
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**Fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* en
fermentación en medio sólido con diferentes
soportes**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MARÍA ISABEL JUÁREZ CÁRDENAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

ASESORES:

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPÚLVEDA

DR. GERARDO GUTIÉRREZ SÁNCHEZ

2015

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT en nivel internacional, con la referencia 001465”

México D.F. a 03 de Diciembre del 2015

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación en medio
sólido con diferentes soportes**

que presentó:

María Isabel Juárez Cárdenas

Comité Tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

Asesor: Dr. Gerardo Gutiérrez Sánchez

Jurado:

Presidente: Dr. Octavio Loera Corral

Secretaria: Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

Vocal: Dra. Luz María Zenit Tovar Castro

Vocal: Dra. María Teresa Torres Mancera



DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a este momento.

A mi mami linda por siempre apoyarme, ser padre y madre y una guerrera incansable.

A Manuel y Andy que son mi motor para seguir adelante, los amo mis amores.

*A Ernesto porque gracias a él, la confianza y el apoyo que me dio incondicionalmente
estoy aquí.*

*A Tania, Gerardo, Loera, Luz y Tere por sus oportunos comentarios para mejorar la
tesis.*

A mis amigas Dan y Nohemí que siempre me apoyaron y creyeron en mí, las adoro.

*A los colegas de la Pp4 que gracias a ellos mi estancia en el laboratorio fue agradable,
gracias por sus consejos.*

A CONACYT por su apoyo económico.

A mí, porque volví a recuperar la esencia que había perdido.

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de dos tipos de soporte (agrolita y aserrín) sobre la fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* CH4 en fermentación en medio sólido (FMS). En la primera etapa se caracterizaron los soportes inertes, evaluando la capacidad de retención de agua, humedad crítica, velocidad máxima de secado e isotermas de adsorción. Los valores de la capacidad de retención de agua fueron 4.2 ± 0.3 gramos de agua (g_{agua})/g de soporte seco (S_s) y 4.7 ± 0.2 g_{agua}/gS_s para agrolita y aserrín respectivamente. Mediante curvas de secado se obtuvo la humedad crítica y las velocidades máximas de secado de cada soporte, obteniendo valores de 1.52 ± 0.1 y 0.61 ± 0.01 g_{agua}/gS_s , respectivamente, para la agrolita y de 1.70 ± 0.1 y 0.56 ± 0.01 g_{agua}/gS_s para el aserrín. Los datos obtenidos en las isotermas de adsorción fueron ajustados al modelo de Henderson, encontrando que las constantes del modelo para cada soporte fueron: n de 0.32 y 0.91, k de 6.13 y 7.57 en agrolita y aserrín respectivamente. Las diferencias obtenidas en los valores de las constantes son atribuidas a la naturaleza de cada soporte. Una vez caracterizados los soportes inertes, en la segunda etapa se evaluó el efecto del soporte sobre la fisiología de crecimiento de *A. niger*.

El crecimiento del hongo se estimó en los sistemas de FMS mediante la medición en línea de la producción de CO_2 y consumo de O_2 en un respirómetro y por el consumo de glucosa (GC). Se evaluaron concentraciones iniciales de glucosa de 50 a 300 g/L en ambos soportes. En todas las concentraciones evaluadas se obtuvo una conversión de glucosa mayor al 90%. Se cuantificó también el contenido de humedad y el pH al inicio y al final del cultivo. La fase Lag se mantuvo casi constante ($t_{\text{Lag}} = 8.44 \pm 0.4$ h) independientemente de la concentración inicial de glucosa cuando se utilizó aserrín; en contraste, altas concentraciones de glucosa incrementaron el t_{Lag} en agrolita, alcanzando valores cercanos a 15 h.

Se registró una mayor actividad respiratoria cuando *A. niger* creció en aserrín, encontrando que la producción de CO_2 fue de 1.4 a 1.8 veces mayor que la obtenida en agrolita. Las tasas de producción de CO_2 en aserrín fueron entre 1.4 y 2.1 veces mayores que las obtenidas con agrolita y las de consumo de O_2 de 1.5 a 2.3 veces. Para ambos soportes, la producción de CO_2 fue mayor que el consumo de O_2 , indicando que la mineralización del carbono se favoreció en todas las condiciones evaluadas.

En el Capítulo 3 se evaluaron diferentes relaciones C/N en orden creciente (8.3 a 65.6) y se observó que cuando el microorganismo crece en aserrín al aumentar la relación C/N el tiempo de la fase Lag disminuye de 16 h a 8 h, mientras que en agrolita la fase Lag se mantuvo con un $t_{Lag}=15.6 \pm 1.1$ h.

Para relaciones C/N entre 16.5 y 65.6, se encontraron tasas máximas de producción de CO₂ (0.44 ± 0.1 mgCO₂/gGC h) y de consumo de O₂ (0.37 ± 0.07 mgO₂/gGC h) muy similares en ambos soportes. Sin embargo en la relación C/N de 8.3, los valores de las tasas máximas de CO₂ y O₂ obtenidas en aserrín (0.55 mgCO₂/gGC h y 0.44 mgO₂/gGC h) fueron casi el doble que en agrolita. Tanto la producción total de CO₂ como el consumo de O₂ obtenidos en cada soporte fueron independientes de la relación C/N; esto se vio reflejado en el coeficiente respiratorio que se encontró ligeramente mayor a 1.

El grupo de Solis 1996 utilizó agua como disolvente en sus medios de cultivo y nosotros utilizamos agua comercial Bonafont®, probablemente en las relaciones C/N más grandes no notamos diferencias en los parámetros de crecimiento entre soporte, es por eso que decidimos evaluar el efecto del tipo de agua (destilada y Bonafont®) sobre la fisiología de crecimiento de *A. niger*. Con los datos obtenidos en línea mediante el sistema respirométrico obtuvimos diferentes parámetros asociados al crecimiento. En primera instancia se observó que la fase Lag fue menor en aserrín (12 h) que en agrolita (15 h), y no hubo diferencia significativa entre tipos de agua. Probablemente, el pH influyó en los resultados de la fase de adaptación, la humedad en ambos soportes fue similar (50%). Los valores obtenidos de las tasas máximas de producción de CO₂ y de consumo de O₂ fueron semejantes en ambos soportes y en los dos tipos de agua evaluados.

Por lo descrito anteriormente, debido a las diferencias encontradas en el grado de interacción del agua con los soportes y en los parámetros obtenidos a partir de la fisiología de crecimiento, es posible concluir que la interacción entre el agua y el soporte en FMS tiene efecto sobre la fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* bajo las condiciones ambientales controladas.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	12
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Tipos de sistemas de fermentación.....	14
2.2. Aspectos importantes de la FMS.....	16
2.2.1. Microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido	16
2.2.2. Soportes	17
2.3. Factores ambientales que afectan el crecimiento microbiano y síntesis de producto en FMS..	20
2.4. <i>Aspergillus niger</i>	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. OBJETIVOS	26
4.1. Objetivo general.....	26
4.2. Objetivos particulares	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. Microorganismo	27
5.2. Conservación de la cepa.....	27
5.3. Propagación del inóculo.....	27
5.4. Medio de cultivo.....	27
5.5. Soportes inertes	29
5.6. Capacidad de retención de agua (CRA).....	29
5.7. Determinación de la humedad crítica	29
5.8. Isotermas de adsorción de agua	30
5.9. Fermentación en medio sólido	30
5.10. Tratamiento de muestras de FMS.....	30
5.11. Análisis de gases.....	31

5.12.	Determinación de glucosa.....	32
5.13.	Humedad.....	32
5.14.	pH.....	33
5.15.	Medición indirecta del crecimiento.....	31
6.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
6.1.	CARACTERIZACIÓN DE LOS SOPORTES.....	36
6.2.	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE GLUCOSA SOBRE LA FISIOLÓGÍA DE <i>Aspergillus niger</i>	43
6.3.	EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO-NITROGENO SOBRE LA FISIOLÓGÍA DE <i>Aspergillus niger</i>	61
6.3.1.	Fase Lag.....	61
6.4.	EFFECTO DEL TIPO DE AGUA SOBRE LA FISIOLÓGÍA DE <i>Aspergillus niger</i>	69
6.4.2	Producción de CO ₂ y consumo de O ₂	73
7.	CONCLUSIONES.....	77
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	78
9.	ANEXO.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Ejemplos de FMS usando soportes inertes impregnados.	19
Tabla 3 Composición de los medios de cultivo utilizados para evaluar el efecto de la concentración de glucosa en la fisiología de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> CH4.	28
Tabla 4 Composición de los medios de cultivo utilizados para evaluar el efecto de la relación de nutrientes en la fisiología de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> CH4.....	28
Tabla 5 Capacidad de retención de agua de los soportes.....	37
Tabla 6. Modelo tipo Langmuir ajustado para cada soporte	38
Tabla 7 Velocidad máxima de secado y humedad crítica obtenida a partir de la curva de secado para cada soporte.....	39
Tabla 8. Datos obtenidos del ajuste del modelo de Henderson a los datos experimentales de los soportes inertes.	42
Tabla 9 Parámetros asociados a la medición de CO ₂ , O ₂ y glucosa durante el cultivo de <i>A. niger</i> en FMS.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfología de <i>Aspergillus niger</i>	24
Figura 2 Curvas de secado, lado izquierdo curva de la agrolita y lado derecho curva del aserrín.	38
Figura 3. Isotermas de adsorción para la agrolita (línea punteada) y para el aserrín (línea continua). Las líneas corresponden al ajuste realizado con el modelo de Henderson de los datos experimentales obtenidos para cada soporte.	41
Figura 4. Tasa de producción de CO ₂ (□) y de consumo de O ₂ (○) en la fase gaseosa a la salida de la columna de fermentación. Los números romanos indican las fases de crecimiento de <i>A. niger</i> : I, Lag; II, aceleración; III, desaceleración; IV, mantenimiento.	44
Figura 5 Tasas de producción de CO ₂ (□) y consumo de O ₂ (○) durante el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en FMS, expresadas en función de la glucosa consumida.	45
Figura 6. Datos integrados de producción de CO ₂ (□) y consumo de O ₂ (○) durante el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en FMS, expresadas en función de la glucosa consumida.....	46
Figura 7 Representación gráfica de la función logística.....	47
Figura 8 Tasa de producción de CO ₂ por <i>A. niger</i> CH ₄ en FMS con agrolita (a) y aserrín (b) como soportes y con diferentes concentraciones iniciales de glucosa en (mg/mL).....	49

Figura 9 Concentración inicial y final de glucosa en los sistemas de FMS con <i>A. niger</i> usando agrolita (Ag) y aserrín (As) como soporte. Se evaluaron diferentes concentraciones iniciales de glucosa: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 g/L.	51
Figura 10 Humedad inicial y final en los sistemas de FMS con <i>A. niger</i> usando agrolita (Ag) y aserrín (As) como soporte. Las concentraciones iniciales de glucosa evaluadas fueron: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 g/L.	53
Figura 11. Valores iniciales y finales de pH en los sistemas de FMS con <i>A. niger</i> usando agrolita (Ag) y aserrín (As) como soporte. Las concentraciones de glucosa evaluadas fueron: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 g/L.	54
Figura 12. Tiempo de la fase de germinación (Lag) en función de la concentración inicial de glucosa durante el cultivo de <i>A. niger</i> en FMS con agrolita (□) y aserrín (o) como soportes. Los valores corresponden al promedio de tres unidades experimentales independientes.	56
Figura 13 Tasas máximas de producción de CO ₂ <i>A. niger</i> en medios de cultivo con diferente concentración inicial de glucosa en FMS con agrolita (□) y aserrín (o) como soportes. Los valores son el promedio de tres unidades experimentales independientes.	57
Figura 14 Tasa específica de producción de CO ₂ durante el cultivo de <i>A. niger</i> medios de cultivo con diferente concentración inicial de glucosa en medios con agrolita (□) y aserrín (o) como soportes inertes	58
Figura 15 Producción de CO ₂ (a) y consumo de O ₂ (b) durante el cultivo de <i>A. niger</i> en FMS con diferente concentración inicial de glucosa, con agrolita (□) y aserrín (o) como soportes inertes. Los valores corresponden al promedio de tres unidades experimentales independientes.	59
Figura 16 Coeficiente respiratorio global del cultivo de <i>A. niger</i> en FMS con diferente concentración inicial de glucosa en agrolita (□) y aserrín (o) como soportes inertes. Se muestran los promedios de tres replicas independientes.	60
Figura 17 Fase de germinación (Lag) en función de la relación C/N durante el cultivo de <i>A. niger</i> en medio sólido con agrolita (□) y aserrín (o) como soportes.	62
Figura 18 Efecto de la relación C/N (CN) en la humedad inicial y final de los sistemas de FMS con <i>A. niger</i> usando agrolita (Ag) y aserrín (As) como soporte. Los números en las leyendas del eje de las abscisas indican la relación C/N.	63

Figura 19 Efecto de la relación C/N (CN) en los valores iniciales y finales de pH en los sistemas de FMS con <i>A. niger</i> usando agrolita (Ag) y aserrín (As) como soporte. Los números en las leyendas del eje de las abscisas indican la relación C/N.....	64
Figura 20 Efecto de la relación C/N sobre las tasas máximas de producción de CO ₂ (a) y consumo de O ₂ (b) durante el cultivo de <i>A. niger</i> en FMS con agrolita (□) y aserrín (o) como soportes.	65
Figura 21 Efecto de la relación C/N sobre las tasas específicas de producción de CO ₂ (a) y consumo de O ₂ (b) durante el cultivo de <i>A. niger</i> en FMS usando agrolita (□) y aserrín (o) como soportes.....	66
Figura 22 Efecto de la relación C/N sobre la producción de CO ₂ (a) y consumo de O ₂ (b) durante el cultivo de <i>A. niger</i> en FMS con agrolita (□) y aserrín (o) como soportes.	67
Figura 23 Coeficiente respiratorio global del cultivo de <i>A. niger</i> en medios de cultivo con diferente concentración inicial de glucosa en medios con agrolita (□) y aserrín (o) como soportes inertes.	68
Figura 24 Efecto del tipo de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]) sobre el consumo de glucosa por <i>A. niger</i> en FMS con agrolita (Ag) y aserrín (As) como soportes.	70
Figura 25 Tiempo de la fase de germinación (Lag) en función del tipo de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]) durante el cultivo de <i>A. niger</i> en FMS con agrolita (■) y aserrín (□) como soportes.	71
Figura 26 Humedad inicial y final en las columnas de FMS con agrolita (Ag) y aserrín (As) como soportes, utilizando diferente tipo de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]).....	72
Figura 27 Valores iniciales y finales de pH en las columnas de FMS con agrolita (Ag) y aserrín (As) como soportes, utilizando diferente tipo de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]).....	73
Figura 28 Tasas máximas de producción de CO ₂ durante el crecimiento de <i>A. niger</i> en FMS usando diferentes tipos de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]), con agrolita (■) y aserrín (□) como soportes. Las barras indican el promedio de los valores obtenidos para dos unidades experimentales independientes.	74
Figura 29 Tasas máximas de consumo de O ₂ durante el crecimiento de <i>A. niger</i> en FMS usando diferentes tipos de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]), con agrolita (■) y aserrín (□) como soportes. Las barras indican el promedio de los valores obtenidos para dos unidades experimentales independientes.	75
Figura 30 Coeficiente respiratorio global del cultivo de <i>A. niger</i> en FMS usando diferentes tipos de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]), con agrolita (■) y aserrín (□) como soportes. Las barras indican el promedio de los valores obtenidos para dos unidades experimentales independientes.....	76

1 INTRODUCCIÓN

La fermentación se ha utilizado ampliamente para la producción de una gran variedad de sustancias que son benéficas para la sociedad. A través de los años, las técnicas de fermentación han ganado gran importancia debido a sus ventajas en el desarrollo económico y ambiental. Las técnicas antiguas se han modificado en profundidad para maximizar la productividad. Esto ha involucrado el desarrollo de nuevos equipos y procesos. Las dos técnicas de fermentación mayormente utilizadas como resultado de este rápido desarrollo son la fermentación líquida (FML) y la fermentación en medio sólido (FMS).

El desarrollo de técnicas de FML y FMS ha dado lugar a la producción a nivel industrial de numerosos compuestos, como enzimas, ácidos orgánicos, alimentos, biopesticidas, entre otros. Numerosos estudios han observado que la aplicación de la fermentación en estado sólido posee diferentes ventajas biotecnológicas como alta productividad, alta concentración final de productos y baja represión catabólica (Hölker y col., 2004).

La fermentación líquida utiliza sustratos líquidos que fluyen libremente, como la melaza y caldos nutritivos. Los nutrientes se utilizan con bastante rapidez; por lo tanto, necesitan ser constantemente reemplazados. Esta técnica de fermentación es la más adecuada para microorganismos que requieren alto contenido de humedad (Subramaniyam y Vimala 2012).

La FMS involucra el crecimiento de microorganismos (generalmente hongos) sobre sustratos sólidos húmedos. Pueden distinguirse dos tipos de sistemas dependiendo de la naturaleza de la fase sólida utilizada (Ooijkaas y col., 2000). El primero y el más comúnmente utilizado es el cultivo sobre un material natural, en este caso el material tiene dos funciones, como soporte y como fuente de nutrientes para el microorganismo. El segundo sistema involucra el crecimiento de los microorganismos sobre un soporte inerte impregnado con un medio líquido, el soporte sólido puede ser de origen natural sirviendo como punto de anclaje para el microorganismo (Ooijkaas y col., 2000).

Estudios realizados en FMS han mostrado que existen diferentes factores que afectan al crecimiento de los microorganismos, tales como, temperatura, concentración del sustrato, pH, actividad de agua, humedad y la naturaleza de soporte utilizado. Lo anterior indica que la

interacción del agua y el soporte influyen en la fisiología de crecimiento de los microorganismos. Con base en lo anterior, el objetivo general de este trabajo fue demostrar que el grado de interacción entre el agua y el soporte tiene efecto sobre la fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* CH4, dependiendo de la naturaleza del soporte.

En el primer capítulo de este estudio se presentan los resultados de la caracterización física de los dos soportes inertes que se utilizaron. Lo anterior consistió en evaluar propiedades como la capacidad de retención de agua, humedad crítica y se obtuvieron curvas de adsorción de agua de cada soporte. Una vez que se obtuvieron las diferencias en las propiedades entre los soportes inertes debido a su origen y composición distinta, en el segundo capítulo se presentan los resultados de la evaluación del efecto de concentraciones elevadas de fuente de carbono sobre la fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* CH4 en FMS con los dos soportes. Considerando la dificultad para estimar la concentración de biomasa en los medios sólidos, las variables de respuesta relevantes fueron aquellas relacionadas con la respiración del cultivo y el consumo de glucosa. En el tercer capítulo se presentan los resultados del efecto de la relación carbono-nitrógeno (C/N) sobre la fisiología de crecimiento de *A. niger* en FMS, evaluando diferentes relaciones C/N con los dos soportes inertes. Finalmente, en el cuarto capítulo, se discuten los resultados del efecto del tipo de agua sobre la fisiología de crecimiento de *A. niger* en FMS con aserrín y con agrolita.

Para facilitar el análisis de los resultados obtenidos, en los capítulos 2, 3 y 4 los resultados se presentan con base en la glucosa consumida (GC); primeramente presentamos la fase Lag, las tasas máximas de producción de CO₂ y consumo de O₂ y las tasas específicas de producción de CO₂ y consumo de O₂. Posteriormente, se presentan y discuten los resultados relacionados con la producción y consumo globales de CO₂ y O₂ respectivamente y el coeficiente respiratorio (CR) global en todos los procesos.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El estudio de los procesos de fermentación en medios sólidos ha tomado importancia desde finales del siglo pasado. Desde entonces se ha evaluado el uso de diferentes soportes (degradables e inertes) para la producción de una gran diversidad de productos, desde enzimas hasta biocombustibles. En esta sección se revisan los principales conceptos relacionados con los procesos de fermentación en medio sólido, lo que dará mayor claridad a la estrategia experimental seleccionada para la realización de este trabajo.

2.1 Tipos de sistemas de fermentación

Existen diferentes tipos de sistemas de fermentación. Si los clasificamos en cuanto a la cantidad de agua, hay dos tipos: la fermentación en medio líquido (FML) y la fermentación en medio sólido (FMS). El sistema de FML es el más utilizado para la producción de metabolitos y enzimas. Científicos de todo el mundo han trabajado arduamente para perfeccionar técnicas que permitan tener un mejor control del proceso. Por otro lado, la FMS es un proceso que involucra el crecimiento de microorganismos bajo condiciones controladas sobre partículas de sustratos sólidos húmedos o soportes impregnados con medios líquidos. El sistema debe encontrarse en ausencia de agua libre (Pandey, 1992; Pandey, 1994; Pandey, 2008; Mitchell y col., 2006). La FMS es una tecnología que tuvo sus orígenes como un arte ancestral. Originalmente, en estos procesos, los hongos filamentosos invadían ciertos materiales sólidos que luego eran consumidos por las personas; por ejemplo el Koji y el Tempeh, que son alimentos tradicionales asiáticos, así como, los quesos camembert y roquefort en Europa (Ooijkaas y col., 2000).

En años recientes hay un gran interés en los procesos de FMS para la obtención de metabolitos como etanol, enzimas, antibióticos, ácidos orgánicos, aminoácidos, pigmentos, metabolitos secundarios, entre otros (Holker y col., 2004, Pandey, 1994; Acuña y col., 1995; Gutiérrez y col., 1995). Este sistema de fermentación ofrece una serie de ventajas económicas sobre los procesos convencionales de FML (Castilho y col., 2000); lo anterior es debido a factores como: bajos niveles de humedad, menor volumen de medio por unidad de peso de sustrato, mayor productividad y los volúmenes de fermentación son menores a los sistemas sumergidos (Aguilar y col., 2001).

A continuación se mencionan algunos trabajos en los que se han obtenido mejores resultados en las propiedades y en la producción de algunos metabolitos cuando se hace uso de la FMS con respecto a la FML. Acuña y col. (1995) realizaron un estudio sobre la producción y propiedades de tres enzimas con actividad pectinolítica producidas por *A. niger* en FMS y FML. Se obtuvieron mayores productividades de estas enzimas cuando la fermentación se llevó a cabo en medio sólido. Además, todas las actividades enzimáticas producidas en FMS fueron más estables en un rango más amplio de pH y a mayor temperatura que las actividades enzimáticas obtenidas en líquido. Estos resultados son similares a los obtenidos para endoglucanasas y β -glucosidasas (Grajek, 1987a), xilanasas (Deschamps y Huet, 1987; Grajek, 1987b) y α -amilasas (Lonsane y Ramesh, 1990).

