



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**DESARROLLO DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA  
PARA EL HONGO *Trichoderma asperellum* Th204 EN UN  
FERMENTADOR DE LECHO FIJO**

**Fredy Mauricio Cruz Barrera**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería, Ingeniería Química y Ambiental  
Bogotá, Colombia

2014

**DESARROLLO DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA  
PARA EL HONGO *Trichoderma asperellum* Th204 EN UN  
FERMENTADOR DE LECHO FIJO**

**Fredy Mauricio Cruz Barrera**

Tesis presentada como requisito para optar al título de:

**Magister en Ingeniería Química**

Directora:

Ph.D. Martha Isabel Gómez Álvarez

Codirector:

Dr. Ing. Juan Carlos Serrato Bermúdez

Línea de Investigación:

Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Control Biológico de Plagas Agrícolas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá, Colombia

2014

*A Dios, Mi Amada Familia y a esa personita  
que siempre estuvo conmigo*

## **Agradecimientos**

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de CORPOICA y el de mis compañeros de trabajo que en una u otra forma me ayudaron durante el desarrollo del trabajo. Adicionalmente quiero agradecer a la empresa alemana PROPHYTA GmbH y especialmente a la investigadora Ute Eiben por la gran persona que fue conmigo al brindarme su amistad y su ayuda incondicional.

Quiero expresar mis sinceros agradecimientos a la directora, codirector y asesor de tesis la Dra. Martha Isabel Gómez, el Dr. Juan Carlos Serrato y el ingeniero Andrés Díaz García, quienes tuvieron una excelente dirección del trabajo y que siempre estuvieron dispuestos a dedicar preciado de sus respectivos tiempos para dar buen desarrollo y término a este trabajo tesis.

## Resumen

Se desarrolló un proceso de fermentación sólida para el hongo *Trichoderma asperellum* Th204 utilizando un fermentador de lecho fijo PROPHYTA® L05 mediante un diseño fraccionado (1/16) evaluando sobre su productividad (conidios/g.s.h) factores de la operación como la relación C/N, la temperatura de incubación, la relación de inoculación, la altura del lecho, la humedad del aire entrante, el caudal de aire y dos tipos de soporte inerte (espuma de poliuretano y cascarilla de arroz). Los factores C/N y el caudal de aire presentaron un efecto significativo sobre la productividad de Th204. El soporte espuma de poliuretano se seleccionó por presentar un significativo efecto sobre la productividad con un valor máximo de  $3,89 \times 10^7$  conidios/g.s.h en comparación a la obtenida con la cascarilla de arroz ( $2,83 \times 10^6$  conidios/g.s.h). Adicionalmente, con la espuma de poliuretano se encontraron condiciones favorables para el crecimiento de Th204 como menores gradientes de humedad del lecho, una menor caída de presión y la mayor  $\mu_{\max}$ . Por último, se generó un modelo de superficie de respuesta utilizando un diseño central compuesto, validando las condiciones óptimas (caudal de aire saturado  $0,9 \text{ m}^3/\text{h}$ , relación C/N 18,1, temperatura de incubación  $28^\circ\text{C}$ , altura de lecho 5 cm y una relación de inoculación de  $1,0 \times 10^7$  conidios/g) con tres fermentaciones obtenido un ajuste promedio del 91,2% respecto a la productividad esperada de  $3,16 \times 10^7$  conidios/g.s.h.

**Palabras clave:** Fermentación sólida, modelamiento, productividad, caída de presión, diseño central compuesto

## Abstract

Solid fermentation process by using a fixed bed fermenter PROPHYTA® L05 for the fungi *Trichoderma asperellum* Th204 was developed. A fractional design (1/16) on productivity of Th204 (conidia/d.s.h) by operating factors such as C/N ratio, incubation temperature, inoculum ratio, bed height, the inlet air humidity, airflow and two types of inert support (polyurethane foam and husk rice) was evaluated. The factors C/N and the airflow had a significant effect on the productivity of Th204. The polyurethane foam support was selected to present a significant effect on productivity with a maximum value of  $3.89 \times 10^7$  conidia/d.s.h compared to that obtained with husk rice ( $2.83 \times 10^6$  conidia/d.s.h). Additionally, by using polyurethane foam favorable conditions to growth Th204 as minor

bed moisture gradients, lower pressure drop values and higher  $\mu_{\max}$  were found. Finally, a response surface model by using a central composite design was generated and validated at optimal conditions (saturated airflow at 0.9 m<sup>3</sup>/h, C/N ratio at 18.1, incubation temperature at 28°C, bed height at 5 cm and an inoculum ratio of 1.0x10<sup>7</sup> conidia/g) with a mean adjustment of 91.2% compared to the expected productivity of 3.16x10<sup>7</sup> conidia/d.s.h.

**Keywords:** Solid state fermentation, modelling, productivity, pressure drop, central composite design

# Contenido

	Pág.
<b><u>Resumen</u></b> .....	<b>VI</b>
<b><u>Lista de figuras</u></b> .....	<b>XI</b>
<b><u>Lista de tablas</u></b> .....	<b>XII</b>
<b><u>Introducción</u></b> .....	<b>1</b>
<b>1. Marco teórico</b> .....	<b>5</b>
1.1 Fermentación en fase sólida .....	5
1.2 Aplicaciones de los procesos de SSF.....	7
1.2.1 Producción de enzimas.....	8
1.2.2 Producción de polímeros .....	8
1.2.3 Producción de biosurfactantes.....	9
1.2.4 Producción de bioplaguicidas y biofertilizantes .....	9
1.3 Biorreactores empleados en los procesos SSF .....	9
1.3.1 Fermentadores de bandejas (Tray biorreactor).....	10
1.3.2 Fermentadores rotatorios (Rotatory drum biorreactor - stirred-drum biorreactor).....	10
1.3.3 Fermentadores mezclados (Mixed bed biorreactor) y con aireación forzada (Forcefully aerated biorreactor) .....	11
1.3.4 Fermentadores de lecho fijo o empacado (Packed bed biorreactor) .....	11
1.4 Principales factores que inciden en los procesos SSF .....	13
1.4.1 El soporte sólido y/o sustrato .....	14
1.4.2 La Humedad y la actividad del agua .....	15
1.4.3 La temperatura .....	15
1.4.4 La aireación .....	17
1.4.5 El tamaño de partícula y la porosidad.....	17
1.4.6 La concentración y disponibilidad del sustrato .....	18
1.4.7 El pH.....	19
1.4.8 El inóculo .....	19
1.5 El caso de estudio: Fermentadores de lecho empacado fijo (PBB) .....	19
1.5.1 Gradientes de temperatura axiales en fermentadores PBB .....	21
1.5.2 La evaporación de la fase acuosa en fermentadores PBB.....	21
1.5.3 La caída de presión a través del sustrato en fermentadores PBB.....	22
1.6 Monitoreo de la condiciones en los procesos SSF .....	22
1.7 Fermentación sólida con soportes inertes .....	24
1.7.1 Tipos de soportes inertes.....	25
1.8 El género <i>Trichoderma</i> sp. y los procesos SSF .....	27
1.8.1 <i>Trichoderma asperellum</i> Th204 .....	28
<b>2. Materiales y métodos</b> .....	<b>29</b>
2.1 Equipo utilizado: Fermentador PROPHYTA® L05.....	29
2.2 Microorganismo.....	29

2.3	Determinación del soporte de crecimiento y los factores que tiene mayor efecto sobre la producción de <i>T. asperellum</i> Th204 en el fermentador de lecho fijo	
	PROPHYTA® L05 .....	30
2.3.1	Preparación del inóculo .....	30
2.3.2	Preparación del soporte inerte y de la suspensión nutritiva .....	30
2.3.3	Adecuación del fermentador PROPHYTA® L05 .....	31
2.3.4	Inoculación e incubación .....	32
2.3.5	Diseño experimental para la selección del soporte sólido y determinación de los factores críticos (efectos fijos) .....	32
	• Determinación de la productividad.....	34
	• Determinación del contenido de humedad.....	34
	• Monitoreo de consumo de O <sub>2</sub> y producción de CO <sub>2</sub> .....	34
	• Monitoreo de la Temperatura .....	35
	• Caída de Presión.....	36
2.4	Generación de un modelo de productividad de <i>T. asperellum</i> Th204.....	36
2.4.1	Diseño experimental utilizando los factores críticos.....	36
	Para la generación de un modelo de respuesta de la concentración final de <i>T. asperellum</i> Th204 en función de los factores críticos seleccionados (X1, X2), se realizó un diseño factorial compuesto central con tres repeticiones en el punto central, definiendo un espacio experimental rotacional con 11 tratamientos en el fermentador PROPHYTA® L05 (Tabla 2.3). .....	36
2.4.2	Validación del modelo estadístico.....	38
<b>3.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>39</b>
3.1	Determinación del soporte de crecimiento y los factores que tienen mayor efecto sobre la producción de <i>T. asperellum</i> Th204 en el fermentador de lecho fijo	
	PROPHYTA® L05 .....	39
3.1.1	Productividad .....	46
3.1.2	Contenido de humedad en el lecho .....	47
3.1.3	Producción de CO <sub>2</sub> .....	49
3.1.4	Consumo de O <sub>2</sub> .....	53
3.1.5	Perfiles de temperatura en fermentaciones utilizando espuma de poliuretano.....	53
3.1.6	Perfiles de temperatura en fermentaciones utilizando cascarilla de arroz.....	56
3.1.7	Caída de presión en el lecho .....	59
3.2	Generación de un modelo de respuesta de la concentración final de <i>T. asperellum</i> Th204 en función de los factores críticos .....	63
3.2.1	Influencia de los factores críticos sobre la productividad de <i>T. asperellum</i> Th204.....	63
3.2.2	Influencia de los factores críticos sobre el gradiente de humedad del lecho.....	67
3.2.3	Influencia de los factores críticos sobre el gradiente de temperatura axial promedio.....	69
3.2.4	Influencia de los factores críticos sobre el gradiente de concentración relativo.....	71
3.2.5	Influencia de los factores críticos sobre la caída de presión relativa.....	73
3.2.6	Influencia de los factores críticos sobre la velocidad específica máxima de crecimiento de <i>T. asperellum</i> Th204 .....	75
3.2.7	Validación del modelo estadístico.....	79
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>83</b>
4.1	Conclusiones.....	83
4.2	Recomendaciones .....	84



**5. Bibliografía ..... 85**

## Lista de figuras

Figura 1.1: Tipo de fermentadores en procesos SSF. _____	12
Figura 1.2: Regimenes de flujo de aire en un fermentador PBB _____	21
Figura 2.1: Esquema del fermentador de lecho fijo PROPHYTA® L05 _____	30
Figura 3.1: Diagrama de Pareto para los 7 factores evaluados, determinación de efectos fijos (Diseño fraccionado 1/16) _____	40
Figura 3.2: Detalle a nivel micro (10X) del crecimiento de <i>T. asperellum</i> Th204 sobre el soporte espuma de poliuretano _____	43
Figura 3.3: Detalle a nivel micro (10X) del crecimiento de <i>T. asperellum</i> Th204 sobre el soporte cascarilla de arroz _____	44
Figura 3.4: Detalle del crecimiento de <i>T. asperellum</i> Th204 en el soporte espuma de poliuretano (Fotografías tomadas al nivel superior del fermentador) _____	46
Figura 3.5: Detalle del crecimiento de <i>T. asperellum</i> Th204 en el soporte Cascarilla de arroz (Fotografías tomadas al primer nivel del fermentador) _____	47
Figura 3.6: Contenido final de humedad de la espuma de poliuretano en las corridas del diseño (1/16) _____	48
Figura 3.7: Contenido final de humedad de la cascarilla de arroz en las corridas del diseño (1/16) _____	49
Figura 3.8: Perfiles de producción de CO <sub>2</sub> de <i>T. asperellum</i> Th204 en el soporte espuma de poliuretano _____	50
Figura 3.9: Perfiles de producción de CO <sub>2</sub> de <i>T. asperellum</i> Th204 en el soporte Cascarilla de arroz (Diseño Fraccionado 1/16) _____	51
Figura 3.10: Perfil de producción de CO <sub>2</sub> de <i>T. asperellum</i> Th204 en el soporte natural a base de arroz _____	52
Figura 3.11: Perfiles de Temperatura: Tres niveles (1, 2,4); aire de salida para las fermentaciones en el soporte espuma de poliuretano _____	54
Figura 3.12: Perfiles de Temperatura del fermentador PROPHYTA® L05 para los tratamientos con espuma de poliuretano (T1, T2, T3 y T5) _____	56
Figura 3.13: Perfiles de Temperatura del aire de salida para las fermentaciones en el soporte Cascarilla de arroz _____	57
Figura 3.14: Perfiles de Temperatura del fermentador PROPHYTA® L05 para los tratamientos con Cascarilla de arroz (T4, T6, T7 y T8) _____	59
Figura 3.15: Caída de presión del aire a través del sustrato natural estándar y los soportes inertes cascarilla de arroz y espuma de poliuretano _____	62
Figura 3.16: Diagrama de Pareto y superficie de respuesta para la variable Log productividad, para los 2 factores críticos (relación C/N y caudal de aire) _____	65
Figura 3.17: Diagrama de Pareto y superficie de respuesta para la variable gradiente de humedad, para los 2 factores críticos (relación C/N y caudal de aire) _____	68
Figura 3.18: Diagrama de Pareto y superficie de respuesta para la variable gradiente de temperatura axial promedio, para los 2 factores críticos (relación C/N y caudal de aire) _____	70
Figura 3.19: Diagrama de Pareto y superficie de respuesta para la variable gradiente de concentración relativa, para los 2 factores críticos (relación C/N y caudal de aire) _____	72

Figura 3.20: Diagrama de Pareto y superficie de respuesta para la caída de presión, para los 2 factores críticos (relación C/N y caudal de aire) \_\_\_\_\_ 74

Figura 3.21: Perfiles de acumulación de CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación de *T. asperellum* Th204 \_\_\_\_\_ 76

Figura 3.22: Diagrama de Pareto y superficie de respuesta para la velocidad específica máxima de crecimiento, para los 2 factores críticos (relación C/N y caudal de aire) \_\_\_\_\_ 77

## Listado de tablas

Tabla 1.1: Tipos de fermentadores sólidos y productos..... 13

Tabla 1.2: Ejemplos de procesos SSF utilizando soportes inertes..... 25

Tabla 2.1: Factores y niveles evaluados en la fermentación sólida de *T. asperellum* Th204..... 33

Tabla 2.2: Tratamientos evaluados para la producción de *T. asperellum* Th204 (Diseño experimental fraccionado 1/16-Efectos fijos). ..... 33

Tabla 2.3: Niveles de los factores críticos (X1, X2) en los tratamientos evaluados en la fermentación sólida de *T. asperellum* Th204 (Diseño de experimentos Central Compuesto)..... 37

Tabla 3.1: Productividad de *T. asperellum* Th204 (conidios/g.s.h) después de 7 días (Diseño fraccionado 1/16). ..... 40

Tabla 3.2: Velocidades específicas máximas de crecimiento para los tratamientos del diseño fraccionado (1/16) ..... 52

Tabla 3.3: Temperatura promedio del lecho y gradientes promedio de temperatura axiales en las fermentaciones con espuma de poliuretano ..... 55

Tabla 3.4: Temperatura promedio del lecho y gradientes promedio de temperatura en las fermentaciones con cascarilla de arroz ..... 57

Tabla 3.5: Caídas de presión ( $\Delta P$ ) promedio y máxima encontradas en las fermentaciones del diseño fraccionado 1/16..... 60

Tabla 3.6: Productividad de *T. asperellum* Th204 en la fermentación sólida en el fermentador PROPHYTA® L05 (Diseño Central Compuesto). ..... 64

Tabla 3.7: Gradiente de humedad del lecho de los tratamientos del diseño central compuesto..... 67

Tabla 3.8: Gradiente de temperatura promedio de los tratamientos del diseño central compuesto..... 69

Tabla 3.9: Gradiente de concentración relativo (%) de los tratamientos del diseño central compuesto..... 72

Tabla 3.10: Caída de presión relativo de los tratamientos del diseño central compuesto 74

Tabla 3.11: Velocidades específicas de crecimiento máximas ( $h^{-1}$ ) para <i>T. asperellum</i> Th204 en el fermentador PROPHYTA® L05 .....	76
Tabla 3.12: Validación de la combinación óptima para el crecimiento de <i>T. asperellum</i> Th204 en espuma de poliuretano.....	80
Tabla 3.13: Comparación de medios de cultivo en cuanto a los costos asociados por gramo seco de biomasa de <i>T. asperellum</i> Th204.....	81

# Introducción

En la actualidad, el control en cultivos de enfermedades, plagas y malas hierbas se realiza principalmente con un sin número de productos químicos, muchos de los cuales tienen un alto poder contaminante en el suelo y agua, así como riesgos en la salud pública (Pimentel, 2005). El uso de estos agentes químicos en la agricultura, fomentado por el sostenimiento de la población en crecimiento, podría agravar la situación ambiental mundial, lo que ha conllevado a que la producción de insumos como bioplaguicidas, promotores de crecimiento entre otros a base de microorganismos sea una respuesta potencialmente sostenible a esta problemática (Glare *et al*, 2012). Sin embargo, el mercado global de estos bioproductos a nivel mundial no supera el 5% comparado con productos de síntesis química. No obstante, con la mejora y el escalamiento de los procesos productivos, se podría fomentar la apropiación de estas alternativas biológicas que se estiman crezcan en un 12% para el año 2017 (Global Biopesticides Market, 2012).

Los procesos productivos de microorganismos con interés biológico suelen involucrar procesos de fermentación sumergida y fermentación sólida (SSF). Una de las técnicas de fermentación sólida mayormente utilizadas ha sido la utilización de biorreactores de lecho empacado, no obstante son relativamente pocos los estudios que involucran el análisis de la incidencia de los factores sobre el rendimiento final en escalas superiores a 16 litros. La información existente en muchos casos se encuentra bajo secreto industrial y raramente es publicada (Mitchell *et al*, 2006).

Diferentes estudios han demostrado como factor limitante en el escalamiento de procesos SSF la pobre remoción de calor producto de las actividades metabólicas del microorganismo (Mitchell *et al*, 2003), ocasionando problemas en el control de la temperatura y la humedad (gradientes), así mismo en la transferencia de oxígeno (Maurel *et al*, 2003; Santos *et al*, 2004). Los procesos de fermentación en estado sólido han utilizado en gran medida sustratos de origen vegetal (Prabhakar *et al*, 2005), estos materiales son generalmente lignocelulósicos con algún contenido de almidón,

provenientes de la agricultura como granos, caña de azúcar, frijoles y pulpas (Pandey, 1992). Los sustratos naturales poseen grandes desventajas, siendo la principal que la fuente de carbono hace parte de su estructura, lo que conlleva a que cuando el microorganismo crece, el medio sólido es degradado, dando como resultado cambios en características físicas del soporte como la porosidad. Estos cambios físicos del sustrato sólido reducen en la mayoría de los casos su capacidad de transferir calor y masa (Barrios, 2012; Manpreet *et al*, 2005; Barrios y Mejia, 1996). La utilización del arroz y otros cereales como la cebada, el frijol, la lenteja han sido parte de los procesos de fermentación en estado sólido (Pandey, 1992), estos materiales tienen un alto valor como fuente alimenticia, siendo imprescindible la investigación en el desarrollo de nuevos sustratos que sean inertes, económicos y que no compitan con la alimentación humana o animal. En los últimos años, ha crecido el interés por el desarrollo de medios de cultivo utilizando soportes inertes en donde los nutrientes están disueltos en una solución líquida definida que es absorbida en el soporte. Igualmente, se ha demostrado que la utilización de este tipo de soportes permite un mejor control del proceso, mayor reproducibilidad y facilidad para el modelamiento que con los soportes naturales (Ooijkaas *et al*, 2000; Chen, 2013).

Corpoica ha trabajado por más de 15 años en la producción de bioplaguicidas y promotores de crecimiento a base de hongos filamentosos como *Trichoderma* sp utilizando como sistemas de producción cuartos calientes o fermentadores de bandejas perforadas monitoreando condiciones como la temperatura y la humedad relativa (Cruz *et al*, 2011; Cruz, 2007). Sin embargo, estos procesos no han sido favorables en lo que se refiere a la utilización de los recursos naturales, ya que se han utilizado sustratos a base de cereales como arroz, avena y cebada entre otros, generando adicionalmente problemas en cuanto a la residualidad, homogeneidad y repetitividad de los procesos. Es así como surge la necesidad de profundizar en la investigación con los soportes inertes naturales o sintéticos que sean una alternativa sostenible a la utilización de sustratos naturales en procesos SSF y que sirvan para la producción masiva de microorganismos con interés biológico y finalmente, contribuir en los campos del modelamiento de los factores críticos del proceso y su optimización.

Recientemente en un proyecto de investigación conjunta entre Corpoica y la Universidad de Rostock en Alemania, se seleccionó la cepa *T. asperellum* Th204 por sus

características como solubilización de fósforo y promoción de crecimiento en plantas. Por tal razón se decidió seleccionar este microorganismo como modelo para estudiar la utilización de soportes inertes como alternativas para su producción y la evaluación de su comportamiento a nivel piloto en un fermentador de lecho fijo (PROPHYTA® L05), el cual permite el monitoreo de los gases de salida, la caída de presión y el control de la temperatura de incubación.

En el presente trabajo se evaluaron dos soportes inertes, uno natural como la cascarilla de arroz y otro sintético como la espuma de poliuretano, siendo los dos materiales económicos y de fácil acceso. Para el proceso de fermentación de *T. asperellum* Th204 en el fermentador PROPHYTA® L05 se evaluaron factores operacionales como el caudal de aire, la humedad del aire, la temperatura de incubación, la altura del lecho, la relación C/N y la relación de inoculación sobre la productividad de hongo y el comportamiento a nivel de gradientes de temperatura, de humedad del lecho, de concentración y caída de presión.

Por último, los objetivos del trabajo de investigación fueron el determinar el mejor soporte sólido inerte para el crecimiento de *T. asperellum* Th204, entre cascarilla de arroz y espuma de poliuretano. Así mismo, identificar los factores que tienen mayores efectos sobre la producción de conidios del hongo en el fermentador de lecho fijo (PROPHYTA® L05) y finalmente, generar un modelo que describa la productividad de los conidios del hongo en función de los factores críticos.





# 1.Marco teórico

## 1.1 Fermentación en fase sólida

Los procesos de fermentación en fase sólida o por sus siglas en inglés SSF (Solid State Fermentation), han existido de manera natural desde los inicios del planeta. La fermentación sólida existe en forma natural desde el comienzo de la vida, y es considerado el método más antiguo usado por el hombre para hacer que los microorganismos trabajen para él (Bhargav *et al*, 2007). Los procesos SSF han sido empleados de forma artesanal en los países del Sudeste Asiático, África y América Central desde hace siglos para la elaboración de alimentos a partir de cereales, siendo utilizado por los egipcios aproximadamente 2600 AC para hacer pan, así como para la preparación de salsa de soya en Asia más conocido como el proceso Koji (Pandey, 1992). Los procesos Koji consisten en el crecimiento de hongos como *Aspergillus oryzae* en arroz u otros cereales cocidos al vapor para obtener una preparación enzimática. Otros procesos SSF que han existido durante siglos incluyen los alimentos fermentados como tempeh, miso y pozol, el queso madurado con mohos (queso Roquefort) y los cultivos iniciadores para cervezas fermentadas (Moo Young *et al*, 1983). Desde sus inicios con los procesos SSF se busca aumentar el contenido proteico de los alimentos, mejorar las capacidades de conservación y cambiar características como el color, el olor o el sabor.

Hesseltine (1972) definió a la fermentación en estado sólido como la fermentación en donde el sustrato no es líquido. Posteriormente, en 1980 Raimbault propuso otra definición en donde enuncia que la fermentación sólida es aquella donde el sustrato no está disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua. Por otro lado, Lonsane *et al* (1985), definieron la fermentación sólida como el cultivo de microorganismos que se desarrollan sobre una superficie o en el interior de una matriz sólida en ausencia de agua. Autores como Auria *et al* (1995) definieron la fermentación sólida en un proceso de cuatro fases, la primera una fase gaseosa (estática o dinámica), un fase sólida insoluble

que contiene una fase estática líquida donde los nutrientes se encuentran solubles y por último una fase biológica formada por el microorganismo en crecimiento. Mitchell *et al* (2000) definieron la fermentación sólida como los procesos donde los microorganismos son cultivados en presencia de una fase acuosa en una concentración máxima de sustrato. Finalmente, una definición ampliamente acogida ha sido la expuesta por Pandey *et al* (2000) quienes definieron a la fermentación en estado sólido como “*El cultivo de microorganismos sobre un soporte sólido humedecido, que puede ser usado como fuente de carbono y de energía* “. En la actualidad se pueden distinguir dos clases de sistemas de fermentación sólida, la primera utilizando sustratos sólidos naturales y la segunda con soportes inertes impregnados con suspensiones de nutrientes (Barrios, 2012).

La principal diferencia entre las fermentaciones líquidas (SmF-Submerged fermentation) y las fermentaciones sólidas es la capacidad de mezcla. Para el caso de las fermentaciones líquidas, éstas son sistemas de reacción que en general están perfectamente mezclados, logrando en cada parte del reactor y en un tiempo dado la misma cantidad de microorganismo, nutrientes, y metabolitos (Gervais y Molin, 2003). El predominio actual de los procesos de fermentación sumergida (SmF) es evidente. Para la mayoría de los productos de fermentación, generados con este tipo de tecnologías se obtienen mejores rendimientos y son más fáciles de aplicar por su avanzado desarrollo en comparación a las tecnologías SSF.

Frente a las técnicas de fermentación sumergida, la fermentación en estado sólido presenta rendimientos más altos para el caso de hongos filamentosos, esto se atribuye principalmente a que la fermentación sólida simula el hábitat natural del microorganismo (Pandey, 2003). Asimismo, los procesos SSF son generalmente menos costosos al demandar menos energía que los procesos SmF (Pandey *et al*, 2008; Thomas *et al*, 2013; Holker y Lenz, 2005). En cuanto a la producción de esporas de hongos filamentosos como *Trichoderma* sp., las tecnologías de fermentación en estado sólido poseen ventajas sobre las tecnologías de fermentación sumergida, ya que en estas se obtienen mayores productividades y se producen conidios con una mayor estabilidad biológica, resistencia a la deshidratación, germinación y una pared celular más rígida (Pandey *et al*, 2008; Larroche *et al*, 1992; Feng *et al*, 2002; Holker y Lenz, 2005). El

crecimiento de los hongos filamentosos puede favorecerse en condiciones de SSF, ya que permite un mayor crecimiento de las hifas que penetran los espacios libres del sustrato colonizándolo completamente (Santos *et al*, 2004).

Los procesos SSF suelen utilizar como sustratos los productos de desecho o subproductos de la agricultura y del procesamiento de alimentos. Esos desechos y subproductos incluyen salvado de trigo, salvado de arroz, tortas de filtración en la industria de los aceites, orujo de manzana, orujo de uva, cáscaras de plátano, cáscaras de cítricos, paja de trigo, cascarilla de arroz, pulpa de café, pulpa de cítricos, pulpa de remolacha de azúcar, cáscara de café y melaza de remolacha azucarera entre muchos otros. En varios casos se han utilizado materiales con un alto valor agrícola y alimentario, tales como la leche cuajada, las remolachas forrajeras, el arroz y la yuca. Recientemente, ha surgido un gran interés en el uso de soportes inertes impregnados con soluciones nutritivas, como el bagazo de la caña de azúcar o como la espuma de poliuretano (Mitchell *et al*, 2006; Thomas *et al*, 2013).

## 1.2 Aplicaciones de los procesos de SSF

Las técnicas de los procesos SSF son utilizadas en varios bioprocesos como bioremediación, biodegradación de compuestos tóxicos, biotransformación de residuos agrícolas, así como en la producción de metabolitos secundarios como antibióticos, alcaloides, factores de crecimiento de plantas, enzimas, ácidos orgánicos, biocombustibles y bioplaguicidas (Pandey *et al*, 2008; Pandey, 1992; Hackett *et al*, 1999; Tuomela *et al*, 2000). Los procesos SSF se han aplicado ampliamente en la producción de bioproductos agroindustriales como bioplaguicidas (producción de esporas) (Feng *et al*, 2002), biofertilizantes y biocombustibles; en la industria química se ha usado para la producción de colorantes y aromas; en la industria de alimentos, para la producción de enzimas como  $\alpha$ -amilasa, fructosil transferasa, lipasas, pectinasas, ácidos orgánicos, ácido láctico, ácido cítrico y gomas de xantano (Pandey *et al*, 2008). Adicionalmente, los procesos SSF son usados en actividades de biodegradación, como el compostaje y el ensilaje (Thomas *et al*, 2013; Mohammad *et al*, 2012).

A pesar de este potencial, pocos de los muchos procesos de SSF que se estudian en el laboratorio llegan a escala de producción industrial. Esto se debe a la dificultad en el

control de las variables claves del proceso a gran escala en los biorreactores, y la dificultad para encontrar los valores óptimos para el crecimiento y/o la formación del producto (Dalsenter *et al*, 2005).

### 1.2.1 Producción de enzimas

La producción de enzimas usando los procesos SSF han contribuido en los campos de los biocombustibles, alimentos y fabricación de detergentes (Thomas *et al*, 2013). Muchos son los ejemplos que incluyen las tecnologías de fermentación sólida para la producción de enzimas, por ejemplo en la producción de amilasas por Roses y Guerra (2009) y Sharma y Satyanarayana (2012), utilizando *Aspergillus niger* y *Bacillus acidicola* respectivamente, celulasas como la  $\beta$ -glucosidasa (Singhania *et al*, 2010; Li *et al*, 2013) secretada por *Neurospora sitophila*, quitinasas por *Colletotrichum lindemuthianum* (Suresh *et al*, 2011), quitosanasas secretadas por el hongo *Trichoderma koningii* (Da silva *et al*, 2012), exo- y endo-glucanasas secretadas por *Aspergillus fumigatus* en salvado de trigo (Mahmood *et al*, 2013), polisacáridos como las inulinas producidas por *Kluyveromyces marxianus* utilizando cachaza como sustrato (Dilipkumar *et al*, 2013), invertasas por fermentación de *Aspergillus caespitosus* (Alegre *et al*, 2009), lacasas secretadas por *Pleurotus ostreatus* (Karp *et al*, 2012), lipasas producidas por *Trichoderma harzianum* utilizando residuos agroindustriales (Coradi *et al*, 2013) y por último fitasas extraídas de *Aspergillus niger* cultivado en cascaras de cítricos (Rodríguez *et al*, 2013) entre otras.

### 1.2.2 Producción de polimeros

La fermentación sólida ha sido explorada para la producción de biopolímeros como los exopolisacáridos (EPSs) (Seesuriyachan *et al*, 2012), polihidroxialcanoatos (PHAs) (Castilho Y Mitchell, 2009) y otros como el dextrano utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (Moussa Y Khalil, 2012). Los EPSs producidos por los microorganismos son de gran importancia industrial, siendo producidos por varios hongos y bacterias tales como las bacterias ácido lácticas (Thomas *et al*, 2013).

### 1.2.3 Producción de biosurfactantes

En los últimos años ha existido un gran interés en la aplicación de los procesos SSF en la producción de biosurfactantes debido a su amplia aplicabilidad en las áreas de la salud y el medio ambiente. Particularmente para la producción de surfactantes secretados por algunas levaduras, estos son surfactantes que tienen propiedades emulsificantes e inhibidoras del crecimiento de microorganismos (Thomas *et al*, 2013). También se ha usado en la producción de lipopéptidos producidas por *Bacillus amyloliquefaciens* para la remoción de derrames de aceite (Zhu *et al*, 2013).

### 1.2.4 Producción de bioplaguicidas y biofertilizantes

Son varios los estudios realizados utilizando la fermentación sólida para la producción de ingredientes activos (hongos, levaduras y bacterias) en la industria de los bioplaguicidas y biofertilizantes. Soccol *et al* (1997) desarrollaron un proceso SSF basado en varios sustratos agro-industriales para producir esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control biológico de plagas en plátano, caña de azúcar, soya y café. Desgranges *et al* (1993) también utilizaron los procesos SSF para producir *B. bassiana* para el control del barrenador europeo del maíz. Por otra parte, Chen *et al* (2011) describieron la producción de *Trichoderma harzianum* SQR-T037 como fertilizante y biocontrolador de *Fusarium* sp. en el cultivo del pepino así mismo, Zhang *et al* (2013) describieron la producción de un bioplaguicida a base de *Bacillus thuringiensis* usando residuos de cocina como sustrato

## 1.3 Biorreactores empleados en los procesos SSF

Sobre la base de las similitudes en el diseño y de operación en cuanto al mezclado y aireación, los biorreactores SSF se pueden dividir en 5 grupos. El primer grupo corresponde a los biorreactores donde el lecho es fijo y el aire circula alrededor de él, como los fermentadores de bandejas (Pandey *et al*, 2008; Dhillon *et al*, 2011; Vaseghi *et al*, 2013). El segundo grupo son los biorreactores donde el lecho es fijo o el mezclado es poco frecuente y el aire es forzado a atravesar el lecho, estos son los lechos empacados (Durand *et al*, 1993; Raimbault, 1998; Rodríguez *et al*, 2000; Fanaei y Vaziri, 2008; Karimi *et al*, 2014). En el tercer grupo, el mezclado del sustrato es continuo o intermitente

y el aire circula alrededor de él, dentro de estos están los tambores rotatorios (Prado *et al*, 2004; Rodríguez *et al*, 2013; Dhillon *et al*, 2013). Por último, los biorreactores donde el sustrato es agitado y el aire es forzado a atravesarlo son calificados como los biorreactores de lecho fluidizado y variaciones de los lechos agitados y aireados (Mitchell *et al*, 2006). También es considerado un quinto grupo que corresponde a los cuartos de incubación con el sustrato en bandejas o bolsas plásticas donde se puede controlar la temperatura y la humedad relativa (Durand, 2003; Leza *et al*, 2007).

