

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

**“ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN EN
MEDIO SÓLIDO CON ASPERGILLUS NIGER
EN UN REACTOR TIPO SEMI-PILOTO”.**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

I.Q. Edgar Adán Hernández Avelino

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Rosalía Cerecero Enríquez

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Manuel Tejero Andrade





FECHA: 24/01/2017
DEPENDENCIA: POSGRADO
ASUNTO: Autorización de Impresión
OPCIÓN: I

C. EDGAR ADAN HERNANDEZ AVELINO
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN:
CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

**"ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO CON ASPERGILLUS NIGER
EN UN REACTOR TIPO SEMI-PILOTO"**.

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E


M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES
JEFE DE LA DIV. DE ESTUDIOS DE POSGRADO



SECRETARIA DE
EDUCACION PÚBLICA
INSTITUTO
TENOLOGICO
DE ORIZABA

ggc



SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



Subsecretaría de Educación Superior
Tecnológico Nacional de México
Instituto Tecnológico de Orizaba

FECHA : 07/12/2016

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

C. M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACION.
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C. :

EDGAR ADAN HERNANDEZ AVELINO

la cual lleva el título de:

"ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO CON ASPERGILLUS NIGER EN UN REACTOR TIPO SEMI-PILOTO".

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : DRA. ROSALIA CERECERO ENRIQUEZ

SECRETARIO : DR. JOSE MANUEL TEJERO ANDRADE

VOCAL : DRA. GUADALUPE LUNA SOLANO

VOCAL SUP. : M.I. NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTU

FIRMA

FIRMA

FIRMA

FIRMA

EGRESADO(A) DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

OPCION: I Tesis



RECONOCIMIENTOS

A mi asesor el Dr. José Manuel Tejero Andrade por la paciencia, asesoramiento y consejos para realizar este trabajo posible.

A mi asesora la Dra. Rosalía Cerecero Enríquez por el apoyo en revisiones y consejos para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Luna Solano por las revisiones y observaciones realizadas para complementar el trabajo.

A la M.I.Q. Norma Vallejo Cantú por las revisiones y observaciones realizadas para complementar el trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca nacional otorgada con el número de registro 389837, durante mi permanencia en la Maestría en Ciencias en Ingeniería Química.

RESUMEN

Estudio de la fermentación en medio sólido con *Aspergillus niger* en un reactor tipo semi-piloto.

Realizado por: Ing. Edgar Adán Hernández Avelino

Dirigido por: Dra. Rosalía Cerecero Enríquez

Dr. José Manuel Tejero Andrade

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un bioreactor escala semi-piloto para el estudio de la fermentación en medio sólido a partir de bagazo de caña de azúcar, cascarilla y pulpa de café, con la cepa de *A. niger* ITV-18. Los residuos en fresco (60-80% de humedad) fueron secados (%humedad<10, $a_w < 0.1$) para ser el soporte-sustrato en la fermentación en mezcla (70% pulpa, 15% cascarilla y 15% bagazo). Se evaluó el efecto del tamaño de partícula del bagazo en la fermentación a nivel laboratorio (1.18 mm, 1mm y 850 μ m). Se realizaron tres tratamientos, con tres réplicas cada uno. Se inocularon 10 g de sustrato con una concentración de 1.1×10^7 esporas/mL y se adicionaron 10 mL de solución nutritiva (100 g $C_{12}H_{22}O_{11}$, 25 g NH_4NO_3 , 2.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.04 g de $CuSO_4$ en un 1 L de agua destilada), incubándose el cultivo durante 7 días. Se estudió el efecto del tamaño de partícula del bagazo (1.18 mm, 1mm y 850 μ m) en el crecimiento de la cepa de *A. niger*. El análisis de varianza no mostró diferencias significativas en el crecimiento del hongo para los tres tamaños, mostrando un crecimiento máximo de 5.7×10^7 esporas/mL en el sustrato de bagazo de tamaño 1.18 mm. Se evaluó el estado no aséptico de la fermentación en caja Petri con las condiciones anteriores. Los resultados mostraron contaminación fúngica (*A. Awamori* y *A. Flavus*) en 4 de los 6 ensayos, por ello, se descartó el estado no aséptico para la etapa semi-piloto. Para esta etapa se diseñó y construyó un bioreactor columna-charola, instrumentado con higrómetro, flujo de aire estéril (100-120 mL/min) y húmedo (60-65%) a 25-28 °C. Para la generación de biomasa de *A. niger*, en condiciones fermentativas se utilizó un inóculo de 1.2×10^6 esporas/mL y se adicionó la solución nutritiva (relación sustrato/solución nutritiva de 1:1 p/v). La fermentación se realizó durante 8 días, alcanzándose el rendimiento máximo al sexto día (23.3 g de biomasa/40 g de sustrato) y conversión de 58.25 %.

ABSTRACT

Study of the fermentation in solid medium with *Aspergillus niger* in a reactor semi-pilot type.

**Made by: Ing. Edgar Adán Hernández Avelino
Directed by: Dra. Rosalía Cerecero Enríquez
Dr. José Manuel Tejero Andrade**

The objective of this work was the development of a bioreactor semi-pilot scale for the study of the fermentation in solid medium from sugar cane bagasse, husk and coffee pulp, with *A. niger* ITV-18 strain. Residues in fresh (60-80% moisture) were dried (moisture content <10, a_w <0.1) to be the substrate-carrier in the fermentation mixture (70% pulp, 15% husk and 15% bagasse). The effect of bagasse particle size on fermentation at laboratory level (1.18 mm, 1 mm and 850 μ m) was evaluated. Three treatments were performed, with three replicates each. 10 g of substrate was inoculated with a concentration of 1.1×10^7 spores/mL and 10 mL of nutrient solution (100 g $C_{12}H_{22}O_{11}$, 25 g NH_4NO_3 , 2.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.04 g of $CuSO_4$ in 1 L of distilled water) were inoculated. The culture being incubated for 7 days. The effect of bagasse particle size (1.18 mm, 1 mm and 850 μ m) on the growth of the *A. niger* strain was studied. The analysis of variance didn't show significant differences in fungus growth for all three sizes, showing a maximum growth of 5.7×10^7 spores/mL in the bagasse substrate size 1.18 mm. The non-aseptic state of the Petri dish fermentation with the above conditions was evaluated. The results showed fungal contamination (*A. Awamori* and *A. Flavus*) in 4 of 6 assays, therefore the non-aseptic state was discarded for the semi-pilot stage. For this stage, a column-tray bioreactor, instrumented with hygrometer, sterile air flow (100-120 mL/min) and wet (60-65%) at 25-28 °C was designed and built. The inoculum of 1.2×10^6 spores / mL was used under fermentative conditions and the nutrient solution (substrate/nutrient solution ratio of 1: 1 w/v) was added to the biomass of *A. niger*. Fermentation was carried out for 8 days, reaching the maximum yield at sixth day (23.3 g of biomass/40 g of substrate) and conversion of 58.25%.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	vi
INTRODUCCION	1
OBJETIVO GENERAL	3
JUSTIFICACION	4
CAPITULO 1. FUNDAMENTOS TEORICOS	5
1.1 Generalidades de la fermentación en medio sólido	6
1.1.1 Definición e introducción a la fermentación en medio sólido	6
1.2 Ventajas y desventajas de la SSF en comparación con SmF	7
1.3 Aplicaciones actuales y potenciales de la SSF	9
1.4 Aspectos bioquímicos e ingenieriles de la SSF	10
1.4.1 Microorganismos	10
1.4.2 Sustrato	12
1.4.2.1 Concentración y disponibilidad del sustrato	13
1.4.2.2 Tamaño de partícula	14
1.4.2.3 Bagazo de caña de azúcar	14
1.4.2.4 Residuos de café	15
1.4.3 Humedad	15
1.4.4 Potencial de hidrógeno	16
1.4.5 Temperatura	17
1.4.6 Aireación	18
1.5 Diseño del bioreactor	18
1.5.1 Clasificación de los bioreactores en SSF por diseño y operación	19
1.5.2 Clasificación de bioreactores en SSF por volumen de operación	20
1.5.3 Descripción de bioreactores	22
1.5.3.1 Bioreactor en columna	22
1.5.3.2 Bioreactor de columna estéril	23
1.5.3.3 Tambor horizontal	25

1.5.3.4 Bioreactor Zymotis	26
1.5.3.5 Bioreactor Growtek	27
1.5.3.6 Bioreactor para proceso continuo	28
1.5.3.7 Bioreactor Biocon	29
1.5.3.8	
Bioreactor de lecho fluidizado	31
1.6 Antecedentes y avances	32
CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1 Metodología general	38
2.2 Selección y acondicionamiento del sustrato-soporte	39
2.2.1 Selección de residuos agroindustriales	39
2.2.2 Bagazo de caña	39
2.2.3 Pulpa y cascarilla de café	40
2.2.4 Pretratamiento de los residuos	40
2.2.5 Secado	40
2.2.6 Molienda	41
2.2.7 Tamizado	41
2.2.8 Almacenamiento	41
2.3 Caracterización fisicoquímica de la materia prima	42
2.4 Microorganismo	43
2.4.1 <i>Aspergillus niger</i>	43
2.4.2 Activación de la cepa de <i>Aspergillus niger</i> ITV-18	43
2.4.3. Incubación	43
2.5 Preparación de solución de Tween 80 al 0.1 %	43
2.6 Preparación del inóculo	44
2.6.1 Crecimiento celular y ajuste del inóculo	44

2.7 Microscopio Zeiss Primo Star	44
2.8 Preparación de solución mineral nutritiva	45
2.9 Fermentación en estado sólido	45
2.9.1 Fermentación a nivel laboratorio	45
2.10 Bioreactor	45
2.10.1 Diseño	45
2.10.2 Configuración y construcción	46
2.11 Instrumentación	46
2.11.1 Sensor de temperatura-humedad	46
2.11.2 Calibración	47
2.12 Servicios auxiliares	47
2.12.1 Sistema de flujo de aire	47
2.12.2 Humidificador	47
2.13 Conexiones	48
2.14 Condiciones de la fermentación en el bioreactor	48
2.15 Cuantificación de biomasa	48
2.17 Cinética de crecimiento	49
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
3.1 Sustrato-soporte	51
3.2 Análisis de la materia prima	51
3.3 Análisis Químicos	53
3.4 Análisis Físicos	54
3.4 Fermentación en medio sólido nivel laboratorio	55