Solis y col. (1993) estudiaron el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la síntesis de pectinasas por *A. niger* en FMS y FML, encontrando que la actividad enzimática fue 2 veces más alta en FMS que en FML. Los resultados que presentaron muestran que el sistema de fermentación utilizada afecta considerablemente la velocidad de la producción de pectinasas; con altas concentraciones de azúcar se estimula la producción de pectinasas en FMS pero en FML altas concentraciones de azúcar disminuyen la síntesis, sugiriendo una represión catabólica en este último sistema. Posteriormente, Aguilar y col. (2001) pusieron en evidencia diferentes mecanismos de inducción y represión para la producción de tanasa por *A. niger* en ambos tipos de cultivo. Para esto, se utilizaron ácido tánico y glucosa como fuentes de carbono. La tolerancia a altas concentraciones de ácido tánico fue menor en medio líquido. La adición de glucosa (>20 g/L) dio como resultado una fuerte represión catabólica en medio líquido. El rendimiento tanasa/biomasa fue por lo menos dos veces más alto en FMS comparado con FML. A una concentración de 50 g/L de glucosa la máxima producción de biomasa (16 g/L) en FMS fue a las 20 h, al mismo tiempo que en FML se produjo la mitad de biomasa. En general, los resultados presentados muestran la capacidad que tiene la FMS para minimizar la represión catabólica, resultados similares a los obtenidos con exopectinasas (Díaz y col., 2001) y producción de biomasa (Favela y col., 1998).

En 2013, Mazotto y col. estudiaron la degradación de residuos de plumas por queratinasas producidas por *Aspergillus niger*, comparando los dos tipos de cultivo, encontrando que la actividad queratinolítica de las diferentes cepas evaluadas siempre fue mayor en FMS con respecto a la obtenida en FML. En ese mismo año, Yanjun Li y col. compararon la producción

de biomasa de *Neurospora sitophila* en FMS y FML; en sus resultados observaron que durante la fermentación (7 días a 30°C) la producción de biomasa fue tres veces mayor en la fermentación en medio sólido que en la líquida.

2.2 Aspectos importantes de la FMS

Para obtener altas productividades y altos rendimientos de metabolitos de interés es necesario diseñar las condiciones idóneas en el sistema de fermentación, esto incluye la selección del microorganismo, tipo y tamaño del inóculo, sustrato apropiado, pre-tratamiento del sustrato, tamaño de partícula del sustrato, optimización de los parámetros del proceso, la cantidad de agua necesaria, aislamiento y purificación del producto (Pandey y col. 1999; Pandey, 2008). En este trabajo se hablará con más detalle de algunos de estos aspectos.

2.2.1 Microorganismos utilizados en procesos de FMS

La capacidad de los microorganismos para crecer en sustratos sólidos depende de la actividad del agua del medio de cultivo, su capacidad de adherencia y penetración en el sustrato sólido, además de su capacidad para asimilar mezclas de diferentes polisacáridos y de la complejidad del sustrato usado (Pérez y col., 2003).

Un gran número de microorganismos incluyendo bacterias como *Burkholderia* (Liu y col., 2014) y *Bacillus subtilis* (Tang y col., 2015), levaduras y hongos filamentosos (Pandey y col., 1999) han sido utilizados para crecer en sustratos sólidos con aplicación en procesos de FMS. Las bacterias se han utilizado principalmente en procesos de composteo, ensilaje y en algunos procesos de producción de enzimas y alimentos (Doelle y col., 1992), las levaduras han sido utilizadas en la producción de etanol y algunos alimentos (Saucedo y col., 1992). En general, los hongos son considerados microorganismos adecuados para la FMS (Pandey, 2008) ya que muchos de ellos pueden crecer en medios con bajo contenido de agua libre. Los hongos filamentosos son el grupo de microorganismos más utilizado en procesos de FMS, ya que el hábitat natural donde se encuentran principalmente son materiales naturales sólidos con bajo contenido de humedad (Hauke y col., 2011). Por lo anterior, se considera que los hongos filamentosos poseen características fisiológicas, bioquímicas y enzimáticas que permiten su rápida adaptación en la FMS (Raimbault, 1998), así como una alta eficiencia en la bioconversión de sustratos. Los hongos filamentosos tienen una característica que los diferencia y les da una ventaja sobre los organismos unicelulares: su forma de crecimiento

micelial. El micelio coloniza rápidamente la superficie del sólido y le permite anclarse firmemente a la superficie del mismo y asimilarlo mejor. La adhesión de los hongos filamentosos al sustrato durante su crecimiento en FMS juega un papel importante favoreciendo el consumo de nutrientes. Esta adhesión se lleva a cabo por la secreción de algunos polisacáridos en una matriz sólida que tiene nutrientes (Mitchell y col., 2000). La mayoría de los hongos necesita menos humedad que las bacterias, por esta razón pueden crecer en medios en los que la mayoría de las bacterias no podría proliferar. Necesitan oxígeno para su crecimiento y pueden crecer a valores de pH bajos, ésta característica combinada con actividades de agua relativamente bajas, crea un medio favorable para el crecimiento de hongos a la par que mantiene condiciones de asepsia en el sistema de fermentación, evitando el crecimiento de microorganismos externos (Mitchell y col., 2000).

Los carbohidratos representan la principal fuente de carbono en estos procesos, por lo que el microorganismo libera enzimas hidrolíticas como amilasas, celulasas, proteasas y lipasas para degradar las macromoléculas de los sustratos sólidos (Mitchell y col., 2000). Estas enzimas difunden dentro del sustrato e hidrolizan los polisacáridos, los azúcares solubles liberados difunden hacia el hongo, simultáneamente, el oxígeno difunde desde la fase gaseosa hacia el microorganismo y éste consume los nutrientes solubles (Sangsurasak y col., 1995).

2.2.2 Soportes

Los soportes utilizados en procesos de FMS deben de tener capacidad para absorber el agua necesaria para las actividades metabólicas. Las bacterias y levaduras crecen adheridas a la superficie del soporte, mientras que los hongos filamentosos son capaces de penetrar el soporte para asimilar los nutrientes. El tipo de soporte y el pretratamiento del mismo influyen considerablemente sobre la FMS (Pandey y col., 1999).

En función de la naturaleza de la fase sólida, en FMS se distinguen dos tipos de soportes. El primero y más utilizado es aquél en el que el soporte sólido sirve como soporte y también como fuente de nutrientes. Estos sustratos son materiales heterogéneos insolubles en agua, provenientes de la agricultura o subproductos de la industria alimentaria, pueden tener carácter amiláceo o lignocelulósico (granos de cereales y subproductos, yuca, papas, frijoles, bagazo de caña, azúcar de remolacha, entre otros), por esta última característica, éstos deben ser pre tratados para que el sustrato se encuentre en mayor disponibilidad para el microorganismo

(Pandey, 1992). El uso de este tipo de soporte-sustrato puede requerir pretratamientos; a continuación se citan algunos de ellos:

- Reducción del tamaño de partícula.
- Ruptura las capas externas del sustrato mediante una molienda, perlado, etc.
- Hidrólisis química o enzimática de los polímeros.
- Adición de nutrientes (fósforo, nitrógeno, sales) y establecer el pH y contenido de humedad, utilizando una solución mineral.
- Tratamiento térmico para una pre-degradación de las estructuras de macromoléculas y eliminación de posibles contaminantes.

En el segundo tipo de soportes se encuentran los denominados soportes inertes; éstos se impregnan con un medio líquido que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos (azúcares, lípidos, ácidos orgánicos, entre otros). El uso de un medio definido y un soporte con una estructura física homogénea presenta ventajas, ya que se mejora el control, el monitoreo y la reproducibilidad de la fermentación. La FMS usando soportes inertes impregnados con medios de cultivo químicamente definidos tiene varias aplicaciones potenciales en estudios científicos y en la producción industrial de productos de alto valor agregado (ácidos orgánicos, enzimas, agentes de control biológico, entre otros). Este tipo de soporte pues permite evaluar con precisión la formulación del medio de cultivo, así como los productos del metabolismo, sin interferencias debidas a los componentes naturales de los sustratos usados tradicionalmente en procesos de FMS. Además, se facilitan la recuperación de productos. Este tipo de soportes puede ser de origen natural, sirviendo éstos sólo como un punto de anclaje para el microorganismo y no como fuente de nutrientes. Se han utilizado como soportes inertes varios materiales naturales como: cáñamo, agrolita, bagazo de caña, vermiculita (Ooijkaas y col., 2000) y sintéticos como la espuma de poliuretano. En la **Tabla 1** se presentan algunos ejemplos de la amplia gama de aplicaciones de soportes inertes en FMS.

Entre las características deseables que debe cumplir un soporte modelo impregnado con una solución nutritiva se encuentran las siguientes:

- No debe existir degradación microbiana de la matriz del soporte, conservando su geometría durante un proceso fermentativo.

- No debe contener inhibidores del crecimiento microbiano que pudieran incorporarse al medio ya sea por liberación directa o por reacción con otros componentes de la solución nutritiva adicionada.
- Debe ser rígido, con espacios interpartícula constantes que permitan la aireación del sistema soporte-microorganismo.
- Debe tener una alta retención de agua para lograr la actividad de agua necesaria que permita el crecimiento microbiano.
- No debe presentar interferencias con las técnicas analíticas (Córdova, 1994).

Tabla 1 Ejemplos de FMS usando soportes inertes impregnados.

Microorganismo	Producto	Soporte	Referencia
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Esporas	Vermiculita, agorlita Cáscaras de arroz	Silman y col., 1993 Silman y col., 1991
<i>Beauveria bassiana</i>	Esporas	Gránulos de arcilla	Desgranges y col., 1993
<i>Penicillium roquefortii</i>	Esporas	Pozolano	Larroche y Gros, 1989
<i>Coniothyrium minitans</i>	Esporas	Cáñamo, bagazo perlita	Weber y col., 1999
<i>Gibberella fujikoroii</i>	Ácido giberélico	Bagazo, EPU* Amberlita	Tomasini y col., 1997 Gelmi y col., 2000
<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico, polioles.	Amberlita, bagazo	Gutiérrez y col., 1995. Pintado y col., 1998
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina	Bagazo	Barrios y col., 1988
<i>Rhizopus delemar</i>	Lipasa	Amberlita	Christen y col., 1995
<i>Penicillium citrinum</i>	Nucleasa P1	EPU	Zhu y col., 1994
<i>Brevibacterium</i> sp.	Ácido L- Glutámico	Bagazo de caña	Nampoothiri y Pandey, 1996
<i>Vibrio costicola</i>	L-Glutaminasa	Poliestireno	Ozawa y col., 1996
<i>Aspergillus oryzae</i>	Proteasa Amilasa	EPU EPU	Murado y col., 1997
<i>Trichoderma veride</i>	Celulasa	EPU	Hu y col., 2011
<i>Aspergillus terreus</i>	Lovastatina	EPU	Baños y col., 2009
<i>Trametes pubescens</i>	Lacasa	EPU	Rodríguez y Couto, 2012

*EPU=Espuma de poliuretano

2.3 Factores que afectan el crecimiento microbiano y síntesis de producto en FMS

Los factores ambientales que pueden afectar significativamente el crecimiento microbiano y la formación de producto son: actividad de agua, contenido de humedad, temperatura, pH, niveles de oxígeno, y la concentración de nutrientes y productos, entre otros. A continuación se detalla el efecto particular de cada variable sobre el crecimiento.

2.3.1 Actividad de agua y contenido de humedad del sustrato

El agua en la FMS es fundamental pues tiene varias funciones. Es el componente dominante en la composición de la biomasa, además de servir como vehículo para las enzimas y los nutrientes, y facilitar el intercambio gaseoso (Oriol y col., 1988). Un alto contenido de agua, es decir una humedad elevada, causa una disminución de la porosidad del sustrato, una baja difusión de oxígeno y favorece el crecimiento de microorganismos como las bacterias. Al contrario, una baja humedad conduce a un crecimiento limitado y disminuye la disponibilidad del sustrato para microorganismos contaminantes.

La actividad de agua (A_w) es un indicador de la disponibilidad de agua de un soporte o sustrato y es un factor crítico en la FMS de diferentes tipos de sustratos (Oriol y col., 1988). La actividad de agua es la relación que existe entre la presión de vapor de un soporte o sustrato y relación con la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura, es importante para el control del crecimiento microbiano; valores de A_w entre 0.95-0.98 pueden ser considerados típicos para sustratos sólidos, estos valores son ideales para el crecimiento de muchos hongos, especialmente filamentosos, los cuales tienen un crecimiento óptimo en valores de A_w de 0.96-0.98 y aún pueden crecer a A_w de 0.9. Como resultado de esto, la mayoría de los procesos de FMS utiliza hongos filamentosos (Mitchell y col., 2000). Por otro lado, la mayoría de las bacterias y levaduras crecen con valores de A_w cercanos a 0.99, el crecimiento disminuye cuando la A_w baja y es completamente inhibido con actividades de agua de 0.9 (Mitchell y col., 2000).

No es lo mismo hablar de contenido de agua o contenido de humedad que hablar de actividad del agua. El contenido de agua o de humedad de un material, hace referencia a la cantidad total de agua que contiene, sin hacer referencia a qué fracción del agua está ligada a otras sustancias, por tanto no proporciona información exacta sobre el crecimiento microbiano. Si bien es cierto que al aumentar el contenido de agua o humedad también suele

aumentar la actividad del agua, no puede establecerse una relación lineal entre ambos parámetros. La relación entre la actividad del agua y el contenido de agua o humedad a una temperatura dada deben calcularse empíricamente para cada producto, obteniendo las isotermas de adsorción. Para un mismo contenido de agua o humedad, no tendrá que ser necesariamente el mismo valor de actividad del agua de una isoterma de adsorción que de una isoterma de desorción.

El agua presente en los sistemas de FMS existe en forma compleja dentro de la matriz sólida o como una delgada capa que se absorbe en la superficie de las partículas. Solo se tiene agua libre cuando la capacidad de saturación de la matriz sólida se excede (Raimbault, 1998). Sin embargo, el nivel de humedad al cual el agua libre se hace aparente varía considerablemente entre sustratos y depende de las características de enlace con el agua (Raimbault, 1998).

Los procesos que afectan la distribución de agua en un sólido son la adsorción y la transferencia inter-partícula del agua libre, la distribución óptima se alcanza cuando el agua libre presente en la superficie del soporte se distribuye rápidamente en el lecho (Schutyser y col., 2003). Se pueden observar dos fenómenos relacionados con la falta de agua en un soporte:

- Si la cantidad de agua en el soporte es insuficiente, no existe una buena difusión de los solutos y gases, ocasionando una reducción en el metabolismo celular o en un caso extremo su interrupción, esto debido a la falta de nutrientes o al incremento en la concentración de inhibidores en los alrededores del microorganismo.
- Si la cantidad de agua intra- o extra-celular no es suficiente para mantener las propiedades de algunas enzimas, éstas se inactivan desequilibrando las rutas metabólicas celulares.

En la FMS el agua está involucrada en la producción de la biomasa y en reacciones metabólicas, actividades enzimáticas y en el transporte de nutrientes extracelulares, de gases y de calor. El contenido de agua es considerado óptimo en valores inferiores a los de saturación del soporte. Las principales causas de la variación en el contenido de humedad son la evaporación debida al calor metabólico liberado, a la hidrólisis del sustrato y la producción metabólica de agua (Bellon-Maurel y col., 2003). El control del contenido de humedad del soporte es el factor clave en el control del espesor de la capa de micelio húmedo y para asegurar condiciones aeróbicas durante la FMS (Oostra y col. 2001). Así mismo, durante el

curso de la fermentación, la capacidad de retención de agua del soporte cambia: la masa del substrato disminuye, la actividad de agua varía debido al agotamiento de los nutrientes y al cambio en la composición química del substrato (Gervais y col., 1996). El contenido de humedad afecta el crecimiento celular y la actividad específica de las enzimas en formas opuestas, lo que sugiere la posibilidad de incrementar los rendimientos celulares o enzimáticos regulando el contenido de humedad durante la fase de crecimiento y estacionaria, para obtener los niveles deseados de biomasa y de producción enzimática respectivamente (Narahara y col., 1984).

2.3.2 Temperatura y transferencia de calor

La temperatura es otro factor muy importante en la FMS, influye en la tasa metabólica del cultivo y, por lo tanto, se relaciona con la cantidad de producto obtenido. Durante la FMS la temperatura del sistema aumenta debido a la liberación de calor metabólico, el incremento en la temperatura es directamente proporcional a la profundidad del lecho y a la actividad metabólica del microorganismo involucrado (Gutiérrez y col., 1996).

Los problemas de transferencia de calor en la FMS inducen gradientes de temperatura que pueden causar los siguientes problemas (Gutiérrez y col., 1995; Raimbault, 1980; Rathbun y col., 1983):

- Actividad microbiana tardía.
- Desviaciones metabólicas indeseables.
- Deshidratación del medio.

Se han investigado diferentes métodos para eliminar el exceso de calor producido. Entre los métodos convencionales, los mecanismos por convección son más eficientes que los conductivos, pero requieren grandes velocidades de aireación y esto puede provocar una deshidratación indeseable del medio. Otros métodos menos convencionales, implican el uso de enfriamiento por evaporación para evitar la acumulación de calor metabólico (Gutiérrez y col., 1995).

2.3.3 pH

El pH en un cultivo puede cambiar en respuesta a la actividad metabólica. Medir y controlar esta variable en la FMS es muy difícil, sobre todo cuando los cultivos se realizan en condiciones estáticas. Cuando es necesario mantener el pH cercano a un valor, se hace uso de soluciones buffer, sin embargo, esto es insuficiente cuando el proceso se lleva a cabo a una mayor escala (Raimbault, 1998; Torrado y col., 1998). La variación del pH durante el tiempo de cultivo depende en gran medida del microorganismo. Con hongos filamentosos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp., el pH puede bajar muy rápidamente hasta debajo de 3.0, mientras que para otros tipos de hongos como *Trichoderma*, *Sporotrichum* y *Pleurotus* sp., el pH es más estable entre 4 y 5. El pH en un cultivo puede cambiar en respuesta a las actividades metabólicas. Esto es causado por la secreción de ácidos orgánicos como cítrico, acético o láctico, lo que hace que el pH disminuya. Por otro lado, la hidrólisis de proteínas generalmente conduce a un incremento del pH del medio de cultivo.

2.3.4 Aireación

La aireación del medio sólido húmedo es uno de los factores críticos que gobierna la productividad, ya que no sólo suministra oxígeno sino que también remueve el calor metabólico, y la acumulación de gases y productos volátiles formados durante la fermentación, además de controlar la humedad en el sistema. La atmósfera gaseosa afecta también de forma significativa la producción de biomasa y de metabolitos de interés (Saucedo y col., 1990).

Las mediciones en línea del consumo de O₂ o la producción de CO₂, a menudo se utilizan para la estimación indirecta de la producción de biomasa o el crecimiento microbiano en los sistemas de FMS (Saucedo y col., 1990).

2.4 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger es un miembro del género *Aspergillus* que incluye un conjunto de hongos que generalmente se consideran asexuales, aunque se han encontrado algunos hongos que se reproducen sexualmente. El género *Aspergillus* incluye una gran cantidad de especies que son ubicuas en la naturaleza. Están ampliamente distribuidos y se han observado en una amplia gama de hábitats, ya que pueden colonizar una gran variedad de sustratos. Particularmente, *A. niger* se encuentra comúnmente como saprófito que crece en hojas

mueratas, granos almacenados, pilas de composta y vegetación en descomposición (Taxonomy browser NCBI, *Aspergillus niger*).

2.4.1 Morfología

Aspergillus niger según la taxonomía moderna se encuentra en el phylum Ascomycota, dentro de la clase de los Eurotiomycetes. Es un hongo ubicuo que crece muy rápido. Las cepas se pueden aislar de muchos hábitats ecológicos diferentes, tales como el suelo, restos vegetales, fruta podrida, medios aéreos, incluso en interiores. Macroscópicamente, este hongo se identifica por formar colonias de fieltro color amarillo e hifas blancas, volviéndose negro con la formación de conidios. Microscópicamente, *A. niger* por sus hifas septadas y conidióforos asexuales son identificados por ser largos y globosos en la punta fermentación (Taxonomy browser NCBI, *Aspergillus niger*). La diferencia importante que actualmente separa a *A. niger* de las demás especies es la producción de conidias marrón muy oscuras llegando a un color negro con fiálides biseriadas. Otras características incluyen los conidióforos incoloros y globosos que contienen las conidias lisas (Taxonomy browser NCBI, *Aspergillus niger*).

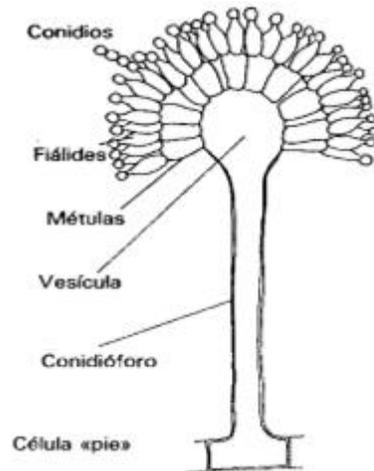


Figura 1 Morfología de *Aspergillus niger*

2.4.2 Usos

Aspergillus niger es ampliamente utilizado industrialmente para la producción de ácido cítrico y ácido glucónico. Muchas enzimas útiles se producen industrialmente mediante sistemas de fermentación líquida, utilizando este microorganismo. Algunos ejemplos de enzimas comercialmente importantes producidas por *A. niger* incluyen: glucoamilasa, que se

utiliza en la producción de jarabe de maíz alto en fructosa; pectinasas, utilizadas en la producción de sidra y clarificación de vinos; alfa-galactosidasa, una enzima útil para descomponer azúcares complejos (Taxonomy browser NCBI, *Aspergillus niger*).

Como se mencionó, existen diferentes factores que afectan el crecimiento de los microorganismos cuando se utilizan sistemas de FMS. En este trabajo se propone que el tipo de soporte utilizado es un factor que afecta la fisiología del crecimiento de los microorganismos. Las siguientes investigaciones son antecedentes que proporcionan argumentos para justificar dicha propuesta.

Solis y col. (1996) utilizaron bagazo de caña como soporte inerte en FMS y *Aspergillus niger* para la producción de pectinasas. En este estudio evaluaron concentraciones iniciales de glucosa de 300 a 800 mg/g de materia seca inicial (MSI). En todos los casos, la glucosa se consumió completamente durante las primeras 24 h de la fermentación sin encontrar el fenómeno de inhibición por sustrato. La tasa de consumo de glucosa no se vio afectada al utilizar concentraciones muy altas de sustrato. Aguilar y col. (2001) realizaron estudios comparativos de los dos sistemas de fermentación: FML y FMS con espuma de poliuretano como soporte inerte. Este grupo estudió *Aspergillus niger* para la producción de tanasas, demostrando diferencias en la producción de biomasa dependiendo el sistema de fermentación. Con 50 g de glucosa/L en FMS se obtuvo un máximo de producción de biomasa de 16 g/L a las 20 h de la fermentación, en ese mismo tiempo, la producción de biomasa en FML fue la mitad de la producida en FMS. En FML se observó que al aumentar la concentración inicial de glucosa, la fase Lag aumentó observándose el fenómeno de inhibición por sustrato, lo anterior no sucedió en FMS.

Díaz y col. (2001) compararon la producción de exopectinasas en FML y FMS, utilizando como soporte inerte espuma de poliuretano; adicionalmente, modificaron la actividad de agua en el sistema con etilenglicol, bajaron la actividad de agua de 0.99 a 0.96 tanto en FML como en FMS y observaron que la producción de biomasa era significativamente mayor en FMS. En general, observaron mayor producción de biomasa en FMS que en FML. Córdova y col. (1996) compararon diferentes métodos para cuantificar la biomasa de *Aspergillus niger* creciendo en dos soportes inertes, bagazo de caña y vermiculita; en todos los casos utilizaron el mismo medio y condiciones de cultivo. La producción de biomasa fue mayor en el bagazo de caña que en la vermiculita. En la vermiculita fue muy claro que la fase Lag tuvo un mayor tiempo de duración que en el bagazo de caña.