### **1.3.1 Fermentadores de bandejas (Tray biorreactor)**

Los fermentadores de bandejas representan el tipo más sencillo de biorreactores que se utilizan para los procesos SSF. Este tipo de fermentadores han sido utilizados durante siglos en la producción alimentos fermentados tradicionales como el tempeh, miso, el koji y la salsa de soya (Durand *et al*, 1993; Mitchell *et al*, 2006).

La cámara del fermentador consta de un gran número de bandejas individuales una encima de la otra con un vacío entre ellas para la aireación. La altura del sustrato puede variar entre 5 y 15 cm. Este tipo de fermentadores pueden ser utilizados a escala de laboratorio o industrial. La bandeja puede estar construida de varios materiales, tales como madera, bambú, metal (el metal debe pintarse para evitar la corrosión), o plástico (Ali y Zulkali, 2011). En escala de laboratorio se pueden emplear cajas de Petri, frascos, bolsas de plástico y frascos Erlenmeyer.

No obstante, la principal desventaja de los fermentadores de bandejas es el alto requerimiento de espacio y una menor carga de sustrato por bandeja. Sin embargo, sigue siendo éste sistema de SSF el preferido para la producción de enzimas industriales, tales como fitasas, pectinasas y celulasas entre otras (Binod *et al*, 2013; Thomas *et al*, 2013).

### **1.3.2 Fermentadores rotatorios (Rotatory drum biorreactor - stirred-drum biorreactor)**

En este tipo de fermentadores, el sustrato es mezclado de forma continua o intermitente con una frecuencia desde minutos hasta horas, haciendo circular el aire en el interior del biorreactor. La agitación del sustrato se obtiene por dos métodos, el primero por rotación

del tambor del biorreactor (Rotatory drum biorreactor), o el segundo por agitación directa en interna del sustrato en el tambor (stirred-drum biorreactor) (Ali Y Zulkali, 2011) (Figura 1.1 B). Los fermentadores rotatorios son más costosos que los fermentadores de bandejas ya que requieren más mantenimiento y su uso se limita a los microorganismos que son tolerantes al esfuerzo cortante (Grajales *et al*, 2012). Sin embargo, ofrecen ventajas en el sentido que permiten el control de la mezcla del sustrato, evitando la canalización del aire, mediante la velocidad de rotación (normalmente muy baja) (Thomas *et al*, 2013).

### **1.3.3 Fermentadores mezclados (Mixed bed biorreactor) y con aireación forzosa (Forcefully aereated biorreactor)**

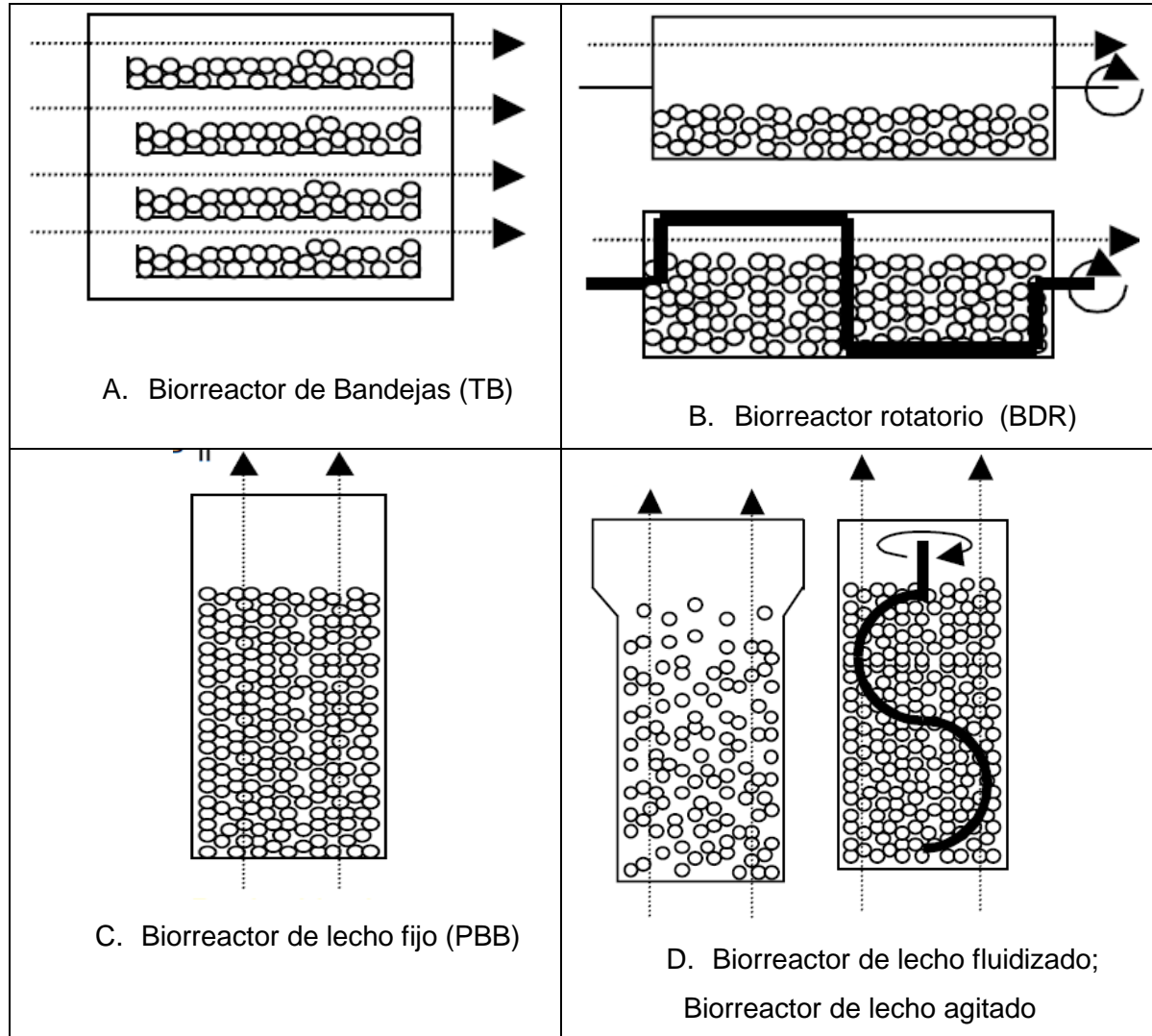
En este grupo de fermentadores, el sustrato es agitado mientras que el aire se sopla con fuerza a través de él. Este tipo de biorreactores típicamente puede ser operado de dos formas, de acuerdo con la manera de mezclar, los biorreactores que mezclan de forma continua o los biorreactores que mezclan intermitentemente. La combinación de la mezcla y la aireación forzada puede ayudar a evitar gradientes tanto de temperatura como de humedad. Es así como durante la mezcla es posible añadir agua al lecho del sustrato, reduciendo la necesidad de utilizar una alta tasa de evaporación como un mecanismo de enfriamiento. La elección entre la operación continua ó intermitente dependerá de la sensibilidad del microorganismo a las fuerzas de corte y a las propiedades de las partículas del sustrato tales como su resistencia mecánica y rigidez. Varios diseños cumplen con estos criterios, como los lechos fluidizados, el tambor oscilante y varios biorreactores-aireados y agitados (Ali y Zulkali, 2011) (Figura 1.1 D).

### **1.3.4 Fermentadores de lecho fijo o empacado (Packed bed biorreactor)**

Se consideran biorreactores de lecho fijo (Packed bed biorreactor) aquellos en donde el sustrato yace horizontalmente en una columna y el aire atraviesa el lecho de abajo hacia arriba ó en sentido contrario (Mitchel *et al*, 2006). Estos biorreactores tienen ventajas en relación con una mayor carga de sustrato por volumen de biorreactor y a la sencillez y precisión para medir los gases a la salida del proceso ( $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ), aspectos que han permitido desarrollar fácilmente modelos cinéticos de crecimiento (Thomas *et al*, 2013) (Figura 1.1 C).

Sobre la base de las consideraciones de eliminación de calor, la columna puede estar cubierta con una camisa de agua, como el tradicional biorreactor de lecho empacado (Figura 1.1 C), o usar una placa de transferencia de calor insertada en el lecho, como el fermentador tipo "Zymotis".

**Figura 1.1:** Tipo de fermentadores en procesos SSF.



(Adaptado de Mitchell *et al*, 2006).

En la tabla 1.1 se muestran algunos ejemplos de aplicación de los biorreactores SSF para diversos productos.



**Tabla 1.1:** Tipos de fermentadores sólidos y productos.

Tipo de Biorreactor	Sustrato	Microorganismo	Producto	Referencia
PBB	Cebada	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Ácido micofenólico	Alani <i>et al</i> , 2009
PBB	Bagazo de caña	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Inulinasa	Mazutti <i>et al</i> , 2010
PBB	Espuma de poliuretano	<i>Aspergillus niger</i>	Tanasa	Rodriguez <i>et al</i> , 2011
TB	Bagazo de caña	<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipasas	Vaseghi <i>et al</i> , 2013
TB	Arroz	<i>Aspergillus niger</i>	Pectinasas	Ruiz <i>et al</i> , 2012
RDB	Algas	<i>Aspergillus niger</i>	Fucoidanasas	Rodriguez Jasso <i>et al</i> , 2013
RDB	Pulpa de manzana	<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico	Dhillon <i>et al</i> , 2013

(Thomas *et al*, 2013)

## 1.4 Principales factores que inciden en los procesos SSF

En los procesos SSF, las condiciones como la temperatura, el pH, la humedad, la concentración del inóculo, la disponibilidad de los nutrientes, la tasa de aireación, el tamaño de partícula del soporte o sustrato afectan significativamente tanto el crecimiento como la formación del producto (Pandey *et al*, 2008). Igualmente, para alcanzar una producción eficiente es de gran importancia determinar la relación óptima entre las fuentes de carbono y nitrógeno (C/N), que permita mantener la actividad de los complejos enzimáticos como quitinasas, celulasas y proteasas entre otros, secretados por el microorganismo para la asimilación de los nutrientes del sustrato (Pandey, 2003). Por otra parte, en este tipo de procesos se debe brindar el suministro efectivo de oxígeno durante el crecimiento del hongo, el cual influye en la colonización completa del sustrato y posterior esporulación (Harman y Kubicek, 1998).

En el cultivo líquido agitado o fermentación sumergida (SmF) el control de las diferentes condiciones es relativamente simple, ya que estos sistemas son homogéneos desde el punto de vista de la concentración celular, nutrientes y productos. Sin embargo, en los sistemas sólidos se presentan algunos problemas con el mezclado, la transferencia de oxígeno, el intercambio de calor, el control de la humedad y el pH, debido principalmente a la heterogeneidad del sistema (Doelle *et al*, 1992, Pandey, 2003). Para el caso de

hongos filamentosos crecidos en SSF, los diferentes estudios no han permitido sintetizar claramente la dependencia de los parámetros fisicoquímicos y termodinámicos con el resultado final del proceso.

### 1.4.1 El soporte sólido y/o sustrato

Los sustratos para los procesos SSF se puede dividir en tres grupos, los sustratos ricos en almidón, los sustratos compuestos principalmente por celulosa o lignocelulosa y los sustratos que contienen azúcar soluble. Entre los sustratos de almidón se incluyen el arroz, la yuca, el salvado de trigo, salvado de arroz, harina de maíz y harina de plátano. En cuanto a los sustratos lignocelulósicos se incluyen la paja de trigo y de maíz, la pulpa de remolacha azucarera y la madera. Por último, los sustratos que contienen azúcares solubles incluyen el orujo, el sorgo dulce, la remolacha azucarera, los desechos de piña y la pulpa de café entre otros (Manpreet *et al*, 2005).

Por otro lado, los soportes pueden ser materiales naturales como el bagazo de caña y la cascarilla de arroz, ó sintéticos como la espuma de polietileno, espuma de poliuretano ó minerales porosos como la vermiculita. Los sustratos naturales poseen grandes desventajas en su uso, siendo la principal que la fuente de carbono hace parte de su estructura, lo que conlleva a que cuando el microorganismo crece, el medio sólido es degradado, dando como resultado cambios en las características físicas de la misma como la porosidad, y la capacidad de transferir calor y masa (Barrios y Mejia, 1996; Mitchell *et al*, 2006).

En contrataste, la utilización de soportes sólidos inertes permite un mejor control del proceso, mayor reproducibilidad y facilidad para el modelamiento que con los soportes naturales (Ooijkaas *et al*, 2000). Son varios los ejemplos de utilización de soportes inertes sólidos para el crecimiento de hongos, como *Lecanicillium lecanii* en espuma de poliuretano (Marin *et al*, 2008), *Colletotrichum truncatum* en vermiculita (Silman *et al*, 1993), *Beauveria bassiana* en granos de arcilla (Desgranges *et al*, 1993) y *Coniothyrium minitans* en bagazo de caña (Weber *et al*, 1999) entre otros.

Por último, al ser el sustrato el principal componente en los procesos SSF, estos determinan los efectos de transferencia (calor y masa) del proceso, afectan la elección de

del microorganismo o metabolito a producir y el diseño del equipo de fermentación (Chen, 2013).

### **1.4.2 La Humedad y la actividad del agua**

El papel del agua en los procesos de SSF es múltiple. El agua es el componente dominante en la composición de la biomasa, el agua sirve además de vehículo para las enzimas y los nutrientes, además de facilitar los intercambios gaseosos. El contenido de humedad del sustrato o del soporte en la fermentación sólida puede variar entre el 30 y 80% (Oriol *et al*, 1988), y depende del sólido utilizado, el microorganismo y el objetivo del proceso (producción de metabolitos o crecimiento de la biomasa).

Una humedad elevada en el sustrato causa una disminución de la porosidad del sustrato, una baja difusión de oxígeno y una mayor probabilidad de contaminación. Al contrario, una baja humedad conduce a un crecimiento limitado y disminuye la disponibilidad del sustrato (Oriol *et al*, 1988). El contenido de agua del soporte sólido está relacionado con la capacidad de retención de agua, valores que pueden alcanzar hasta 10 gramos de agua por gramo de materia seca en el caso de fibras de celulosa (Gervais y Molin, 2003) o 30 gramos de agua por gramo de soporte inerte en el caso de la espuma de poliuretano (Marin *et al*, 2008).

La actividad del agua ( $a_w$ ) es el parámetro que se ha utilizado para caracterizar el agua que realmente está disponible para el microorganismo. La actividad del agua se define como la relación entre la presión parcial del vapor de agua en la solución gaseosa en el estado de equilibrio, con el agua adsorbida en el sólido y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Por lo general, las bacterias necesitan un  $a_w$  de 0,90 a 0,99; las levaduras de 0,80 a 0,90, y los hongos necesitan 0,60 a 0,70 (Gervais y Molin, 2003).

### **1.4.3 La temperatura**

La temperatura se considera como uno de los factores críticos de control en los procesos SSF debido a la alta concentración del sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo compuesto por una fase sólida (sustrato o soporte) una fase líquida (agua, suspensión de nutrientes) y una fase gaseosa (aire,

volátiles). A causa de la baja conductividad térmica de los sustratos utilizados en procesos SSF y los pequeños contenidos de humedad, se generan problemas considerables con la transferencia de calor. Esta transferencia de calor depende también de otros parámetros del soporte sólido como el tamaño de partícula y la porosidad. Igualmente, de parámetros del proceso como el tipo de microorganismo (calor metabólico), flujo y temperatura de aire de entrada y tipo del material de fabricación del fermentador (Mitchell *et al*, 2002; Mitchell *et al*, 2006). El aumento descontrolado de la temperatura se traduce principalmente en una desaceleración de la actividad del microorganismo y la deshidratación del sustrato (Gutiérrez *et al*, 1995). El control de la temperatura se ha tratado a través de mecanismos de conducción y convección forzada. Por otro lado, los métodos de extracción de calor por convección requieren de elevadas tasas de aireación que con frecuencia deshidratan al medio. No obstante, se puede controlar la temperatura mediante la utilización del calor latente de vaporización del agua, que permite eliminar el calor metabólico de manera rápida y efectiva (Sargantanis *et al*, 1993).

Son muchos los trabajos que se han centrado en este aspecto, ya que el control de temperatura es uno de los problemas que se ha detectado desde siempre en los procesos SSF y que actualmente no tiene una solución clara. Se han reportado diversos gradientes de temperatura dentro del lecho de fermentación: 30°C cm<sup>-1</sup> (Rathbun y Schuler, 1983); 2,50°C cm<sup>-1</sup> (Raimbault, 1980); 4,50°C cm<sup>-1</sup> (Saucedo *et al*, 1990; González *et al*, 1990). Adicionalmente, no existe mucha información acerca de la magnitud del calor metabólico generado en un proceso SSF, sin embargo Rathbun y Schuler (1983) reportaron una producción hasta de 15,9 J/kg de materia seca, mientras que la velocidad de generación de calor es del orden de 3,3x10<sup>5</sup> J/kg.h de materia seca (Raimbault, 1980). En un proceso de SSF a nivel industrial el seguimiento y el control de la temperatura y la humedad son fundamentales por lo que se requiere tomar la humedad del medio, la humedad relativa del aire y la temperatura. Por otra parte, el tipo de reactor utilizado (con o sin agitación) juega un papel fundamental en la eficiencia del control de la temperatura, que se puede controlar normalmente por aire forzado a través del lecho, con la agitación o por evaporación de la humedad.

#### 1.4.4 La aireación

En la mayoría de los procesos de fermentación en estado sólido participan microorganismos aerobios, por lo tanto la aireación es un factor fundamental para el desarrollo del proceso. La aireación se utiliza para suministrar el oxígeno necesario, para extraer el CO<sub>2</sub> formado, así como para extraer el calor metabólico evolucionado (Chen, 2013; Mitchell *et al*, 2006). El flujo óptimo de aire debe tomar en consideración la naturaleza del microorganismo utilizado, los requerimientos de oxígeno para su crecimiento y/o la formación del producto deseado, la velocidad de generación de calor metabólico, la concentración crítica del dióxido de carbono y otros metabolitos volátiles, el espesor del sustrato sólido, entre otros. En varios casos la aireación de los procesos de fermentación sólida es más fácil que en las fermentaciones sumergidas, porque la superficie de contacto es mayor entre el aire y el líquido que está absorbido en las partículas (Viniegra *et al*, 2003).

#### 1.4.5 El tamaño de partícula y la porosidad

El tamaño de partícula está muy ligado a la transferencia de masa en el sistema de fermentación en estado sólido. La transferencia de masa puede ser intrapartícula e interpartícula (Moo Young *et al*, 1983). Para la transferencia de masa intrapartícula influye el tamaño, la porosidad, la forma del poro, y el tamaño de la partícula (Krishna, 2005). Mientras que en el segundo caso, el espacio interpartícula es lo más importante y éste es afectado por el tamaño de la partícula, su forma y la humedad (Bernard *et al*, 1992). Otro aspecto que influye en la transferencia de masa durante el proceso, es el cambio de estructura de las partículas del sustrato resultado de la acción de los microorganismos (Moo Young *et al*, 1983). En general, el tamaño de partícula en los procesos SSF tiende a disminuir como resultado de la degradación y actividad metabólica del microorganismo, asimismo la mayoría de los soportes sólidos son pre tratados por molienda, buscando disminuir el tamaño de partícula y aumentando el área superficial (Pandey *et al*, 2008).

En general una alta porosidad total significa más agua y aire entre los poros de la matriz sólida. Generalmente, poros con un diámetro equivalente menor a 0,002 mm son inactivos, ya que estos poros se ven afectados por la película de agua delimitada entre

las partículas, impidiendo el efecto capilar (las fuerzas intramoleculares predominan). Los poros con un diámetro equivalente de 0,002 mm hasta 0,2 se conocen como poros capilares de porosidad; ya que estos poros pueden mantener el agua por fuerzas capilares. Finalmente, los poros de ventilación son poros con diámetros equivalentes mayores a 0,02 mm (Chen, 2013).

Los valores de porosidad sólo reflejan la suma de agua y el espacio ocupado por el aire (gas) dentro de la matriz sólida, pero no las cantidades relativas de agua y aire (gas) de forma independiente. La relación de la porosidad de aireación (poros de ventilación) y la porosidad de retención de agua (poros capilares) conocido como R es un parámetro importante que refleja en la matriz las condiciones del agua y aire. Los valores R altos significan menos capacidad de retención de agua y una ventilación más grande, sugiriendo un exceso de ventilación que obliga a aumentar el suministro de agua en el proceso SSF. Por otro lado, si R es pequeño sugiere un volumen de aire pequeño y una gran capacidad de retención de agua en la matriz sólida, lo que conllevaría fácilmente a un almacenamiento excesivo de agua dentro de la matriz (Chen, 2013).

#### **1.4.6 La concentración y disponibilidad del sustrato**

El medio de cultivo debe tener todos los nutrientes necesarios de forma balanceada para favorecer el crecimiento y/o expresión metabólica del microorganismo. Las relaciones entre algunos de sus elementos son de particular importancia, por ejemplo, la relación carbono-nitrógeno (C/N) es relevante en la eficiencia de conversión energética y en la respiración celular (Cannel y Moo Young, 1980).

Al igual que en los cultivos sumergidos, la concentración del sustrato ejerce una influencia sobre el desarrollo del microorganismo. Sin embargo, esta influencia no está caracterizada en términos de limitación o inhibición como en los cultivos sumergidos; no obstante, los efectos de limitación pueden ser mayores en las fermentaciones sólidas, debido a la baja velocidad de difusión de los nutrientes en su fase líquida (Moo Young *et al*, 1983; Gervais y Molin, 2003). Se ha encontrado que la relación C/N tiene una gran importancia y su valor óptimo puede variar en el intervalo de 10 a 100 dependiente del proceso de fermentación y del microorganismo. Para el caso de hongos filamentosos como *Trichoderma* sp. diversos estudios con diferentes cepas han generado valores óptimos entre 6 y 26 (Aceh, 2007; Martin *et al*, 1997).

### 1.4.7 El pH

El pH es otra variable que afecta el desarrollo de los procesos SSF, al igual que lo hace en los cultivos sumergidos. Sin embargo, en el caso de la fermentación sólida, su control es prácticamente imposible, debido a la ausencia de instrumentos capaces de medir el pH en la capa de líquido que rodea el sólido (Mitchell *et al*, 2002). Sin embargo, algunos autores sugirieron el uso de un electrodo de pH estándar, después de suspender la muestra sólida en agua destilada (Durand y Chereau, 1988). El pH cambia por diferentes razones; normalmente disminuye por la secreción de ácidos orgánicos como el ácido acético y el ácido láctico durante el proceso, o por la hidrólisis de proteínas (Gervais y Molin, 2003). No obstante, Domenech (2000) demostró que la fuente de nitrógeno utilizada influye mucho en la tendencia que sigue el pH. Durante el proceso, el pH puede ser controlado mediante la adición de ácidos o bases en el agua suministrada para el enfriamiento del lecho (Durand y Chereau, 1988). Igualmente, el pH se puede mantener utilizando soluciones buffer, para el caso de hongos entre 3,5 y 6,0, para levaduras entre 4,5 y 7,0 y para bacterias entre 2 y 8 (Pandey *et al*, 2008).

### 1.4.8 El inóculo

Otro factor que influye en los procesos de SSF lo representa el tipo de inóculo y la forma de inoculación. En general se usan dos tipos de inoculantes, la microflora natural o endógena del sustrato o los inoculantes controlados. En los procesos de compostaje y de ensilado se prefiere la microflora natural, mientras que en los procesos de producción de enzimas y de alimentos fermentados se utilizan inóculos puros o inóculos mixtos. Por ejemplo, para la producción industrial de varios bioplaguicidas se utilizan las esporas o conidios de los hongos antagonistas como *Trichoderma* sp. ó entomopatógenos como *Lecanicillium* sp. *Metarhizium* sp. *Beauveria* sp. (Pandey *et al*, 2008).

## 1.5 El caso de estudio: Fermentadores de lecho empacado fijo (PBB)

Los fermentadores sólidos de lecho empacado se caracterizan principalmente por tener el sustrato o soporte fijo en una columna, con una sección transversal constante, en donde el aire es forzado a travesar el lecho comúnmente de abajo hacia arriba. La columna puede tener un tubo perforado insertado dentro de su centro axial que mejora el

suministro de aire. Adicionalmente, la columna del lecho puede estar enchaquetada o puede tener platos de transferencia de calor insertados (Mitchell *et al*, 2006).

Dentro de las principales variables de control en un fermentador sólido PBB se encuentran la velocidad de aireación y la temperatura del aire de entrada. Por otro lado, en los fermentadores PBB se han descrito tres fenómenos importantes que son afectados por la escogencia del diseño y las variables de control, como son:

- Los gradientes de temperatura axiales y radiales generados dentro del lecho.
- La evaporación de la fase acuosa del lecho (gradientes de humedad).
- La caída de presión a través del lecho.

Los últimos estudios en fermentadores de lecho empacado se han centrado en la optimización del proceso mediante el uso de diversos soportes inertes buscando mejorar la transferencia de calor y masa y promoviendo el flujo de oxígeno (Chen, 2013). Es así como Baños *et al* (2009) utilizaron la espuma de poliuretano (trozos de 1-3 cm<sup>3</sup>) con *Aspergillus terreus* para producir lovastatina en un fermentador PBB con un diámetro de 0,021 m y una longitud de columna de 0,15 m. Los resultados mostraron una producción de lovastatina significativamente superior a las encontradas con otras tecnologías de SSF y SmF.

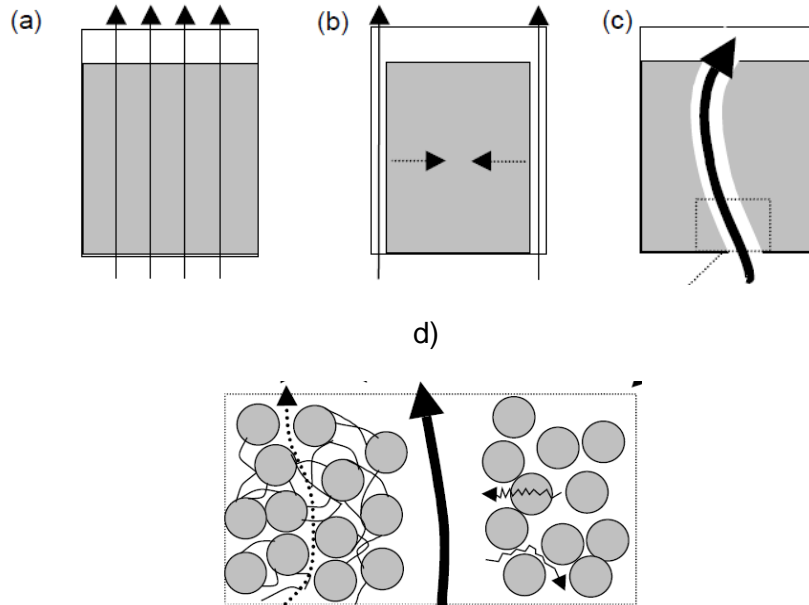
Otro fenómeno que es de gran importancia controlar en los fermentadores PBB es la canalización del aire o “Channelling” (Figura 1.2) este fenómeno puede ocurrir principalmente por las características del soporte, la fase de crecimiento del microorganismo, la velocidad de aireación y la velocidad de pérdida de humedad de la matriz.

En la Figura 1.2 se describe el fenómeno de la canalización donde (a) es la situación deseable, con un flujo uniforme a través de toda la sección transversal del lecho. En el caso (b) existe un flujo preferencial entre el lecho y la pared del fermentador cuando el lecho se aleja de la pared. En (c) existe un flujo preferencial a través de una “grieta” en el lecho. Finalmente, en (d) se muestra una vista a microescala de un canal, que describe cómo un flujo preferencial surge debido a dos fuentes de resistencia al flujo, como la trayectoria tortuosa a través del lecho y el hecho de que el espacio entre las partículas se llenan parcialmente con biomasa. En casos extremos de canalización, puede no existir



flujo a través de los espacios entre las partículas, por lo que la transferencia de materia se limita a la difusión y la transferencia de calor a la conducción (Tomado y adaptado de Mitchell *et al*, 2006).

**Figura 1.2:** Regimenes de flujo de aire en un fermentador PBB



### 1.5.1 Gradientes de temperatura axiales en fermentadores PBB

El flujo de aire a través del lecho en los fermentadores PBB es considerado mayormente como un flujo pistón, esta característica más la ausencia de un mezclado provocan la generación de gradientes de temperatura axiales. Estudios realizados por Ghildyal *et al.* (1994), Gowthaman *et al* (1993) y Weber *et al* (2002), sugieren que los gradientes de temperatura axiales aumentan linealmente con el aumento de la altura del lecho y con la disminución de la velocidad de aireación. El aumento de la temperatura del aire a medida que fluye a través del lecho aumenta la capacidad de transporte de agua en el aire y por lo tanto la evaporación se producirá, incluso si se utiliza aire saturado en la entrada (Mitchell *et al*, 2006).

### 1.5.2 La evaporación de la fase acuosa en fermentadores PBB

La evaporación es un mecanismo eficaz para la eliminación del calor metabólico producido durante el cultivo en un biorreactor de SSF a mayor escala. Sin embargo, la evaporación afecta la actividad de agua ( $a_w$ ) en el soporte ocasionando un efecto

adverso sobre la actividad del microorganismo. Adicionalmente, la evaporación también puede causar la contracción del soporte-sustrato, lo que conlleva a la canalización en el lecho del sustrato y por lo tanto a un pobre control del proceso. De esta forma, la reposición del agua pérdida es requerida. En los sistemas no mezclados como en los biorreactores PBB, esto es imposible, y como resultado se presentan fuertes gradientes de humedad. No obstante, aunque el contenido total de humedad del medio se puede medir, la detección y el control en línea son difíciles (Chen, 2013; Mitchell *et al*, 2006).

### **1.5.3 La caída de presión a través del sustrato en fermentadores PBB**

La caída de presión ha sido relativamente poco estudiada en los procesos SSF en general, sin embargo varias aproximaciones se han hecho en los fermentadores PBB. Se conoce que las variaciones en la presión entrante y saliente del aire pueden ser usadas como modelo para determinar las fases de crecimiento de los hongos, así mismo se pueden correlacionar con la evolución de CO<sub>2</sub> (Auria *et al*, 1995). El fenómeno de la caída de presión se ha descrito que surge debido a la viscosidad del aire, ya que este tiende a pegarse a las superficies de las partículas del lecho y de las biopelículas formadas, retardando el flujo de aire y ocasionado la pérdida de la energía por la fricción viscosa entre las diversas capas de aire. El aire debe fluir a través de la columna a una velocidad constante, por lo que esta resistencia al flujo no disminuye la energía cinética del aire, sino que disminuye su presión (Mitchell *et al*, 2006).

Caídas de presión del aire fueron estudiadas por Auria *et al* (1995) en la fermentación de *A. niger* sobre un soporte inerte (Amberlite IRA-900) en un fermentador PBB (2 cm diámetro interno y 8 cm de longitud de columna), determinado que la estructura sólida del soporte no cambia con caídas de presión de 0,4 mmHg. Recientemente, en fermentadores de 2,5 cm de diámetro y 20 cm de longitud, Karimi *et al* (2014) determinaron la caída de presión máxima durante el crecimiento de *A. niger* sobre salvado con valores cercanos a 80 mbar (60 mmHg) después de 40 horas de proceso.

## **1.6 Monitoreo de la condiciones en los procesos SSF**

A causa de que los procesos SSF involucran hasta cuatro fases, la determinación de los parámetros del proceso son generalmente difíciles. Contrario a lo que ocurre con las

fermentaciones sumergidas donde la concentración de la biomasa se puede monitorear continuamente, en los procesos SSF esta medición es casi imposible. La estimación del crecimiento de microorganismos en SSF tiene grandes dificultades, debido a que las células permanecen sujetas al soporte y son difíciles de separar completamente. Para el caso de hongos el problema se acentúa ya que el micelio penetra los poros del sustrato (Pandey, 2003).

Por lo tanto, el monitoreo del crecimiento del microorganismo en SSF es generalmente obtenido por métodos indirectos, mediante la determinación de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos ó glucosamina entre otras (Roussos y Gaime, 1996; Tomaselli *et al*, 2001). Recientemente, y en particular con fermentadores de lecho empacado la determinación de la velocidad de O<sub>2</sub> consumido y de CO<sub>2</sub> generado son considerados como los métodos más exactos para determinar el crecimiento de microorganismos en SSF (Pandey *et al*, 2008). La importancia en determinar el flujo de aire de entrada radica en que para los procesos de SSF en lechos empacados la transferencia de O<sub>2</sub> y calor ocurren simultáneamente, el aire se calienta unidireccionalmente a través del lecho, perdiendo su capacidad de enfriamiento, ocasionando gradientes de temperatura y evaporación excesiva de la humedad contenida en el sustrato (Saucedo *et al*, 1990).

La medición de estos gases de salida está directamente correlacionada con las actividades metabólicas del microorganismo y permiten determinar el rendimiento de la fermentación. La determinación de la biomasa por métodos indirectos se ha empleado por diferentes investigadores, como Sato *et al* (1983), Rodríguez *et al* (1986) y Desgranges *et al* (1991) quienes basaron su metodología en el metabolismo respiratorio de los microorganismos. El O<sub>2</sub> consumido y el CO<sub>2</sub> producido son el resultado de los procesos metabólicos a través de los cuales los microorganismos aeróbicos obtienen la energía necesaria para su crecimiento. Por tanto, estas actividades metabólicas están asociadas al crecimiento del microorganismo y pueden usarse para estimar la biomasa sintetizada. Por tal razón es posible relacionar en términos diferenciales el O<sub>2</sub> consumido ( $dO_2/dt$ ) y el CO<sub>2</sub> producido ( $dCO_2/dt$ ) tanto con el crecimiento como al mantenimiento celular.

Estos modelos de correlación son resueltos con el uso de técnicas numéricas y la solución de ecuaciones diferenciales. Con el empleo de computadoras y software adecuados y cromatógrafos o analizadores de gases (CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>) acoplados a la salida de

los gases del fermentador, es posible estimar de forma continua la biomasa sintetizada y, de esta manera, estimar el calor metabólico generado. Esta metodología a gran escala puede aplicarse en el control de parámetros de la fermentación en un proceso industrial. Otros parámetros que se pueden correlacionar con la actividad metabólica incluyen la evolución del pH y la caída de presión a través del lecho (Auria *et al*, 1995).

