
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTO DE LA AGITACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CO₂
POR HONGOS SEPTADOS (*Aspergillus versicolor*) Y NO
SEPTADOS (*Rhizopus microsporus*) EN CULTIVO EN MEDIO
SÓLIDO**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

I.BQ. GREGORIO NICOLÁS JUÁREZ LUNA

DR. ERNESTO FAVELA TORRES
DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
DR. GUSTAVO FIDEL GUTIÉRREZ LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS
ASESOR
ASESOR

MARZO DE 2014

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de CONACYT, en el nivel de Competencia Internacional, con la referencia 001465.



asa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

Fecha : 10/03/2014

Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA del alumno GREGORIO NICOLAS JUAREZ LUNA, matrícula 2113801113, quien cumplió con los 140 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha doce de marzo del 2014 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

**EFFECTO DE LA AGITACION
SOBRE LA PRODUCCION DE CO₂
POR HONGOS FILAMENTOSOS
SEPTADOS (*Aspergillus
versicolor*) Y NO SEPTADOS
(*Rhizopus microsporus*) EN
CULTIVO EN MEDIO SOLIDO.**

Cabe mencionar que la aprobación del Examen de Grado tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 180 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBAR

JURADO

Presidente

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

Secretaria

DRA. MARIA TERESA TORRES MANCERA

Vocal

DRA. FLOR DE MARIA CUERVO LOPEZ

Vocal

MTRA. LORENA LETICIA PEDRAZA SEGURA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa por haberme permitido llevar a cabo este proyecto en sus instalaciones.

A CONACYT por la beca de maestría otorgada.

A Dr. Ernesto Favela Torres, Dr. Gerardo Saucedo Castañeda y al Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López por su guía, su conocimiento y su confianza.

A la Dr. María Teresa Torres Mancera y M. en B. Lorena Pedraza Segura por aceptar participar en el jurado de esta tesis y por sus importantes comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

A Rosa Isela García por su conocimiento y su apoyo en la parte microbiológica de hongos de este trabajo.

A Nohemí López Ramírez por su apoyo en los experimentos con los reactores.

DEDICATORIAS

A México, que a pesar de sus carencias, es rico en su gente, en su folklor y en su naturaleza. Es un privilegio haber nacido en esta tierra.

*A mis padres María Teresa Luna y Paulino Juárez por regalarme la vida. Yo no elegí nacer de Ustedes, pero sin duda lo volvería a hacer. **Los amo con todo mi corazón.***

*A mi hermana Erandi Juárez y su familia (Mario, Brayan y Erick) por ser parte de mis proyectos de vida y por regalarme tanto cariño. **Los amo.***

*A Alejandra Anaya por salvarme de mi mismo cada vez que no sé qué camino de mi vida tomar. Sin duda eres la bendición más grande en mi paso por este mundo. **Te amo.***

A la Señora Lourdes Domínguez, ¿cómo imaginar esta vida sin sus enseñanzas, sin su ejemplo? Me siento muy orgulloso de poderme contar entre sus amigos. Todo mi cariño para Usted y su familia. Y a Doña Gregoria, que desde donde está siempre es un faro que guía e ilumina mi camino por muy oscura que pueda ser la noche.

*A mis relámpamigos (Dulce Palmerín, Alida Canul, Cándida Martínez, Ruth Peña, Edna Esparza, Rodrigo Melgarejo y familia, Miguel Arellano, Pedro López, Luis Víctor Rodríguez) gracias por tanta diversión, tanta risa, por tanta idiotez que libera el alma, por tanta vulgaridad disfrazada de intelecto y por su apoyo, su comprensión, su dinero y su tiempo. **Los quiero.***

A los Dr. Ernesto Favela, Gerardo Saucedo, Sergio Huerta y Arely Prado por abrirme las puertas de la PP4, por su confianza y por hacer de mí una persona de bien. Mi más profundo cariño, respeto y admiración. Y a la I.BQ. Teresa Favela por haberme guiado hacia la PP4.

A toda la PP4, al taller de teatro “Akropolis”, a todos mis amigos de la UAMI y de la vida.

Gracias.

CONTENIDO

CONTENIDO	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
GLOSARIO DE TERMINOS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Descripción del cultivo en medio sólido	3
2.2. Hongos filamentosos y su morfología	3
2.3. Procesos a micro-escala en el cultivo en medio sólido	5
2.4. Problemas de escalamiento de los cultivos en medio sólido	6
2.5. Mezclado como control de temperatura	7
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. HIPÓTESIS	11
5. OBJETIVOS	11
5.1. Objetivo general	11
5.2. Objetivos particulares	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS	12
6.1. Procedimientos	12
6.1.1. Microorganismos	12
6.1.2. Preparación del inóculo	12
6.1.3. Medios de cultivo utilizados	13
6.1.4. Pretratamiento del soporte	15
6.1.5. Preparación del soporte	16
6.1.6. Cultivos en reactores tubulares	16
6.1.7. Monitoreo de la temperatura en reactores tubulares (RTG o RTD)	17
6.1.8. Cultivos en reactores de tanque horizontal	18
6.1.9. Monitoreo de la temperatura en los reactores de tanque horizontal	20
6.1.10. Evaluación del efecto de la agitación en el reactor de tanque horizontal	21
6.2. Métodos analíticos	22
6.2.1. Respirimetría	22
6.2.2. Capacidad de retención de agua	22
6.2.3. Isotherma de adsorción	22
6.2.4. Humedad	23
6.2.5. Actividad de agua (a_w)	23

6.2.6.	Determinación de pH _____	23
6.2.7.	Determinación de sacarosa _____	23
6.2.8.	Actividad enzimática _____	24
6.2.8.1.	Celulasa (U_c) _____	24
6.2.8.2.	Xilanasa (U_x) _____	24
6.2.8.3.	Invertasa (U_i) _____	25
6.2.9.	Determinación de ácido cítrico _____	25
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	26
7.1.	Selección de los microorganismos y soporte _____	26
7.1.1.	Selección de los microorganismos _____	26
7.1.2.	Selección y evaluación del soporte _____	28
7.1.2.1.	Capacidad de retención de agua _____	28
7.1.2.2.	Evaluación del salvado de trigo y aserrín como soportes inertes _____	30
7.1.2.3.	Efecto del lavado del aserrín sobre la producción de CO_2 en cultivos de <i>A. versicolor</i> _____	32
7.1.2.4.	Control del pH en el cultivo de <i>A. versicolor</i> sobre aserrín _____	34
7.1.3.	Caracterización física de aserrín _____	37
7.1.4.	Efecto del tamaño de partícula en la producción de CO_2 por <i>A. versicolor</i> _____	38
7.1.5.	Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de CO_2 por <i>R. microsporus</i> _____	43
7.2.	Estimación de los parámetros cinéticos _____	46
7.2.1.	Respirómetro _____	46
7.2.2.	Estimación de la tasa de producción de CO_2 _____	47
7.2.3.	Estimación de la producción de CO_2 _____	49
7.2.4.	Ajuste con el modelo logístico _____	50
7.2.5.	Ajuste al modelo logístico por intervalos discretos _____	51
7.3.	Acumulación de calor en cultivos estáticos de <i>A. versicolor</i> y <i>R. microsporus</i> en reactores tubulares y de tanque horizontal _____	55
7.3.1.	Efecto de la temperatura en la producción de CO_2 en cultivos de <i>A. versicolor</i> y <i>R. microsporus</i> _____	55
7.3.2.	Efecto de la temperatura sobre la tasa específica de producción de CO_2 en cultivos de <i>A. versicolor</i> y <i>R. microsporus</i> _____	60
7.3.3.	Acumulación de calor en cultivos de <i>A. versicolor</i> y <i>R. microsporus</i> en biorreactores tubulares _____	62
7.3.4.	Acondicionamiento del área para la instalación y operación de los reactores de tanque horizontal. _____	70
7.3.5.	Acumulación de calor en cultivos de <i>A. versicolor</i> y <i>R. microsporus</i> en los reactores de tanque horizontal _____	71
7.4.	Efecto de la agitación en cultivos de <i>A. versicolor</i> y <i>R. microsporus</i> en biorreactores de tanque horizontal. _____	78
8.	CONCLUSIONES _____	86
8.1.	General _____	86
8.2.	Particulares _____	86
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6-1. Medio Sabouraud 3[X].	13
Tabla 6-2. Medio Czapek–Dox 3[X].	13
Tabla 6-3. Medio Czapek–Dox (MP) 3[X].	14
Tabla 6-4. Medio Czapek–Dox (NU) 3[X].	14
Tabla 6-5. Medio Yeast Extract Peptone Desxtrose (YPD) 2[X].	15
Tabla 7-1. Condiciones iniciales y finales de los cultivos de <i>A. versicolor</i> sobre salvado de trigo y aserrín.	31
Tabla 7-2. Condiciones iniciales y finales de los cultivos de <i>A. versicolor</i> sobre aserrín lavado y sin lavar.	33
Tabla 7-3. Condiciones iniciales y finales del cultivo de <i>A. versicolor</i> sobre aserrín con medio Czapek-Dox (UN) y Czapek-Dox (MP).	35
Tabla 7-4. Parámetros cinéticos estimados del cultivo de <i>A. versicolor</i> sobre aserrín impregnado con medio Czapek-Dox (NU) y Czapek-Dox (MP) con el ML.	36
Tabla 7-5. Condiciones iniciales y finales del cultivo de <i>A. versicolor</i> sobre diferentes tamaños de partícula de aserrín.	41
Tabla 7-6. Parámetros cinéticos estimados del cultivo de <i>A. versicolor</i> sobre aserrín de diferentes tamaños de partícula con el ML.	42
Tabla 7-7. Parámetros cinéticos estimados del cultivo de <i>R. microsporus</i> sobre medio Sabouraud y Czapek-Dox (NU) con el ML.	45
Tabla 7-8. Condiciones iniciales y finales de los cultivos de <i>R. microsporus</i> sobre medio Sabouraud y Czapek-Dox (NU).	46
Tabla 7-9. Parámetros cinéticos estimados por las dos formas de ajuste.	54
Tabla 7-10. Parámetros cinéticos estimados del cultivo de <i>R. microsporus</i> a diferentes temperaturas con el MLID.	57
Tabla 7-11. Parámetros cinéticos estimados en los cultivos de <i>A. versicolor</i> a diferentes temperaturas con el MLID.	59
Tabla 7-12. Valores estimados con el ajuste al modelo de Ratkowsky.	61
Tabla 7-13. Parámetros cinéticos estimados para los cultivos de <i>R. microsporus</i> en biorreactores estáticos.	64
Tabla 7-14. Parámetros cinéticos estimados para los cultivos de <i>A. versicolor</i> en biorreactores tubulares con el MLID.	66
Tabla 7-15. pH inicial y final en cultivos de <i>A. versicolor</i> y <i>R. microsporus</i> en biorreactores estáticos.	69
Tabla 7-16. Parámetros cinéticos estimados en el cultivo de <i>R. microsporus</i> en RTH estático con el MLID.	73
Tabla 7-17. Parámetros cinéticos estimados para los cultivos de <i>A. versicolor</i> en RTH estáticos con el MLID.	76
Tabla 7-18. pH inicial y final en cultivos de <i>A. versicolor</i> y <i>R. oligosporus</i> en RTH estático.	78
Tabla 7-19. Parámetros cinéticos estimados en los cultivos de <i>A. versicolor</i> en el RTH agitado y RTD estático.	80
Tabla 7-20. Parámetros cinéticos estimados para los cultivos de <i>R. microsporus</i> en biorreactores.	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Diagrama de la morfología de hongos.	4
Figura 2-2. Procesos a micro-escala en el cultivo en medio sólido.	5
Figura 2-3. Control de temperatura por mezclado intermitente.	8
Figura 6-1. Sistema experimental en reactores tubulares.	17
Figura 6-2. Esquema del reactor de tanque horizontal con sistema de retromezclado.	19
Figura 6-3. Sistema experimental de reactor de tanque agitado.	21
Figura 7-1. Hifas septadas de <i>A. versicolor</i> (40X).	27
Figura 7-2. Hifas no septadas de <i>R. microsporus</i> (40X).	27
Figura 7-3. Capacidad de retención de agua de los soportes propuestos.	29
Figura 7-4. Tasa de producción de CO_2 de los cultivos de <i>A. versicolor</i> sobre salvado de trigo y aserrín.	30
Figura 7-5. Efecto del lavado sobre la tasa de producción de CO_2 de <i>A. versicolor</i> sobre aserrín.	33
Figura 7-6. Efecto del medio de cultivo sobre la tasa de producción de CO_2 de <i>A. versicolor</i> sobre aserrín.	34
Figura 7-7. Efecto del medio de cultivo sobre la producción de CO_2 de <i>A. versicolor</i> sobre aserrín.	36
Figura 7-8. Isotherma de adsorción del sistema aserrín-agua a 25 °C.	37
Figura 7-9. Distribución de tamaños de partícula del aserrín.	39
Figura 7-10. Efecto del tamaño de partícula sobre la tasa de producción de CO_2 de <i>A. versicolor</i> .	40
Figura 7-11. Efecto del tamaño de partícula sobre la producción de CO_2 de <i>A. versicolor</i> .	41
Figura 7-12. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la tasa de producción de CO_2 de <i>R. microsporus</i> .	43
Figura 7-13. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de CO_2 de <i>R. microsporus</i> .	44
Figura 7-14. Concentración volumétrica de CO_2 en la corriente gaseosa de un cultivo de <i>A. versicolor</i> en la salida de un biorreactor tubular.	47
Figura 7-15. Tasa de producción de CO_2 de <i>A. versicolor</i> en un biorreactor tubular.	48
Figura 7-16. Producción de CO_2 en un cultivo de <i>A. versicolor</i> en un biorreactor tubular.	49
Figura 7-17. Ajuste de los datos de producción de CO_2 al modelo logístico.	50
Figura 7-18. Estimación de la fase lag a partir del logaritmo natural de la producción de CO_2 .	52
Figura 7-19. Ajuste de los datos de producción de CO_2 de <i>A. versicolor</i> en un biorreactor tubular al modelo logístico por intervalos discretos.	53
Figura 7-20. Ajuste de la tasa de producción de CO_2 de un cultivo de <i>A. versicolor</i> en un biorreactor tubular con ambos modelos.	55
Figura 7-21. Efecto de la temperatura sobre la tasa de producción de CO_2 de <i>R. microsporus</i> .	56
Figura 7-22. Efecto de la temperatura sobre la producción de CO_2 de <i>R. microsporus</i> .	57
Figura 7-23. Efecto de la temperatura sobre la tasa de producción de CO_2 de <i>A. versicolor</i> .	58
Figura 7-24. Efecto de la temperatura sobre la producción de CO_2 de <i>A. versicolor</i> .	59
Figura 7-25. Efecto de la temperatura sobre la tasa específica de producción de CO_2 .	60
Figura 7-26. Tasa de producción de CO_2 de <i>R. microsporus</i> a 37.5 °C en biorreactores tubulares de diferente diámetro.	62
Figura 7-27. Producción de CO_2 de <i>R. microsporus</i> a 37.5 °C en biorreactores tubulares de diferente diámetro.	63
Figura 7-28. Perfil de temperaturas a diferentes alturas de reactores tubulares en un cultivo de <i>R. microsporus</i> a 37.5 °C.	64
Figura 7-29. Tasa de producción de CO_2 de <i>A. versicolor</i> a 37.5 °C en biorreactores tubulares de diferente diámetro.	65
Figura 7-30. Producción de CO_2 de <i>A. versicolor</i> a 37.5 °C en biorreactores tubulares de diferente diámetro.	66
Figura 7-31. Perfil de temperaturas a diferentes alturas de reactores tubulares en un cultivo de <i>A. versicolor</i> a 37.5 °C.	67
Figura 7-32. Incremento de temperatura en función de la altura en reactores tubulares en cultivos de <i>A. versicolor</i> y <i>R. microsporus</i> .	68
Figura 7-33. Consumo de sacarosa en el cultivo de <i>A. versicolor</i> .	69
Figura 7-34. Consumo de sacarosa en el cultivo de <i>R. microsporus</i> .	69

Figura 7-35. Sistema de aireación de los reactores. Compresor. _____	70
Figura 7-36. Sistema de distribución de aire a través de válvulas de bajo caudal. _____	70
Figura 7-37. Sistema de reactores de tanque horizontal con agitación mecánica. _____	71
Figura 7-38. Sistema de reactores en operación. _____	71
Figura 7-39. Tasa de producción de CO ₂ de <i>R. microsporus</i> en RTH en condiciones estáticas a 37.5 °C. _____	72
Figura 7-40. Producción de CO ₂ de <i>R. microsporus</i> RTH en condiciones estáticas a 37.5 °C. _____	73
Figura 7-41. Perfil de temperaturas en el aire de salida y en dos posiciones del cuerpo del RTH en el cultivo de <i>R. microsporus</i> . _____	74
Figura 7-42. Tasa de producción de CO ₂ de <i>A. versicolor</i> en RTH en condiciones estáticas a 37.5 °C. _____	75
Figura 7-43. Producción de CO ₂ de <i>A. versicolor</i> en RTH en condiciones estáticas a 37.5 °C. _____	75
Figura 7-44. Perfil de temperaturas en el aire de salida y en dos posiciones del cuerpo del RTH en el cultivo de <i>A. versicolor</i> . _____	77
Figura 7-45. Tasa de producción de CO ₂ de <i>A. versicolor</i> en el RTH con agitación y en RTD. 3 rpm (RTH) a 37.5 °C. _____	79
Figura 7-46. Producción de CO ₂ de <i>A. versicolor</i> en el RTH con agitación y en RTD. _____	80
Figura 7-47. Perfil de temperaturas en el aire de salida y en dos posiciones del cuerpo del RTH en el cultivo de <i>A. versicolor</i> . _____	81
Figura 7-48. Tasa de producción de CO ₂ de <i>R. microsporus</i> en el RTH con agitación y en RTD. _____	82
Figura 7-49. Levaduras aisladas del cultivo de <i>R. microsporus</i> en agar PDA con cloranfenicol. _____	83
Figura 7-50. Aparente formación de micelio a partir de la levaduras de <i>R. microsporus</i> . _____	83
Figura 7-51. Producción de CO ₂ de <i>R. microsporus</i> en el RTH con agitación y en RTD. _____	83
Figura 7-52. Perfil de temperaturas en el aire de salida y en dos posiciones del cuerpo del RTH en el cultivo de <i>R. microsporus</i> . _____	85

GLOSARIO DE TERMINOS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	Parámetro de ajuste para el modelo de Henderson.
a_w	Actividad de agua.
CRA	Capacidad de retención de agua (gH ₂ O/gms).
C_1	Parámetro de ajuste para el modelo de Ratkowsky ($h^{-0.5} K^{-1}$).
C_2	Parámetro de ajuste para el modelo de Ratkowsky (K^{-1}).
f	Parámetro de ajuste para el modelo de Henderson.
gms	Gramo de materia seca.
lag	Fase lag (h).
MP	Mezcla de fosfato mono y dibásico.
ML	Modelo logístico.
MLID	Modelo logístico por intervalos discretos.
n	Parámetro de ajuste para el modelo de Henderson.
NU	Mezcla de Urea y sulfato de amonio
RTG	Reactor tubular grueso.
RTD	Reactor tubular delgado.
RTH	Reactor de tanque horizontal.
PCO ₂	Producción de CO ₂ (mg/gms).
$P_{CO_2 final}$	Producción de CO ₂ al final del cultivo (mg/gms).
$r_{CO_2 max}$	Tasa de producción de CO ₂ máxima.
T	Temperatura (K, °C).
TE	Temperatura a 5 cm de la entrada de aire del reactor de tanque horizontal (°C).
TEA	Temperatura del aire a la entrada del reactor (°C).
t_d	Tiempo de duplicación (h).
T_{min}	Temperatura mínima de crecimiento (K).
T_{max}	Temperatura máxima de crecimiento (K).
TS	Temperatura a 5 cm de la salida de aire del reactor de tanque horizontal (°C).
TSA	Temperatura del aire a la salida del reactor (°C).
Uc	Actividad celulasa (U/gms).
Ux	Actividad xilanasa (U/gms).
Ui	Actividad invertasa (U/gms).
Xw	Contenido de agua (gH ₂ O/gms).
Δt	Incremento de tiempo (h).
ΔT	Incremento de temperatura (°C).
φ	Frecuencia de agitación (h).
μ	Tasa específica de producción de CO ₂ (h^{-1}).

RESUMEN

El cultivo en medio sólido se considera como una alternativa viable al tradicional cultivo sumergido o en medio líquido. Sin embargo, la falta de datos técnicos para el escalamiento de estos procesos ha limitado su aplicación a nivel piloto e industrial.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la agitación sobre la producción de CO₂ en cultivos de hongos septados y no septados. Como hongo septado se eligió una cepa de *Aspergillus versicolor* y como hongo no septado se eligió una cepa de *Rhizopus microsporus*. Ambos microorganismos se eligieron por sus altas tasas de producción de CO₂, su morfología y porque son consideradas termotolerantes.

Como soporte se eligió aserrín de pino lavado y tamizado (0.42 mm – 3.36 mm) debido a su alta capacidad de retención de agua (2.78 g/gms) y alta resistencia mecánica. Además, es un material económico, disponible y, por su composición rica en carbohidratos estructurales, puede considerarse como un soporte inerte.

Se desarrolló una estrategia de ajuste por intervalos discretos para la estimación de los parámetros cinéticos a través del modelo logístico. Con esta estrategia se pudo establecer un criterio de selección de la sección simétrica de la curva de producción de CO₂ y estimar de manera confiable los parámetros cinéticos asociados a la producción de CO₂.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la producción de CO₂ y sobre la tasa específica de producción de CO₂. Se concluyó que la temperatura de incubación para los cultivos de ambos microorganismos en reactores tubulares y de tanque horizontal debe ser de 37.5 °C.

Se evaluó el incremento de temperatura en dirección axial y radial en reactores tubulares gruesos (4.5 cm de diámetro). El gradiente de temperatura radial fue de 1.2 °C con *R. microsporus* y de 2.8 °C con *A. versicolor*. El gradiente de temperatura en dirección axial resultó significativamente menor 0.25 °C con *R. microsporus* y de 1.45 °C con *A. versicolor*. Estos incrementos de temperatura no fueron nocivos para la producción de CO₂ para ninguno de los microorganismos. En el reactor de tanque horizontal sin agitación se registró la temperatura en las corrientes de entrada y salida de air, obteniendo gradientes de 2.19 °C con *A. versicolor* de 0.98 °C con *R. microsporus*.

Finalmente, se evaluó el efecto de la agitación sobre la producción de CO₂ con ambos microorganismos. En los cultivos con el hongo septado (*A. versicolor*), la agitación mejoró la tasa de producción de CO₂ en un 26 % y además hubo una disminución significativa sobre el gradiente de temperatura axial que fue de 1.78 °C. En los cultivos con el hongo no septado (*R. microsporus*) la tasa de producción de CO₂ mejoró en un 133 %. En este caso el gradiente de temperatura axial fue de 1.60 °C. En el cultivo con hongos no septados se indujo la forma levaduriforme de *R. microsporus*.

ABSTRACT

Solid state culture is considered as an alternative to traditional submerged or liquid culture. However, the lack of technical scale up knowledge has limited its application at pilot and industrial scale.

The aim of this work was evaluate the effect of mixing over the CO₂ production in cultures of septate and non-septate fungi. As septate and as non septate fungi strains of *Aspergillus versicolor* and *Rhizopus microsporus* respectively were selected. Both microorganisms were chosen due to their high CO₂ production rate, their morphology and because they show a certain grade of thermotolerance.

As support, washed and sieved sawdust (0.42 mm – 3.36 mm) was selected due to holding water capability (2.78 g/gms) and its mechanical resistance. Also, this is a cheap material, easily acquirable and for its composition rich in structural carbohydrates can be considered as an inert support.

A strategy for data adjustment by discrete intervals was developed for the estimation of kinetic parameters. With this strategy we were able to establish a criterion of selection of the symmetric section for the CO₂ production curve and estimate the kinetic parameters related to CO₂ production.

The effect of temperature over CO₂ production and specific CO₂ production rate was assessed. It was established that incubation temperature for both microorganisms must be 37.5 °C.

The increase of temperature in axial and radial direction in thicker tubular reactors (4.5 cm of diameter) was evaluated. The radial temperature gradient was 1.2 °C in *R. microsporus* cultures and 2.8 °C in *A. versicolor* cultures. The axial direction

gradient was significantly less, 0.25 °C in *R. microsporus* cultures and 1.45 °C in *A. versicolor* cultures. These temperature increments were not harmful for none of these microorganisms. Measurement of temperature at the input and output air current in the horizontal tank reactor allowed determining temperature gradients of 2.19 °C in *A. versicolor* cultures and 0.98 °C in *R. microsporus* cultures.

Finally, the effect of mixing over CO₂ production was assessed in both microorganisms. In the cultures of the septated fungi (*A. versicolor*), the intermittent mixing improved the CO₂ production rate in 26 % and also the temperature gradient was significantly less, 1.78 °C. In cultures of non-septated fungi (*R. microsporus*) the CO₂ production rate increased 133 %. In this case, temperature gradient was 1.60 °C and a dimorphism phenomenon from mycelium to single cells was induced.

1. INTRODUCCION

El cultivo en medio sólido es una alternativa al tradicional cultivo sumergido (*Schutyser y col., 2003*) y se caracteriza por el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos húmedos con bajo contenido de agua libre y aire como fase continua (*Schutyser y col., 2003; Nava, 2003 y Hölker y Lenz, 2005*).