3 JUSTIFICACIÓN

La fisiología de crecimiento de los hongos filamentosos se ve afectada por el contenido de agua, la actividad de agua y el tipo de soporte utilizado para la fermentación en medio sólido. Esto quiere decir que la fisiología de crecimiento está completamente relacionada con la forma de interacción y disponibilidad del agua en el soporte. En este trabajo se propuso realizar una investigación que pretende explicar cómo es que el grado de interacción entre el medio de cultivo y el soporte sólido afecta la fisiología de crecimiento del hongo filamentoso *Aspergillus niger*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar el efecto de la naturaleza del soporte sobre la fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* en FMS.

4.2 Objetivos particulares

- Diseñar y evaluar una estrategia experimental que permita evaluar la fisiología de *A. niger* en FMS.
- Caracterizar dos tipos de soporte para su uso en fermentación en medio sólido.
- Determinar el efecto de la concentración de nutrientes sobre el crecimiento de *A. niger* en diferentes tipos de soporte.
- Determinar el efecto de la relación C/N sobre la fisiología de crecimiento de *A. niger* en diferentes tipos de soporte.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismo

En este trabajo se utilizó la cepa *Aspergillus niger* CH4 donada por el Dr. Carlos Huitrón (Departamento de Biotecnología, IIBM, UNAM, México). La cepa fue aislada de pulpa de henequén, un subproducto rico en pectina que resulta del proceso de eliminación de fibras de las hojas del henequén (Huitrón y col., 1984; Trejo y col., 1991).

5.2 Conservación de la cepa

La cepa *A. niger* CH4 se conservó liofilizada en ampollitas utilizando como crioprotector leche descremada en polvo al 10% (Svelty®) (García y Prado, 2012). Para reactivar la cepa se agregó 1 mL de Tween 80 (0.05% v/v) a cada ampollita, se homogeneizó, y se transfirieron 500 µL de la suspensión a matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio papa-dextrosa-agar (PDA). Los matraces fueron incubados durante 7 días a 30°C.

5.3 Propagación del inóculo

El inóculo se preparó en matraces de 125 mL con 30 mL de medio PDA, después de 72 h de incubación a 30°C se adicionaron 20 mL de Tween 80 (0.05% v/v). Las esporas se suspendieron en la solución de Tween 80 con ayuda de un agitador magnético, esta suspensión se vertió en otro matraz que pasó por el mismo proceso de incubación, el conteo de esporas se realizó en una cámara de Neubauer. En todos los casos la concentración inicial del inóculo fue de 2×10^7 esporas/g de soporte seco (S_s).

5.4 Medios de cultivo

El medio de cultivo contiene los mismos nutrientes que utilizaron Solís y col. (1996) excepto pectina. Para los estudios que se presentan en el **Capítulo 2**, la concentración de glucosa se aumentó desde 50 hasta 300 g/L y se mantuvo la concentración de los nutrientes restantes, las relaciones de nutrientes se presentan en la **Tabla 3**. Para los estudios que se presentan en el **Capítulo 3** se disminuyó la concentración de nutrientes excepto la fuente de carbono, obteniendo 4 diferentes relaciones de nutrientes que se presentan en la **Tabla 4**. En el caso de los resultados presentados en los Capítulos 2 y 3, se utilizó agua Bonafont® para la preparación de los medios de cultivo.

Tabla 2 Composición de los medios de cultivo utilizados para evaluar el efecto de la concentración de glucosa en la fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* CH4.

Relación C/N	Glucosa (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (% p/v)	KH ₂ PO ₄ (% p/v)	FeSO ₄ (% p/v)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (% p/v)	Urea (% p/v)
1.5	50	4.5	2.3	0.1	0.7	1.1
2.8	100	4.5	2.3	0.1	0.7	1.1
4.2	150	4.5	2.3	0.1	0.7	1.1
5.6	200	4.5	2.3	0.1	0.7	1.1
7.0	250	4.5	2.3	0.1	0.7	1.1
8.3	300	4.5	2.3	0.1	0.7	1.1

Tabla 3 Composición de los medios de cultivo utilizados para evaluar el efecto de la relación de nutrientes en la fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* CH4.

Relación C/N	Glucosa (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (% p/v)	KH ₂ PO ₄ (% p/v)	FeSO ₄ (% p/v)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (% p/v)	Urea (% p/v)
8.3	300	4.5	2.3	0.1	0.7	1.1
16.5	300	2.25	1.15	0.05	0.35	0.55
32.9	300	1.125	0.575	0.025	0.175	0.275
65.6	300	0.5625	0.2875	0.0125	0.0875	0.1375

En los estudios realizados para evaluar el efecto del tipo de agua como disolvente de los componentes del medio de cultivo se utilizó la misma concentración de nutrientes que el medio con la relación C/N 65.6. Los dos tipos de agua evaluados fueron agua destilada y agua Bonafont®. En todos los casos el pH inicial del medio fue cercano a 6.0 y la cantidad de medio de cultivo utilizada fue calculada para definir la humedad inicial (50%) para cada soporte, tomando en cuenta la cantidad de agua presente en los diferentes medios y el factor de capacidad de retención de agua.

5.5 Soportes

En este trabajo se utilizaron dos soportes inertes, aserrín (Multiusos®, Procesos en madera S.A. de C.V.) y agrolita (Agrolita ®, Minerales Expandidos S.A. de C.V.). Ambos soportes fueron pretratados mediante su tamizado (malla 12/16) para tener un tamaño de partícula homogéneo (1.19 - 1.68 mm). Posteriormente, se lavaron dos veces con agua de grifo caliente y dos veces con agua destilada fría, se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 h. Para lograr un secado completo los soportes se secaron en una estufa a 60°C por 24 h y se guardaron en bolsas de polietileno negro hasta su uso.

5.6 Capacidad de retención de agua (CRA)

Para la determinación de la capacidad de retención de agua de ambos soportes (aserrín y agrolita), se pesó un gramo en un matraz de 250 mL, se agregaron 100 mL de agua destilada, se agitó durante 24 h a 10°C con ayuda de un agitador magnético evitando la ruptura particularmente de la agrolita. Posteriormente, el soporte se escurrió por aproximadamente 45 min hasta no notar escurrimiento de agua, la muestra se pesó y se llevó a peso constante en una estufa a 60 °C, la capacidad de retención de agua se obtuvo con la siguiente ecuación (Ec.1).

$$CRA = \frac{(\text{Peso de la muestra húmeda} - \text{Peso de la muestra seca})}{\text{Peso de la muestra seca}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Se realizaron cinco repeticiones para cada soporte.

5.7 Determinación de la humedad crítica

Para la determinación de la humedad crítica, se pesaron 3 g de soporte seco (aserrín o agrolita) en un matraz de 500 mL, se agregaron 300 mL de agua destilada, se agitó con un agitador magnético durante 24 h en un cuarto frío a 10°C. Posteriormente, se escurrió el exceso de agua durante 45 min aproximadamente hasta no notar goteo; se tomó 1 g de soporte húmedo y se determinó el contenido de humedad en una termobalanza OHAUS MB de 45 a 130°C, se registraron valores a intervalos de tiempo de 10 s.

Con los datos obtenidos se construyeron graficas de velocidad de secado en función del contenido de humedad. La humedad crítica se obtuvo de la intersección de las líneas

obtenidas de la velocidad de secado máxima y la velocidad de secado decreciente. El valor de la intersección en el eje de las abscisas se consideró como la humedad crítica del soporte.

5.8 Isotermas de adsorción de agua

Para obtener las isotermas de adsorción de agua, se pesaron 7.5 g de soporte en un matraz Erlenmeyer, se agregaron 750 mL de agua destilada y se mantuvo en agitación durante 24 h a 10°C. Posteriormente, se escurrió el exceso de agua durante 45 min aproximadamente hasta no notar goteo. El material se mantuvo a 60°C en una estufa, se tomaron muestras de aproximadamente 1 g de soporte húmedo en intervalos cortos de tiempo (5 a 60 min). Con los datos obtenidos se construyeron gráficos de humedad contra actividad de agua y se ajustaron a diferentes modelos de isotermas. Se seleccionó el modelo que tuvo un ajuste con menor error y mayor coeficiente de correlación (Kaleta y Górnicki, 2007; Foo y Hameed, 2010).

5.9 Fermentación en medio sólido

Para los estudios de FMS se usaron columnas de vidrio de 2 cm de diámetro y 20 cm de altura. Las columnas fueron empacadas con aproximadamente 12 g de soporte húmedo homogéneamente inoculado, manteniendo un inóculo de 2×10^7 esporas/gS_s y una altura de lecho de 10 cm aproximadamente. Las columnas se incubaron en un baño de agua a 35°C. Se usó una tasa de aireación entre 30 y 50 mL/min de aire húmedo saturado (entre 3 y 5 VKgM) (Raimbault y Alazard, 1980). Para hidratar el aire del sistema, a cada columna se le conectó un humidificador en la parte inferior. Cada condición experimental se evaluó con tres réplicas (columnas).

5.9.1 Tratamiento de muestras de FMS

Al finalizar las fermentaciones, la materia fermentada de cada columna se homogeneizó en bolsas de polietileno y se le determinó el contenido de humedad en una termobalanza (OHAUS MB 45) a 130°C. Adicionalmente, se pesó un gramo de materia fermentada húmeda en tubos de centrifuga de 50 mL y se adicionaron 10 mL de agua destilada, el tubo fue agitado en un vórtex durante 30 s, y el sobrenadante se utilizó para determinar el pH y la concentración final de glucosa. Cabe mencionar que todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

5.9.2 Análisis de gases como medida de crecimiento indirecto

Para estimar indirectamente los parámetros asociados al crecimiento, se cuantificó el flujo de aire y las concentraciones volumétricas de oxígeno y dióxido de carbono en la corriente gaseosa a la entrada y salida de las columnas de fermentación. A la salida de cada columna, la corriente gaseosa húmeda se conectó a un sistema de separación de condensados y deshidratación de aire con sílica. La corriente de gas deshidratada se analizó en un sistema respirométrico que permite el monitoreo en línea de concentraciones de O₂, CO₂ y el flujo de aire. El sistema respirométrico consta de 15 válvulas, un medidor de flujo, un detector de O₂ y un detector de CO₂. El medidor y los detectores están conectados a un Datalogger que captura, transmite, traduce los datos de las variables medidas y transfiere los datos al programa LabView para que sean procesados y almacenados en el programa Excel (Torres y col., 2013) (Solicitud de patente MX/a/2013/004638).

El análisis del flujo de aire y de la concentración volumétrica (%v/v) de CO₂ y O₂ de la corriente de aire a la entrada y salida de las columnas de fermentación sirvió para estimar algunos parámetros asociados al crecimiento de *A. niger* (tiempo Lag, tasa específica de producción de CO₂ y coeficiente respiratorio). Los mismos datos fueron usados para estimar las tasas máximas de producción de CO₂ y consumo de O₂ (Lareo y col., 2006). Para ello, se utilizó la ecuación logística (Ec. 2) en su forma integral para ajustar los datos experimentales expresados como producción de CO₂ y consumo de O₂ por gramo de glucosa consumida. Para la estimación de los parámetros de ajuste de los datos experimentales se utilizó la aplicación "Solver" de "Excel de Microsoft Office". Esta aplicación usa un algoritmo Newton-Raphson asociado al mínimo valor de la sumatoria de los errores cuadrados entre los datos experimentales y los calculados.

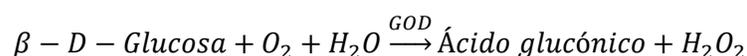
$$CO_2 = \frac{CO_{2\max}}{1 + \left[\left(\frac{CO_{2\max} - CO_{2o}}{CO_{2o}} \right) e^{-\mu t} \right]} \quad (\text{Ec. 2})$$

Para la estimación del tiempo Lag se consideraron los datos experimentales expresados como logaritmo natural. Se obtuvo la función lineal en la región correspondiente a la máxima pendiente y la intersección de estos datos con las abscisas corresponde al tiempo Lag (t_{lag}).

El coeficiente respiratorio en función del tiempo se obtuvo graficando la relación de la tasa instantánea de producción de CO₂ entre la tasa instantánea de consumo de O₂. Ambas tasas se expresaron como mol de CO₂ y mol de O₂ por mol de glucosa consumida por hora.

5.10 Determinación de glucosa

Para cuantificar el consumo de glucosa, al inicio y al final de la fermentación se tomó un gramo de la materia húmeda homogeneizada. Se agregaron 10 mL de agua destilada, se homogeneizó en un vórtex, se tomaron muestras del sobrenadante en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 8000 rpm para retirar la biomasa y pequeñas partículas del soporte. Posteriormente, el sobrenadante se utilizó para realizar las debidas diluciones y determinar la concentración de glucosa con el Kit Spinreact®, el cual se basa en el siguiente principio: la glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD):



Las muestras se realizaron por triplicado y se leyeron en un espectrofotómetro (UV-1800, Shimadzu) a 505 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

5.11 Humedad

La humedad se determinó por gravimetría en una termobalanza (OHAUS MB 45) a 130°C. Los resultados se expresaron en porcentaje en base húmeda.

5.12 Actividad de agua

La actividad de agua se midió en un equipo AquaLab CX-2, Labsen Scientific.

5.13 pH

El pH se determinó al inicio y al final de cada fermentación; para esto, 1 g de materia húmeda se homogeneizó, se suspendió en 10 mL de agua destilada, se agitó en un vórtex y se filtró. El pH se determinó en el sobrenadante con un potenciómetro Conductronic pH120.

5.14 Medición indirecta del crecimiento

El análisis del flujo de aire y de la concentración volumétrica (%v/v) de CO₂ y O₂ de la corriente de aire a la entrada y salida de las columnas de fermentación sirvió para estimar algunos parámetros asociados al crecimiento (tiempo Lag, tasa específica de producción de CO₂ y coeficiente respiratorio). Los mismos datos fueron usados para estimar las tasas máximas de producción de CO₂ y consumo de O₂ así como la máxima producción y consumo de CO₂ y O₂ respectivamente (Lareo y col., 2006). Para ello, se utilizó la ecuación logística (Ec. 2) en su forma integral para ajustar los datos experimentales expresados como producción de CO₂ y consumo de O₂ por gramo de glucosa consumida. Para la estimación de los parámetros de ajuste de los datos experimentales se utilizó la aplicación “Solver” de “Excel de Microsoft Office”. Esta aplicación usa un algoritmo Newton-Raphson asociado al mínimo valor de la sumatoria de los errores cuadrados entre los datos experimentales y los calculados.

$$CO_2 = \frac{CO_{2\max}}{1 + \left[\left(\frac{CO_{2\max} - CO_{2o}}{CO_{2o}} \right) e^{-\mu t} \right]} \quad (\text{Ec. 2})$$

Para la estimación del tiempo Lag se consideraron los datos experimentales expresados como logaritmo natural. Se obtuvo la función lineal en la región correspondiente a la máxima pendiente y la intersección de estos datos con las abscisas corresponde al tiempo Lag (t_{lag}).

El coeficiente respiratorio en función del tiempo se obtuvo graficando la relación de la tasa instantánea de producción de CO₂ entre la tasa instantánea de consumo de O₂. Ambas tasas expresadas como mol de CO₂ y mol de O₂ respectivamente por mol de glucosa consumida por hora.

5.15 Análisis estadísticos

Método de Tukey. Consiste en comparar las diferencias entre medias muestrales como el valor crítico dado por:

$$T_{\alpha} = q_{\alpha}(k, N - k) \sqrt{CM_E/n_i}$$

Donde CM_E es el cuadrado medio del error, n es el número de observaciones por tratamiento, k es el número de tratamientos, $N-k$ es igual a los grados de libertad para el error, α es el nivel de significancia prefijado y el estadístico $q_{\alpha}(k, N-k)$ son puntos porcentuales de la distribución del rango estudentizado. Se declaran significativamente diferentes los pares de medias cuya diferencia muestral en valor absoluto sea mayor que T_{α} . Se realizaron 3 réplicas por cada condición.

ANOVA: El análisis de varianza es la técnica central en el análisis de datos experimentales. La idea general de esta técnica es separar la variación total en las partes con las que contribuye cada fuente de variación en el experimento. El análisis de la varianza parte de los conceptos de regresión lineal. Un análisis de la varianza permite determinar si diferentes tratamientos muestran diferencias significativas o por el contrario puede suponerse que sus medias poblacionales no difieren. El análisis de la varianza permite superar las limitaciones de hacer contrastes bilaterales por parejas que son un mal método para determinar si un conjunto de variables con $n > 2$ difieren entre sí. Cuando se utilizó este método de análisis de resultados las muestras tuvieron tres réplicas. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos factores, $\alpha < 0.05$, en el programa de computo

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las siguientes secciones el capítulo de Resultados y Discusión se divide en cuatro capítulos. La primera etapa del trabajo experimental consistió en la caracterización de los soportes; posteriormente se evaluó el efecto del tipo de soporte y concentración de nutrientes sobre los parámetros asociados al crecimiento de *A. niger* CH4. Con el fin de saber si el tipo de agua influía en los resultados obtenidos de la fermentación ya que Solís y col. 1996 trabajaron con agua destilada, se evaluó el efecto de dos tipos de agua sobre la fisiología de crecimiento de *A.niger* en medio sólido con dos soportes diferentes.

CAPÍTULO 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SOPORTES

En la FMS existen factores fisicoquímicos que afectan tanto el crecimiento de los microorganismos como la producción de metabolitos. Entre éstos destacan la disponibilidad de agua, pH, temperatura y la atmósfera gaseosa, así como las concentraciones de sustrato y de producto (Mitchell y col., 2002). Como hipótesis de este trabajo se planteó que el tipo de soporte influye en la fisiología del crecimiento de los microorganismos en FMS. Dicho soporte, debe ser inerte a los componentes del medio de cultivo, es decir, no debe inhibir el crecimiento microbiano, debe ser poroso y tener espacios libres disponibles, poseer resistencia mecánica para poder ser empacado; debe tener además la capacidad para retener agua y nutrientes, no debe presentar interferencias con las técnicas analíticas, debe ser barato y de fácil adquisición (Sánchez, 2004).

En este primer capítulo se presentan los resultados de la caracterización de los soportes estudiados; dicha caracterización consistió en evaluar la capacidad de retención de agua, la humedad crítica y obtener los parámetros asociados a curvas de adsorción. Como se mencionó, los soportes utilizados en este trabajo son de origen y composición distinta; mientras el aserrín es un residuo de la madera y es un material orgánico, la agrolita tiene origen volcánico y es un material inorgánico. Debido a la diferencia en la composición de los soportes se espera tener diferencias en las propiedades evaluadas.

6.1 Capacidad de retención de agua

La agrolita es un mineral volcánico poroso, cuyos espacios vacíos pueden ser ocupados por el agua adsorbida (Bures y col., 1997). Se ha reportado que la agrolita tiene la capacidad de retener agua de 3 a 4 veces su peso seco (Esparza, 2012). El valor obtenido en el presente estudio fue de $4.2 \text{ g}_{\text{agua}}/\text{g}$ de soporte seco (S_s) y es ligeramente mayor que el reportado por Esparza (2012). La diferencia puede deberse al tamaño de partícula utilizado, ya que Esparza manejó un tamaño de partícula dos veces menor (1.19-0.84 mm) que el usado en este estudio (1.19–1.68 mm).

El aserrín tiene dos características importantes, es un material poroso y se hincha en presencia de agua. Al estar en contacto con el agua, el agua ocupará los espacios vacíos que tiene el aserrín (Dunlap, 1914), al mismo tiempo, ocurre un fenómeno llamado hinchamiento, es decir, un cambio de volumen debido a la hidratación (Mantanis y col., 1994). Juárez Luna,

2014, obtuvo la capacidad de retención de agua del aserrín obteniendo un valor de 2.88 g_{agua}/gS_s , cabe mencionar que el tamaño de partícula que ocupó fue de 0.42-3.36 mm, las diferencias entre el valor que obtuvimos y el de Juárez Luna son debidas a las diferencias en el tamaño de partícula.

En la **Tabla 5** se presentan los valores de capacidad de retención de agua de los soportes inertes usados en este trabajo, cada soporte se realizó por triplicado. A pesar de que ambos soportes tienen diferencias en cuanto al origen y composición, el análisis estadístico de los valores obtenidos con el método de Tukey demostró que no hay diferencias significativas en la capacidad de retención de agua entre soportes.

Tabla 4 Capacidad de retención de agua de los soportes.

Soporte	Capacidad de retención de agua (g_{agua}/gS_s)
Agrolita	4.2 ±0.3 ^a
Aserrín	4.7 ±0.2 ^a

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Para mantener las mismas condiciones de humedad en los soportes inertes al momento de agregarles el medio de cultivo, se tomó en cuenta un factor de corrección conocido como factor de capacidad de retención de agua.

$$\text{Factor CRA} = \frac{4.7}{4.2} = 1.1$$

Las siguientes dos propiedades evaluadas en los soportes, la humedad crítica y la adsorción de agua, permitieron conocer el grado de la interacción entre el agua y cada soporte.

6.1.1 Humedad crítica

A partir de datos obtenidos durante las pruebas de secado, se obtuvieron curvas de secado para ambos materiales (**Figura 2**). Las curvas de secado se ajustaron con un modelo modificado tipo Langmuir:

$$V = \frac{V_{\text{max}}H}{K + H}$$

Donde **V** es la velocidad de secado, **V_{max}** la velocidad máxima de secado, **K** la constante de saturación y **H** la humedad. La humedad crítica se obtuvo de la intersección de las líneas

de velocidad máxima de secado y la línea gruesa (obtenida como la pendiente del punto K), que corresponde al contenido de humedad en el que la velocidad de secado es un medio de la velocidad máxima. El valor de la intersección en el eje de las abscisas se consideró como la humedad crítica del soporte.

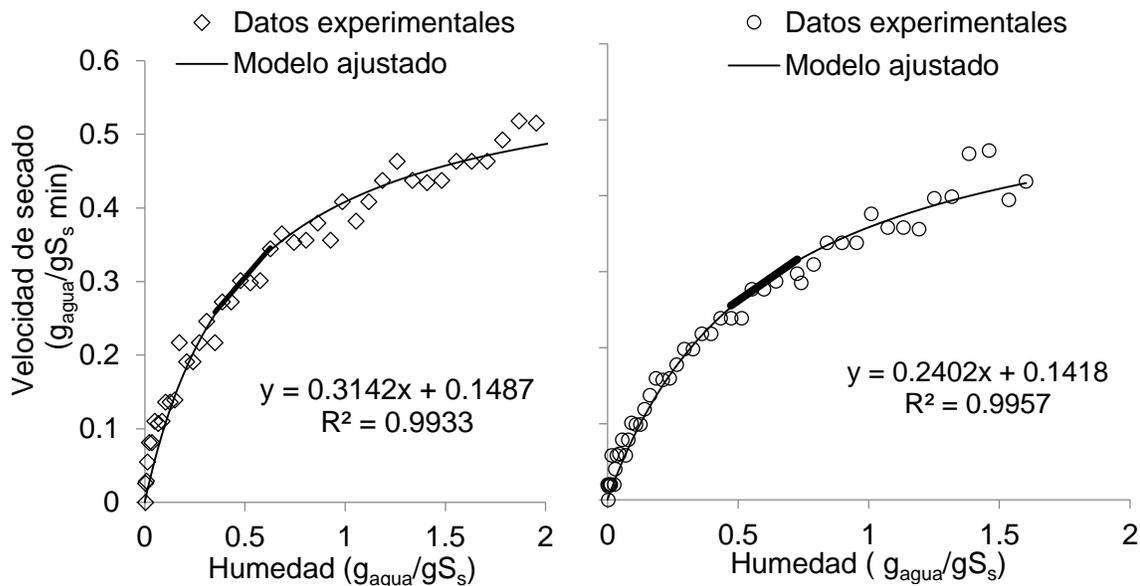


Figura 2 Curvas de secado, lado izquierdo curva de la agrolita y lado derecho curva del aserrín.