## 1.7 Fermentación sólida con soportes inertes

A pesar del potencial de los procesos SSF, algunos aspectos físicos relacionados con la heterogeneidad de los sustratos provocan graves limitaciones. Las desventajas de la utilización de sustratos naturales en los procesos SSF radica principalmente en tres aspectos: En primer lugar, el sustrato es la fuente de nutrición para el crecimiento de los microorganismos y, al mismo tiempo, proporciona un microambiente para el crecimiento microbiano, provocando la descomposición gradual del sustrato formando aglomerados, de esta forma la porosidad disminuye, generando limitaciones en la transferencia de masa y calor. Segundo, las impurezas en los sustratos se integran fácilmente en los extractos de fermentación, lo que no beneficia la separación y purificación de los productos. Por último, debido a la heterogeneidad del sustrato y su constante cambio se dificulta la medición precisa y reproducible de las variables, ocasionando problemas de control en el biorreactor y en los procedimientos de escalado (Chen, 2013).

Para superar estos problemas, es conveniente utilizar soportes que tengan propiedades bien caracterizadas y un mínimo de interacción con la biología del proceso. La utilización de soportes inertes contribuye a generar condiciones homogéneas en los fermentadores asimismo a disminuir la presencia de impurezas (Aidoo *et al*, 1982; Nampoothiri Y Pandey 1996). Se han reportado varias investigaciones en el campo de la fermentación sólida utilizando soportes inertes, como el descrito por Auria *et al* (1995) utilizando una resina Arberlita IRA 900 para el crecimiento de *Aspergillus niger*. Igualmente, la espuma de poliuretano (PUF) fue utilizada por Fujishima *et al* (1972) para la producción de enzimas por diferentes hongos. Kobayashi *et al* (1991) utilizaron PUF como vehículo inerte para la producción de glucoamilasa con *Aspergillus oryzae*, y sugirieron que la utilización de PUF en fermentación sólida permite alcanzar una composición del medio controlado y un mejor proceso de separación del producto. Se ha demostrado que la utilización de este tipo de soportes permite un mejor control del proceso, una mayor

reproducibilidad y facilidad para el modelamiento que con los soportes naturales (Ooijkaas *et al*, 2000).

### 1.7.1 Tipos de soportes inertes

En la actualidad, los soportes inertes utilizados en los procesos SSF se pueden dividir en tres tipos. Los naturales, como los lignocelulosicos bagazo de caña de azúcar, cascarilla de arroz (Mohan Kumar *et al*, 2013), residuos de yuca, coco, cacao y otros residuos agrícolas (Pandey *et al*, 2000). Los minerales como la vermiculita y la perlita (Meyrath, 1965). Por último los sintéticos, como las resinas de intercambio iónico (Richard *et al*, 1990), el poliestireno (Nagendra Prabhu y Chandrasekaran, 1995), el poliuretano (Marin *et al*, 2008; Lareo *et al*, 2006) y la silica (SiO<sub>2</sub>) (Peralta *et al*, 2001). En la tabla 1.2 se resumen algunos estudios de fermentación sólida utilizando soportes inertes.

**Tabla 1.2:** Ejemplos de procesos SSF utilizando soportes inertes

Soporte Inerte	Microorganismo	Producto	Referencia
Bagazo	<i>Aspergillus niger</i>	Ácido Citrico	Cahn (1935)
	<i>Aspergillus niger</i>	Pectinasa	Huerta <i>et al</i> (2004)
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina	Barrios <i>et al</i> (1993)
Vermiculita	<i>Aspergillus niger</i>	Amilasa	Meyrath (1965)
Cascarilla de arroz	<i>Cladosporium sp.</i>	L-Asparaginasa	Mohan Kumar <i>et al</i> (2013)
Poliestireno	<i>Vibrio costicola</i>	L-Glutaminasa	Nagendra Prabhu (1995)
	<i>Aspergillus niger</i>	Fitasa	Gautam <i>et al</i> (2002)
Espuma de Poliuretano	<i>Trichoderma viride</i>	Quitinasas	Marin <i>et al</i> , (2008)
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Proteasas alcalinas	Ozawa <i>et al</i> (1996)
	<i>Mucor bacilliformis</i>	Esporas	Lareo <i>et al</i> (2006)
	<i>Aspergillus terreus</i>	Lovastina	Baños <i>et al</i> (2009)
	<i>Acetobacter xylinum</i>	Celulasas	Weng y Chen (2010)
SiO <sub>2</sub> Xerogel	<i>Aspergillus niger</i>	Esporas	Peralta <i>et al</i> (2001)

#### Soporte inertes naturales

Los soportes inertes naturales son generalmente subproductos agrícolas los cuales en su mayoría son abundantes y fáciles de manejar, siendo menos costosos que otros sustratos utilizados en procesos SSF (Chen, 2013; Pandey, 2003). Sin embargo, presentan algunas desventajas como la baja porosidad con insuficientes estructuras

internas que perturban la aireación, la baja remoción de calor y la captación de nutrientes. Adicionalmente, estos soportes se pueden contaminar fácilmente. Es así como, utilizando bagazo de caña de azúcar Marin *et al* (2008) encontraron problemas de esterilización del sustrato, por problemas con el control de la temperatura.

### La cascarilla de arroz

El exterior de la cascarilla de arroz se compone de elementos rectangulares dentados, compuestos principalmente de sílice recubiertos con una gruesa cutícula. La región central y la epidermis contienen poca sílice (Bronzeoak, 2003). Jauberthie *et al* (2000) confirmaron que la presencia de sílice amorfa está concentrada en las superficies de la cáscara de arroz y no dentro de la propia cáscara. La composición química de la cascarilla de arroz es similar a la de muchos subproductos agrícolas e incluye celulosa entre 40 a 50%, lignina entre 25 a 30%, cenizas entre 15 a 20% y un contenido de humedad entre 8 y 15% (Hwang y Chandra, 1997). La cascarilla de arroz se ha utilizado como soporte inerte en diferentes estudios SSF, como el elaborado por Ramos *et al* (2008) quienes crecieron *Trichoderma* sp. llegando a obtener concentraciones hasta de  $2,3 \times 10^8$  conidios/g después de 8 días de fermentación.

### **Soporte inertes sintéticos**

Los soportes inertes sintéticos en los procesos SSF son generalmente polímeros de síntesis química como el poliuretano, poliestireno, polietileno entre otros. Estos polímeros tienen propiedades intrínsecas en cuanto a un alto nivel de porosidad, capacidad de absorción de agua, permeabilidad y homogeneidad en su estructura (Chen, 2013). Las desventajas de estos soportes radican principalmente en su costo, no obstante se puede minimizar esta diferencia al utilizar materiales provenientes de residuos industriales.

### Espuma de poliuretano

Entre los soportes inertes sintéticos comúnmente estudiados se encuentra la espuma de poliuretano o PUF por sus siglas en inglés, la cual se ha usado como un soporte adecuado para los procesos SSF porque presenta una alta porosidad, baja densidad, y una relativamente alta absorción de agua. La espuma de poliuretano tiene un tamaño de poro adecuado, que proporciona un entorno satisfactorio para el crecimiento de los

hongos (Chen, 2013). La capacidad absorbente de la espuma de poliuretano puede ser de hasta 20 ml/g, conteniendo pequeños poros de aproximadamente 700 micras de diámetro, generando un área superficial específica cercana a  $4,5 \times 10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3$ .

La producción de la compañía alemana PROPHYTA GmbH se estima en cerca de 150 kilogramos de sustrato por fermentador de 600 litros de capacidad. Con una capacidad instalada de cerca de 60 fermentadores se podrían generar hasta 9 toneladas de residuos después del proceso de cosecha. Según comunicación personal este tipo de sustratos no es reutilizable y la mayoría de los residuos generados son usados como activos en abonos.

## 1.8 El género *Trichoderma* sp. y los procesos SSF

Los hongos del género *Trichoderma* sp. son un grupo de microorganismos que habitan naturalmente en un número importante de suelos, con abundante materia orgánica en descomposición y altas densidades de raíces. *Trichoderma* sp. se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo en diferentes zonas, además se suele hallar asociado a la superficie de las plantas y cortezas de madera descompuesta, en diferentes zonas y hábitats (Harman, 2004).

El interés científico despertado por los hongos de este género, se debe a las características antagónicas que presentan frente a hongos fitopatógenos. Entre los mecanismos de control referenciados para *Trichoderma* sp. está la competencia por nutrientes o espacio, el micoparasitismo y la antibiosis entre otros. Estos mecanismos no son excluyentes sino que actúan sinérgicamente en el control de los patógenos (Harman y Kubicek, 1998; Chet *et al*, 1997; Belanger *et al*, 1995).

La producción de *Trichoderma* sp. a nivel industrial y semindustrial se ha propuesto empleando diferentes sustratos sólidos como zanahoria (Castillo, 2001), bagazo de caña, cascarilla de café, arroz o mezclas de las misma fuente de carbono. La fermentación sólida de *Trichoderma* sp. ha sido estudiada en diferentes escalas, en donde se ha evaluado el tipo de sustrato, la temperatura, los efectos de luz y la oscuridad sobre la esporulación o conidiogénesis del hongo (García *et al*, 2009). Es así como Cruz (2007) utilizando fermentación bifásica (airlift y fermentador de bandejas) para una cepa de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) reportó concentraciones finales de  $8,44 \times 10^9$  conidios/g

después de 9 días de fermentación. Así mismo, Cruz *et al* (2011) con la misma cepa de *Trichoderma* sp. estudiaron su producción masiva mediante dos métodos de fermentación sólida, el primero disponiendo el sustrato en bolsas de polietileno en incubadas en cuarto de incubación y el segundo utilizando un fermentador de bandejas llegando a obtener productividades de  $4.70 \times 10^6$  conidios/g.h y  $1,42 \times 10^7$  conidios/g.h respectivamente.

### **1.8.1 *Trichoderma asperellum* Th204**

La especie *Trichoderma asperellum* ha recibido considerable atención de la investigación en cuanto a su potencial como un agente de control biológico (Tipán, 2013; Carvajal *et al*, 2008). En particular, la cepa *T. asperellum* Th204 ha demostrado características biológicas de interés como solubilización de fósforo y promoción de crecimiento en plantas. Sin embargo, en la planta de bioproductos de Corpoica la propagación de *T. asperellum* Th204 se realiza mediante SSF, utilizando sustratos naturales a base de arroz, dispuestos en bandejas perforadas que son inoculadas e incubadas en cuartos calientes o fermentadores de bandejas. Sin embargo, las limitantes en el control del proceso, hacen que el uso de este tipo de sistemas de fermentación conduzca a lotes heterogéneos y por tanto con baja repetibilidad y reproducibilidad (Cruz *et al*, 2011; Cruz, 2007).



## 2. Materiales y métodos

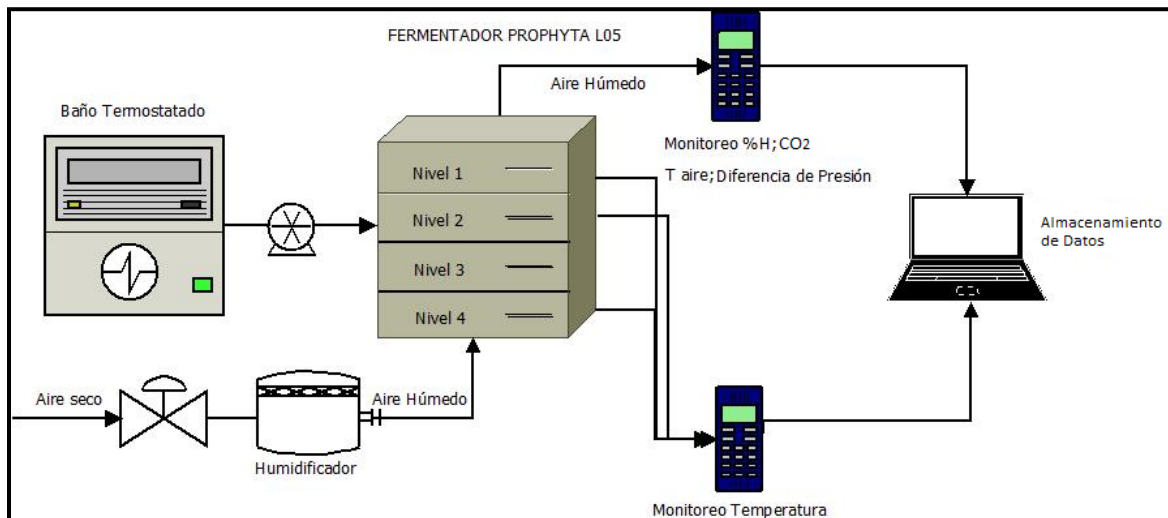
### 2.1 Equipo utilizado: Fermentador PROPHYTA® L05

Fermentador sólido diseñado por la multinacional alemana PROPHYTA® GmbH modelo L05 (United States Patent 6620614) construido en acero inoxidable con dimensiones de 68 cm de altura, 25 cm de ancho y 25 cm de profundidad.

El fermentador cuenta con cuatro niveles para soportar el sustrato, cada uno con un serpentín de dos brazos para enfriamiento o calentamiento utilizando un baño termostático externo para controlar la temperatura. Adicionalmente, en la parte inferior cuenta con distribuidor de aire rectangular y un soporte para un material humidificador (Figura 2.1). En el exterior posee líneas con sistemas de filtración *Sartorius* de 0,2 µm para la alimentación de agua y aire. La inoculación del sustrato se realizó por inyección desde la parte superior utilizando una bomba peristáltica Heidolph 8314. El cierre del fermentador se realizó desde la parte superior mediante el ajuste de cuatro clavijas y empaques siliconados. El fermentador PROPHYTA® L05 permitió un monitoreo de las condiciones de procesos SSF, tales como la temperatura usando puertos para termocuplas al interior de cada nivel. Por otra parte, mediante instrumentación externa se adecuó el fermentador para la determinación de la composición y el registro de los gases de salida en tiempo real (Figura 2.1).

### 2.2 Microorganismo

La cepa del hongo de estudio *T. asperellum* Th204 fue suministrada por el Banco de Germoplasma de microorganismos con interés en control biológico de CORPOICA. La cepa se crioconservó a -70±2°C. El hongo se mantuvo en cajas Petri con medio agar papa dextrosa (PDA) y se incubó a 25±2°C por 7 días. Las cajas Petri con el hongo esporulado se utilizaron en la preparación de las suspensiones de conidios que sirvieron como inóculos.

**Figura 2.1:** Esquema del fermentador de lecho fijo PROPHYTA® L05

## 2.3 Determinación del soporte de crecimiento y los factores que tiene mayor efecto sobre la producción de *T. asperellum* Th204 en el fermentador de lecho fijo PROPHYTA® L05

### 2.3.1 Preparación del inóculo

A partir de cultivos en medio PDA con el hongo esporulado, se removieron los conidios mediante la adición de 10 mL de Tween 80 al 0,1% (v/v). La suspensión de conidios obtenida se dispuso en un frasco Falcon estéril, para luego homogeneizarla en un agitador vibratorio Vortex durante 30 segundos. A partir de esta suspensión ( $1 \times 10^8$  conidio/mL) se realizaron las diluciones requeridas para obtener 2 litros de inóculo en las concentraciones a evaluar ( $10^7$  y  $10^8$  conidios/mL). Las concentraciones se determinaron mediante el recuento en cámara de NeuBauer (16 celdas por triplicado) (Bastidas, 2013).

### 2.3.2 Preparación del soporte inerte y de la suspensión nutritiva

#### Soporte 1: Espuma de poliuretano:

Se utilizó espuma de poliuretano flexible de origen comercial (Espumas Santafé), de 40 y 50 ppi (poros por pulgada). La espuma fue cortada en cubos de 2 cm de arista

aproximadamente. Según la altura del lecho a evaluar 5 cm o 8 cm se utilizaron 25 o 30 gramos de espuma seca previamente cortada respectivamente.

### **Soporte 2: Cascarilla de arroz:**

Se utilizó cascarilla de arroz cruda proveniente de Cascarillas de Colombia con un tamaño de partícula entre 0,5 y 12 mm.

### **Preparación de la suspensión nutritiva**

La suspensión nutritiva se utilizó para humectar el soporte inerte a razón de un litro de suspensión por nivel en el fermentador PROPHYTA® L05. Para la preparación de la suspensión nutritiva como fuente principal de carbono se utilizó puré de papa en polvo de origen comercial marca VanGuy y extracto de levadura Tecna como fuente de nitrógeno.

En función de la relación C/N a evaluar se pesaron las cantidades requeridas de puré de papa en polvo y de extracto de levadura. Los dos componentes fueron suspendidos en 4 litros de agua y homogeneizados utilizando un emulsificador industrial DYNAMIC a 300 rpm durante 5 minutos. El pH inicial de la suspensión para todos los tratamientos experimentales se mantuvo constante en  $5,5 \pm 0,3$ .

### **2.3.3 Adecuación del fermentador PROPHYTA® L05**

En soporte inferior debajo del nivel 4 fue llenado con sepiolita seca sirviendo como filtro por su capacidad absorbente. Una vez cargado los cuatro niveles del fermentador con el soporte inerte humectado con la suspensión nutritiva, se procedió a cerrar el fermentador asegurando parcialmente las clavijas de seguridad de la cubierta. Posteriormente, se acopló una manguera siliconada de un cuarto de pulgada (Masterflex®), la cual se utilizó para la operación de inoculación, el extremo de la manguera se selló con algodón y papel aluminio para su protección. Posteriormente, se ajustó un filtro de aire (Sartorius 0,2  $\mu\text{m}$ ) a la acometida de aire de entrada, dejando las válvulas del filtro en posición de abertura previniendo sobrepresiones en el proceso de esterilización. Finalmente, el fermentador PROPHYTA® L05 se sometió a una operación de esterilización en una autoclave vertical LEQUEUX (París) 863706 a 121°C y 20 psi de presión durante 30 minutos.

### 2.3.4 Inoculación e incubación

Dos litros del inóculo de *T. asperellum* Th204 se alimentaron bajo condiciones de asepsia al fermentador a razón de 15 L/h utilizando una bomba peristáltica Heildolph 8314. Al finalizar la alimentación del inóculo, se adicionaron 22 litros de Tween 80 (0,1%v/v) previamente estéril con el propósito de permitir la homogeneización del inóculo en todo el sustrato y el ajuste de la humedad por inundación. Después de una hora la válvula inferior de desagüe del fermentador se abrió hasta completar el vaciado. La válvula de desagüe se cerró y la manguera de inoculación se selló con una abrazadera metálica.

Con el propósito de ajustar los niveles de la temperatura de incubación a evaluar se utilizó un baño termostático MEMMERT WNB 7. El agua del baño (7 litros) se ajustó a 30°C y 36°C según los niveles de temperatura evaluados de 23°C y 28°C respectivamente (Tabla 2.1). Los niveles de la temperatura de fermentación se controlaron con un flujo de agua proveniente del baño termostático utilizando una bomba sumergible Evans12W que alimentó continuamente los serpentines del fermentador a razón de 1,5 L/min. De esta forma, el agua de calentamiento circuló continuamente en un circuito cerrado entre el baño termostático y el fermentador.

Por último, se acopló la línea de aire al sistema de filtración y humidificación (Erlenmeyer con desprendimiento lateral) y se ajustó con un rotámetro el caudal de aire a evaluar. El fermentador PROPHYTA® L05 se mantuvo cerrado con suministro continuo de aire por el tiempo de fermentación definido (7 días).

### 2.3.5 Diseño experimental para la selección del soporte sólido y determinación de los factores críticos (efectos fijos)

El diseño experimental utilizado fue fraccionado 1/16 con siete factores evaluados a dos niveles cada uno, nivel alto (1) y nivel bajo (-1) con resolución III y dos repeticiones en el punto central (C1-C2). Los factores a evaluar fueron: El soporte inerte sólido (A), la relación C/N de la suspensión de nutrientes (B), la relación de inoculación (C), la humedad del aire entrante (D), la temperatura de incubación (E), la altura del lecho del sustrato (F) y el caudal de aire entrante (G) (Tabla 2.1). En total, el experimento consistió en la evaluación de 10 tratamientos experimentales y un control positivo (E1) utilizando el medio de cultivo estándar para la producción de otras cepas de *Trichoderma* sp. en la

planta de bioproductos de CORPOICA (Tabla 2.2). Las variables de respuesta en cada tratamiento fueron la productividad medida como los conidios producidos de Th204 por gramo seco de sustrato por hora (conidios/g.s.h) después de 7 días de fermentación, el contenido de humedad final del sustrato, la evolución de la producción de CO<sub>2</sub> (ppm) y consumo de O<sub>2</sub> (%v/v) , la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ , h<sup>-1</sup>), la temperatura de tres niveles (°C), y la caída de presión (mmHg) a través del lecho del sustrato.

**Tabla 2.1:** Factores y niveles evaluados en la fermentación sólida de *T. asperellum* Th204

Código	Factor	Nivel	
		-1	1
A	Soporte sólido	CA*	EP*
B	Relación C/N	6	8
C	Relación de inoculación (conidios/g seco)	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
D	Humedad del aire (%)	15	95
E	Temperatura (°C)	23	28
F	Altura de lecho (cm)	5	8
G	Flujo de aire entrante (m <sup>3</sup> /h)	0,42	1,13

\*C.A (Cascarilla de arroz); E.P (Espuma de poliuretano).

**Tabla 2.2:** Tratamientos evaluados para la producción de *T. asperellum* Th204 (Diseño experimental fraccionado 1/16-Efectos fijos).

Tratamiento	Soporte	C/N	Inóculo	Humedad del aire (%)	Temperatura (°C)	Altura del lecho (cm)	Caudal de aire (m <sup>3</sup> /h)
T1	Espuma	8	-1	95	23	8	1,13
T2	Espuma	8	-1	15	28	5	1,13
T3	Espuma	6	1	15	23	8	0,42
T4	Cascarilla	6	1	95	23	5	1,13
T5	Espuma	6	1	95	28	5	0,42
T6	Cascarilla	6	-1	95	28	8	0,42

<b>T7</b>	Cascarilla	8	1	15	28	8	1,13
<b>T8</b>	Cascarilla	8	-1	15	23	5	0,42
<b>C1</b>	Cascarilla	7	0	95	25	7	0,77
<b>C2</b>	Espuma	7	0	95	25	7	0,77
<b>E1</b>	<b>Arroz</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>95</b>	<b>28</b>	<b>8</b>	<b>1,13</b>

### • Determinación de la productividad

Una vez terminado el tiempo de fermentación, el sustrato crecido con Th204 se sometió a un lavado con Tween 80 (0,1%v/v) en una relación 2:1 (Tween:Soporte) utilizando una batidora Oster 2612-012 durante 5 minutos. Al extracto resultante se le determinó la concentración de conidios por recuento en cámara de Neubauer (Bastidas, 2013). Esta concentración del extracto se utilizó para determinar los valores de productividad de cada tratamiento en términos de conidios producidos por gramo de sustrato seco inicial por hora (conidios/g.s.h). El sustrato seco se determinó como la suma de los pesos del soporte seco (espuma-cascarilla) y los nutrimentos (puré de papa y extracto de levadura).

### • Determinación del contenido de humedad

Al inicio (tiempo cero) y al finalizar el tiempo de fermentación definido (7 días), se tomaron tres muestras de 1 g del soporte sólido en cada nivel para determinar el contenido de humedad utilizando una balanza Kern MLS-50. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), prueba de homogeneidad de varianzas (Test de Bartlett), normalidad (Test de Shapiro-Wilk) y comparación de medias (Tukey  $\alpha=0,05$ ). Cuando algunos de los supuestos no se cumplieron los datos se sometieron a una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ).

### • Monitoreo de consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>

El monitoreo de la concentración de O<sub>2</sub> (%v/v) a la salida del fermentador se realizó utilizando un sensor Ox-01 tomando en promedio 4 lecturas por día.

Para cada tratamiento de fermentación, se monitoreó la concentración del CO<sub>2</sub> (ppm) de la corriente de aire de salida, la temperatura (°C) y la humedad del aire (%) mediante un datalogger CO<sub>2</sub> EXTECH CO210. Con los datos obtenidos de respirometría de CO<sub>2</sub> cada

20 minutos se estimaron las velocidades de producción medidas en miligramos de CO<sub>2</sub> por gramo de soporte por hora (mg CO<sub>2</sub>/g soporte.h). Adicionalmente, se estimó para cada tratamiento la velocidad específica máxima de crecimiento de *T. asperellum* Th204 (Figura 2.1).

### **Determinación de la velocidad específica máxima de crecimiento**

En función de los resultados de respirometría para el crecimiento de *T. asperellum* Th204 en el fermentador PROPHYTA® L05 se utilizó el modelo logístico de crecimiento (Ecuaciones 2.1 y 2.2).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left( \frac{1 - X}{X_{\max}} \right) \quad (2.1)$$

$$X = \frac{X_m}{1 + \left[ \left( \frac{X_m}{X_0} \right) - 1 \right] e^{-\mu t}} \quad (2.2)$$

Donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento (h<sup>-1</sup>), X<sub>m</sub> y X<sub>0</sub> la concentración de biomasa máxima e inicial respectivamente medida en kg biomasa seca por kg de sustrato seco (kg X /kgs.s).

Siguiendo el método descrito por Gelmi *et al* (2000) las velocidades específicas máximas de crecimiento para *T. asperellum* Th204 se estimaron utilizando los resultados de respirometría específicamente los de producción de CO<sub>2</sub>. En todos los tratamientos cada 20 minutos se determinó la concentración de CO<sub>2</sub> medida como los gramos de CO<sub>2</sub> acumulados producidos por gramo de sustrato seco. Tomando el logaritmo natural de la concentración de CO<sub>2</sub> y graficándola en función del tiempo se determinó la pendiente (intervalo de mayor pendiente, 20-40 horas aproximadamente) siendo esta la velocidad específica máxima de crecimiento (h<sup>-1</sup>).

### **• Monitoreo de la Temperatura**

El monitoreo de la temperatura al interior del fermentador se realizó en tres niveles (niveles 1, 2 y 4) tomando una lectura cada 20 minutos utilizando un datalogger TESTO AG 735-2 (Figura 2.1). Se determinó el gradiente de temperatura axial (promedio y

máximo) como la relación entre la diferencia entre las temperaturas del nivel 1 (superior) y el nivel 4 (inferior) y la altura del lecho (cm).

- **Caída de Presión**

De la misma forma para cada tratamiento de fermentación, se midió la caída de presión cada 20 minutos mediante la adecuación de un manómetro diferencial EXTECH HD755 de 0,5 psi entre la entrada (inferior) y salida (superior) de la corriente del aire del biorreactor (Figura 2.1).

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de normalidad de Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianza. Se ajustó un modelo lineal de los efectos, así mismo se analizaron gráficamente los efectos mediante diagramas de Pareto para determinar la significancia de los factores. El análisis de resultados permitió evidenciar que soporte sólido es mejor en comparación con el otro, en función de la productividad final alcanzada (conidios/g.s.h), la velocidad específica máxima de crecimiento, la presencia de gradientes de humedad del lecho, de temperatura axial y la caída de presión. Adicionalmente, se seleccionaron los dos factores críticos (X1, X2) diferentes al soporte inerte con mayor influencia positiva o negativa según el grado del efecto sobre la variable respuesta productividad de Th204.

## **2.4 Generación de un modelo de productividad de *T. asperellum* Th204**

### **2.4.1 Diseño experimental utilizando los factores críticos**

Para la generación de un modelo de respuesta de la concentración final de *T. asperellum* Th204 en función de los factores críticos seleccionados (X1, X2), se realizó un diseño factorial compuesto central con tres repeticiones en el punto central, definiendo un espacio experimental rotacional con 11 tratamientos en el fermentador PROPHYTA® L05 (Tabla 2.3).



**Tabla 2.3:** Niveles de los factores críticos (X1, X2) en los tratamientos evaluados en la fermentación sólida de *T. asperellum* Th204 (Diseño de experimentos Central Compuesto)

Tratamiento	X1	X2
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1.4142	0
6	1.4142	0
7	0	1.4142
8	0	-1.4142
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Las repeticiones en el punto central permitieron determinar el error experimental.

Se mantuvieron como variables respuesta en cada tratamiento: La productividad final de Th204 (conidios/g.s.h), la velocidad específica máxima de crecimiento (Gelmi *et al*, 2000), el contenido de humedad final del soporte (gradiente de humedad relativo), la temperatura entre niveles (gradiente de temperatura axial promedio) y la caída de presión (caída de presión relativo) a través del lecho del sustrato.

Utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVI.II se ajustó un modelo de segundo orden para la productividad de Th204 (conidios/g.s.h) en función de los factores X1 y X2. Con el modelo encontrado se determinó una relación óptima de X1 y X2 maximizando la productividad.

El gradiente de humedad del lecho al finalizar la fermentación se determinó como la diferencia de contenido de humedad del lecho entre el nivel 1 y el nivel 4, siguiendo la metodología descrita previamente en el numeral 2.3.5.

El gradiente de temperatura axial del fermentador se determinó como el valor promedio de la diferencia de temperatura entre el nivel 1 y el nivel 4 registrada cada 20 minutos. Se

utilizó el datalogger TESTO AG 735-2 para el registro de la temperatura del lecho entre niveles.

La caída de presión relativa se determinó tomando como base la presión de aire entrante en cada fermentación. La variable se expresó como porcentaje (caída de presión máxima/ presión entrante). Tanto la presión del aire entrante como la caída de presión del aire a través del lecho se determinaron con el manómetro diferencial EXTECH HD755.

El gradiente de concentración relativo se determinó para los logaritmos de las concentraciones en base seca de *T. asperellum* Th204 entre los niveles 1 y 4 en relación al nivel 1 expresada como porcentaje.

Por último, los resultados de los gradientes de temperatura axial, de humedad del lecho, de concentración relativa y de caída de presión relativa, se analizaron mediante diagramas de Pareto (significancia  $\alpha=0,05$ ) y superficies de respuesta.

#### **2.4.2 Validación del modelo estadístico**

El punto óptimo generado para la productividad en el diseño central compuesto se validó mediante 3 fermentaciones manteniendo los demás factores en los niveles que favorecieron el crecimiento de Th204. Al finalizar del tiempo de cada fermentación se determinó la productividad (numeral 2.3.5) y se calculó su ajuste con el valor de productividad óptimo encontrado con el diseño. El ajuste se determinó como la relación porcentual entre la productividad experimental y la óptima teórica esperada.

## 3.Resultados y discusión

### 3.1 Determinación del soporte de crecimiento y los factores que tienen mayor efecto sobre la producción de *T. asperellum* Th204 en el fermentador de lecho fijo PROPHYTA® L05

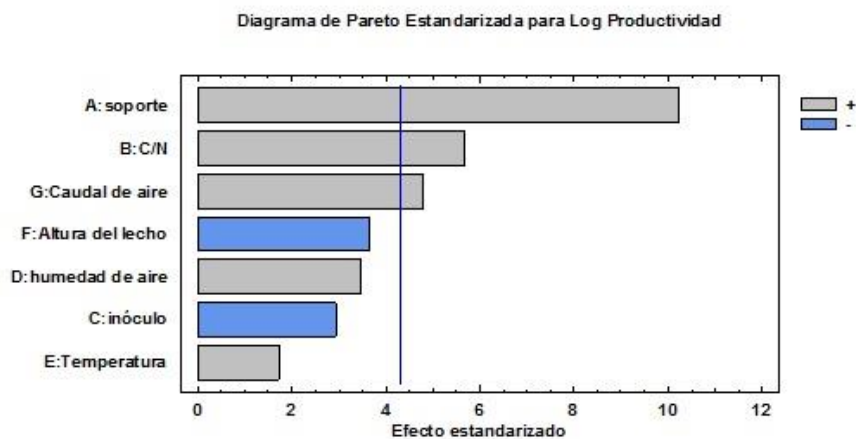
Con el análisis elemental de la suspensión nutritiva se determinó que el puré de papa contiene un 39,23% de carbono y un 1,30% de nitrógeno. Para el caso del extracto de levadura se determinó un contenido de carbono y nitrógeno de 36,40% y 11,28% respectivamente (Anexo A). Estos valores permitieron ajustar con mayor exactitud la relación Carbono/Nitrógeno (C/N) requeridas en los diferentes tratamientos. El nivel C/N de 8 se ajustó en la suspensión nutritiva utilizando 250 g de puré de papa y 125 g de extracto de levadura. Por otro lado, la relación C/N de 6, se ajustó con 250 g tanto para el puré de papa como para el extracto de levadura.

Después de llevar a cabo las fermentaciones propuestas en el diseño experimental fraccionado (1/16) con dos repeticiones en el punto central C1 y C2, se pudo evidenciar que con el soporte espuma de poliuretano se obtuvieron las mayores productividades expresadas en conidios producidos por gramo de sustrato seco por hora (conidios/g.s.h) después de 7 días de fermentación en comparación al soporte cascarilla de arroz y al sustrato control (E1) (Tabla 3.1). El diagrama de Pareto de la la figura 3.1 expone solo los efectos principales de los factores, en donde se evidencia que los factores con mayor incidencia positiva y significativa sobre la variable respuesta (Logaritmo de la productividad) **son el soporte inerte (P=0,0094), el caudal de aire (P=0,0411) y la relación C/N (P=0,0296)** (Anexo B). Los factores humedad del aire y temperatura de incubación también tienen un efecto positivo sobre la productividad de Th204, aunque estos efectos no fueron significativos en el espacio experimental evaluado.