3.5 Evaluación del tamaño de partícula del bagazo de caña	55
3.6 Estado no aséptico	59
3.7 Elección del Bioreactor	61
3.8 Diseño del bioreactor columna-charola	63
3.8.1 Estructura del bioreactor	63
3.9 Reactor Columna-Charola UAC	67
3.10 Instrumentación	68
3.10.1 Validación de los datos de temperatura y humedad	69
3.11 Validación del bioreactor columna-charola	70
3.11.1 Montaje del sistema de fermentación en medio sólido	70
3.12 Fermentación a escala semi-piloto	71
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.1	Representación del sistema de fermentación en estado sólido (SSF)	6
1.2	Características del <i>A. niger</i>	11
1.3	Requerimientos de actividad de agua para diversos Microorganismos	16
1.4	Características de diseño básicas de los diversos biorreactores SSF	20
1.5	Reactor de columna a escala de laboratorio	23
1.6	Bioreactor de columna estéril	24
1.7	Bioreactor de tambor horizontal	26
1.8	Biorreactor de tambor horizontal con paletas	27
1.9	Biorreactor Zymotis	28
1.10	Biorreactor (Growtek)	29
1.11	Vista general de la fermentación continua en estado sólido	30
1.12	Biorreactor PlaFractorTM	31
1.13	Diagrama esquemático de un bioreactor a gran escala	32
1.14	Bioreactor columna-charola de la UAC	34
2.1	Metodología del proceso fermentativo a escala semi-piloto	38
2.2	Bagazo de caña semi-humedo del Ingenio “La Gloria”	39
2.3	Residuos de café de la región de Huatusco	40
2.4	Secado solar en charolas del bagazo de caña	41
2.5	Sensor comercial de uso industrial SHT21	46
3.1	Materia prima seca y molida	52
3.2	Mezcla de bagazo de caña, cascarilla y pulpa de café	56
3.3	<i>Aspergillus niger</i> ITV-18 en objetivo 40x	57
3.4	Esporas de <i>A. niger</i> en cámara de Neubauer	57

3.5	Gráfica de comparación de medias de tamaño de partícula	59
3.6	Crecimiento de ITV-18 fermentado en mezcla de residuo de café y bagazo	60
3.7	Contaminación de cultivo en la FES	61
3.8	Bioreactor columna-charola	63
3.9	Placa de distribución uniforme de aire	64
3.10	Dimensiones de la columna de vidrio	65
3.11	Soporte interno	66
3.12	Bridas superior e inferior	66
3.13	Higrómetro	69
3.14	Interfaz desarrollada	69
3.15	Diagrama esquemático del montaje del sistema Fermentativo	71
3.16	Crecimiento del <i>A. niger</i> al interior del reactor columna-charola	72
3.17	Biomasa recuperada en solución de twenn 80 al 0.01%	73
3.18	<i>A. niger</i> creciendo alrededor del bagazo de caña	73
3.19	Cinética de crecimiento microbiano del <i>A. niger</i> sobre la mezcla de sustratos	74
3.20	Monitoreo del pH durante el proceso fermentativo	75
3.21	Monitoreo de temperatura al interior del bioreactor	76

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1.1	Tabla comparativa entre la fermentación sumergida (SFm) y en soporte sólido (SSF)	7
1.2	Clasificación y diferencias en bioreactores a nivel laboratorio, piloto e industrial	21
2.1	Descripción de la caracterización química de la materia prima	42
2.2	Descripción de la caracterización física de la materia prima	42
3.1.	Porcentaje de humedad y actividad de agua del soporte-sustrato utilizado	51
3.2.	Resultados de la caracterización química del bagazo de caña <i>Saccharum officinarum L</i>	53
3.3.	Resultados de la caracterización química de la cascarilla y pulpa de café (<i>Coffea-arabica</i>)	53
3.4.	Resultados de la caracterización física del bagazo de caña	54
3.5.	Resultados de la caracterización física de la cascarilla de café	54
3.6.	Resultados de la caracterización física de la pulpa de café	54
3.7.	Resultados de crecimiento microbiano del <i>A. Niger</i> (esporas/mL)	58
3.8.	Análisis de varianza del crecimiento de <i>A. Niger</i> en la mezcla de sustratos	58
3.9.	Evaluación del estado aséptico en la mezcla residuos de café bagazo	60
3.10.	Ventajas y desventajas del diseño columna-charola	62
3.11.	Características del bioreactor desarrollado en el Instituto Tecnológico de Orizaba	67
3.12.	Características del biorreactor desarrollado en la Universidad Autónoma de Coahuila	67

3.13.	Datos de temperatura del termómetro de referencia y el higrómetro diseñado	70
3.14.	Datos de humedad relativa del higrómetro de referencia y el realizado	70

INTRODUCCIÓN

Los procesos fermentativos puede ser realizado por (1) fermentación sumergida, la cual se basa en el cultivo de microorganismos en medio líquido conteniendo nutrientes y, (2) fermentación en medio sólido (SSF, por sus siglas en inglés), la cual consiste en el crecimiento microbiano y formación de producto en partículas sólidas en ausencia (o casi ausencia) de agua, sin embargo, el sustrato contiene la suficiente humedad para permitir el crecimiento y metabolismo del microorganismo (Pandey, 2003). Las ventajas que presenta la SSF debido al bajo contenido de líquido que requiere, es que, se utilizan fermentadores relativamente pequeños, sin que se sacrifique el rendimiento del producto, además la baja actividad de agua reduce las contaminaciones pues solo algunas bacterias son capaces de crecer en estas condiciones.

El diseño de bioreactores para la SSF ha avanzado lentamente en la última década debido a problemas de operación, fenómenos de transferencia de masa y escalamiento. La limitante principal en este tipo de cultivo concierne al escalamiento del proceso, en gran medida debido a la transferencia de calor y problemas de homogeneidad del cultivo. Para evitar estos problemas se deben de diseñar fermentadores con control de las variables críticas del proceso para el desarrollo optimó del mismo, con el microorganismo adecuado para la obtención del producto deseado.

Por otro lado, la especie de *Aspergillus niger* se encuentran en el suelo y entre la materia vegetal, es la especie más común de hongos. Este organismo es el contaminante más frecuente en los laboratorios de microbiología. Es un hongo filamentoso perteneciente al grupo de los *Deuteromicetos*, familia *Eurotium*, y se caracteriza por presentar hifas septadas, esporas asexuales llamadas conidiosporas. La forma vegetativa o micelio de *A. niger* es de color blanco o amarillento, al llegar a la madurez se producen estructuras reproductoras llamadas conidióforos que dan origen, en el tipo silvestre, a esporas negras, lo que da el nombre de la especie, y es común en todo tipo de residuos orgánicos (Romero, 2001).

Los residuos agroindustriales han surgido como una fuente reutilizable de materiales de desecho, en este grupo está el bagazo de caña, cascarilla y pulpa de café, son residuos de

generación alta localmente. Entonces la SSF surge como alternativa para el crecimiento microbiano en sustratos naturales orgánicos para la obtención de productos de valor agregado.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar, construir y evaluar un bioreactor para fermentación en medio sólido a escala semi-piloto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones idóneas *in vitro* para la fermentación de *A. niger* en medio sólido de bagazo de caña, cascarilla y pulpa de café.
- Diseñar y construir un bioreactor a escala semi-piloto.
- Instrumentar y controlar las condiciones de operación del bioreactor.
- Determinar las condiciones de fermentación en medio sólido de *A. niger* y validar el bioreactor.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente los residuos agroindustriales son un foco de atención debido a que parte de sus constituyentes pueden ser materia prima para generar diversos productos de valor económico. En menor cantidad contienen (cafeína, taninos, polifenoles), y muestran una naturaleza tóxica que limita su potencial uso. Por lo que, representa un problema ambiental su deposición final. Con las ventajas de la biotecnología se ha incrementado a nivel global el uso potencial de estos agro-residuos en la obtención de enzimas, ácidos orgánicos, metabolitos secundarios, proteína unicelular, etc.

Una alternativa para el uso de los residuos es la fermentación en medio sólido, que proporciona una solución a esta problemática, donde los medios de cultivo son simples, subproductos agrícolas que se reutilizan debido al alto contenido de nutrientes, o que pueden ser enriquecidos para utilizarlos como soporte inerte. El problema de esta tecnología es el poco conocimiento que se tiene, otra limitante del escalamiento debido al nulo desarrollo de sistemas de bio-reacción a escala semi-piloto y piloto. A favor de esta fermentación podemos mencionar que tiene rendimientos equiparables o superiores a la de cultivo sumergido, con requerimientos energéticos menores, menor espacio de ocupación además de un añadido de que la recuperación del producto es más sencilla, y las posibilidades de contaminación en el cultivo son menores.

Es por ésto que se propone diseñar y validar un reactor para la fermentación en medio sólido a escala semi-piloto, que permitirá generar infraestructura y aportar mayor conocimiento en el proceso fermentativo y en el aprovechamiento de residuos agroindustriales locales, como los generados en la zona centro del estado de Veracruz, por la industria azucarera (bagazo de caña) y cafetalera (pulpa y cascarilla), debido a que es el primer lugar en producción de azúcar y el segundo en producción de café del país.

CAPITULO I

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Generalidades de la fermentación en medio sólido

1.1.1 Definición e introducción a la fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido (SSF) se define como la fermentación que implica sustratos sólidos cerca de la ausencia de agua, sin embargo, el sustrato debe poseer la suficiente humedad para apoyar el crecimiento y metabolismo del microorganismo (Pandey *et al.*, 2000). En general, los procesos fermentativos (figura 1.1) se dividen en fermentación líquida sumergida (SmF por sus siglas en inglés) y fermentación en medio sólido (SSF). La principal diferencia entre estos dos procesos, es la cantidad de líquido libre en el sustrato.