En la **Tabla 6** se muestran las constantes obtenidas para cada soporte en el modelo de Langmuir.

Tabla 5. Modelo tipo Langmuir ajustado para cada soporte

Soporte	Ecuación tipo Langmuir ajustada
Agrolita	$V = \frac{0.61H}{(0.49 + H)}$
Aserrín	$V = \frac{0.56H}{(0.57 + H)}$

En la **Tabla 7** se presentan los datos de la velocidad máxima de secado y humedad crítica obtenidos a partir de las curvas de secado (**Figura 2**). La velocidad máxima de secado de los soportes fueron significativamente diferentes, lo anterior fue comprobado con prueba de Tukey

($P < 0.05$). Durante el período de velocidad máxima, la velocidad se mantiene constante ya que la superficie de ambos soportes se encuentra muy mojadas al principio y sobre ella hay una película continua de agua. Esta capa de agua, es agua no ligada, y actúa como si el sólido no estuviera presente (Geankoplis, 1998). No se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en los valores de humedad crítica de los soportes.

Tabla 6 Velocidad máxima de secado y humedad crítica obtenida a partir de la curva de secado para cada soporte.

Soporte	Velocidad máxima de secado ($g_{\text{agua}}/gS_s \text{ min}$)	Humedad crítica (g_{agua}/gS_s)
Agrolita	0.61 ± 0.01^a	1.52 ± 0.10^b
Aserrín	0.56 ± 0.01^b	1.70 ± 0.11^b

Valores con diferente letra presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)

Cuando ocurre la evaporación superficial, debe haber un movimiento del agua desde el interior del sólido hasta la superficie. La naturaleza del movimiento modifica el secado durante el período de velocidad decreciente (Treybal, 1988). Existen diferentes teorías para explicar el movimiento del agua y su relación con las curvas de disminución de la velocidad de secado, pero sólo dos de ellas explican el movimiento de la humedad en nuestros soportes.

En el caso de la agrolita, que es un sólido granular y muy poroso, se ajusta la teoría del movimiento capilar. La mayor parte del agua que se evapora durante el período de velocidad constante proviene de su interior. Este periodo continúa mientras el agua siga llegando a la superficie con la misma rapidez con la que se evapora. El agua libre se desplaza a través de capilares y espacios vacíos por acción capilar. En este mecanismo interviene la tensión superficial. A medida que se evapora el agua, se forma un menisco de líquido en cada poro en el interior del sólido. Esto origina las fuerzas capilares por la tensión interfacial entre el agua y el sólido. Estas fuerzas constituyen el impulso para desplazar el agua a través de los poros hasta la superficie (Geankoplis, 1998).

En el aserrín, el movimiento del agua ocurre de acuerdo con la teoría de difusión del líquido. Durante el periodo de velocidad constante, la concentración de agua superficial se reduce, pero la concentración en el interior del aserrín es elevada. La difusión del agua en fase líquida puede derivarse de los gradientes de concentración entre el interior del sólido, donde la concentración es alta, y la superficie, donde es baja. Estos gradientes se fijan durante el

secado de la superficie. La alta difusividad resultante permite que el agua se mueva hasta la superficie tan rápido como se evapora y la velocidad de secado permanece constante. La velocidad de secado decae a medida que avanza el tiempo, ya que el secado sólo sucede a flujos que están completamente controlados por la rapidez de difusión dentro del sólido, puesto que éstas son lentas a contenidos bajos de humedad (Treybal, 1988). En este soporte la velocidad de secado también se ve afectada por efecto de la contracción del aserrín al secarse, ocasionando que el material se deforme y cambie su estructura (Geankoplis, 1998).

Con el modelo tipo Langmuir utilizado se pudo determinar la humedad crítica de ambos soportes. La humedad crítica de la agrolita ($1.52 \text{ g}_{\text{agua}}/\text{gS}_s$) resultó menor que la del aserrín ($1.70 \text{ g}_{\text{agua}}/\text{gS}_s$) (**Tabla 7**). Con base en lo anterior, puede considerarse que la mayor parte del agua retenida por la agrolita interactúa con poca fuerza con el soporte, esta agua es fácil de evaporar durante el secado. Lo anterior se debe a la naturaleza granular y porosa de la agrolita. En cambio, el aserrín presenta menor capacidad de retención de agua libre. La velocidad de secado en el aserrín se ve afectada por la difusión de agua dentro del sólido y por el encogimiento del material durante el secado.

Las teorías de la estructura de sólidos y de los fenómenos superficiales, no permiten predecir la variación del contenido de humedad de equilibrio en diversos materiales, con base en principios fundamentales. Sin embargo, se ha intentado correlacionar datos experimentales mediante modelos como los de isotermas de adsorción (Geankoplis, 1998). Algunos de ellos tienen base teórica, mientras otros son semi-empíricos o empíricos. Para determinar el tipo de isoterma, el procedimiento habitual es ajustar los datos experimentales a diferentes modelos, el modelo elegido es aquél que le da el mejor ajuste (Petkovska, 2014). En la última parte de este capítulo se obtuvieron las isotermas de adsorción para cada soporte.

6.1.2 Isotermas de adsorción

Los datos experimentales obtenidos de humedad y actividad de agua se ajustaron a diferentes modelos. El modelo que dio un mejor ajuste fue el de Henderson; los criterios para elegir dicho modelo fueron el coeficiente de correlación y el mínimo error típico de estimación. Henderson (citado por Geankoplis, 1998) propone una relación empírica entre el contenido de humedad de equilibrio y el porcentaje de humedad relativa. La ecuación de Henderson es la siguiente:

$$M = \left[\frac{-\ln(1 - A_w)}{k} \right]^{\frac{1}{n}}$$

Donde, **M**= es el contenido de humedad en el equilibrio, **A_w**=actividad de agua, **k** y **n** son constantes que dependen del tipo de material.

En la **Figura 3** se presentan los datos experimentales y el ajuste con el modelo de Henderson para ambos soportes.

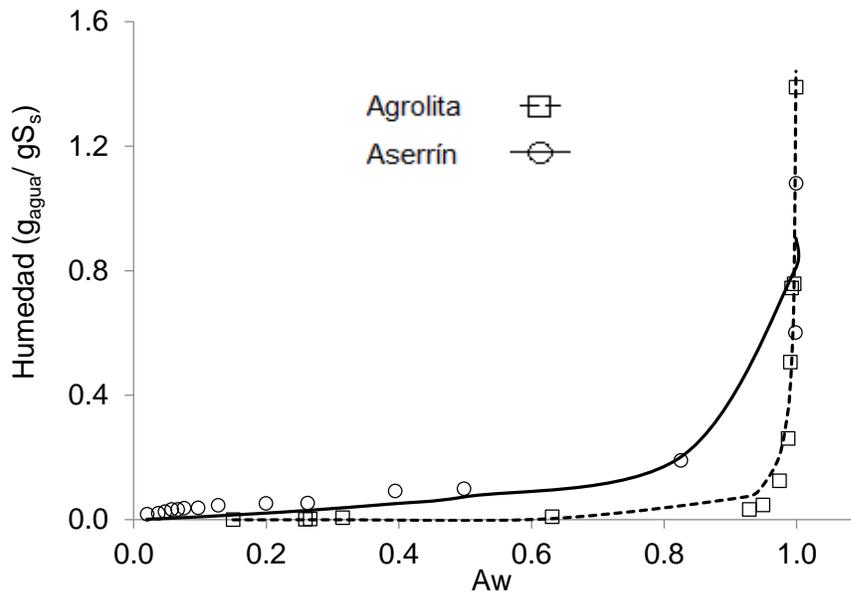


Figura 3. Isotermas de adsorción para la agrolita (línea punteada) y para el aserrín (línea continua). Las líneas corresponden al ajuste realizado con el modelo de Henderson de los datos experimentales obtenidos para cada soporte.

De acuerdo con los datos presentados en la **Tabla 8** se establece que el modelo de Henderson se ajusta bien a los dos soportes, tomando en cuenta que existe una buena correlación (>0.935) y el error de estimación es cercano a cero. Según Henderson, con este modelo es posible explicar el grado de interacción física o química del agua con el material higroscópico. Henderson menciona que en este caso predomina el mecanismo de adsorción (Henderson, 1952).

Tabla 7. Datos obtenidos del ajuste del modelo de Henderson a los datos experimentales de los soportes inertes.

Modelo	Soporte	R ²	Error típico estimado	Modelo obtenido
$M = \left[-\frac{\ln(1 - A_w)}{k} \right]^{\frac{1}{n}}$	Agrolita	0.955	0.095	$M = \left[-\frac{\ln(1 - A_w)}{6.130} \right]^{\frac{1}{0.327}}$
	Aserrín	0.937	0.079	$M = \left[-\frac{\ln(1 - A_w)}{7.577} \right]^{\frac{1}{0.916}}$

En la **Figura 3** se observa que en ambos soportes, a contenidos de agua mayor a 0.9 g_{agua}/gS_s el valor de A_w es muy cercano a 1. A contenidos de humedad menores de 0.9 g_{agua}/gS_s se observan diferencias en las curvas de adsorción de los soportes inertes. En la **Tabla 8** observamos que existen diferencias en el valor de las constantes **k** y **n** obtenidas a partir del modelo de Henderson, esa diferencia se debe a la composición del material (Henderson, 1952).

La diferencia en el valor de la constante **n** afecta más en la tendencia de las curvas de adsorción que el valor de la constante **k**. A menor valor de **n** y mayor valor de **k** la curva se vuelve asintótica al eje de las abscisas, en este caso podemos decir que existe una mayor cantidad de agua que se encuentra libre, el grado de interacción entre el agua y el material es bajo. A valores de **n** mayores y valores de **k** menores la curva ya no es asintótica al eje de las abscisas, es decir existe mayor cantidad de agua que se encuentra ligada con el material de manera física, química o la combinación de éstas.

De los parámetros seleccionados para caracterizar los soportes, la diferencia más notable fue en las isothermas de adsorción y en la velocidad máxima de secado. Con lo anterior puede concluirse que el grado de interacción del agua con el aserrín es mayor que el grado de interacción del agua con la agrolita. En la agrolita la velocidad máxima de secado fue mayor que la del aserrín.

CAPÍTULO 2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE GLUCOSA SOBRE LA FISIOLOGÍA DE *Aspergillus niger*

La FMS muestra algunas ventajas sobre la FML; entre éstas destacan: a) menor requerimiento de agua, b) menores exigencias en las condiciones de asepsia, c) posibilidad de uso de altas concentraciones de sustratos, d) obtención de productos más concentrados y e) mayor productividad (Oriol y col., 1988; Roussos y col., 1991).

El uso de un soporte impregnado con medio líquido, con una estructura físicamente constante durante el proceso, facilita la reproducibilidad y la realización de estudios fisiológicos y cinéticos en FMS (Lareo y col., 2006). Lareo y colaboradores (2006) caracterizaron el crecimiento y la esporulación de *Mucor bacilliformis* en FMS sobre un soporte inerte; con el fin de obtener datos indirectos de crecimiento durante la fermentación registrarón y determinaron la producción de CO₂ en línea en un sistema cromatográfico donde la composición del gas de salida de 8 columnas se registraba el porcentaje de CO₂ cada 7.5 minutos.

El análisis de la composición del gas de salida de las columnas de fermentación de este trabajo fue parecido al de Lareo, col. (2006) y posteriormente se describirá.

En este segundo capítulo se presentan los resultados obtenidos del estudio del efecto de diferentes concentraciones de glucosa y concentraciones constantes de macro y micro nutrientes, sobre la fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* en FMS con los dos soportes previamente caracterizados. Considerando la dificultad para estimar la concentración de biomasa en los soportes sólidos, las variables de respuesta relevantes fueron aquellas relacionadas con la respiración del cultivo y el consumo de glucosa. Como variables respuesta complementarias se cuantificó el contenido de humedad y pH al inicio y al final del cultivo.

La medición de la producción de CO₂ y consumo de O₂ se realizó en línea en 16 unidades experimentales simultáneamente. Saucedo y col. (1992) demostraron que durante el cultivo de la levadura *Schwanniomyces castellii* en FMS, la producción de CO₂ fue proporcional al incremento de la biomasa microbiana; por ello, es posible estimar parámetros asociados al crecimiento a través de la producción de CO₂ desde el inicio del cultivo hasta el final de la fase estacionaria. Debido a que no hay reportes de estudios similares para hongos filamentosos, en este trabajo se considera que la producción de CO₂ es proporcional al incremento en la biomasa desde el final del tiempo de germinación (tiempo Lag) hasta el final de la fase de desaceleración y/o inicio de la fase estacionaria de crecimiento.

Para determinar el efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo sobre la producción de CO₂, consumo de O₂ y glucosa en FMS con agrolita y aserrín como soportes, se usaron concentraciones iniciales de 50 a 300 g/L. Se evaluaron 6 concentraciones del azúcar (por triplicado) para cada soporte. Como resultado, se realizaron 36 cultivos independientes, obteniendo de cada uno cinéticas de la tasa de producción y consumo de CO₂ y O₂ respectivamente.

6.2 Estimación de parámetros de crecimiento

Como ya se mencionó, el análisis de los parámetros de crecimiento se basó en los datos cinéticos de producción de CO₂, consumo de O₂ y consumo de glucosa. Esto permite tener datos cinéticos que pueden utilizarse para estimar varios parámetros asociados a cada una de las fases de crecimiento. En la **Figura 4** se presentan curvas típicas de las tasas de consumo de O₂ y producción de CO₂ en la fase gaseosa.

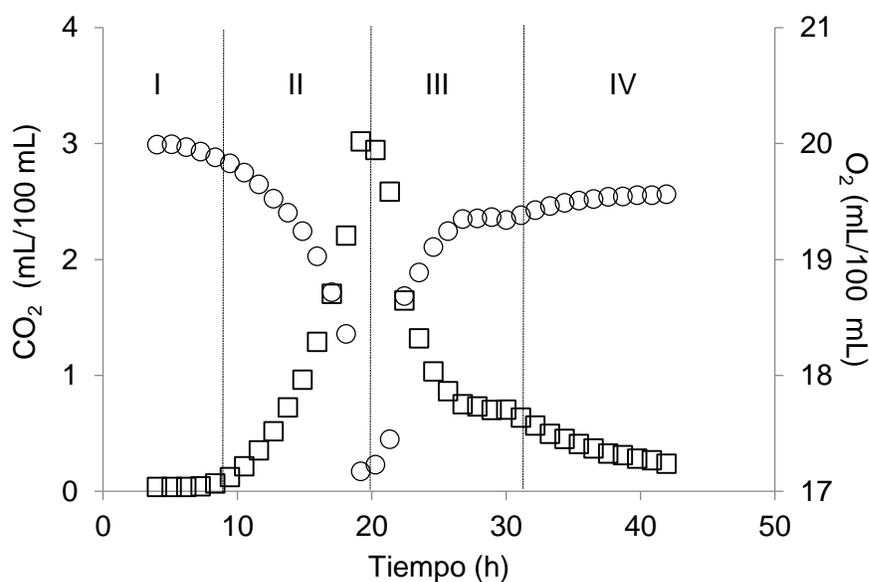


Figura 4. Tasa de producción de CO₂ (□) y de consumo de O₂ (○) en la fase gaseosa a la salida de la columna de fermentación. Los números romanos indican las fases de crecimiento de *A. niger*: I, Lag; II, aceleración; III, desaceleración; IV, mantenimiento.

Un análisis detallado de la **Figura 4** permite identificar las diferentes fases de crecimiento propias de *A. niger* en FMS: I germinación de esporas o Fase Lag, II Fase de aceleración, III Fase de desaceleración, IV Fase de mantenimiento. La tasa máxima de producción de CO₂ es

una variable muy importante que corresponde a la transición entre las Fases II y III. Cuando se usa la producción de CO_2 o consumo de O_2 para describir el metabolismo de organismos heterótrofos, la Fase IV presenta una pendiente igual o mayor a cero. Al no haber “consumo” de CO_2 en este tipo de cultivos, la fase IV no puede presentar pendiente negativa. La Fase IV es además un indicador del estado metabólico del cultivo; es decir, si la pendiente en la fase IV es cero indica ausencia total de actividad respiratoria, mientras que un valor positivo refleja actividad metabólica en el cultivo.

Para comparar el efecto de la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo sobre la fisiología de crecimiento de *A. niger* en dos soportes diferentes, para todos los parámetros cinéticos y rendimientos, se tomó como base de cálculo la glucosa consumida. La **Figura 5** presenta las curvas de producción de CO_2 y consumo de O_2 con base en la glucosa consumida.

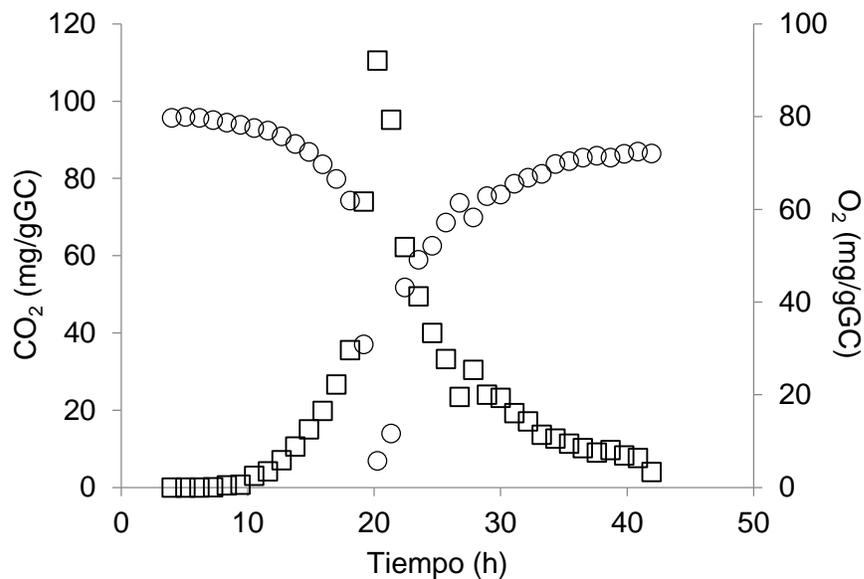


Figura 5 Tasas de producción de CO_2 (\square) y consumo de O_2 (\circ) durante el crecimiento de *Aspergillus niger* en FMS, expresadas en función de la glucosa consumida.

En la **Figura 6** se presenta la forma integral de la producción de CO_2 y consumo de O_2 , es decir, los valores totales acumulados para cada gas. En esta Figura también pueden observarse las 4 fases características de las curvas de crecimiento microbiano.

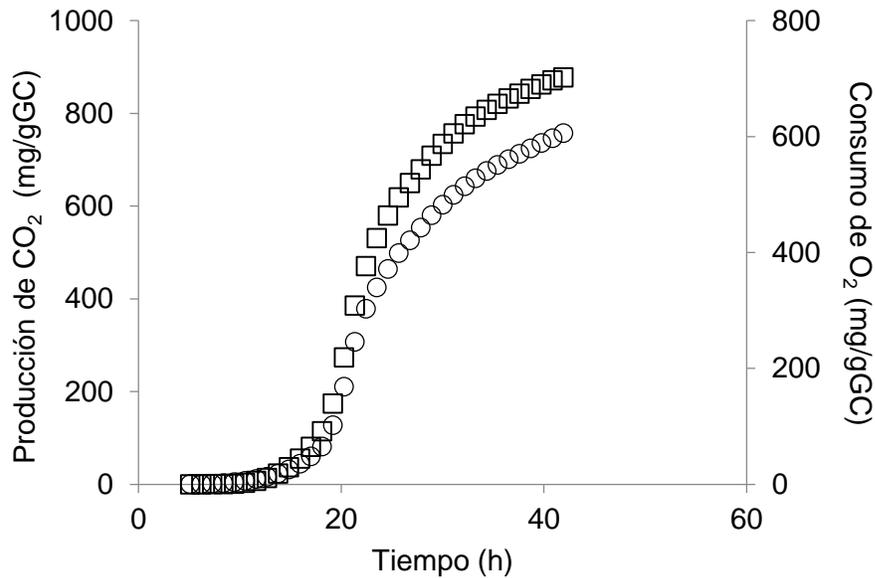


Figura 6. Datos integrados de producción de CO₂ (□) y consumo de O₂ (○) durante el crecimiento de *Aspergillus niger* en FMS, expresadas en función de la glucosa consumida.

Para el cálculo de los parámetros asociados a la producción de CO₂ y consumo de O₂ para todos los medios de cultivo evaluados se usaron los datos de CO₂ y O₂ en sus formas diferencial e integral. Para la obtención de la fase Lag se utilizó el método de Pirt (1975), graficando el Ln(CO₂) vs tiempo. Se ajusta una recta en la región en la que la pendiente es máxima y la intersección de esta recta con la línea de las abscisas corresponde a la fase Lag (Fase I).

Para la estimación de la tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) pueden utilizarse diferentes modelos (exponencial, cúbico, logístico y Gompertz, entre otros). De ellos, los que permiten utilizar datos cinéticos durante la mayor parte del tiempo de cultivo son los dos últimos (logístico y Gompertz). El modelo de Gompertz se utiliza principalmente para modelos asimétricos de cultivo en los que importa caracterizar las secciones inicial y/o final del mismo. Por ejemplo, el modelo de Gompertz es muy utilizado para sistemas microbianos en los que el metabolismo secundario es predominante. Por otra parte, el modelo logístico es utilizado para modelos simétricos en los que las tasa inicial y final de producción de CO₂ tiende a cero. Ninguno de los dos modelos puede ser utilizado para procesos en los que la pendiente de la

Fase IV es significativamente mayor a cero. Por lo anterior, para la estimación de la tasa máxima de producción de CO₂ en función del tiempo se usó el modelo logístico (**Figura 7**).

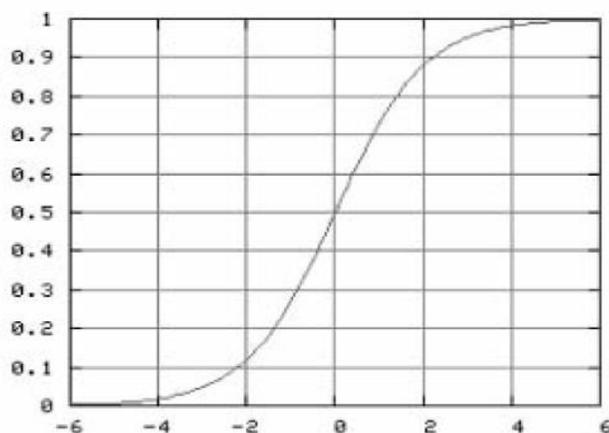


Figura 7 Representación gráfica de la función logística.