**Tabla 3.1:** Productividad de *T. asperellum* Th204 (conidios/g.s.h) después de 7 días (Diseño fraccionado 1/16).

C1 y C2. Fermentaciones en el punto central, E1 Tratamiento sustrato control

Tratamiento	Soporte	C/N	Inóculo	Humedad del aire (%)	Temperatura (°C)	Altura del lecho (cm)	Caudal del aire (m <sup>3</sup> /h)	Productividad (Conidios/g.s.h)	Log (Prod.)
T1	Espuma	8	-1	95	23	8	1,13	1,96x10 <sup>7</sup>	7,29
T2	Espuma	8	-1	15	28	5	1,13	2,57x10 <sup>7</sup>	7,41
T3	Espuma	6	1	15	23	8	0,42	9,38 x10 <sup>5</sup>	5,97
T4	Cascarilla	6	1	95	23	5	1,13	1,61x10 <sup>6</sup>	6,21
T5	Espuma	6	1	95	28	5	0,42	2,88x10 <sup>6</sup>	6,46
T6	Cascarilla	6	-1	95	28	8	0,42	9,35x10 <sup>5</sup>	5,97
T7	Cascarilla	8	1	15	28	8	1,13	2,83x10 <sup>6</sup>	6,45
T8	Cascarilla	8	-1	15	23	5	0,42	2,65x10 <sup>6</sup>	6,42
C1	Cascarilla	7	0	95	25	7	0,77	2,75x10 <sup>6</sup>	6,44
C2	Espuma	7	0	95	25	7	0,77	7,08x10 <sup>6</sup>	6,85
E1	<b>Arroz</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>95</b>	<b>28</b>	<b>8</b>	<b>1,13</b>	8,87x10 <sup>6</sup>	6,95

**Figura 3.1:** Diagrama de Pareto para los 7 factores evaluados, determinación de efectos fijos (Diseño fraccionado 1/16)

El modelo y los resultados tuvieron un alto grado de ajuste con un valor de  $R^2$  de 0,9754, un valor de regresión relativamente alto para este tipo de procesos multivariable. De esta forma se puede inferir que más del 97% de la variabilidad del sistema en el espacio experimental evaluado se podría modelar con los 7 factores evaluados, dejando menos de un 3% al error aleatorio y experimental. A continuación se presenta la ecuación ajustada del modelo para la variable Log (productividad) en función de los 7 factores evaluados.

$$\text{Log (Productividad)} = 4,1016 + 0,248*\text{soporte} + 0,259153*\text{C/N} - 0,108716*\text{inóculo} + 0,00281029*\text{humedad de aire} + 0,0186098*\text{Temperatura} - 0,0650273*\text{Altura del lecho} + 0,495941*\text{Caudal de aire}$$

$$R^2 \text{ (ajustada por g.l.)} = 97,61\%$$

- **Efecto del soporte inerte**

El efecto significativo del soporte inerte sobre la productividad de *T. asperellum* Th204 podría radicar en dos aspectos como son la porosidad y la capacidad de retención del agua. Para el caso de las espuma de poliuretano diversos estudios han demostrado valores relativamente altos de retención de agua entre 20 y 30 mL/g y porosidades de partícula superiores a 0,912 (Marin *et al.* 2008), mientras que para la cascarilla de arroz la capacidad de retención de agua es baja con valores entre 0,4 y 0,92 mL/g (Saenz y Calderon, 2001) y una porosidad aparente del lecho de 0,6 (Srinives *et al.*, 2010).

Según Marin *et al.* (2008) la capacidad de retención de agua de la espuma de poliuretano mantendría los valores de  $a_w$  entre 0,985 y 0,999 condiciones favorables para el crecimiento de los hongos. Es así como, menores cantidades de agua retenida para el caso de la cascarilla de arroz podrían haber ocasionado inicialmente rápidas velocidades de evaporación ocasionando disminución en las actividades de agua ( $a_w$ ), gradientes de humedad y gradientes de temperatura, aspectos altamente desfavorables para el crecimiento y la esporulación de *T. asperellum* Th204. Adicionalmente, una mayor densidad del lecho, con menor porosidad aparente ocasionaría menores transferencias de  $O_2$  y desorción de  $CO_2$  (Mitchell *et al.*, 2006; Chen, 2013).

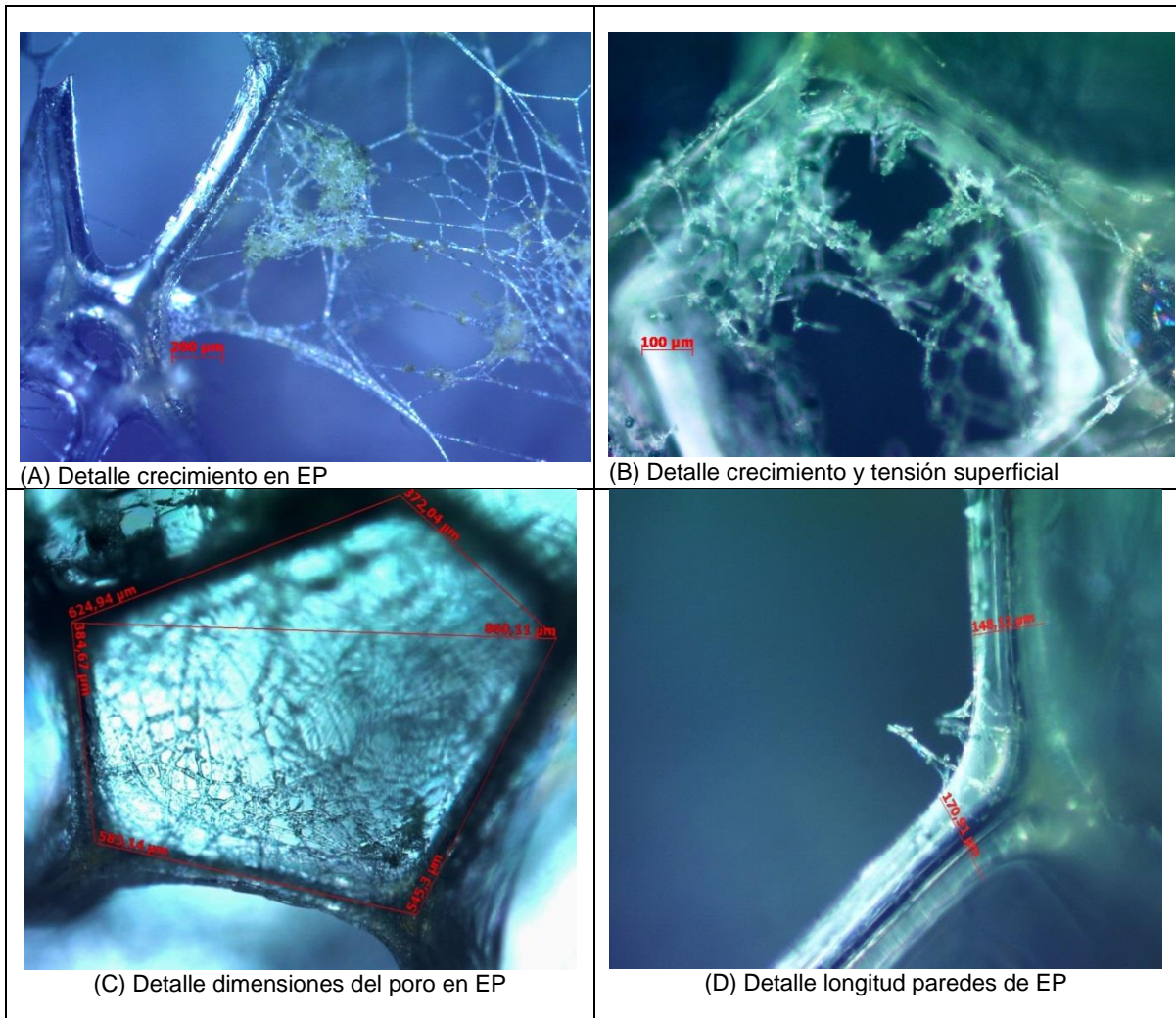
Por otro lado, los soportes en procesos SSF tienen en su mayoría una estructura porosa con una gran área superficial, entre  $10^3$ - $10^6$   $\text{m}^2/\text{cm}^3$  (Chen Y Xu, 2004), para el caso de la espuma de poliuretano usada en la fermentación de Th204, con una distribución de cubos de  $2 \text{ cm}^3$  y utilizando las medidas a nivel micro, se estimó esta relación en  $6 \times 10^4$   $\text{m}^2/\text{cm}^3$  estando en los promedios reportados para soportes inertes, favoreciendo los fenómenos de transferencia en general (Chen, 2013).

Según lo descrito por Oostra *et al* (2001) y citado por Barrios (2012) se distinguen tres capas de micelio para hongos filamentosos en procesos SSF. En primer lugar una biopelícula de hifas que cubren las superficies de las paredes del soporte con un alto contenido de humedad (poros capilares). Diversos autores han descrito esta capa como la capa crítica en donde el oxígeno y los nutrimentos deben ingresar, siendo el principal lugar para los fenómenos de transferencia de masa (Thibault, *et al*, 2000; Mitchell *et al*, 2000). En segundo lugar, las hifas aéreas las cuales se encuentran en mayor contacto con la fase de gas, siendo importante para la colonización de otras zonas dentro de la matriz (poros de ventilación). Por último, las hifas penetrativas con capacidad para colonizar al interior del soporte y asimilar los nutrimentos.

El buen crecimiento de *T. asperellum* Th204 sobre la espuma de poliuretano sugiere que esta matriz provee microambientes favorables para la solubilización del oxígeno y la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento del hongo, resultados similares encontrados por Rodríguez *et al* (1997).

En la figura 3.2 se evidencia el crecimiento a nivel micro de la cepa Th204 sobre el soporte espuma de poliuretano, en donde se puede observar la presencia de la tensión superficial del agua en los poros de la espuma, el crecimiento de Th204 sobre las paredes y en la película de agua con fracciones de gas disueltas (Figura 3.2 A-B). No obstante, se ha descrito que una alta tensión superficial impediría la elongación de las hifas para los hongos aeróbicos como *T. asperellum* causado por una baja solubilidad del oxígeno, siendo la tasa de difusión de oxígeno en el agua aproximadamente 10000 veces menor que en el aire, por lo que la tensión de la película de agua se convertiría en el principal factor limitante que afectaría la extensión del micelio (Chen, 2013). Este fenómeno se podría haber presentado en el tratamiento T3 para el cual se obtuvieron los menores valores de productividad.

**Figura 3.2:** Detalle a nivel micro (10X) del crecimiento de *T. asperellum* Th204 sobre el soporte espuma de poliuretano

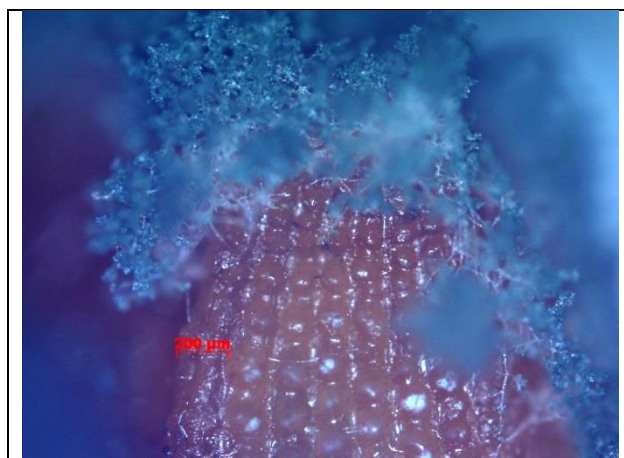


Utilizando un microscopio AXIO Lab. A1 de campo oscuro se determinaron las dimensiones del poro pentagonal de la espuma. De esta forma la espuma de poliuretano evaluada se podría considerar como un panel de polímero con paredes entre 140 y 300 µm de grosor y perímetros entre 4000 y 5100 µm (Figura 3.2 C-D), estando clasificados estos poros como tanto capilares (menor a 200 µm) como de ventilación (mayores a 200 µm) según lo descrito por Chen (2013). La presencia de poros de ventilación podría haber favorecido la elongación de las hifas de *T. asperellum* Th204 al interior de la partícula de espuma, en zonas con oxígeno disuelto permitiendo la asimilación de parte de los nutrimentos absorbidos.

En contraste a lo observado con la espuma de poliuretano en cuanto a la absorción de los nutrimentos, en la cascarilla de arroz la mayor cantidad de agua con los nutrimentos suspendidos y disueltos se encontraría en la superficie de la partícula de cascarilla, ya que a pesar de que se ha reportado que el 54% de la cascarilla como partícula es porosa, estos poros se encuentran cerrados a bajas temperaturas para las fuerzas capilares (Kaupp, 1987) y se podría clasificar como poros inactivos según lo descrito por Chen (2013). Es así como, en la figura 3.3 se observa el crecimiento de Th204 a nivel micro sobre la cascarilla de arroz, en donde se puede distinguir la naturaleza rígida de la cascarilla recubierta con una gruesa cutícula, con un exterior compuesto por elementos rectangulares y dentados (aprox. 200  $\mu\text{m}$ ), que según Bronzeoak (2003) y Jauberthie *et al* (2000) están compuestos principalmente de sílice.

De esta forma se podría inferir que el crecimiento de *T. asperellum* Th204 fue predominantemente sobre la superficie de la cascarilla como partícula con una baja presencia de elongación de las hifas del hongo al interior, causadas posiblemente por las condiciones de hipoxia dentro de la partícula ya que generalmente el oxígeno presenta bajas concentraciones en soportes sólidos en profundidades mayores a 100 micras (Chen, 2013).

**Figura 3.3:** Detalle a nivel micro (10X) del crecimiento de *T. asperellum* Th204 sobre el soporte cascarilla de arroz



- **Efecto del caudal de aire**

Por otro lado, el caudal de aire entrante en los fermentadores de lecho empacado ha sido encontrado anteriormente como determinante en el proceso fermentativo SSF, estando



directamente relacionado con las velocidades de transferencia (agua, oxígeno, dióxido de carbono) y calor por convección y evaporación (Mitchell *et al*, 2006; Durand, 2003; Gowthaman *et al*, 1993).

- **Efecto de la relación C/N**

El efecto de la relación C/N en los procesos SSF ha sido levemente estudiado en comparación a los procesos SmF, sin embargo se sabe que la relación C/N es un factor determinante en el desarrollo y esporulación del hongo durante la fermentación (Elson *et al*, 1998), es así como Gao y Liu (2009) para el caso de *Trichoderma viride* TV-1 formularon un amplio intervalo de crecimiento para relaciones C/N y sugirieron que el crecimiento de la cepa de *Trichoderma* se ve más afectada por la relación C/N que por las concentraciones de C y N independientes. De esta forma varios estudios se han centrado en la optimización de la relación C/N en procesos SSF (Santos *et al*, 2012; Shi *et al*, 2009).

- **Efecto de la altura del lecho y relación de inoculación**

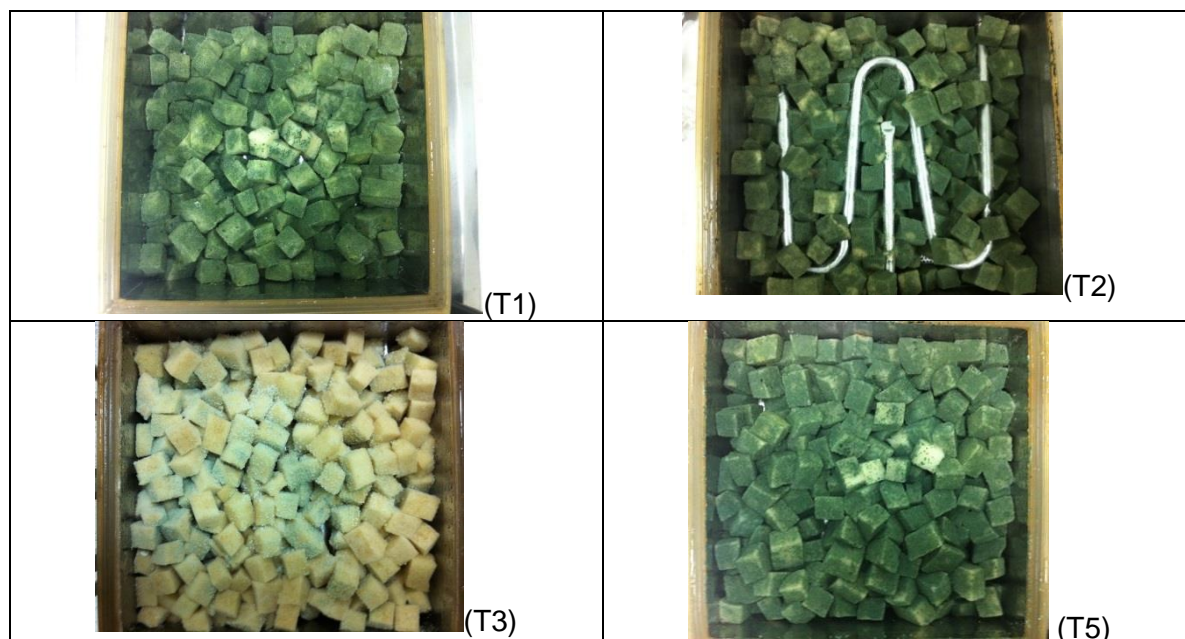
Por otra parte, para los factores altura del lecho y la relación de inoculación el diagrama de Pareto determinó un efecto negativo sobre la productividad de Th204, aunque estos efectos no fueron estadísticamente significativos (Figura 3.1, Anexo B). La altura de lecho se ha descrito como determinante sobre los fenómenos de transferencia de calor principalmente en el retiro del calor metabólico y la generación de gradientes de temperatura. Es así como varios autores han determinado en los fermentadores de lecho empacado que a mayor altura de lecho el incremento en la temperatura a la salida del fermentador disminuye el comportamiento favorable del biorreactor (Fanaei y Vaziri, 2008).

En cuanto a la relación de inoculación, los resultados sugirieron que una relación más cercana a  $1,0 \times 10^7$  que a  $1,0 \times 10^8$  conidios/g seco sería más favorable para el crecimiento del hongo, siendo consistente con los reportado por Raimbault (1980) y citado por Roussos y Gaime (1996) quien determinó para una cepa de *Trichoderma harzianum* un tasa de inoculación óptima de  $2,0 \times 10^7$  conidios/g seco en un proceso SSF.

### 3.1.1 Productividad

La mayores productividades para el crecimiento de *T. asperellum* Th204 se obtuvieron con los tratamientos de espuma T2 y T1 con valores de  $2,57 \times 10^7$  y  $1,96 \times 10^7$  respectivamente, siendo considerablemente superiores al valor encontrado con el sustrato control de  $8,87 \times 10^6$  conidios/g.s.h (Tabla 3.1).

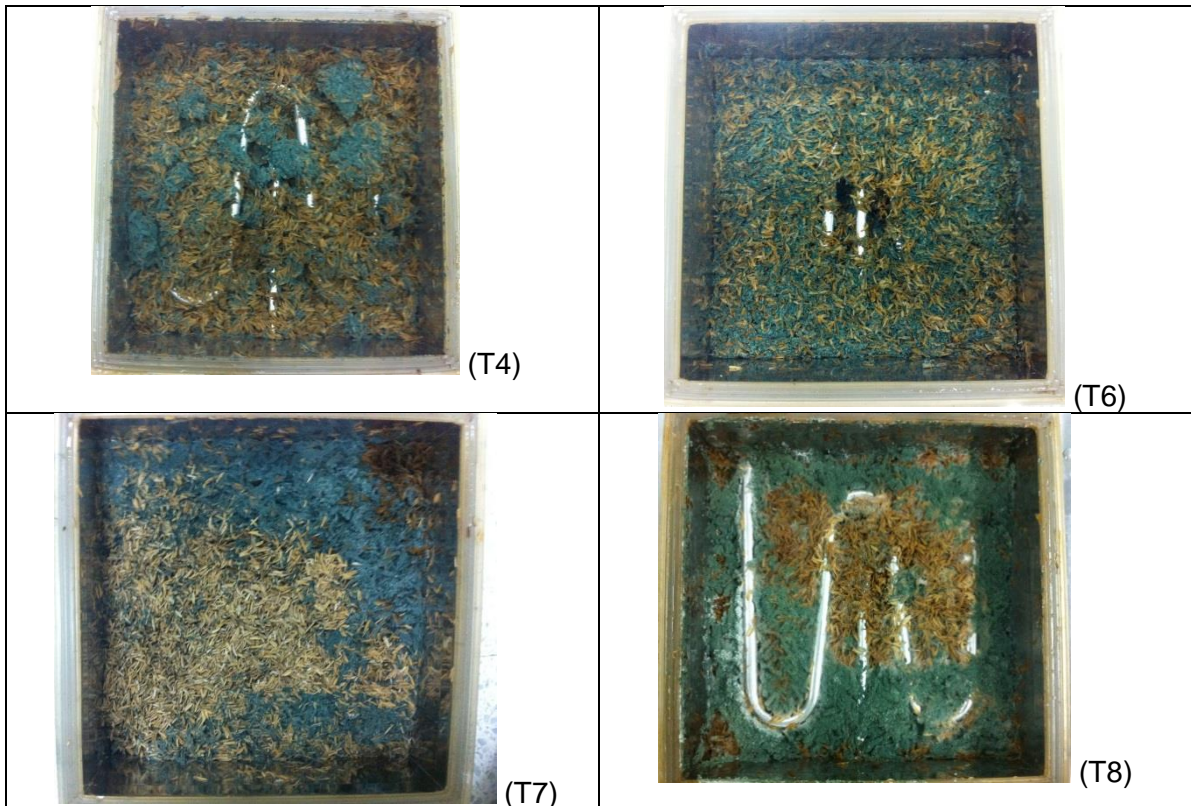
**Figura 3.4:** Detalle del crecimiento de *T. asperellum* Th204 en el soporte espuma de poliuretano (Fotografías tomadas al nivel superior del fermentador)



En la figura 3.4 se muestra el crecimiento de *T. asperellum* Th204 en los tratamientos con espuma de poliuretano, en donde se evidencian los mejores resultados para T1 y T2, con productividades mayores a  $1,0 \times 10^7$  conidios/g.s.h. Para estas fermentaciones, se observa el crecimiento uniforme de *T. asperellum* Th204 en todo el soporte con un característico color verde que indica la esporulación del hongo. Por otro lado, se observa para T3 y T5 un crecimiento parcial y heterogéneo del hongo, encontrándose para el tratamiento T3 la menor productividad con un valor de  $9,38 \times 10^5$  conidios/g.s.h.

Para el caso del soporte inerte natural cascarilla de arroz, las productividades fueron cercanas entre sí, con valores desde  $1,61 \times 10^6$  conidios/g.s.h (T4) al mayor valor para el tratamiento T7 con  $2,83 \times 10^6$  conidios/g.s.h. Sin embargo, en todos los casos se observó que la colonización no fue completa en toda la matriz (Tabla 3.1; Figura 3.5).

**Figura 3.5:** Detalle del crecimiento de *T. asperellum* Th204 en el soporte Cascarilla de arroz (Fotografías tomadas al primer nivel del fermentador)



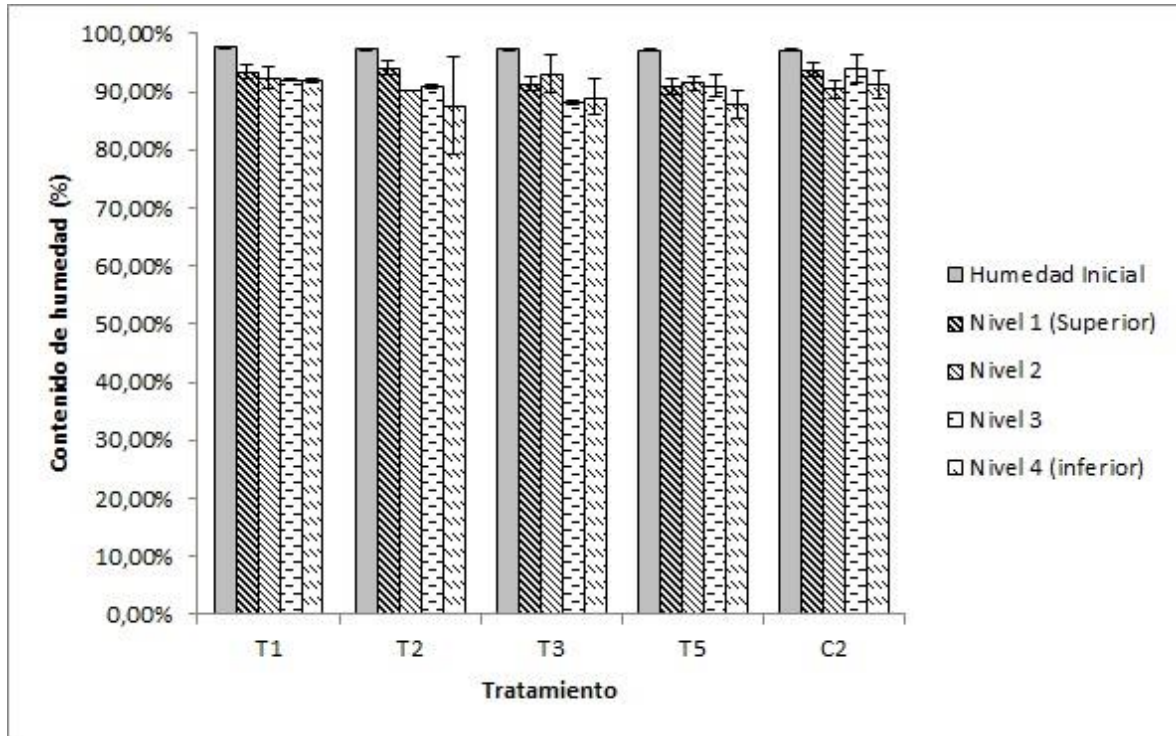
### 3.1.2 Contenido de humedad en el lecho

Las humedades iniciales de los soportes espuma de poliuretano y cascarilla de arroz antes de los procesos de fermentación se determinaron en promedio en 97,5% y 76,9% respectivamente. Al finalizar el día 7 de fermentación el contenido final de humedad de los soportes se determinó para cada nivel. Los resultados evidenciaron que se presentaron pérdidas en el contenido de humedad en ambos soportes en las condiciones evaluadas, siendo mayores con el soporte cascarilla de arroz.

La mayor pérdida de humedad entre los tratamientos de espuma de poliuretano se determinó en 10,23% para el tratamiento T2, mientras que para la cascarilla de arroz la mayor pérdida de humedad fue de 32,1% para el caso del tratamiento T7 (Figura 3.6 y 3.7). A pesar de que muchos factores cambiaron entre tratamientos, se podría inferir que una combinación de flujo de aire en el nivel superior ( $1,13 \text{ m}^3/\text{h}$ ), un contenido de humedad del aire inferior (15%) y una temperatura de  $28^\circ\text{C}$ , favorecerían la capacidad de

del aire para arrastrar el agua presente en el lecho, fenómeno que se observó en los tratamientos T2 y T7.

**Figura 3.6:** Contenido final de humedad de la espuma de poliuretano en las corridas del diseño (1/16)



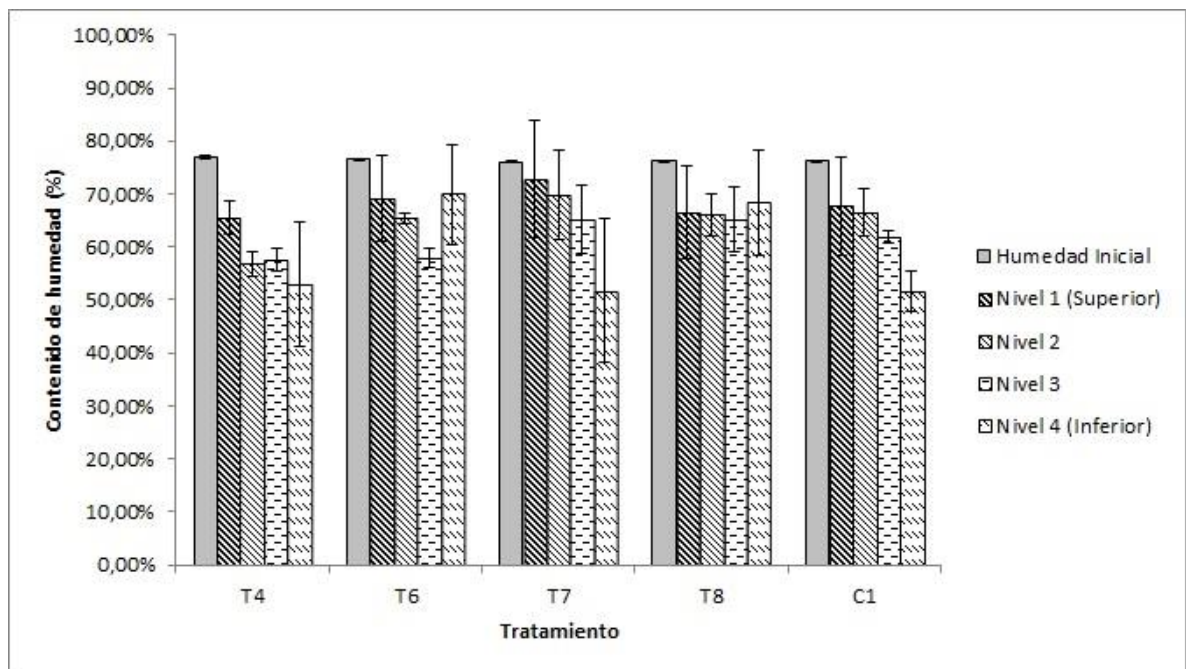
El análisis estadístico permitió encontrar que para todos los tratamientos en espuma de poliuretano (T1, T2, T3, T5 y C2) existió una diferencia significativa en comparación con la humedad inicial (T1:P=0,0001; T2:P=0,0035; T3:P=0,0036; T5:P=0,0036 y C2:P=0.0205  $\alpha=0,05$ ), mientras que no existieron diferencias entre los contenidos de humedad del sustrato entre niveles (T1:P=0,199; T2:P=0,0698; T3:P=0,1087; T5:P=0,1027; C2:P=0.0821;  $\alpha=0,05$ ) (Figura 3.6).

En contraste a lo encontrado en los tratamientos con espuma, para los tratamientos llevados a cabo en cascarilla de arroz se encontraron diferencias significativas en los contenidos de humedad entre niveles, así como con entre éstos y el contenido de humedad inicial. Es así como tanto para T4, T7 y C1 se determinaron diferencias significativas entre niveles (T4:P=0,0152; T7:P=0,0328; C1:P=0.0398:  $\alpha=0,05$ ) observándose diferencias superiores al 20% entre el nivel 1 (superior) y el nivel 4 (inferior).

Por otro lado, para los tratamientos T6, y T8 no se encontraron diferencias significativas entre niveles para el contenido de humedad final del sustrato (T6:  $P=0,0556$ ; T8:  $P=0,1457$ ;  $\alpha=0,05$ ) ( Figura 3.7).

Aunque entre los tratamientos T6 y T8 variaron otros factores, se podría inferir que el flujo de aire entrante relativamente pequeño de  $0,42 \text{ m}^3/\text{h}$  podría haber influido en la homogeneidad encontrada en el contenido de humedad final del sustrato, en contraste con los tratamientos T4 y T7 para los cuales el flujo de aire fue superior con  $1,13 \text{ m}^3/\text{h}$  (Tabla 3.1).

**Figura 3.7:** Contenido final de humedad de la cascarilla de arroz en las corridas del diseño (1/16)



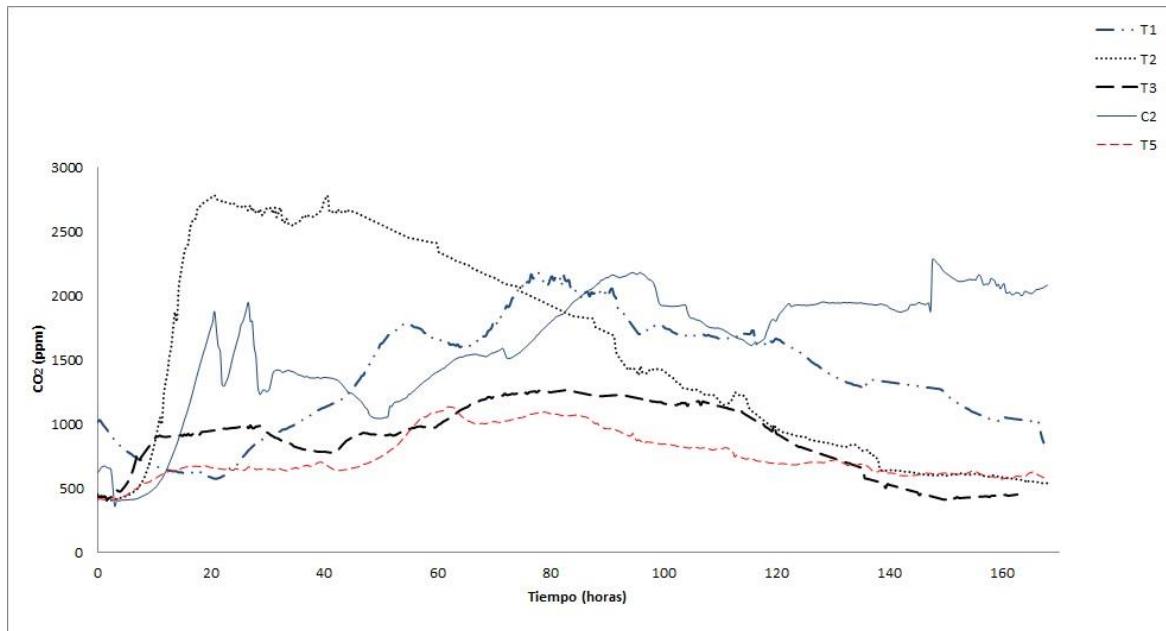
### 3.1.3 Producción de CO<sub>2</sub>

Analizando los perfiles de CO<sub>2</sub> producidos para los tratamientos llevados a cabo con espuma de poliuretano se evidenció que se presentaron los mayores picos de producción para las fermentaciones T1, T2 y C2 para las cuales se alcanzaron concentraciones superiores a los 2000 ppm de CO<sub>2</sub> con valores máximos de 2170, 2780 y 2283 ppm respectivamente (Figura 3.8). Por otro lado, para los tratamientos T3 y T5 la producción de CO<sub>2</sub> y los rendimientos fueron relativamente bajos con valores máximos de 1260 y 1130 ppm. Adicionalmente, las velocidades máximas de producción de CO<sub>2</sub> fueron de

15,12, 23,01, 4,22, 6,35 y 13,17 mg CO<sub>2</sub>/g soporte.h para los tratamientos T1, T2, T3, T5 y C2 respectivamente.