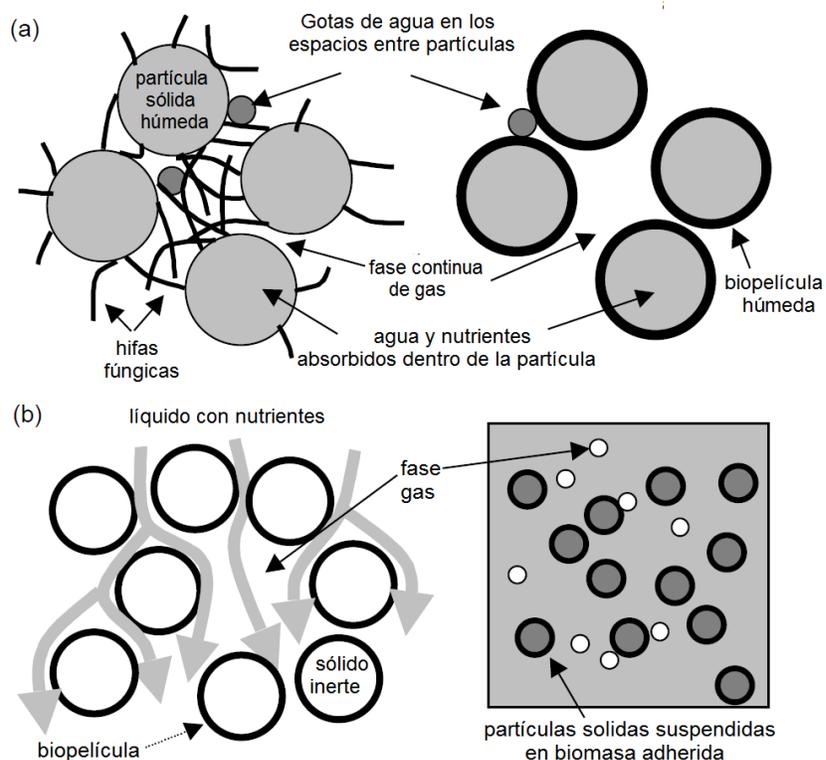


Figura 1.1 Representación del sistema de fermentación en estado sólido (SSF). (a) Arreglo de las partículas sólidas y el continuo paso de gas en SSF en un sistema con hongos filamentosos. (b) Sistema que involucra crecimiento sobre sólido, pero no se define como SSF debido a la cantidad de

agua entre partículas. El diagrama de la izquierda representa un sistema de tipo goteo-filtro, mientras que el de la derecha representa un sistema de suspensión o lechada (Mitchell *et al.*, 2006).

1.2 Ventajas y desventajas de la SSF en comparación con SmF

Debido a las particularidades antes definidas que presentan los sistemas de fermentación sólida, se presentan algunas ventajas y desventajas generales entre el cultivo sólido y el sumergido en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Tabla comparativa entre la fermentación sumergida (SFm) y en soporte sólido (SSF)

Fermentación sumergida	Fermentación sólida
Los medios tienen mayor cantidad de compuestos, es decir son más complejos.	Medios simples, requieren una solución de agua o mineral y sustratos variables.
Mayor riesgo de contaminación	Bajas a_w reduce los riesgos de contaminación
Medios diluidos. Volúmenes de fermentadores grandes.	Medios concentrados. Menor volumen de reactor
Transferencia gas-líquido es generalmente limitante	Menor consumo de energía para la aireación
Mezclado homogéneo, la difusión de los nutrientes no es limitante	Mezclado imperfecto. Difusión puede limitar el proceso.
Alto contenido de agua facilita el control de la temperatura	Remoción de calor es crítica y la transferencia de calor por evaporación puede ser importante.
Amplio desarrollo de sistemas de medición y control	Control del proceso es difícil y la estimación de biomasa no es directa
Cinética y modelos difusionales conocidos	Cinética y fenómenos de transporte poco conocidos

Hesseltine (1972), describe incipientemente a la SSF como “fermentaciones donde el sustrato no es líquido”, después Raimbault (1980) propuso “fermentaciones donde el sustrato no está ni disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua” Moo-Young *et al.* (1983), propusieron “procesos que utilizan materiales insolubles en agua para el crecimiento de microorganismos en ausencia de agua libre”. Una definición más general, de Viniegra-González (1997), “proceso microbiológico que ocurre

comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles". Esta definición abarca a procesos donde el soporte sólido es inerte y los sustratos que utiliza el microorganismo pueden ser sustancias solubles en agua.

En los últimos años, la SSF ha demostrado ser un campo fértil en el desarrollo de nuevos bioprocesos y generación de productos con valor agregado, por lo que se han evaluado diferentes productos que pueden ser obtenidos por este método.

Este proceso fermentativo consiste en hacer crecer un microorganismo sobre un sustrato, empleando una fuente de nitrógeno y sales nutritivas, en condiciones controladas de humedad, pH, aireación y temperatura. Esta fermentación no presenta agua libre en su estructura, aunque si requerimientos mínimos de humedad. El desarrollo de la biotecnología favorece el empleo de hongos filamentosos con vistas al enriquecimiento proteico del producto final y la excreción al medio de enzimas, entre las que se encuentran *celulasas*, *amilasas*, *pectinasas*, *xilanasas* y *glucoamilasas* (Díaz-Plascencia *et al.*, 2011). Las investigaciones que se realizan en la actualidad van enfocadas hacia este rubro del enriquecimiento proteico de los residuos agroindustriales en algunos casos de la producción azucarera (Echeverría *et al.*, 2003).

Ejemplos de procesos sólidos fermentativos tradicionales son:

- Tempe, que consiste en el cultivo del hongo *Rhizopus oligosporus* en soja cocida. El micelio del hongo se une la soja en una torta compacta, que se fríe y se come como un sustituto de la carne. Este alimento fermentado es muy popular en Indonesia;
- En la fabricación de salsa koji de soja, que consiste en el cultivo del hongo *Aspergillus oryzae* en soja cocida. Durante el proceso de SSF inicial de 2 a 3 días, el micelio fúngico abarca no sólo los granos, sino también segrega una mezcla de enzimas en ellos. Los granos fermentados se transfieren luego en

salmuera, durante un período de varios meses donde las enzimas degradan lentamente a las semillas de soja, dejando una salsa de color marrón oscuro.

- ang-kak, o "arroz rojo", que consiste en el cultivo de la *Monascus purpureus* hongos en el arroz cocido. El hongo produce un pigmento de color rojo oscuro. Al final de la fermentación del arroz rojo fermentado se seca y se muele, el polvo que se utiliza como un colorante en la cocina. (Díaz-Plascencia *et al.*, 2010)

1.3 Aplicaciones actuales y potenciales de la SSF

Mitchel *et al.*, 2002, afirman que se ha incrementado el interés por el desarrollo tecnológico de la SSF, con fines de producción de:

- Enzimas por ejemplo, *amilasas*, *proteasas*, *lipasas*, *pectinasas*, *celulasas*, *tanases*, y cuajo
- pigmentos
- compuestos aromáticos y saborizantes
- ácido giberélico (hormona del crecimiento vegetal)
- enriquecimiento proteico de residuos agrícolas usados como alimentos de animales
- alimentos para animales con niveles reducidos de toxinas o mayor digestibilidad
- antibióticos (penicilina y oxitetraciclina)
- agentes de control biológico (incluidos bioinsecticidas y bioherbicidas)
- inóculos de esporas (producción de queso azul a partir de esporas de *Penicillium roqueforti*)
- compuestos orgánicos (etanol, ácido oxálico, ácido cítrico, y ácido láctico)

Otras investigaciones sobre el uso de microorganismos que crecen en condiciones propias de la SSF para mediar en procesos tales como:

- decoloración de tintes;
- bioblanqueo
- biopulpeado
- biorremediación

1.4 Aspectos bioquímicos e ingenieriles de la SSF

En general las variables más importantes de la fermentación en medio sólido son el microorganismo, tipo de sustrato elegido, condiciones ambientales de humedad, actividad del agua, pH, temperatura, concentración, aireación, tamaño de partícula y cada uno afecta significativamente el rendimiento de productos en la SSF. Por lo que, en el siguiente apartado se citan y valoran cada variable del proceso:

1.4.1 Microorganismos

Son utilizados principalmente cepas puras de hongos filamentosos, cultivos mixtos de hongos con cepas modificadas genéticamente (para trabajar en simbiosis) y cultivos mixtos de cepas autóctonas aisladas de los sustratos utilizados. Entre las cepas de hongos utilizados en SSF los genéricos ó más comunes son: *Aspergillus* (Rahardjo *et al.*, 2005, Botella *et al.*, 2005, Nizamuddin *et al.*, 2008, Botella *et al.*, 2007), *Rhizopus* (Blandino *et al.*, 2001), *Trichoderma* (Melek *et al.*, 2001), *Penicillium* (Roussos y Perreud-Gaime 1996, Paz-Lago y Hernández 2000), *Gliocadium* (Pandey *et al.*, 1999), *Saccaobolus* (Diorio *et al.*, 2003), *Pleurotus* (Bermúdez *et al.*, 2003), *Phanerochaete* (Pandey *et al.*, 1999), *Coriolus* (Bhargav *et al.*, 2008).

El *Aspergillus niger* se encuentra en el grupo de los aspergilos negros, el cual se clasifica dentro de la familia moniliaceae, orden moniliales, clase hyphomicetes, filum deuteromycota. (Kwon-Chung, 1992). Es importante conocer las características del grupo de *Aspergillus niger* para su identificación (figura 1.2), las cuales son: cabezas conidiales de tonos negro a negro grisáceo, negro café, negro púrpura o negro

carbón, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidos. Los conidióforos son de color hialino a café, típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas, quebradizas, dividiéndose longitudinalmente al ser trituradas. Vesículas globosas o casi globosas, hialinas o de color café claro a oscuro. Esterigmata en una o dos series dependiendo de las especies, con frecuencia profundamente coloreadas. Los conidios son globosos o subglobosos, elípticos o achatados horizontalmente, lisos o casi lisos, espinosos, o con estrias longitudinales marcadas. Esclerotia globosa o subglobosa, de coloración crema cuando es joven, tornándose rosada, gris o café (Sáez *et al.*, 2002).