Aunque ha sido utilizado durante siglos para la fabricación de alimentos, bebidas y otros productos (*Mitchell y col., 2000*), en años recientes, las investigaciones sobre el cultivo en medio sólido han conducido a que este tenga un amplio rango de aplicaciones a nivel laboratorio (*Nagel y col., 2001*) tal como, producción de enzimas, ácidos orgánicos, etanol, biogás, antibióticos, surfactantes, biopesticidas, entre otros (*Mitchell y col., 2000*). Estos procesos son industrialmente atractivos ya que ofrecen mayores rendimientos, menores requerimientos energéticos, menores costos de equipo, menores costos de separación y menores efluentes de aguas residuales (*Fanaei y Vaziri, 2009*).

A pesar de que el cultivo en medio sólido ofrece una perspectiva clara para la obtención de diversos productos, su aplicación a nivel piloto e industrial no es sencilla debido, principalmente, a la carencia de conocimiento tecnológico sobre el diseño y escalamiento de estos sistemas (*Schutyser y col., 2003*).

Los soportes sólidos utilizados en el cultivo en medio sólido varían en su composición, tamaño de partícula, porosidad y capacidad de retención de agua; y representan uno de los factores que afectan el diseño de reactores y el control de parámetros estratégicos (*Durand, 2003*).

La respiración de los microorganismos genera calor. En los cultivos en medio sólido no es fácil de remover debido a la pobre conductividad térmica de los

soportes utilizados y del aire (*Ghildyal y col., 1994; Durand, 2003*). La acumulación de calor genera gradientes de temperatura que pueden tener efectos nocivos sobre los microorganismos (*Gutiérrez-Rojas y col., 1996*).

El enfriamiento evaporativo se ha utilizado como mecanismo de remoción de calor, sin embargo, este resulta en la desecación del soporte sólido. Los reactores con sistemas de mezclado ofrecen algunas ventajas, (i) reducción de la heterogeneidad del lecho, (2) distribución uniforme de la humedad y aireación durante el cultivo y (3) mejora el intercambio de gases y la transferencia de calor (*Nagel y col., 2001*).

Otros factores que afectan el diseño de los biorreactores son: (i) la morfología de los hongos (presencia o ausencia de hifas septadas) y en relación con lo anterior, su resistencia a la agitación mecánica y (ii) la necesidad de tener condiciones asépticas (*Durand, 2003*).

En este trabajo se evaluó el efecto de la agitación sobre la actividad respiratoria de dos hongos filamentosos; uno septado y otro no septado. En el capítulo 2 se presenta una revisión bibliográfica sobre el cultivo en medio sólido y el efecto de la agitación mecánica sobre el crecimiento y producción de metabolitos en diferentes tipos de biorreactores. En los capítulos 3 a 5 se presenta la justificación y objetivos de este trabajo. Posteriormente, en el capítulo 6 se presenta con detalles los materiales y métodos usados para alcanzar los objetivos. El capítulo 7 presenta los principales resultados obtenidos y que permitieron llegar a las conclusiones presentadas en el capítulo 8.

2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1. Descripción del cultivo en medio sólido

El cultivo en medio sólido es considerado como una alternativa a los procesos de cultivo en medio líquido (también conocidos como fermentación sumergida) y consiste en el cultivo de microorganismos sobre sustratos sólidos húmedos (sin escurrimiento de agua) con bajo contenido de agua libre a grado tal, que permita el crecimiento de los microorganismos sin exceder la capacidad de retención de agua de la matriz sólida (*Hölker y Lenz, 2005; Schutyser y col., 2003 y Minjares y col., 1997*).

En el cultivo en medio sólido se simulan las condiciones de vida de muchos hongos filamentosos que crecen sobre sustratos húmedos (*Nava y col., 2006*). Es por esta razón que el cultivo en medio sólido es preferido en casos en los cuales los procesos biotecnológicos requieren de diferenciación metabólica y morfológica entre las hifas somáticas y las hifas aéreas tal como la producción de esporas (*Hölker y Lenz, 2005*).

2.2. Hongos filamentosos y su morfología

Los hongos son microorganismos más evolucionados que los procariontes (Bacterias). Forman largas células tubulares llamadas hifas por un procedimiento de crecimiento apical (*Ruíz-Herrera, 2011*) y la quitina es el principal constituyente de su pared celular. El conjunto de hifas se llama micelio.

Se dividen en dos grupos en función de su morfología: Levaduras e hifas. Las levaduras son hongos unicelulares que se reproducen asexualmente por

gemación o fisión binaria. Las hifas son hongos multicelulares que se reproducen sexual o asexualmente. El dimorfismo es una condición en la cual el hongo exhibe ambas formas (hifa o levadura) dependiendo de las condiciones de crecimiento. Muy pocos hongos presentan esta condición. La mayoría de ellos se desarrolla en forma de hifas filamentosas ramificadas. Las hifas pueden carecer de divisiones (hifas cenocíticas o no septadas) o presentarlas (hifas septadas). En la Figura 2-1 se muestran las diferentes morfologías de hongos filamentosos. Algunas especies, las hifas septadas desarrollan septos con conexiones de abrazadera que conecta los elementos de las hifas (Murray y col., 1990).

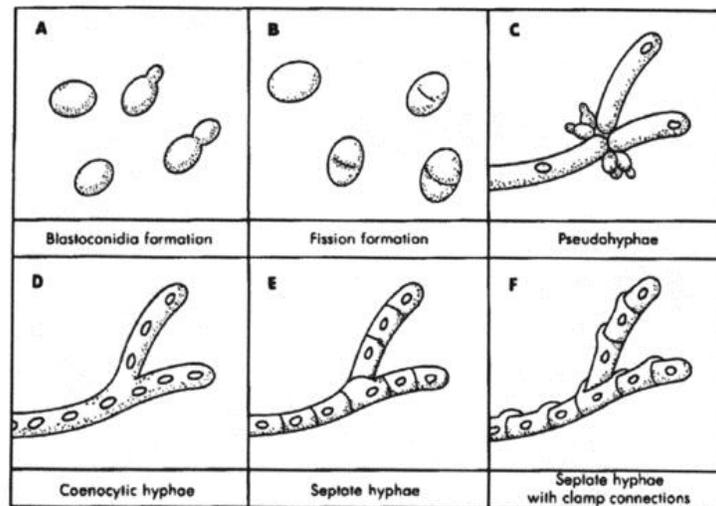


Figura 2-1. Diagrama de la morfología de hongos. A) Células de levadura reproduciéndose por gemación, B) Reproducción por fisión binaria, C) Desarrollo de pseudohifas, D) Hifas cenocíticas, E) Hifas septadas y F) Hifas septadas con conexiones de abrazadera.

Todos los hongos son heterótrofos y algunos son importantes recicladores del carbono contenido en la pared celular de plantas tanto en celulosa como en lignina. El mayor rasgo de distinción de estos microorganismos es su nutrición por absorción. Son capaces de producir grandes cantidades de ácidos orgánicos para acidificar el ambiente local y producir enzimas hidrolíticas que degradan las fuentes de nutrientes externamente para posteriormente absorberlas hacia el interior de la célula.

2.3. Procesos a micro-escala en el cultivo en medio sólido

Durante un cultivo en medio sólido suceden una serie de eventos a escala microscópica, que se describen a continuación (Figura 2-2).

Después de la esporulación, se desarrollan las hifas somáticas formando el micelio, el cual se desarrolla sobre toda la superficie de las partículas que conforman la matriz sólida. A partir de este micelio se desarrollan las hifas aéreas mientras que otras hifas se introducen en los poros llenos de líquido (hifas penetrativas). Las actividades metabólicas principales ocurren cerca de la superficie del sustrato y dentro de los poros. Sin embargo, en las hifas aéreas también existe actividad metabólica y puede existir transporte de sustancias hasta las hifas penetrativas y viceversa. Las enzimas hidrolíticas que son producidas por el micelio, difunden hacia la matriz sólida y catalizan la degradación de macromoléculas a unidades más pequeñas que servirán como nutrientes al microorganismo (Hólker y Lenz, 2005).

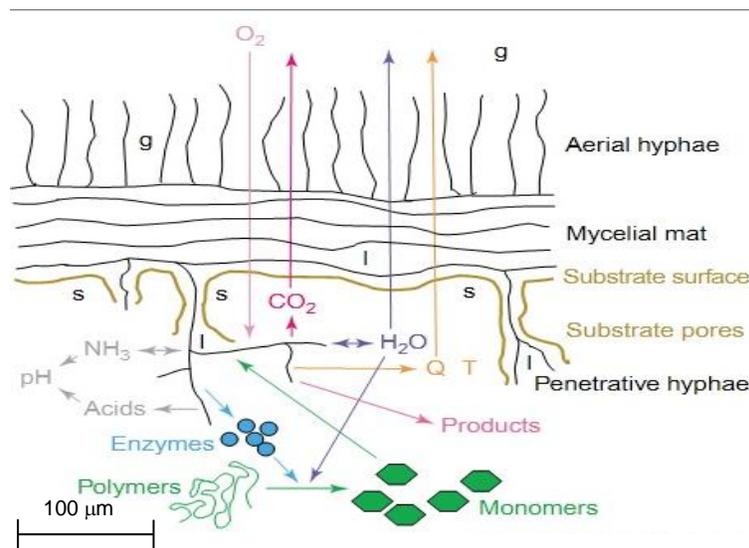


Figura 2-2. Procesos a micro-escala en el cultivo en medio sólido.

Durante el cultivo el oxígeno se consume y se produce dióxido de carbono, agua, calor y metabolitos (que pueden ser de interés bioquímico). Por lo que se desarrollan gradientes de masa que favorecen el transporte de oxígeno de la fase gaseosa a las zonas más profundas de la matriz sólida, mientras que, el dióxido de carbono difunde de estas regiones hacia la fase gaseosa (*Hólker y Lenz, 2005*).

El calor que se genera produce un rápido aumento de la temperatura. Dicho calor es parcialmente disipado por dos vías, conducción y evaporación. El pH varía debido a la secreción de ácidos orgánicos y amoníaco en algunos casos. Los metabolitos de interés son liberados en la matriz sólida y en los poros llenos de líquido durante el cultivo aunque también pueden ser absorbidos por la matriz sólida y tienen que ser extraídos al final del proceso (*Hólker y Lenz, 2005*).

2.4. Problemas de escalamiento de los cultivos en medio sólido

La principal razón por la que no se ha usado a gran escala el cultivo en medio sólido es la serie de problemas de ingeniería que presenta, tales como, la dificultad para estandarizar los procesos, la limitada reproducibilidad de los resultados y las limitaciones por transferencia de calor. El escalamiento representa un cuello de botella debido a los diferentes gradientes (temperatura, humedad, etc.) que surgen en el transcurso del proceso y que tienen efectos adversos sobre el desarrollo de los microorganismos (*Hólker y Lenz, 2005*). Esto se debe a que las estrategias de escalamiento prácticamente han sido empíricas por falta de información en cuanto a operación y diseño (*Oostra y col., 2000*).

Los procesos metabólicos son exotérmicos por lo tanto, en cultivo en medio sólido es inherente la formación de gradientes de temperatura en el cultivo (*Mudgett, 1986*). El sobrecalentamiento en los procesos de cultivo en medio sólido es el mayor problema que se presenta debido al flujo unidireccional de aire y el bajo

contenido de agua libre, por lo que el calor metabólico producido es difícil de disipar por métodos convencionales (*Saucedo-Castañeda y col., 1992 y Hölker y Lenz, 2005*). Comparado con el cultivo sumergido, el medio usado en el cultivo sólido contiene una menor cantidad de agua y una importante fase gaseosa que se encuentra entre las partículas, característica de gran relevancia debido a la baja conductividad térmica del aire en respecto al agua (*Durand, 2003*).

La aireación forzada cumple con funciones importantes como el arrastre del dióxido de carbono, control de temperatura y humedad (*Durand y col., 1988*). La disponibilidad de oxígeno (aireación) es otro de los factores importantes a considerar ya que está determinada por fenómenos de difusión, porosidad, tamaño de partícula y consistencia del sustrato (*Mitchell y col., 1988 y Durand, 2003*). Para lograr un buen suministro de oxígeno y alcanzar el nivel óptimo de productividad se requiere de una elevada tasa de aireación (*Silman y col., 1979*).

2.5. Mezclado como control de temperatura

De Reu y colaboradores en 1993 reportaron que la eliminación de calor mejora significativamente al mezclar el soporte sólido durante el cultivo (Figura 2-3), debido a que incrementa la transferencia de calor por mayor contacto de los sólidos con la pared del reactor (*de Reu y col., 1993*).

Algunos autores reportan que la agitación impide el crecimiento de hongos filamentosos (*Larroche y Gross, 1986 y Desgranges y col., 1993*), mientras que otros mejoran sus resultados en sistemas agitados (*de Reu y col., 1993 y Marsh y col., 1998*).

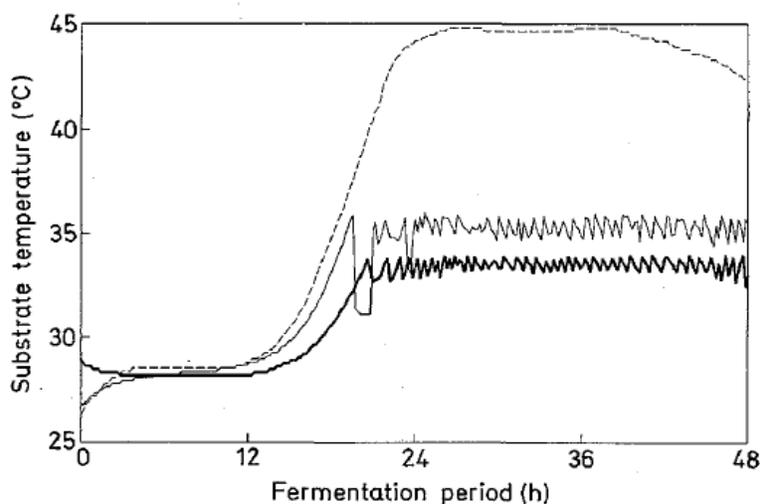


Figura 2-3. Control de temperatura por mezclado intermitente.

En 2002, Weber y colaboradores demostraron la necesidad de agitar un cultivo de *A. oryzae* sobre granos de trigo. Esto, debido a la combinación de la desecación del sustrato por evaporación de agua y la formación de la red de micelio entre los granos lo que genera grietas y dificultades para controlar la temperatura por medio de la aireación forzada.

Por otro lado, se ha reportado que el sustrato sólido puede ser mezclado continuamente sin ningún inconveniente. Oostra y col. (2000) concluye que la agitación continua no impide la esporulación de *Coniothyrium minutans* cultivado sobre granos de avena.

Nagel y col. (2001) estudiaron el efecto de la agitación continua en un mezclador de paletas usando *A. oryzae* con granos de trigo como sustrato sólido y encontraron que la agitación continua mejora el control del proceso al permitir la distribución homogénea del agua, reducir los gradientes de temperatura y oxígeno en el soporte sólido y mejorar la disipación de calor por transferencia a las paredes del reactor.

En contraste, *Han y col.* (1999) investigaron el efecto de la agitación intermitente en la producción de enzimas usando *Rhizopus* spp. sobre frijol de soya como soporte y reportaron que la agitación intermitente tiene un efecto negativo en la producción de enzimas.

Nava y col. (2006) concluyen que la agitación continua suave favorece que no haya formación de aglomerados de sustrato provocando mejor crecimiento y una mayor tasa de esporulación en *Penicillium commune* usando pulpa de café como soporte sólido. Sin embargo, se presentó un cierto daño al micelio como lo indicó la baja producción de CO₂.

En 2002, *Rahardjo y colaboradores* explicaron en cierta medida los efectos negativos de la agitación. Ellos encontraron que el micelio aéreo contribuye con la captación de más del 75% del oxígeno requerido en cultivos de *A. oryzae* sobre harina de trigo (*Rahardjo y col.*, 2002). Al agitar hay una disminución en la tasa de respiración en cultivo en medio sólido, ya que al romper o compactar el micelio aéreo ya no hay una adecuada transferencia de oxígeno (*Schutyser y col.*, 2003).

Entre estos trabajos hay cuatro diferencias básicas, la primera es el tipo de hifa de los hongos utilizados (septada y no septada), la estructura y firmeza del sustrato sólido, la configuración del reactor y el régimen de agitación (*Schutyser y col.*, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

Diversos factores, tales como temperatura, transferencia de agua y oxígeno y la formación de una red de micelio aéreo y somático son difíciles de controlar en el cultivo en medio sólido. Esto ha traído como consecuencia que esta tecnología no se haya aplicado a gran escala a pesar de la serie de ventajas que presenta sobre los cultivos sumergidos.

Por lo anterior, se ha propuesto como solución alternativa el mezclado del soporte sólido durante el cultivo para eliminar los gradientes de temperatura, humedad y concentración de oxígeno que se pudieran formar. Sin embargo, diversos estudios arrojan datos contradictorios sobre los efectos que provoca el mezclado sobre el crecimiento, productividad y los parámetros cinéticos de un microorganismo en particular. Una de las diferencias principales entre estos estudios es el tipo de hifas de los hongos utilizados.

Por lo anterior, este estudio pretende contribuir al entendimiento del papel que juega el tipo de hifa de los hongos (septadas y no septadas) en la resistencia a los esfuerzos de corte en los cultivos en medio sólido mezclados intermitentemente; en particular, se determinará el efecto de la agitación mecánica sobre el perfil respiratorio de dos hongos filamentosos, uno septado y otro no septado.

4. HIPÓTESIS

La agitación provocará una disminución significativa de los parámetros cinéticos y en la producción de CO₂ de los hongos no septados, mientras que los hongos septados presentarán mayor resistencia a los esfuerzos de corte.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar el efecto del mezclado en el perfil respiratorio de hongos filamentosos septados (*Aspergillus versicolor*) y no septados (*Rhizopus microsporus*) en cultivo en medio sólido.

5.2. Objetivos particulares

- Determinar las condiciones experimentales de cultivo para los estudios de producción de CO₂ en reactores estáticos y agitados.
- Establecer una estrategia para la estimación de los parámetros cinéticos.
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos.
- Evaluar el efecto del mezclado sobre los parámetros cinéticos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Procedimientos

6.1.1. Microorganismos

Se utilizó *Aspergillus versicolor* como microorganismo septado y *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (43aIV) como microorganismo no septado (Hernández-Rodríguez y col., 2009). La cepa de *A. versicolor* fue donada por la M. en C. Lorena Pedraza Segura de la Universidad Iberoamericana y la cepa de *R. microsporus* fue donada por el Dr. Jesús Córdova López de la Universidad de Guadalajara. Ambas cepas fueron propagadas en tubos con agar papa dextrosa (PDA) inclinado e incubadas a 40 °C por siete días.

6.1.2. Preparación del inóculo

Las cepas se resembraron periódicamente a partir de un tubo al que se adicionaron 5 mL de una solución estéril de tween 80 al 0.05% (v/v). El tubo se agitó en un vórtex durante 30 s y se tomaron alícuotas de 500 µL para inocular la superficie de agar PDA (50 mL) contenido en matraces Erlenmeyer (250 mL). Los matraces fueron incubados a 40 °C por siete días (Nava y col., 2011).

Transcurrido el tiempo de incubación se cosecharon las esporas agregando 20 mL de una solución estéril de tween 80 al 0.05% (v/v) a un matraz, se agitó con una barra magnética hasta recuperar la mayor cantidad de esporas. Esta suspensión se transfirió a un segundo matraz y se repitió la operación. De la suspensión obtenida se hizo una dilución 1:10 ó 1:100 con agua destilada para realizar el conteo de esporas con la cámara de Neubauer (Nava y col., 2011).

6.1.3. Medios de cultivo utilizados

En este trabajo se utilizaron cuatro medios de cultivo: Sabouraud, Czapek–Dox; Czapek–Dox adicionado con una mezcla de fosfatos (MP); Czapek-Dox con urea y sulfato de amonio (NU). Todos los medios se utilizaron 3 veces concentrados y fueron enriquecidos con extracto de levadura. En las Tablas 6-1, 6-2, 6-3 y 6-4 se muestra la composición de cada uno.

Tabla 6-1. Medio Sabouraud 3[X]*.

Componente	Concentración (g/L)
Dextrosa [C ₆ H ₁₂ O ₆]	120
Polipeptona	30

*pH final ajustado a 5.5

Tabla 6-2. Medio Czapek–Dox 3[X]*.

Componente	Concentración (g/L)
Sacarosa [C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁]	90
Nitrato de sodio [NaNO ₃]	9
Fosfato monobásico de potasio [KH ₂ PO ₄]	3
Sulfato de magnesio [MgSO ₄ ·7H ₂ O]	1.5
Cloruro de potasio [KCl]	1.5
Sulfato ferroso [FeSO ₄ ·7H ₂ O]	0.03
Extracto de levadura	1.5

*pH final ajustado a 5.5

Los medios Sabouraud, Czapek-Dox y Czapek-Dox (MP) se utilizaron en cultivos en reactores tubulares delgados para evaluar el efecto de la adición de MP and

UN en el control del pH y de la fuente de nitrógeno en cultivos de *A. versicolor* y *R. microsporus* (Raimbault, 1998).

Tabla 6-3. Medio Czapek–Dox (MP) 3[X]*.

Componente	Concentración (g/L)
Sacarosa [C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁]	90
Nitrato de sodio [NaNO ₃]	9
Fosfato monobásico de potasio [KH ₂ PO ₄]	8.25
Fosfato dibásico de potasio [K ₂ HPO ₄]	10.57
Sulfato de magnesio [MgSO ₄ ·7H ₂ O]	1.5
Cloruro de potasio [KCl]	1.5
Sulfato ferroso [FeSO ₄ ·7H ₂ O]	0.03
Extracto de levadura	1.5

*pH final ajustado a 5.5

El medio Czapek-Dox (NU) se utilizó en reactores tubulares gruesos, delgados y en los reactores de tanque horizontal en condiciones estáticas y con agitación en los experimentos de efecto de la temperatura, gradientes de temperatura y efecto del mezclado.

Tabla 6-4. Medio Czapek–Dox (NU) 3[X]*.

Componente	Concentración (g/L)
Sacarosa [C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁]	90
Sulfato de amonio [(NH ₄) ₂ SO ₄]	13.5
Urea [CH ₄ N ₂ O]	3
Fosfato monobásico de potasio	8.25

[KH ₂ PO ₄]	
Fosfato dibásico de potasio [K ₂ HPO ₄]	10.57
Sulfato de magnesio [MgSO ₄ ·7H ₂ O]	1.5
Cloruro de potasio [KCl]	1.5
Sulfato ferroso [FeSO ₄ ·7H ₂ O]	0.03
Extracto de levadura	1.5

*pH final ajustado a 5.5

Debido a la baja capacidad de producción de esporas de *R. microsporus* en los experimentos con reactor de tanque horizontal se inoculó con micelio. Para ello, se propagó esta cepa en medio líquido YPD concentrado dos veces a partir de una suspensión de esporas (1×10^6 esporas/mL) durante 48 h a 45 °C con agitación (120 rpm). En la Tabla 6-5 se muestra la composición del medio YPD. Es importante señalar que el pH del medio YPD debe ser 6.0 para que el hongo crezca en forma de *pellets* pequeños y se pueda dispersar homogéneamente en el aserrín. A pH mayores este hongo crece como micelio y es difícil de disgregar.

Tabla 6-5. Medio Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) 2[X]*.

Elemento	Concentración(g/L)
Dextrosa [C ₆ H ₁₂ O ₆]	40
Polipeptona	40
Extracto de levadura	20

*pH final ajustado a 6.0

6.1.4. Pretratamiento del soporte

Se utilizó aserrín de madera (pino) adquirido en una tienda departamental local. El aserrín se tamizó y se recuperó la fracción que pasa malla 6 y es retenida en malla 40 (3.36 mm - 0.42 mm). El lavado consistió en la inmersión del aserrín tamizado

en agua a 70 °C (en proporción 1:5) durante 5 min agitando manualmente. Se escurrió y se repitió la operación. Se enjuagó con agua fría del grifo (temperatura ambiente) y se dejó escurrir durante 1 h aproximadamente. Posteriormente, se secó en un secador de charolas a baja temperatura (aire a temperatura ambiente) hasta que el aserrín alcanzó una humedad menor al 10 %. El aserrín lavado y seco se almacenó en bolsas de plástico protegidas de la luz y cerradas.

6.1.5. Preparación del soporte

A partir del conteo de esporas en la cámara de Neubauer se calculó el volumen de suspensión de esporas necesaria para alcanzar un tamaño de inóculo de 2×10^7 esporas/gms. En todos los casos el volumen de inóculo representó menos del 5 % del volumen de líquido total (medio de cultivo más suspensión de esporas, excepto en los cultivos en reactores de tanque horizontal con *R. microsporus*). El volumen de medio se calculó restando del volumen de líquido necesario para alcanzar un nivel de humedad de 65 % el volumen de suspensión de esporas. El medio de cultivo líquido se inoculó con la suspensión de esporas y se mantuvo en agitación por 5 min (se consideró como el tiempo inicial del cultivo). El medio inoculado se mezcló con el aserrín seco haciendo movimientos circulares hasta que la mezcla fue homogénea.

6.1.6. Cultivos en reactores tubulares

Los reactores tubulares delgados (RTD) consisten en columnas de vidrio de 2.3 cm de diámetro x 20 cm de altura y los reactores tubulares gruesos (RTG) son columnas de vidrio de 4.5 cm de diámetro x 20 cm de altura.