Los resultados de producción de CO<sub>2</sub> y de productividad encontrados permitieron evidenciar una relación directa y proporcional, es así como en los tratamientos con los mayores valores tanto de concentración y como de velocidad de producción de CO<sub>2</sub>, T1, T2 y C2 se encontraron las mayores productividades con  $1,96 \times 10^7$ ,  $2,57 \times 10^7$  y  $7,08 \times 10^6$  conidios/g.s.h respectivamente (Tabla 3.1).

**Figura 3.8:** Perfiles de producción de CO<sub>2</sub> de *T. asperellum* Th204 en el soporte espuma de poliuretano

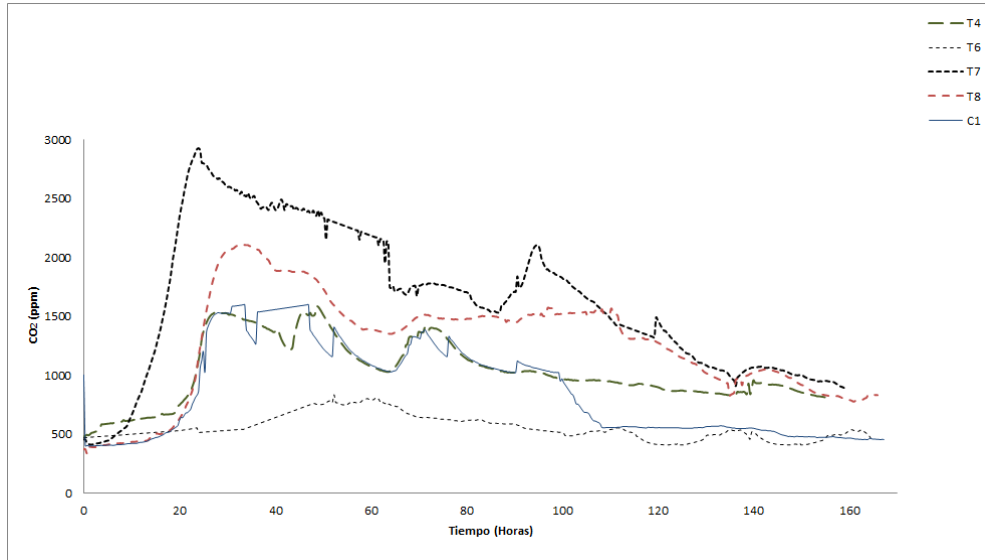


Los perfiles de CO<sub>2</sub> encontrados en las evaluaciones con cascarilla de arroz se presentan en la figura 3.9, de igual forma a lo encontrado con espuma de poliuretano se evidencian las mayores concentraciones de CO<sub>2</sub> en los tratamientos con las mayores productividades, en este caso T7, T8 y C1 con valores de 2917, 2104 y 1599 ppm respectivamente. Por otro lado, los tratamientos con bajas productividades (T4:  $1,61 \times 10^6$  y T6:  $9,35 \times 10^5$ ) los picos máximos de concentración de CO<sub>2</sub> fueron relativamente bajos con valores de 1530 y 802 ppm.

Las velocidades máximas de producción de CO<sub>2</sub> utilizando cascarilla de arroz como soporte fueron sustancialmente inferiores a las encontradas con el soporte espuma de poliuretano, con valores de 0,963, 2,21, 0,745, 0,506 y 0,619 mg CO<sub>2</sub>/g soporte.h para

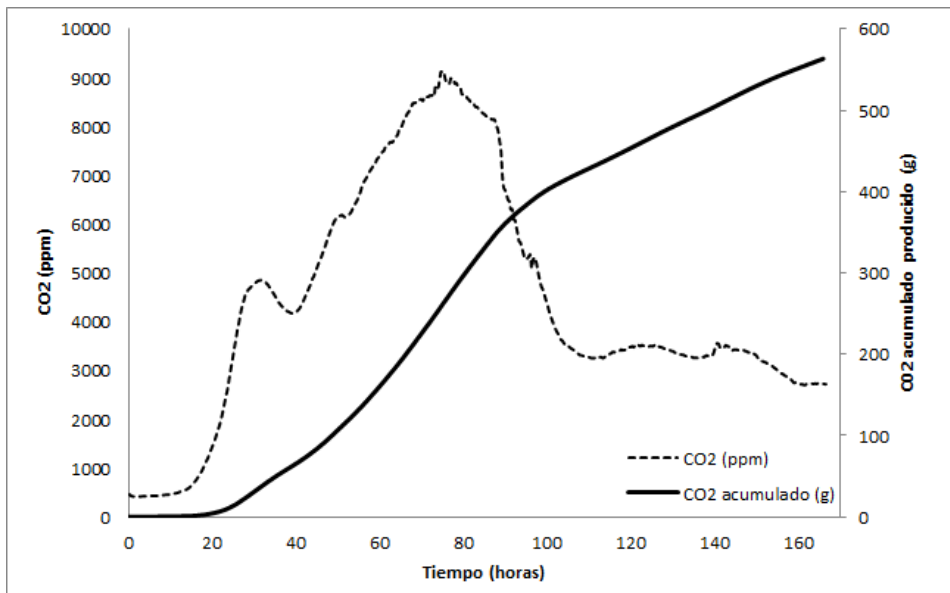
los tratamientos T4, T6, T7, T8 y C1 respectivamente. El excesivo valor de producción de CO<sub>2</sub> encontrado en T6 podría radicar en una baja desorción de CO<sub>2</sub> desde la matriz sólida, fenómeno que se podría haber acentuado con un bajo caudal de aire y una altura de lecho de 8 cm.

**Figura 3.9:** Perfiles de producción de CO<sub>2</sub> de *T. asperellum* Th204 en el soporte Cascarilla de arroz (Diseño Fraccionado 1/16)



En la figura 3.10 se muestra el perfil de CO<sub>2</sub> generado durante la fermentación de *T. asperellum* Th204 creciendo en el sustrato control estándar a base de arroz (E1), en donde se hace evidente la mayor producción de CO<sub>2</sub> durante el tiempo de proceso en comparación con los soportes inertes, llegando a un valor máximo de concentración a la salida de 9098 ppm a las 75 horas.

En general, los perfiles de producción de CO<sub>2</sub> son similares a otros estudios desarrollados en fermentadores de lecho fijo, con valores pico en la salida del gas del fermentador hasta del 4% después de 20 horas de fermentación de *Aspergillus niger* (Saucedo *et al*, 1989) o los determinados por Lareo *et al* (2006) quienes encontraron velocidades de producción de CO<sub>2</sub> hasta de 33,4 (mg CO<sub>2</sub>/ g soporte.h) después de 30 horas en la fermentación de *Mucor bacilliformis* sobre espuma de poliuretano.

**Figura 3.10:** Perfil de producción de CO<sub>2</sub> de *T. asperellum* Th204 en el soporte natural a base de arroz

- **Determinación de la velocidad específica máxima de crecimiento**

Siguiendo el método descrito por Gelmi *et al* (2000) las velocidades específicas máximas de crecimiento para *T. asperellum* Th204 se estimaron utilizando los resultados de respirometría de CO<sub>2</sub> (Anexo C). En la Tabla 3.2 se resumen los resultados de las velocidades específicas de crecimiento para todos los tratamientos llevados a cabo en los dos soportes y el sustrato control.

A pesar de que varios factores cambiaron entre tratamientos, la mayor velocidad específica de crecimiento para *T. asperellum* Th204 se encontró en el tratamiento T2 (0,1631 h<sup>-1</sup>) utilizando espuma de poliuretano.

**Tabla 3.2:** Velocidades específicas máximas de crecimiento para los tratamientos del diseño fraccionado (1/16)

Soporte	Tratamiento	Velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ , h <sup>-1</sup> )
Espuma de Poliuretano	T1	0,0467
	T2	<b>0,1631</b>
	T3	0,0424
	T5	0,0453



	C2	0,0781
Cascarilla de Arroz	T4	0,0863
	T6	0,1027
	T7	0,0756
	T8	0,1282
	C1	0,0547
Natural (Arroz)	E1	0,1401

### 3.1.4 Consumo de O<sub>2</sub>

En todos los tratamientos utilizando tanto espuma de poliuretano como cascarilla de arroz, la evolución del oxígeno consumido se consideró poco variante, puesto que las determinaciones estuvieron en la gran mayoría de los casos superiores a 20,5%v/v e inclusive cercanas al 22%v/v, sugiriendo que durante las fermentaciones el oxígeno se encontró en exceso y no fue un factor limitante. Varios estudios en fermentadores de lecho fijo han coincidido en que la concentración de oxígeno a la salida del biorreactor permanece en valores razonablemente altos, por encima del 18%v/v, incluso a tasas de flujo de aire bajos (Gowthaman *et al*, 1993; Mitchell *et al*, 2006).

Los resultados de consumo de oxígeno en las fermentaciones corroboran los resultados reportados por (Gowthaman *et al*, 1993), quienes determinaron para *Aspergillus niger* concentraciones de oxígeno a la salida no inferiores a 19,8%v/v, utilizando flujos de aire entre 0,9 y 1,2 m<sup>3</sup>/h. Por otro lado, Bajracharya (1980) y más recientemente Chen en 2013 reportaron que las velocidades de transferencia de oxígeno en los procesos SSF son relativamente superiores a las encontradas en la mayoría de los procesos SmF, a causa de una mayor relación de área interfacial por volumen de agua, haciendo más efectiva la transferencia gas-líquido.

### 3.1.5 Perfiles de temperatura en fermentaciones utilizando espuma de poliuretano

Los perfiles de temperatura encontrados en las fermentaciones con espuma de poliuretano presentaron un comportamiento periódico cada 24 horas con temperaturas entre 20 y 37°C, siendo similares a los hallados por Fernández y Pérez (2007) utilizando un modelamiento real de un biorreactor (200 kg) de lecho fijo creciendo *Gibberella fujikuroi* en salvado de trigo y almidón. Igualmente, la mayoría de los picos de

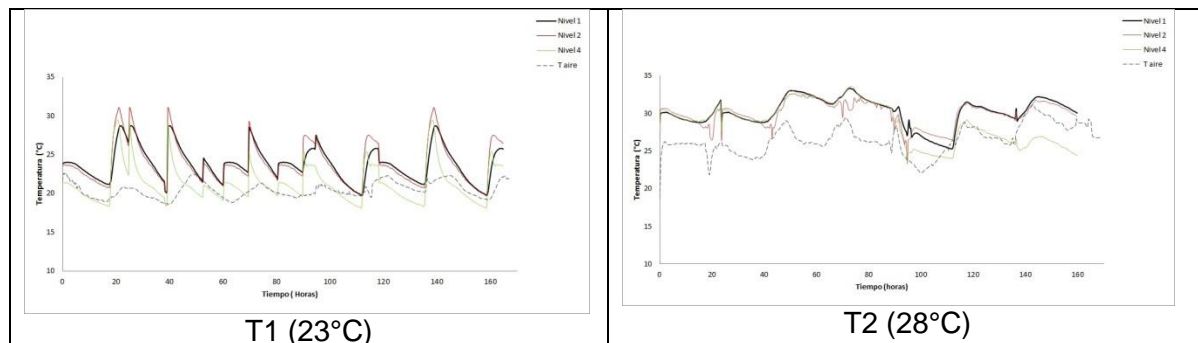
temperatura del lecho se encontraron entre las primeras 30 y 50 horas de fermentación, resultados similares a otros perfiles de temperatura del lecho reportados en otros estudios de fermentación sólida en lecho empacado (Fanaei y Vaziri, 2008; Chen *et al*, 2005; Mitchell *et al*, 1999).

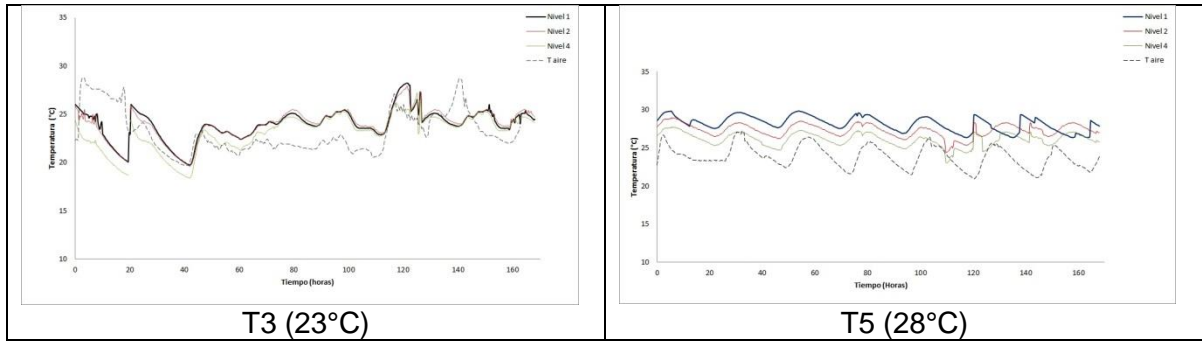
Para el caso de la espuma de poliuretano, los resultados de temperatura promedio encontrados después de los 7 días de fermentación permitieron inferir que la temperatura se mantuvo cerca de la temperatura de evaluación. Adicionalmente, los valores de los gradientes axiales de temperatura promedio estuvieron entre 0,028 y 0,1045 °C/cm, con un gradiente de temperatura máximo encontrado en el tratamiento T2 de 3,65°C (0,18°C/cm) (Tabla 3.3).

En cuanto a la fermentación T3, en donde la productividad fue la más baja utilizando espuma de poliuretano como soporte, las temperaturas dentro de los niveles 1, 2 y 3 del fermentador promediaron los 23,95°C, 23,96°C y 23,1°C respectivamente. Mientras que la temperatura del aire varió entre un mínimo de 19,7°C y un máximo de 28,8°C, con un comportamiento periódico de 24 horas (Figura 3.11 T3).

Por último, para el tratamiento T5 se encontró el mayor gradiente axial de temperatura utilizando espuma de poliuretano como soporte, con un valor de 4,45°C (0,22°C/cm) a las 109,6 horas de fermentación. Resultados similares encontraron Gutiérrez *et al* (1996) quienes determinaron para el crecimiento de *Aspergillus niger* sobre el soporte inerte Amberlita en un fermentador de lecho fijo gradientes de temperatura axiales de 0,42°C/cm.

**Figura 3.11:** Perfiles de Temperatura: Tres niveles (1, 2,4); aire de salida para las fermentaciones en el soporte espuma de poliuretano



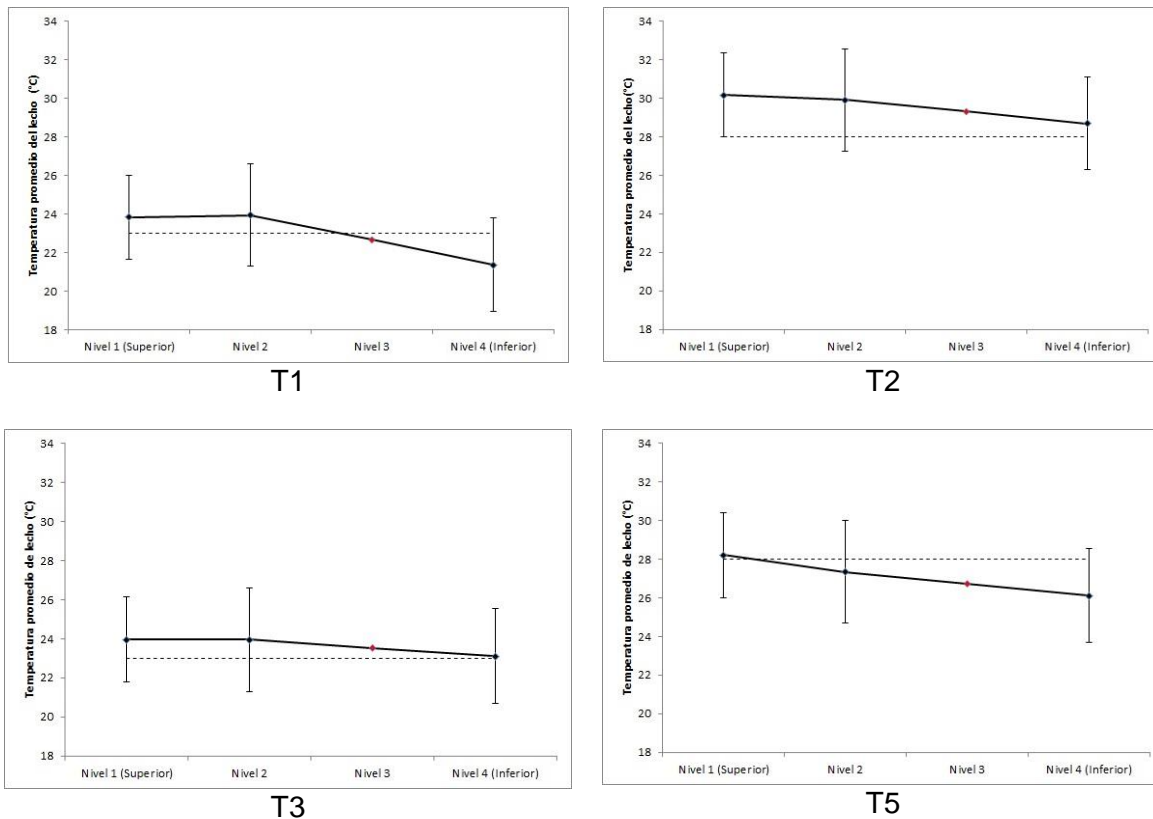


**Tabla 3.3:** Temperatura promedio del lecho y gradientes promedio de temperatura axiales en las fermentaciones con espuma de poliuretano

Tratamiento	Nivel	Gradiente de T (°C/cm)
T1	1 (Superior)	Promedio: 0,077°C/cm Max. 0,13°C/cm
	2	
	4 (Inferior)	
T2	1 (Superior)	Promedio: 0,072°C/cm Max. 0,18°C/cm
	2	
	4 (Inferior)	
T3	1 (Superior)	Promedio: 0,028°C/cm Max. 0,11°C/cm
	2	
	4 (Inferior)	
T5	1 (Superior)	Promedio: 0,1045°C/cm Max. 0,22°C/cm
	2	
	4 (Inferior)	

La figura 3.12 demuestra que para todos los tratamientos independientemente de la temperatura evaluado (23-28°C serie punteada) los perfiles generales de temperatura del lecho dentro del fermentador aumentaron desde la parte inferior (Nivel 4) hacia la parte superior (Nivel 1), adicionalmente, este análisis sugiere la presencia de un gradiente de temperatura permanente durante del proceso. Por último, teniendo en cuenta las barras de error se podría inferir que la temperatura del lecho dentro del fermentador su mantuvo bajo control en función de la temperatura de incubación deseada (serie punteada) ya que esta siempre se mantuvo dentro de las tolerancias ( $\pm 1\sigma$ ).

**Figura 3.12:** Perfiles de Temperatura del fermentador PROPHYTA® L05 para los tratamientos con espuma de poliuretano (T1, T2, T3 y T5)



### 3.1.6 Perfiles de temperatura en fermentaciones utilizando cascarilla de arroz

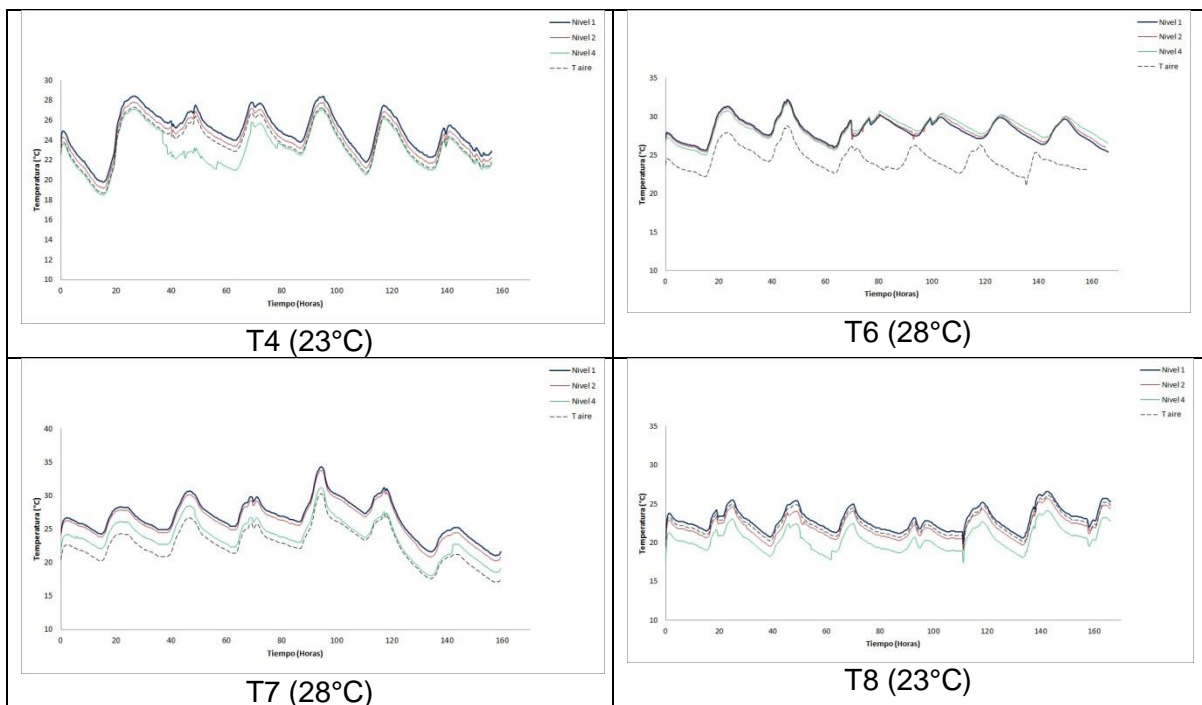
En la figura 3.13 se muestra el comportamiento de las temperaturas del lecho en los diferentes niveles para los tratamientos con cascarilla de arroz, en donde se observa un comportamiento similar a lo descrito para el soporte espuma de poliuretano. A pesar de que cada tratamiento es distinto en cuanto a los valores de los otros factores, como la humedad del aire, la relación de inoculación, la relación C/N y el flujo de aire, se puede inferir que el comportamiento térmico del fermentador en cuanto al lecho tienen la misma tendencia de calentamiento desde la parte inferior hacia la parte superior.

Para el tratamiento T4 las temperaturas de los niveles promediaron 24,83°C, 24,23°C y 23,07°C para los niveles 1, 2 y 4 respectivamente, con el mayor gradiente de temperatura de 4,6°C (0,23 °C/cm) después de 50 horas de fermentación con una temperatura del aire de salida promedio de 23,7 ± 2,05°C. Para el tratamiento T6 se encontraron los

menores gradientes axiales de temperatura promedio ( $0,005\text{ }^{\circ}\text{C/cm}$ ) y máximo ( $0,018^{\circ}\text{C/cm}$ ) indicando una relativa homogeneidad en esta variable (Tabla 3.4).

Resultados similares con otro soporte natural inerte fueron encontrados por Chen *et al* (2005), quienes utilizando salvado de trigo para la fermentación de *Penicillium decumbes* determinaron un gradiente máximo de temperatura de  $0,12^{\circ}\text{C/cm}$  en un lecho de 9 cm. En otro estudio, Fanaei y Vaziri (2008) determinaron por modelamiento gradientes axiales de temperatura superiores a  $0,29^{\circ}\text{C/cm}$  en un fermentador de lecho de 17 cm de altura teniendo como modelo el crecimiento de *Aspergillus niger*.

**Figura 3.13:** Perfiles de Temperatura del aire de salida para las fermentaciones en el soporte Cascarilla de arroz



**Tabla 3.4:** Temperatura promedio del lecho y gradientes promedio de temperatura en las fermentaciones con cascarilla de arroz

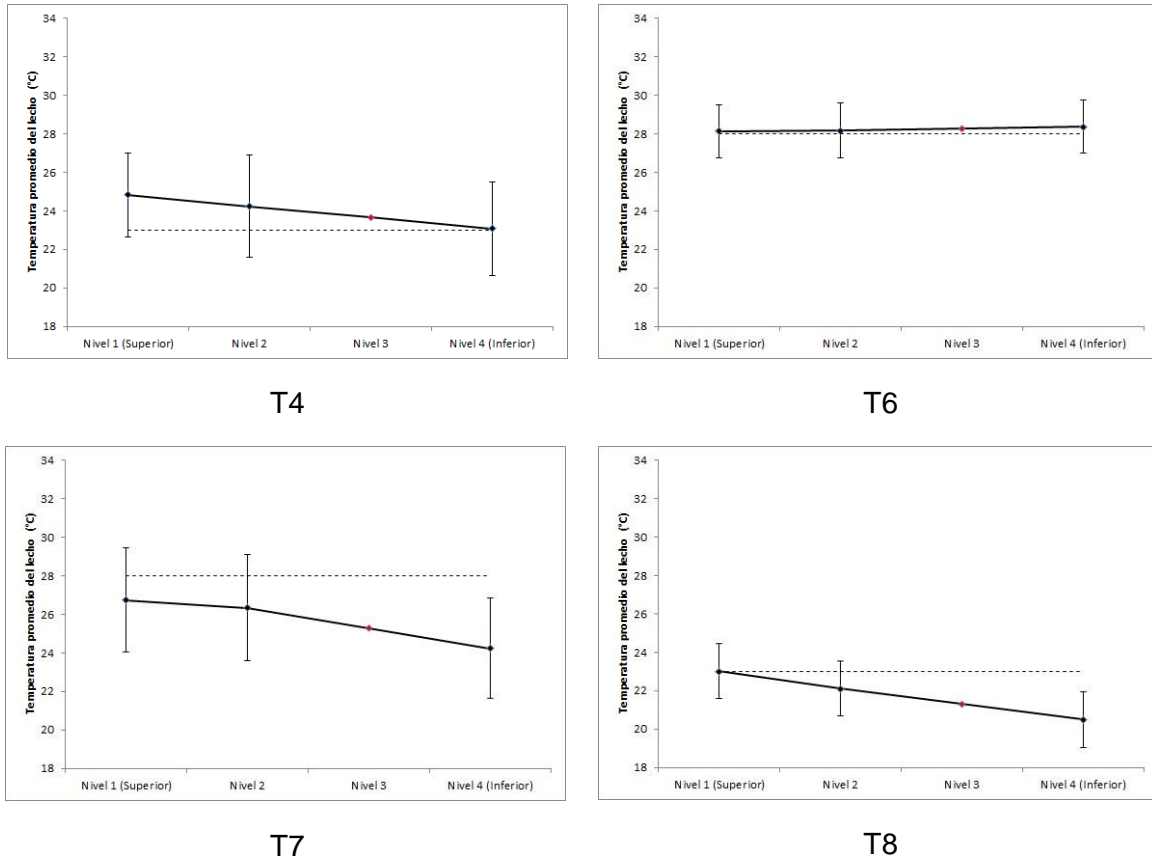
Tratamiento	Nivel	Gradiente de T ( $^{\circ}\text{C/cm}$ )
T4	1 (Superior)	Promedio: $0,087^{\circ}\text{C/cm}$ Max. $0,23^{\circ}\text{C/cm}$
	2	
	4 (Inferior)	
T6	1 (Superior)	Promedio: $0,005^{\circ}\text{C/cm}$ Max. $0,018^{\circ}\text{C/cm}$
	2	
	4 (Inferior)	

T7	1 (Superior)	Promedio: 0,14°C/cm Max. 0,18°C/cm
	2	
	4 (Inferior)	
T8	1 (Superior)	Promedio: 0,13°C/cm Max. 0,19°C/cm
	2	
	4 (Inferior)	

En la figura 3.14 se puede destacar el tratamiento T6 donde la temperatura promedio del lecho se mantuvo muy cercana a la del control, caso contrario a lo encontrado en los tratamientos T7 y T8, donde para el nivel 4 la temperatura promedio del lecho se encontró por fuera de las tolerancias (Barras de error  $\pm 1\sigma$ ) indicando que esta combinación de factores tendría un efecto negativo sobre las velocidades de transferencia de calor entre el baño termostático y el lecho del fermentador, posiblemente por el significativo gradiente en el contenido de humedad del sustrato encontrado en este tratamiento (Figura 3.7).

En general, los gradientes axiales de temperatura son imposibles de evitar en los fermentadores de lecho fijo debido a la utilización de la refrigeración por convección utilizando el flujo unidireccional del aire (Aslhey *et al*, 1999). De hecho, estos gradientes de temperatura pueden ser considerados como de pseudo-estado estacionario ya que dependen de la tasa de crecimiento del microorganismo y pueden cambiar relativamente de forma lenta durante la fermentación (Weber *et al*, 1999). Por otro lado, la velocidad superficial del aire es una variable clave para la operación en un fermentador de lecho fijo, ya que permite una disminución en la diferencia de temperaturas entre la entrada y la salida (Mitchell *et al*, 1999). Fenómeno que se observó en los tratamientos T6 con una combinación de flujo de aire bajo y saturado del mismo impidiendo una alta tasa de evaporación del agua del soporte en especial en el nivel 4 (inferior) del fermentador (Figura 3.14 T6).

**Figura 3.14:** Perfiles de Temperatura del fermentador PROPHYTA® L05 para los tratamientos con Cascarilla de arroz (T4, T6, T7 y T8)



### 3.1.7 Caída de presión en el lecho

En la tabla 3.5 se observa que en general los valores de caída de presión encontrados fueron mayores al utilizar cascarilla de arroz como soporte, llegando a tener un valor máximo de 13,77 mmHg (T6), mientras que para la espuma de poliuretano el máximo valor registrado fue de 4,69 mmHg (T1). A pesar de que entre los tratamientos otros factores como las relaciones de inoculación y C/N fueron diferentes se podría inferir sobre la existencia de una correlación entre el flujo de aire alimentado y las pequeñas caídas de presión. Es el caso de los tratamientos T3 (espuma) y T8 (cascarilla) para los cuales se encontraron caídas de presión relativamente pequeñas inferiores a 2 mmHg, teniendo como factor común la alimentación de un flujo de aire bajo y seco ( $0,42 \text{ m}^3/\text{h}$ ).

**Tabla 3.5:** Caídas de presión ( $\Delta P$ ) promedio y máxima encontradas en las fermentaciones del diseño fraccionado 1/16

Tratamiento	$\Delta P$ promedio (mmHg)	$\Delta P$ máximo (mmHg)
T1	1,86 $\pm$ 0,94	4,69
T2	2,36 $\pm$ 0,25	2,58
T3	1,19 $\pm$ 0,40	2,01
T4	3,96 $\pm$ 0,48	5,21
T5	3,41 $\pm$ 0,29	3,47
T6	11,47 $\pm$ 2,07	13,77
T7	5,93 $\pm$ 0,78	7,11
T8	1,20 $\pm$ 0,34	2,10
C1	3,58 $\pm$ 0,18	3,89
C2	2,34 $\pm$ 0,12	2,54
E1	12,91 $\pm$ 5,53	15,92

Con el propósito de comparar el comportamiento de la caída de presión entre los soportes y el sustrato control (E1) se decidió escoger los tratamientos con condiciones similares como fueron la misma altura del lecho y el caudal de aire (presión de aire entrante). Es así como se escogieron los tratamientos T2 y T4 por presentar una altura de lecho de 5 cm y un caudal de aire saturado de 1,13 m<sup>3</sup>/h, equivalentes a una presión de entrada de 24,2 mbar (Línea superior) (Figura 3.15).

Los perfiles de caída de presión son sustancialmente diferentes en especial el del soporte natural en comparación con los soportes inertes. La caída de presión utilizando el sustrato natural (E1) alcanzó valores hasta de 15,92 mmHg o 21,17 mbar (1,05 mbar/cm) a las 128,4 horas de fermentación. Este resultado permitió inferir que con el sustrato natural estándar se podría llegar a perder hasta el 87,5% de la presión del aire de entrada al finalizar la fermentación. Estos valores son excesivamente altos, teniendo un riesgo alto de taponamiento total generando una aireación nula en los niveles superiores.

Por otro lado, con el soporte natural cascarilla de arroz (T4) la máxima caída de presión registrada fue de 5,21 mmHg equivalentes a 6,94 mbar (0,347 mbar/cm) a las 145,3 horas de proceso, siendo ésta caída de presión el 28,2% de la presión del aire de entrada. Este valor es cercano al reportado por Srinives *et al* (2010), quienes utilizando un lecho de cascarilla de arroz de 0,5 metros encontraron caídas de presión hasta de 8,04 mbar.

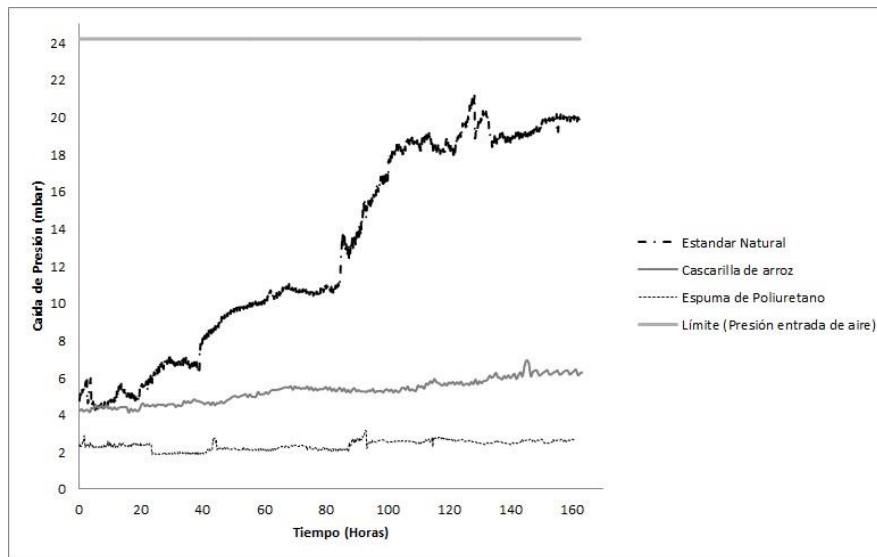


Por último, utilizando la espuma de poliuretano (T2) el perfil de caída de presión se comportó linealmente con una pequeña pendiente, siendo el valor máximo registrado de 2,58 mmHg (3,44 mbar, 0,172 mbar/cm) a las 92,8 horas de fermentación, equivalentes al 13% de la presión de aire entrante (Figura 3.15). Karimi *et al* (2014) reportaron perfiles de caída de presión muy similares para la fermentación de *A. niger* en salvado, con los máximos valores finalizando el proceso, utilizando biorreactores de 2,5 cm de diámetro y 20 cm de altura registraron una máxima caída de presión de 80 mbar (4 mbar/cm). Chen (2013) reportó estudios con caídas de presión en resinas macroporosas de 0,637 mbar/cm en fermentadores de 6,5 cm de altura y 2 cm de diámetro, y hasta de 2,18 mbar/cm en el mismo fermentador utilizando bagazo de caña.