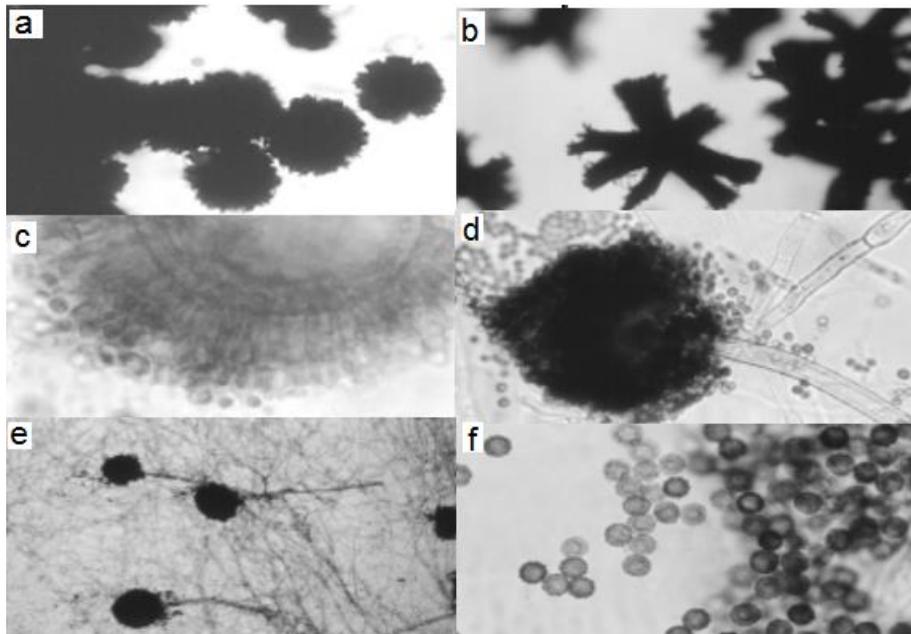


Figura 1.2. Características del *A. niger* a) Cabezas conidiales (globosas) b) Cabezas conidiales mostrando las columnas c) Vesícula, métulas, fiálides y conidios d) Cabeza conidial e) Conifióforo, vesícula y métulas f) Conidios (Sáez *et al.*, 2002).

1.4.2 Sustrato

Los residuos agroindustriales tienen características fisicoquímicas adecuadas para utilizarse como sustratos en los bioprocesos de la SSF. Con una composición

química en polisacáridos como celulosa y hemicelulosa, como fuente de carbono para los microorganismos. Sin embargo, la presencia de la lignina representa un factor que repercute en la disponibilidad de esos polisacáridos para el desarrollo microbiano, considerado un sustrato recalcitrante formado por polifenoles. Debido a esto, se incrementa el área superficial para el desarrollo microbiano, modificando el tamaño de partículas (pretratamiento mecánico) y, la accesibilidad a la fuente de nutrientes (pretratamientos químicos y enzimáticos) (Ferrer *et al.*, 2001). La selección de un residuo agroindustrial depende del costo, disponibilidad en cantidades para justificar una aplicación industrial y posibilidad de almacenamiento sin causar deterioro morfológico y microbiológico (Bhargav *et al.*, 2008).

La gran variedad de materiales sólidos utilizados en la SSF pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Materiales inertes: actúan como soporte físico para el anclaje de los microorganismos.
- Materiales no inertes: no sólo actúan como soporte, sino que además proporcionan algunos nutrientes a los microorganismos. Estos sustratos son compostas y productos heterogéneos de agricultura o subproductos de la industria agraria. Los materiales no inertes se dividen en:

Por su contenido en fibra:

- Alta digestibilidad: pulpa de cítricos, salvado de gluten de maíz, residuo de cebada, etc.
- Baja digestibilidad: bagazo de caña de azúcar, cereales: maíz, paja de soja y algodón, cáscaras de algodón, soja, cacahuate, bagazo de uva, etc.
- Salvados a los que pertenecen el arroz, cacahuetes, soja y algodón.

Entre los sustratos más utilizados en SFF se encuentran: bagazos de yuca, caña de azúcar, naranja, manzana, uva, aceituna y tomate, cascarilla y pulpa de café, salvado de trigo, paja de arroz, paja de trigo, harina de trigo, harina de maíz, escobajo de

uva, torta de presando en la producción de aceite de higuera, desecho generado en la producción de vinagre; okara (residuo generado en la preparación de queso de soya), según Ferrer *et al.* (2014).

1.4.2.1 Concentración y disponibilidad del sustrato

El medio de cultivo debe tener todos los nutrientes necesarios de forma balanceada para favorecer el crecimiento del microorganismo. Las relaciones entre algunos de sus elementos son de particular importancia, como carbono-nitrógeno y fósforo-oxígeno, esta última de relevante importancia en la eficiencia de conversión energética y tasa de respiración. La formulación depende de aspectos cuantitativos de los medios, es decir, debe establecer las concentraciones a ser utilizada de cada componente. Una primera aproximación con respecto a las cantidades a utilizar de las diversas fuentes, es el conocimiento de la composición de la biomasa del microorganismo empleado. Mediante el conocimiento de los coeficientes de rendimiento para la formación de biomasa y producto, y los valores de la energía de mantenimiento será posible establecer también los requerimientos de las fuentes de carbono necesarios para formular un medio (Pandey, 2003).

Al igual que en los cultivos sumergidos, la concentración de sustrato ejerce una influencia sobre el desarrollo del microorganismo. La influencia no está caracterizada en términos de limitación o inhibición como en los cultivos sumergidos; pero se piensa que los efectos de limitación sean mayores en las fermentaciones sólidas, debido a la baja velocidad de difusión de los nutrientes en la fase líquida (Ferrer *et al.*, 2014).

1.4.2.2 Tamaño de partícula

Está muy ligado a la transferencia de masa en el sistema de SSF, y considerando este fenómeno se ha propuesto dividir el análisis en la transferencia de masa

intrapartícula e interpartícula. En el primer caso, influye más el tamaño y la forma del poro de la partícula, así como la porosidad, aunque también influye el tamaño de la partícula. En el segundo caso, el espacio interpartícula es lo más importante y es afectado por el tamaño de la partícula, su forma y la humedad. Otro aspecto que influye en la transferencia de masa durante el proceso, es el cambio de estructura de las partículas de sustrato resultado de la acción de los microorganismos, (Pandey, 2003). Aunque en algunos sistemas donde el lecho no es compacto este factor se puede omitir.

1.4.2.3 Bagazo de caña de azúcar

El bagazo de caña es un residuo fibroso de la caña de azúcar obtenido después de la trituración y extracción del jugo, caracterizado por ser un material lignocelulolítico constituido principalmente por celulosa y hemicelulosa ligadas fuertemente a la lignina, representa el 25 a 30% por tonelada de caña molida. La composición es aproximadamente 50% de celulosa y 25% cada uno de hemicelulosa y lignina. Químicamente, el bagazo contiene alrededor de 50% α -celulosa, 30% de pentosas, y 2.4% de cenizas. Debido a su bajo contenido de cenizas, el bagazo ofrece numerosas ventajas en comparación con otros residuos, tales como, paja de arroz y paja de trigo, que tienen respectivamente 17.5% y 11%. Un bajo contenido de ceniza es útil en los procesos de bioconversión utilizando cultivos microbianos.

1.4.2.4 Residuos de café

La pulpa y cascarilla de café son considerados desechos del proceso de obtención del grano en la industria cafecultora. La pulpa de café es el principal residuo sólido del beneficio húmedo del grano de café y constituye aproximadamente el 40-45% y la cascarilla 5-8% del peso húmedo del grano de café. La eliminación de estos residuos constituye un problema ambiental, ya que la pulpa y el mucílago representan contaminación del agua (DQO) al ser desechados con el agua de

lavado. En general, de acuerdo a la composición de los residuos de la pulpa de café en beneficio húmedo es: materia seca, 90,64%; proteína cruda, 7,39%; grasa, 1,06%; fibra cruda, 10,63%; cenizas, 6,20% y carbohidratos 74,42% (Guattieri *et al.*, 2007). En la actualidad una disposición sustentable de los residuos es el aprovechamiento mediante la obtención de biomasa. Es llamada también “proteína unicelular”, dado que es el producto obtenido por bacterias, levaduras, algas y hongos crecidos por procesos fermentativos en desechos orgánicos (Gualtieri y Sánchez Crispín 2003, Gutiérrez Ramírez y Gómez Rave, 2008).

1.4.3 Humedad

Es el factor más decisivo sobre una fermentación en medio sólido. El nivel adecuado depende de la naturaleza del sustrato, tipo de producto final y los requerimientos del microorganismo. Se encuentra relacionado con la actividad de agua (a_w) cuya influencia sobre el desarrollo de las actividades metabólicas de los microorganismos es determinante. Los microhongos son los microorganismos más adecuados (figura 1.3), con bajos requerimientos en actividad de agua, para desarrollarse sobre sistemas en medio sólido. Los requerimientos de actividad de agua para la producción de metabolitos son superiores a los necesarios para el crecimiento, por lo que el mantenimiento y control de la humedad en los cultivos puede utilizarse como recurso para el control externo de este tipo de procesos (Díaz-Plascencia *et al.*, 2010). Así, un alto contenido de humedad provoca descenso de la porosidad y de la difusión del oxígeno, y aumenta el riesgo de contaminación bacteriana e incrementa la formación de micelio aéreo, efectos que se deben prevenir en la SSF. Generalmente el contenido inicial de humedad en el sustrato oscila de 30 al 75%. Durante el curso de las fermentaciones ocurre reducción de este nivel debido tanto a pérdidas por evaporación, como a la propia actividad metabólica de los microorganismos. Por ello es frecuente la implementación de humidificadores en los fermentadores o bien simple adición en intervalos de agua estéril al sistema (Pastrana, 1996).

