Thermique* 14, 125-132.
- Hesseltine C.W., 1983. The future of fermented foods. *Nutr. Rev.* Vol. 16 p.p. 293-301
- Hudecová A., Valík, L., Lioptáková, D., 2009. Influence of temperature on the surface growth of *Geotrichum candidum*. *Acta Chimica Slovaca*. Vol. 2, No. 2, p.p. 81.
- Kim, J.H., Hosobuchi, M., Kishimoto, M., Seki, T., Yoshida, T., Taguchi, H., Ryu, D.Y., 1985. Cellulase production by a solid state culture system. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 27. p.p. 1445, 1450.
- Lecocq, J. 1991. Interactions entre *Geotrichum candidum* et *Brevibacterium linens*. Influence de facteurs intervenant en technologie fromagère. PhD thesis Université de Caen.
- López-Ramírez, N., Volke-Sepulveda, T., Gaime Perraud, I., Saucedo-Castañeda G., Favela-Torres, E., 2018. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. *Bioresource Technology*. Vol. 265 p.p. 291-298.
- López-Ramírez, N. “Producción de xilanasas y celulasas por *Trichoderma harzianum* en fermentación en estado sólido”. (2014). Tesis para obtener el grado de maestra. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México D.F. p.p 22, 27.
- Mitchell D.A. and Lonsane B.K, 1992, Definition, characteristics and potential. In *Solid substrate cultivation*, Vol 1, Elsevier Applied Science, p.p. 1-16.
- Montiel-González, A.M., Fernández, F.J., Viniestra-González, G., Loera, O., 2002. Invertase production on solid-state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 102. p.p. 63, 70.
- Moo-Young, M., 1983. Principles of solid-substrate fermentation. In: *The Filamentous Fungi*, Vol. 4. Ed. Smith J.E., Berry D.R. and Kriistiansen B. Edward Arnold. London. pp: 117-144.
- Mudgett, R.E., 1986. Solid-state fermentations, In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed. Demain A.L., and Solomon. H.A. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.p. 66-83.
- Nakadai, T. and Nasuno, S., 1988. Culture conditions of *Aspergillus oryzae* for production of enzyme preparation, *J. Ferment. Tech.* Vol. 66, p.p. 525-533.
- Ooijkaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J., Rinzema, A., 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends Biotechnol.* Vol. 18, p.p. 356-360.
- Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 13, p.p. 81–84.
- Pandey, A., 1999. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*. Vol. 77, p.p. 149–162.

- Prabhakar, A., Krishnaiah, K., Janaun, J., Bono, A., 2005. An overview of Engineering Aspects of Solid State Fermentation, Malaysian Journal of Microbiology. Vol. 1(2), p.p. 10-16.
- Prillinger, H., Molnar, O., Eliskases-Lechner, F., Lopandic K., 1999. Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. Antonie Van Leeuwenhoek. 75 p.p. 267-283.
- Raimbault, M. and Alazard, D., 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 9, p.p. 199-209.
- Robinson, T., Singh, D., Nigam, P., 2001. Solid-state fermentation: A promising technology for secondary metabolite production. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 55, p.p. 284-289.
- Sajo, B., Idi, A., Umar, A., 2011. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. Research in Biotechnology. Vol. 2(6), p.p. 21-26.
- Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernández, M., Lonsane, B., Navarro, J., Roussos, S., Dufour, D., Raimbault, M., 1994. On-line Automated Monitoring and Control Systems for CO₂ and O₂ in Aerobic and Anaerobic Solid-State Fermentations. Process Biochemistry. Vol. 29, p.p. 13-24.
- Saucedo, G., Lonsane, B., Krishnaiah, M., Navarro, J., Roussos, S., Raimbault, 1992. Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid-state fermentation system. Process Biochem. Vol. 27, p.p. 97-107.
- Saucedo-Castañeda, G., Gutiérrez-Rojas, M., Bacquet, G., Raimbault, M., Viniegra González, G., 1990. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. Biotechnol. Bioeng., Vol. 35, p.p. 802-808.
- Shankaranand V.S., Ramesh, M.V., Lonsane, B.K., 1992. Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. Process. Biochem. Vol. 27, p.p. 33-36.
- Trinci, A.J.P., 1972. Culture turbidity as a mesure of mold growth. Transactions of the British Mycological Society 58, 467-473.
- Trinci, A.J.P., 1971. Influence of the Width of the Peripheral Growth Zone on the Radial Growth Rate of Fungal Colonies on Solid Media. Microbiology. Vol. 67. p.p. 325-344.
- Vrije, T., Antoine, N., Buitelaar, R., Oostra, J., Rinzema, A., Weber, F., 2001. The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: Production by solid-state fermentation, application and marketing. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol.56, p.p. 58-68.
- Wyder, M. T., 1998. Identification and characterisation of the yeast flora in Kefyr and smear ripened cheese. Contribution of selected yeasts to cheese ripening. PhD thesis Swiss Federal Institute of Technology, 1-152.
- Zalokar, M., 1959. Growth and differentiation of *Neurospora* hyphae. Amer. Jour. Bot. 46(8): 602-610.