Ambos tipos de reactores se empacaron con una cantidad suficiente de soporte inoculado para llenar aproximadamente 75 % del volumen del mismo. En todos los

casos se inició el cultivo con un tamaño de inóculo de 2×10^7 esporas/gas. La aireación fue de 40 mL/min para las columnas de 2.3 cm y de 120 mL/min para las columnas de 4.5 cm (1.5 VKgM). La temperatura de incubación se controló con un baño de agua, dependiendo de cada experimento.

6.1.7. Monitoreo de la temperatura en reactores tubulares (RTG o RTD)

En las columnas gruesas (4.5 cm) se monitoreó la temperatura por medio de 4 termopares tipo “J” colocados a diferentes alturas (0 cm, 3 cm, 6 cm y 9 cm) en el centro de la columna. En la figura 6-1 se presenta un diagrama del sistema experimental utilizado.

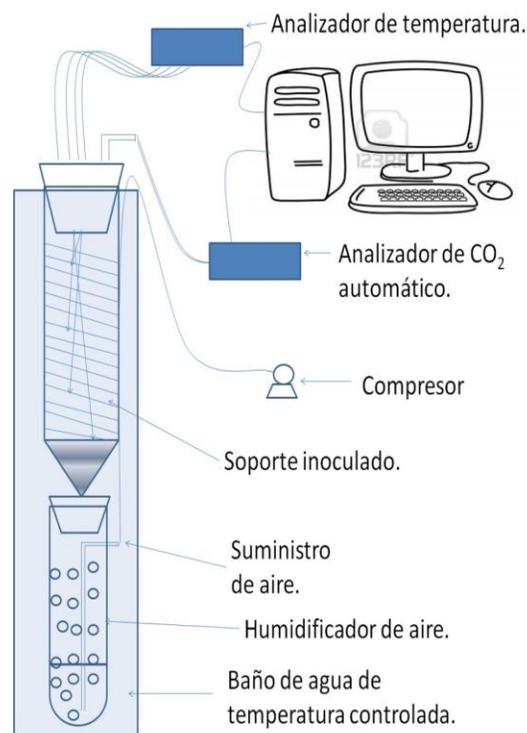
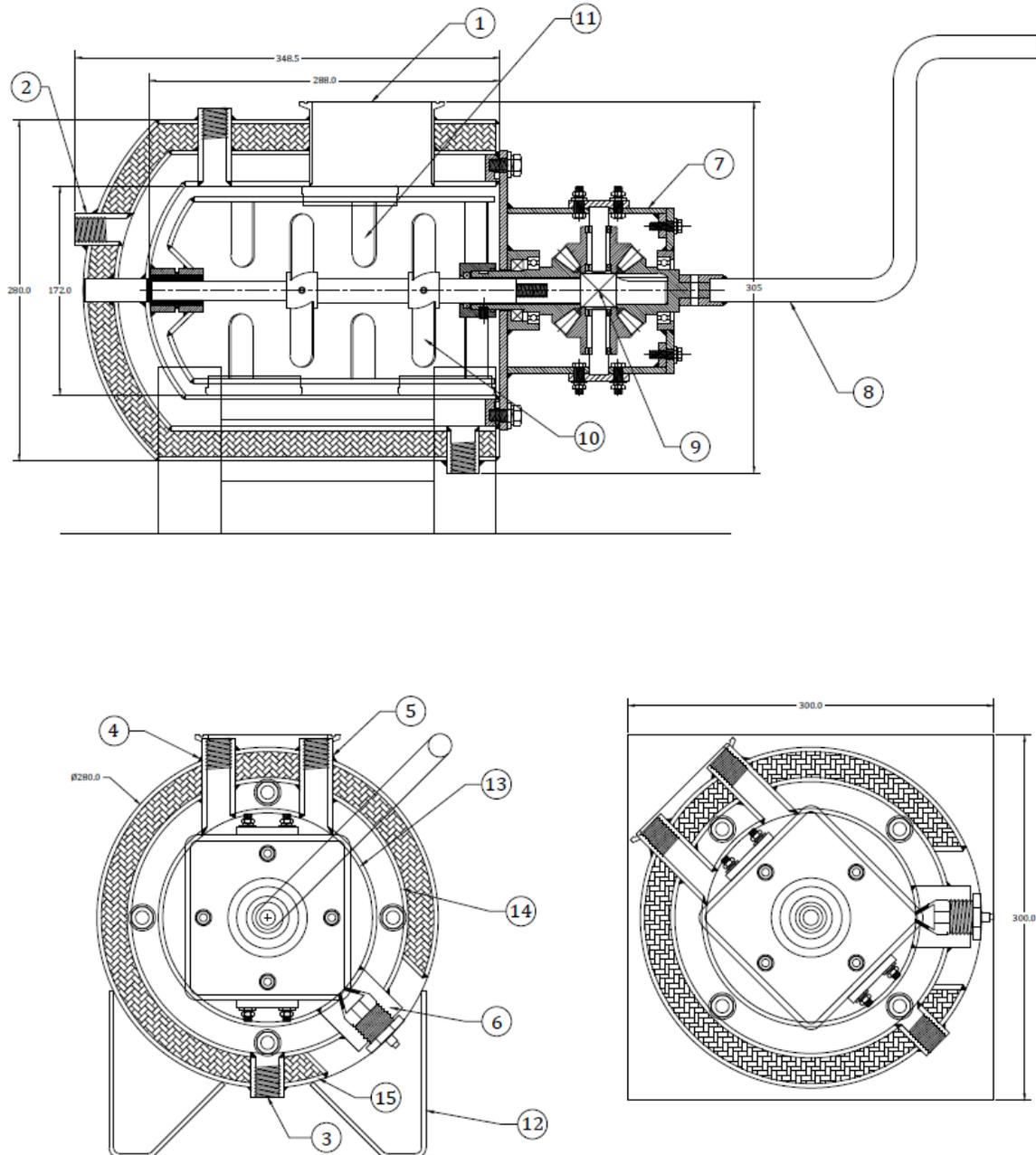


Figura 6-1. Sistema experimental en reactores tubulares.

6.1.8. Cultivos en reactores de tanque horizontal

Los reactores de tanque horizontal (RTH) son cilindros convencionales de tapa plana y fondo semielíptico de 6 L de capacidad aproximadamente. Las dimensiones del interior del tanque son: largo 28.00 cm y 17.20 cm de diámetro, provisto de un sistema de retromezclado. En la Figura 6-2 se muestra un esquema del reactor.



1- MIRILLA DE 4"	6- TERMOPOSO	11- ANCLA
2- ENTRADA DE VAPOR A CHAQUETA	7- CAJA DE ENGRANES	12- PATAS
3- SALIDA DE CONDENSADOS DE CHAQUETA	8- MANIVELA (desmontable)	13- CUERPO
4- ENTRADA DE AIRE A CUERPO	9- FLECHA (bipartida)	14- CHAQUETA
5- SALIDA DE AIRE DE CUERPO	10- PALETAS	15- AISLAMIENTO

Figura 6-2. Esquema del reactor de tanque horizontal con sistema de retomezclado.

El sistema de retromezclado consiste en dos propelas concéntricas que giran en dirección contrarias. Cada propela tiene una serie de baffles perpendiculares al cuerpo del reactor con un ángulo de deflexión de 45 ° aproximadamente. El movimiento de la propela externa impulsa los sólidos en una dirección muy cerca de las paredes del reactor y hacia arriba, mientras que la propela interna impulsa los sólidos en dirección opuesta cerca del eje del reactor. Esto permite que haya un mezclado homogéneo. El control de temperatura se realiza mediante el abastecimiento de agua fría o caliente en el doble cuerpo (chaqueta). Posee puertos de suministro de aire, salida de aire, entrada y salida de agua o vapor, todos de ½ pulgada. Cuenta con 4 termo pozos para registro de temperatura.

El volumen de operación fue entre 20 % y 30 % del volumen total, (entre 1.2 y 1.8 L). El tanque del reactor se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. La aireación fue de 600 mL/min (1 VKgM). La temperatura de incubación fue de 37.5 °C. Se colocaron termopares a la entrada y a la salida de la corriente de aire y en la superficie interna del reactor a 5 cm del inicio y del final del tanque. Las condiciones del soporte se ajustaron a 65% de humedad inicial y el tamaño de inóculo de 2×10^7 esporas/gms. En los cultivos con *R. microsporus*, se inoculó con micelio crecido en medio líquido y se adicionó al 5 % v/v.

6.1.9. Monitoreo de la temperatura en los reactores de tanque horizontal

En el reactor de tanque horizontal se monitoreó la temperatura a través de 4 termopares tipo “J” colocados en diferentes posiciones del reactor (Figura 6-3). Uno se colocó en la entrada de aire al reactor, otro a la salida y dos fueron colocados en la parte inferior del reactor a 5 cm de la entrada y de la salida respectivamente.

6.1.10. Evaluación del efecto de la agitación en el reactor de tanque horizontal

Para evaluar el efecto de la agitación sobre la producción de CO₂ por *A. versicolor* y *R. microsporus* se utilizó el sistema descrito en el apartado anterior (Figura 6-3). Ambos reactores se operaron al 25 % de su capacidad con una tasa de aireación de 600 mL/ min (1 VKgM). La intensidad de agitación fue de 3 rpm y para establecer la frecuencia de agitación se tomó como criterio el tiempo de duplicación, el cual se determinó con la siguiente expresión:

$$\varphi = t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

En donde t_d es el tiempo de duplicación y μ es la tasa específica de producción de CO₂ de los experimentos en el reactor de tanque horizontal bajo condiciones estáticas. La intensidad de agitación se determinó en base a la máxima capacidad del motor del reactor (3 rpm) y la duración del mezclado fue de 1 min según lo reportado por *Nava y col., en 2011*.

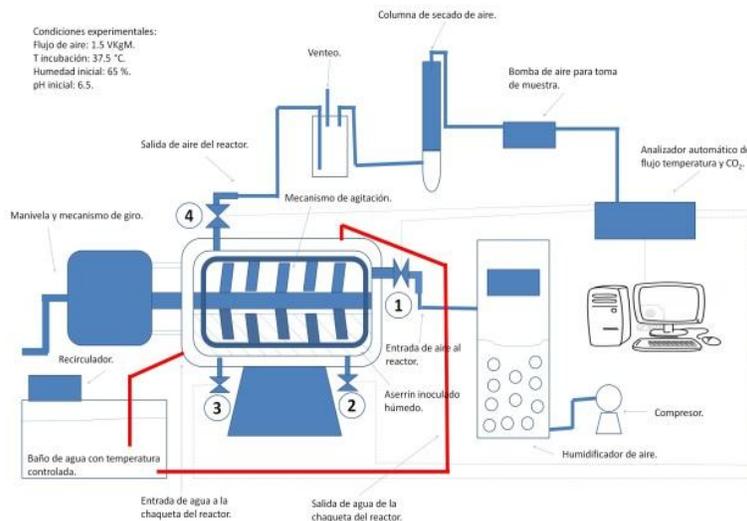


Figura 6-3. Sistema experimental de reactor de tanque agitado. 1= Temperatura del aire a la entrada del reactor (TEA); 2= Temperatura a la entrada del reactor (TE); 3= Temperatura a la salida del reactor (TS) y 4= Temperatura del aire a la salida del reactor (TSA).

6.2. Métodos analíticos

6.2.1. Respirimetría

Se utilizó la producción de CO₂ como indicador del crecimiento de ambos microorganismos. El aire proveniente de un compresor se hizo pasar a través de agua (destilada) para humidificarlo. El aire húmedo se introdujo en ambos tipos de reactores para suministrar el O₂ necesario para la respiración del microorganismo y remover el CO₂ y parte del calor generado por la actividad metabólica del mismo. El aire a la salida de los reactores se hizo pasar por un condensador y por una columna empacada con sílica-gel para deshidratarlo. El aire seco pasó a través de un medidor de flujo, un analizador automático de CO₂ y por último un analizador de O₂. Las concentraciones de CO₂ y O₂ se obtuvieron en porcentaje (mL/100mL aire). (*Saucedo-Castañeda y col., 1994*)

6.2.2. Capacidad de retención de agua

En un matraz Erlenmeyer seco y tarado de 150 mL se pesaron aproximadamente 3g de aserrín seco (<2 % humedad) y se adicionaron 50 mL de agua destilada. Se incubó a 30 °C por 2 h en condiciones estáticas. Posteriormente, se escurrió el líquido con la ayuda de una gasa fijada a la boca del matraz hasta que no hubo más escurrimiento. Se pesó cada uno de los matraces con soporte húmedo y se determinó la cantidad máxima de agua retenida por gramo de soporte seco.

6.2.3. Isotherma de adsorción

Se secó una muestra de aserrín a 100 °C por 2 h. Se mezclaron las cantidades de agua y aserrín seco necesarias para alcanzar diferentes niveles de humedad (desde 5 % hasta 75 %) en un recipiente hermético. Se dejaron reposar por 10 min. Cada nivel de humedad se verificó experimentalmente y se midió la actividad

de agua. Por último se graficó el contenido de agua en función de la actividad de agua (*Gálvez y col., 2006*).

6.2.4. Humedad

La humedad se determinó gravimétricamente con un analizador automático de humedad *OHAUS* MB45.

6.2.5. Actividad de agua (a_w)

Se determinó con el equipo Aqualab CX-2 el cual se basa en el punto de rocío sobre un espejo frío.

6.2.6. Determinación de pH

Se pesó aproximadamente 1 g de soporte (inicial y final) en un tubo Corning de 50 mL. Se adicionaron 10 mL de agua y se agitó en vórtex durante 1 min. Se dejó reposar por 5 min y se midió el pH con un potenciómetro Conductronic pH 20 directamente en el sobrenadante (*Nava, 2003*).

6.2.7. Determinación de sacarosa

Del extracto obtenido para la medición del pH se recuperó 1 mL y se centrifugó a 5000 rpm por 3 min. Del sobrenadante se hizo una dilución adecuada, se agregaron 2 mL de solución de fenol en ácido sulfúrico 1 mg/mL y se llevó a ebullición por 10 min. Se dejó enfriar y se leyó en espectrofotómetro a 480 nm. Como estándar se utilizó una solución de sacarosa ó glucosa 1 mg/mL (*Martínez-Ruíz, 2005*).

6.2.8. Actividad enzimática

Se midieron tres diferentes actividades enzimáticas.

6.2.8.1. *Celulasa (U_c)*

Para la actividad celulasa se utilizó como sustrato una solución 0.25 % de carboximetilcelulosa (CMC) en buffer de citratos pH 5.2. Del extracto obtenido se tomó una alícuota de 100 μ L y se diluyó en 900 μ L de solución de sustrato. La reacción se llevó a cabo a 40 °C y duró 15 min. Para finalizar la reacción se adicionaron 1.5 mL de DNS, se llevó a ebullición por 10 min y se dejó enfriar. Se leyó a 480 nm en espectrofotómetro. Como control se utilizó agua destilada y como estándar una solución de glucosa 1 mg/mL. Una unidad de actividad enzimática (U_c) corresponde a la cantidad de enzima necesaria para liberar una micromol de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones de ensayo.

6.2.8.2. *Xilanasa (U_x)*

Para la actividad xilanasa se utilizó como sustrato una solución al 0.25 % de xilano de abedul en buffer de citratos pH 5.2. Del extracto obtenido se tomó una alícuota de 100 μ L y se diluyó en 900 μ L de solución de sustrato. La reacción se llevó a cabo a 40 °C y duró 30 min. Para finalizar la reacción se adicionaron 1.5 mL de DNS, se llevó a ebullición por 10 min y se dejó enfriar. Se leyó a 480 nm en espectrofotómetro. Como control se utilizó agua destilada y como estándar una solución de xilosa 1 mg/mL. Una unidad de actividad enzimática (U_x) corresponde a la cantidad de enzima necesaria para liberar una micromol de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones de ensayo.

6.2.8.3. *Invertasa (U_i)*

Para la actividad invertasa se utilizó como sustrato una solución 0.1 M de sacarosa en buffer de acetatos pH 5.0. Del extracto obtenido se tomó una alícuota de 100 μ L y se diluyó en 900 μ L de solución de sustrato. La reacción se llevó a cabo a 50 °C y duró 10 min. Para finalizar la reacción se adicionaron 1.5 mL de DNS, se llevó a ebullición por 10 min y se dejó enfriar. Se leyó a 480 nm en espectrofotómetro. Como control se utilizó agua destilada y como estándar una solución de glucosa 1 mg/mL. Una unidad de actividad enzimática (U_i) corresponde a la cantidad de enzima necesaria para liberar una micromol de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones de ensayo (*Martínez-Ruíz, 2005*).

6.2.9. Determinación de ácido cítrico

El ácido cítrico se cuantificó por HPLC (Perkin Elmer LC250) con una columna Phenomenex para monómeros y ácidos orgánicos acoplada a un detector de índice de refracción, 60 °C, flujo fue de 0.6 mL/min y agua como fase móvil. Como estándar se utilizó una solución de ácido cítrico 1 mg/mL y para verificar la separación se utilizó una mezcla de ácido cítrico y glucosa a 1 mg/mL.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo está dividido en tres secciones. En la primera se justifica la selección de los microorganismos y soporte, en la segunda se describe la estrategia que se utilizó para estimar los parámetros cinéticos y en la tercera se muestra el efecto de la temperatura y de la agitación en la producción de CO₂ en los cultivos con ambos microorganismos.

7.1. Selección de los microorganismos y soporte

Los estudios relacionados con el efecto de la agitación mecánica sobre el perfil respiratorio de los hongos evaluados en este trabajo se realizaron en biorreactores a nivel laboratorio de 5 L de capacidad, por lo que, los microorganismos seleccionados debieron presentar un cierto grado de termotolerancia. Por otra parte, el soporte utilizado tuvo que ser resistente a la agitación mecánica y en la medida de lo posible mantener una estructura dispersa bajo estas condiciones.

7.1.1. Selección de los microorganismos

Diversos factores afectan el diseño y la operación de los cultivos en medio sólido. Entre otros, la selección de las cepas y el soporte (o soporte-sustrato) es fundamental (*Pandey y col., 2000*). En el cultivo en medio sólido se simulan las condiciones de vida de hongos filamentosos que se desarrollan en hábitats terrestres sobre sustratos húmedos (*Hölker y Lenz, 2005*). Su crecimiento en forma de hifas les proporciona la capacidad de penetrar en el sustrato (*Pérez-Guerra y col., 2003*). Estas son las principales razones por las que los hongos son los microorganismos más utilizados en el cultivo en medio sólido. Los ficomicetos (*Mucor y Rhizopus*), ascomicetos (*Aspergillus y Penicillum*) y basidiomicetos (hongo de la pudrición blanca) son los mayormente utilizados en este tipo de

cultivos (Pandey y col, 2000). Se establecieron tres criterios para la selección de los microorganismos: Presencia y ausencia de hifas septadas, altas tasas de crecimiento para evitar contaminación bacteriana y de otros hongos y termotolerancia para evitar problemas por el incremento de temperatura en los reactores (Córdova-López y Roussos, 2001).

Como hongo septado se eligió *Aspergillus versicolor*. Este microorganismo pertenece a la clase de los ascomicetos y entre sus características está la presencia de hifas septadas (Schlegel y Zaborosch, 1997). Como hongo no septado se eligió *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (43aIV) (Hernández-Rodríguez y col., 2009). Este microorganismo pertenece a la clase de los ficomicetos que es un grupo de hongos cuyos cuerpos vegetativos carecen de septos y son uninucleados aunque las hifas estén muy ramificadas (Schlegel y Zaborosch, 1997). En la figura 7-1 se presenta una fotografía de *A. versicolor* en donde se confirma la presencia de hifas septadas y en la figura 7-2 de *R. microsporus* en donde se confirma la ausencia de hifas septadas.

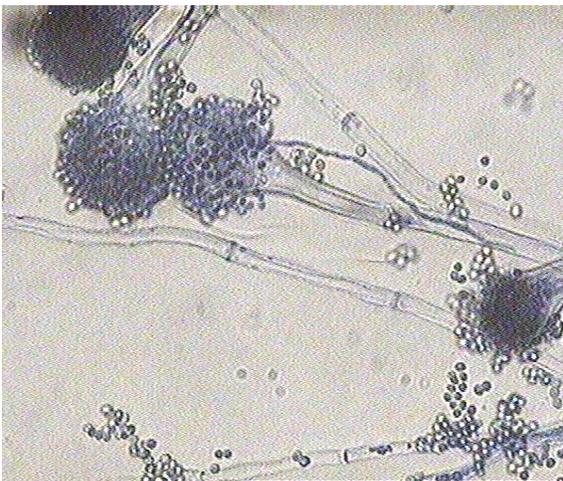


Figura 7-1. Hifas septadas de *A. versicolor* (40X).



Figura 7-2. Hifas no septadas de *R. microsporus* (40X).

7.1.2. Selección y evaluación del soporte

La capacidad de un microorganismo para crecer en un medio sólido está directamente relacionada con sus requerimientos de actividad de agua (a_w), su capacidad de adherencia y penetración en el medio sólido y su capacidad para asimilar mezclas de polisacáridos debido a la naturaleza compleja de los sustratos utilizados (*Pérez-Guerra y col., 2003*). Por otro lado, la selección del soporte depende de diversos factores, entre ellos disponibilidad y costo.

Se evaluaron cuatro materiales reportados en la literatura como soportes (soporte-sustrato). Estos fueron aserrín de madera (pino), salvado de trigo, semilla de arroz y agrolita (*Pandey y col., 2000; Martínez-Ruiz y col., 2008*). Estos soportes se eligieron por ser disponibles y de bajo costo.

7.1.2.1. Capacidad de retención de agua

La humedad es un parámetro importante en los cultivos en medio sólido por su influencia en el crecimiento, en la biosíntesis y en la secreción de algunos metabolitos (*Pérez-Guerra y col., 2003*). En los cultivos en medio sólido el soporte debe contener un nivel de humedad que no limite la actividad metabólica de los microorganismos sin llegar al escurrimiento (*Mitchell y col., 2002*). Por ello, se consideró importante elegir un soporte con alta capacidad de retención de agua (CRA). Se midió la CRA de los soportes propuestos (Figura 7-3).

Los resultados indican que la CRA de agrolita, salvado de trigo y arroz no presenta diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$). El salvado de trigo y la agrolita poseen las CRA más elevadas, 4.19 y 4.18 g/gms respectivamente. El arroz presentó una CRA de 3.68 g/gms y el aserrín tuvo la más baja con 2.88 g/gms. La CRA se puede expresar como contenido de humedad (%) y en este caso corresponde al 80 % para el salvado de trigo y la agrolita, 78 % para el arroz y 74 % para el aserrín. Los resultados obtenidos permiten concluir que los

soportes propuestos tienen CRA adecuada (alrededor de tres veces su peso) para este tipo de procesos. Los cultivos en medio sólido operan generalmente con niveles de humedad que van desde el 30 % hasta el 70 % (Mitchell y col., 2002).

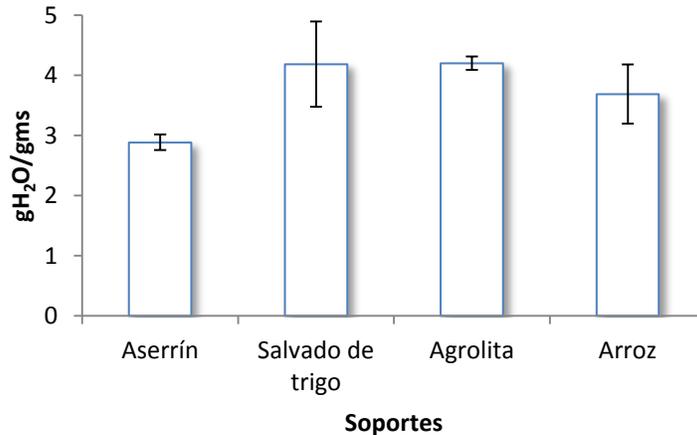


Figura 7-3. Capacidad de retención de agua de los soportes propuestos.

El arroz se sometió a un pretratamiento de cocción (121 °C, 15 min) para gelatinizar el almidón y que éste pueda ser consumido por los microorganismos. Esto puede provocar interferencias analíticas (por la degradación parcial del soporte) y operativos (disminución de tamaño de partícula, generación de gradientes de humedad, temperatura y oxígeno) (Pandey y col., 2000).

Los soportes inertes impregnados con nutrientes pueden considerarse como un medio ideal para el desarrollo de modelos matemáticos, estudios de transferencia de calor y en los estudios cinéticos (Gutiérrez-Rojas y col., 1996). Por lo tanto, en este caso convino el uso de un soporte inerte y se descartó el uso del arroz, mientras que la agrolita se descartó debido a su baja resistencia mecánica (tiende a romperse con facilidad). Esto provoca la disminución del tamaño de partícula y en consecuencia problemas de transferencia de oxígeno, agua y calor, además de daño por abrasión a los microorganismos en los biorreactores agitados

(Mitchell y col., 2002). Con base en lo anterior, se decidió evaluar el salvado de trigo y el aserrín como soportes inertes.