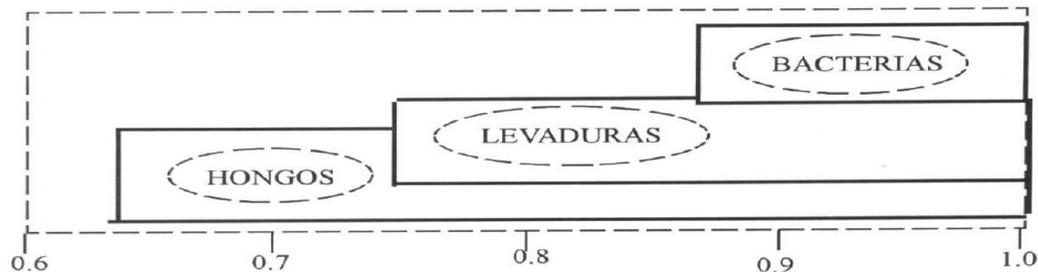


Figura 1.3 Requerimientos de actividad de agua para diversos microorganismos (Romero, 2001)

1.4.4 Potencial de hidrógeno

Este parámetro presenta un rango amplio para el desarrollo de microorganismos, cercanos a valores neutros, generalmente entre 5 y 8. Los hongos están adaptados a un rango más amplio de pH, son sensibles a alteraciones bruscas del pH del medio, afectando a la membrana y al transporte de solutos, inhibiendo la actividad de las enzimas, etc. Por este motivo, es muy importante controlar este parámetro durante la fermentación

Como consecuencia del crecimiento microbiano y la actividad metabólica se puede producir un cambio en el balance de los protones y, por tanto, en el pH del medio de cultivo. La razón más obvia para esta variación es la secreción por el microorganismo de ácidos orgánicos como son el ácido cítrico, acético o láctico, los cuales podrían disminuir el pH del medio, tal y como ocurriría con el consumo de las sales de amonio. Por otro lado, la asimilación de ácidos orgánicos, los cuales pueden estar presentes en ciertos medios, podría producir un incremento del pH (Pandey 2003).

La cinética de variación del pH está muy relacionada con el microorganismo utilizado. De esta manera se ha observado cómo especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus*, el pH suele caer rápidamente hasta un valor de 3. Sin embargo, para otros tipos de hongos de las especies de *Trichoderma*, *Sporotrichum* y *Pleurotus*, el

pH se estabiliza entre 4 y 5. La naturaleza del sustrato también tiene gran influencia en la cinética del pH, aunque los materiales lignocelulósicos, que se utilizan en la SSF, presentan efecto tampón por su compleja composición (Mitchell *et al.*, 2002).

La medición y control del pH durante todo el proceso de fermentación son necesarios para evitar alcanzar valores donde puede llegar a producirse la muerte del microorganismo. Además, el control del pH permite reducir o eliminar los riesgos de contaminación bacteriana en SSF de hongos y levaduras.

1.4.5 Temperatura

Es un factor importante en el crecimiento de los microorganismos, necesario para que se lleven a cabo toda serie de reacciones químicas y actividades celulares. Es una variable crítica, debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo sólido-líquido-gas, lo que favorece la acumulación del calor metabólico en el sistema e incremento de la temperatura del cultivo. Esto último favorece la actividad microbiana que se desacelera o se detiene; se deshidrata el medio sólido y, el metabolismo se desvía como un mecanismo de defensa ante el calor o ante la deshidratación (Bhargav *et al.*, 2008).

1.4.6 Aireación

La aireación en las fermentaciones en medio sólido es más fácil que las fermentaciones sumergidas, porque la superficie de contacto es mayor entre el aire y el líquido que está absorbido en las partículas. Esto permite la transferencia de masa tanto a nivel interparticular como intraparticular. A nivel interparticular el proceso de transferencia de masa más importante es la difusión de gases, en especial la transferencia de oxígeno y depende esencialmente de la proporción de espacios huecos en la masa de fermentación y de la aireación. La proporción de espacios huecos, es una función de la geometría de las partículas del sustrato, del contenido

en humedad y de la naturaleza química del sustrato, y debe representar al menos un 30% del volumen total de la masa de fermentación (Pastrana, 1996). Las tasas de aireación se establecen de acuerdo con el tipo de microorganismos, los requerimientos para la síntesis del producto objetivo, el grado de eliminación del calor y CO₂, el espesor de la capa de sustrato empleada y el número de espacios intersticiales que dejan las partículas de sustrato. Debido a que la mayor parte de los sustratos empleados en los cultivos en estado sólido son poliméricos (almidón, celulosa), necesitan ser previamente degradados por las enzimas extracelulares, las limitaciones difusionales intraparticulares juegan un importante papel.

1.5 Diseño del bioreactor

La SSF es un proceso biotecnológico y al equipo donde se lleva a cabo se denomina “bioreactor”. Este equipo debe proporcionar todas las condiciones operativas adecuadas para que el microorganismo produzca el compuesto deseado. El diseño de bioreactores para la SSF no ha presentado un avance significativo en los últimos tiempos, esto provocado por los problemas de operación del proceso mismo, los fenómenos de transporte que se presentan, principalmente de transferencia de masa y calor. En el escalamiento, aunque existen bioreactores que manejan volúmenes considerables, son casos aislados, pero de éxito, como las industrias establecidas de la salsa de soja y el Tempe, pero la información de estos desarrollos no está disponible. Los trabajos comúnmente se realizan en cajas Petri o a nivel matraz.

1.5.1 Clasificación de los bioreactores en SSF por diseño y operación

Mitchel *et al.* (2002), propone una clasificación en base a las similitudes de diseño y operación (figura 1.4), en la SSF se pueden dividir en grupos sobre la forma base en que se mezclan y se airean.

- Grupo I: Bioreactor de lecho estático o de mezclado poco frecuentemente (es decir, una o dos veces al día) y el aire circula alrededor, pero no atraviesa de

forma forzada a través del lecho. Estos se refieren a menudo como bioreactor de bandeja.

- Grupo II: Bioreactor de lecho es estático o de mezclado poco frecuente (es decir, una vez al día) y se pasa aireación forzada a través del lecho. Éstos son referidos típicamente como bio-reactores lecho empacado.
- Grupo III: Bioreactor de mezclado continuo o mezclado intermitentemente con una frecuencia de minutos a horas, y el aire es distribuido alrededor del lecho, pero no se hace pasar de forma forzada a través de él. Dos bioreactores tienen este modo de operación, utilizando diversos mecanismos para lograr la agitación, estos son bioreactor de tambor agitado y bioreactor de tambor rotatorio.
- Grupo IV: Bioreactor de lecho agitado y con aireación forzada través del lecho. Este tipo de bioreactor típicamente funciona en cualquiera de los dos modos, por lo que es útil para identificarlos realizar dos subgrupos.
 - ✓ Grupo IV a) bioreactor de mezclado continuo
 - ✓ Grupo IV b) bioreactor intermitente con intervalos de minutos a horas entre los eventos de mezcla. Varios diseños cumplen estos criterios, tales como lecho fluidizado gas-sólido, tambor agitado, y bioreactor agitado-aireado.

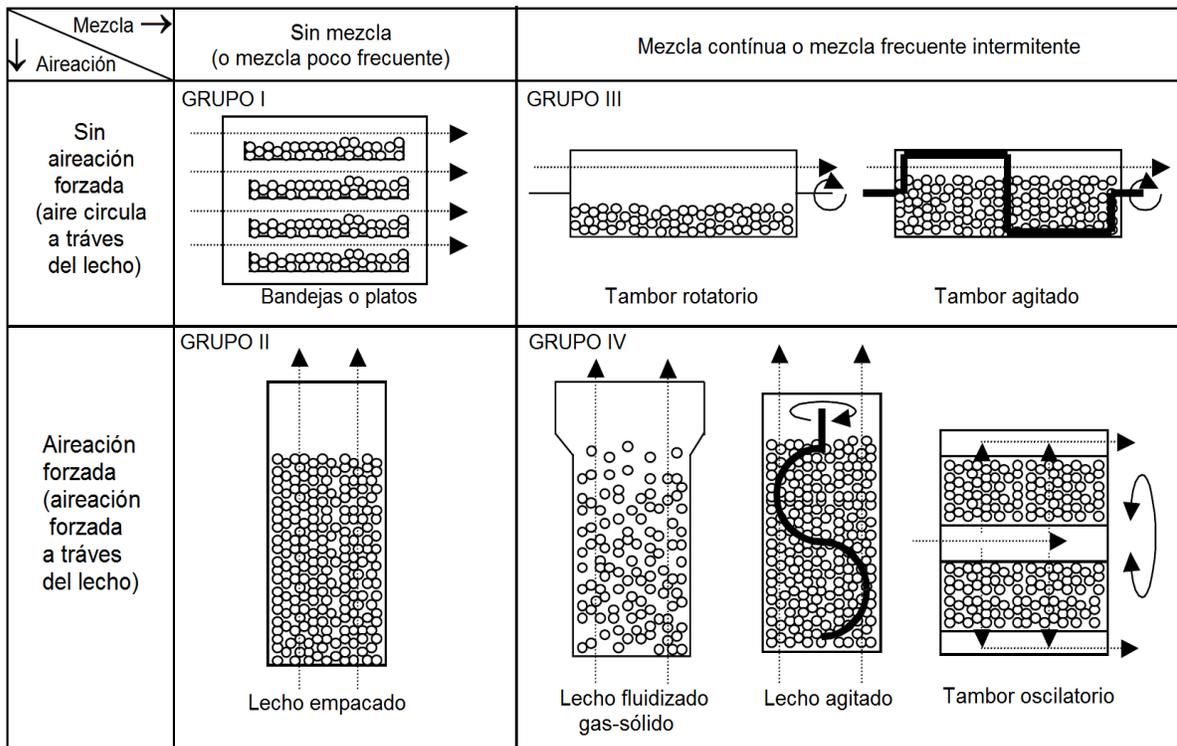


Figura 1.4 Características de diseño básicas de los diversos bioreactores SSF.

Es importante mencionar que esta división se realiza en base a la forma en que el bioreactor es operado, y no en la apariencia exterior del bioreactor.