Para lo anterior, se definió un intervalo simétrico entre el final de la fase Lag (Fase I) y el final de la fase de desaceleración (Fase III) e inicio de la fase estacionaria (Fase IV). Para determinar este último punto (transición entre Fases III y IV) se definió como punto central el tiempo en el que se obtiene la máxima tasa de producción de CO₂.

Por lo tanto, el tiempo utilizado para ajustar los datos con el modelo logístico fue desde el tiempo Lag al tiempo resultante de multiplicar por dos la diferencia entre el tiempo de máxima producción de CO₂ y el tiempo Lag, es decir $t = t(\text{Lag})$ a $t = t(\text{Lag}) + 2(t(d\text{CO}_2/dt_{\text{max}}) - t(\text{Lag}))$. Con estos valores y los datos de consumo de glucosa se pueden obtener los parámetros que se presentan en la **Tabla 9**.

Tabla 8 Parámetros asociados a la medición de CO₂, O₂ y glucosa durante el cultivo de *A. niger* en FMS.

Parámetro	Abreviatura	Unidades
Tiempo Lag	t_{Lag}	h
Producción de CO ₂	CO ₂	mg/gGC
Consumo de O ₂	O ₂	mg/gGC
Tasa específica de producción de CO ₂	μ_{CO_2}	1/h
Tasa específica de producción de O ₂	μ_{O_2}	1/h

Parámetro	Abreviatura	Unidades
Tasa de producción de CO ₂	d(CO ₂ /dt)	mg/gGC h
Tasa de consumo de O ₂	d(O ₂ /dt)	mg/gGC h
Tasa máxima (o primaria) de producción de CO ₂	d(CO ₂ /dt) _{max}	mg/gGC h
Tasa máxima (o primaria) de consumo de O ₂	d(O ₂ /dt) _{max}	mg/gGC h
Relación entre las tasas de producción de CO ₂ asociada y no asociada a la etapa de producción primaria		Adimensional
Relación entre las tasas de consumo de O ₂ asociada y no asociada a la etapa de consumo primaria		Adimensional
Glucosa inicial	G _i	mg/gS _s
Coeficiente respiratorio	CR	molCO ₂ /molO ₂
Glucosa final	G _f	mg/gS _s
Glucosa consumida	G _c	mg/gS _s

En la **Figura 8** se muestran los perfiles de producción de CO₂, para las diferentes concentraciones de glucosa (50, 100, 150, 200, 250 y 300 g/L) tanto en agrolita (a) como en aserrín (b). Comparando los dos tipos de soporte se observa una mayor actividad respiratoria en aserrín que en agrolita. En ambos soportes se observa que al aumentar la concentración de glucosa inicial, la tasa de producción de CO₂ aumenta, esto en caso de las concentraciones de 50 a 150 g/L. Lareo y col. (2006), evaluaron el efecto de la concentración del medio de cultivo sobre los perfiles de la tasa de producción de CO₂ utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte y *Mucor bacilliformis*; observaron que la tasa de producción depende de la concentración inicial de nutrientes y que al aumentarlos también aumentaba la actividad respiratoria. Nosotros no aumentamos todas las concentraciones de los nutrientes, sólo aumentamos la concentración de la fuente de carbono, sin embargo notamos que al aumentar la concentración de glucosa también aumentó el tiempo en el que ocurre la máxima producción de CO₂ probablemente las altas concentraciones de glucosa pueden ejercer una presión osmótica sobre *Aspergillus niger*, lo que provocó un retraso en la germinación de las esporas.

En el caso de la agrolita, a partir de 200 g de glucosa/L, la tasa máxima de producción de CO₂ disminuyó drásticamente incluso por debajo de los valores obtenidos con concentraciones de glucosa más bajas. En las concentraciones de 250 y 300 g glucosa/L, en ambos soportes se observó una disminución de la tasa de producción de CO₂ y el desplazamiento del tiempo en que ocurre la máxima tasa de producción de CO₂.

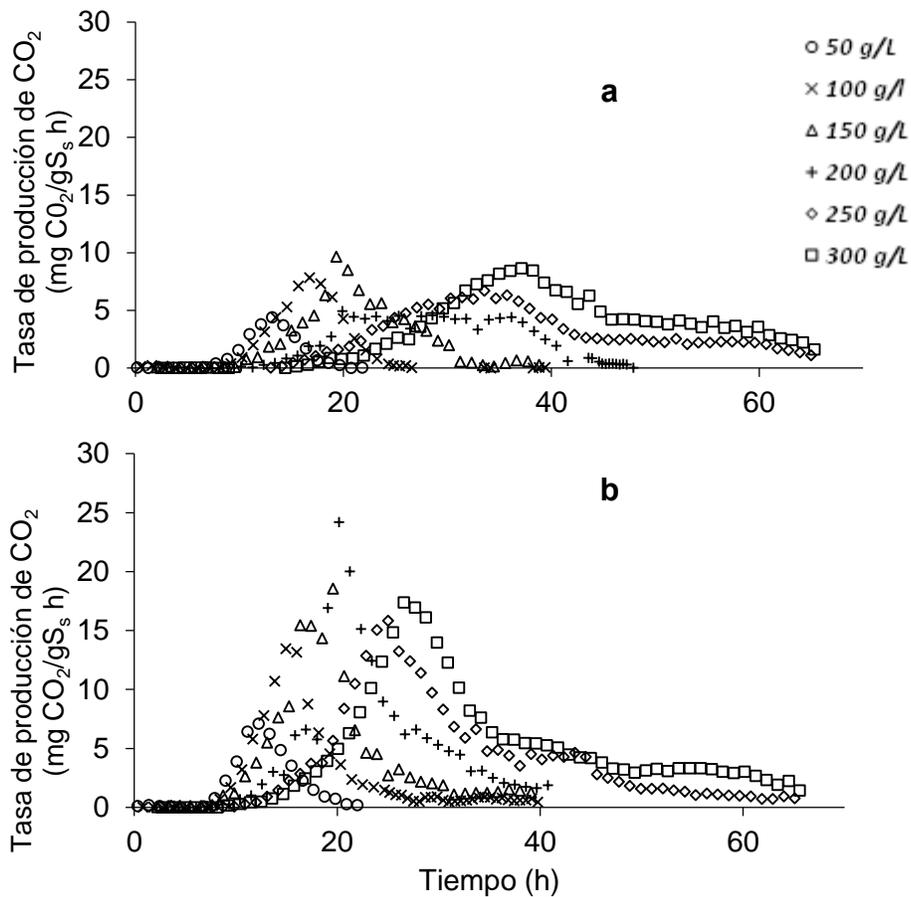


Figura 8 Tasa de producción de CO₂ por *A. niger* CH₄ en FMS con agrolita (a) y aserrín (b) como soportes y con diferentes concentraciones iniciales de glucosa en (mg/mL).

Como se mencionó anteriormente, en esta etapa del trabajo experimental se determinó el efecto de concentraciones crecientes de glucosa (50 a 300 g/L) sobre la actividad respiratoria y sobre el consumo de glucosa en medios de cultivo con agrolita y aserrín como soportes. Para facilitar la comprensión y comparación de los resultados, en todos los casos las variables de estudio se presentan con base en la glucosa consumida (GC). Por ello, a continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos de consumo de glucosa; posteriormente, debido al efecto importante de la humedad en el metabolismo microbiano, se presenta la estrategia utilizada para definir las condiciones iniciales de cultivo. Después, y por la importancia que puede tener en los perfiles cinéticos, se presentan y discuten los valores obtenidos de pH

inicial y final. Posteriormente, se presentan los resultados con base en las fases de crecimiento; es decir, en una primera etapa se presentarán los resultados relacionados con la Fase Lag, las tasas máximas de producción de CO₂ y consumo de O₂ y las tasas específicas de producción de CO₂ y consumo de O₂. Finalmente, se presentan y discuten los resultados relacionados con la producción y consumo totales de CO₂ y O₂, las tasas secundarias de producción de CO₂ y consumo de O₂ y el coeficiente respiratorio global en todos los procesos.

6.3 Consumo de glucosa

Además del tipo de soporte, la concentración inicial de glucosa fue una variable importante en este trabajo. Estudios previos han demostrado mayores tasas de consumo de glucosa al aumentar la concentración inicial (Solis y col., 1996); además, se han demostrado diferencias en rendimientos de producción de biomasa en función de la fuente de carbono. La **Figura 9** presenta los valores iniciales y finales de concentración de glucosa en los medios de cultivo.

Se evaluaron concentraciones de glucosa de 70 a 370 mg/gS_s (50 a 300 g/L). Hay que recordar que en todos los medios se mantuvo constante la concentración de sales, por lo que la C/N aumentó al aumentar la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo. En todos los casos el consumo de glucosa fue cercano al 100%. La glucosa residual al final del cultivo fue mayor al usar agrolita como soporte, esto fue confirmado con un ANOVA de dos factores el cual nos dice que el tipo de soporte tiene un efecto sobre el consumo de glucosa ($\alpha < 0.05$) y que hay diferencia significativa entre soportes teniendo un mayor consumo de glucosa en aserrín, lo cual pudo deberse a una menor tasa de consumo de sustrato. Por el consumo prácticamente total de glucosa, la utilización del valor de glucosa consumida como base de cálculo para presentar los parámetros asociados a producción de CO₂ y consumo de O₂, es equivalente a usar la concentración inicial de glucosa como base de cálculo. No se usó la cantidad de materia seca inicial o de soporte seco inicial como base de cálculo debido a los cambios importantes en la concentración de nutrientes en los medios de cultivo.

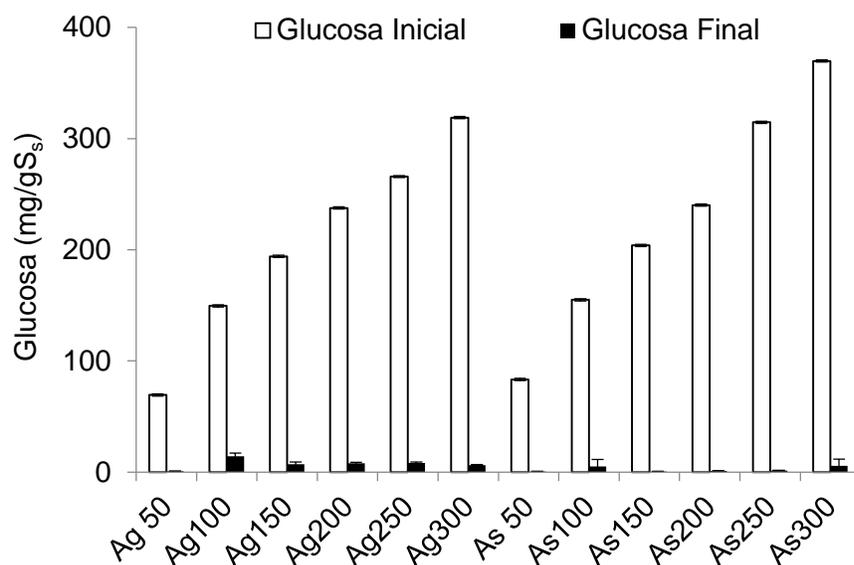


Figura 9 Concentración inicial y final de glucosa en los sistemas de FMS con *A. niger* usando agrolita (Ag) y aserrín (As) como soporte. Se evaluaron diferentes concentraciones iniciales de glucosa: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 g/L.

En 1996, Solís y col. evaluaron diferentes concentraciones de glucosa en FMS con *A. niger* CH4. Las concentraciones de glucosa evaluadas fueron 100, 250, 350 y 450 g/L, en sus resultados observaron que la mayor cantidad de glucosa (> 90%) fue consumida durante las primeras 24 h de la fermentación. En nuestro trabajo, *Aspergillus niger* también consumió más del 90% de la glucosa inicial; sin embargo, no se realizó una cinética del consumo de glucosa durante la fermentación para saber en qué tiempo se consumió esa cantidad de glucosa. Favela y col. en 1998, evaluaron el efecto de altas concentraciones iniciales de glucosa (50 a 450 g/L) sobre el crecimiento de *A. niger* utilizando amberlita como soporte inerte. En las concentraciones de 50 a 200 g de glucosa/L, el microorganismo fue capaz de utilizar más del 90% de la glucosa inicial; sin embargo, con concentraciones mayores el porcentaje de consumo disminuyó drásticamente. Este grupo atribuye las diferencias a la presión osmótica, el contenido de agua y el oxígeno disuelto.

6.4 Humedad

Como se mencionó en la sección de revisión bibliográfica, la humedad es una variable muy importante en los procesos de FMS pues está estrechamente relacionada con los mecanismos de transferencia de masa y calor en el medio de fermentación. Ésta además regula el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos, lo que permite realizar cultivos con bajas posibilidades de contaminación por bacterias y levaduras. Sin embargo, los medios con bajo contenido de agua disponible pueden representar un factor limitante para el crecimiento. Además del bajo contenido de agua propio de los cultivos en FMS, los cambios en la concentración inicial de glucosa de 70 a 370 mg/gS_s, equivalente a 50 a 300 g/L de medio de cultivo líquido (antes de mezclar con el soporte) provocan cambios en el contenido de humedad debido a la propia composición del medio. Es decir, los medios con menor concentración de solutos tienen mayor cantidad de agua. La concentración de agua en el medio, cambia durante el cultivo debido a la producción de agua metabólica, al intercambio de agua de la fase gaseosa (aire húmedo) a la fase sólida y al propio consumo de los sólidos solubles. Si solo se considera el agua presente en el medio, ésta aumenta su concentración en función del tiempo debido a la disminución de solutos (sustratos) durante el cultivo. Debido a que el control de la humedad (contenido y forma de agua) en los procesos de cultivo sólido particularmente en aquellos en los que la concentración de solutos es alta, se decidió establecer un contenido de humedad inicial mayor al de la humedad crítica y menor al de la capacidad de retención de agua de cada soporte. Es decir, debido a las diferencias de los soportes en cuanto a su interacción con el agua, se utilizó un contenido de humedad equivalente a una fracción (40%) de la capacidad de retención de agua de cada soporte. En la **Figura 10** se presentan los valores de humedad inicial y final para cada soporte.

Para cada soporte la humedad inicial disminuye al aumentar la concentración inicial de nutrientes en el medio de cultivo, en cada concentración de nutrientes la humedad inicial en agrolita es menor a la de aserrín. Se notan diferencias en la humedad inicial a pesar de que se tomaron en cuenta el factor de capacidad de retención de agua y la cantidad de agua en cada uno de los diferentes medios de cultivo.

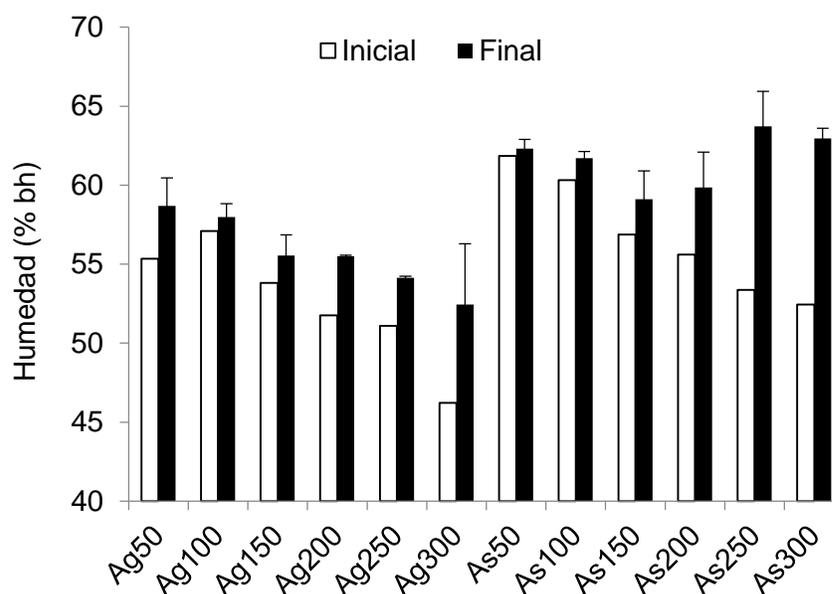


Figura 10 Humedad inicial y final en los sistemas de FMS con *A. niger* usando agrolita (Ag) y aserrín (As) como soporte. Las concentraciones iniciales de glucosa evaluadas fueron: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 g/L.

Mediante un ANOVA de dos factores ($\alpha < 0.05$) se obtuvo que existen diferencias significativas en la humedad final debido al efecto del soporte y al efecto de la concentración inicial de glucosa y a la interacción de éstos.

En todos los casos, el contenido de humedad final fue significativamente mayor que la humedad inicial, esto se debe a la producción de agua durante la fermentación. Estos resultados indican que durante el tiempo que duró el cultivo (72 h), no hubo problemas por limitación de agua en el sistema. Sin embargo, se obtuvieron perfiles diferentes con ambos soportes. Con agrolita, el contenido de humedad final disminuyó significativamente al aumentar la concentración inicial de glucosa, mientras que con aserrín la humedad final fue prácticamente independiente de la concentración inicial del azúcar. Con el ANOVA de dos factores se comprobó que el tipo de soporte y la concentración inicial de glucosa así como la interacción tienen un efecto sobre la humedad final. Esto puede ser debido a la diferente interacción agua-soporte con agrolita y aserrín.

6.5 pH

Otra variable importante que puede afectar considerablemente el perfil de crecimiento es el pH. Es una variable difícilmente controlable en procesos estáticos de FMS, por lo que el medio de cultivo debe formularse con el tipo y concentración de nutrientes que evite cambios importantes en el pH. En este trabajo se usaron dos componentes que influyen en la estabilidad del pH (fosfato de potasio y urea). En la **Figura 11** se presentan los valores iniciales y finales de los valores de pH en todos los medios utilizados.

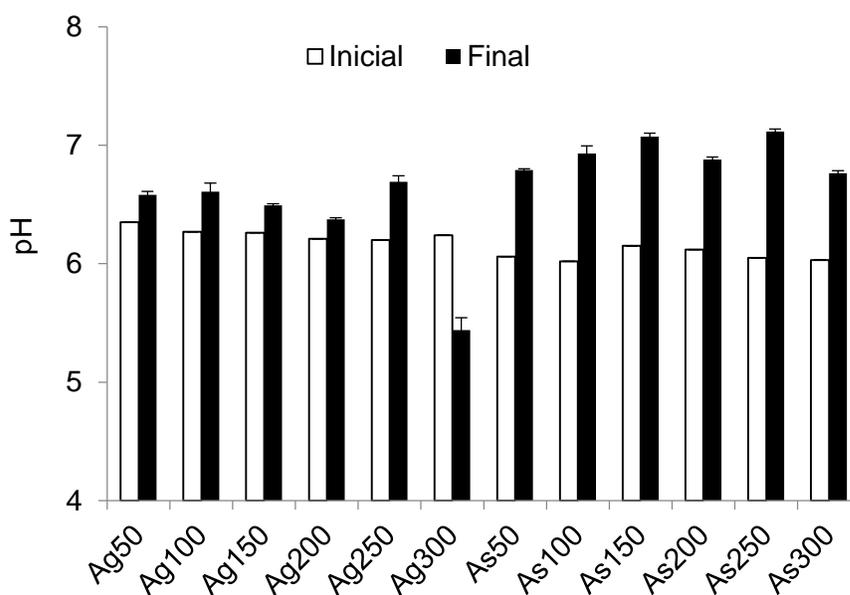


Figura 11. Valores iniciales y finales de pH en los sistemas de FMS con *A. niger* usando agrolita (Ag) y aserrín (As) como soporte. Las concentraciones de glucosa evaluadas fueron: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 g/L.

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): El soporte, la concentración de glucosa y la interacción entre estos dos factores tienen efecto sobre el pH final.

En general, el pH inicial fue cercano a 6.2 en todas las condiciones evaluadas. Los valores finales de pH fue cercano a 7, con excepción del medio Ag300 el pH disminuyó hasta 5.3. En el caso de la agrolita, el pH final fue de 6.55 ± 0.12 y para el aserrín de 6.93 ± 0.14 . Los datos obtenidos del ANOVA muestran que el tipo de soporte y la concentración inicial de glucosa, así como la interacción de éstos tienen un efecto sobre el pH.

Solís y col. en 1996, evaluaron altas concentraciones de glucosa (100, 250, 350 y 450 g/L) en bagazo de caña. Para cada concentración se realizó una cinética de pH durante la fermentación, iniciando con valores cercanos a 4.5; este grupo observó que ese valor de pH se mantuvo sólo durante las primeras 10 horas del proceso y que posteriormente había una caída drástica del pH. El efecto de la caída del pH tuvo un comportamiento diferente en todas las concentraciones de glucosa evaluadas, observando que a mayor concentración de glucosa la caída fue más rápida, llegando a valores entre 2.2 y 3. Nosotros no realizamos cinéticas de pH durante la fermentación, sin embargo los valores de pH obtenidos al inicio y al final de nuestro proceso indican que no hubo variaciones drásticas durante la fermentación.

Una vez que se presentaron y describieron algunas variables (consumo de glucosa, humedad y pH) que pueden tener un efecto importante en la producción de CO₂ y consumo de O₂, se presentan los resultados cinéticos y rendimientos de CO₂ y O₂.

6.6 Fase Lag

En el caso de los cultivos de hongos filamentosos inoculados con esporas, el tiempo Lag (t_{Lag}) corresponde al tiempo de germinación de las esporas. Con concentraciones de glucosa de 50 a 250 mg/gS_s, el t_{Lag} se encontró en un rango de 6 a 10 h (**Figura 12**) para ambos soportes. Sin embargo, con concentraciones de glucosa superiores a 250 mg/gS_s, se observa claramente un aumento del tiempo de la fase Lag en agrolita llegando a un $t_{Lag}=15.4$ h, mientras que con aserrín en esas mismas concentraciones, la fase Lag se mantuvo constante con un $t_{Lag}=8.44 \pm 0.4$ h. Al realizar un ANOVA de dos factores se determinó que el tipo de soporte, la concentración inicial de glucosa y la interacción de éstos tienen un efecto sobre la Fase Lag.

El aumento en la fase Lag con concentraciones de glucosa >250 g/L puede ser debido al bajo valor de humedad inicial obtenido bajo estas condiciones (**Figura 10**). Sin embargo, es importante mencionar que no se observó un efecto negativo de la humedad inicial sobre la duración del tiempo Lag en los medios con concentraciones iniciales de glucosa de 50 a 250 g/L. Estos resultados sugieren que las diferencias en la fase Lag entre ambos soportes se debe a la diferente interacción agua-soporte en la agrolita y en el aserrín.