7.1.2.2. *Evaluación del salvado de trigo y aserrín como soportes inertes*

Con la finalidad de evitar los problemas analíticos y operativos provocados por la degradación parcial del soporte se decidió emplear un material inerte impregnado de un medio nutritivo. Por ello, en este experimento se usó salvado de trigo y aserrín impregnados con medio Czapek-Dox y sólo se evaluó el perfil respiratorio durante el cultivo de la cepa de *A. versicolor*. Ambos cultivos se llevaron a cabo en condiciones asépticas en reactores tubulares delgados (RTD). La humedad se ajustó a 65 % (Hang y Woodams, 1987) para satisfacer las necesidades de agua del microorganismo (Nagel y col., 2001), sin rebasar la CRA de ambos soportes, evitando el escurrimiento de la fase líquida y la saturación de los poros (Pandey, 1992). La tasa de aireación se mantuvo en 1 VKgM. En la figura 7-4 se presenta la tasa de producción de CO₂ (experimental) para ambos cultivos. El cultivo de *A. versicolor* sobre salvado de trigo alcanzó su tasa de producción de CO₂ máxima a las 22 h y fue de 14.88 mg/gms h, mientras en el cultivo sobre aserrín la tasa de producción de CO₂ sólo alcanzó 0.95 mg/gms h después de 40 h.

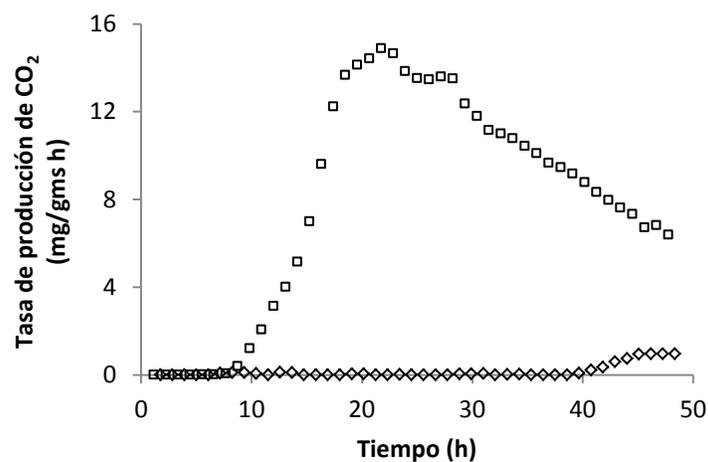


Figura 7-4. Tasa de producción de CO₂ de los cultivos de *A. versicolor* sobre salvado de trigo y aserrín. Salvado de trigo (□); aserrín (◇).

En el cultivo con salvado de trigo se observó un incremento importante de pH al final del cultivo. Por el contrario, en el cultivo sobre aserrín se observó una ligera disminución del pH al final del cultivo (Tabla 7-1).

El pH óptimo para el crecimiento y producción enzimática (lipasas y proteasas) de *A. versicolor* se reporta entre 6 y 7 (Veerabhadrapa y col., 2013). Sin embargo, no se consideró que la ausencia de crecimiento se haya debido a la variación del pH en el cultivo. Otra posible causa de la baja producción de CO₂ por *A. versicolor* sobre aserrín es la presencia de sustancias tóxicas presentes en la madera tales como la pinosilvina y el resveratrol (Lee y col. 2005).

Tabla 7-1. Condiciones iniciales y finales de los cultivos de *A. versicolor* sobre salvado de trigo y aserrín.

Soporte	pH		Humedad	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Aserrín	4.50 ± 0.03	4.18 ± 0.07	56.59 ± 1.24	55.68 ± 1.36
Salvado de Trigo	5.00 ± 0.04	6.49 ± 0.02	62.32 ± 0.98	69.44 ± 0.88

Con relación al contenido de humedad del soporte durante el cultivo; ésta se mantuvo prácticamente constante en el caso del aserrín, mientras que aumentó considerablemente en el cultivo con salvado de trigo.

Aunque el cultivo sobre salvado de trigo resultó ser mejor, se observó la formación de aglomerados de partículas de diferentes tamaños difíciles de disgregar debido a la naturaleza del soporte y al abundante micelio. Este fenómeno conduce a una alta heterogeneidad en los biorreactores, genera gradientes de temperatura, pH y humedad y en consecuencia limita la reproducibilidad entre experimentos (Raimbault, 1998).

Aunque el crecimiento sobre aserrín fue prácticamente nulo, este material cumple con todas las características requeridas; es fácilmente accesible, es de bajo

costo, posee una CRA adecuada y presenta una excelente resistencia mecánica. Además, debido a su composición, cercana al 55 % de carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y 27 % de lignina (López-Miranda y col., 2009) puede ser considerado como un soporte inerte cuando se impregna con un medio de cultivo balanceado con una fuente de carbono de fácil asimilación. Por lo anterior, se decidió evaluar el efecto del lavado del aserrín sobre el perfil respiratorio de *A. versicolor*.

7.1.2.3. *Efecto del lavado del aserrín sobre la producción de CO₂ en cultivos de A. versicolor*

Se ha reportado la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana y antifúngica en la madera de pino (Lee y col., 2005). Por otro lado, en experimentos cualitativos se observó que la fase *lag* de cultivos de *A. versicolor* que crecen sobre aserrín sin pretratar (sin lavar) se alargó hasta 32 h, mientras que una cepa de *A. niger* creciendo sobre el mismo soporte pero pretratado (lavado) presenta una fase *lag* de tan solo 12.5 h. Por ello, se decidió evaluar el efecto del pretratamiento del soporte sobre la producción de CO₂ por *A. versicolor*. El pretratamiento consistió en un lavado con agua caliente y fría descrito en la sección de métodos y materiales (capítulo 6). En la Figura 7-5 se presenta la tasa de producción de CO₂ (experimental) de un cultivo de *A. versicolor* sobre aserrín lavado y sin lavar. Los resultados indican que, en comparación con los valores obtenidos con salvado de trigo (Fig. 7-4) la tasa de producción de CO₂ en ambos casos es muy baja. El análisis de varianza de la tasa de producción de CO₂ máxima indica que no hay diferencia significativa entre los dos cultivos. La tasa de producción de CO₂ máxima para el cultivo sobre aserrín lavado fue de 1.69 mg/gms h y para el cultivo sobre aserrín sin lavar fue de 1.55 mg/gms h. Sin embargo, se observó que disminuyó significativamente la fase *lag* en el cultivo sobre aserrín lavado y fue de 23 h, mientras que en el cultivo sobre aserrín sin lavar la fase *lag* se alargó hasta las 42 h, lo cual corresponde con lo encontrado en experimentos anteriores (Fig. 7-4).

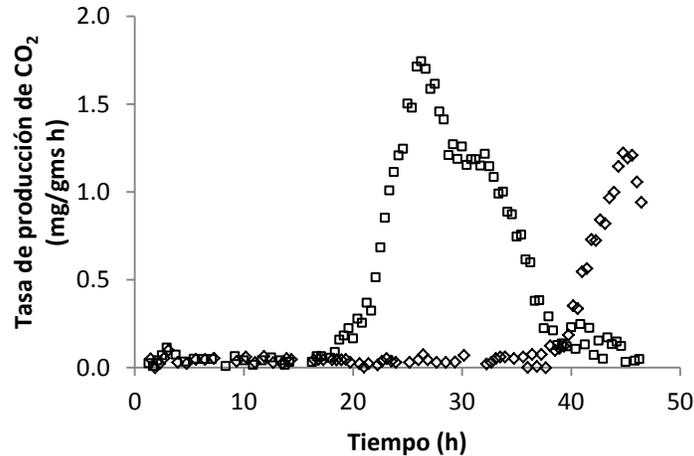


Figura 7-5. Efecto del lavado sobre la tasa de producción de CO₂ de *A. versicolor* sobre aserrín. Lavado (□) y sin lavar (◇).

En la Tabla 7-2 se muestran las condiciones de humedad y pH iniciales y finales de ambos cultivos.

Tabla 7-2. Condiciones iniciales y finales de los cultivos de *A. versicolor* sobre aserrín lavado y sin lavar.

Soporte	pH		Humedad	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Aserrín lavado	5.59 ± 0.03	3.82 ± 0.25	58.55 ± 0.88	59.11 ± 0.62
Aserrín sin lavar	4.29 ± 0.07	4.12 ± 0.04	59.16 ± 2.43	55.82 ± 0.35

Se observa que en el cultivo sobre aserrín lavado el pH inicial fue mayor (en más de 1 unidad) que en el aserrín sin lavar, debido a la remoción de sustancias ácidas contenidas en la madera (i.e. ácido abiótico). Sin embargo, el pH disminuyó a lo largo del cultivo. Es común que los cultivos de *Aspergillus* y *Rhizopus* presenten un rápido descenso del pH (debajo de 3.0) debido a la producción de ácidos orgánicos. Usar una mezcla de sales de amonio y urea es una estrategia para el control del pH en los cultivos. La hidrólisis de la urea libera amoniaco que contrarresta la rápida acidificación causada por el consumo del ion amonio (Raimbault, 1998).

7.1.2.4. Control del pH en el cultivo de *A. versicolor* sobre aserrín

Con la finalidad de mantener el pH controlado durante el cultivo se decidió evaluar el efecto de la adición de una mezcla de sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ y urea $(\text{CH}_4\text{N}_2\text{O})$ en el medio Czapek-Dox (Pérez-Guerra y col., 2003). Por otro lado, se evaluó la adición de una mezcla de fosfato de potasio monobásico y dibásico $(\text{KH}_2\text{PO}_4$ y $\text{K}_2\text{HPO}_4)$ como agente amortiguador (Baysal y col., 2003). La composición de los medios empleados se encuentra en la sección de métodos y materiales. En la Figura 7-6 se presenta la tasa de producción de CO_2 del cultivo de *A. versicolor* sobre aserrín con medio Czapek-Dox con sulfato de amonio y urea (NU) y Czapek-Dox con fosfato de potasio mono y dibásico (MP). Con ambas estrategias se logró mayor producción de CO_2 y (5 veces más aproximadamente que en el experimento de la sección 7.1.2.3). El análisis de varianza indica que no hay diferencias significativas entre estos dos tratamientos.

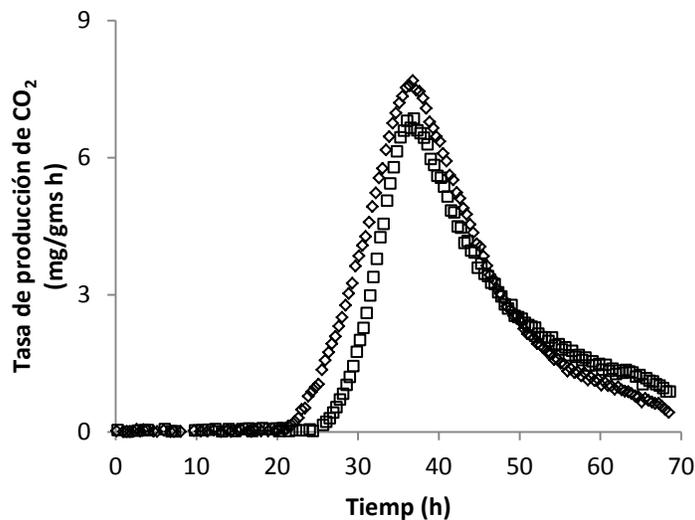


Figura 7-6. Efecto del medio de cultivo sobre la tasa de producción de CO_2 de *A. versicolor* sobre aserrín. Czapek-Dox (MP) (\diamond) y Czapek-Dox (NU) (\square).

La tasa de producción de CO_2 máxima en los dos cultivos se alcanzó cerca de las 36 h y fue de 7.68 mg/gms h para el medio Czapek-Dox (MP) y de 6.85 mg/gms h

para el medio Czapek-Dox (NU). En la Tabla 7-3 se presentan las condiciones de humedad y pH iniciales y finales.

Tabla 7-3. Condiciones iniciales y finales del cultivo de *A. versicolor* sobre aserrín con medio Czapek-Dox (UN) y Czapek-Dox (MP).

Soporte	pH		Humedad	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Czapek-Dox (MP)	4.87 ± 0.08	5.91 ± 0.09	58.35 ± 2.56	61.65 ± 3.23
Czapek-Dox (NU)	4.97 ± 0.07	3.07 ± 0.13	59.34 ± 0.68	60.02 ± 0.78

Con el medio Czapek-Dox (MP) se logró mantener el pH del cultivo dentro del intervalo adecuado para el crecimiento de *A. versicolor* que es entre 6 y 7 como se mencionó anteriormente (Veerabhadrapa y col., 2013). En el caso del medio Czapek-Dox (NU) el pH disminuyó al final del cultivo aunque esto puede deberse a que primero se metabolizó la urea permitiendo el desarrollo del hongo y posteriormente, se consumió el sulfato de amonio provocando la acidificación del medio (Raimbault, 1998).

En la Figura 7-7 se presenta el gráfico de producción de CO₂. Los valores experimentales se ajustaron con el modelo logístico (Okazaki y col., 1980). La producción más alta de CO₂ se alcanzó en el cultivo con medio Czapek-Dox (MP) y fue de 135.52 mg/gms, mientras que con el medio Czapek-Dox (NU) la producción de CO₂ fue de 115.14 mg/gms lo que no representó diferencia significativa. A partir del ajuste con el modelo logístico se estimaron los parámetros cinéticos (Tabla 7-4). En base a los resultados se decidió utilizar tentativamente el medio Czapek-Dox (MP) para los siguientes experimentos.

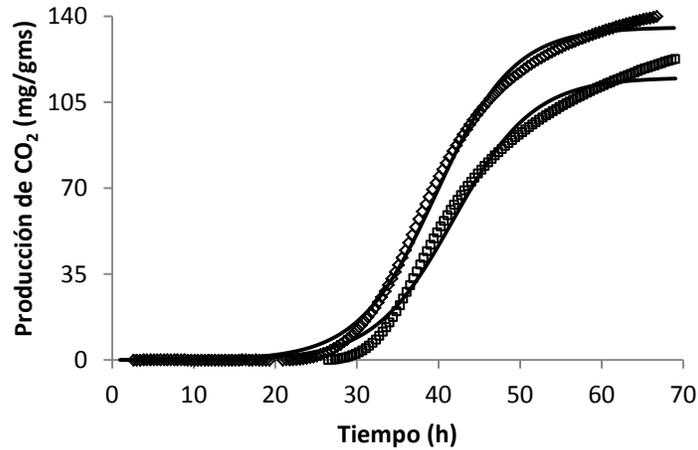


Figura 7-7. Efecto del medio de cultivo sobre la producción de CO₂ de *A. versicolor* sobre aserrín. Czapek-Dox (MP) (∇) y Czapek-Dox (NU) (□). Las líneas continuas corresponden al ajuste de los datos con el ML.

Cabe mencionar que se observaron dos problemas para llevar a cabo el ajuste con el ML. Primero, la falta de un criterio adecuado para establecer la simetría de los datos, por lo que el modelo subestima algunos parámetros (*Okazaki y col., 1980*). El segundo es que la producción de CO₂ (experimental) nunca se vuelve asintótica, sino que continua incrementándose al final del cultivo (*Saucedo-Castañeda y col., 1994*).

Tabla 7-4. Parámetros cinéticos estimados del cultivo de *A. versicolor* sobre aserrín impregnado con medio Czapek-Dox (NU) y Czapek-Dox (MP) con el ML.

Parámetro	Medio de cultivo	
	Czapek-Dox (MP)	Czapek-Dox (NU)
$P_{CO2_{final}}$ (mg/gms)	135.49 ± 7.91	115.03 ± 10.29
μ (h ⁻¹)	0.21 ± 0.003	0.21 ± 0.01
$r_{CO2_{max}}$ (mg/gms h)	7.11 ± 0.002	5.97 ± 0.71
<i>lag</i> (h)	29.97 ± 0.35	32.11 ± 1.08
R ²	> 0.99	> 0.92

7.1.3. Caracterización física de aserrín

Se construyó la isoterma de adsorción graficando el contenido de agua en función de la actividad de agua (a_w) a temperatura constante (procedimiento descrito en la sección 6); obteniendo los resultados presentados en la Figura 7-8 (Al-Muhtaseb y col., 2002). Los datos obtenidos se ajustaron al modelo de Henderson (Gálvez y col., 2006) ya que este fue el que presentó el mejor coeficiente de correlación ($R^2 = 0.91$) de 7 modelos probados (GAB, BET, Caurie, Smith, Oswim y Halsey). El modelo de Henderson se presenta a continuación:

$$X_w = A * \left[\frac{-\log(1-a_w)}{10^f} \right]^{1/n} = 0.019 * \left[\frac{-\log(1-a_w)}{10^{0.856}} \right]^{1/1566.511}$$

En donde X_w es el contenido de agua calculado, a_w la actividad de agua y los valores de A , f y n son parámetros del modelo de Henderson característicos para el aserrín (Gálvez y col., 2006). La isoterma resultante es del tipo III de acuerdo a la clasificación de Brunauer y col., 1940.

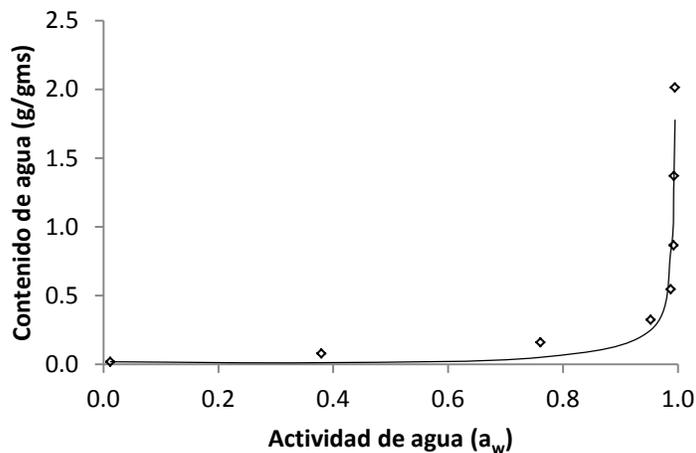


Figura 7-8. Isotherma de adsorción del sistema aserrín-agua a 25 °C. Contenido de agua experimental (\diamond) y ajuste al modelo de Henderson (—).

Entre los valores de actividad de agua 0.012 y 0.953 el contenido de agua aumenta lentamente de 0.019 hasta 0.323 g/gms (1.87 % - 24.43 %). Esto se debe a que el agua retenida por el soporte se encuentra formando una multicapa de moléculas alrededor de las partículas del sólido. Esta agua está disponible sólo para disolver algunos solutos de bajo peso molecular y algunas reacciones bioquímicas pero no para el crecimiento microbiano (*Al-Muhtaseb y col., 2002*).

Por arriba de 0.988 de actividad de agua, el contenido de agua aumenta rápidamente hasta alcanzar la CRA del soporte (35.29 % - 74.00 %) ya que el agua se encuentra retenida en macro capilares y tiene prácticamente las propiedades del agua líquida. Esta agua está disponible como disolvente y para el metabolismo microbiano (*Al-Muhtaseb y col., 2002*).

Por lo tanto, concluimos que un contenido de agua por arriba de 0.545 g/gms (35.287 %) asegura una actividad de agua mayor a 0.95. Esto es importante porque se considera que la actividad de agua mínima requerida para el crecimiento de hongos filamentosos no xerófitos es de 0.95 (*Figueroa-Montero, 2011*). Con base en lo anterior establecimos como criterio que el nivel de humedad tanto en los cultivos de *A. versicolor* como en los de *R. microsporus* debe estar entre 35 % y 74 %. En todos los cultivos se ajustó el nivel de humedad a 65 % para satisfacer las necesidades de agua del microorganismo (*Nagel y col., 2001*), sin rebasar la CRA del aserrín, evitando el escurrimiento de la fase líquida y la saturación de los poros (*Pandey, 1992*).

7.1.4. Efecto del tamaño de partícula en la producción de CO₂ por *A. versicolor*

El tamaño de partícula es de gran importancia en el desarrollo de los cultivos en medio sólido. Con tamaños de partícula pequeños se tiene una gran área superficial pero disminuye la porosidad intra-partícula. Por el contrario, con tamaños de partícula grandes la porosidad intra-partícula es grande pero el área superficial es pequeña. Este factor es el que probablemente determina un

crecimiento y producción enzimática óptimos (Baysal y col., 2003). El aserrín se tamizó y se midió su distribución de tamaños de partícula (Figura 7-9).

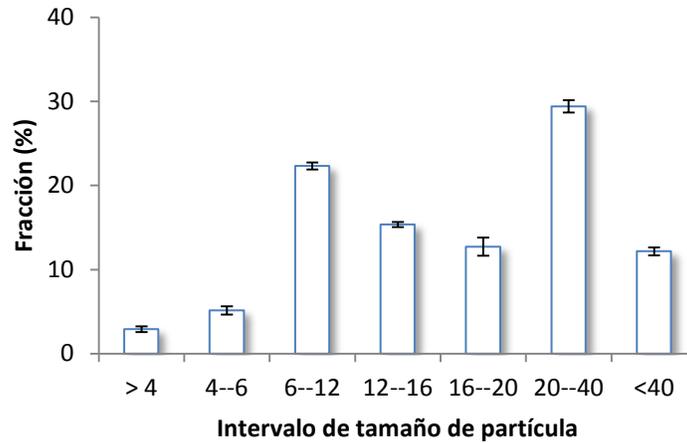


Figura 7-9. Distribución de tamaños de partícula del aserrín.

Se colectó el intervalo de tamaños de partícula que pasan malla 6 y se retienen en malla 40, equivalente a 3.36 mm y 0.42 mm (Sigma-Aldrich, Particle Size Conversion Table). Se eligió este intervalo de tamaños de partícula debido a que representa el 80 % del peso total del aserrín. El tamaño de partícula afecta la tasa de crecimiento, la penetración de aire, la remoción de CO₂ y calor y debe compensar entre la accesibilidad de los nutrientes y la disponibilidad de oxígeno. En cultivos en medio sólido frecuentemente se utiliza una distribución de tamaño de partícula de 1 mm – 10 mm (Manpreet y col., 2005). Se ha reportado que intervalos del tamaño de partícula entre 0.18 mm y 1.4 mm mejoran la productividad (Pandey, 1992).

Se evaluó el perfil respiratorio de *A. versicolor* sobre diferentes tamaños de partícula, los cuales fueron 6-12 (3.36 mm – 1.68 mm), 12-16 (1.68 mm – 1.19 mm), 20-40 (0.841 mm – 0.420 mm) y 6-40 (3.36 mm – 0.42 mm). En la Figura 7-10 se muestra la tasa de producción de CO₂ de cultivos de *A. versicolor* sobre diferentes fracciones de tamaño de partícula de aserrín.

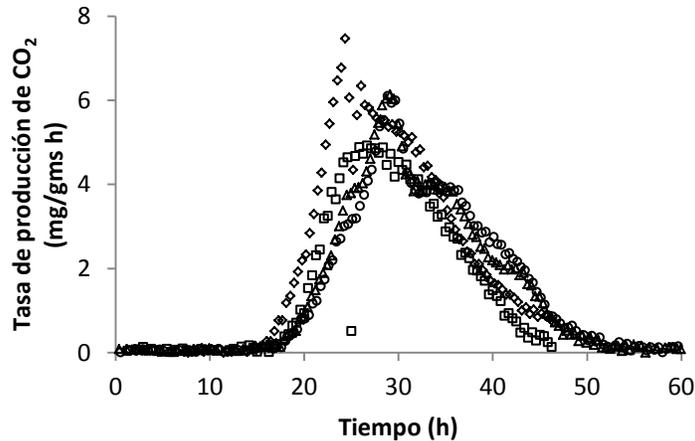


Figura 7-10. Efecto del tamaño de partícula sobre la tasa de producción de CO₂ de *A. versicolor*. Mallas: 6-12 (□); 12-16 (◇); 20-40 (Δ) y 6-40 (○).

La tasa de producción de CO₂ máxima obtenida con el tamaño de partícula 12-16 fue la más alta (7.47 mg/gms h) y resultó significativamente mayor que las demás. Para las mallas 20-40, 6-40 y 6-12 la tasa de producción de CO₂ máxima fue de 6.19 mg/gms h, 6.09 mg/gms h y 5.013 mg/gms h respectivamente.

Aunque la mayor producción de CO₂ se obtiene con la fracción 12-16, esta representa tan sólo el 20 % del peso total del aserrín y, por otro lado, la tasa de producción de CO₂ máxima en la fracción 6-40 representa más del 80 % de la tasa de producción de CO₂ máxima alcanzada con la fracción 12-16. Por lo anterior, se decidió hacer un compromiso entre obtener la tasa máxima de producción de CO₂ más elevada y utilizar la mayor cantidad de aserrín posible. Es por esta razón que en todos los experimentos se utilizó la fracción 6-40 (Manpreet y col., 2005).

En este caso se logró controlar el pH. Los resultados se muestran en la Tabla 7-5. En los cultivos con malla 6-12 y 12-16 el pH se mantuvo dentro del rango óptimo de producción de CO₂ (Veerabhadrapa y col., 2013). Sin embargo, en los cultivos sobre malla 20-40 y 6-40 el pH se elevó.

Tabla 7-5. Condiciones iniciales y finales del cultivo de *A. versicolor* sobre diferentes tamaños de partícula de aserrín.

Tamaño de partícula	pH		Humedad	
	Inicial	Final	Inicial	Final
6-12	6.85 ± 0.42	6.01 ± 0.00	57.87 ± 0.66	60.15 ± 0.54
12-16	6.93 ± 0.01	6.52 ± 0.11	60.55 ± 0.03	63.47 ± 0.81
20-40	6.49 ± 0.01	9.10 ± 0.09	57.05 ± 0.47	60.69 ± 0.22
6-40	6.43 ± 0.02	8.84 ± 0.04	57.43 ± 0.01	60.26 ± 0.21

El incremento en el pH puede deberse a proteólisis como una adaptación fisiológica al estrés metabólico debido a un exceso en la duración del cultivo (Viniestra-González y col., 2003) ya que este experimento se llevó a cabo en dos etapas, la primera con duración de 50 h aproximadamente y la segunda de 65 h (para evaluar la producción de enzimas lignocelulósicas). En la Figura 7-11 se presenta la producción de CO₂ de los cultivos de *A. versicolor* con diferentes tamaños de partícula de aserrín.