1.5.2 Clasificación de bioreactores en SSF por volumen de operación

Ruíz-Leza *et al.* (2007), clasifican los procesos de fermentación en medio sólido en dos categorías de acuerdo al volumen de operación: A escala laboratorio en las cuales se utilizan pequeñas cantidades de medio sólido hasta pocos kilogramos. A escala piloto e industrial, en donde, se utilizan desde kilogramos hasta toneladas. En la primera categoría existen muchos diseños de bioreactores, los cuales llegan a ser muy sofisticados, mientras que en la segunda categoría es poca la variedad de bioreactores utilizados, solo algunos de los bioreactores a nivel industrial pueden operar en condiciones estériles, aunque sigue siendo un área de desarrollo. A

continuación se muestra la Tabla 1.2 con la clasificación de las ventajas y desventajas generales.

Tabla 1.2 Clasificación y diferencias en bioreactores a nivel laboratorio, piloto e industrial (Ruíz-Leza *et al.*, 2007)

Bioreactor	Ventajas	Desventajas
Escala Laboratorio		
Columna	Económico, fácil montaje, monitoreo y control humedad, temperatura, biomasa y CO ₂ . Conexión en forma continua de varias columnas.	Canales preferenciales de O ₂ , dificultad en la toma de muestra y problemas en la eliminación de calor.
Columna Estéril	Control de humedad y temperatura. Sistema de esterilización previo inoculación y toma de muestra.	Formación de gradientes de concentración de O ₂ y nutrientes.
Tambor horizontal	Mayor aireación y mezclado del sustrato. Existen varios diseños con modificaciones que mejoran la remoción del calor.	Daño de estructura micelial. Dificultad en el control de temperatura y humedad. Poco volumen utilizado en el tambor
Zymotis	Mejor transferencia de calor	Problemas de asepsia en el proceso. Mayor compactación de la cama de sustrato
Growtek	Facilidad en la toma de muestra. Mayor contacto entre el medio de cultivo y el soporte sólido. Menor acumulación de calor en el lecho de sustrato.	No cuenta con un sistema de aireación. Solo se pueden manejar una sola carga de 400 mL de medio líquido por fermentación.
Proceso continuo	Menor tiempo de residencia. Mejor mezclado y crecimiento fúngico. Mayor asepsia.	Transferencia no homogénea de calor. Aglomeración de células por rompimiento micelial.
Columna-Charola	Económico. Alta transferencia de O ₂ y aireación. Mayor transferencia de nutrientes. Fácil remoción de temperaturas elevadas.	Primer Prototipo. Optimizar la cantidad y tamaño de charolas en el volumen del cilindro.

Continuación de la tabla 1.2

Escala piloto y/o industrial		
Biocom	Automatizado en el control de las variables de estudio del crecimiento microbiano. Altos niveles de asepsia. Equipo compacto.	Dificultad en la toma de muestra. Rápida generación de calor exotérmico por crecimiento microbiano.
Lecho fluidizado	Opera de forma continua. Menor aglomeración del sustrato. Incremento en la transferencia de O ₂ y humedad. Variedad de configuraciones de soportes.	Formación de altos esfuerzos cortantes que pueden afectar al microorganismo y al rendimiento del producto.

1.5.3 Descripción de bioreactores

1.5.3.1 Bioreactor en Columna

Desarrollado y patentado por el grupo del Instituto para la Investigación y Desarrollo (IRD) en Francia entre 1975-1980, compuesto por pequeñas columnas de cuatro centímetros de diámetro y veinte centímetros de altura, el cual es llenado con un medio previamente inoculado y puesto en un termostato de agua (Figura 1.5). El equipo está conectado a una columna de cromatografía de gases para monitorear la producción de CO₂, resultado de la respiración del microorganismo y de sus reacciones metabólicas. La demanda de oxígeno se cubre por medio de aeración forzada utilizando compresores con sistemas de regulación de presión para evitar la compactación excesiva del lecho. La geometría y diseño de las columnas permite que sea un equipo barato, debido a que son elaboradas a base de vidrio, por lo que la remoción del calor exotérmico de la fermentación se lleva a cabo de manera eficiente. Requiere de poca cantidad de medio de cultivo y la fácil adaptación del equipo a sistemas más rudimentarios en cuanto a equipamiento y cuantificación de productos, le confiere practicidad de uso. Sin embargo, para llevar a cabo las lecturas de los parámetros cinéticos durante la fermentación es necesario sacrificar una columna completa, dado que el diseño de la misma no permite tomar muestras

(Durand *et al.*, 1993). Este equipo es conveniente en las primeras etapas del desarrollo de un bioproceso es adecuado para estudios de caracterización y optimización de la composición del medio de cultivo, y para cuantificar los datos necesarios para llevar a cabo el cálculo de parámetros cinéticos.

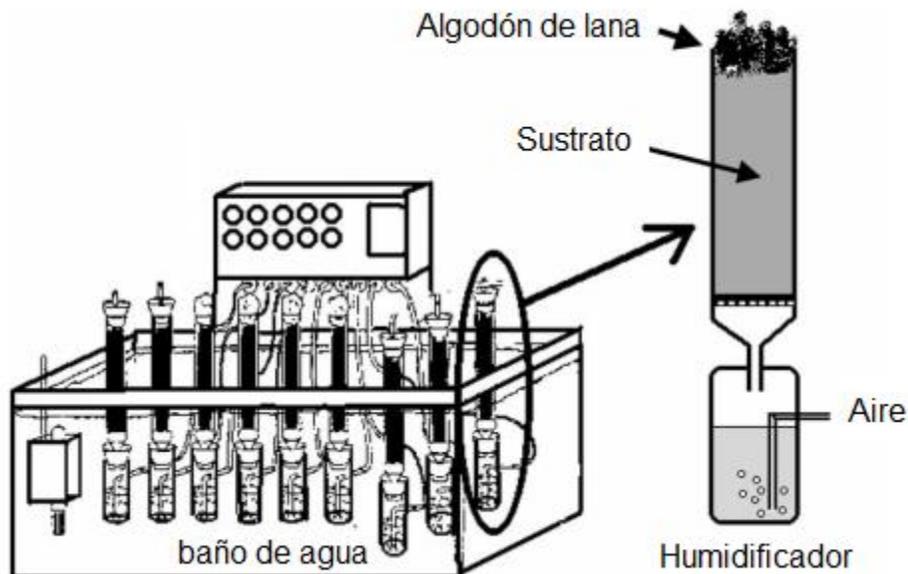


Figura 1.5 Reactor de columna a escala de laboratorio. Varias columnas pequeñas la se encuentran en un baño de agua para controlar la temperatura.

1.5.3.2 Bioreactor de columna estéril

Diseñado por un grupo del Instituto Nacional de la Investigación Agronómica (INRA) en Francia, tomando como base de diseño al bioreactor en columna. Se elaboraron varios prototipos previos al modelo desarrollado en el año 2000 (figura 1.6). Este bioreactor trabaja con un volumen de 1 L, cuenta con un muestreador de humedad relativa y un sistema de calefacción en la cabeza de la columna, mientras que en el circuito de operación se encuentra un sistema de enfriamiento, utilizando agua fría, el cual rodea una resistencia de calentamiento. Dichas modificaciones permiten una mejor regulación del contenido de agua durante el proceso. Es posible la toma de

muestra de la columna de forma aséptica abriendo la tapa superior, la cual dispone de un dispositivo de flama que impide problemas de contaminación. Se trabaja con varios bioreactores conectados a un sistema de control automático por computadora, el cual regula temperatura, humedad y aireación a través de la cama del sustrato. Debido a que el equipo cuenta con un sistema de control, es adecuado para llevar estudios de perfiles de velocidad de flujo del aire suministrado, así como de temperatura, permitiendo evaluar parámetros necesarios para llevar a cabo estudios de escalamiento (Durand, 2003).

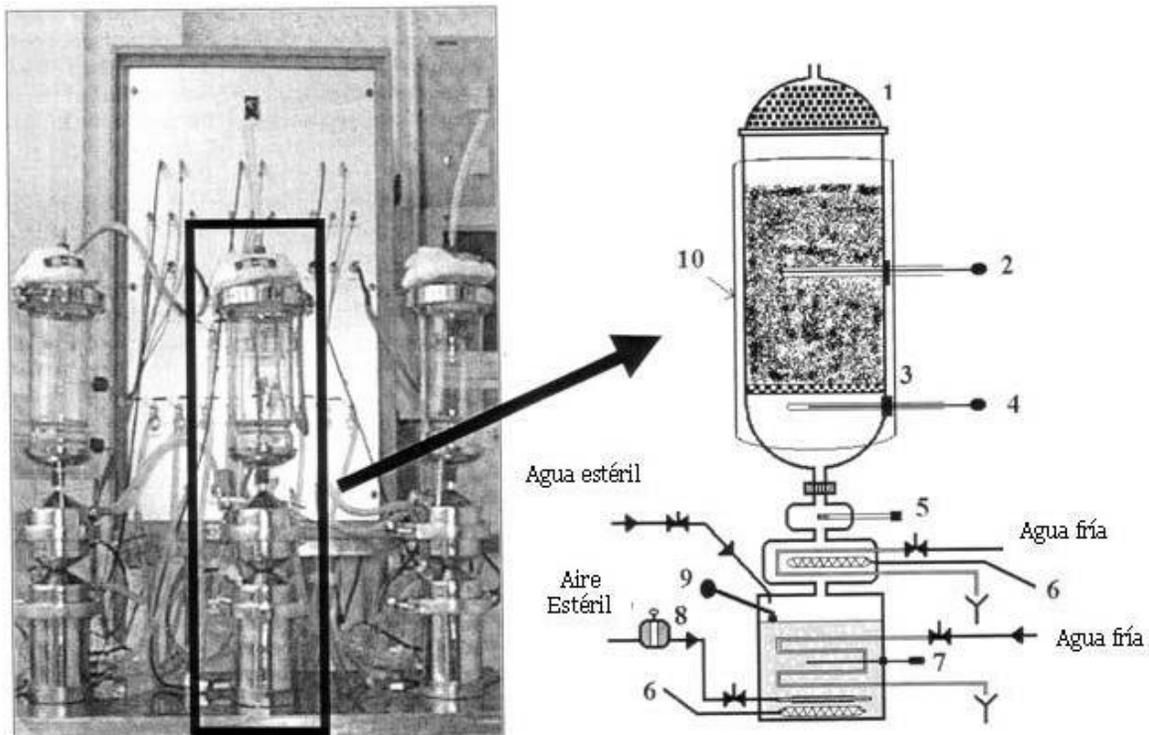


Figura 1.6 Bioreactor de columna estéril. (1) tapa de calefacción, (2) termómetro, (3) tamiz de acero, (4) medidor de temperatura del aire en la entrada, (5) medidor de humedad relativa, (6) resistencia, (7) medidor de temperatura de agua, (8) medidor de flujo másico, (9) medidor de nivel, (10) chaqueta aislante.