Anexos

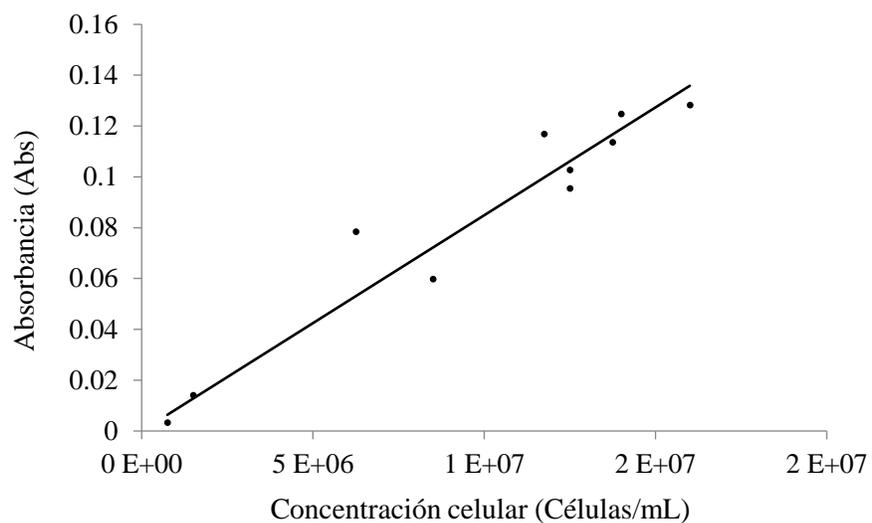


Figura A1. Curva estándar. Absorbancia vs Concentración celular (Células/mL).

Tabla A1. Composición medio WL (g/L).

	Medio WL (g/L)
Extracto de levadura	4
Hidrolizado de caseína	5
Glucosa	50
KH ₂ PO ₄	0.55
Cloruro de potasio	0.425
Cloruro de calcio	0.125
Sulfato de magnesio	0.125
Cloruro férrico	0.0025
Sulfato de manganeso	0.0025
Verde de bromocresol	0.022
Agar	17
pH	5.5

Tabla A2. Composición de medios de cultivo (g/L) utilizados.

	Medio PDA	Medio WL modificado	Medio mínimo
	g/L	g/L	g/L
Infusión de papa (sólidos)	4	-	-
Agar	15	-	-
Glucosa	20	50	50
Peptona de caseína	-	5	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	8.5
KH ₂ PO ₄	-	0.55	6
K ₂ HPO ₄	-	-	1.2
MgSO ₄ 7H ₂ O	-	-	0.61
Extracto de levadura	-	4	1.5
pH	5.6	6	6



Figura A2. Baños de agua a 5 diferentes temperaturas controladas.



a)



b)

Figura A3. Biorreactor agitado. a) Vista lateral exterior. b) Mirilla del reactor, se aprecia el aserrín inoculado.