Los perfiles de caída de presión sugieren que utilizando el sustrato natural la altura máxima permitida del lecho en las condiciones evaluadas (velocidad superficial de aire 0,005 m/s) no superaría los 0,5 m, con alturas superiores existiría un alto riesgo de nula aireación en la parte superior del biorreactor, fenómeno descrito por Mitchell *et al* (1999) quienes determinaron una relación directa entre la altura crítica del lecho y la velocidad superficial del aire. Para el caso de los soportes inertes, la altura crítica del lecho sería significativamente superior a la del sustrato estándar, de esta forma para estos casos la altura crítica dependería de los gradientes de humedad y de temperatura permitidos para el proceso.

Con la utilización de soportes inertes como la cascarilla de arroz o la espuma de poliuretano se reducirían los problemas ocasionados por la caída de presión, como la reducción del flujo de aire, la poca transferencia de masa ( $O_2$  y  $CO_2$ ) en la parte superior del lecho y el desfavorable fenómeno de canalización (Mitchell *et al*, 2006; Mitchell *et al*, 2000; Karimi *et al*, 2014). Es conocido que la caída de presión se ha convertido en uno de los más importantes parámetros en los fermentadores de lecho empacado, siendo creciente su importancia con la escala de trabajo a nivel técnico y económico (Khanahmadi *et al*. 2006), de esta forma para la selección del medio de cultivo la evolución de la caída de presión de aire a través de lecho deberá ser considerada. Las menores caídas de presión encontradas en las fermentaciones utilizando espuma de poliuretano sugieren a este material como promisorio para operar en mayores escalas en fermentadores de lecho empacado con elevadas alturas.

**Figura 3.15:** Caída de presión del aire a través del sustrato natural estándar y los soportes inertes cascarilla de arroz y espuma de poliuretano



Teniendo en cuenta los resultados encontrados con el diseño fraccionado 1/16 se seleccionó a la espuma de poliuretano como el mejor soporte para el crecimiento y producción de conidios de *T. asperellum* Th204. Con la espuma de poliuretano se obtuvieron las mayores productividades de Th204 en conidios, con los menores gradientes de humedad, temperatura del lecho controlable y las menores caídas de presión en comparación con el soporte cascarilla de arroz y el sustrato estándar a base de arroz. Adicionalmente, con una mayor relación de conidios producidos por peso seco de soporte, con la espuma de poliuretano se necesitaría un menor peso en comparación a la cascarilla de arroz para una determinada cantidad de conidios de *T. asperellum* Th204, ventaja que a nivel logístico podría ser muy importante.

Finalmente, se determinó para este espacio experimental los factores relación C/N y el caudal de aire como los dos factores a optimizar para maximizar la producción de conidios de Th204. De esta forma, para la optimización de los factores críticos, los factores cuyos efectos fijos no fueron significativos se mantuvieron en los valores para los cuales favorecieron la productividad de Th204. Es así como los factores con efectos positivos sobre la productividad como la temperatura y el contenido de humedad del aire se mantuvieron para las fermentaciones de optimización en 28°C y 95% respectivamente. Por otro lado, para los factores con efecto negativo sobre la productividad, sus valores se mantuvieron en los niveles inferiores anteriormente

evaluados, de esta forma la altura de lecho se mantuvo en 5 cm y la relación de inoculación en  $1,0 \times 10^7$  conidios/ g seco de soporte.

### **3.2 Generación de un modelo de respuesta de la concentración final de *T. asperellum* Th204 en función de los factores críticos**

Una vez seleccionado la espuma de poliuretano como el mejor soporte para la producción de *T. asperellum* Th204, se planteó la optimización de la productividad en función de los factores críticos determinados anteriormente (relación C/N y el caudal de aire), generando un modelo de superficie de respuesta utilizando un diseño central compuesto con 11 tratamientos incluyendo tres repeticiones en el punto central. Se evaluaron 5 niveles de la relación C/N: (9,2, 10,5, 13,6 (punto central), 16,8 y 18,1) y 5 niveles para el caudal de aire (0,33, 0,56, 1,13 (punto central), 1,70 y 1,93 m<sup>3</sup>/h) (Tabla 3.6).

Igualmente al diseño experimental fraccionado (numeral 3,1), las variables respuesta fueron el logaritmo de la productividad de conidios de Th204 (conidios/g.s.h), la velocidad específica máxima de crecimiento (Gelmi *et al*, 2000), el contenido de humedad final del soporte (gradiente de humedad relativo), la temperatura entre niveles (gradiente de temperatura axial promedio) y la caída de presión (caída de presión relativo) a través del lecho del sustrato.

Para todos los tratamientos se mantuvieron las siguientes condiciones: temperatura de incubación 28°C, altura de lecho 5 cm y una relación de inoculación de  $1,0 \times 10^7$  conidios/ g soporte.

#### **3.2.1 Influencia de los factores críticos sobre la productividad de *T. asperellum* Th204**

En la tabla 3.6 se evidencia que la mayor productividad ( $3,89 \times 10^7$  conidios/g.s.h) se alcanzó en el tratamiento 8 con la mayor relación C/N (18,1) y el nivel central del caudal de aire 1,13 m<sup>3</sup>/h. Mientras que la menor productividad se encontró en el tratamiento 11 con un valor de  $6,17 \times 10^7$  conidios/g.s.h al trabajar con un caudal de aire de 1,70 m<sup>3</sup>/h y una relación C/N de 10,5.

Los resultados del diseño de optimización fueron en promedio superiores a los encontrados con el diseño fraccionado, demostrando que las condiciones de trabajo en estas fermentaciones realizadas fueron en general más favorables.

**Tabla 3.6:** Productividad de *T. asperellum* Th204 en la fermentación sólida en el fermentador PROPHYTA® L05 (Diseño Central Compuesto).

Tratamiento	C/N	Caudal de aire saturado entrante (m <sup>3</sup> /h)	Productividad (conidios /g.s.h)	Log (Productividad)
1	13,6	1,13	1,20x10 <sup>7</sup>	7,08
2	16,8	0,56	2,24x10 <sup>7</sup>	7,35
3	9,20	1,13	1,17x10 <sup>7</sup>	7,07
4	16,8	1,70	1,58x10 <sup>7</sup>	7,20
5	13,6	1,13	1,55x10 <sup>7</sup>	7,19
6	13,6	0,33	1,86x10 <sup>7</sup>	7,27
7	10,5	0,56	8,91x10 <sup>6</sup>	6,95
8	13,6	1,13	3,89x10 <sup>7</sup>	7,59
9	13,6	1,93	7,08x10 <sup>6</sup>	6,85
10	18,1	1,13	3,16x10 <sup>7</sup>	7,50
11	10,5	1,70	6,17x10 <sup>6</sup>	6,79

En cuanto a la ecuación ajustada del modelo, se encontró una relación de segundo nivel con un ajuste de regresión superior a 0,72. De esta forma se puede inferir que cerca del 72% de la variabilidad del sistema en cuanto a la productividad de conidios de Th204 se podría predecir con la evaluación de los dos factores críticos, la relación C/N y el caudal de aire de entrada (m<sup>3</sup>/h). Resultados similares en cuanto al ajuste del modelo para este tipo de diseños en procesos de fermentación sólida en lecho fijo fueron encontrados por Cavalcanti *et al* (2005) quienes en estudios para la optimización de la producción de lipasa por *Penicillium simplicissimum* con la temperatura y el flujo de aire como variables reportaron un ajuste del 72%.

El ajuste del modelo central compuesto es sustancialmente inferior al primer modelo generado con el diseño fraccionado, en el cual su ajuste fue superior al 97% (numeral 3.1). No obstante, el primer modelo era más restrictivo en cuanto a los factores críticos caudal de aire y relación C/N, con caudales de aire entre 0,425 y 1,13 m<sup>3</sup>/h y relaciones C/N entre 6 y 8. Por otro lado, para el segundo modelo la productividad se podría modelar en un espacio experimental más grande con un menor ajuste, con valores de caudal de aire entre 0,33 y 1,93 m<sup>3</sup>/h y relaciones C/N entre 9,2 y 18,1.

La ecuación de ajuste del diseño central compuesto se presenta a continuación:

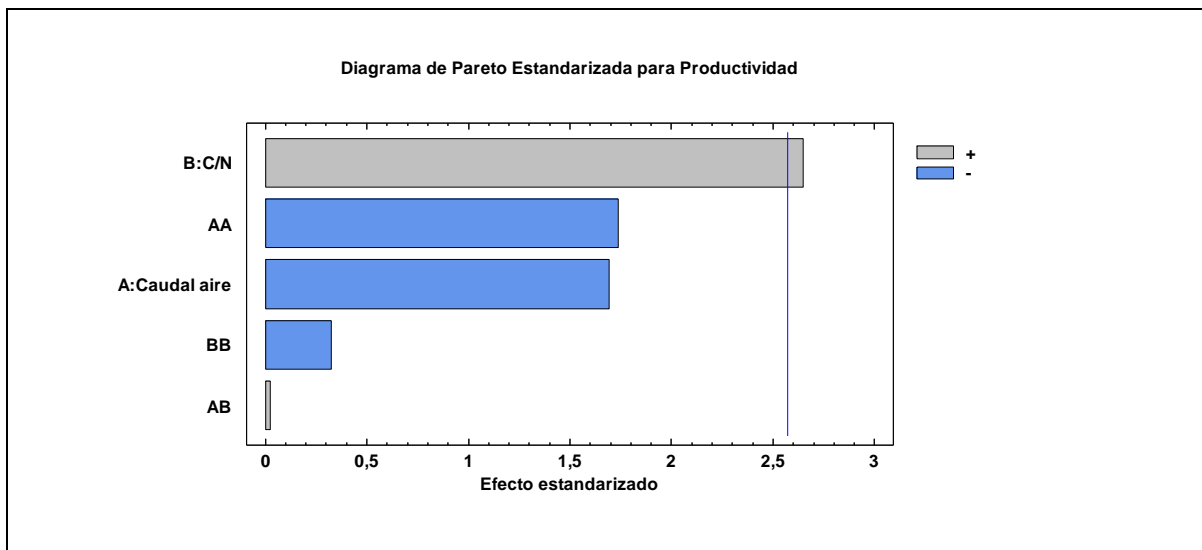
$$\text{Log (Productividad)} = 5,72813 + 0,757741 \cdot \text{Caudal aire} + 0,125764 \cdot \text{C/N} - 0,43105 \cdot \text{Caudal aire}^2 + 0,00140097 \cdot \text{Caudal aire} \cdot \text{C/N} - 0,00260352 \cdot \text{C/N}^2$$

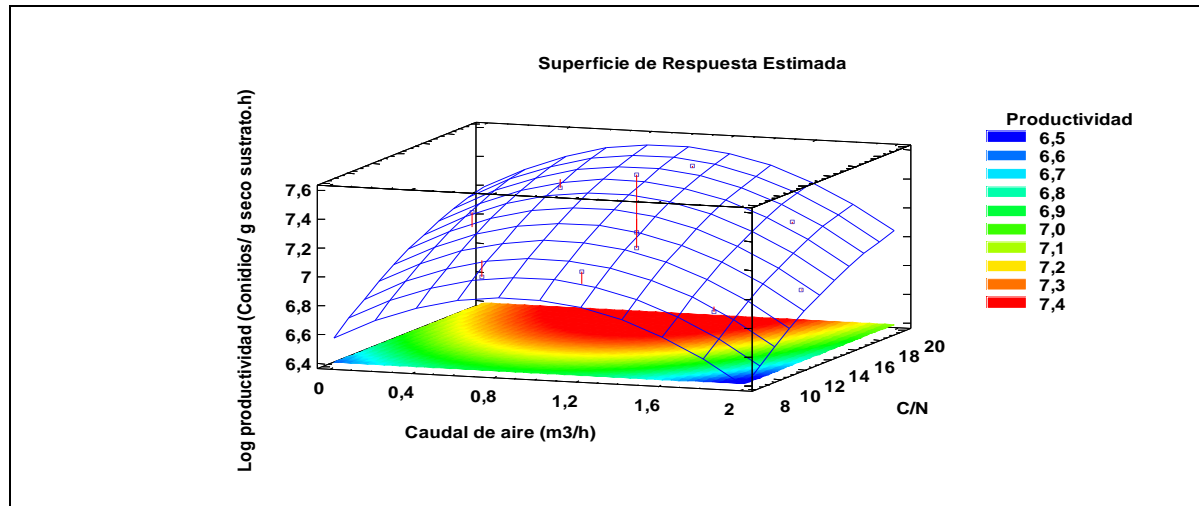
$R^2 = 72.09$  por ciento

El diagrama de Pareto de la figura 3.16 evidencia que para el diseño de optimización el factor C/N tiene una incidencia significativa sobre la variable respuesta (productividad) ( $P=0,0045$ ). Por otro lado, en el espacio experimental evaluado, el factor caudal de aire tiene un efecto negativo, sin embargo este no es significativo sobre la variable respuesta (Anexo B).

En la figura 3.16 se muestra la superficie de respuesta generada, en donde se evidencia el efecto entre los dos factores críticos, sobre la productividad de Th204. Se puede observar que la producción de conidios de *T. asperellum* Th204 se favorece con caudales de aire entre 0,8 y 1,4 m<sup>3</sup>/h y con relaciones C/N superiores a 16. Adicionalmente, los resultados permiten predecir que se obtendrían bajas productividades con las combinaciones de relaciones C/N bajas (inferiores a 8) con caudales de aire tanto altos (superiores a 1,8 m<sup>3</sup>/h) como bajos (inferiores a 0,3 m<sup>3</sup>/h). Utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVI.II se encontró un **óptimo de Log productividad de 7,50 equivalente a 3,16x10<sup>7</sup> conidios/g.s.h utilizando la combinación de flujo de aire de 0,90 m<sup>3</sup>/h y una relación C/N de 18,1.**

**Figura 3.16:** Diagrama de Pareto y superficie de respuesta para la variable Log productividad, para los 2 factores críticos (relación C/N y caudal de aire)





En cuanto a la relación C/N, resultados similares fueron encontrados por Santos *et al* (2012) quienes estudiaron el efecto de la relación C/N y el contenido de humedad sobre la fermentación sólida de *T. asperellum* T8a con cáscaras de mango y espuma de poliuretano como matrices sólidas. Es este estudio se determinó una relación óptima de C/N de 26, alcanzando concentraciones máximas en ambos casos de  $7,6 \times 10^9$  conidios/g equivalentes a  $3,97 \times 10^7$  conidios/g.s.h.

Según los estudios de Gao y Liu (2009) con diferentes géneros de hongos, el valor óptimo de la relación C/N para la esporulación es diferente al valor óptimo para el crecimiento micelial, siendo estos dependientes de la especie y el aislamiento. Para el caso de *Trichoderma viride* TV-1 formularon un amplio intervalo de crecimiento para relaciones C/N entre 10 y 40 encontrando el óptimo en una relación C/N de 10, no obstante sugirieron que el crecimiento de la cepa de *Trichoderma* se ve más afectada por la relación C/N que por las concentraciones de C y N independientes. De esta forma se puede inferir que mayores relaciones C/N utilizando concentraciones altas de carbono no tendrían mayor efecto en la producción de conidios de Th204, pero si en los costos asociados para preparar el medio de cultivo.

Para el caudal de aire de entrada el efecto deletéreo en valores superiores a  $1,8 \text{ m}^3/\text{h}$  se podría deber a los daños causados por el estrés de cizallamiento en el hongo y principalmente a la reducción del contenido de humedad de la matriz sólida, disminuyendo la  $a_w$  e impidiendo el crecimiento del hongo, fenómeno que ha sido

descrito en fermentadores de lecho fijo por otros autores (Lonsane *et al*, 1985; Lu *et al*, 1997).

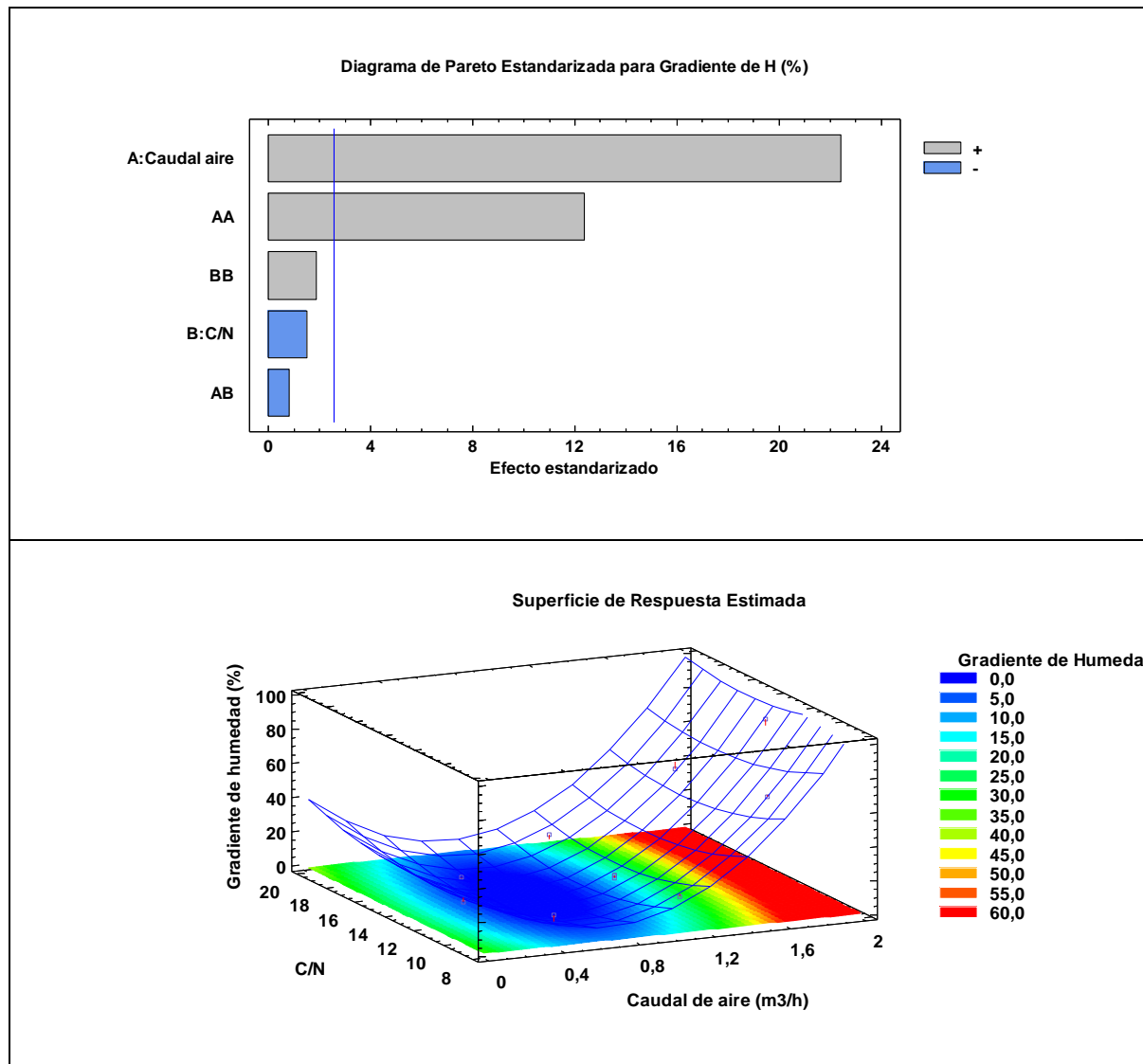
### 3.2.2 Influencia de los factores críticos sobre el gradiente de humedad del lecho

Para el gradiente de humedad del lecho se encontraron valores desde 1,1% (T2) hasta 90,7% (T9) (Tabla 3.7). El factor crítico caudal de aire resultó tener un efecto significativo y positivo sobre esta variable ( $P=0,00001$ ), contrario a lo encontrado con la relación C/N donde su efecto fue negativo y no significativo ( $P=0,1927$ ) (Figura 3.17). Este resultado coincide con lo expresado por Mitchell *et al* (2006) quienes concluyen que el aire que atraviesa el lecho en los fermentadores PBB sumado a la presencia de gradientes de temperatura axiales favorecen el arrastre de la humedad de abajo hacia arriba, inclusive cuando éste se alimenta saturado. Este fenómeno se acentúa con mayores caudales de aire como se evidencia en la figura 3.17 donde con caudales superiores a  $1,6 \text{ m}^3/\text{h}$  se podrían ocasionar gradientes de humedad superiores al 60% en el lecho de espuma. Este fenómeno fue evidenciado en el tratamiento 9 (flujo de aire  $1,93 \text{ m}^3/\text{h}$ ) donde el gradiente de humedad fue superior al 90%. Por otro lado, con caudales de aire entre  $0,4$  y  $1 \text{ m}^3/\text{h}$  los gradientes de humedad al finalizar la fermentación de Th204 serían inferiores al 5% (Figura 3.17).

**Tabla 3.7:** Gradiente de humedad del lecho de los tratamientos del diseño central compuesto

Tratamiento	C/N	Caudal de aire entrante ( $\text{m}^3/\text{h}$ )	Gradiente H (%)
1	13,7	1,13	8,6
2	16,8	0,56	1,1
3	9,20	1,13	14,8
4	16,8	1,70	51,1
5	13,7	1,13	7,2
6	13,7	0,33	2,5
7	10,5	0,56	5,2
8	13,7	1,13	8,9
9	13,7	1,93	90,7
10	18,1	1,13	13,8
11	10,5	1,70	61,1

**Figura 3.17:** Diagrama de Pareto y superficie de respuesta para la variable gradiente de humedad, para los 2 factores críticos (relación C/N y caudal de aire)



Gowthaman *et al* (1993); Ghildyal *et al* (1994) reportaron resultados similares para el gradiente de humedad en el lecho, en la fermentación de *A. niger* en salvado de trigo para lechos de 28 cm, con pérdidas del contenido de humedad entre el 20% y el 60% para caudales de aire desde 0,9 hasta 1,5 m<sup>3</sup>/h respectivamente.



### 3.2.3 Influencia de los factores críticos sobre el gradiente de temperatura axial promedio

Para el gradiente de temperatura axial se encontraron valores desde  $-1,13^{\circ}\text{C}$  (T6) hasta  $5,6^{\circ}\text{C}$  (T4 y T11) (Tabla 3.8). Con el análisis de Pareto se determinó para el factor caudal de aire entrante un efecto significativo sobre la variable gradiente de temperatura ( $P=0,0030$ ) y un efecto negativo pero no significativo del factor relación C/N ( $P=0,6321$ ) (Figura 4.18: Anexo B). Estos resultados se pueden relacionar con la tasa de evaporación de humedad, la cual es directamente proporcional al caudal de aire alimentado. Con mayores caudales de aire el contenido de humedad del nivel 4 cae rápidamente mientras que el calor latente retirado es acumulado en la parte superior, generando una diferencia de temperatura que puede ser hasta de  $8,8^{\circ}\text{C}$  ( $0,44^{\circ}\text{C}/\text{cm}$ ). Diversos autores han descrito este fenómeno utilizando sustratos naturales con gradientes de temperatura de  $2,50^{\circ}\text{C}/\text{cm}$  (Raimbault, 1980);  $4,50^{\circ}\text{C}/\text{cm}$  (Saucedo *et al*, 1990; González *et al*, 1990) y hasta  $30^{\circ}\text{C}/\text{cm}$  (Rathbun y Schuler, 1983). De esta forma, los gradientes encontrados en este estudio utilizando espuma de poliuretano se consideran relativamente pequeños, sugiriendo que la naturaleza de la capacidad de absorción de agua de la espuma podría minimizar el retiro excesivo de humedad lo que disminuiría la magnitud de los gradientes de temperatura axial.

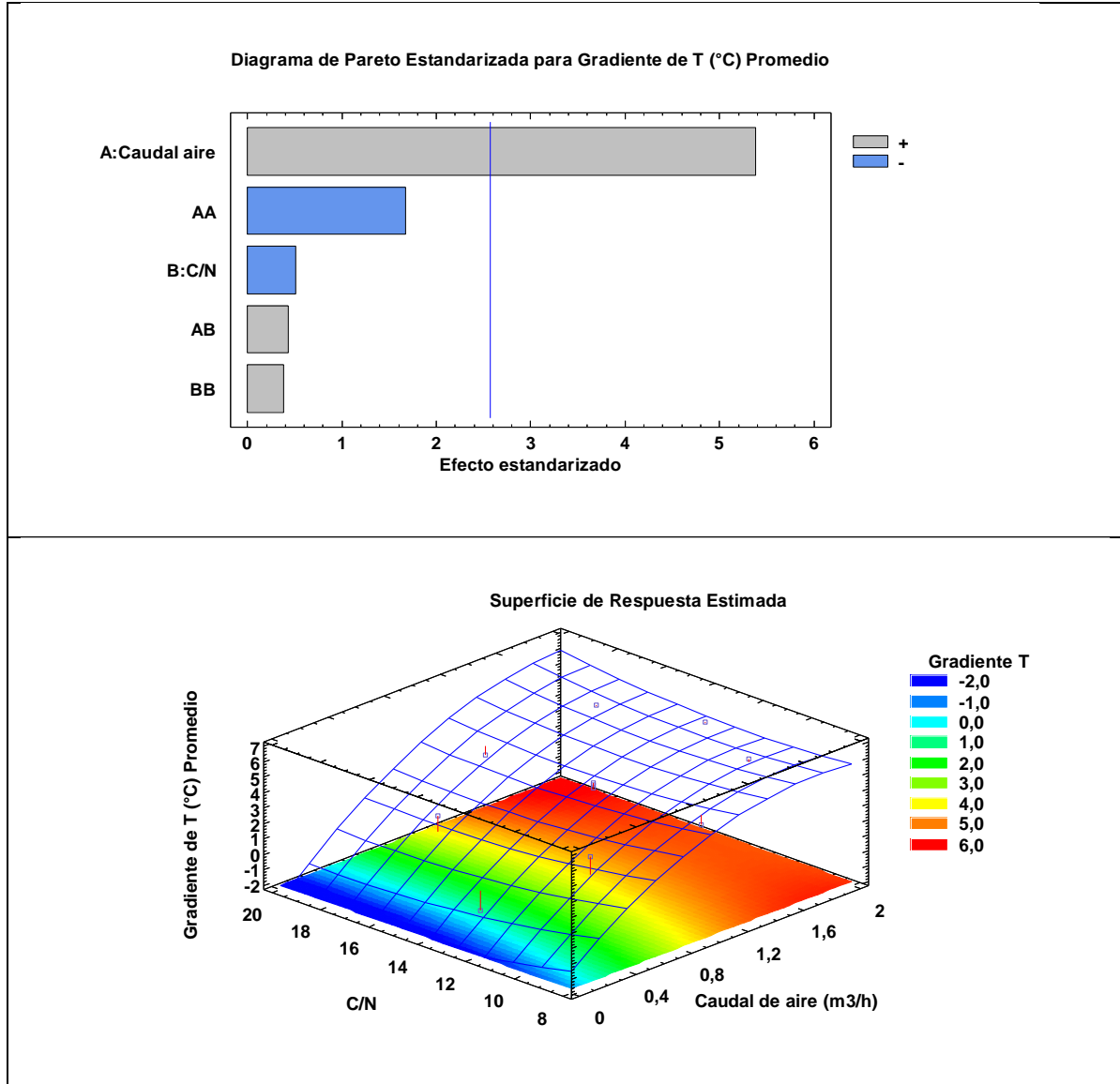
En la figura 3.18 se puede evidenciar que el gradiente de temperatura axial promedio se favorecería con caudales de aire desde  $1,2$  a  $2 \text{ m}^3/\text{h}$ , siendo independiente de la relación C/N. Para minimizar la probabilidad de gradientes de temperatura altos (inferiores a  $3^{\circ}\text{C}$ ), el modelo sugiere trabajar con flujos de aire menores a  $0,8 \text{ m}^3/\text{h}$ .

**Tabla 3.8:** Gradiente de temperatura promedio de los tratamientos del diseño central compuesto

Tratamiento	C/N	Caudal de aire entrante ( $\text{m}^3/\text{h}$ )	Gradiente T promedio ( $^{\circ}\text{C}$ )
1	13,7	1,13	4,1
2	16,8	0,56	2,3
3	9,20	1,13	4,0
4	16,8	1,70	5,6
5	13,7	1,13	4,2
6	13,7	0,33	-1,3
7	10,5	0,56	3,2

8	13,7	1,13	3,9
9	13,7	1,93	5,4
10	18,1	1,13	3,6
11	10,5	1,70	5,6

**Figura 3.18:** Diagrama de Pareto y superficie de respuesta para la variable gradiente de temperatura axial promedio, para los 2 factores críticos (relación C/N y caudal de aire)



Resultados similares para el gradiente de temperatura axial fueron reportados por Ghildyal *et al* (1994) y descritos por Mitchell *et al* (2006), quienes en estudios de fermentación sólida de *A. niger* en salvado de trigo determinaron gradientes de 3 a 10°C para alturas de lecho entre 8,4 y 24 cm utilizando flujos de aire desde 0,54 hasta 1,44 m<sup>3</sup>/h respectivamente.

### **3.2.4 Influencia de los factores críticos sobre el gradiente de concentración relativo**

Los valores de gradientes de concentración relativos al nivel 1 se encontraron desde 1,7 (T6) hasta el 100% (T4, T9, T11) (Tabla 3.9). Mayores gradientes de concentración relativos indicarían una mayor heterogeneidad en el crecimiento del hongo entre los niveles del fermentador, mientras que menores valores indicarían un crecimiento homogéneo.

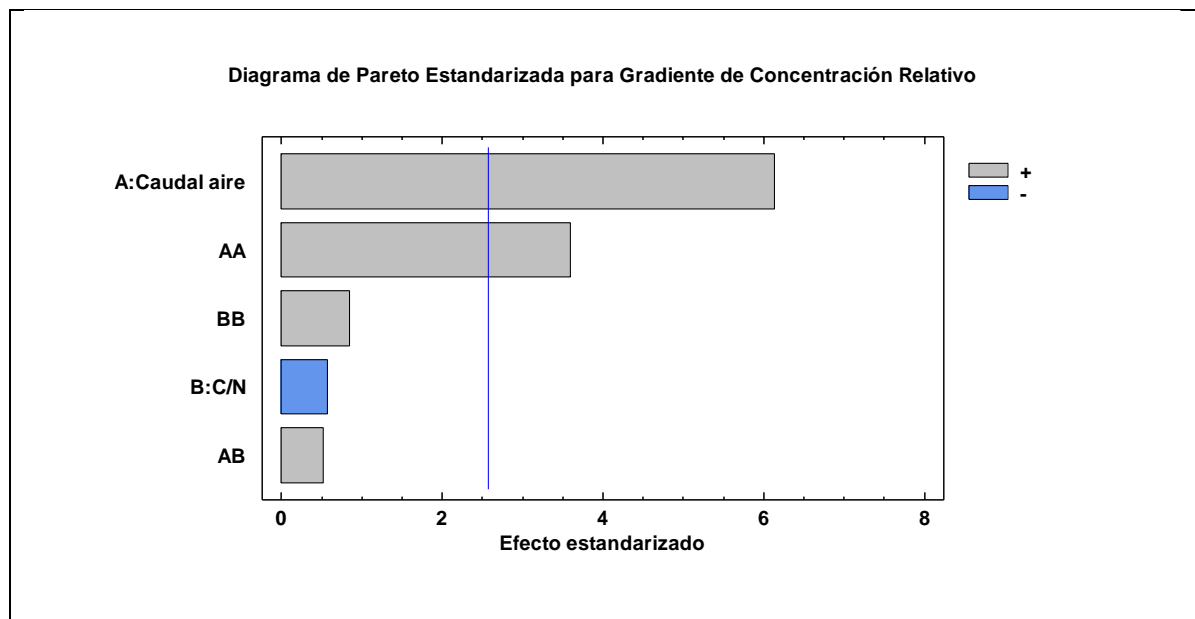
El diagrama de Pareto de la figura 3.19 muestra que el factor caudal de aire tiene un efecto positivo y significativo ( $P=0,0017$ ) sobre el gradiente de concentración, mientras que el factor C/N tuvo un efecto negativo pero no significativo sobre esta variable ( $P=0,5976$ ) (Anexo B).