1.5.3.3 Tambor horizontal

Uno de los bioreactores en estado sólido más utilizados son los llamados tambor horizontal, el cual se ha diseñado de varias formas: como un contenedor rotatorio, perforado o con paletas, con el fin de obtener una agitación continua del sustrato sólido para incrementar el contacto entre las paredes del bioreactor y el sustrato, así como, proveer mayor oxígeno al microorganismo. Los equipos rotatorios, desarrollados por el grupo Several, consisten de un cilindro, con o sin chaqueta con agua para el control de temperatura, el cual gira lentamente volteando al medio de cultivo ayudado de pestañas que se encuentran adheridas a la pared (figura 1.7). Este tipo de bioreactor presenta dificultades en el control de temperatura y humedad debido a problemas de aglomeramientos de células por ruptura micelial (Viniestra-González, 2003). En cambio los bioreactores de tipo tambor con paletas, vuelve más eficiente la transferencia de oxígeno y disminuye la aglomeración de partículas de sustrato durante el crecimiento microbiano (figura 1.8). Sin embargo, generalmente, un bioreactor de fermentación sólida con agitación permanente, aunque sea suave, puede modificar la estructura del medio sólido. Además, dependiendo de la naturaleza de la partícula del soporte sólido, esta agitación puede llegar a ser abrasiva causando daños al micelio. Se han diseñado sistemas continuos de tambor rotatorio con el fin de mejorar los sistemas de control de temperatura y humedad, sin embargo, a medida que aumenta el volumen del sistema fermentativo la remoción de calor por las paredes del bioreactor se vuelve más ineficiente (Ruíz-Leza *et al.*, 2007).

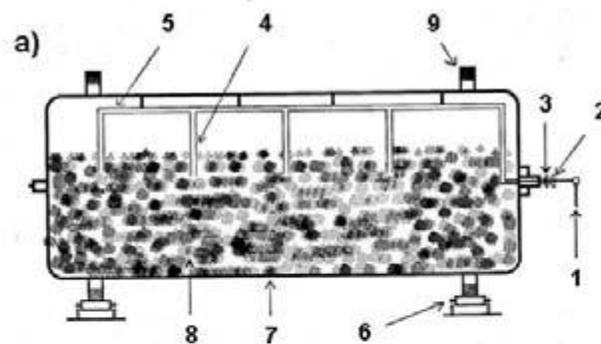


Figura 1.7 Bioreactor de tambor horizontal: (a) Rotatorio. (1) Entrada de aire, (2) embalaje rotatorio, (3) conector, (4) boquillas de entrada de aire, (5) línea de aire, (6) rodillos, (7) tambor rotatorio, (8) medio sólido, (9) aro. (Durand, 2003).

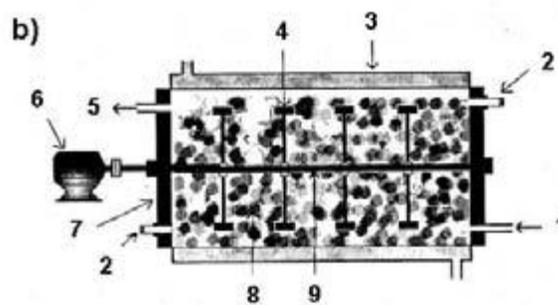


Figura 1.8 Bioreactor de tambor horizontal con paletas. (1) entrada de aire, (2) medidor de temperatura, (3) chaqueta de agua, (4) paletas, (5) salida de aire, (6) motor para agitación, (7) reactor, (8) medio sólido, (9) árbol de agitación (Durand, 2003).

1.5.3.4 Bioreactor Zymotis

Diseñado y desarrollado por el grupo ORSTOM (actualmente IRD de Francia), el cual consiste de platos verticales por donde internamente hay transferencia de calor debido a la circulación de agua fría, mientras, que el aire previamente temporizado es introducido por el fondo del sistema. Entre cada plato se carga el medio sólido previamente inoculado, dicha cama se mantiene estática durante la fermentación. Este sistema es parecido a los bioreactores de columna, con la diferencia de que las capas de sustrato están verticalmente fijas, por lo tanto es difícil trabajar en

condiciones asépticas (figura 1.9). Además, existe mayor posibilidad de que la cama de sustrato presente un encogimiento de volumen durante el crecimiento del micelio, provocando que el contacto con los platos verticales disminuya a medida que la fermentación progresa, lo cual llevaría a la formación de canales pobres en transferencia de calor y oxígeno (Mitchell y von Meien, 1999).

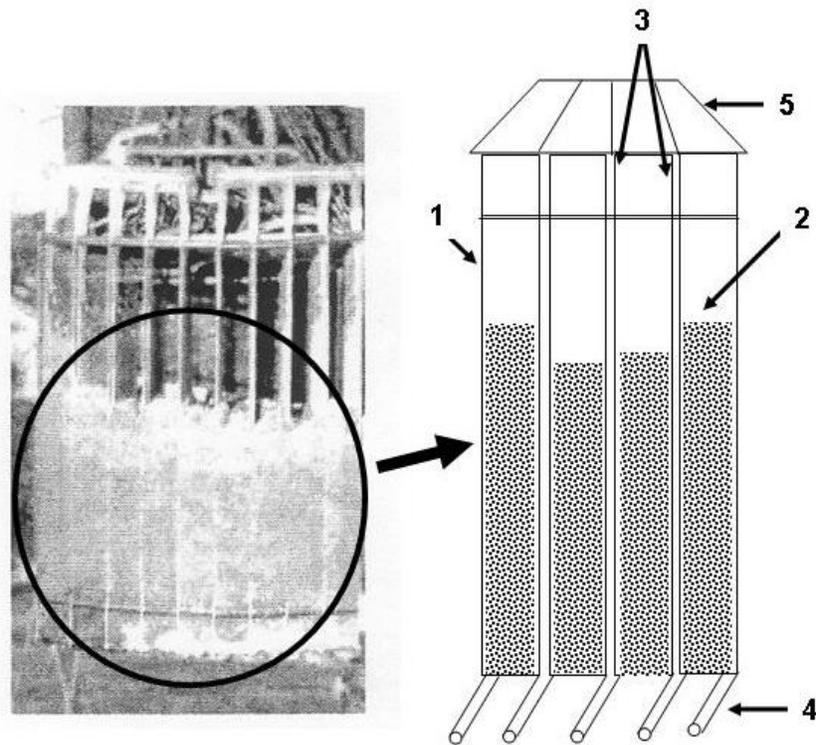


Figura 1.9 Bioreactor Zymotis (1) Platos verticales intercambiadores de calor, (2) cama de sustrato, (3) entrada de agua, (4) salida de agua, (5) termostato (Durand, 2003).

1.5.3.5 Bioreactor Growtek

Diseñado por el Departamento de Biotecnología, Agricultura e Ingeniería en Alimentos del Instituto Tecnológico de la India, llamado Growtek. Consiste de un envase de 16 cm de altura y 11.3 cm de diámetro, que tiene un tubo, de 2.6 cm de diámetro y 8.5 cm de altura, pegado a la base con una inclinación de 15° con respecto a la vertical. El cuerpo del recipiente y el tubo externo están hechos de

poli carbonato, y las tapas de ambos son de polipropileno (figura 1.10). Este bioreactor tiene dentro del envase un depósito de polipropileno que contiene una tela de fibra de vidrio en el fondo, donde se sostiene el sustrato. La fermentación ocurre en la vasija cilíndrica y el medio es introducido por el tubo inclinado. Dicho dispositivo también permite la dosificación de agua para mantener la humedad adecuada para el crecimiento microbiano. Sin embargo, no cuenta con un sistema de medición de la variación de temperatura y no es posible la toma de muestra sin sacrificar toda la cama del sustrato (Kar *et al.*, 1999).

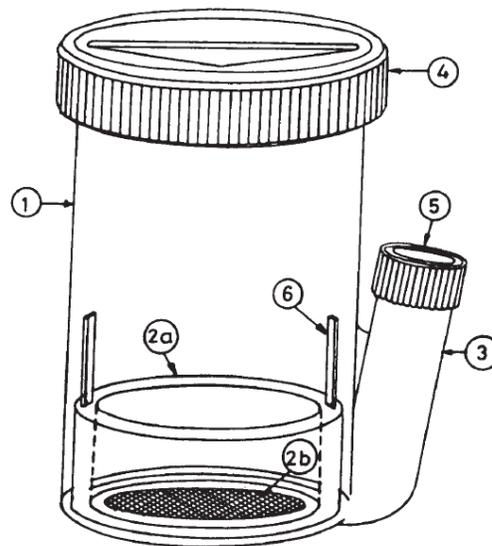


Figura 1.10 Bioreactor Growtek. Para la fermentación en estado sólido modificado. (1) Cuerpo de poli carbonato transparente del bioreactor; 2a) depósito; 2b) base perforada contiene sustrato sólido e inóculo; (3) tubo lateral al recipiente para facilitar cambios de medio o toma de muestras; (4) tapa enroscada para la aireación estéril; (5) tapa roscada para tubo lateral; (6) retenedor de flotador.