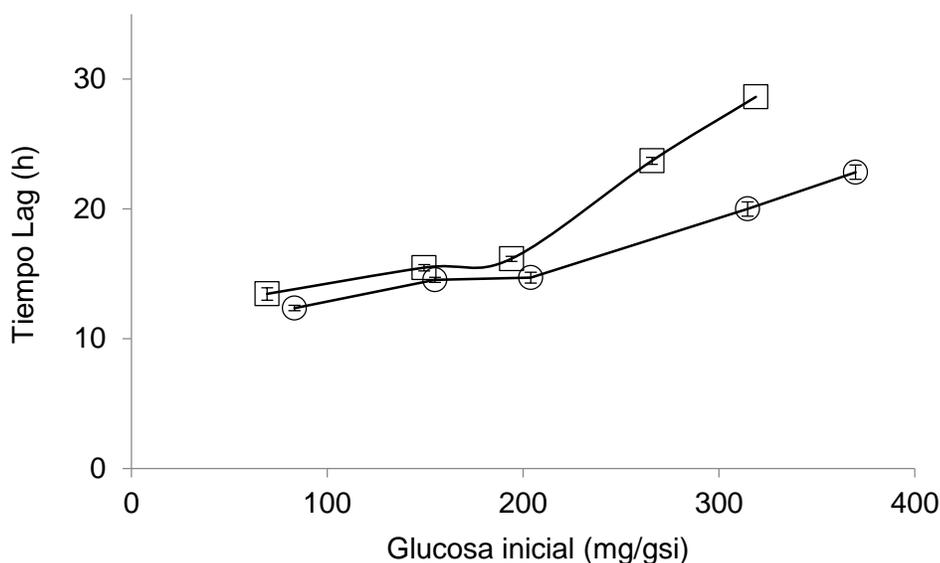


Figura 12. Tiempo de la fase de germinación (Lag) en función de la concentración inicial de glucosa durante el cultivo de *A. niger* en FMS con agrolita (□) y aserrín (○) como soportes. Los valores corresponden al promedio de tres unidades experimentales independientes.

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): El soporte, la concentración de glucosa y la interacción entre estos dos factores tienen efecto sobre el t Lag.

6.7 Producción de CO₂ y consumo de O₂

Después de la fase de germinación (Lag), pueden distinguirse las fases de aceleración y desaceleración de producción de CO₂ y consumo de O₂. Entre ambas fases (aceleración y desaceleración) se encuentra la máxima tasa de producción de CO₂. Para cada soporte y cada concentración en glucosa inicial, los valores máximos de la tasa de producción y consumo de CO₂ y O₂ respectivamente se obtuvieron en el mismo tiempo de cultivo. Es importante recordar que estos valores se obtienen durante las Fases II y III de crecimiento y, por consiguiente, la producción de CO₂ es debida exclusivamente al carbono que aporta la glucosa.

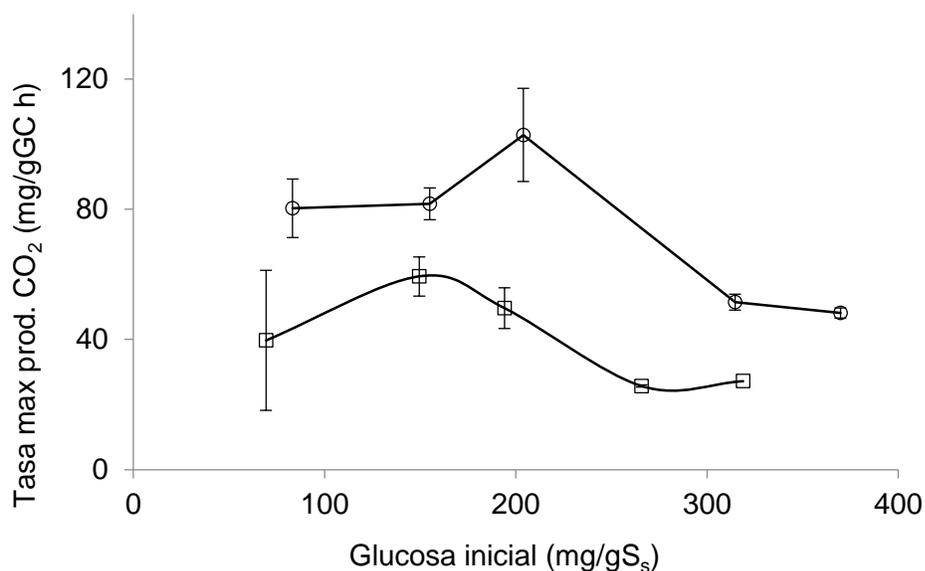


Figura 13 Tasas máximas de producción de CO₂ *A. niger* en medios de cultivo con diferente concentración inicial de glucosa en FMS con agrolita (□) y aserrín (o) como soportes. Los valores son el promedio de tres unidades experimentales independientes.

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): El soporte, la concentración de glucosa y la interacción entre estos dos factores tienen efecto sobre la tasa máxima de producción de CO₂.

Al usar aserrín como soporte, las tasas de producción de CO₂ son de 1.3 a 2 veces mayores que las obtenidas con agrolita, corroborando con los datos obtenidos del ANOVA de dos factores demostramos que existe una diferencia significativa entre soportes y entre concentraciones de glucosa ($\alpha < 0.05$). Lareo y col. (2006) evaluaron diferentes concentraciones de glucosa (24.9, 49.8 y 74.7 g/L) con diferentes contenidos de humedad (70, 80 y 90%) y observaron que la tasa máxima de producción de CO₂ aumentaba considerablemente al incrementar la humedad en el cultivo, y las tasas máximas se obtenían en la concentración más alta de glucosa. Los resultados mostrados en las **Figuras 13** y **10** sugieren que las diferencias que tienen los soportes en la humedad al inicio de la fermentación puede tener un efecto en las tasas máximas de producción de CO₂. Para todos los medios evaluados, la producción de CO₂ fue mayor que el consumo de oxígeno, indicando mayor mineralización del carbono con este aserrín. Para ambos soportes se obtiene una relación molar CO₂/O₂ (coeficiente respiratorio) similar (1.28 mol/mol \pm 5%). Finalmente, las mayores

tasas de producción de CO₂ se obtuvieron en los medios con una concentración inicial de glucosa de 149.5 mg/gS_s y 203.9 mg/gS_s en agrolita y aserrín, respectivamente.

Las tasas específicas de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) alcanzaron su máximo valor en concentraciones bajas de glucosa en ambos soportes (**Figura 14**). Los resultados presentados en esta sección son los estimados con el modelo logístico, en el intervalo correspondiente a las fases de aceleración y desaceleración de producción de CO₂. La disminución de los valores de la μ_{CO_2} por efecto de la concentración inicial de glucosa fue ligeramente más marcada en agrolita que en aserrín; es decir, al incrementar la concentración de glucosa en el medio de 69 a 369 mg/gS_s se obtuvo una reducción de 79% y 62% en agrolita y aserrín respectivamente. Los valores estimados por el modelo logístico en las zonas II y III son 1.2 % \pm 0.18 mayores a los estimados con el modelo exponencial en la fase de producción acelerada de CO₂.

Una vez presentado y discutido el efecto del tipo de soporte y la concentración inicial de glucosa sobre el perfil respiratorio de *A. niger* en las fases Lag y de máxima tasa de producción de CO₂, se analiza el efecto de las mismas variables (tipo de soporte y concentración inicial de glucosa) sobre la producción de CO₂ (**Figura 15**).

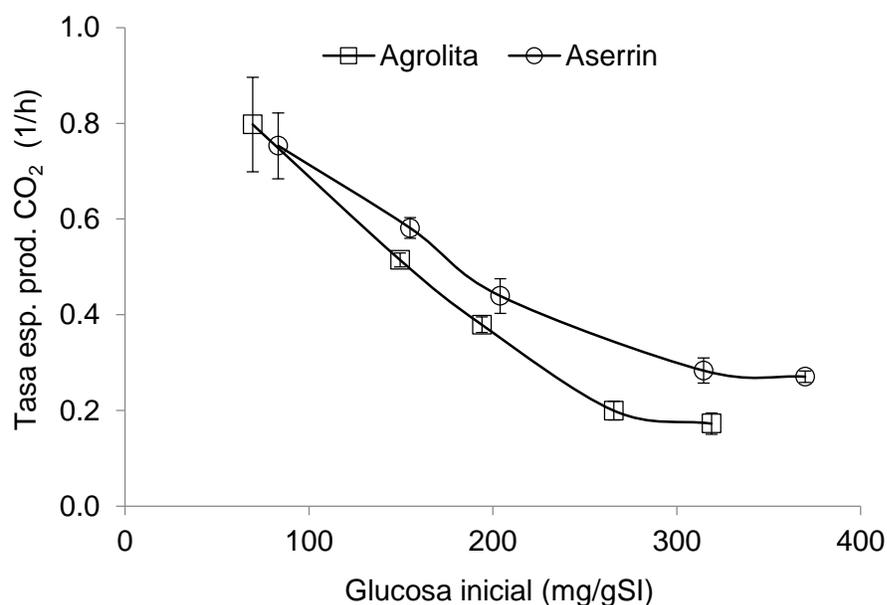


Figura 14 Tasa específica de producción de CO₂ durante el cultivo de *A. niger* medios de cultivo con diferente concentración inicial de glucosa en medios con agrolita (\square) y aserrín (\circ) como soportes inertes

En el caso del aserrín, la producción de CO_2 llega a ser de 1.2 a 2.3 veces mayor que en agrolita. Esto puede ser debido a una mayor mineralización del carbono de la glucosa con aserrín como soporte o a la mineralización parcial del carbono de este soporte. Lo que es evidente en ambos soportes, es que la mineralización del carbono fue menor en medios con concentración inicial de glucosa de 69 a 200 mg/gS_s y que ésta se mantuvo en los medios con la mayor concentración de glucosa evaluada. El consumo de O_2 se mantuvo sin cambios significativos con concentraciones de glucosa de 149 a 369 mg/gS_s en ambos soportes; este comportamiento se ve reflejado en los valores del coeficiente respiratorio global del proceso, que indican la relación molar entre la producción de CO_2 y el consumo de O_2 (**Figura 16**). El coeficiente respiratorio aumentó en los medios de cultivo con concentraciones de glucosa de 50 a 200 mg/gS_s y se mantuvo prácticamente constante a concentraciones entre 200 y 380 mg/gS_s . Estos resultados sugieren que el metabolismo de la fuente de carbono depende de la concentración inicial de glucosa pero no del tipo de soporte utilizado. Los bajos valores del coeficiente respiratorio en medios con bajas concentraciones iniciales de glucosa indican una menor mineralización del carbono, lo que sugiere la síntesis de biomoléculas con grado de oxidación mayor al de la glucosa.

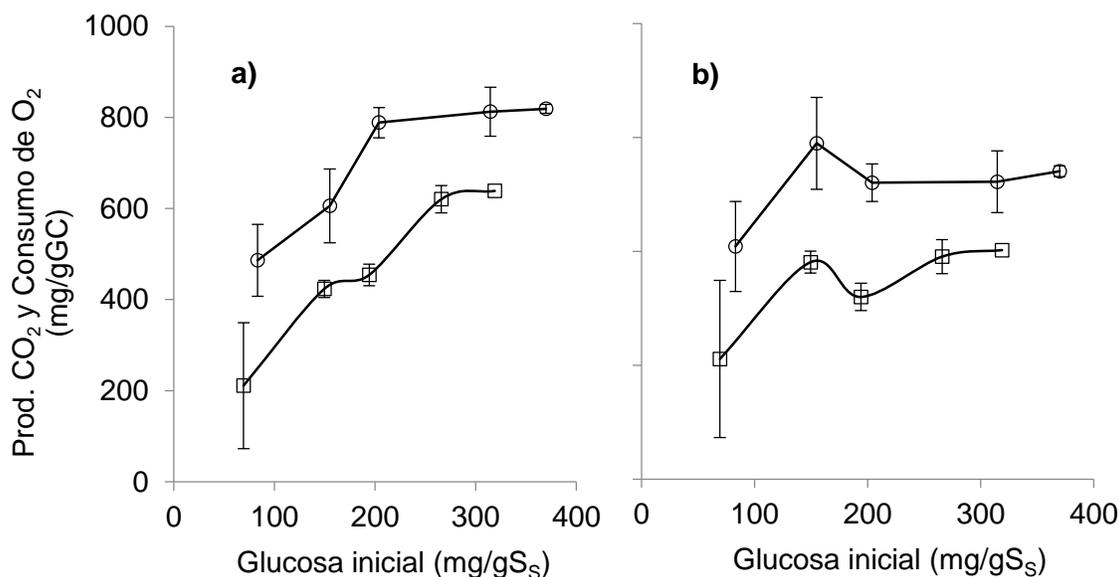


Figura 15 Producción de CO_2 (a) y consumo de O_2 (b) durante el cultivo de *A. niger* en FMS con diferente concentración inicial de glucosa, con agrolita (□) y aserrín (○) como soportes inertes. Los valores corresponden al promedio de tres unidades experimentales independientes.

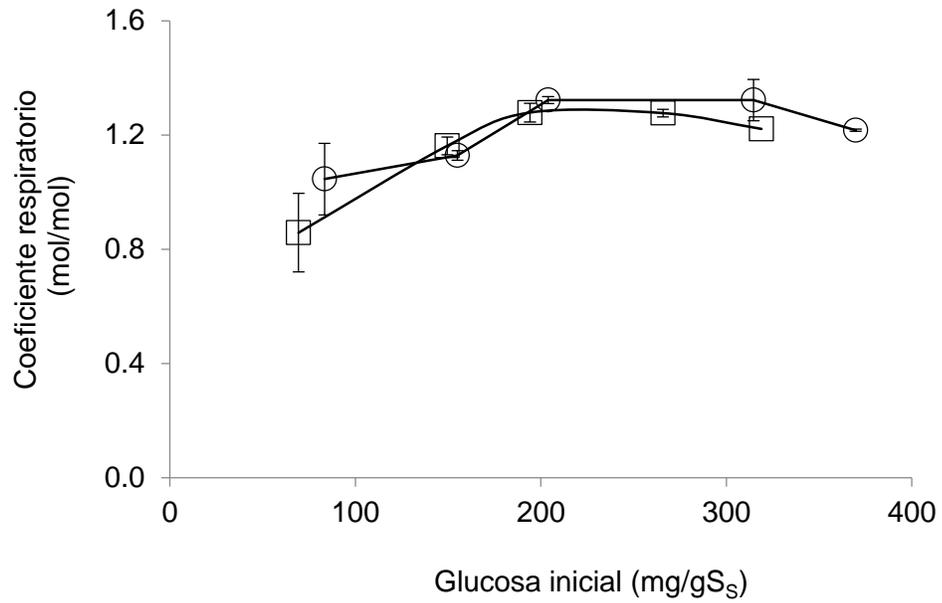


Figura 16 Coeficiente respiratorio global del cultivo de *A. niger* en FMS con diferente concentración inicial de glucosa en agrolita (□) y aserrín (○) como soportes inertes. Se muestran los promedios de tres replicas independientes.

CAPÍTULO 3. EFECTO DE LA RELACIÓN C/N SOBRE LA FISIOLÓGÍA DE *A. niger*

El tipo y la naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno se encuentran entre los factores más importantes para cualquier proceso de fermentación. De los principales componentes de la biomasa celular, la fuente de carbono es la más importante. El nitrógeno es el siguiente nutriente más importante, ya que determina el crecimiento de los microorganismos (Pandey y col., 2008). Generalmente, se cree que la relación entre la masa de carbono y nitrógeno (relación C/N) es crucial para un proceso particular y obtener un producto determinado. Esta consideración es válida cuando el metabolito a producir no está asociado al crecimiento o incluso, se encuentra asociado parcialmente. Cuando se trata de los hongos, es necesario tener en cuenta la relación C/N en el metabolismo microbiano, desde la germinación de las esporas hasta la esporulación al final del cultivo (Pandey y col., 2008).

En este capítulo se presentan los resultados del efecto de la relación C/N sobre la producción de CO₂ y el consumo de O₂ y glucosa por *A. niger* en FMS con agrolita y aserrín como soportes. Para ello, se usó una concentración inicial de glucosa de 300 g/L y se disminuyó la concentración del resto de los nutrientes, obteniendo así medios de cultivo con diferentes relaciones C/N (8.3, 16.5, 32.9, 65.6). Cada relación C/N se evaluó por triplicado, obteniendo 12 cultivos (unidades experimentales) independientes. De cada unidad experimental se obtuvieron cinéticas de tasas de producción y consumo de CO₂ y O₂ respectivamente.

Para facilitar el análisis de los resultados se presentarán primeramente los resultados relacionados con la fase Lag, las tasas máximas de producción de CO₂ y consumo de O₂ y las tasas específicas de producción de CO₂ y consumo de O₂.

6.8 Fase Lag

En la **Figura 17** se observa que en el caso de la agrolita como soporte, el aumento de la relación C/N no tuvo efecto sobre la duración de la fase Lag, manteniéndose en un rango entre 15 y 17 h. Mediante un ANOVA se demostró que si existen diferencias significativas debidas al tipo de soporte y a la relación C/N sobre el tiempo Lag. Un resultado similar se presentó en un experimento realizado por Volke y col. (2006), quienes utilizaron como soporte inerte espuma de poliuretano, como sustrato hexadecano y *Aspergillus niger*; ellos evaluaron diferentes relaciones C/N (29, 57, 86 y 115) y observaron que la fase Lag (4.9-5.2 días) fue prácticamente independiente de la relación C/N. En el caso del aserrín, el aumento de la relación C/N causó una variación en la duración de la fase Lag; primero se notó un aumento

en la relación C/N=16.5 con una duración de 14 h, y con las relaciones C/N más altas (32.9 y 65.6) la fase Lag disminuyó hasta 8 h.

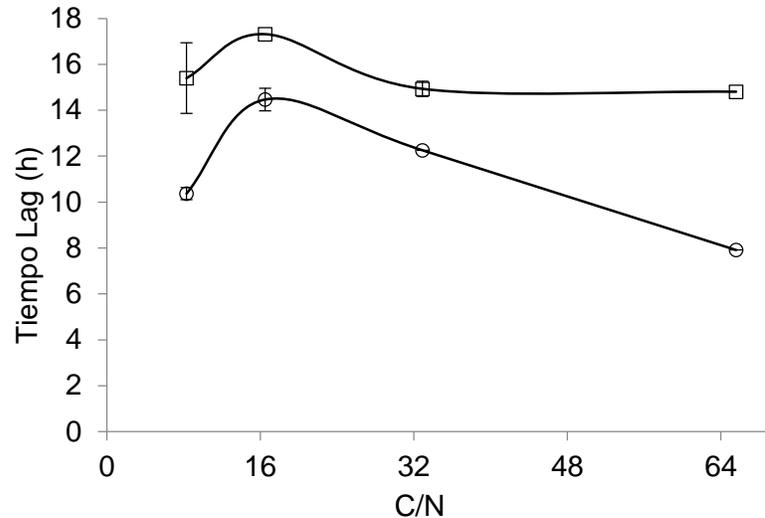


Figura 17 Fase de germinación (Lag) en función de la relación C/N durante el cultivo de *A. niger* en medio sólido con agrolita (□) y aserrín (○) como soportes.

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): El soporte, la concentración de glucosa y la interacción entre estos dos factores tienen efecto sobre el t Lag.

Se evaluaron la humedad y el pH para saber si influían en la variación de la fase Lag. En la **Figura 18** se observa que la humedad inicial registrada en ambos soportes fue muy similar y se encontró en un rango entre 46.2 y 53.8%; sin embargo en la humedad final se comprobó que existen diferencias significativas debido al efecto que produce el soporte.

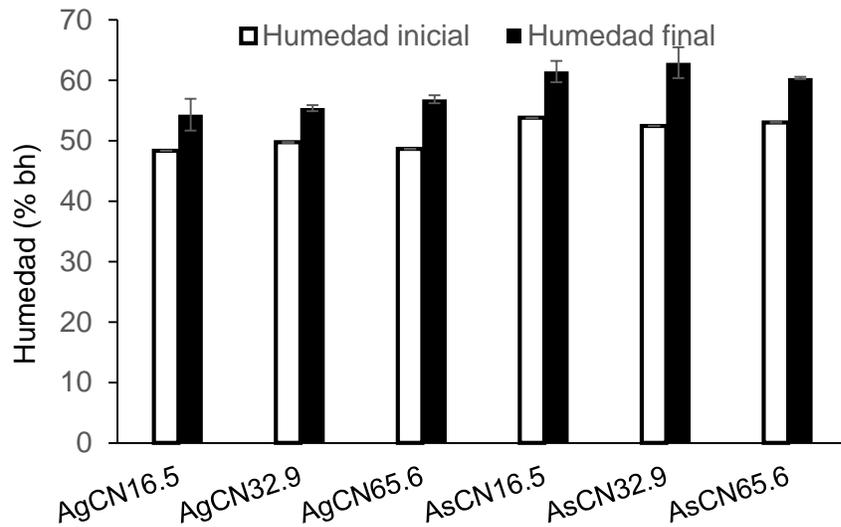


Figura 18 Efecto de la relación C/N (CN) en la humedad inicial y final de los sistemas de FMS con *A. niger* usando agrolita (Ag) y aserrín (As) como soporte. Los números en las leyendas del eje de las abscisas indican la relación C/N.

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): El soporte tiene efecto sobre la humedad final.

La **Figura 19** presenta los datos obtenidos del pH, variable que pudo influir en la duración de la fase Lag. El pH inicial en ambos soportes fue muy similar (6.0-6.8) en ambos soportes, sin embargo en el pH al final del tiempo de cultivo tuvo diferencias significativas debido al efecto que produce el soporte. Un seguimiento de los valores de pH durante el tiempo de la fermentación podría haber ayudado a determinar el tiempo de la caída del pH, y con ello, si este tuvo un efecto sobre la duración de la fase Lag. Solís y col. (1996) evaluaron concentraciones altas de glucosa inicial y realizaron cinéticas del pH durante una FMS con *A. niger*, utilizando bagazo de caña como soporte; el pH inicial en todas las fermentaciones iniciaron fue de 4.5 y este valor se mantuvo durante las primeras 10 horas, posteriormente hubo una caída drástica hasta valores de pH entre 2 y 3 y, al final de las fermentaciones, el pH se encontró entre 2.5 y 3.7.

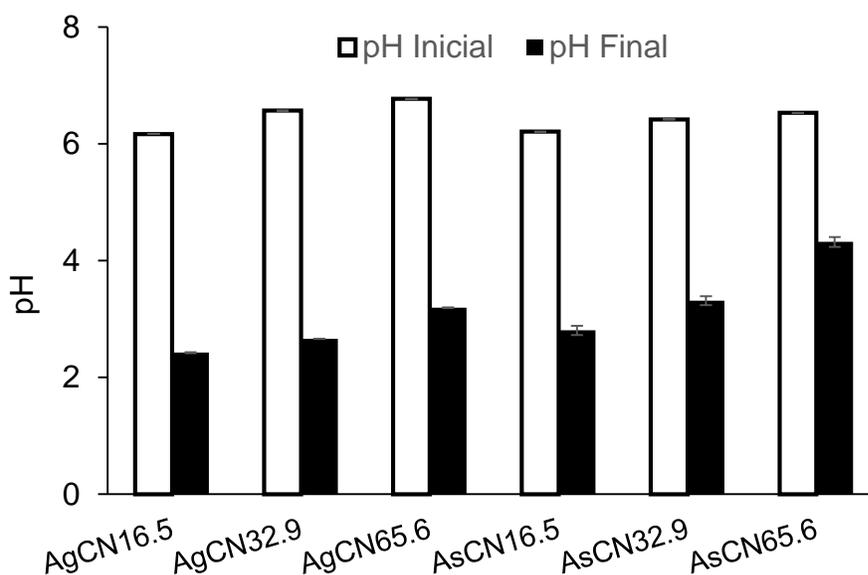


Figura 19 Efecto de la relación C/N (CN) en los valores iniciales y finales de pH en los sistemas de FMS con *A. niger* usando agrolita (Ag) y aserrín (As) como soporte. Los números en las leyendas del eje de las abscisas indican la relación C/N.

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): El soporte, la relación C/N y la interacción entre estos dos factores tienen efecto sobre el pH final.