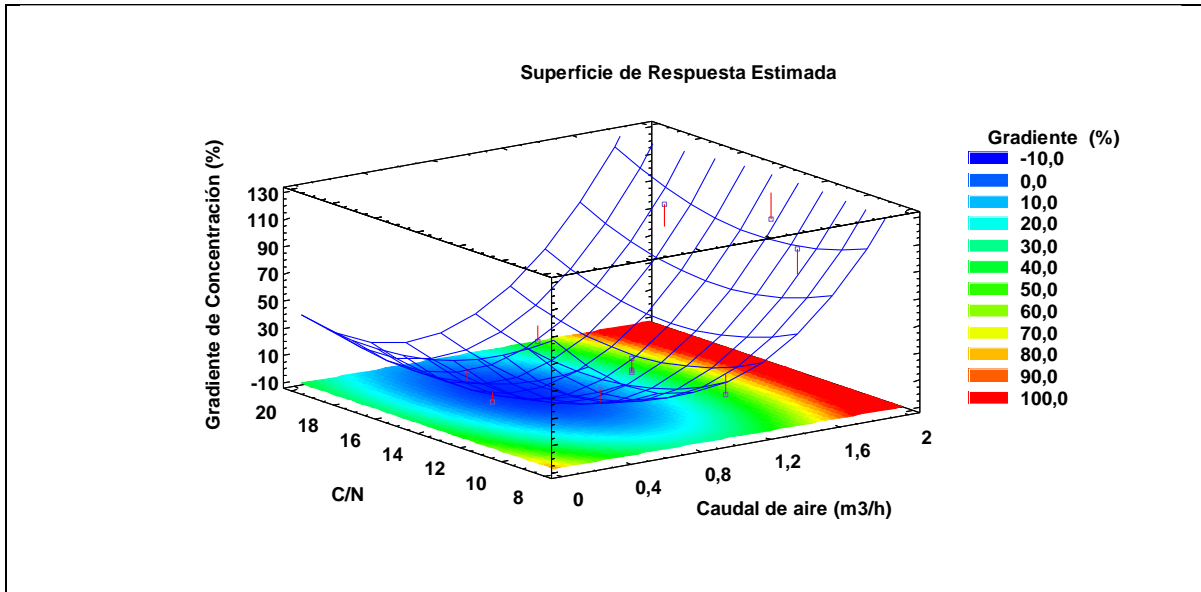
En la figura 3.19 el análisis por superficie de respuesta determina que altos caudales de aire (superiores a 1,6 m<sup>3</sup>/h) ocasionarían gradientes de concentración en relación al nivel 1 de hasta el 100%, este fenómeno se observó principalmente en el tratamiento 9, donde con un flujo de aire de 1,93 m<sup>3</sup>/h el crecimiento por parte de Th204 en el nivel 4 fue prácticamente nulo. Para obtener una mayor homogeneidad en el crecimiento de Th204 entre los niveles del fermentador con un gradiente menor al 10%, los resultados permiten sugerir caudales de aire entre 0,3 y 1 m<sup>3</sup>/h.

Los gradientes de concentración han sido descritos por Chen (2013) y Mitchell *et al* (2006), como problemas a resolver en los fermentadores de lecho fijo, atribuyendo su presencia a fenómenos de gradientes de humedad, y temperatura que desfavorecen el desarrollo efectivo del microorganismo. .

**Tabla 3.9:** Gradiente de concentración relativo (%) de los tratamientos del diseño central compuesto

Tratamiento	C/N	Caudal de aire entrante (m <sup>3</sup> /h)	Gradiente de Concentración (%)
1	13,7	1,13	15,6
2	16,8	0,56	3,5
3	9,20	1,13	12,5
4	16,8	1,70	100
5	13,7	1,13	7,2
6	13,7	0,33	1,7
7	10,5	0,56	22,1
8	13,7	1,13	5,3
9	13,7	1,93	100
10	18,1	1,13	5,3
11	10,5	1,70	100

**Figura 3.19:** Diagrama de Pareto y superficie de respuesta para la variable gradiente de concentración relativa, para los 2 factores críticos (relación C/N y caudal de aire)

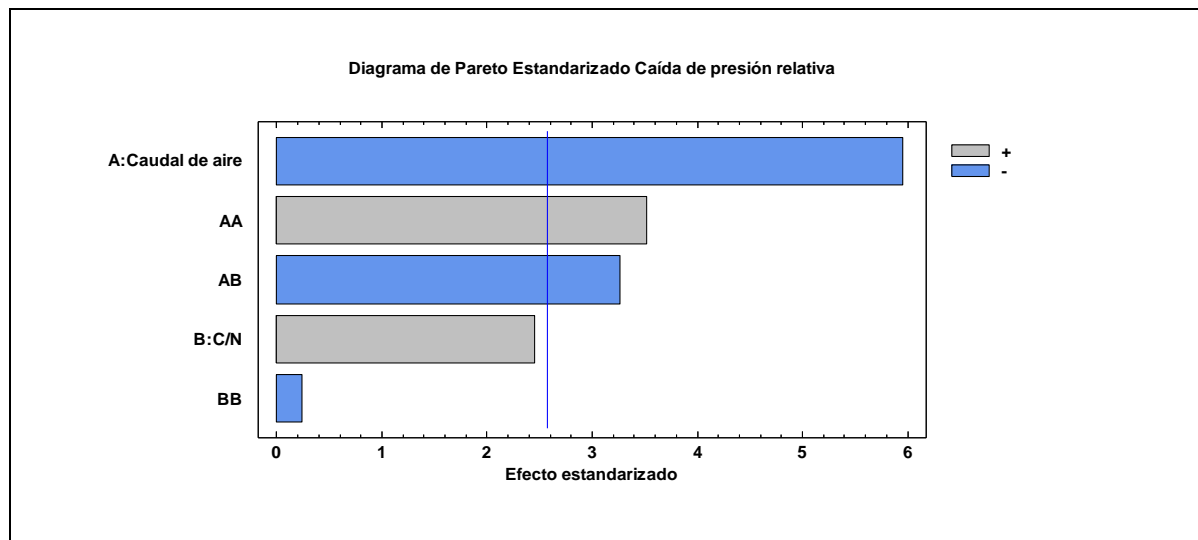


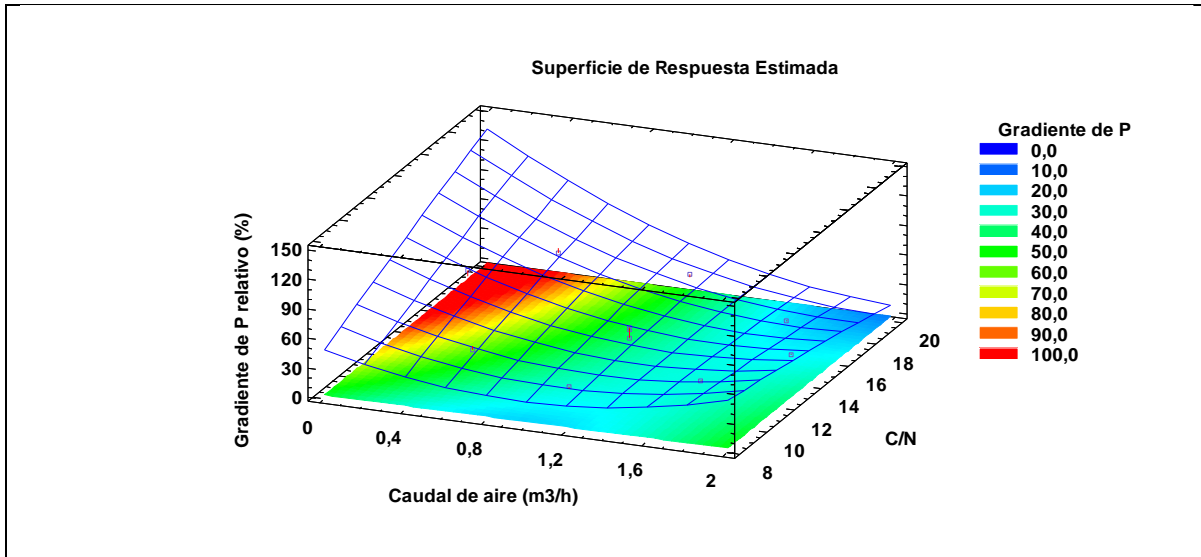
### 3.2.5 Influencia de los factores críticos sobre la caída de presión relativa

Para la caída de presión relativa se encontraron valores desde 22,8% (T4) hasta 72,5% (T6) (Tabla 3.10). Se determinó para el factor caudal de aire entrante un efecto negativo y significativo sobre esta variable ( $P=0,0019$ ) y un efecto positivo pero no significativo del factor relación C/N ( $P=0,058$ ) (Figura 3.20: Anexo B). En la figura 3.20, el análisis de superficie de respuesta muestra que las caídas de presión pueden llegar a ser hasta del 100% con caudales de aire bajos (menores a  $0,4 \text{ m}^3/\text{h}$ ) y relaciones C/N superiores a 14. Este comportamiento podría radicar en que con flujos de aire pequeños durante la fase de crecimiento exponencial de Th204 (favorecido por C/N altas), no se tendría la suficiente presión de entrada de aire para vencer la resistencia al flujo ocasionada por la disminución de la porosidad del lecho y la menor fracción vacía disponible para el flujo del aire. Estos fenómenos han sido descritos por Auria *et al* (1995) y más recientemente por Karimi (2014), quienes describen la dependencia de la caída de presión con la densidad del lecho, la cual en procesos SSF estaría en constante crecimiento.

**Tabla 3.10:** Caída de presión relativo de los tratamientos del diseño central compuesto

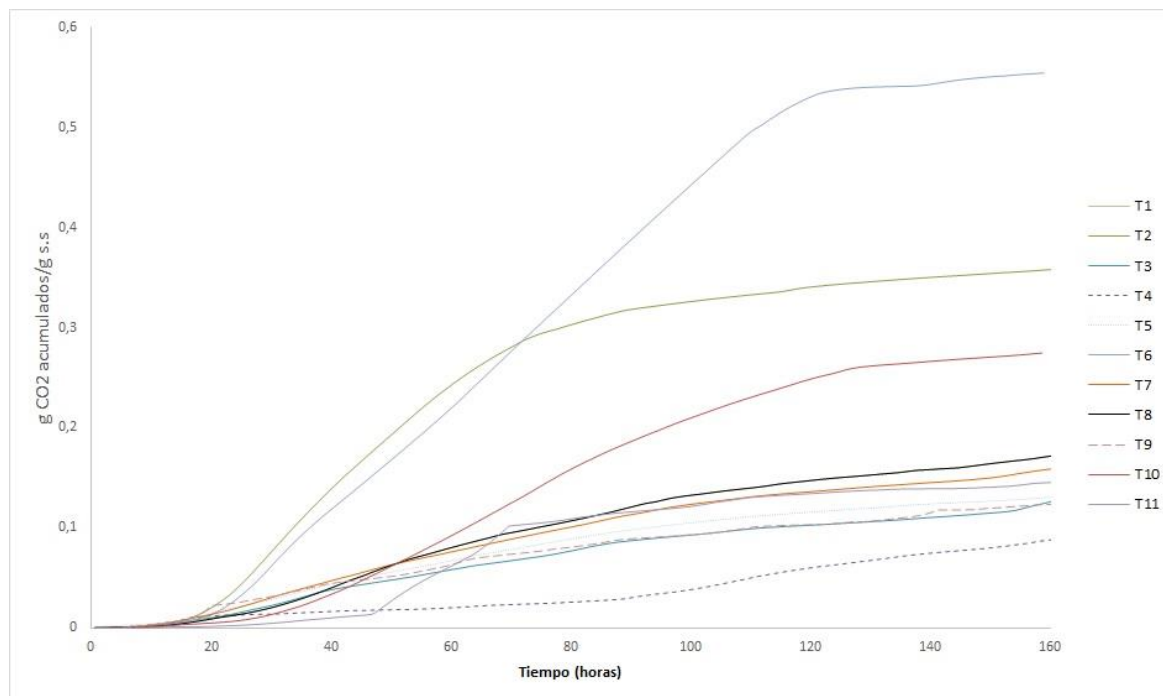
Tratamiento	C/N	Caudal de aire entrante (m <sup>3</sup> /h)	Caída de P (%)
1	13,7	1,13	24,9
2	16,8	0,56	61,4
3	9,20	1,13	25,4
4	16,8	1,70	22,8
5	13,7	1,13	36,2
6	13,7	0,33	72,5
7	10,5	0,56	32,9
8	13,7	1,13	34,2
9	13,7	1,93	30,5
10	18,1	1,13	40,6
11	10,5	1,70	32,4

**Figura 3.20:** Diagrama de Pareto y superficie de respuesta para la caída de presión, para los 2 factores críticos (relación C/N y caudal de aire)



### 3.2.6 Influencia de los factores críticos sobre la velocidad específica máxima de crecimiento de *T. asperellum* Th204

En la figura 3.21 se observa el comportamiento de los perfiles de acumulación de CO<sub>2</sub> para cada uno de los 11 tratamientos evaluados. Se puede destacar de forma general un comportamiento del tipo logístico, es decir una fase de adaptación entre 0 y 20 horas, una fase exponencial de crecimiento entre 20 y 80 horas y una fase estacionaria o de mantenimiento entre 100 y 160 horas aproximadamente. El modelo logístico en los procesos SSF se basa en una limitante de superficie durante la fermentación y en un cantidad máxima de biomasa producida (Mazaheri y Shojaosadati, 2013). La ecuación logística se ajusta razonablemente bien en alrededor del 75% de los perfiles de la literatura obtenidos en los sistemas SSF y se prefiere generalmente porque a menudo es posible utilizarla para describir todo la curva de crecimiento (Viccini *et al*, 2001).

**Figura 3.21:** Perfiles de acumulación de CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación de *T. asperellum* Th204

Las velocidades específicas de crecimiento máximas encontradas para Th204 utilizando espuma de poliuretano se encontraron entre 0,0336 (T11) y 0,1067 h<sup>-1</sup> (T6) (Tabla 3.11). Estas velocidades específicas de crecimiento máximas y las expuestas en las tabla 4.2 utilizando los otros sustratos fueron en promedio cercanos a los encontrados por Agosin *et al* (1997) para cepas de *T. harzianum* con valores entre 0,05 y 0,12 h<sup>-1</sup>. Igualmente, a los reportados en los estudios de Viccini *et al* (2001) quienes realizaron una compilación de los modelos de crecimiento en fermentación sólida y reportaron velocidades de crecimiento para el género *Trichoderma* entre 0,061 y 0,089 h<sup>-1</sup> utilizando sorgo dulce y remolacha azucarera como sustratos.

**Tabla 3.11:** Velocidades específicas de crecimiento máximas (h<sup>-1</sup>) para *T. asperellum* Th204 en el fermentador PROPHYTA® L05

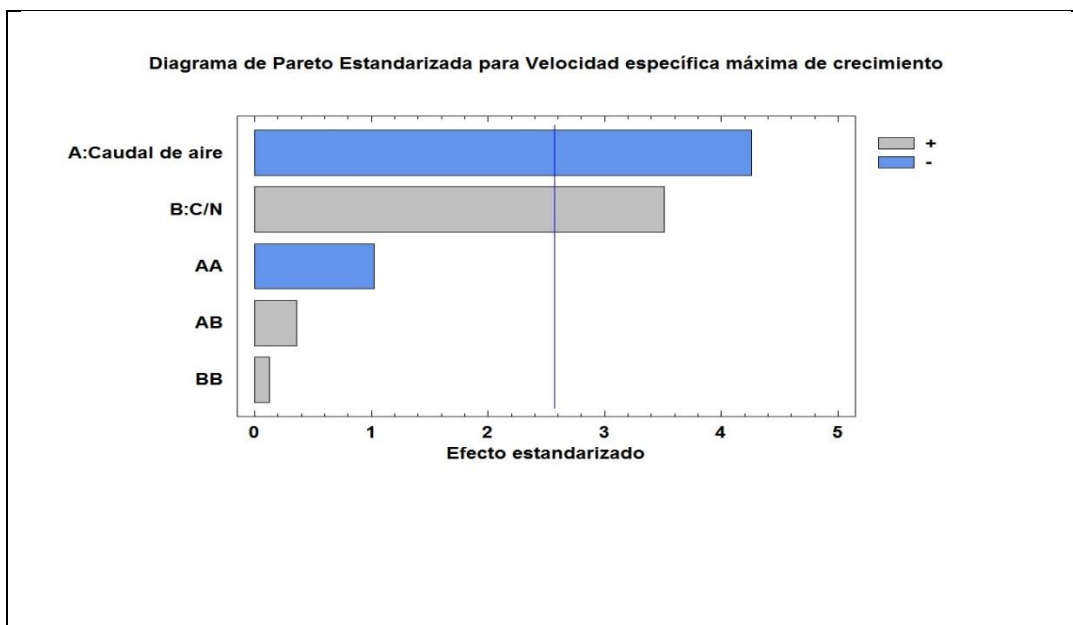
Tratamiento	C/N	Caudal de aire entrante (m <sup>3</sup> /h)	μ máx. (h <sup>-1</sup> )
1	13,7	1,13	0,0736
2	16,8	0,56	0,0939
3	9,2	1,13	0,0663

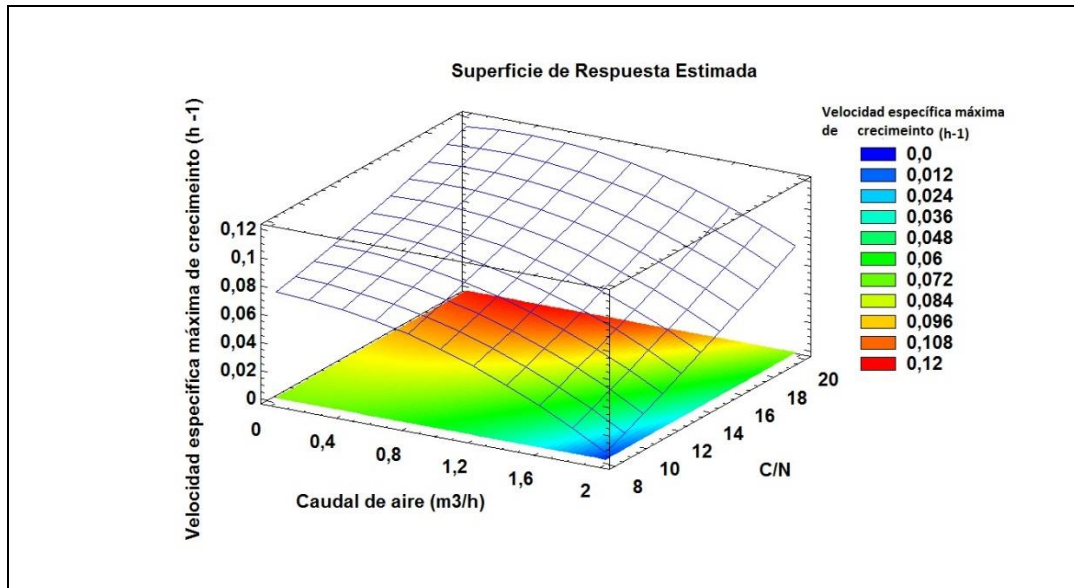


4	16,8	1,70	0,0746
5	13,7	1,13	0,0825
6	13,7	0,33	0,1067
7	10,5	0,56	0,0616
8	13,7	1,13	0,0726
9	13,7	1,93	0,0362
10	18,1	1,13	0,1001
11	10,5	1,70	0,0336

Se determinó un efecto significativo y negativo del factor caudal de aire ( $P=0,0080$ ) y un efecto positivo y significativo de la relación C/N ( $P=0,0171$ ) sobre la velocidad específica máxima de crecimiento de *T. asperellum* Th204. Adicionalmente, mediante la superficie de respuesta generada se podría inferir que con mayores relaciones C/N (superiores a 16) y menores caudales de aire (menores a  $0,6 \text{ m}^3/\text{h}$ ) se obtendría unas mayores  $\mu_{\text{máx}}$  superiores a  $0,10 \text{ h}^{-1}$  (Figura 3.22).

**Figura 3.22:** Diagrama de Pareto y superficie de respuesta para la velocidad específica máxima de crecimiento, para los 2 factores críticos (relación C/N y caudal de aire)





Con el fin de determinar el grado de asociación e interdependencia de las variables respuesta con los factores críticos se estimaron las correlaciones utilizando los rangos de Sperman (Ortega *et al*, 2009). Para el factor crítico caudal de aire se determinaron con un 95% de confianza correlaciones significativas con el gradiente de temperatura ( $P=0,0036$ ), el gradiente de humedad ( $P=0,0031$ ), el gradiente de concentración relativo ( $P=0,0144$ ) y la caída de presión ( $P=0,0339$ ) (Anexo B). De esta forma se entiende que pequeños cambios en el flujo de aire entrante al fermentador PROPHYTA® L05 tendrán un efecto significativo sobre estas variables durante la fermentación de *T. asperellum* Th204. Por otro lado, para el factor C/N no se encontraron correlaciones significativas con los gradientes de temperatura, de humedad, de concentración relativa y caída de presión en el espacio experimental evaluado.

En general, el factor operacional caudal de aire entrante ejerció un efecto significativo sobre los gradientes de humedad, de temperatura, de concentración y caída de presión, mientras que su efecto fue negativo tanto para la productividad como para la velocidad específica máxima de crecimiento de *T. asperellum* Th204. Por otro lado, el factor relación C/N con mayor afinidad a la preparación del sustrato, no ejerció efectos significativos sobre los gradientes de humedad, de temperatura, de concentración y caída de presión pero sí sobre la productividad y la velocidad específica máxima de crecimiento de *T. asperellum* Th204 (Anexo B).

Se podría inferir que el caudal de aire tendría una influencia directa sobre los fenómenos de transporte dentro del biorreactor. Es así como esta variable afectaría las dinámicas de transferencia de masa como el arrastre del contenido de humedad del lecho y la evaporación. También influiría en los fenómenos de transferencia de calor como el retiro y/o acumulación de los calores metabólicos y latentes de vaporización. Finalmente, tendría un efecto sobre las transferencias de cantidad de movimiento como las pérdidas de presión a través del lecho.

En contraste, el factor relación C/N tendría una mayor influencia sobre los fenómenos dentro del sustrato como la disponibilidad de nutrientes y sobre el hongo en cuanto a su cinética de crecimiento.

### **3.2.7 Validación del modelo estadístico**

La validación del modelo se realizó utilizando la combinación óptima de los factores críticos encontrada en el numeral 3.2.1 (Caudal de aire saturado de 0,9 m<sup>3</sup>/h y relación C/N de 18,1). Se utilizó una temperatura de incubación de 28°C, una altura de lecho de 5 cm y una relación de inoculación de 1,0x10<sup>7</sup> conidios/g.s según lo discutido en el numeral 3.2.

Los valores de logaritmo de la productividad para las validaciones 1 y 2 se encontraron en 7,49 y 7,48 respectivamente, siendo muy cercanos al valor esperado de 7,50 según el modelo ajustado. No obstante, para la validación número 3 el valor encontrado de productividad de 2,53x10<sup>7</sup> conidios/g.s.h (Log=7,40) se desvió del esperado en un 20%, Sin embargo, este último resultado se podría explicar teniendo en cuenta que el R<sup>2</sup> del modelo fue de un 72% (numeral 3.2.1) y por lo tanto se podría esperar un error aleatorio y experimental cercano al 28%. Sin embargo, numéricamente los valores de productividad para las tres validaciones no fueron muy diferentes al estar entre 2,0x10<sup>7</sup> y 3,0x10<sup>7</sup> conidios/g.s.h y se consideraría estos valores de productividad similares a nivel de procesos de producción masiva de hongos (Tabla 3.12).

**Tabla 3.12:** Validación de la combinación óptima para el crecimiento de *T. asperellum* Th204 en espuma de poliuretano

Validación	Caudal de aire m <sup>3</sup> /h	C/N	Productividad Esperada (conidios/g.s.h)	Productividad observada (conidios/g.s.h)	Ajuste al esperado (%)
1	0,90	18,1	3,16x10 <sup>7</sup>	3,09x10 <sup>7</sup>	97,7
2	0,90	18,1	3,16x10 <sup>7</sup>	3,02x10 <sup>7</sup>	95,5
3	0,90	18,1	3,16x10 <sup>7</sup>	2,53x10 <sup>7</sup>	80,0
			<b>Promedio</b>	<b>2,88 x10<sup>7</sup></b>	<b>91,2%</b>

Finalmente, los resultados permitieron desarrollar un sistema de fermentación sólida para el hongo Th204 utilizando espuma de poliuretano como soporte. Al utilizar este sistema se encontraron productividades superiores a las del sustrato natural estándar (arroz y salvado) actualmente usado para la producción masiva de microorganismos con interés biológico en CORPOICA. Adicionalmente, en un estudio preliminar de costos de producción asociados al sustrato, se encontró que utilizando el soporte de espuma de poliuretano el costo por gramo de biomasa seca (determinada experimentalmente para extractos de los soportes) producida de Th204 sería de 1,51 veces menor al compararlo con los costos si se utilizará el sustrato natural (Tabla 3.13). Las diferencias en costos podrían ser mayores si se considera la posibilidad de la reutilización de la espuma para más de una fermentación, aspecto que se ha descrito en otros estudios utilizando este tipo de soportes inertes (Marín *et al*, 2008), sin embargo se deben realizar evaluaciones adicionales con miras a determinar el máximo número de reutilizaciones del soporte sin que se vean afectadas sus propiedades fisicoquímicas como la capacidad de absorción de agua y el área superficial por volumen, entre otras. Adicionalmente, la disminución en el tamaño de la espuma entre 0,5 a 1 cm de arista podría mejorar los rendimientos encontrados en el presente trabajo, proporcionando una mayor área por unidad de volumen en el lecho.

**Tabla 3.13:** Comparación de medios de cultivo en cuanto a los costos asociados por gramo seco de biomasa de *T. asperellum* Th204

	Componente	Costo/kg	Distribución del costo	Precio por fermentación	Costo por gramo de biomasa seca de Th204
<b>Medio estándar</b>	Arroz blanco	\$ 2.400,00	89,66%	<b>\$10.244</b>	\$ 179,5
	Salvado	\$ 1.200,00	10,34%		
<b>Medio Espuma</b>	Espuma de poliuretano	\$ 4.000	16,47%	<b>\$2.429</b>	\$ 118,49
	Puré de papa	\$ 12.000,00	63,73%		
	Extracto de levadura	\$ 37.000,00	19,80%		

Fuente costos: Industrias del cultivo, espumas Santafé.



## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

- La mayor productividad para *T. asperellum* Th204 utilizando el fermentador PROPHYTA® L05 se encontró con el soporte inerte espuma de poliuretano ( $3,89 \times 10^7$  conidios/g.s.h) siendo significativamente mayor en comparación con la encontrada en el soporte cascarilla de arroz ( $2,83 \times 10^6$  conidios/g.s.h) y en el sustrato natural a base de arroz ( $8,87 \times 10^6$  conidios/g.s.h).
- Los factores críticos con un mayor efecto significativo positivo sobre la productividad de *T. asperellum* Th204 en el fermentador PROPHYTA® L05 fueron el caudal de aire alimentado ( $\text{m}^3/\text{h}$ ) y la relación C/N.
- El caudal de aire tiene un efecto significativo sobre los gradientes de humedad del lecho, de temperatura, de concentración final y la caída de presión, mientras que el factor C/N tiene un efecto significativo sobre la productividad y la velocidad específica máxima de crecimiento de *T. asperellum* Th204.
- El modelo generado con el diseño central compuesto determinó una zona en donde se obtendrían productividades de *T. asperellum* Th204 superiores a  $3,0 \times 10^7$  conidios/g.s.h, con caudales de aire entre 0,5 y  $1,13 \text{ m}^3/\text{h}$  y relaciones C/N superiores a 18.
- Las condiciones óptimas para la fermentación de *T. asperellum* Th204 en el fermentador PROPHYTA® L05 (productividad superior a  $3,0 \times 10^7$  conidios/g.s.h) generadas por el modelo y que permitieron la validación de su producción fueron un caudal de aire saturado de  $0,9 \text{ m}^3/\text{h}$  y una relación C/N de 18,1.

- La utilización de la espuma de poliuretano surge como una alternativa a los sustratos naturales para la producción de *T. asperellum* Th204, siendo validada a nivel de fermentador de lecho fijo de 16 Litros generando un proceso SSF con bajos gradientes de humedad del lecho, de concentración y caídas de presión.

## 4.2 Recomendaciones

Evaluar la capacidad de reutilización en el proceso y la disminución del tamaño de partícula de la espuma de poliuretano, así mismo otras fuentes de carbono y nitrógeno más económicas para el crecimiento del microorganismo. Estos tres factores podrían disminuir aún más los costos de operación. Adicionalmente, probar la espuma de poliuretano en otros sistemas de fermentación como los fermentadores de bandejas o rotatorios. Por último, profundizar el modelamiento de los fermentadores de lecho fijo desde el punto de vista analítico de los fenómenos de transporte.



## 5. Bibliografía

ACEH, D. (2007). Spore Production of Biocontrol Agent *Trichoderma Harzianum*: Effect of C / N ratio and Glucose Concentration. 6:35–40.

AIDOO, K. E., HENDRY, R., WOOD, B. J. B. (1982). Solid substrate fermentations. *Advances in Applied Microbiology*, 28: 201-237.

AGOSIN, E., VOLPE, D., MUNOZ, G., SAN MARTIN, R., CRAWFORD, A. (1997). Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*, *World Journal of Microbiology y Biotechnology*: 225-232.

ALANI, F., GROVE, J.A., ANDERSON, W. A., MOO YOUNG, M. (2009). Mycophenolic acid production in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor, *Biochem.Eng. J*, 44: 106–110.

ALEGRE, A. C. P., POLIZELI, M. L. T. M., TERENCE, H. F., JORGE, J. A., GUIMARAES, L. H. S. (2009). Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid-state fermentation using agroindustrial residues as carbon source, *Braz. J. Microbiol.* 40: 612–622.

ALI, H. K. Q., ZULKALI M. M. D. (2011). Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation : A Review. 25:255–266.

ASLHEY, V. M., MITCHELL, D. A., HOWES, T. (1999). Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 3: 141-150.

AURIA, R., ORTIZ, L., VILLEGAS, E., Revah, S. (1995). Influence of Growth and High Mould Concentration on the Pressure Drop in Solid State Fermentations. *Process Biochemistry*, (30), No. 8: 751-755.

BAÑOS, J.G., TOMASINI, A., SZAKACS, G., BARRIOS, G. J. (2009). High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: an artificial inert support. *J Biosci Bioeng.* Aug; 108(2):105-10. doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.03.006.

BARAJRACHARYA, R., MUDGETT, R. E. (1980). Effects of controlled gas environments in solid substrate fermentations of rice. *Biotechnology and Bioengineering* 22:2219-2235.

BARRIOS, G, J. (2012). Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochem* 47:175–185. doi: 10.1016/j.procbio.2011.11.016.

BARRIOS, G., MEJIA, A. (1996). Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2: 85–121

BARRIOS, G. J., GONZÁLEZ, H., MEJIA, A. (1993). Effect of particle size, packing density and agitation on penicillin production in solid state fermentation. *Biotechnol Adv*;11:539–547.

BASTIDAS (2013). Cell-counting-Neubauer-chamber. Disponible en: <http://futurescienceleaders.org/protocols/files/2013/02/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf>

BELANGER, R., DUFUOR, N., CARON, J., BENHAMOU, N. (1995). Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. *Biocontrol Science Technology* 5: 41-54.

BERNARD, A. P., JANES, C., DU, P. (1992). Environmental Parameters. In *Solid Substrate Cultivation*. Doelle H. W. y otros. *Elsevier Applied Science*, London, N. York, Chapter 5: 65-85.

BHARGAV, S., PANDA, B.P., ALI, M., JAVED, S. (2007). Solid-state Fermentation: An Overview *Chem. Biochem. Eng. Q.* 22 1: 49–70.

BINOD, P., PALKHIWALA, P., GAIKAIWARI, R., NAMPOOTHIRI, K., DUGGAL, A., DEY, K., PANDEY, A. (2013). Industrial enzymes: present status and future perspectives for India: present scenario and perspectives, *J. Sci. Ind. Res.* 72: 271–286.

BRONZEOAK, 2003. Rice Husk Ash Market Study. DTI, London. 62

CAHN, F. (1935). Citric acid fermentation on solid materials. *Ind Eng Chem* ;27:201–204.

CANNEL, E., MOO YOUNG, M. (1980). Solid state fermentation. *Process Biochem.* 15: 2-7.

CARVAJAL, H, L., CHAPARRO, P., ABRAMSKY, M., CHET, L., ORDUZ, S. (2008). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana* 26, 3: 451-458.

CASTILLO, C. (2001). Optimización de algunos parámetros para la producción de conidios de *Trichoderma* spp. en estado sólido. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

CASTILHO, L.R., MITCHELL, D.A., FREIRE, D.M.G. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation, *Biores. Technol.* 100: 5996–6009.

CAVALCANTI, C. E., GUTARRA, E. L., FREIRE, G. M. D., CASTILHO, R. L., JUNIOR, A. S. G. (2005). Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. *Braz. arch. biol. technol.* vol.48. ISSN 1516-8913

CHEN, HZ. (2013). *Modern Solid State Fermentation*. doi: 10.1007/978-94-007-6043-1

CHEN, HZ., XU, J. (2004). *Principle and application of current solid state fermentation*. Beijing: Chemical Industry Press.

CHEN, HZ., XU, J., LI, Z. (2005). Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air. *23:117–122*. doi: 10.1016/j.bej.2004.11.003

CHEN, L., YANG, X., EAZA, W., LUO, J., ZHANG, F. SHEN, Q. (2011). Solid-state fermentation of agro-industrial wastes to produce bioorganic fertilizer for the biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber in continuously cropped soil, *Biores. Technol.*102: 3900–3910.

CHET, I., IBAR, J., HADAR, I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships* (Wicklow DT y Soderstrom B, eds.). New York: Springer Verlag: 165-192.

CORADI, G.V., Da VISITACAO, V.L., De LIMA, E.A., SAITO, L.Y.T., PALMIERI, D.A., TAKITA, M.A., De OLIVA NETO, P., De LIMA, V. M. G. (2013). Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*, *Ann. Microbiol.* 63: 533–540.

CRUZ, B. F., GÓMEZ, A. M., DÍAZ, A. (2011). Escalamiento de la producción del bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003, *Uso de Trichoderma koningiopsis* Th003 para el control de fitopatógenos en hortalizas. ISBN: 978-958-940-070-0 ed: Productos Editoriales y Audiovisuales-Produmedios: 27 – 42.

CRUZ, M. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis Microbiología Industrial. 148-152.

Da SILVA, L. C. A., HONORATO, T. L., FRANCO, T., FRANCO, T., RODRIGUES, S. (2012). Optimization of chitosanase production by *Trichoderma koningii* sp. under solid-state fermentation, *Food Bioproc. Technol.* 5: 1564–1572.