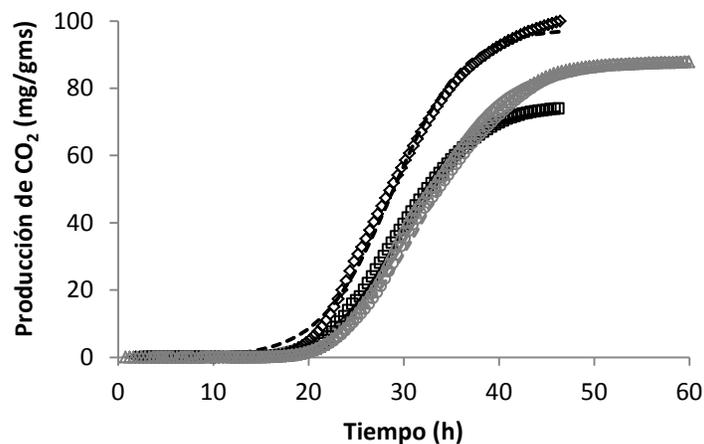


Figura 7-11. Efecto del tamaño de partícula sobre la producción de CO₂ de *A. versicolor*. Mallas: 6-12 (□); 12-16 (◇); 20-40 (Δ) y 6-40 (○) Las líneas resultan del ajuste con el modelo logístico.

La producción de CO₂ más alta se alcanzó con el cultivo de *A. versicolor* sobre aserrín malla 12-16 y fue de 97.67 mg/gms. Los parámetros cinéticos estimados a través del modelo logístico se presentan en la tabla 7-6. Cabe mencionar que se tuvieron los mismos problemas para llevar a cabo el ajuste que en el experimento anterior (sección 7.1.5).

Tabla 7-6. Parámetros cinéticos estimados del cultivo de *A. versicolor* sobre aserrín de diferentes tamaños de partícula con el ML.

Parámetro	Tamaño de partícula			
	6-12	12-16	20-40	6-40
$P_{CO_2_{final}}$ (mg/gms)	73.58 ±	97.67 ±	87.11 ±	87.16 ±
	2.04	4.09	4.80	4.81
μ (h ⁻¹)	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.00	0.24 ± 0.00	0.23 ± 0.00
$r_{CO_2_{max}}$ (mg/gms h)	5.01 ± 0.05	7.47 ± 0.23	6.18 ± 0.27	6.10 ± 0.44
<i>lag</i> (h)	19.01 ±	17.39 ±	19.03 ±	19.39 ±
	0.40	0.15	0.81	0.08
R ²	0.999	0.998	0.999	0.999

Se observa que la tasa específica de producción de CO₂ (μ) es significativamente mayor en las mallas 6-12 y 12-16 que en las mallas 20-40 y 6-40. Por otro lado, se observó una disminución importante en la fase *lag* con la malla 12-16 que fue de 17 h aproximadamente, mientras que entre las mallas restantes no hubo diferencia significativa.

7.1.5. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de CO₂ por *R. microsporus*

Se inició la propagación de la cepa de *R. microsporus* y en una serie de experimentos cualitativos (en matraces) se observó que no hubo crecimiento de este hongo sobre aserrín impregnado con medio Czapek-Dox (MP). Se decidió evaluar el efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento de *R. microsporus* ya que las fichas técnicas comerciales del medio Czapek-Dox indican que éste es recomendado para hongos capaces de consumir nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno (Difco™ & BBL™). Se evaluó la producción de CO₂ con medio Sabouraud (glucosa como fuente de carbono y polipeptona como fuente de nitrógeno), medio Czapek-Dox (MP) y medio Czapek-Dox (NU). En la Figura 7-12 se muestra el gráfico de la tasa de producción de CO₂ para estos cultivos.

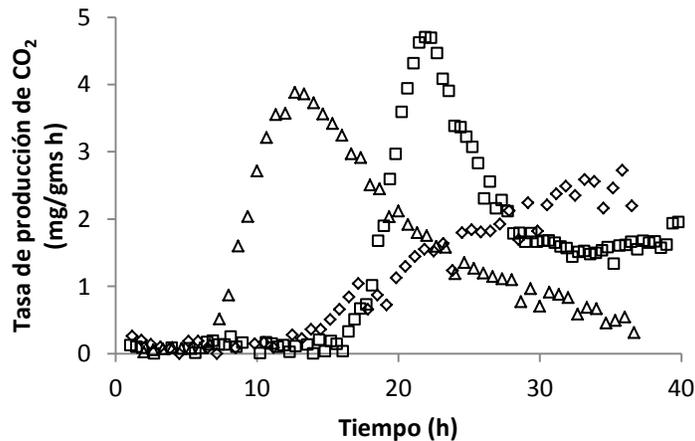


Figura 7-12. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la tasa de producción de CO₂ de *R. microsporus*. Medio Sabouraud (Δ), Czapek-Dox (MP) (◇) y Czapek-Dox (NU) (□).

La tasa de producción de CO₂ máxima más alta se obtuvo con el medio Czapek-Dox (NU) y fue de 4.70 mg/gms h. Sin embargo, se observó que la fase lag se alargó hasta las 17 h aproximadamente. La tasa de producción de CO₂ máxima con medio Sabouraud fue de 3.88 mg/gms h y resultó ser significativamente

menor respecto al medio Czapek-Dox (NU). La producción de CO₂ sobre Czapek-Dox (MP) fue muy baja y el cultivo se alargó por casi 40 h sin alcanzar su tasa de producción de CO₂ máxima. Esto se debe a que *R. microsporus* no es capaz de consumir nitrato de sodio como fuente de nitrógeno (Sorenson y Hesseltine, 1966) y el poco crecimiento obtenido fue, tal vez, gracias al extracto de levadura. En la Figura 7-13 se presenta la gráfica de producción de CO₂ y el ajuste por intervalos discretos al modelo logístico de los cultivos sobre medio Sabouraud y Czapek-Dox (NU).

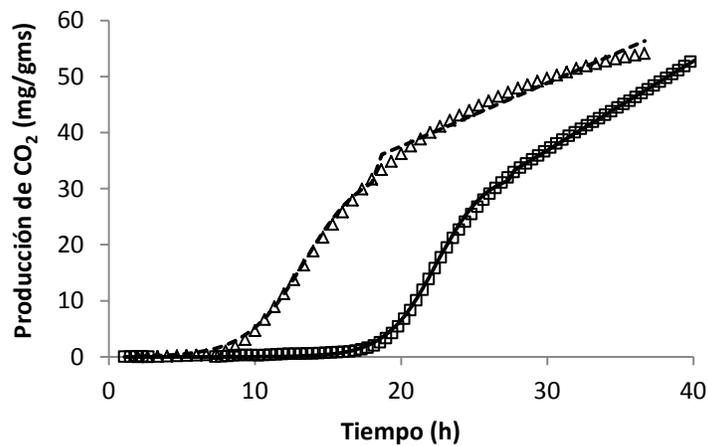


Figura 7-13. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de CO₂ de *R. microsporus*. Medio Sabouraud (Δ) y Czapek-Dox (UN) (□).

En la tabla 7-7 se presentan los parámetros cinéticos estimados a través del ajuste por intervalos discretos al modelo logístico (este procedimiento se explica en la sección 7.2).

Tabla 7-7. Parámetros cinéticos estimados del cultivo de *R. microsporus* sobre medio Sabouraud y Czapek-Dox (NU) con el ML.

Parámetro	Medio de cultivo	
	Sabouraud	Czapek-Dox (UN)
$P_{CO2_{final}}$ (mg/gms)	66.04 ± 13.85	53.13 ± 2.54
μ (h ⁻¹)	0.50 ± 0.03	0.58 ± 0.04
$r_{CO2_{max}}$ (mg/gms h)	3.88 ± 0.69	4.75 ± 0.04
<i>lag</i> (h)	7.88 ± 0.26	16.67 ± 0.17
R ²	0.999	0.999

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que el medio Czapek-Dox (NU) (sulfato de amonio y urea como fuente de nitrógeno) es el más adecuado para el crecimiento de *R. microsporus* debido que con este medio se obtiene la tasa específica de producción de CO₂ mas alta. Por otra parte, aunque la fase *lag* es más larga, se alcanzó la tasa de producción de CO₂ más alta con este medio. Además, el medio Sabouraud es rico en glucosa por lo que está propenso a contaminación por bacterias. Y en el experimento de la sección 7.1.2.4, se demostró que el perfil respiratorio de *A. versicolor* es prácticamente igual con cualquiera de estas fuentes de nitrógeno por lo que el medio Czapek-Dox (NU) se utilizará en los biorreactores para ambas cepas. En la Tabla 7-8 se presentan los valores de pH y humedad de los cultivos. Cabe mencionar que el pH en estos experimentos se logró controlar y no hubo problemas de acidificación o alcalinización.

Tabla 7-8. Condiciones iniciales y finales de los cultivos de *R. microsporus* sobre medio Sabouraud y Czapeck-Doc (NU).

Medio de cultivo	pH		Humedad	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Sabouraud	7.01 ± 0.13	7.40 ± 0.02	54.98 ± 1.16	69.63 ± 3.89
Czapek-Dox (NU)	7.43 ± 0.21	5.04 ± 0.01	52.93 ± 0.51	60.86 ± 0.26

Los estudios realizados permitieron la selección de un soporte con características adecuadas para cumplir con los objetivos del trabajo. Adicionalmente, por su carácter termotolerante y la presencia y ausencia de septos se seleccionaron las cepas de *Aspergillus versicolor* y *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (43aIV). Por otro lado, se estableció el nivel de humedad, el medio de cultivo y el tamaño de partícula para llevar a cabo los experimentos en los reactores de tanque horizontal agitado. En el siguiente capítulo se describe la estrategia para la estimación de los parámetros cinéticos de manera reproducible en cada uno de los experimentos.

7.2. Estimación de los parámetros cinéticos

El consumo de O₂ y la liberación de CO₂ son resultado de la respiración. Este proceso metabólico sirve a los microorganismos para utilizar la mayor parte de su energía en crecimiento. Por lo tanto, estas actividades están asociadas al crecimiento y pueden ser usadas para estimar la formación de biomasa (*Raimbault, 1998*).

7.2.1. Respirómetro

En el laboratorio de Fermentación en Medio Sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana se desarrolló un sistema de monitoreo y análisis automático de la

composición de la corriente gaseosa que sale de los biorreactores denominado respirómetro.

Este equipo consta de un sistema de válvulas solenoides (ASCO, USA) controladas por un PLC (Programmable Logic Controller) que permiten el análisis de una corriente gaseosa por válvula. El flujo de aire pasa a través de un medidor de flujo, un analizador infrarrojo de CO₂ (United Phosphorous, LTD, USA), y un detector dispersivo de O₂ (United Phosphorous, LTD, USA). Los datos obtenidos son almacenados en un registrador automático (Data Logger) y procesados a través de un software analizador de datos (LabView 2009) que genera una hoja de Excel (Torres-Mancera, 2013).

7.2.2. Estimación de la tasa de producción de CO₂

Los datos se obtienen en un archivo de Excel generado por el LabView. Como resultado del análisis de la fase gaseosa se obtiene el flujo volumétrico de aire (mL/min) y la composición volumétrica de CO₂ y O₂ (mL/100 mL aire). En la figura 7-14 se presenta la concentración volumétrica de CO₂ del cultivo de *A. versicolor* con medio Czapek-Dox (MP) en una sola unidad experimental.

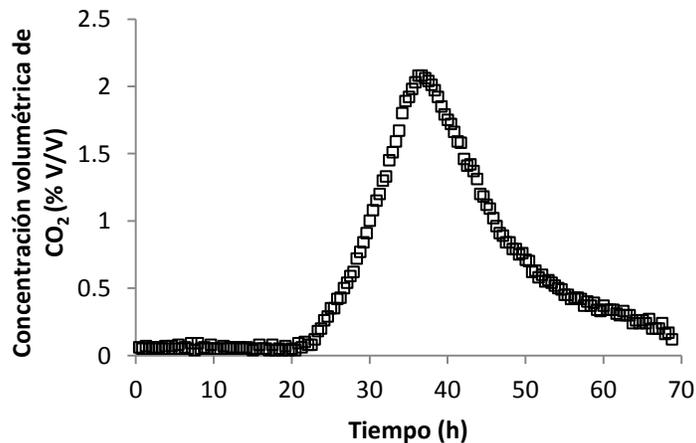


Figura 7-14. Concentración volumétrica de CO₂ en la corriente gaseosa de un cultivo de *A. versicolor* en la salida de un biorreactor tubular.

Estos datos se transforman en tasas de producción de CO₂ y consumo de O₂ mediante la ley general de los gases ideales, haciendo correcciones por presión (debidas a la altura de la ciudad de México) y temperatura (debidas a la temperatura de incubación), de acuerdo con la siguiente expresión obtenida a partir de un balance de masa y considerando que no hay acumulación:

$$r_{CO_2} = \frac{dCO_2}{dt} = \frac{(CO_{2M} - CO_{2A}) * F * CP * CT * PM_{CO_2} * Ct}{W_{msi} * V_g}$$

En donde $r_{CO_2} = \frac{dCO_2}{dt}$ es la tasa de producción de CO₂ (mg/gms h); CO_{2M} y CO_{2A} son las concentraciones de CO₂ en la corriente analizada y en el aire respectivamente (mL/100 mL aire); *F* es el flujo (mL/min); *CP* el factor de corrección por presión (0.77); *CT* el factor de corrección por temperatura ($\frac{273.15}{273.15+T_{incubación}}$); *W_{msi}* es el peso de materia seca inicial y *V_g* es el volumen que ocupa un mol de aire en condiciones estándar (22.4 mL aire/mmol aire; 1 atm y 273.15 K). Esta ecuación aplica también para hacer determinar la tasa de consumo de O₂. En la Figura 7-15 se presenta la tasa de producción de CO₂ correspondiente.

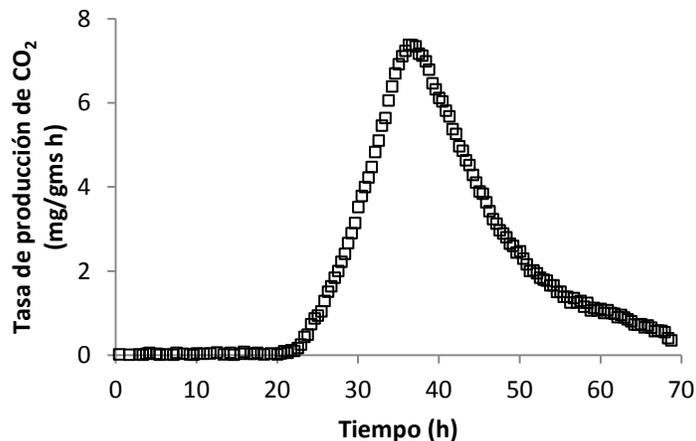


Figura 7-15. Tasa de producción de CO₂ de *A. versicolor* en un biorreactor tubular.

7.2.3. Estimación de la producción de CO₂

A partir de los datos de la tasa de producción de CO₂ se estimó la producción de CO₂ por medio de la integración con un método numérico, en este caso empleando la regla del trapecio:

$$P_{CO_2(n+1)} = \left(r_{CO_2n} * (t_{n+1} - t_n) + \left(\frac{(r_{CO_2(n+1)} - r_{CO_2n}) * (t_{n+1} - t_n)}{2} \right) \right) + P_{CO_2n}$$

En donde $P_{CO_2(n+1)}$ y P_{CO_2n} son las producciones de CO₂ (mg/gms) en el punto n+1 y en el punto n respectivamente; $r_{CO_2(n+1)}$ y r_{CO_2n} son las tasas de producción de CO₂ (mg/gms h) en los puntos n+1 y n respectivamente y t_{n+1} t_n son los tiempos (h) en los puntos n+1 y n respectivamente.

En la Figura 7-16 se presenta la curva de producción de CO₂, tomando como ejemplo el cultivo de *A. versicolor* en medio Czapek-Dox (MP).

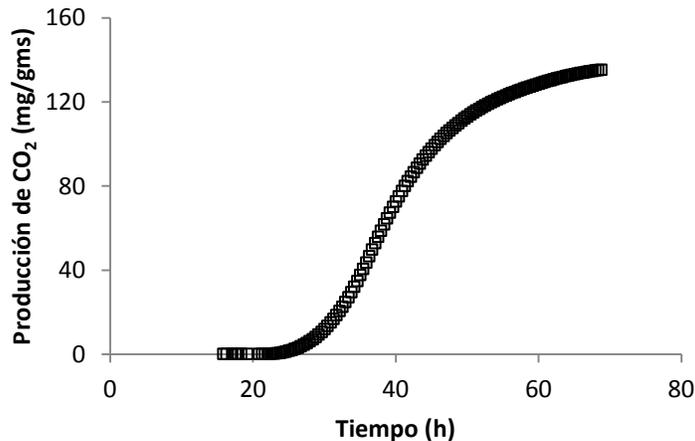


Figura 7-16. Producción de CO₂ en un cultivo de *A. versicolor* en un biorreactor tubular.

Ahora estimar los parámetros cinéticos asociados a la respiración del microorganismo y relacionarlo de manera indirecta con el crecimiento (*Raimbault*,

1980) a través del ajuste de los datos experimentales a un modelo no estructurado. Existen varios modelos no estructurados para llevar a cabo este procedimiento (Exponencial, Gompertz, etc), en este trabajo utilizaremos el modelo logístico propuesto por *Okazaki y col., 1980*.

7.2.4. Ajuste con el modelo logístico

Con los valores de producción de CO₂ se hizo un ajuste al modelo logístico (*Hamidi-Esfahani y col., 2004*) utilizando la función Solver de Excel. El modelo, en su forma integral, se muestra a continuación:

$$P_{CO_2}(t) = \frac{P_{CO_2_{final}}}{1 + (C * e^{-\mu t})}$$

En donde $P_{CO_2}(t)$ es la producción de CO₂ calculada al tiempo t (mg/gms); $P_{CO_2_{final}}$ es la producción de CO₂ alcanzada al final del cultivo (mg/gms); μ es la tasa específica de producción de CO₂ (h⁻¹) y t es el tiempo (h). En la Figura 7-17 se presenta la curva de producción de CO₂ ajustada a través del modelo logístico.

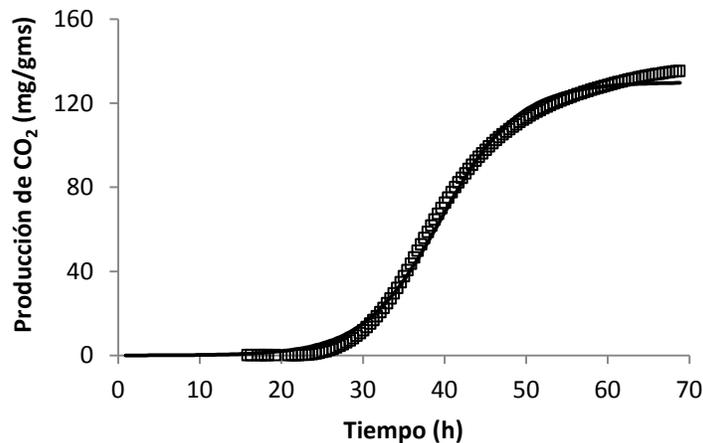


Figura 7-17. Ajuste de los datos de producción de CO₂ al modelo logístico. Experimental (□) y Ajuste (—).

Se puede apreciar que el modelo logístico describe de manera adecuada la primera parte del cultivo. Sin embargo, cuando el modelo ajustado alcanza la producción de CO₂ máxima (calculada) la producción de CO₂ experimental continúa aumentando. Por esta razón no se puede considerar que la curva es simétrica y en consecuencia el modelo logístico está subestimando los parámetros, principalmente la producción final de CO₂ y la tasa específica de producción de CO₂ al final del cultivo.

La propuesta en este trabajo es aplicar un criterio para establecer la sección de la curva que es simétrica y para ello se siguió el procedimiento que se describe a continuación.

7.2.5. Ajuste al modelo logístico por intervalos discretos

El ajuste al modelo logístico por intervalos discretos (AMLID) consiste en seleccionar la sección de la curva de producción de CO₂ que es simétrica alrededor del punto de mayor tasa de producción de CO₂. El primer paso es calcular la fase *lag* a partir del logaritmo natural de la producción de CO₂. En la Figura 7-18 se presenta la intersección entre la función lineal del $\ln(P_{CO_2})$ en función del tiempo y el eje de las abscisas. Esta intersección corresponde al tiempo *lag* del cultivo. Para el caso de cultivos bacterianos *Pirt* (1975) propone la función logarítmica base 10.

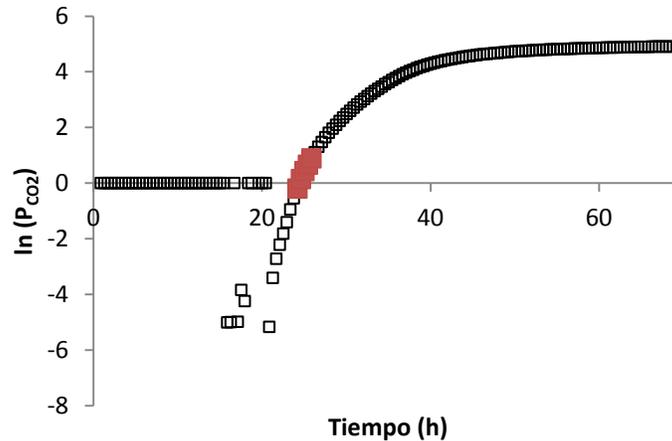


Figura 7-18. Estimación de la fase *lag* a partir del logaritmo natural de la producción de CO₂.

Una vez definido el tiempo *lag*, se identifica el tiempo correspondiente a la tasa de producción de CO₂ máxima. La diferencia entre estos dos tiempos (tiempo *lag* y tiempo en el que $r_{CO_2_{max}}$) representa la mitad del tiempo de cultivo en el cual la producción de CO₂ se considera simétrica; es decir, este Δt se suma al tiempo correspondiente a $r_{CO_2_{max}}$. El intervalo discreto para el ajuste con el modelo logístico es entonces de *lag* a *lag* + 2 Δt (h), en la figura 7-20 se puede observar que la curva de tasa de producción de CO₂ ajustada describe de manera precisa este intervalo discreto de tiempo.

Finalmente, la producción de CO₂ al final del cultivo se determina por medio de un ajuste lineal a partir del tiempo *lag* + 2 Δt considerado para la fase de crecimiento logístico. En la Figura 7-19 se muestra el ajuste por intervalos discretos considerando el intervalo ajustado con el modelo logístico y con el modelo lineal.

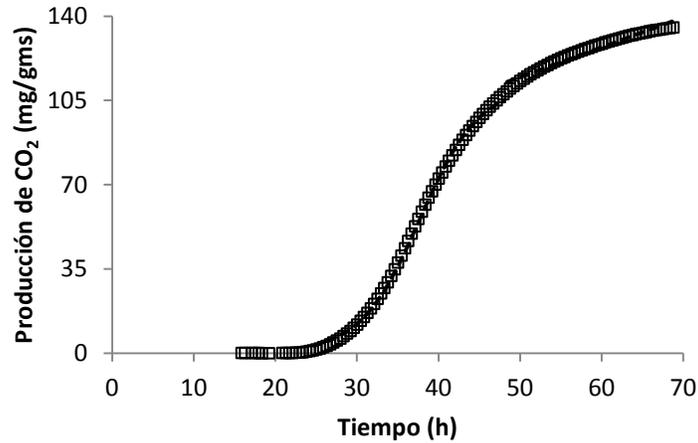


Figura 7-19. Ajuste de los datos de producción de CO₂ de *A. versicolor* en un biorreactor tubular al modelo logístico por intervalos discretos. Czapeck-Dox (MP) (□); Ajuste por el MLID (----).

Con esta estrategia se logra un mejor ajuste de la zona de respiración asociada al crecimiento. La etapa de respiración no asociada al crecimiento se describe muy bien a través del modelo lineal ($R^2 > 0.95$). En la Tabla 7-9 se muestra la comparación de los parámetros cinéticos estimados por las dos formas.

El ajuste al modelo logístico sin ningún criterio de simetría subestima la tasa específica de producción de CO₂ (μ) en un 20 % aproximadamente. El $P_{CO_2\text{final}}$ se denominó así puesto que en ningún momento (en el tiempo de cultivo) dejó de haber producción de CO₂, es decir no se alcanzó un valor máximo para la producción de CO₂.

Tabla 7-9. Parámetros cinéticos estimados por las dos formas de ajuste.

Parámetro	Logístico	Logístico por intervalos discretos
$P_{CO_2_{final}}$ (mg/gms)	135.20	143.54
μ (h^{-1})	0.21	0.27
$r_{CO_2_{max}}$ (mg/gms h)	6.86	7.56
lag (h)	24.48	24.48
R^2	0.998	0.999

El valor experimental para el CO₂ final es de 141.00 mg/gms, mientras que el ML da un valor de 135.20 mg/gms, es decir que subestima este parámetro en 5 % aproximadamente mientras que el MLID da una estimación de 143.54 mg/gms, sobreestimando 2 % el valor real, lo cual es aceptable.