6.9 Producción de CO₂ y consumo de O₂

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante la fase en la que ocurre la máxima tasa de producción de CO₂ y de consumo de O₂. Este máximo valor corresponde al final de la tasa de aceleración en la producción de CO₂ y consumo de O₂. Para cada relación C/N inicial, las máximas tasas de producción de CO₂ y consumo de O₂ se obtuvieron en el mismo tiempo de cultivo. Los valores mostrados en la **Figura 20** corresponden al promedio de los valores obtenidos para tres unidades experimentales independientes. Es importante recordar que estos valores se obtienen en la primera etapa de crecimiento y, por consiguiente la producción de CO₂ es debida exclusivamente al carbono proporcionado por la glucosa.

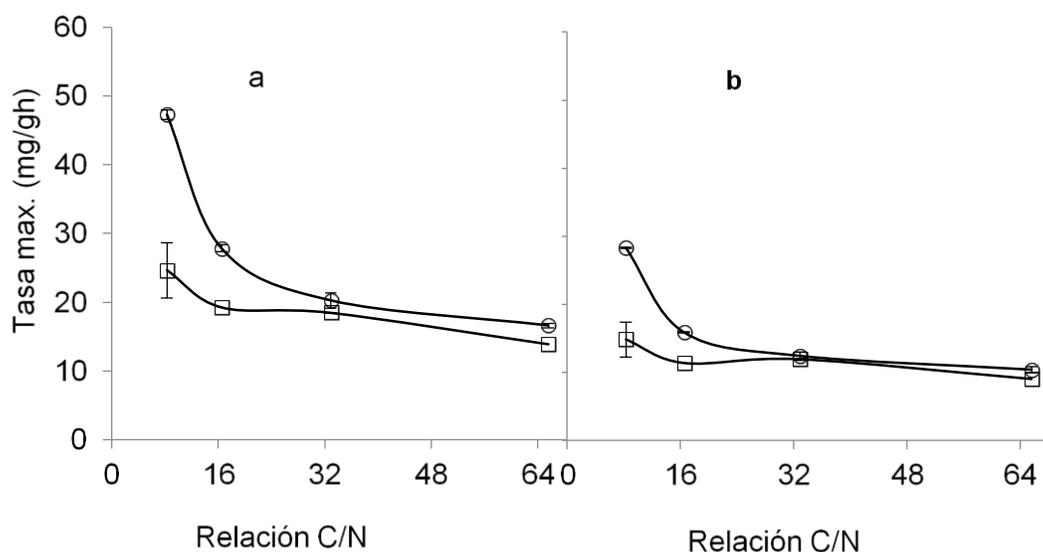


Figura 20 Efecto de la relación C/N sobre las tasas máximas de producción de CO₂ (a) y consumo de O₂ (b) durante el cultivo de *A. niger* en FMS con agrolita (□) y aserrín (o) como soportes.

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): El soporte, la relación C/N y la interacción entre estos dos factores tienen efecto sobre el pH final

En el caso del aserrín en las relaciones C/N de 8.3 y 16.5, los valores de las tasas máximas de producción de CO₂ duplicaron a los obtenidos con agrolita (**Figura 20**), en las relaciones C/N de 32.9 y 65.6, ambos soportes tuvieron tasas máximas de producción de CO₂ similares. En las tasas máximas de consumo de oxígeno se observaron diferencias entre soportes en las relaciones C/N=8.3 y 16.5 obteniéndose en aserrín las tasas máximas más altas. Mediante un ANOVA se comprobó que existe diferencia significativa debido al tipo de soporte y a la relación C/N.

Las mayores tasas específicas de producción de CO₂ y de consumo de O₂ (**Figura 21**) se obtuvieron en la relación C/N=16 en ambos soportes, no obstante, los valores obtenidos en aserrín duplicaron a los de agrolita. En el caso de la agrolita las tasas de producción de CO₂ y de consumo de O₂ son muy semejantes en todas las relaciones C/N evaluadas: $0.14 \pm 2\%$ y $0.10 \pm 3\%$ respectivamente.

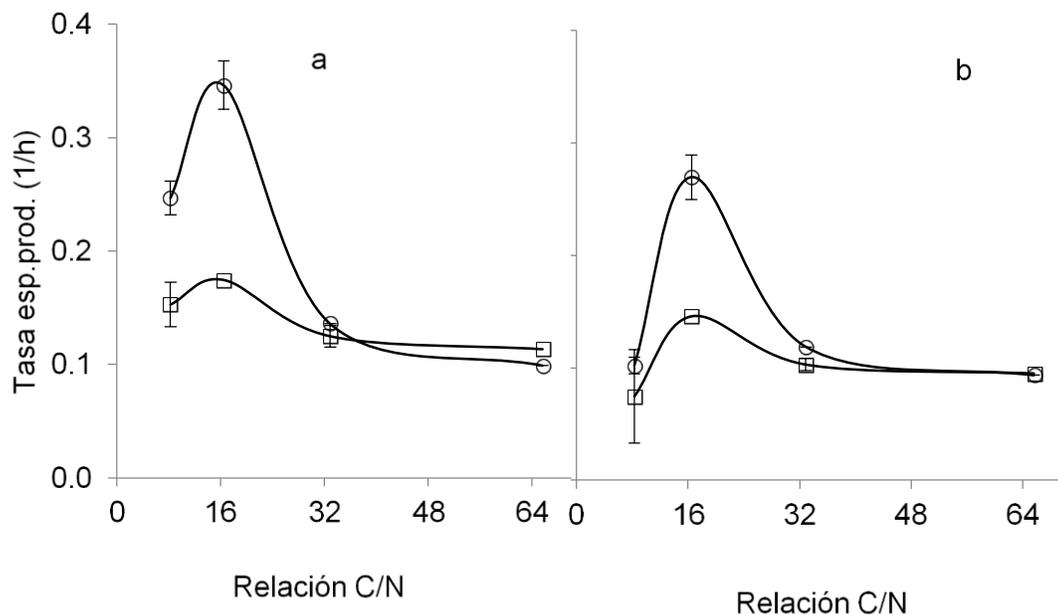


Figura 21 Efecto de la relación C/N sobre las tasas específicas de producción de CO₂ (a) y consumo de O₂ (b) durante el cultivo de *A. niger* en FMS usando agrolita (□) y aserrín (o) como soportes.

A continuación se presentan los resultados de máxima producción de CO₂ y consumo de O₂; en este caso, se presentan los valores obtenidos experimentalmente (**Figura 22**). Los valores presentados en la **Figura 22** son expresados con base en la glucosa consumida. En el caso de los medios de cultivo con aserrín, la máxima producción de CO₂ y consumo de O₂ fueron semejantes en todas las relaciones C/N evaluadas (658.9 ± 40.5 y 431.0 ± 22.2 mg/gGC respectivamente). En el caso de la agrolita, en la relación C/N más pequeña, la producción máxima de CO₂ y consumo de O₂ fueron la mitad de la producción registrada con aserrín en esa misma relación. En las relaciones C/N de 16.5, 32.9, 65.6, la producción de CO₂ y consumo de O₂ fueron similares en ambos soportes. Esto se refleja en los resultados expresados como el coeficiente respiratorio global del proceso (**Figura 23**), el cual fue similar en todas las relaciones C/N evaluadas ($1.1 \pm 5\%$).

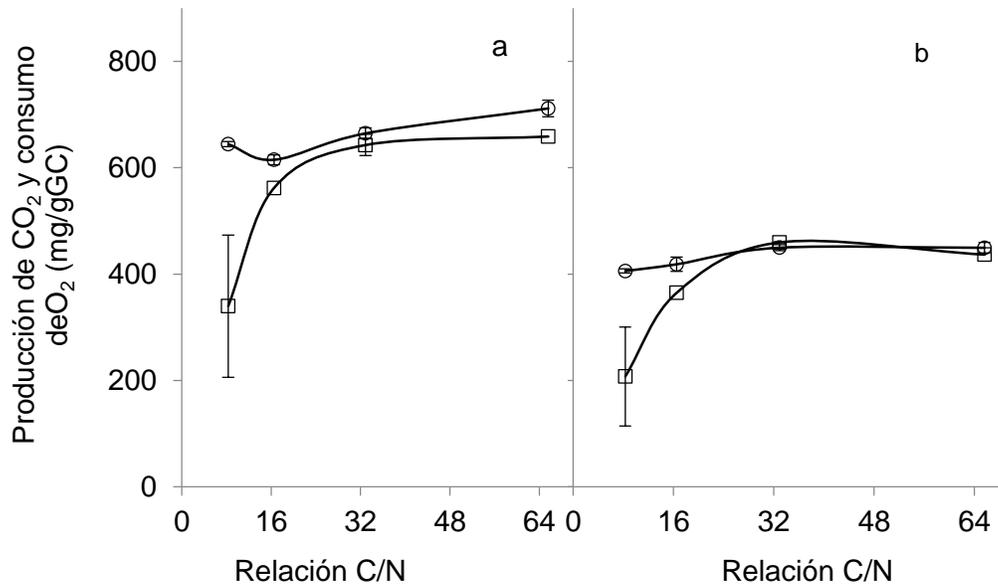


Figura 22 Efecto de la relación C/N sobre la producción de CO₂ (a) y consumo de O₂ (b) durante el cultivo de *A. niger* en FMS con agrolita (□) y aserrín (o) como soportes.

En este capítulo se observa que altas relaciones C/N (>16.5) no afectaron los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento como la producción de CO₂, consumo de O₂ y las tasas máximas tuvieron. Sin embargo, en la fase Lag, sí se registraron diferencias significativas debidas al tipo de soporte utilizado, siendo ésta 2 veces mayor en agrolita.

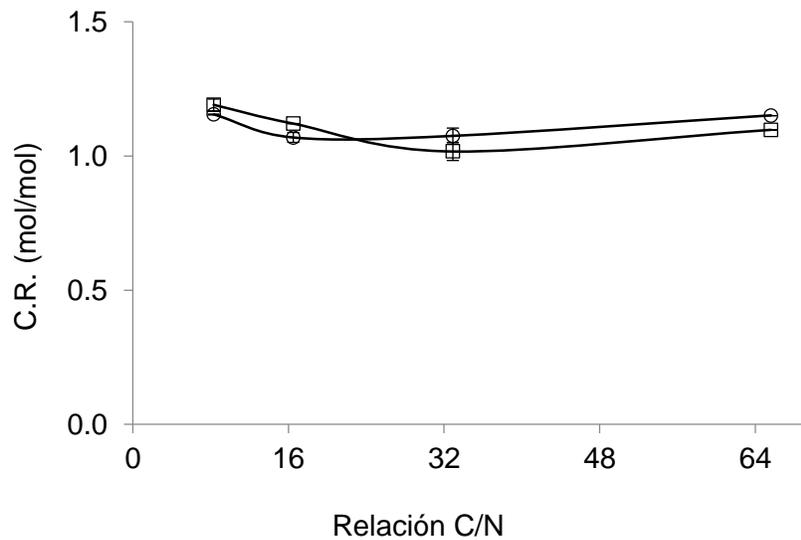


Figura 23 Coeficiente respiratorio global del cultivo de *A. niger* en medios de cultivo con diferente concentración inicial de glucosa en medios con agrolita (□) y aserrín (○) como soportes inertes.

Nosotros trabajamos las mismas condiciones que Solís y col. en 1996, este grupo de trabajo utilizó agua destilada en sus medios de cultivo y nosotros utilizamos agua Bonafont®. Probablemente no se mostraban diferencias significativas en las últimas relaciones C/N debido a la calidad de agua que usamos. El siguiente capítulo evaluaremos el efecto del tipo de agua (Bonafont® y destilada) sobre la fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* utilizando una relación C/N de 65.6, como se mencionó en el Capítulo 3 fue la relación C/N más alta y dónde sólo hubo diferencia significativa en la fase de adaptación.

CAPÍTULO 4. EFECTO DEL TIPO DE AGUA SOBRE LA FISIOLOGÍA DE *Aspergillus niger*

El papel del agua en los sistemas biológicos es muy diverso y los mecanismos de acción e interacción de esta molécula con moléculas orgánicas no son conocidas totalmente (Gervais y colaboradores, 1996). El agua tiene dos funciones fundamentales:

- Como disolvente de los nutrientes necesarios para el microorganismo y de los metabolitos desechados por el microorganismo.
- Estructural, ya que está implicada con la estabilidad y la función de las estructuras biológicas organizadas en los niveles celular y molecular. A nivel molecular el papel del agua está relacionado con la estabilización de la estructura de los biopolímeros, como proteínas, nucleótidos y carbohidratos. A nivel celular el papel de las moléculas de agua está en la estabilización de la estructura laminar de las membranas plasmáticas y por lo tanto en la preservación de su permeabilidad. En el medio intracelular las moléculas de agua se relacionan con otras moléculas como polioles, azúcares y enzimas, que contribuyen a mantener el volumen celular (Gervais y Molin, 2002).

A partir de estas diferentes funciones, podemos entender por qué el agua es esencial para el metabolismo de hongos en la fermentación de estado sólido:

- a. Si la cantidad de agua es insuficiente y no permite una buena difusión de solutos y gases, el metabolismo celular se ralentiza, o se puede detener debido a la falta de sustratos o a la alta concentración de metabolitos inhibitorios en o cerca de la célula.
- b. Si la cantidad intracelular o extracelular de agua no permite el mantenimiento de las propiedades funcionales de algunas enzimas, su inactividad crea un desequilibrio en el metabolismo.
- c. Si la transferencia de agua inducida por el estrés de agua conduce a una desnaturalización de la estructura mecánica de la membrana, todas las propiedades de permeabilidad y el transporte a través de la membrana se ven afectados (Gervais y Molin, 2003).

En este capítulo se pretende evaluar el efecto del tipo de agua sobre la fisiología de *Aspergillus niger*, usando una relación C/N de 65.6 y 300 g/L de glucosa.

Los resultados cuantitativos de producción y de CO₂, consumo de O₂, y tasas de producción de CO₂ y consumo de O₂, expresados todos ellos con base en la glucosa consumida fueron utilizados para la estimación de parámetros cinéticos de los cultivos.

6.10 Fase Lag

A continuación se presenta el efecto del tipo de agua y de soporte sobre el consumo de glucosa, la fase Lag y las tasas de producción de CO₂ y consumo de O₂. En un principio observamos que la glucosa tanto inicial y final (**Figura 24**) fue muy similar en los dos tipos de agua evaluados en agrolita y aserrín. En ambos casos, *A. niger* fue capaz de convertir más del 75% de la glucosa inicial.

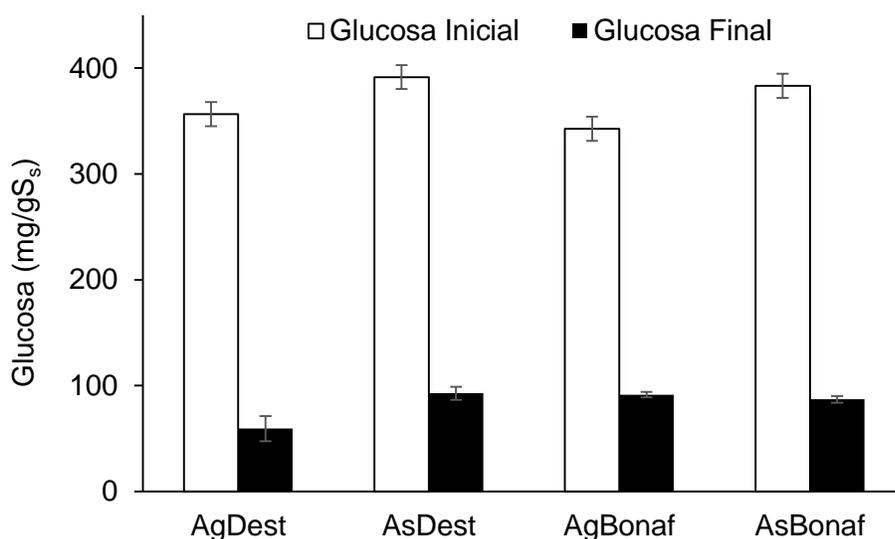


Figura 24 Efecto del tipo de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]) sobre el consumo de glucosa por *A. niger* en FMS con agrolita (Ag) y aserrín (As) como soportes.

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): El soporte tiene efecto sobre la glucosa consumida.

Mediante un ANOVA de dos factores se comprobó que el tipo de soporte tiene efecto en el consumo de glucosa, así que los soportes tienen diferencias significativas. Este mismo comportamiento se observó en los capítulos anteriores. Sin embargo no hay un efecto por el tipo de agua.

En la **Figura 25** se observa que el tipo de agua no tiene efecto sobre el tiempo de la fase de germinación; en agrolita, la fase Lag se mantuvo en un rango de 14.9 y 15.8 h, mientras que en aserrín entre 11.0 y 12.5 h. Al comparar el tiempo de la fase Lag entre soportes, se observa que la fase Lag del hongo es menor cuando crece en aserrín. Es decir, el hongo tarda en adaptarse 1.2 veces más en agrolita que en aserrín. El análisis de los datos mediante un ANOVA nos dice que si existe diferencia significativa entre soportes y el efecto está sobre el tiempo Lag.

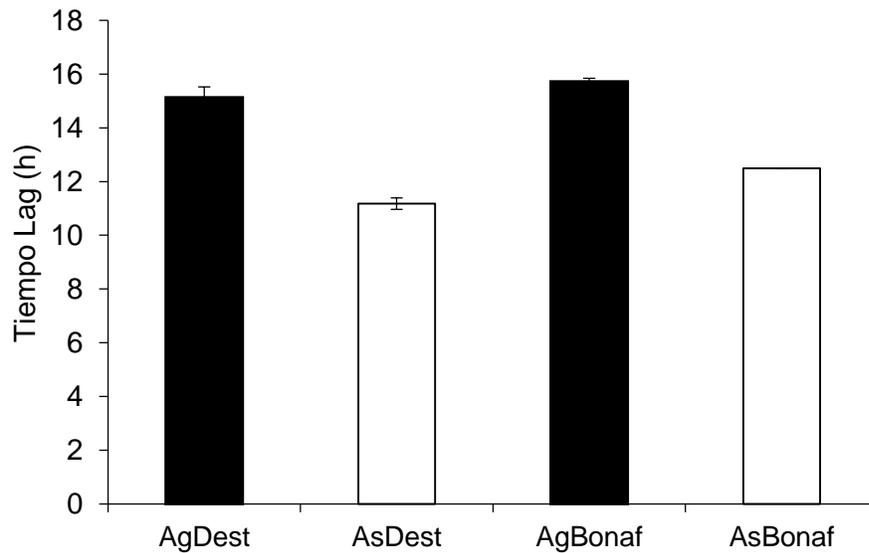


Figura 25 Tiempo de la fase de germinación (Lag) en función del tipo de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]) durante el cultivo de *A. niger* en FMS con agrolita (■) y aserrín (□) como soportes.

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): El soporte y el tipo de agua estos dos factores tienen efecto sobre el tiempo Lag.

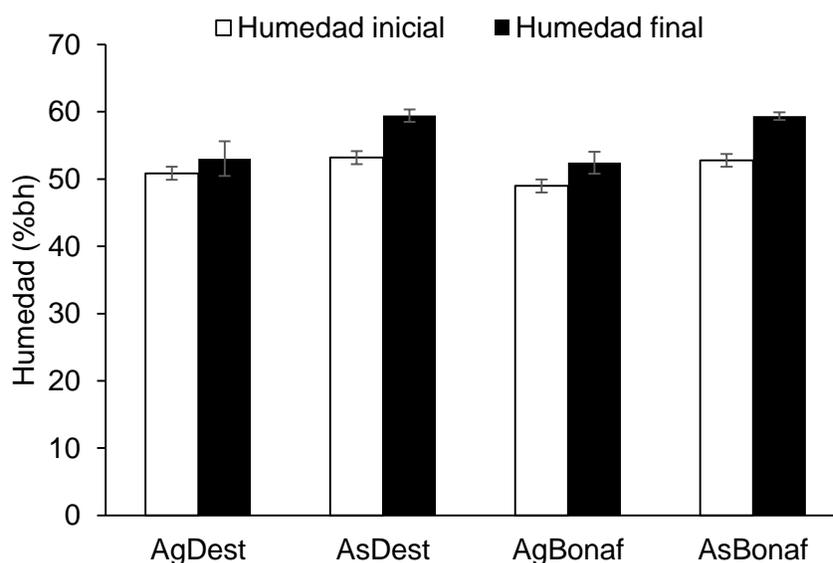


Figura 26 Humedad inicial y final en las columnas de FMS con agrolita (Ag) y aserrín (As) como soportes, utilizando diferente tipo de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]).

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): El soporte tiene efecto sobre la humedad final

La humedad inicial fue muy similar en ambos soportes independientemente del tipo de agua utilizada (**Figura 26**), encontrándose en un rango entre 48.9 y 53.2 %. En la humedad final si encontramos diferencias significativas debido al tipo de soporte, teniendo siempre una humedad final en aserrín mayor que en agrolita. Este comportamiento se observó en los capítulos anteriores.

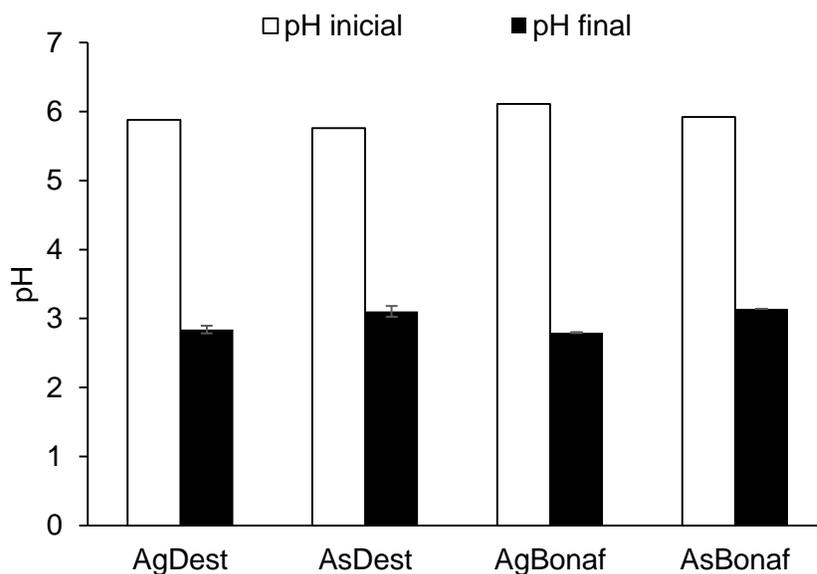


Figura 27 Valores iniciales y finales de pH en las columnas de FMS con agrolita (Ag) y aserrín (As) como soportes, utilizando diferente tipo de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf])

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): El soporte tiene un efecto sobre el pH final

En la **Figura 27** se observa que al inicio de la fermentación el pH fue de 5.9 ± 0.1 , sin diferencias significativas entre los dos tipos de agua evaluados. Al final de la fermentación, el pH registró una caída drástica; sin embargo, debido a que no se realizó una cinética del pH durante la fermentación, no es posible saber en qué tiempo ocurre la caída y, por lo tanto, determinar si el pH influyó en los cambios de la duración de la fase Lag en función del soporte. Mediante un ANOVA se demostró que si existen diferencias significativas entre soportes en el pH final.