DALSENTER, F. D. H., VICCINI, G., BARGA, M. C., MITCHELL, D. A., KRIEGER, N. (2005). A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. *Process Biochem.* 40:801–807.

DESGRANGES, C., VERGOIGNAN, C., GEORGES, M., Durand, A. (1991). Biomass estimation in solid-state fermentation. II. On-line measurements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 206–209.

DESGRANGES, C., VERGOIGNAN, C., LEREEC, A., RIBA, G., DURAND, A. (1993). Use of solid state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of European corn borer. *Biotechnol Adv*;11, 3: 577–87.

- DHILLON, G. S., BRAR, S. K., KAUR, S., VERMA, M (2013). Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. *Ind Crops Prod* 41:78–84. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.04.001
- DHILLON, G. S., OBEROI, H. S., KAUR, S., BANSAL, S., BRAR, S.K. (2011). Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Ind Crops Prod* 34:1160–1167. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.04.001
- DILIPKUMAR, M., RAJAMOCHAN, N., RAJASIMMAN, N., RAJASIMMAN, M. (2013). Inulinase production in a packed bed reactor by solid-state fermentation, *Carbohydr. Polym.* 96: 196–199.
- DOELLE, H. W., MITCHELL, D. A., ROLZ, C. E. (1992). *Solid Substrate Cultivation*, Elsevier, London.
- DOMENECH, F. (2000). Obtención de un biopreparado a partir de *Metarhizium anisopliae* por fermentación en estado sólido para su empleo como control biológico de insectos en la agricultura. Trabajo presentado en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas. Subdirección de Biotecnología, ICIDCA, Ciudad Habana
- DURAND, A., CHEREAU, D. (1988). A new pilot reactor for solid-state fermentation: application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnol Bioeng* ;31: 476-486.
- DURAND, A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. 13: 113–125.
- DURAND, A., RENAUD, R., ALMANZA, S., MARATRAY, J., DIEZ, M., DESGRANGES, C. (1993). Solid-state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant. *Biotechnology Advances*, 11: 591–597.
- ELSON, M. K., SCHISLER, D. A., JACKSON, M. A. (1998). Carbon-to-nitrogen ratio, carbon concentration, and amino acid composition of growth media influence conidiation of *Helminthosporium solani*, *Mycologia* 98: 406-413.
- FANAEI, M. A., VAZIRI, B. M. (2008). Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors. 2–5.
- FENG, K. C., B. L. LIU., Y. M. TZENG. (2002). Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. Department of Biotechnology, Fooyin Institute of Technology, Taliao, Kaohsiung, Taiwan, *Journal of Microbiology Y Biotechnology* 18: 217–224.
- FERNÁNDEZ, F. M., PÉREZ, C. J. R. (2007). Realistic model of a solid substrate fermentation packed-bed pilot bioreactor. *Process Biochem* 42: 224–234. doi: 10.1016/j.procbio.2006.08.003
- FUJISHIMA, T., UCHIDA, K., YOSHINO, H. (1972). Enzyme production by molds in sponge culture. *J. Ferment. Technol* 50: 724-730.

- GAO, L., LIU, X. Z. (2009). A novel two-stage cultivation method to optimize carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio for sporulation of biocontrol fungi. *Folia Microbiol.* 54, 2: 142-146.
- GARCIA, C. M., MONTANA, L. J. S., MARTÍNEZ, S. (2009) Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. 245–251.
- GAUTAM, P., SABU, A., PANDEY, A., SZAKACS, G., SOCCOL, C. R. (2002). Microbial production of extra-cellular phytase using polystyrene as inert solid support. *Bioresour Technol*; 83: 229–33.
- GELMI, C., PÉREZ, C. R., AGOSIN, E. (2000). Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. *Proc Biochem*: 35: 1227–33.
- GERVAIS, P., MOLIN, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 85–101.
- GHILDYAL, N. P., GOWTHAMAN, M. K., RAGHAVA, Rao KSMS., KARANTH, N. G. (1994). Interaction between transport resistances with biochemical reaction in packed bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients. *Enzyme Microb Technol*:16: 253–257.
- GLARE, T., CARADUS, J., GELERNTER, W., JACKSON, T., KEYHANI, N., KOHL, J., MARRONE, P., MORIN, L., STEWART, A. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol* 30: 250–258. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.01.003
- Global Biopesticides Market – Trends Y Forecasts (2012 – 2017) marketsandmarkets.com Publishing Date: June 2012 Report Code: CH 1266.
- GONZÁLEZ, B., SAUCEDO, C. G., VINIEGRA, G. G. (1990). Protein enrichment of sugar cane products using solid-state cultures of *Aspergillus terreus*. *J. Ferment. Technol.* 70: 351-354.
- GOWTHAMAN, M. K., RAGHAVA, Rao KSMS, GHILDYAL, N. P., KARANTH, N. G. (1993). Gas concentration and temperature gradients in a packed bed solid-state fermentor *Biotechnol Adv* 11:611–620.
- GRAJALES, L. M., XAVIER, N. M., HENRIQUE, J. P., THOMEIO, J. C. (2012). Mixing and motion of rice particles in a rotating drum. *Powder Technol* 222:167–175. doi: 10.1016/j.powtec.2012.02.028
- GUTIÉRREZ, R. M., HOSN, S. A. A., AURIA, R. (1996). Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochem.*;31: 363–9.
- GUTIÉRREZ, M y col. (1995). Escalamiento de Procesos con Fermentación Sólida. En curso avanzado sobre procesos Biotecnológicos. Itto. de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, México.
- HACKETT, G. A. R., EASTON, C. A., DUFF, S. J. B. (1999). Composting of pulp and paper mill fly ash with wastewater treatment sludge. *Biores Technol* ;70: 217 224.

- HARMAN, G., KUBICEK, C. (1998). *Trichoderma* and *Gliocadium* Enzymes and biological control applications, Cornell University, Geneva, NY, USA; University of Technology, Vienna, Austria, 2: 183-190.
- HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, a virulent plant symbionts. *Nat. Rev.* 2: 43–56.
- HESSELTINE C.W. (1972). Solid State Fermentations. *Biotechnol. and Bioeng.* 14: 517 – 532.
- HOLKER, LENZ, J. (2005). Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages? *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 301–306.
- HUERTA, S., FAVELA, E., LOPEZ, U. R., FONSECA, A., VINIEGRA, G. G., GUTIÉRREZ, R. M. (1994). Absorbed substrate fermentation for pectinase production with *Aspergillus niger*. *Biotechnol Technol.* 1994;8: 837–42.
- HWANG, C.L., CHANDRA, S. (1997)- The Use of Rice Husk Ash in Concrete. *Waste Materials Used in Concrete Manufacturing*. Edited: Chandra, S., Noyes Publications, USA. 198.
- JAUBERTHIE, R., RENDELL, F., TAMBA, S., CISSE, I. (2000). Origin of the pozzolanic effect of rice husks.” *Constr. Build. Mater*, 14: 419–423.
- KARIMI, A., SHOJAOSADATI, S, A., HEJAZI, P., VASHEGHANI, E, HASHEMI, M. (2014) Porosity changes during packed bed solid-state fermentation. *J Ind Eng Chem.* doi: 10.1016/j.jiec.2014.01.001
- KARP, S.G., FARACO, V., AMORE, A., BIROLO, L., GIANGRANDE, C., SOCCOL, V.T., PANDEY, A., SOCCOL, C.R. (2012). Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse, *Biores. Technol.* 114: 735–739.
- KAUPP, A. (1984). *Gasification of Rice Hulls: Theory and Practices*. Eschborn: Deutsches Zentrum Fuer Entwicklungs Technologien (GATE).
- KHANAHMADI, M., ROOSTAAZAD, R., MITCHELL, D. A., MIRANZADEH, M., BOZORGMEHRI, R., SAFEKORDI, A. (2006). Bed moisture estimation by monitoring of air stream temperature rise in packed-bed solid-state fermentation. *Chem Eng Sci* 61:5654–5663. doi: 10.1016/j.ces.2006.04.039
- KOBAYASHI, T., OZAWA, S., SATO, K., NAGAMUNE, T., ENDO, I. (1991). Production of glucoamylase by solid-state fermentation using urethane foam carrier as a semi-solid medium. *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, (Japan), 17, 3: 491-496.
- KRISHNA, C. (2005). Solid-state fermentation systems—an overview. *Crit Rev Biotechnol.* 25: 1–30.
- LAREO, C., SPOSITO, A. F., BOSSIO, A. L., VOLPE, D. C. (2006). Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. *Enzyme Microb Technol* 38: 391–399. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.06.009

- LARROCHE C., THEODORE, M., GROS, J. B., BIOLOGIQUE, C., PASCAL, U. B., CEDEX, F. A. (1992). Applied Microbiology Biotechnology Growth and sporulation behaviour of *Penicillium roquefortii* in solid substrate fermentation: effect of the hydric parameters of the medium. 183–187.
- LEZA, R., RODRIGUEZ, J. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. Revista mexicana de ingeniería química. Universidad autónoma metropolitana – Iztapalapa, Distrito federal Mexico, Vol 6 número 001: 33-40.
- LI, Y. PENG, X. CHEN, H. (2013). Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation, J. Biosci. Bioeng. 116, 4: 493–498.
- LONSANE, B. K., GHILDYAL, N. P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme and Microbial Technology, 7: 258–265.
- LU, M., BROOKS, J. D., MADDOX, I. S. (1997). Citric acid production by solid state fermentation in a packed-bed reactor using *Aspergillus niger*. Enzyme and Microbial Technology, 21: 392–397.
- MAHMOOD, R.T., ASAD, M.J., MEHBOOB, N., MUSHTAQ, M., GULFAZ, M., ASGHER, M., MINHAS, N.M., HADRI, S.H. (2013). Appl. Biochem. Biotechnol. 170: 895–908.
- MANPREET, S., SAWRAJ, S., SACHIN, D., PANKAJ, S., BANEJEE, U.C. (2005). Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. Malaysian Journal of Microbiology, 2: 1-9
- MARIN, C. M. D.C., MATSUMOTO, Y., RAMIREZ, C. L., Rocha, P. Z., VINIEGRA, G., SHIRAI, K. (2008). Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. Process Biochem 43: 24–32. doi: 10.1016/j.procbio.2007.10.009
- MARTIN, R. S., CRAWFORD, A., AGOSIN, E., VOLPE, D., MUN, G. (1997). Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. 13: 225–232.
- MAUREL, V. B., ORLIACA, O., CHRISTEN, P. (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. Process Biochemistry, 38: 881-89.
- MAZAHERI, D., SHOIAOSADATI, S. A. (2013). Mathematical Models for Microbial Kinetics in Solid-State Fermentation: A Review \* Iranian Journal of Biotechnology. August; 11 3: 156-167
- MAZUTTI, M. A., ZABOT, G., BONI, G., SKOVRONSKI, A., De OLIVEIRA, D., Di LUCCIO, M., RODRIGUES, M. I., MAUGERI, F. (2010). Optimization of inulinase production by solid-state fermentation in a packed bed bioreactor, J. Chem. Technol. Biotechnol, 85: 109–114.
- MEYRATH, J. (1965). Production of amylase on vermiculite by *Aspergillus oryzae*. Sci Food Agric.: 16: 14–8.

- MITCHELL, D. A., PANDEY, A., SANGSURASAK, P., KRIEGER, N (1999). Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. *Process Biochem* 35:167–178. doi: 10.1016/S0032-9592(99)00048-5
- MITCHELL, D. A., KRIEGER, N., STUART, D. M., PANDEY, A. (2000). New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. 35: 1211–1225.
- MITCHELL, D. A., MEIEN, O. F. V., KRIEGER, N. (2003), Recent developments in modeling of solid state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochem. Eng. J*, 13: 137-147.
- MITCHELL, D.A., BEROVIC, M., KRIEGER, N (2000). Biochemical engineering of solid state bioprocessing. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 68: 61-138.
- MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N (2002). Overview of solid state bioprocessing *Biotechnology Annual Review* 183 2002 Elsevier Science B.V. El-Gewely 8.
- MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. (2006). Solid-state fermentation bioreactors. Springer ISBN: 9783540312857. 5-7.
- MOHAMMAD, N. ALAM, M. Z., KABBASHI, N., AHSAN, A. (2012). Effective composting of oil palm industrial waste by filamentous fungi: A review. *Resour Conserv Recycl* 58: 69–78. doi: 10.1016/j.resconrec.2011.10.009
- MOHAN KUMAR, N. S., RAMASAMY, R., MANONMANI H. K. (2013). Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Ind Crops Prod* 43:150–158. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.07.023
- MOO YOUNG, M., MOREIRA, A. R., TENDERDY, R. P. (1983). Principles of the Solid Substrate Fermentation. In *Filamentous Fungi*. 4. Ed. J. E. Smith, D. R. Berry and B. Kristiansen, Edward Arnold: 117 – 144.
- MOUSSA, T. A. A., KJALILI, N. M. (2012). Solid-state fermentation for the production of dextran from *Saccharomyces cerevisiae* and its cytotoxic effects, *Life Sci. J.* 9: 2210–2218.
- NAGENDRA, P. G., CHANDRASEKARAN, M. (1965). Polystyrene an inert carrier for L glutaminase production by marine *Vibrio costicola* under solid-state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*: 11: 683–684.
- NAMPOOTHIRI, K. M., PANDEY, A. (1996). Solid state fermentation for L-glutamic acid production using *Brevibacterium* sp. *Biotechnol Lett.* 1996;18: 199–204.
- OIJKAAS, L.D., WEBER, F.J., BUITELAAR, R.M., TRAMPER, J., RINZEMA, A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *TIBTECH* 18.



OOSTRA, J., COMTE, E. P., Van den HEUVEL, J. C., TRAMPER, J., RINZEMA, A. (2001). Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnol Bioeng*;75: 13–24

ORIOLE, E., RAIMBAUT, M., ROUSSOS, S., VINIEGRA, G. (1988). Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 27: 498-503

ORTEGA, M. M. R. (2009). El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas. Versión On-line ISSN 1729-519X*. Rev haban cienc méd v.8 n.2 Ciudad de La Habana.

OZAWA, S., SATO, K., ENDO, I. (1996). Repeated batch production of alkaline protease by solid-state fermentation using urethane foam as carriers. *Bioprocess Biosyst Eng*; 14: 63–68.

PANDEY, A. (1992). Recent developments in solid-state fermentation. *Proc Biochem* 27: 109-117.

PANDEY, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. Volumen 13: 81-84.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., LARROCHE, C. (2008). *Current Developments in Solid-state Fermentation*. Delhi: N. K. Muraleedharan for Asiatech Publishers Inc. ISBN: 978-0-387-75212-9.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., MITCHELL, D. (2000). New developments in solid state fermentation. I Processes and products. *Process Biochem* 35: 1153–1169.

PERALTA, P. M., SAUCEDO, C. G., GUTIÉRREZ, R. M., CAMPERO, A. (2001). SiO<sub>2</sub> xerogel: a suitable inert support for microbial growth. *J Sol-Gel Sci Technol*;20: 105–10.

PIMENTEL, D (2005). Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. *Environ Dev Sustain* 7: 229–252. doi: 10.1007/s10668-005-7314-2

PRABHAKAR, A., KRISHNAIAH, K., JANAUN, J., BONO, A. (2005). An overview of Engineering Aspects of Solid State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*,2: 10-16.

PRADO, F. C., VANDENBERGHE, L. P. S., LISBOA, C., PACA, J., PANDEY, A., SOCCOL, C. R. (2004). Relation between citric acid production and respiration rate of *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Engineering in Life Sciences*, 4: 179–186.

RAIMBAULT, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*> Disponible en <http://www.ejb.org> – Visitado 01-12-2010.

RAIMBAULT, M., ALAZARD, D. (1980). Culture Method to study fungal growth in solid state fermentation. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 9: 199-209.

- RAMOS, E. Y. A., NAVARRO, Z. R. I., ZUMAQUE, O. L. E., VIOLETH, B. J. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. Revista Colombiana de Biotecnología. Rev. colomb. Biotecnol vol.10 no.2 Bogotá July/Dec. 2008. *Print version* ISSN 0123-3475.
- RATHBUN, B. L., SHULER, M. L. (1983). Heat and mass transfer effect in solid substrate fermentation: design of fermentation chambers. *Biotechnology and Bioengineering* 15: 929-938
- RICHARD, A., SERGIO, H., MAURICE, R., SERGIO, R. (1990). Ion exchange resin: a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnol Tech.*;4: 391-6.
- RODRÍGUEZ, F. D. E., PARADA, J. L., MEDEIROS, A. B. P., De CARVALHO, J.C., LACERDA, L. G., RODRÍGUEZ, L. J., SOCCOL, C. R. (2013). Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation, *Proc. Biochem.*48: 374-379.
- RODRÍGUEZ J, R. M., MUSSATTO, S. I., SEPULVEDA, L., AGRASAR, A. T., PASTRANA, L., AGUILAR, C. N., TEIXEIRA, J, A. (2013). Fungal fucoidanase production by solid-state fermentation in a rotating drum bioreactor using algal biomass as substrate. *Food Bioprod Process* 91: 587-594. doi: 10.1016/j.fbp.2013.02.004
- RODRÍGUEZ, C., RIVELA, I., MUÑOZ, M. R., SANROMAN, A. (2000). Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packed-bed bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess Engineering*, 23: 287-293.
- RODRIGUEZ, D. L. V., CONTRERAS, E. J. C., RODRIGUEZ, R., ARELY P., Aguilar, L. C. N. (2011). Optimization of tannase production by *Aspergillus niger* in solid-state packed bed bioreactor, *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 960-967.
- RODRIGUEZ, L. J. A., DOMENECH, F., LEON, M., MENDEZ, T., RODRIGUEZ, D. E., PANDEY, A. (1997). Production of Spores of *Trichoderma harzianum* on Sugar Cane Molasses and Bagasse Pith in Solid State Fermentation for Biocontrol.
- RODRÍGUEZ, J. A. y otros. (1986). Optimization of Solid State Fermentation of Citrus Dried Peel by *Aspergillus niger* in a Packed Bed Column. *Acta Biotechn.*, 6, 3: 253-258.
- ROSES, R. P., GUERRA, N.P. (2009). Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 1929-1939.
- ROUSSOS, S. PERRAUD-GAIME, I. (1996). Laboratoire de Biotechnologie PMC, Centre ORSTOM, BP 5045,34034 Montpellier cedex 1, FRANCE.
- RUIZ, H. A., RODRIGUEZ, J. R. M., RODRIGUEZ, R., CONTRERAS, E. J. C., AGUILAR, C. N. (2012). Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation-tray bioreactor, *Biochem. Eng. J.* 65: 90-95.

SANTOS, M. M., ROSA, A. S., DALBOIT, S., MITCHELL, D. A., KRIGER, N. (2004). Thermal denaturation: is solid state fermentation really a good technology for the production of enzymes? *Bioresour. Technol.* 93: 261–268.

SANTOS, V. S., RODRIGUEZ, H. E. L., ORTEGA, V. F., CABRIALES, P. J. (2012). PRODUCTION OF *Trichoderma asperellum* T8a SPORES BY A “HOME-MADE” SOLID-STATE FERMENTATION OF MANGO INDUSTRIAL WASTES. *BioResources* 7, 4: 4948-4951.

SARGANTANIS, J., KARIM, M. N., MURPHY, V. G., RYOO, D., TENDERDY, R. P. (1993). Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. *Biotechnol Bioeng*: 42: 149–58

SATO, K., NAGATANI, M., NAKAMURA, S. (1983). Growth estimation of *Candida lipolitica* from Oxygen Uptake in a solid State Culture with Force Aeration. *J. Ferment. Technol.* 61: 6: 623-629.

SAUCEDO C, G., GUTIÉRREZ, R, M., BACQUET, G., RAIMBAULT, M., VINIEGRA, G. G. (1990). Heat Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 802-808.

SEESURIYACHAN, P. KUNTIYA, A. HANMOUNGIAI, P. TECHAPUN, C. CHAIYASI, T. LEKSAWASDI, N. (2012). Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid-state fermentation under high salinity stress, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76: 912–917.

SHARMA, A., SATYANARAYANA, T. (2012). Production of acid-stable and high-maltose-forming-amylase of *Bacillus acidicola* by solid-state fermentation and immobilized cells and its applicability in baking. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168: 1025–1034.

SHI, Y, J., XU, X.Q., ZHU, Y. (2009). Optimization of *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation on sugar-cane bagasse. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82: 921–927

SILMAN, R. W. (1993). Production of *Colletotrichum truncatum* for use as a mycoherbicide: effects of culture drying and storage on recovery and efficacy. *Biotechnol. Adv.* 11: 561–575

SINGHANIA, R. R., SUKUMARAN, R. K., PATEL, A. K. LARROCHE, C. PANDEY, A. (2010). Advance-ment and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases, *Enz. Microb. Technol.* 46: 541–549.

SOCCOL, C. R., AYALA, L. A., SOCCOL, V. T., KRIEGER, N., SANTOS, H. R. (1997). Spore production by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* from declassified potatoes by solid-state fermentation. *Review Microbiology.* 28 (Suppl. 1): 34-42

SRINIVES, S., CHARINPANITKUL, T., TANTHAPANICHAKOON, W. (2010). Utilization of rice-husk packed beds as fine dust collectors at heavy dust loadings. *J Ind Eng Chem* 16: 224–229. doi: 10.1016/j.jiec.2009.09.069

STUART, D. M., MITCHELL, D. A., JHONS, M. R., LITSTER, J. D. (1999). Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors: operating variables affect performance through their effects on transport phenomena. *Biotechnology and Bioengineering*, 63: 383–391.

SURESH, P. V., SACHINDRA, N. M., BHASKAR, N. (2011). Solid-state fermentation production of chitin de acetylase by *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676 using different substrates, *J. Food Sci. Technol.* 48: 349–356.

THIBAUT, J., POULIOT, K., AGOSIN, E., PEREZ, C. R. (2000). Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and KLa in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 36: 9–18.

THOMAS, L., LARROCHE, C., PANDEY, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 81: 146–161. doi: 10.1016/j.bej.2013.10.013

TIPÁN, T. F. J. (2013). Uso del hongo *Trichoderma asperellum* en plántulas de pimiento (*Capsicum annum*) y su efecto sobre la supervivencia y productividad en campo. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/2485>.

TOMASELLI, C., VERGOIGNAN, C., FERON, G., DURAND, A. (2001). Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* in solid state cultivation conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 7: 1-5.

TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A., ITAVAARA, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Biores. Technol*; 72: 169-83.

United States Patent 6620614. Disponible en:

<http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect2=PTO1Y&Sect2=HITOFF&p=1&u=/netahtml/PTO/searchbool.html&r=1&f=G&l=50&d=PALL&RefSrch=yes&Query=PN/6620614>

VASEGHI, Z., NAJAFPOUR G. D., MOHSENE, S., MAHJOUR, S. (2013). Production of active lipase by *Rhizopus oryzae* from sugarcane bagasse: solid-state fermentation in a tray bioreactor, *Int. J. Food Sci. Technol.* 48: 283–289.

VICINI, G., MITCHELL, D. A., BOIT, S. D., GERN, J. C., Da ROSA, A. S. (2001). Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. *Food Technol Biotechnol*; 39: 271–294.

VINIEGRA, G., FAVELA T. E., AGUILAR, C. N., ROMERO G. S. J., DIAZ, G., AUGUR, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13: 157-167.

WEBER, F. J., OOSTRA, J., TRAMPER, J., RINZEMA, A. (1999). A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minitans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 447–458.

WEBER, F. J., OOSTRA, J., TRAMPER, J., RINZEMA, A. (2002). Validation of a model for process development and scale-up of packed-bed solid-state bioreactors. *Biotech. Bioeng.* 77: 381.

WENG, Y. Y., CHEN, H. (2010). Production of bacterial cellulose under solid state fermentation on polyurethane foam. *J Cell Sci Technol*; 18: 1–7.

ZHANG, L., QIU, A., GONG, Y., CAO, B. (2013). Solid-state fermentation of kitchen waste for production of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide, *BioRe-sources* 8: 1124–1135.

ZHU, Z., ZHANG, F., WEI, Z., RAN, W., SHEN, Q. (2013). The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens*, *J. Environ.Manag.* 127: 96–102.

## A. Anexo A: Análisis elemental de la suspensión nutritiva y la biomasa de Th204 seca

Se pesaron en una microbalanza XP6 de Mettler Toledo y se sometieron a estudio en el Analizador Elemental Flash 2000 de Thermo Scientific, el cual consta de un automuestreador, un reactor, una columna Porapak de 2 m y un detector de conductividad térmica, utilizando las siguientes condiciones:

Temperatura del reactor: 950°C  
 Temperatura de la columna: 65°C  
 Gas acarreador de Helio AP  
 Flujo 140 mL/min  
 Tiempo de corrida 720 s  
 Patrón estándar certificado Cistina

Análisis elemental de los componentes de la suspensión nutritiva

Muestra	Resultados			
	Carbono	Nitrógeno	Hidrógeno	Azufre
	Porcentaje (%) p/p base seca			
Puré de Papa (polvo)	39,23	1,30	6,00	0,00
Extracto de levadura	36,40	11,28	5,96	1,86
Biomasa	42,56	4,53	5,93	0,27

## B. Anexo B: Análisis de varianza de los diseños experimentales

### Análisis de Varianza ( $\alpha=0,05$ ) para Log Productividad en el Diseño fraccionado (1/16)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Soporte	0,737789	1	0,737789	99,69	0,0099
B:C/N	0,148512	1	0,148512	20,07	0,0464
C:Inóculo	0,0841	1	0,0841	11,36	0,0779
D:Humedad de aire	0,030625	1	0,030625	4,14	0,1789
E:Temperatura	0,0276125	1	0,0276125	3,73	0,1931
F:Altura del lecho	0,10947	1	0,10947	14,79	0,0614
G:Caudal de aire	0,1849	1	0,1849	24,98	0,0378
Error total	0,0148011	2	0,00740057		
Total (corr.)	2,71444	9			

R-cuadrada = 99,4547 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 97,5463 por ciento

Error estándar del est. = 0,0860266

### Análisis de Varianza ( $\alpha=0,05$ ) para Log Productividad en el Diseño de compuesto central

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Caudal aire	0,102587	1	0,102587	2,86	0,1515
B:C/N	0,251386	1	0,251386	7,01	0,0455
AA	0,108063	1	0,108063	3,01	0,1430
AB	0,000025	1	0,000025	0,00	0,9800
BB	0,00376868	1	0,00376868	0,11	0,7589
Error total	0,179241	5	0,0358483		
Total (corr.)	0,642218	10			

R-cuadrada = 72,0903 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 44,1806 por ciento

Error estándar del est. = 0,189336

Error absoluto medio = 0,0935027

Estadístico Durbin-Watson = 2,28659 (P=0,7734)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,266847

### Análisis de Varianza ( $\alpha=0,05$ ) para producción el gradiente de humedad (%) Diseño de compuesto central

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Caudal de aire	6649,0	1	6649,0	492,78	0,0000
B:C/N	30,0867	1	30,0867	2,23	0,1956
AA	2033,68	1	2033,68	150,72	0,0001
AB	8,7025	1	8,7025	0,64	0,4584
BB	45,1334	1	45,1334	3,34	0,1269

Error total	67,4642	5	13,4928		
Total (corr.)	8835,81	10			

R-cuadrada = 99,2365 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98,4729 por ciento

Error estándar del est. = 3,67326

Error absoluto medio = 2,05705

Estadístico Durbin-Watson = 1,49375 (P=0,3282)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,241793

### Análisis de Varianza ( $\alpha=0,05$ ) para el gradiente de T en el Diseño de compuesto central

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Caudal aire	28,1802	1	28,1802	28,99	0,0030
B:C/N	0,252328	1	0,252328	0,26	0,6321
AA	2,70645	1	2,70645	2,78	0,1561
AB	0,1764	1	0,1764	0,18	0,6878
BB	0,144938	1	0,144938	0,15	0,7153
Error total	4,86005	5	0,972011		
Total (corr.)	37,0311	10			

R-cuadrada = 86,8757 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 73,7515 por ciento

### Análisis de Varianza ( $\alpha=0,05$ ) para producción el gradiente de concentración (%) Diseño de compuesto central

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Caudal de aire	12278,8	1	12278,8	37,61	0,0017
B:C/N	103,555	1	103,555	0,32	0,5976
AA	4231,22	1	4231,22	12,96	0,0155
AB	86,49	1	86,49	0,26	0,6287
BB	231,149	1	231,149	0,71	0,4385
Error total	1632,57	5	326,515		
Total (corr.)	18349,5	10			

R-cuadrada = 91,1029 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 82,2058 por ciento

Error estándar del est. = 18,0697

Error absoluto medio = 10,7788

Estadístico Durbin-Watson = 2,19423 (P=0,7293)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,216542

### Análisis de Varianza ( $\alpha=0,05$ ) para el gradiente de P en el Diseño de compuesto central

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Caudal aire	1209,92	1	1209,92	35,36	0,0019
B:C/N	204,586	1	204,586	5,98	0,0583
AA	422,852	1	422,852	12,36	0,0170
AB	363,665	1	363,665	10,63	0,0224
BB	1,94359	1	1,94359	0,06	0,8211



Error total	171,096	5	34,2193		
Total (corr.)	2436,45	10			

R-cuadrada = 92,9776 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 85,9553 porciento

### Análisis de Varianza ( $\alpha=0,05$ ) para la velocidad específica máxima de crecimiento en el Diseño de compuesto central

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Caudal de aire	0,0027012	1	0,0027012	18,16	0,0080
B:C/N	0,00183316	1	0,00183316	12,32	0,0171
AA	0,000155153	1	0,000155153	1,04	0,3540
AB	0,0000189225	1	0,0000189225	0,13	0,7359
BB	0,00000226498	1	0,00000226498	0,02	0,9066
Error total	0,000743852	5	0,00014877		
Total (corr.)	0,00548154	10			

R-cuadrada = 86,4299 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 72,8597 porciento

Error estándar del est. = 0,0121972

Error absoluto medio = 0,00666688

Estadístico Durbin-Watson = 2,19131 (P=0,7278)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,103989

### Análisis Multivariado correlaciones de Spearman

Datos/Variabes:

C/N

Caudal aire (m<sup>3</sup>/h)

CO<sub>2</sub> (g/kg)

Gradiente de H ((%))

Gradiente de P ((%))

Gradiente T ((°C))

Productividad

#### Correlación Ordinal de Spearman

	C/N	Caudal aire	CO <sub>2</sub>	Gradiente de H	Gradiente de P	Gradiente T	Productividad
C/N		0,0000	-0,2998	-0,1485	0,2875	-0,0958	0,6900
		(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
		1,0000	0,3431	0,6386	0,3633	0,7619	0,0291
Caudal aire	0,0000		0,7737	0,9343	-0,6708	0,9199	-0,4216
	(11)		(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
	1,0000		0,0144	0,0031	0,0339	0,0036	0,1824
CO <sub>2</sub>	-0,2998	0,7737		0,7432	-0,8074	0,8165	-0,7707
	(11)	(11)		(11)	(11)	(11)	(11)
	0,3431	0,0144		0,0188	0,0107	0,0098	0,0148
Gradiente de H	-0,1485	0,9343	0,7432		-0,6545	0,8000	-0,4545
	(11)	(11)	(11)		(11)	(11)	(11)
	0,6386	0,0031	0,0188		0,0385	0,0114	0,1506
Gradiente de P	0,2875	-0,6708	-0,8074	-0,6545		-0,7545	0,5182
	(11)	(11)	(11)	(11)		(11)	(11)
	0,3633	0,0339	0,0107	0,0385		0,0170	0,1013
Gradiente T	-0,0958	0,9199	0,8165	0,8000	-0,7545		-0,4909

	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)		(11)
	0,7619	0,0036	0,0098	0,0114	0,0170		0,1206
Productividad	0,6900	-0,4216	-0,7707	-0,4545	0,5182	-0,4909	
	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	
	0,0291	0,1824	0,0148	0,1506	0,1013	0,1206	

### Optimización de Múltiples Respuestas para Log Productividad

Datos/VARIABLES:

Productividad

	Mínimo	Máximo
Respuesta	Observado	Observado
Productividad	6,79	7,59

	Deseabilidad	Deseabilidad		Pesos	Pesos	
Respuesta	Baja	Alta	Meta	Primero	Segundo	Impacto
Productividad	6,79	7,59	Maximizar	1,0		3,0

Fila	Productividad	Deseabilidad Prevista	Deseabilidad Observada
1	7,08	0,620833	0,3625
2	7,35	0,775325	0,7
3	7,07	0,242889	0,35
4	7,2	0,499084	0,5125
5	7,19	0,620833	0,5
6	7,27	0,474751	0,6
7	6,95	0,338415	0,2
8	7,59	0,620833	1,0
9	6,85	0,07525	0,075
10	7,5	0,869612	0,8875
11	6,79	0,0496741	0,0

Productividad - maximizar

#### Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo = 0,896679

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Caudal aire	0,331348	1,93365	0,908355
C/N	9,19523	18,1048	18,1048

Respuesta	Óptimo
Productividad	7,50734

## C. Anexo: Determinación de la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ , $\text{h}^{-1}$ )

Siguiendo el método descrito por Gelmi *et al* (2000) las velocidades específicas máximas de crecimiento para *T. asperellum* Th204 se estimaron utilizando los resultados de respirometría específicamente los de producción de  $\text{CO}_2$ . En todos los tratamientos (T1 a T11) cada 20 minutos se determinó la concentración de  $\text{CO}_2$  medida como los gramos de  $\text{CO}_2$  acumulados producidos por gramo de sustrato seco. Tomando el logaritmo natural de la concentración de  $\text{CO}_2$  y graficándola en función del tiempo se determinó la pendiente (intervalo de 20-40 horas) siendo esta la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\text{h}^{-1}$ ).

Teniendo como ejemplo el tratamiento T10 se determinó para el periodo entre 20 y 40 horas la pendiente correspondiente a la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) de  $0,0736 \text{ h}^{-1}$ .

**Anexo C Figura 1:** Figura 1. Perfil de Acumulación de  $\text{CO}_2$  producido durante la fermentación de *T. asperellum* Th204 y estimación de la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) (T10)