A partir de los datos de producción de CO₂ ajustados por el ML y por MLID se calculó la tasa de producción de CO₂ ajustada (la forma diferencial) para obtener la tasa de producción de CO₂ ajustada. En la Figura 7-20 se observa la tasa de producción de CO₂ de ambos modelos.

Ambos modelos sobreestiman el tiempo en el que se alcanza la tasa de producción de CO₂ máxima. El ML subestima el valor de la $r_{CO_2_{max}}$ ya que el valor experimental es de 7.37 mg/gms h a las 36.33 h y el estimado de 6.86 mg/gms h a las 39.67, mientras que el MLID estima que la tasa de producción de CO₂ máxima es de 7.56 mg/gms h a las 38 h. En base a los resultados obtenidos se decidió utilizar esta estrategia de ajuste para todos los experimentos.

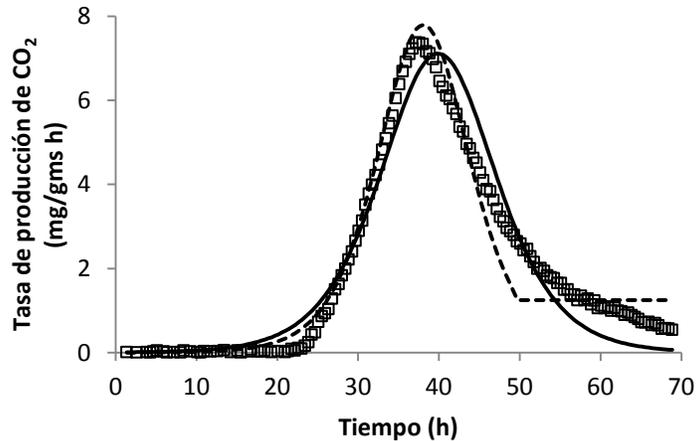


Figura 7-20. Ajuste de la tasa de producción de CO₂ de un cultivo de *A. versicolor* en un biorreactor tubular con ambos modelos. Experimental (□); logístico (—) y logístico fraccionado (---).

7.3. Acumulación de calor en cultivos estáticos de *A. versicolor* y *R. microsporus* en reactores tubulares y de tanque horizontal

En este capítulo se presentan los resultados que se obtuvieron con los cultivos de las cepas de *A. versicolor* y de *R. microsporus* a diferentes temperaturas de incubación; así como, los estudios de acumulación de calor bajo condiciones estáticas y con agitación en los reactores de tanque horizontal. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado en unidades experimentales independientes. Los valores que se reportan en tablas y gráficas son promedios.

7.3.1. Efecto de la temperatura en la producción de CO₂ en cultivos de *A. versicolor* y *R. microsporus*

La temperatura de incubación es un factor primordial para el crecimiento y metabolismo de cualquier célula. A medida que la temperatura aumenta, las reacciones bioquímicas en el interior de la célula se aceleran. Sin embargo, por arriba de cierta temperatura, proteínas y ácidos nucleicos, principalmente pueden desnaturalizarse (Córdova and Roussos, 1999). Con la finalidad de establecer las

condiciones de operación de los biorreactores con ambas cepas se evaluaron diferentes temperaturas, 35, 37.5, 40, 42.5, y 45 °C. En la Figura 7-21 se presenta la tasa de producción de CO₂ en cultivos de *R. microsporus* a diferentes temperaturas.

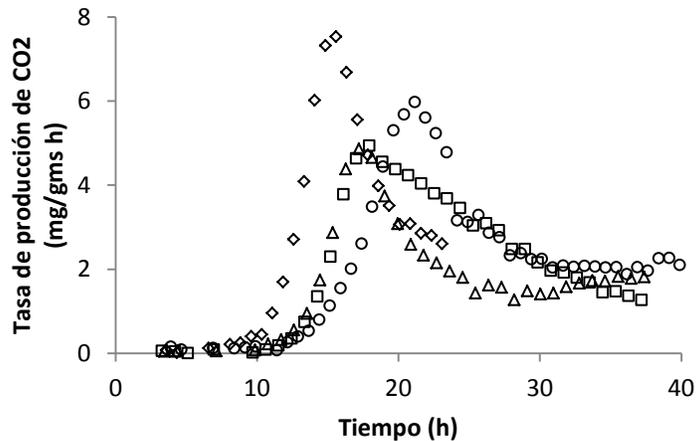


Figura 7-21. Efecto de la temperatura sobre la tasa de producción de CO₂ de *R. microsporus*. 35 °C (□); 37.5 °C (◇); 40 °C (Δ) y 42.5 °C (○).

La tasa de producción de CO₂ mayor fue 7.53 mg/gms h a 37.5 °C. Las tasas de producción de CO₂ obtenidas con las demás temperaturas evaluadas no presentaron diferencias significativas. Cabe mencionar que a partir de 45 °C la tasa de producción de CO₂ máxima alcanzada es 60 % menor que la máxima alcanzada a 37.5 °C, además de que la fase *lag* se duró más de 30 h, por eso no se consideraron en este estudio.

En la Figura 7-22 se presenta la producción de CO₂ y el ajuste con el MLID. A partir de estos datos se estimaron los parámetros cinéticos, lo cuales se muestran en la tabla 7-10.

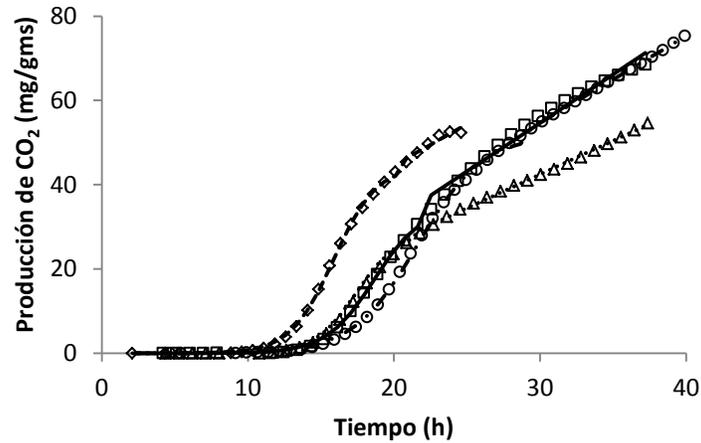


Figura 7-22. Efecto de la temperatura sobre la producción de CO₂ de *R. microsporus*. 35 °C (□); 37.5 °C (◇); 40 °C (Δ) y 42.5 °C (○). Las líneas representan el ajuste con el MLID.

También se observó la fase *lag* más corta a 37.5 °C. La tasa específica de producción de CO₂ resultó dependiente de la temperatura, es decir, aumenta conforme aumenta la temperatura hasta una temperatura máxima después de la cual comienza su descenso (Saucedo-Castañeda y col., 1990). Las producciones finales de CO₂ fueron de más de 70 mg/gms para los 35 °C y 42.5 °C, mientras que a 37.5 °C y 40 °C resultaron significativamente menores.

Tabla 7-10. Parámetros cinéticos estimados del cultivo de *R. microsporus* a diferentes temperaturas con el MLID.

Parámetro	Temperatura (°C)			
	35	37.5	40	42.5
$P_{CO2_{final}}$ (mg/gms)	71.28 ± 2.48	53.62 ± 1.63	54.27 ± 9.74	75.16 ± 6.85
μ (h ⁻¹)	0.61 ± 0.00	0.68 ± 0.01	0.71 ± 0.04	0.45 ± 0.01
$r_{CO2_{max}}$ (mg/gms)	4.94 ± 0.24	7.53 ± 0.11	4.86 ± 1.02	5.97 ± 0.09
h)				
<i>lag</i> (h)	13.61 ± 0.11	10.82 ± 0.12	13.12 ± 0.50	13.73 ± 0.19
R ²	0.998	0.999	0.999	0.999

En la Figura 7-23 se presenta la tasa de producción de CO₂ para los cultivos de *A. versicolor* a las mismas temperaturas. Se encontró que la tasa de producción de CO₂ máxima más elevada fue a 42.5 °C con un valor de 13.70 mg/gms h. Al igual que en el caso de *R. microsporus*, a partir de los 45 °C la tasa de producción de CO₂ máxima alcanzada fue 80 % menor que a 37.5 °C y la fase *lag* tuvo una duración de más de 30 h. Por ello, no se consideró en este estudio temperaturas superiores a 42.5 °C.

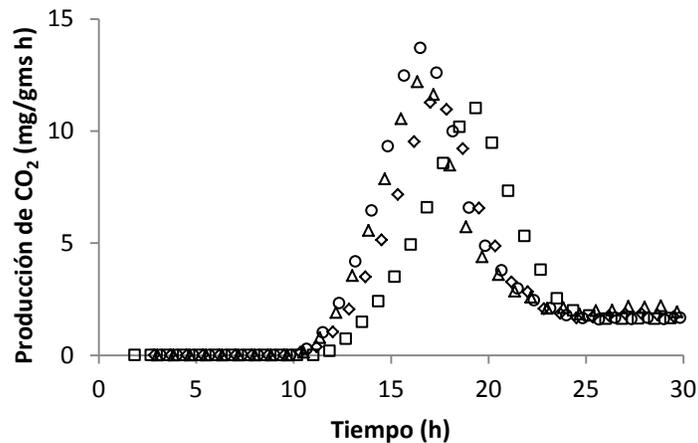


Figura 7-23. Efecto de la temperatura sobre la tasa de producción de CO₂ de *A. versicolor*. 35 °C (□); 37.5 °C (◇); 40 °C (△) y 42.5 °C (○).

En la Figura 7-24 se presenta el gráfico de la producción de CO₂ para los cultivos de *A. versicolor* a diferentes temperaturas, ajustados por el MLID. Se observó que la fase *lag* más corta se obtuvo a los 40 °C. La tasa específica de producción de CO₂ resultó dependiente de la temperatura, es decir, aumenta conforme aumenta la temperatura hasta una temperatura máxima después de la cual comienza su descenso (Saucedo-Castañeda y col., 1990).

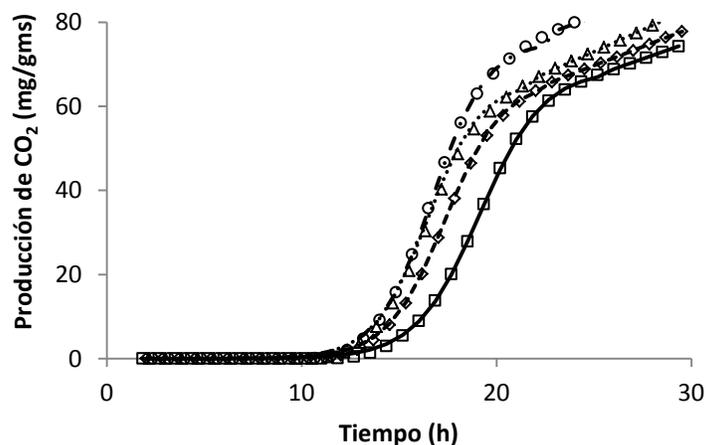


Figura 7-24. Efecto de la temperatura sobre la producción de CO₂ de *A. versicolor*. 35 °C (□); 37.5 °C (◇); 40 °C (Δ) y 42.5 °C (○). Las líneas son el ajuste con el MLID.

Las producciones finales de CO₂ fueron de más de 70 mg/gms para los 35 °C y 42.5 °C, mientras que a 37.5 °C y 40 °C resultaron significativamente menores. En la Tabla 7-11 se muestran los parámetros cinéticos estimados. Como era esperado, de nuevo se observó que la tasa específica de producción de CO₂ depende de la temperatura.

Tabla 7-11. Parámetros cinéticos estimados en los cultivos de *A. versicolor* a diferentes temperaturas con el MLID.

Parámetro	Temperatura (°C)			
	35	37.5	40	42.5
$P_{CO2_{final}}$ (mg/gms)	74.93 ± 3.24	77.81 ± 6.60	82.73 ± 1.35	89.71 ± 10.68
μ (h ⁻¹)	0.61 ± 0.01	0.68 ± 0.04	0.73 ± 0.05	0.72 ± 0.03
$r_{CO2_{max}}$ (mg/gms)	11.02 ± 0.92	11.33 ± 1.63	12.41 ± 1.12	13.70 ± 1.59
h)				
lag (h)	13.33 ± 0.19	12.18 ± 0.09	11.92 ± 0.01	13.70 ± 1.59
R ²	1.000	1.000	0.999	0.996

7.3.2. Efecto de la temperatura sobre la tasa específica de producción de CO₂ en cultivos de *A. versicolor* y *R. microsporus*

En los resultados obtenidos se observó la dependencia de la tasa específica de producción de CO₂ (μ) con la temperatura (*Rajagopalan y Modak, 1995*). En la Figura 7-25 se muestra la gráfica de la tasa específica de producción de CO₂ en función de la temperatura.

Los datos se ajustaron al modelo de Ratkowsky modificado de acuerdo a *Smits y col. (1998)*. El modelo de Ratkowsky se muestra a continuación:

$$\mu_{max}(T) = (C_1 * (T - T_{min}) * (1 - e^{(C_2*(T-T_{max}))}))^2$$

En donde $\mu_{max}(T)$ es la tasa específica de producción de CO₂ en función de la temperatura; C1 y C2 son parámetros de ajuste del modelo de Ratkowsky; T es la temperatura (K).

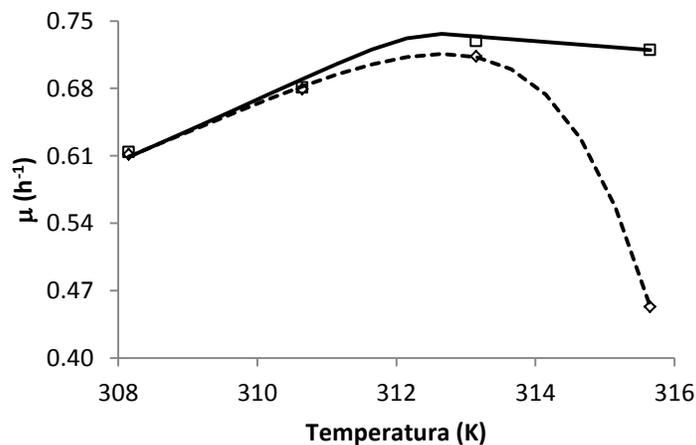


Figura 7-25. Efecto de la temperatura sobre la tasa específica de producción de CO₂. Tasa específica de producción de CO₂: *A. versicolor* (\square); *R. microsporus* (\diamond). Las líneas representan el ajuste con el modelo de Ratkowsky modificado.

En la Tabla 7-12 se muestra los valores de ajuste para los dos cultivos. En ambos cultivos se obtuvo la tasa específica de producción de CO₂ máxima a 40 °C y fue de 0.73 h⁻¹ y de 0.71 h⁻¹ para *A. versicolor* y *R. microsporus* respectivamente. A temperaturas mayores hubo una ligera disminución (0.71 h⁻¹) con *A. versicolor* mientras que con *R. microsporus* fue muy marcada (0.45 h⁻¹).

Tabla 7-12. Valores estimados con el ajuste al modelo de Ratkowsky.

Parámetro	Microorganismo	
	<i>A. versicolor</i>	<i>R. oligosporus</i>
T _{min} (K)	269.76	269.07
T _{max} (K)	315.25	317.35
C ₁ (h ^{-0.5} K ⁻¹)	0.02	0.02
C ₂ (K ⁻¹)	1.61	0.75
R ²	0.986	1.000

Los resultados anteriores nos permitieron concluir que 37.5 °C es la temperatura de operación adecuada para los cultivos en los biorreactores. Esto es debido a que la tasa específica de producción de CO₂ más alta para *R. microsporus* está muy comprometida, es decir, un ligero aumento en la temperatura provoca una gran disminución de la producción de CO₂ (crecimiento) y sabemos que en los biorreactores es muy probable que haya acumulación de calor y en consecuencia aumento de la temperatura, dando lugar a un proceso no isotérmico (Szewczyk y Myszk, 1994). Por eso se eligió esta temperatura (37.5 °C) que, aunque es ligeramente menor, genera una tasa específica de producción de CO₂ alta.

7.3.3. Acumulación de calor en cultivos de *A. versicolor* y *R. microsporus* en biorreactores tubulares

Debido a las características térmicas de los soportes utilizados en el CMS se favorece la acumulación de calor metabólico (Saucedo-Castañeda y col., 1990). La dificultad para remover dicho calor en los CMS provoca la formación de gradientes de temperatura, dando lugar a procesos no isotérmicos (Szewcyk y Myszka, 1994), que pueden tener efectos indeseables sobre el crecimiento de microorganismos mesofílicos (Gutierrez-Rojas y col., 1996). En los reactores de lecho empacado, el suministro de aire a través del soporte provoca que haya una gran actividad metabólica y en consecuencia un aumento de temperatura considerable (Fanaei and Vaziri, 2009). En este trabajo los cultivos en biorreactores tubulares (RTD) se utilizaron como sistema control (Ruíz-Leza y col., 2007). La temperatura de incubación fue de 37.5 °C y la tasa de aireación se mantuvo en 1 VKgM aproximadamente. El objetivo de este experimento fue evaluar el incremento de temperatura en cultivos de *A. versicolor* y *R. microsporus* en RTG en dirección axial.

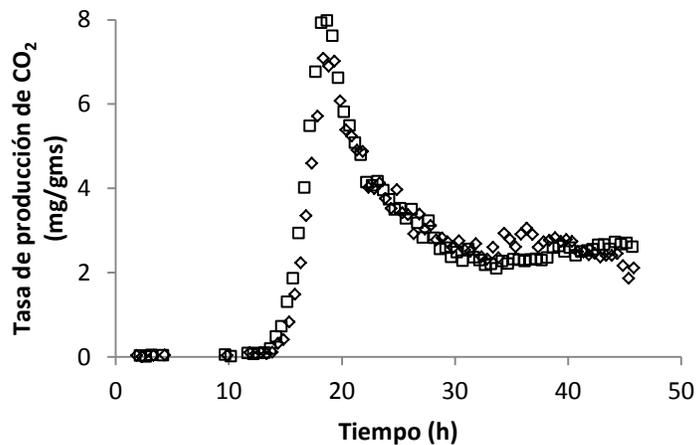


Figura 7-26. Tasa de producción de CO₂ de *R. microsporus* a 37.5 °C en biorreactores tubulares de diferente diámetro. 4.5 cm (□) y 2 cm (◇).

En la Figura 7-27 se presenta la tasa de producción de CO₂ de los cultivos de *R. microsporus* en RTG y RTD. En el cultivo de *R. microsporus*, la tasa de producción de CO₂ máxima alcanzada en cada uno de los biorreactores no tuvo diferencia significativa. En el RTG alcanzó una tasa de producción de CO₂ máxima de 8.01 mg/gms h, mientras que en RTD este valor fue de 7.50 mg/gms h. En la Figura 7-28 se presenta la producción de CO₂. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros cinéticos estimados para cada tipo de biorreactor.

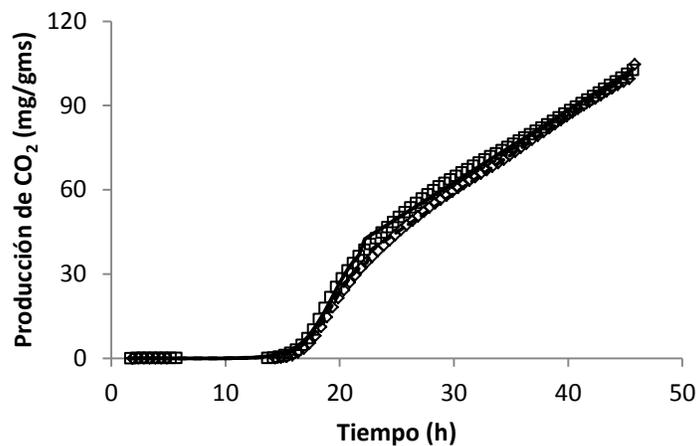


Figura 7-27. Producción de CO₂ de *R. microsporus* a 37.5 °C en biorreactores tubulares de diferente diámetro. 4.5 cm (□) y 2 cm (◇). Las líneas representan el ajuste con el modelo logístico fraccionado.

En la Tabla 7-13 se presentan los parámetros cinéticos estimados. La fase *lag* fue de 15 h aproximadamente y la tasa específica de producción de CO₂ alrededor de 0.7 h⁻¹, mientras que la producción final de CO₂ fue cercana a 100 mg/gms en ambos tipos de biorreactores. Cabe mencionar que la producción de CO₂ reportada en las tablas corresponde al último dato estimado por el modelo lineal, ya que es el que se ajusta mejor a los valores experimentales al final de cultivo.

Tabla 7-13. Parámetros cinéticos estimados para los cultivos de *R. microsporus* en biorreactores estáticos.

Parámetro	Tipo de Bioreactor	
	RTG	RTD
$P_{CO2_{final}}$ (mg/gms)	102.96 ± 13.38	101.71 ± 6.75
μ (h ⁻¹)	0.71 ± 0.01	0.74 ± 0.04
$r_{CO2_{max}}$ (mg/gms h)	8.01 ± 0.50	7.50 ± 0.50
lag (h)	15.21 ± 0.58	15.75 ± 0.29
R ²	0.995	0.998

En la Figura 7-29 se presenta el perfil de incremento de temperaturas (ΔT) a diferentes alturas del lecho empacado en función del tiempo de cultivo para la cepa de *R. microsporus*.

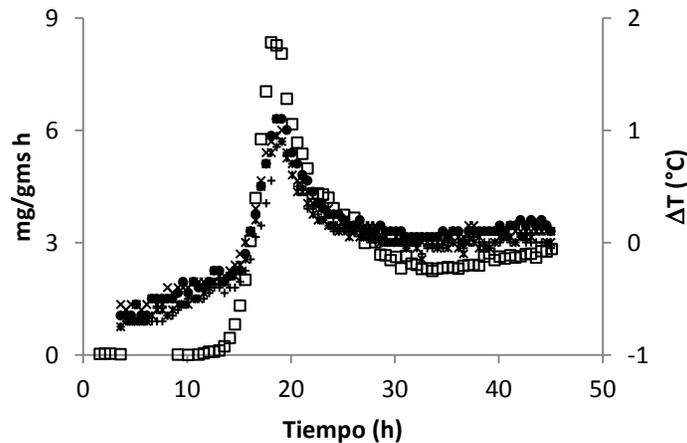


Figura 7-28. Perfil de temperaturas a diferentes alturas de reactores tubulares en un cultivo de *R. microsporus* a 37.5 °C. Tasa de producción de CO₂ (□). 0 cm (x); 3 cm (*); 6 cm (•) y 9 cm (+).

El máximo incremento de temperatura fue de 1.2 °C a las 19 h a 6 cm de altura a partir del fondo de la columna y corresponde con el tiempo en que se alcanza la mayor tasa de producción de CO₂. El incremento de temperatura a 0 cm, 3 cm y 9 cm fue de 1.1 °C, 1.0 °C y 0.95 °C respectivamente.

En la Figura 7-30 se presenta la tasa de producción de CO₂ de los cultivos de *A. versicolor* en RTG y RTD. En este cultivo, la tasa de producción de CO₂ máxima alcanzada en cada uno de los biorreactores no tuvo diferencia significativa. En el RTG alcanzó una tasa de producción de CO₂ máxima de 18.15 mg/gms h, mientras que en RTD este valor fue de 17.81 mg/gms h.

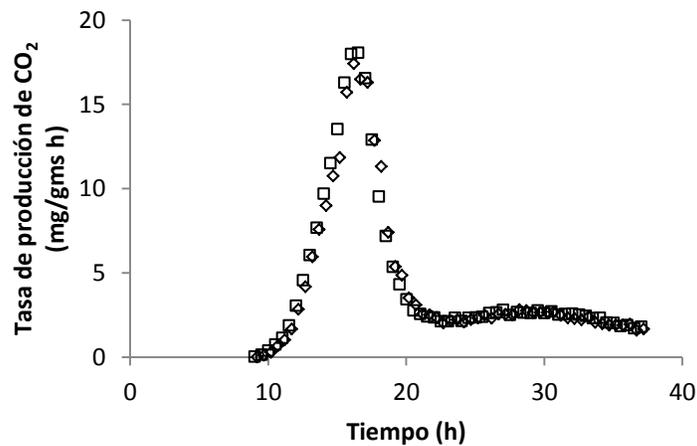


Figura 7-29. Tasa de producción de CO₂ de *A. versicolor* a 37.5 °C en biorreactores tubulares de diferente diámetro. 4.5 cm (□) y 2 cm (◇).

En la Figura 7-31 se presenta la producción de CO₂. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros cinéticos estimados para cada tipo de biorreactor.

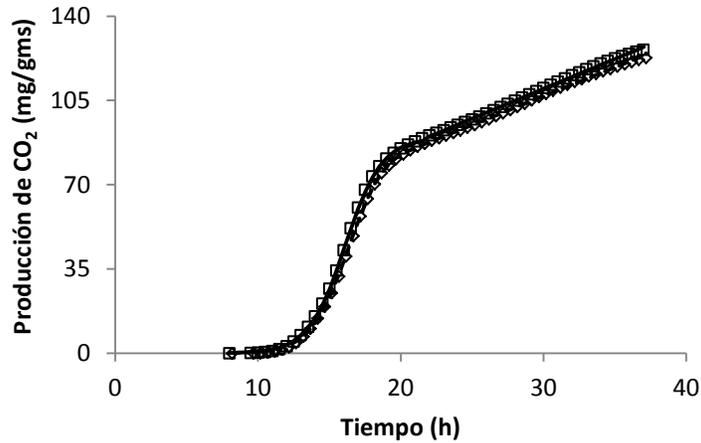


Figura 7-30. Producción de CO₂ de *A. versicolor* a 37.5 °C en biorreactores tubulares de diferente diámetro. 4.5 cm (□) y 2 cm (◇). Las líneas representan el ajuste con el modelo logístico fraccionado.