6.11 Producción de CO_2 y consumo de O_2

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en la fase de crecimiento representada por la máxima tasa de producción de CO_2 y de consumo de O_2 , que ocurre a continuación de la fase de germinación (Lag). Este máximo valor corresponde al final de la tasa de aceleración en la producción de CO_2 y consumo de O_2 . Para cada tipo de agua, las máximas tasas de producción y consumo de CO_2 y O_2 respectivamente se obtuvieron en el

mismo tiempo de cultivo. Es importante reiterar que estos valores se obtienen en la primera etapa de crecimiento y, por consiguiente la producción de CO₂ es debida exclusivamente al carbono proporcionado por la glucosa.

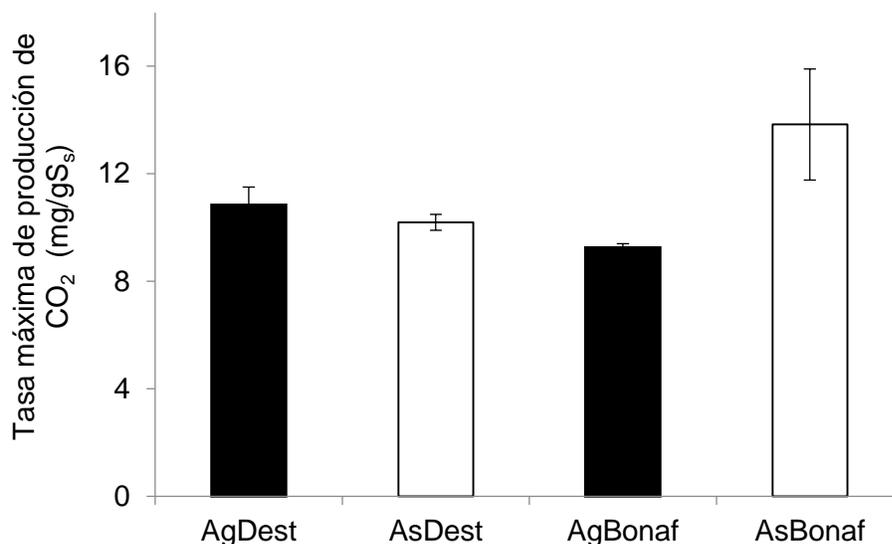


Figura 28 Tasas máximas de producción de CO₂ durante el crecimiento de *A. niger* en FMS usando diferentes tipos de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]), con agrolita (■) y aserrín (□) como soportes. Las barras indican el promedio de los valores obtenidos para dos unidades experimentales independientes.

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): El soporte tiene efecto sobre la tasa máxima de producción de CO₂.

Se observa (**Figura 28**) que para el caso de la agrolita, no hay diferencia si se trabaja con agua destilada o con agua Bonafont®, encontrando una tasa máxima de producción de CO₂ de 10.0 ± 1.1 mg CO₂/gS. Al analizar mediante un ANOVA los datos obtenidos nos indican que sólo hay diferencia significativa debido al efecto producido por los soportes y no hay efecto producido por el tipo de agua.

En la **Figura 29** se observan las tasas máximas de consumo de O₂ utilizando agrolita y aserrín como soportes, evaluando dos tipos de agua. No hubo diferencia significativa entre soportes ni entre los tipos de agua evaluadas, las tasas de producción de CO₂ y consumo de O₂ fueron muy similares en todos los casos.

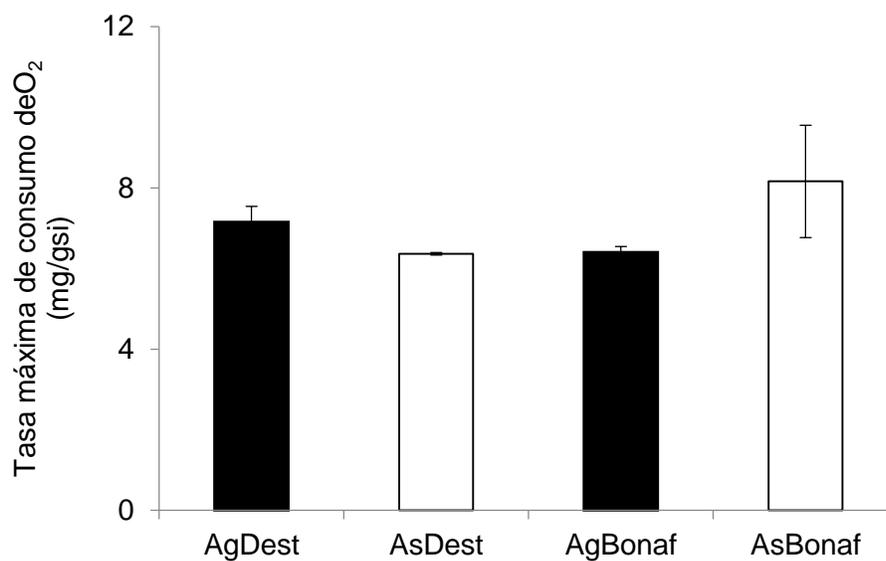


Figura 29 Tasas máximas de consumo de O₂ durante el crecimiento de *A. niger* en FMS usando diferentes tipos de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]), con agrolita (■) y aserrín (□) como soportes. Las barras indican el promedio de los valores obtenidos para dos unidades experimentales independientes.

Análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$): No hay efecto por factores sobre el consumo de Oxígeno.

Los perfiles del coeficiente respiratorio resultaron similares en los tratamientos evaluados, independientemente del soporte y el tipo de agua manteniéndose en un valor de 1.04 ± 0.01 (Figura 30).

Los resultados obtenidos indican que el tipo de agua (Bonafont® y destilada) no influyen en los parámetros asociados al crecimiento de *A. niger*. Pero el soporte sigue siendo un factor que influye en el crecimiento de este microorganismo.

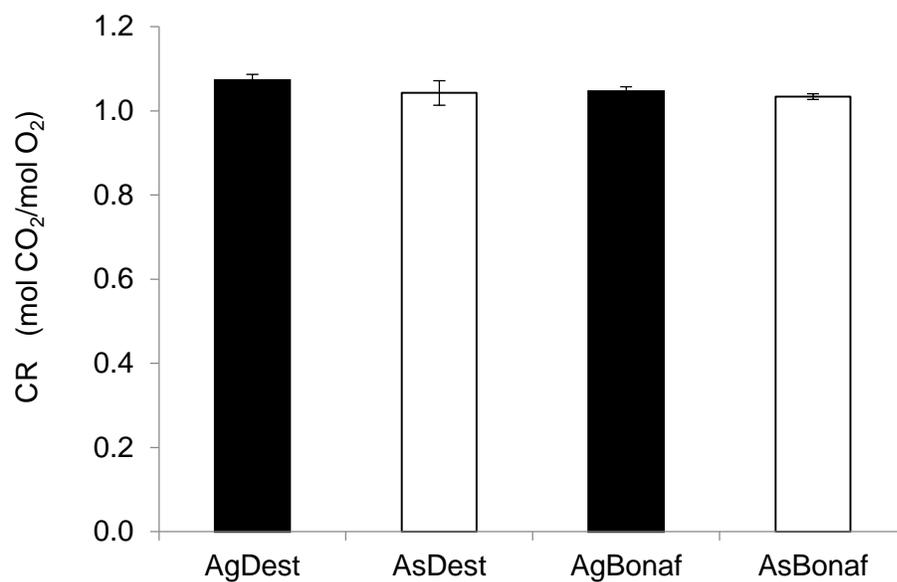


Figura 30 Coeficiente respiratorio global del cultivo de *A. niger* en FMS usando diferentes tipos de agua (destilada [Dest] y Bonafont® [Bonaf]), con agrolita (■) y aserrín (□) como soportes. Las barras indican el promedio de los valores obtenidos para dos unidades experimentales independientes.

7 CONCLUSIONES

- Los soportes tienen diferencias significativas en la fuerza de interacción con el agua, esto fue comprobado con el modelo de Henderson, esto nos llevó desde un principio realizar una estrategia experimental que nos permitió evaluar el efecto del tipo de soporte sobre la fisiología de *Aspergillus niger*.
- Determinamos el efecto de la concentración de nutrientes sobre el crecimiento de *A. niger* en aserrín y en agrolita, aumentando la concentración de glucosa inicial. Los resultados obtenidos en los parámetros de crecimiento indican que hay diferencias significativas entre soportes, debidas al efecto que ejerce el soporte, la glucosa inicial en el medio y la interacción de estos dos factores.
- Determinamos el efecto de la relación C/N sobre la fisiología de crecimiento de *A. niger*. Los datos obtenidos en los diferentes parámetros de crecimiento indican que hay una diferencia significativa entre soportes en las relaciones C/N más pequeñas, debidas al tipo de soporte. Sin embargo al aumentar la relación C/N, los valores de parámetros de crecimiento no tuvieron diferencias significativas.
- Determinamos el efecto del tipo de agua sobre la fisiología de *Aspergillus niger*, para saber si obteníamos diferencias en la relación C/N 65.6 debido a la calidad de agua. Los resultados en los parámetros de crecimiento indican que las diferencias obtenidas sólo se deben al efecto que produce el soporte y no al que produce el tipo y calidad de agua.

8 BIBLIOGRAFÍA

Acuña M., Gutiérrez M., Viniegra G., Favela E. 1994. Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. *Biotechnology letters*, 16 (1):23-28.

Acuña M., Gutiérrez M., Viniegra, G., Favela, E. 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*,43:808-814.

Abarca María Lourdes. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana Micología*, 17:S79-S84.

Aguilar C., Augur C., Favela E., Viniegra G. 2001. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26:296-302.

Baños J., Tomasini A., Szakács G., Barrios, J. 2009. High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: An artificial inert support. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108 (2):105–110.

Barrios J., Tomasini A., Viniegra G., López J. 1988. Penicillin production by solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*,10:793-798.

Bellon-Maurel V., Orliac O., Christen P. 2003. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*, 38:881-896.

Bures S., Gago M., and Martínez F. 1997. Water characterization in granular materials. *Acta Hort*, 450:389-396.

Castilho L., Medronho R., Alves T. 2000. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*,71:45-50.

Bitton G., & Marshall K. C. 1980. Adsorption of microorganisms to surfaces. *John Wiley and Sons, Inc.* 105-144.

Córdova L. J. 1994. Tesis de Maestría, Efecto de la concentración de glucosa en el crecimiento y la producción de ácido cítrico en *Aspergillus niger* por fermentación en estado sólido. UAM.

Córdova L., Gutiérrez M., Huerta S., Saucedo G., Favela E. 1996. Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation. *Biotechnology techniques*, 10(1):1-6.

- Christen P., Angeles N., Gorzo G., Farres A. and Revah S. 1995. Microbial lipase production on polymeric resin. *Biotechnology techniques* . 9,(8):597-600.
- Desgranges C., Vergoignan C., Lereec A., Riba G. and Durand A.. 1993. Used of solid-state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of European corn borer. *Biotechnology advances*. 11(3):577-587.
- Deschamps F. and Huet M. 1985. Xylanase production in solid-state fermentation: a study of its properties. *Applied microbiology and Biotechnology*, 22(3):177-180.
- Díaz G., Soriano J., Augur C. and Viniegra G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26(5), 271-275.
- Doelle H.W., Mitchell D. and Rolj C.1992. Solid Substrate Cultivation. *Elsevier Science Publishers*. Ltd. England.
- Dunlap F. 1914. Density of wood substance and porosity of wood. *Journal of agricultural research*.11(6).
- Esparza E. Yolanda. 2012. Producción de etanol por *Zymomonas mobilis* en fermentación en medio sólido. Tesis para obtener el grado de maestro. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México D.F.
- Favela E., Córdova J., García M. and Gutierrez M. 1998. Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*, 33(2):103-107.
- Foo K. and Hameed B. 2010. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal* 156(1): 2-10.
- García, R. y Prado, A. 2012. Métodos de conservación de cepas de la Planta de Fermentación en Medio Sólido (Pp4), 7-14.
- Geankoplis C. J. 1998. Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias. Tercera edición. Compañía editorial Continental, S.A. de C.V. México, 593-601.
- Gelmi, C., Perez, R., Agosin, E. 2002. Modelling *Gibberella fujikuroi* growth and GA₃ production in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 37(9):1033–1040.
- Gelmi C., Perez, R., González M. and Agosin E. 2000. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. *Process Biochemistry*, 35(10):1227–1233.
- Gervais P., Marechal, P., Molin, P. 1996 Water relations of solid state fermentation. *Journal Science Ind. Res.* 55: 343–357.

Gervais P. and Molin, P. 2003. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2), 85-101.

Grajek W. 1987. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology* 26(2):126-129.

Grajek W. 1987. Production of D-xylanases by thermophilic fungi using different methods of culture. *Biotechnology letters*, 9(5):353-356.

Gutiérrez M., Córdova J., Auria R., Revah S. and Favela E. 1995. Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnology letters*, 17(2):219-224.

Harms H., Schlosser D. and Wick L. 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Applied and Industrial Microbiology. Natures Reviews Microbiology*, 9(3):177-192.

Henderson S. M. 1952. A basic concept of equilibrium moisture. *Agricultural Engineering*, 33:29–32.

Hölker U., Höfer M. and Lenz, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2):175–186.

Hu T., Zhou Y., Dai L., Wang Y., Liu D., Zhan J. and Liu, H. 2011. Enhanced cellulase production by solid state fermentation with polyurethane foam as inert supports. *Procedia Engineering*, 18:335 – 340.

Huitrón C., Saval and Acuña M. 1984. Production of microbial enzymes from Agroindustrial By-products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 437(1): 110-114.

Kaletka A. and Górnicki K. 2007. Influence of equilibrium moisture content data on results of vegetable drying simulation. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57 (2[A]):83-87.

Lareo C., Sposito A., Bossio A. and Volpe D. 2006. Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. *Enzyme and Microbial Technology*, 38 (3):391–399.

Larroche C. and Gros J. 1989. Strategies for spore production by *Penicillium roquefortii* using solid-state fermentation techniques. *Process Biochemistry*, 24(3): 97-103.

Li Y., Peng X. and Chen H. 2013. Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(4):493-498.

Liu Y., Li C., Wang S. and Chen W. 2014. Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* cultured via solid state fermentation for biodiesel production: Optimization and kinetics. *Applied Energy*,113:713-721.

Lonsane B. and Ramesh M. 1990. Production of bacterial thermoestable α -Amylase enzymes by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production. *Advances in Applied Microbiology*, 35:1-56.

Mantanis G., Young R. and Rowell R. 1994. Swelling of wood. *Wood Science and Technology*, 28(2):119– 134.

Mazotto A., Couri S., Damaso M. and Vermelho, A.. 2013. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85:189-195.

Mitchell D., Berovic M. y Krieger N. 2000. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 68:65-135.

Mitchell D., Berovic M. and Krieger N. 2002. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review*, 8:183-225.

Mitchell D., Berovic, M. and Krieger N. 2006. Solid- state fermentation bioreactor fundamentals: Introduction and overview. *Springer Berlin Heidelberg*, 1-12.

Murado M., González M., Torrado A. and Pastrana L. 1997. Amylase production of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. *Process Biochemistry*, 32(1):35-42.

Nampoothiri K. and Pandey A.. 1996. Solid-state fermentation for L-glutamic acid production using *Brevibacterium* sp. *Biotechnology letters*, 18(2):199–204.

Narahara H., Koyama Y., Yoshida T., Atthasampunna P. and Taguchi H. 1984. Control of water content in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Journal of fermentation technology*, 62(5):453-459.

Ooijkaas L., Weber F., Buitelaar R., Tramper J., and Rinzema A. 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*, 18(8);356-360.

Oriol E., Raimbault M., Roussos S. and Viniegra G., 1988. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(5-6):498-503.

Oostra J., Le Comte E., Van den Heuvel J., Tramper J. and Rinzema A. 2001. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 74(1):13-24.

Ozawa S., Sato K. and Endo I. 1996. Repeated batch production of alkaline protease by solid-state fermentation using urethane foam as carriers. *Bioprocess Engineering*, 14(2):63-68.

Pandey A. 1992. Recent Process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 27(2):109-117.

Pandey A. 1994. Solid-state fermentation: An overview. New Delhi: *Wiley Eastern Publisher*, 3-10.

Pandey A., Benjamin S., Soccol C., Nigam P., Krieger N. and Soccol V. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and applied biochemistry*, 29(2):119-131.

Pandey A., Fernandes M., and Larroche C. 2008. Current Developments in Solid-state Fermentation. *Springer Science and Business Media*.

Pérez N., Torrado A., López C. and Pastrana L. 2003: Main Characteristics and Applications of Solid Substrate Fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*, 2(3):343-350.

Petkovska M. 2014. Discrimination between adsorption isotherm models based on nonlinear frequency response results. *Adsorption*, 20(2-3):385-395.

Pintado J., Lonsane B., Gaime I. and Roussos S. 1998. On-line monitoring of citric acid production in solid-state culture by respirometry. *Process Biochemistry*, 33(5):513-518.

Pirt S. J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. *Blackwell Scientific Publications*.

Raimbault M. and Alazard D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid state fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 9(3):199-209.

Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3):26-27.

Rathbun B. and Shuler M. 1983. Heat and mass transfer effects in static solid substrate fermentations: Design of fermentation chambers. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(4):929-938.

Rodríguez S. and Couto S. 2012. A promising inert support for laccase production and decolouration of textile wastewater by the white-rot fungus *Trametes pubescens*. *Journal of hazardous materials*, 233:58– 162.

Roussos S., Olmos A., Rimbault M., Saucedo G. and Lonsan B. 1991. Strategies for large scale inoculum development solid state fermentation system: Conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Techniques*, 5(6):415-420.

Roussos S. and Perraud I. 1996. Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. *Fonds documentaire ORTISM*, 341-348.

Samson Robert A. 1992. Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. In *Aspergillus: Biology and industrial applications* (Eds Bennett, J.W. & Klich, M.A.). Boston, Butterworth-Heinemann, 355–390.

Samson R. A. 1994. Taxonomy- Current concepts of *Aspergillus* Systematics. In *Aspergillus. Biotechnology handbooks*, 1-22.

Sánchez J. M. 2004. Efecto de la composición del medio de cultivo en el metabolismo de *Aspergillus niger* 10 en fermentación en medio sólido. Tesis para obtener el grado de maestro. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Saucedo G., Gutierrez M., Bacquet G., Rimbault M. and Viniegra G. 1990. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(8):802-808.

Saucedo G., Lonsane B., Navarro J. and Roussos S. 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(5):580-582.

Sangsurasak P. and Mitchell D. 1995. Incorporation of death kinetics into a 2-D dynamic heat transfer model for solid state fermentation. *Journal of Chemical and Technology and Biotechnology*, 64(3):253–260.

Schutyser M., Weber F., Briels W., Rinzema A. and Boom R. 2003. Heat and water transfer in rotating drum containing solid substrate particles. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(5):552-563.

Silman R., Bothast R. and Schisler D. 1993. Production of *Colletotrichum truncatum* for use as a mycoherbicide: effects of culture drying and storage on recovery and efficacy. *Biotechnology Advances*, 11(3):561-575.

Silman R., Nelsen T. and Bothast R. 1991. Comparison of culture methods for production of *Colletotrichum truncatum* spores for use as a mycoherbicide. *FEMS microbiology letters*. 79(1):69-74.

Solis S., Favela E., Viniegra G., Gutierrez M. 1993. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(1):36-41.

Solis S., Favela E., Gutiérrez M., Roussos S., Saucedo G., Viniestra G. 1996. Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(3):257-260.

Subramaniyam R. and Vimala R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International journal of science and nature* 3(3):480-486.

Tang B., Xu H., Xu Z., Xu C., Xu Z., Lei P., Qiu Y., Liang J. and Feng X. 2015. Conversion of agroindustrial residues for high poly (γ -glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NX-2 via solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 181:351–354.

Tomasini A., Fajardo C., Barrios J. 1997. Gibberellic acid production using different solid-state fermentation systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(2):203-206.

Torrado A., González M. and Murado M. 1998. pH regulation in solid state culture through the initial ratio between oxidized and reduced sources of nitrogen. A model applicable to the amylase production by *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology techniques*, 12(5):411-415.

Torres M. Teresa. 2013. Obtención de ácido clorogénico de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México D.F.

Trejo M., Oriol E., López A., Roussos S., Viniestra G. y Raimbault M. 1991. Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* - por fermentación sólida sobre soporte. *Micology Neotropical Applied*, 4: 49-62.

Treybal R. E.. 1988. Operaciones de Transferencia de Masa. *Segunda edición. McGraw Hill. México*, 723-750.

Viccini G., Mitchell D. and Krieger N. 2003. A Model for Converting Solid State Fermentation Growth Profiles Between Absolute and Relative Measurement Bases. *Food Technology and Biotechnology* 41(3):191–201.

Volke T., Gutiérrez M. and Favela E. 2006. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. *Bioresource Technology*, 97(14):1583–1591.

Weber F., Tramper J. and Rinzema, A. 1999. A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minutans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. *Biotechnology and bioengineering*. 65(4):447-458.

Zhu Y., Smits J., Knol W. and Bol J. 1994. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as carrier. *Biotechnology Letters*. 16(6):643-648.

Referencia de patente:

Solicitud de patente MX/a/2013/004638, 2013. Sistema de respirometría con administración remota para el monitoreo en línea de la concentración de CO₂ y O₂ y flujo de los gases de salida en procesos biológicos. Cuyos inventores son Jesús Gerardo Saucedo Castañeda, Ernesto Favela Torres, Gustavo Viniegra González, María Teresa Torres Mancera, Arturo Alejandro Figueroa Montero y Gabriel Rosales Zamora.

Referencia de ligas de internet:

Taxonomía de *Aspergillus niger*. Recuperado el 6 de Julio de 2015 de:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5061&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

9. ANEXO

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
FML	Fermentación en Medio Líquido
FMS	Fermentación en Medio Sólido
C/N	Relación Carbono-Nitrógeno
GC	Glucosa Consumida
CO ₂	Dióxido de Carbono
O ₂	Oxígeno
CR	Coeficiente Respiratorio
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
g	gramos
h	horas
Aw	Actividad de agua
Mg	miligramos
MSI	Materia seca inicial
IIBM	Instituto de Investigaciones Biomédicas
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
S _s	Soporte seco
mL	mililitros
%v/v	por ciento volumen/volumen
g _{agua}	Gramos de agua
gS _s	Gramos de soporte seco
CRA	Capacidad de Retención de Agua
EPU	Espuma de poliuretano
PDA	Medio Papa-dextrosa-agar
Ag50	Agrolita con 50 g glucosa/L
Ag100	Agrolita con 100 g glucosa/L
Ag150	Agrolita con 150 g glucosa/L
Ag200	Agrolita con 200 g glucosa/L
Ag250	Agrolita con 250 g glucosa/L
Ag300	Agrolita con 300 g glucosa/L
AgCN16.5	Agrolita con relación C/N=16.5
AgCN32.9	Agrolita con relación C/N=32.9
AgCN65.6	Agrolita con relación C/N=65.6
AsCN16.5	Aserrín con relación C/N=16.5
AsCN32.9	Aserrín con relación C/N=32.9
AsCN65.6	Aserrín con relación C/N=65.6
AgDest	Agrolita con agua destilada
AgBonaf	Agrolita con agua Bonafont ®
AsDest	Aserrín con agua destilada
AsBonaf	Aserrín con agua Bonafont ®