El comportamiento de ambos biorreactores fue similar ya que no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros cinéticos estimados para cada uno de ellos. En la Tabla 7-14 se presentan los parámetros cinéticos estimados. La fase *lag* fue de 11 h aproximadamente y la tasa específica de producción de CO₂ alrededor de 0.77 h⁻¹, mientras que la producción final de CO₂ fue cercana a 125 mg/gms en ambos tipos de biorreactores.

Tabla 7-14. Parámetros cinéticos estimados para los cultivos de *A. versicolor* en biorreactores tubulares con el MLID.

Parámetro	Tipo de Bioreactor	
	RTG	RTD
$P_{CO2_{final}}$ (mg/gms)	127.23 ± 6.69	123.97 ± 2.51
μ (h ⁻¹)	0.78 ± 0.01	0.77 ± 0.02
$r_{CO2_{max}}$ (mg/gms h)	18.15 ± 0.28	17.81 ± 0.81
<i>lag</i> (h)	11.06 ± 0.04	11.29 ± 0.07
R ²	1.000	1.000

En la figura 7-32 se muestra el perfil de incremento de temperatura (ΔT) en el cultivo de *A. versicolor*.

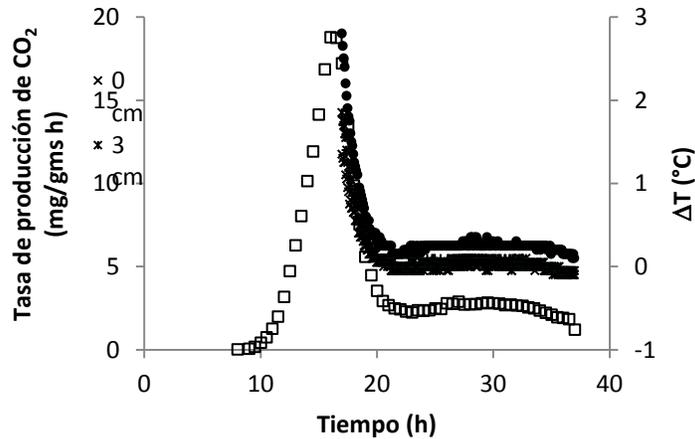


Figura 7-31. Perfil de temperaturas a diferentes alturas de reactores tubulares en un cultivo de *A. versicolor* a 37.5 °C. Tasa de producción de CO₂ (□). 0 cm (x); 3 cm (*); 6 cm (•) y 9 cm (+).

El máximo incremento fue de 2.80 °C a las 17 h a 6 cm de altura a partir del fondo de la columna y coincide con el tiempo en el que se alcanza la tasa máxima de producción de CO₂. El incremento de temperatura a 0 cm, 3 cm y 9 cm fue de 1.35 °C, 1.85 °C y 1.80 °C respectivamente.

En la Figura 7-33 se muestra el gráfico de incremento de temperatura máximo (ΔT_{max}) en función de la posición del termopar (altura medida a partir de la base de la columna). Los incrementos de temperatura máximos reportados anteriormente son incrementos en dirección radial, es decir que se generan del centro hacia la pared de la biorreactor. El gradiente de temperatura en dirección axial es menor en ambos casos que el gradiente en radial, 0.25 °C para el cultivo de *R. microsporus* y 1.45 °C en el cultivo de *A. versicolor*. Este comportamiento se explica por el diámetro relativamente pequeño (4.5 cm) del reactor, en donde la aireación forzada (Saucedo-Castañeda y col., 1990) permite la remoción de calor

por convección y el baño de temperatura controlada permite la remoción de calor por conducción a través de la pared del reactor (Ruíz-Leza y col., 2007).

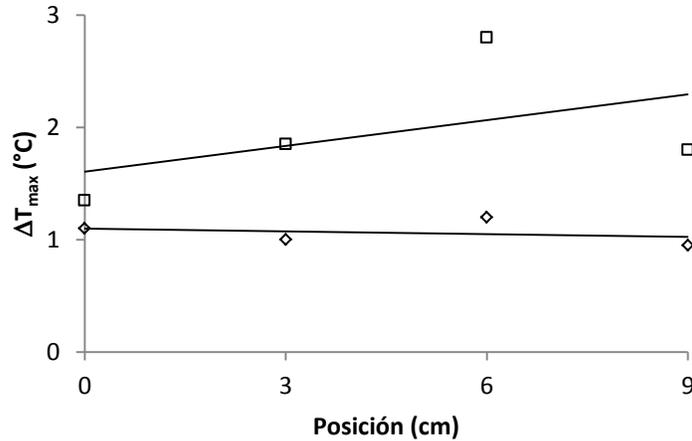


Figura 7-32. Incremento de temperatura en función de la altura en reactores tubulares en cultivos de *A. versicolor* y *R. microsporus*. *A. versicolor* (□); y *R. microsporus* (◇)

El incremento de temperatura no tuvo efectos negativos en el cultivo. Se observa, por otro lado, que el incremento máximo de temperatura en los cultivos de *A. versicolor* es 2.3 veces mayor que en el cultivo de *R. microsporus*, lo cual corresponde con la tasa de producción de CO_2 máxima que es 2.25 veces mayor en *A. versicolor* que en *R. microsporus*.

En las Figuras 7-34 y 7-35 se presenta el consumo de sustrato en cada uno de los cultivos. El consumo de sacarosa en los dos cultivos y en ambos tipos de reactor fue mayor al 90 %. Con estos datos se estimó el porcentaje de conversión de sacarosa a CO_2 a través de un balance de carbono. En el cultivo de *A. versicolor* se encontró que el porcentaje de conversión fue de 69 % en el RTG y de 67 % en el RTD.

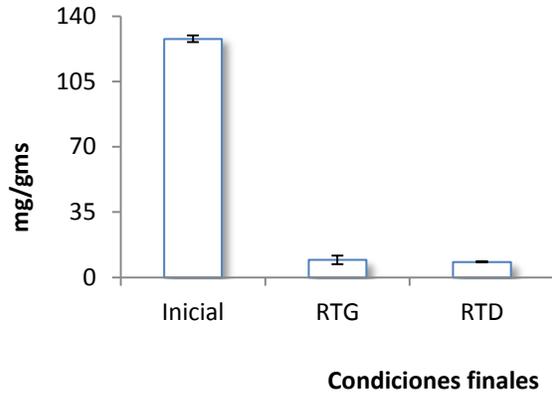


Figura 7-33. Consumo de sacarosa en el cultivo de *A. versicolor*.

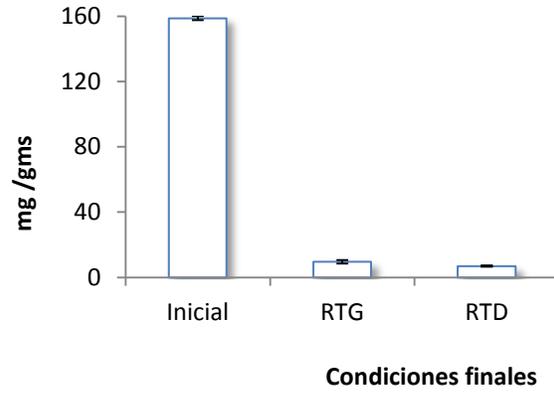


Figura 7-34. Consumo de sacarosa en el cultivo de *R. microsporus*.

En los cultivos de *R. oligosporus* fue de 44 % en el RTG y de 45 % en el RTD. El porcentaje de conversión a CO₂ con fuentes de carbono de fácil asimilación es de 50 %. El carbono restante es dirigido hacia la producción de biomasa y reacciones anabólicas (Chiellini y col., 2007). Una conversión de carbono a CO₂ mayor a 50 % podría deberse a la producción de enzimas lignocelulósicas capaces de degradar los polisacáridos del aserrín y utilizarlo como fuente de carbono. En el caso de *A. versicolor* se evaluó la actividad xilanasa y celulasa. Sin embargo, no se encontró ninguna de estas actividades enzimáticas.

En la Tabla 7-15 se presentan los resultados de pH inicial y final de ambos cultivos.

Tabla 7-15. pH inicial y final en cultivos de *A. versicolor* y *R. microsporus* en biorreactores estáticos.

Microorganismo	Reactor			
	RTG		RTD	
	Inicial	Final	Inicial	Final
<i>A. versicolor</i>	6.80 ± 0.01	6.08 ± 0.09	6.80 ± 0.01	6.14 ± 0.03
<i>R. oligosporus</i>	6.92 ± 0.03	4.61 ± 0.13	6.92 ± 0.03	4.89 ± 0.12

El pH final en el cultivo de *A. versicolor* se mantuvo constante, mientras que en el cultivo de *R. microsporus* hubo un descenso que aparentemente no tuvo efectos negativos sobre su perfil respiratorio. La humedad se mantuvo constante en ambos cultivos y en los dos tipos de biorreactor alrededor del 60 %. La actividad de agua aumentó ligeramente debido al consumo de sacarosa.

7.3.4. Acondicionamiento del área para la instalación y operación de los reactores de tanque horizontal.

Los reactores de tanque horizontal (RTH) se instalaron en un cuarto de temperatura controlada a 30 °C. Para la operación de estos equipos fue necesario acondicionar un área de trabajo en la que se tuviera la disponibilidad de aire. Para ello se instaló un compresor y un sistema de distribución a través de válvulas de bajo caudal. En las Figura 7-36 se muestra el sistema de distribución de aire. En la figura 7-37 se muestra el dispositivo de distribución de aire.



Figura 7-35. Sistema de aireación de los reactores. Compresor.



Figura 7-36. Sistema de distribución de aire a través de válvulas de bajo caudal.

Originalmente, los reactores se diseñaron para ser operados manualmente. Sin embargo, al cargar los reactores con materia húmeda se requiere de gran torque para girar el sistema de retromezclado. Con la finalidad de obtener reproducibilidad en los experimentos, los reactores se adaptaron a un sistema de agitación con motor (Figura 7-37). En la Figura 7-38 el sistema de reactores en operación.



Figura 7-37. Sistema de reactores de tanque horizontal con agitación mecánica.

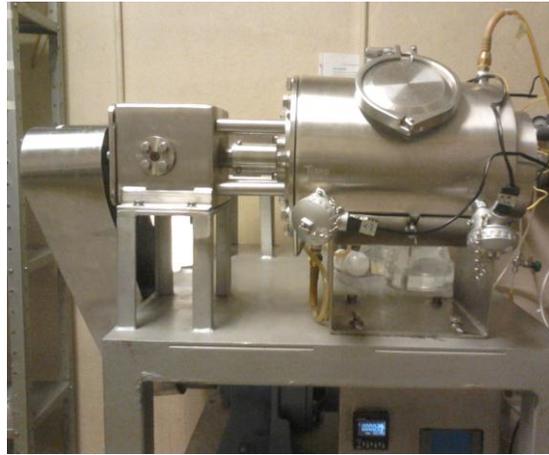


Figura 7-38. Sistema de reactores en operación.

7.3.5. Acumulación de calor en cultivos de *A. versicolor* y *R. microsporus* en los reactores de tanque horizontal

Durante los procesos de cultivo en medio sólido en reactores a nivel piloto e industriales se generan gradientes de temperatura, humedad y oxígeno a lo largo del lecho. Entre los mecanismos de remoción de calor, el enfriamiento evaporativo puede ser muy eficiente para controlar la temperatura. Sin embargo, este procedimiento tiende a secar el soporte provocando limitaciones en el crecimiento (Nava y col., 2011). A diferencia de los reactores de lecho empacado, la aireación de los reactores estáticos se limita a la superficie expuesta por lo que el desarrollo de microorganismos se limita a solo unos pocos centímetros de espesor de lecho (Fanaei and Vaziri, 2009).

En estos experimentos se utilizaron los reactores de 5 L de capacidad operados al 30 % de su volumen. La temperatura de incubación se controló por medio de circulación de agua a través de la chaqueta del reactor. En ambos casos fue de 37.5 °C. El flujo de aireación se mantuvo a 1 VKgM sin atemperar el aire, por lo que su temperatura fue de 30 °C (temperatura controlada en el cuarto) para evitar condensación en la superficie del reactor. En la Figura 7-39 se presenta la tasa de producción de CO₂ del reactor con el cultivo de *R. microsporus*.

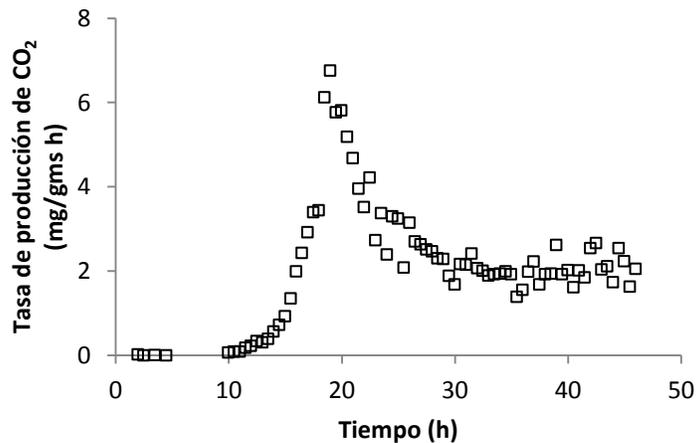


Figura 7-39. Tasa de producción de CO₂ de *R. microsporus* en RTH en condiciones estáticas a 37.5 °C.

La tasa de producción de CO₂ máxima fue de 6.75 mg/gms h y se alcanzó a las 19 h aproximadamente. En comparación con los reactores tubulares (RTG y RTD) hubo una diferencia significativa. La tasa de producción de CO₂ máxima encontrada en el reactor representa el 83 % de la máxima encontrada en el RTD.

En la Figura 7-40 se presenta la producción de CO₂ en el RTH y en la Tabla 7-16 se presentan los parámetros cinéticos estimados para este cultivo. La producción final de CO₂ fue de 83.93 mg/gms, cerca de 20 % menor en comparación con los reactores tubulares. Aunque se observó una ligera disminución en la fase *lag*, también disminuyó la tasa específica de producción de CO₂.

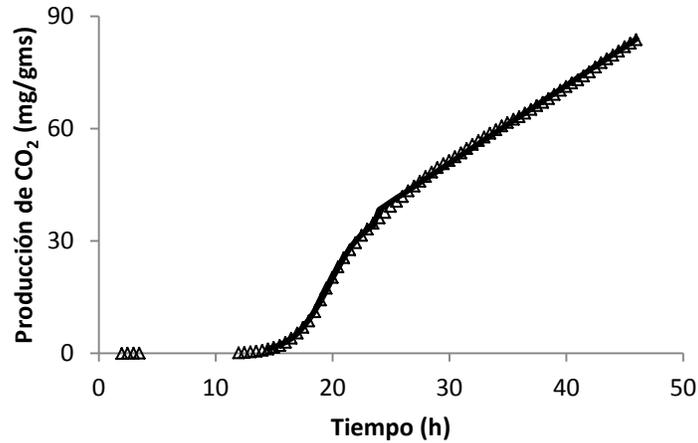


Figura 7-40. Producción de CO₂ de *R. microsporus* RTH en condiciones estáticas a 37.5 °C.

Se evaluó el incremento de temperatura en el aire suministrado al reactor. Bajo condiciones estáticas se esperaba que se generara un marcado incremento en la temperatura. En la Figura 7-41 se presenta el gráfico de ΔT en función del tiempo de cultivo. En este experimento en particular no se hizo duplicado. Los resultados presentados corresponden a un solo RTH.

Tabla 7-16. Parámetros cinéticos estimados en el cultivo de *R. microsporus* en RTH estático con el MLID.

Parámetro	RTH
$P_{CO2_{final}}$ (mg/gms)	83.93
μ (h ⁻¹)	0.65
$r_{CO2_{max}}$ (mg/gms h)	6.75
<i>lag</i> (h)	14.32
R ²	0.999

Los termopares colocados en la superficie del cultivo no registraron incrementos de temperatura significativos que correspondan con la máxima tasa de producción de CO₂. Esto se debe a que la remoción de calor en la superficie del reactor se lleva a cabo de manera eficiente por conducción. Por otro lado, la temperatura del aire a la salida presentó un incremento de 0.98 °C cuando se alcanzó la máxima tasa de producción de CO₂.

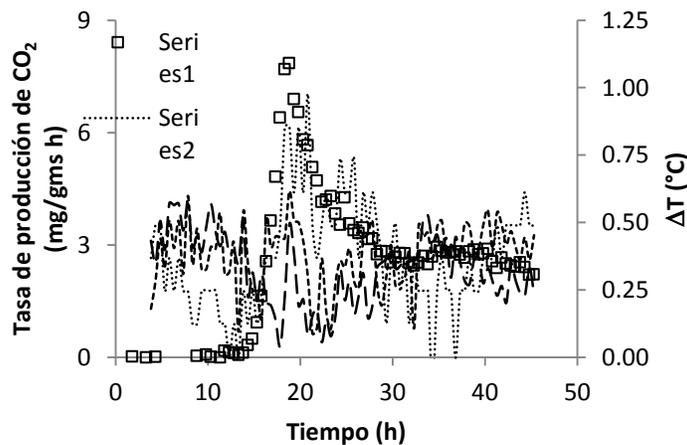


Figura 7-41. Perfil de temperaturas en el aire de salida y en dos posiciones del cuerpo del RTH en el cultivo de *R. microsporus*. Tasa de producción de CO₂ (□). Aire (....); T1 (---) y T2 (----).

Este aumento de temperatura es debido a la actividad metabólica de *R. microsporus* ya que se consideraron las diferentes fuentes que pudieron haber aportado calor al sistema. En la Figura 7-42 se presenta la tasa de producción de CO₂ en el cultivo de *A. versicolor* en el RTH estático.

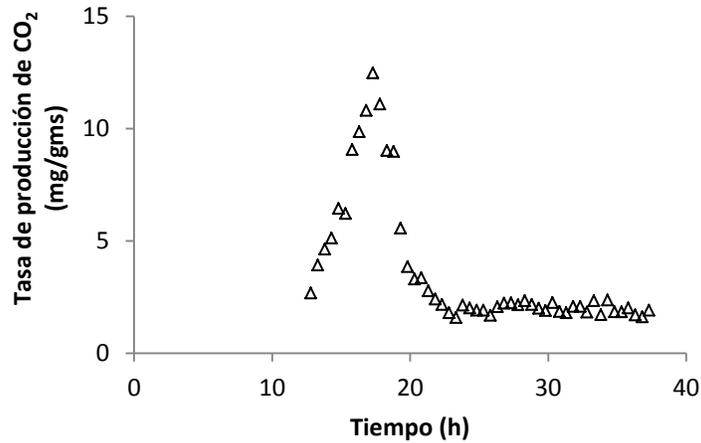


Figura 7-42. Tasa de producción de CO₂ de *A. versicolor* en RTH en condiciones estáticas a 37.5 °C.

La tasa de producción de CO₂ máxima que se alcanzó en este cultivo fue de 12.47 mg/gms h y corresponde aproximadamente al 70 % de la tasa de producción máxima encontrada en los RTD. El la Figura 7-43 se presenta la producción de CO₂ de este cultivo.

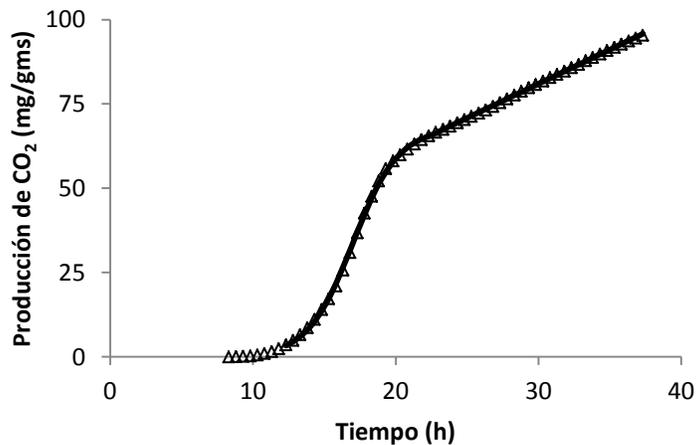


Figura 7-43. Producción de CO₂ de *A. versicolor* en RTH en condiciones estáticas a 37.5 °C.

La producción de CO₂ final fue de 95.81 mg/gms, cerca de 25 % menor en comparación con los reactores tubulares. De la misma manera, se observó una ligera disminución en la fase *lag*, pero disminuyó la tasa específica de producción de CO₂. En la Tabla 7-17 se muestran los parámetros cinéticos estimados para este cultivo.

Tabla 7-17. Parámetros cinéticos estimados para los cultivos de *A. versicolor* en RTH estáticos con el MLID.

Parámetro	RTH
$P_{CO2_{final}}$ (mg/gms)	95.81
μ (h ⁻¹)	0.63
$r_{CO2_{max}}$ (mg/gms h)	12.47
<i>lag</i> (h)	10.78
R ²	1.000

En la Figura 7-44 se presenta el gráfico de ΔT en función del tiempo de cultivo. En este caso, se observaron incrementos de temperatura en la superficie del cultivo que corresponden con la tasa de producción de CO₂ máxima, sin embargo tampoco fueron significativos. Esto se debe a que la remoción de calor en la superficie del reactor se lleva a cabo de manera eficiente por conducción. Por otro lado, la temperatura del aire a la salida presentó un incremento de 0.98 °C cuando se alcanzó la máxima tasa de producción de CO₂. En este cultivo se registró un incremento de temperatura máximo de 0.66 °C en a 5 cm de la entrada de aire (sobre la superficie del reactor) y de 1.66 °C en la posición 2 (5 cm antes de la salida de aire, sobre la superficie del reactor).

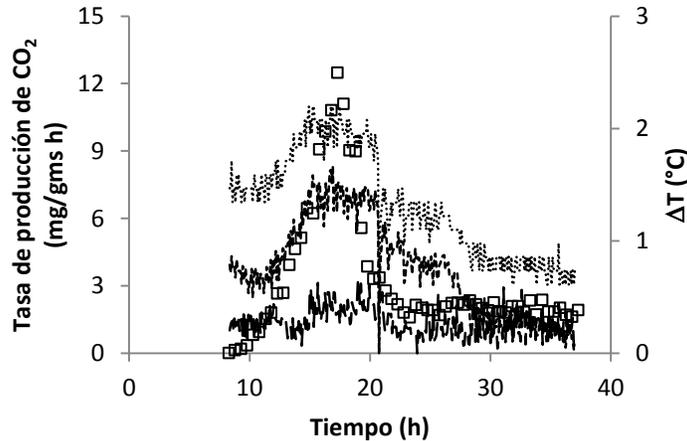


Figura 7-44. Perfil de temperaturas en el aire de salida y en dos posiciones del cuerpo del RTH en el cultivo de *A. versicolor*. Tasa de producción de CO₂ (□). Aire (....); T1 (---) y T2 (----).

El incremento de temperatura del aire debido a la actividad metabólica de *A. versicolor* fue de 2.19 °C. La diferencia de temperaturas en los termopares colocados en el cuerpo del RTH indica que existe un gradiente en dirección axial, mientras que el aumento en la temperatura del aire nos indica que existe un gradiente en dirección radial. Aunque el aumento de temperatura no fue tan marcado en la superficie como para provocar un daño en el metabolismo de *A. versicolor*, tal vez el aumento de temperatura sea mayor en el interior del lecho, lo que provocó la disminución en la producción de CO₂ y en la disminución de los parámetros cinéticos estimados.

El consumo de sustrato en el RTH para el cultivo de *R. microsporus* fue del 85 %, mientras que en el cultivo de *A. versicolor* fue del 93 %. El balance de carbono indica que en el cultivo de *R. microsporus* hubo una conversión del 40 % y en el de *A. versicolor* fue de 52 %. En la Tabla 7-18 se presentan las condiciones iniciales y finales de pH y humedad.

Tabla 7-18. pH inicial y final en cultivos de *A. versicolor* y *R. oligosporus* en RTH estático.

Microorganismo	RTH			
	pH		Humedad	
	Inicial	Final	Inicial	Final
<i>A. versicolor</i>	6.80 ± 0.01	6.39 ± 0.23	59.00 ± 0.42	61.45 ± 1.20
<i>R. oligosporus</i>	6.92 ± 0.03	4.24 ± 0.16	60.63 ± 0.30	63.73 ± 0.90

El pH en el cultivo de *A. versicolor* se mantuvo controlado, mientras que en el cultivo de *R. microsporus* hubo un ligero descenso pero no tuvo efectos negativos sobre el desarrollo del microorganismo. La humedad se mantuvo constante en ambos cultivos y en los dos tipos de biorreactor alrededor del 60 %. La actividad de agua aumentó ligeramente debido al consumo de sacarosa.

7.4. Efecto de la agitación en cultivos de *A. versicolor* y *R. microsporus* en biorreactores de tanque horizontal.

El bajo contenido de agua en los cultivos en medio sólido provoca dificultades en la remoción del calor metabólico, debido a que la conductividad térmica del aire es mucho menor que la del agua lo que disminuye la transferencia de calor por convección, mientras que la baja conductividad térmica de los soporte utilizados (en este caso madera) dificulta la remoción de calor por conducción a través de las paredes del reactor (*Mitchell y col., 2002*). La agitación en los cultivos en medio sólido se ha propuesto como mecanismo para reducir los gradientes de calor, humedad y de intercambio de gases y ha sido evaluada en la producción de etanol, enzimas, entre otros (*Han y col., 1999*). Aunque la agitación puede mejorar significativamente la remoción de calor a través de las paredes del reactor, no es utilizada en todos los reactores de cultivo en medio sólido ya que no todos los hongos y soportes son capaces de tolerar los esfuerzos de corte y fuerzas de colisión que resultan del mezclado (*Fanaei y Vaziri, 2009*).

Se evaluó el efecto de la agitación intermitente sobre el metabolismo de ambas cepas. Para establecer la frecuencia de agitación se propuso como criterio el tiempo de duplicación (t_d). Para calcularlo se utilizó la siguiente expresión:

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

En donde φ es la frecuencia de agitación (h) y μ es la tasa específica de producción de CO₂ estimada en el cultivo bajo condiciones estáticas. El cultivo de *A. versicolor* se mezcló cada 1.58 h a 3 rpm por 1 min y el cultivo de *R. microsporus* se mezcló cada 1.36 h a 3 rpm por 1 min. En la Figura 7-45 se presenta la tasa de producción de CO₂ del cultivo de *A. versicolor* en el reactor de tanque horizontal con agitación intermitente.

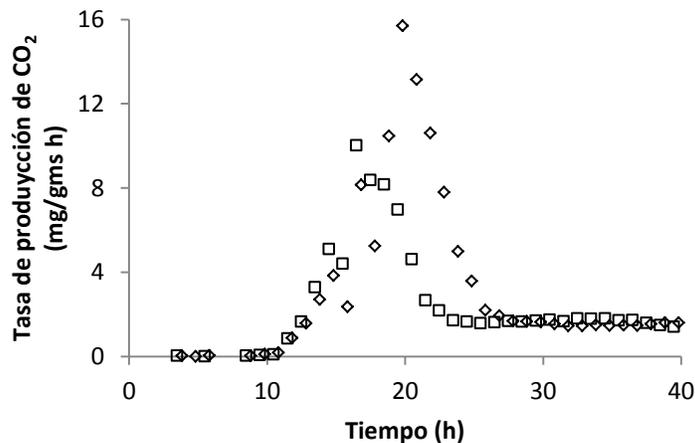


Figura 7-45. Tasa de producción de CO₂ de *A. versicolor* en el RTH con agitación y en RTD. 3 rpm (RTH) a 37.5 °C. RTH (◇) y RTD (□).

La tasa de producción máxima alcanzada fue de significativamente mayor en el RTH que en los RTD, ésta fue de 15.70 mg/gms h y de 10.72 mg/gms h respectivamente. En comparación con el cultivo en condiciones estáticas de la sección anterior, se logró mejorar este parámetro en un 25 %.

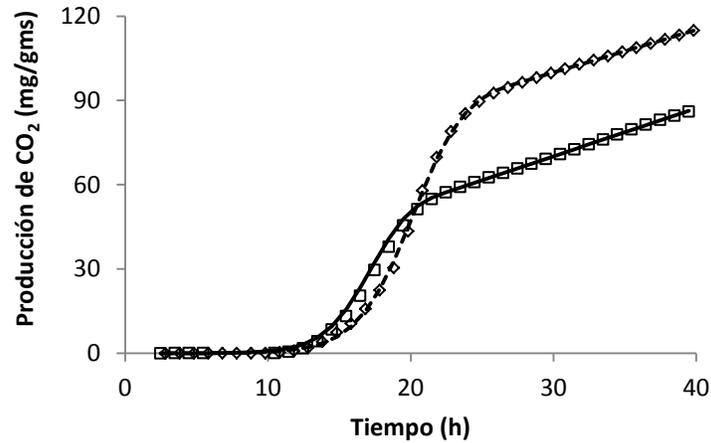


Figura 7-46. Producción de CO₂ de *A. versicolor* en el RTH con agitación y en RTD. 3 rpm (RTH) a 37.5 °C. RTH (◇) y RTD (□). Las líneas representan el ajuste al modelo logístico fraccionado.

En la Figura 7-46 se presenta la producción de CO₂ y en la Tabla 7-19 los parámetros cinéticos estimados para este cultivo. La producción de CO₂ en el reactor agitado aumentó cerca del 20 % en comparación con el cultivo en condiciones estáticas. La fase *lag* se retrasó cerca de 1 h y la tasa específica de producción de CO₂ disminuyó.

Tabla 7-19. Parámetros cinéticos estimados en los cultivos de *A. versicolor* en el RTH agitado y RTD estático.

Parámetro	Tipo de Biorreactor	
	RTH	RTD
$P_{CO2_{final}}$ (mg/gms)	114.88 ± 9.21	86.33 ± 8.07
μ (h ⁻¹)	0.52 ± 0.02	0.61 ± 0.06
$r_{CO2_{max}}$ (mg/gms h)	15.70 ± 0.48	10.72 ± 1.41
<i>lag</i> (h)	11.88 ± 0.05	12.02 ± 0.43
R ²	0.999	1.000

Estos resultados sugieren que la agitación en este cultivo mejoró la aireación y la homogeneidad del soporte, lo que permitió que el microorganismo presentara una mayor producción de CO₂. Esto se confirmó con observaciones al microscopio estereoscópico. En la Figura 7-47 se presenta el perfil de temperaturas en el cultivo de *A. versicolor* en RTH agitado.

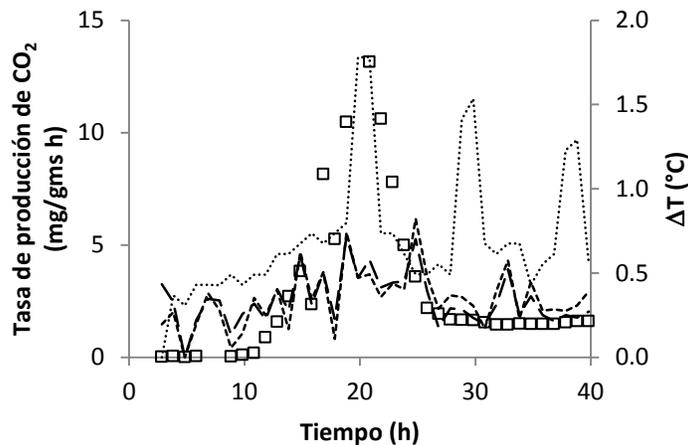


Figura 7-47. Perfil de temperaturas en el aire de salida y en dos posiciones del cuerpo del RTH en el cultivo de *A. versicolor*. Tasa de producción de CO₂ (□). Aire (....); T1 (---) y T2 (----).

Se midieron los incrementos de temperatura y se observó que la agitación tuvo un efecto significativo en la formación de gradientes de temperatura. El máximo incremento en la temperatura del aire a la salida del reactor fue de 1.78 °C. Mientras que en la superficie del lecho no hubo incrementos de temperatura importantes en ninguna de las dos posiciones monitoreadas.

Por otra parte, el cultivo de *R. microsporus* fue inoculado con micelio debido a que no este hongo no esporula tanto como *A. versicolor*, por lo que la cantidad de suspensión de esporas necesaria representaba más del 10 % del volumen de medio para ajustar la humedad. Para ello, se propagó este hongo en medio YPD a pH 6 por 24 h, y se inoculó el medio Czapek-Dox NU con un volumen

equivalente al 5 % del requerido. En la Figura 7-48 se presenta la tasa de producción de CO₂ en el cultivo de *R. microsporus* en el RTH agitado.

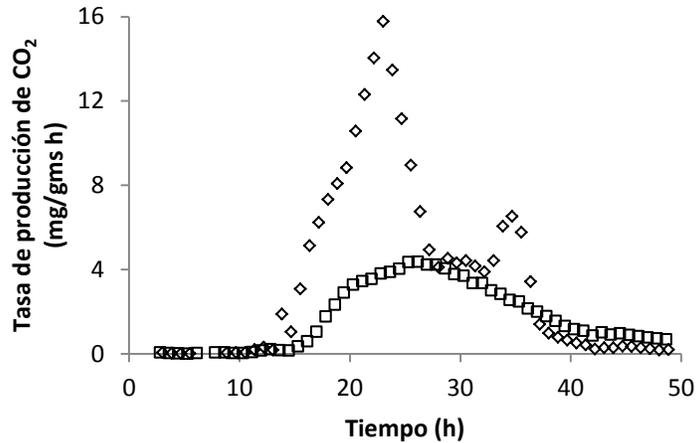


Figura 7-48. Tasa de producción de CO₂ de *R. microsporus* en el RTH con agitación y en RTD. 3 rpm (RTH) a 37.5 °C. RTH (◇) y RTD (□).

En este caso el cultivo en RTH presentó una tasa de producción de CO₂ de 15.78 mg/gms h que es más del doble de la encontrada bajo condiciones estáticas (133 % más). Sin embargo, a las 30 h de cultivo se presentó una segunda fase de crecimiento. Este comportamiento puede deberse a la inducción de una forma de dimorfismo de *R. microsporus* (Bandyopadhyay y col., 2012). Se hizo un frotis del cultivo y se constató la presencia de levaduras.

Para comprobar este fenómeno, se resembraron muestras del cultivo en cajas Petri con agar PDA y se incubaron a 37.5 °C por 24 h. Se aisló una colonia (Figura 7-49) y se resembró en cajas Petri con agar PDA con cloranfenicol a 500 ppm para eliminar bacterias. Después de 24 h se resembró una colonia en agar PDA y se incubó a 37.5 °C por 24 h. En la Figura 7-50 se observa la formación de hifas cenocíticas a partir de levaduras. En este trabajo no se identificó plenamente la forma levaduriforme de *R. microsporus* por lo que se recomienda que se haga una evaluación más extensa de este fenómeno.



Figura 7-49. Levaduras aisladas del cultivo de *R. microsporus* en agar PDA con cloranfenicol.

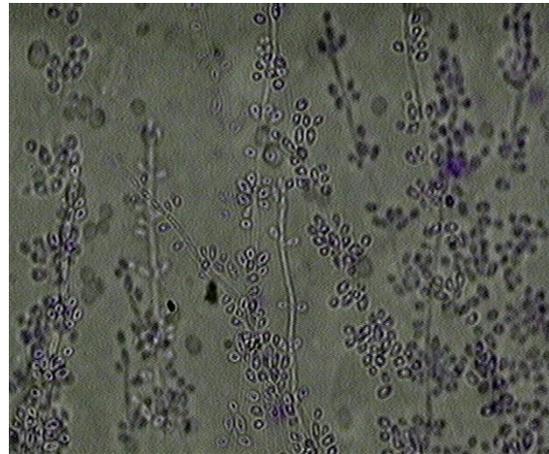


Figura 7-50. Aparente formación de micelio a partir de la levaduras de *R. microsporus*. (40X).

En la Figura 7-51 se presenta la producción de CO₂ del cultivo de *R. microsporus*. Se puede observar que la curva tiene diversas fases de respiración. La primera corresponde a la forma micelial y corresponde a un perfil respiratorio convencional. La segunda etapa corresponde a un perfil respiratorio no asociado a crecimiento. Por último se genera una nueva producción de CO₂ exponencial que corresponde al crecimiento de la forma levaduriforme.

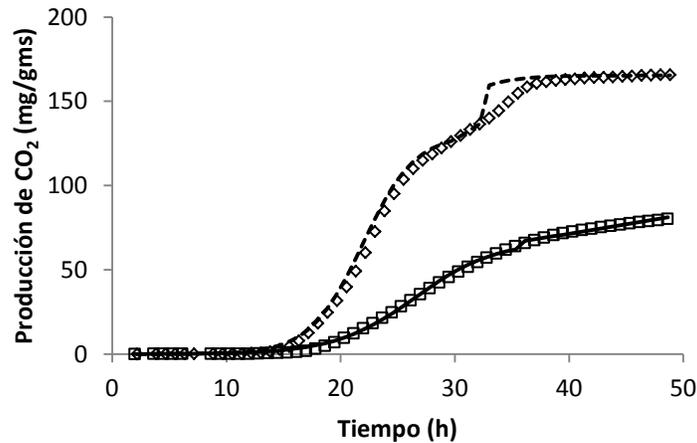


Figura 7-51. Producción de CO₂ de *R. microsporus* en el RTH con agitación y en RTD. 3 rpm (RTH) a 37.5 °C. RTH (◇) y RTD (□). Las líneas representan el ajuste al modelo logístico fraccionado.

Tabla 7-20. Parámetros cinéticos estimados para los cultivos de *R. microsporus* en biorreactores.

Parámetro	Tipo de Bioreactor	
	RTH	RTD
$P_{CO2_{final}}$ (mg/gms)	165.22 ± 21.71	81.09 ± 4.84
μ (h ⁻¹)	0.44 ± 0.05	0.28 ± 0.01
$r_{CO2_{max}}$ (mg/gms h)	15.78 ± 0.97	4.40 ± 0.17
<i>lag</i> (h)	13.56 ± 0.36	15.70 ± 0.55
R ²	0.999	0.997

El consumo de sustrato en estos experimentos fue mayor del 95 % en ambos cultivos. A través de los balance de carbono podemos observar que en el cultivo de *A. versicolor* el porcentaje de mineralización de la sacarosa fue de 37 %, mientras que en *R. microsporus* fue de 59.94 %. Como se mencionó anteriormente este exceso de mineralización de fuente de carbono puede deberse a la degradación parcial del soporte. Sin embargo no se detectó actividad celulasas ni xilanasas.

En la Figura 7-52 se presenta el perfil de temperaturas en el cultivo de *R. microsporus* en RTH agitado. En este caso, el aumento de temperatura en el aire de salida fue de 1.60 °C mientras que en las posiciones monitoreadas en el cuerpo del reactor no hubo diferencias significativas. Sin embargo, los gradientes de temperatura generados no representaron un riesgo para este microorganismo. Como se observó en gráfica 7.48, la tasa de producción de CO₂ fue más del doble en comparación con la tasa de producción de CO₂ en el cultivo estático. En consecuencia la generación de calor debe de ser proporcional al aumento de la actividad respiratoria, por lo que la remoción de calor fue mayor.

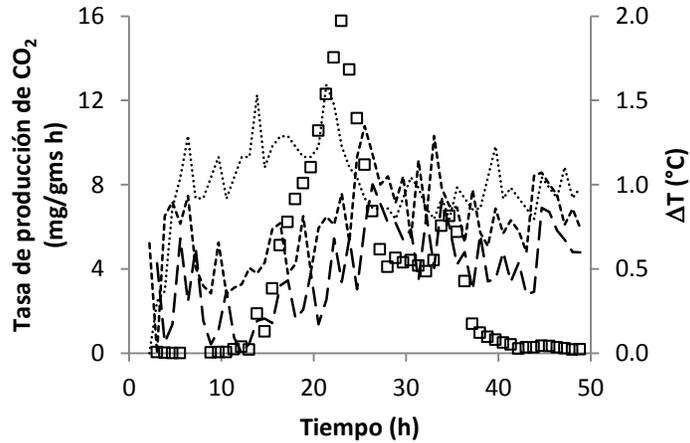


Figura 7-52. Perfil de temperaturas en el aire de salida y en dos posiciones del cuerpo del RTH en el cultivo de *R. microsporus*. Tasa de producción de CO₂ (□). Aire (....); T1 (---) y T2 (----).

Con este experimento concluimos que el mezclado en los cultivos en medio sólido en combinación con la aireación forzada son mecanismos eficientes para evitar los gradientes de temperatura sin provocar daños a los microorganismos independientemente de la presencia o ausencia de hifas septadas.

8. CONCLUSIONES

8.1. General

El cultivo en medio sólido en biorreactores agitados no tuvo efecto negativo en la producción de CO₂ del hongo septado *Aspergillus versicolor*, sin embargo, bajo las condiciones de agitación evaluadas en este trabajo, la agitación mecánica provocó cambios importantes en el perfil respiratorio y en la generación de un cultivo levaduriforme del hongo no septado *Rhizopus microsporus*.

8.2. Particulares

Se seleccionó un soporte inerte con características adecuadas en cuanto a capacidad de retención de agua (tres veces su peso), tamaño de partícula y densidad para los experimentos en los reactores de tanque horizontal bajo condiciones estáticas y agitadas.

Se observó la importancia de controlar el pH a lo largo del cultivo a través de la adición de sales que funcionen con agente regulador. La estrategia de usar urea y sulfato de amonio aparentemente fue más adecuada ya que permitió además suministrarle una fuente de nitrógeno asimilable a *R. microsporus*.

Se desarrolló una estrategia para estimar los parámetros cinéticos por intervalos discretos asociados al crecimiento confiable y capaz de describir muy precisamente (coeficientes de correlación mayores a 0.95) ambas fases de respiración, la asociada al crecimiento y la no asociada al crecimiento.

Se establecieron las condiciones de operación más adecuadas para la operación de los reactores de tanque horizontal en cuanto a temperatura. Se observó que en

reactores tubulares los gradientes de temperatura en dirección axial son mucho menores que los gradientes en dirección radial.

En los reactores de tanque horizontal hubo la formación de gradientes sólo en dirección radial tanto en condiciones estáticas como agitadas.

La agitación del medio provocó una mejora en la tasa de respiración de ambos microorganismos. Pero aparentemente indujo el dimorfismo en la cepa de *R. microsporus*.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Muhtaseb A. H., Mc Minn W. A. M. and Megee T. R. A. (2002). Moisture sorption isotherm characteristics of foods products: a review. *Food and Bioproducts Processing*, 80:118-128
- Baysal Z., Uyar F., Aytekin C. (2003). Solid state fermentation for production of α -amylase by thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochemistry*, 38:1665-1668.
- Brunauer S., Deming L. S., Deming W. E. and Troller E. (1940). On the theory of Van der Waals adsorption of gases. *Journal of the American Chemical Society*, 62:1723-1732.
- Chiellini E., Corti A., D'Antone S. (2007). Microbial biomass yield and turnover in soil biodegradation test: carbon substrate effects. *Journal of Polymers and the Environment*, 15:169-178.
- Córdova-López J. y Roussos S. (2001, 10-14 septiembre). Producción de lipasas de hongos termófilos cultivados en medios sólidos y líquidos. Trabajo presentado en el IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.
- De Reu J.C., Zwietering M.H., Rombouts F.M. and Nout R.J.M. (1993). Temperature control in solid substrate fermentation through discontinuous rotation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40:261-265.
- Durand A. (2003). Bioreactor design for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13:113-125.
- Desgranges C., Vergoingnan C., Léréec A., Riba G. and Durand A. (1993). Use of solid state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of European corn borer. *Biotechnology Advances*, 11:577-587.
- Fanaei M. A. and Vaziri B. M. (2009). Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors. *Chemical Engineering and Processing*, 48:446-451.
- Figueroa-Montero A. (2011). Modelamiento de la transferencia de calor y masa (agua) en un bioreactor de charolas para fermentación en medio sólido. Tesis de Doctorado. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Gálvez V. A., Aravena L. E., Mondaca L. R. (2006). Isothermas de adsorción en harinas de maíz. *Food Science and Technology*, 26:821-827.
- Ghildyal N. P., Gowthman M. K. and Rao K. S. M. R. (1994). Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients. *Enzyme and Microbial Technology*, 16:253-257.
- Gutiérrez-Rojas M., Aboul H. S. A., Auria R., Rheva S. and Favela-Torres E. (1996). Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 31:363-369.

- Han B., Kiers J.L. and Nout R.M.J. (1999). Solid-substrate fermentation of soy-beans with *Rhizopus spp.*: Comparison of discontinuous rotation with stationary bed fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88:205-209.
- Hang Y. D. and Woodams E. E. (1987). Effect of substrate moisture content on fungal production of citric acid in a solid state fermentation system. *Biotechnology Letters*, 9:183-186.
- Hernández-Rodríguez B., Córdova J., Bárzana E. and Favela-Torres E. (2009). Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61:136-142.
- Hölker U. and Lenz J. (2005). Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8:301-306.
- Larroche C., Gross J.B. (1986). Spore production of *Penicillium roqueforti* in fermentors filled with buckwheat seeds: batch and semi-continuous cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24:134-139.
- Lee S. K., Lee H. J., Min H. Y., Park E. J., Lee K. M., Ahn Y. H., Cho Y. J. and Pyee J. H. (2005). Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia*, 76:258-260.
- Manpreet S., Sawraj S., Sachin D., Pankaj S. and Banerjee U. C. (2005). Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 1:1-9.
- Marsh A.J., Mitchell D.A., Stuart D.M. and Howes T. (1998). O₂ uptake during solid-state fermentation in a rotating drum bioreactor. *Biotechnology Letters*, 20:607-611.
- Martínez-Ruiz A., García H. S., Saucedo-Castañeda G. and Favela-Torres E. (2008). Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151:393-401.
- Martínez-Ruiz J. A. (2005). Hidrólisis de sacarosa en un reactor de lecho empacado con invertasa y *Aspergillus niger* inmovilizados en el medio de cultivo sólido. Tesis de maestría. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Minjares-Carranco A., Trejo-Aguilar B. A., Aguilar G. and Viniegra-González G. (1997). Physicochemical comparison between pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 21:25-31.
- Mitchell D.A., Doelle H.W. and Greenfield P.H. (1988). Improvement of growth of *Rhizopus oligosporus* on a model solid substrate. *Biotechnology Letters*, 10:497-502.
- Mitchell D. A., Krieger N., Stuart D. M., Pandey A. (2000). New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, 35:1211-1225.

- Mitchell D. A., Tongta A., Stuart D. M. and Krieger N. (2002). The potential of establishment of axial temperature profiles during solid-state fermentations in rotating drum bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 80:115-122.
- Mudgett R. E. (1986). Solid-state fermentations. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Ed. A.L. Demain and H.A. Solomon. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp: 66-83.
- Murray P. R. (1990). Medical microbiology. USA. Elsevier Inc.
- Nagel F.J.L., Tramper J., Bakker M.S.N. and Rinzema A. (2001). Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72:219-230.
- Nava I., Favela-Torres E. and Saucedo-Castañeda G. (2011). Effect of mixing on the solid-state fermentation of coffee pulp with *Aspergillus tamari*. *Food Technology and Biotechnology*, 49:391-395.
- Nava I., Gaime-Perraud I., Huerta-Ochoa S., Favela-Torres E., and Saucedo-Castañeda G. (2006). *Penicillium commune* spore production in solid-state fermentation of coffee pulp at laboratory scale and in helical ribbons rotating reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81:170-176.
- Nava-Villagómez, J. I. (2003). Fermentación de pulpa de café con *Penicillium commune* a nivel laboratorio y semi-piloto. Tesis de maestría. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Okazaki N., Sugama S. and Tanaka T. (1980). Mathematical model for surface culture of koji mold: Growth of koji mold on the surface of steamed rice grains (IX). *Journal of Fermentation Technology*, 58:471-476.
- Oostra J., Tramper J. and Rinzema. (2000). Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats. *Enzyme and Microbiology Technology*, 27:652-663.
- Pandey A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 27:109-117.
- Pandey A., Soccol C. R. and Mitchell D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. *Process Biochemistry*, 35:1153-1169.
- Pérez-Guerra N., Torrado-Agrasar A., López-Macías C. and Pastrana L. (2003). Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2:343-350.
- Rahardjo Y.S.P., Weber F.J., Le Comte P., Tramper J. and Rinzema A. (2002). Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering*, 78:539-544.

- Rimbault M. and Alazard D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 9:199-209.
- Rimbault M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Process Biotechnology*, 15:1-23.
- Rajagopalan S. and Modak J. M. (1995). Modeling of heat and mass transfer for solid state fermentation process in try bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 13:161-169.
- Ruiz Herrera J. (2011). El asombroso mundo de los hongos. *Avance y Perspectiva*, 20:275-281.
- Ruíz-Leza H. A., Rodríguez-Jasso R. M., Rodríguez-Herrera R., Contreras-Esquivel J.C. and Aguilar C. N. (2007). Bio-reactors desing for solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6:33-40.
- Saucedo-Castañeda G. and Trejo-Hernández M. R. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*, 29:13-24.
- Saucedo-Castañeda G., Lonsane B.K., Navarro J.M., Roussos S. and Rimbault M. (1992). Control of carbon dioxide in exhaust air as a method for equal biomass yields at different bed heights in a column fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37:580-582.
- Schutyser M.A.I., de Pagter P., Weber F.J., Briels W.J., Boom R.M. and Rinzema A. (2003). Substrate aggregation due to aerial hyphae during discontinuously mixed solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae*: Experiments and modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 83:503-513.
- Schlegel H. and Zaborosch C. (1997). *Microbiología General*. Barcelona (España). Omega.
- Silman R. W., Conway H. F., Anderson R. A. and Bagley E. B. (1979). Production of aflatoxin in corn by a large-scale solid-substrate fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering*, 21:1799-1808.
- Smits J. P., Rinzema A., Tramper J., Van Sonsbeek H. M., Hage J. C., Kaynak A. and Knol W. (1998). The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 22:50-57.
- Sorenson W. G. and Hesseltine C. W. (1966). Carbon and nitrogen utilization by *Rhizopus oligosporus*. *Mycologia*, 58:681-689.
- Szewczyk K. W. and Myszka L. (1994). The effect of temperature on the growth of *A. niger* in solid state fermentation. *Bioprocess Engineering*, 10:123-126.
- Torres-Mancera M. T. (2013). Obtención de ácido clorogénico de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido. Tesis de doctorado. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Veerabhadrapa B. M., Shivakumar B. S. and Devappa S. (2014). Solid-state fermentation of *Jatropha* seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in

Jatropha seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117:208-2014.

- Weber F.J., Oostra J., Tramper J. and Rinzema A. (2002). Validation of a model for process development and scale-up of packed solid-state reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 77:381-393.