1.5.3.6 Bioreactor para proceso continuo

Van de Lagemaat y Pyle (2001) propusieron un proceso de fermentación en medio sólido basado en la producción continua de la enzima tanasa. Este trabajo es uno de los reportes que han explorado el diseño de bioreactores de régimen continuo a

escala laboratorio y cuyo principio es el empleo de un tornillo sin fin que sirve para alimentar y agitar los sustratos los cuales pueden o no ser inoculados en el proceso (figura 1.11). Los estudios correspondientes de mezclado, crecimiento fúngico y niveles de esporulación han sido llevados a cabo en condiciones exitosas de operación, debido a que el tiempo de residencia del complejo sustrato-microorganismo-enzima es menor que en los bioreactores convencionales y, al estar en condiciones cerradas la asepsia es mayor. En cambio, existe la formación de gradientes de temperatura que no permiten un sistema homogéneo de transferencia de calor. Actualmente, el interés hacia este tipo de bioreactores ha permitido el desarrollo de procedimientos que permitan la optimización del proceso de fermentación en cultivo sólido.

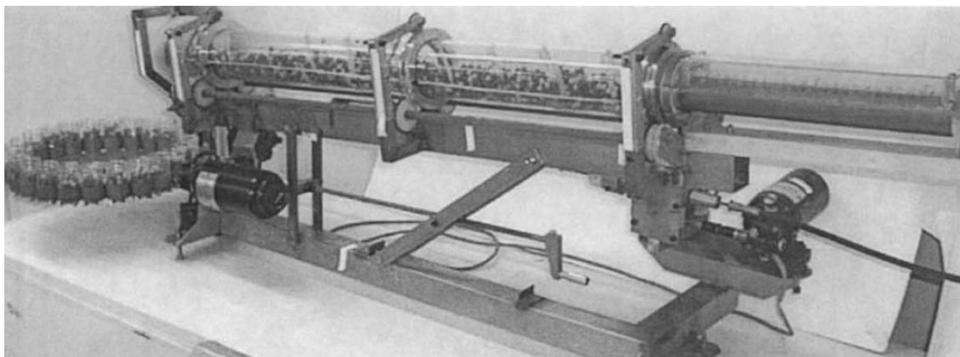


Figura 1.11. Vista general de la fermentación continúa en estado sólido
(Van de Lagemaat y Pyle, 2001).

1.5.3.7 Bioreactor Biocon

Biocon diseñó, desarrolló y patentó un nuevo bioreactor llamado PlaFactor™ para llevar a cabo fermentaciones usando matrices sólidas. El sistema fue higiénicamente diseñado y automatizado para un proceso de cultivo en charola, el cual ya es utilizado eficientemente en plantas industriales en Biocon, en el desarrollo de productos de uso alimenticio. La fermentación se lleva a cabo en un bioreactor controlado por computadora. Todas las operaciones del proceso fermentativo, como

esterilización, enfriamiento, inoculación, control, recuperación de producto y post-esterilización, se realiza en un solo equipo. El equipo consta de charolas selladas colocadas una sobre la otra formando dos torres unidas por un eje central. Cada módulo cuenta con un brazo de mezclado, el cual rota alrededor axialmente, y con canales de remoción de calor metabólico, control de humedad, aireación y vapor para la esterilización. Este equipo fue diseñado con el objetivo de reemplazar los cuartos de incubación por un equipo más compacto.

El equipo de PlaFactor™, como se muestra en la figura 1.12, es un sistema que cuenta con estudios del uso cultivos sólidos para la producción de agentes de biocontrol y productos farmacéuticos a nivel industrial, lo cuales requieren altas condiciones de asepsia y condiciones de alta precisión (Suryanarayan, 2002).

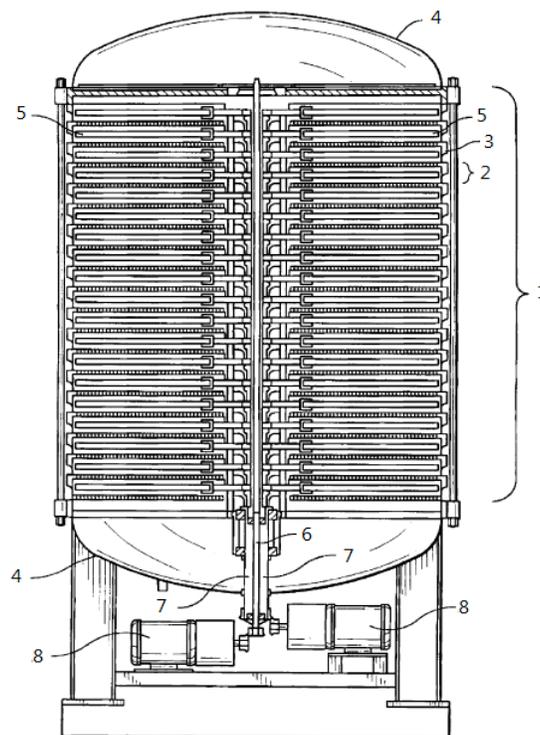


Figura 1.12. Bioreactor PlaFractor™ (1) módulos de varias de bandeja (2) colocados uno sobre el otro y selladas (3) en a la mitad. Hay un plato superior e inferior (4) encima y debajo de la pila de módulos. Cada módulo de bandejas tiene un brazo de mezcla (5) con cuchillas,

que giran alrededor del eje formado por los brazos (5). Los brazos mismos giran alrededor del eje formado por los dos ejes centrales concéntricos (6 y 7), que son accionadas independientemente por dos motores (8). Un motor proporciona la potencia para la rotación de las cuchillas de los brazos de mezcla mientras que el otro proporciona la energía para el movimiento giratorio de los brazos de mezcla alrededor del eje central (Suryanaraya, 2002)

1.5.3.8 Bioreactor de lecho fluidizado

Sistema de operación en modo continuo el cual puede ser operado por altos periodos de tiempo a un alto valor de productividad. Los primeros bioreactores constaban de un cilindro de vidrio, con o sin chaqueta, llenado por una carga completa de lecho o sustrato, pero causaba problemas de compactación similares a los presentados en los equipos de lecho empacado. Las variaciones en el lecho han permitido un mejor funcionamiento de este sistema, ya que se utilizan pedazos de esponjas, troncos naturales (loofa, coyonoxtle), polímeros sintéticos (espumas de poliuretano, poliestireno), así como también canastas o cajas delgadas de acero inoxidable, que cuentan con perforaciones que permiten tener una eficiente inmovilización de las células en el soporte con el medio de cultivo (Ogbonna *et al.*, 2001). Dichos soportes son llenados por el medio sólido a fermentar, los cuales fueron previamente colocados a lo largo del contenedor.

El principio del diseño (figura 1.14) se basa en proveer agitación y aireación por flujo forzado de aire proveyéndolo por la parte del cilindro a través de una bomba. El sistema provee un incremento en la transferencia de oxígeno a la cama de sustrato, sin embargo, se presenta daño al inoculo por causa del gran esfuerzo de corte generado, además de que se forman gradientes de temperatura a través de la columna que pueden afectar al producto deseado (Rivela *et al.*, 2001).

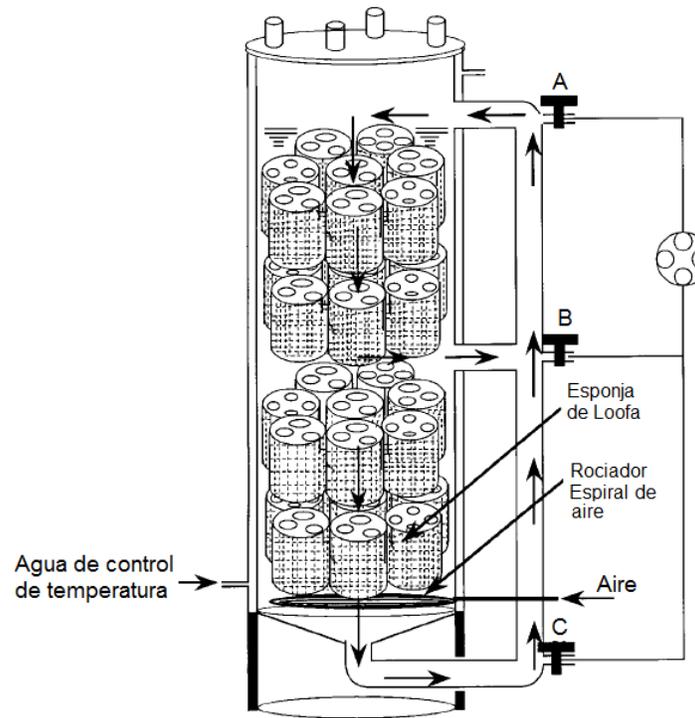


Figura 1.13 Diagrama esquemático de un bioreactor a gran escala con bucle externa que contiene lechos de esponja de loofa que muestran posibles vías de circulación del lixiviado (indicado por las flechas) para la inmovilización celular uniforme. La ruta de flujo se controla mediante el cierre de cualquiera de las válvulas A, B o C (Ogbonna *et al.*, 2001)

1.6 Antecedentes y avances

Camargo *et al.* (2005), estudiaron la relación entre la producción de ácido cítrico y la respiración de la cepa *A. niger* LPB-21 en la fermentación en estado sólido del bagazo de yuca. Los experimentos se llevaron a cabo en bioreactor tambor horizontal junto con un sistema de cromatografía de gases. La fermentación fue llevada durante 144 h con humedad inicial del sustrato del 60% utilizando 2 kg de bagazo de yuca tratado térmicamente como única fuente de carbono. Analizaron el aire de escape del bioreactor para el seguimiento de CO_2 producido y O_2 consumido con el fin de estimar la biosíntesis de la biomasa por el cultivo de hongos. La actividad

metabólica de *A. niger* en crecimiento la asociaron con la producción de ácido cítrico. Usaron el software FERSOL que determinó 4,372 g de biomasa/g de O₂ consumido.

Prado *et al.* (2005), obtuvieron ácido cítrico a a escala semi-piloto utilizando diferentes porcentajes de bagazo de yuca con *A. niger*, con una concentración del inóculo de 1×10^8 esporas/mL, el bagazo de yuca con una composición en almidón del 55%. Se observó el efecto de la gelatinización de almidón en la producción de ácido cítrico probando diferentes proporciones de bagazo de yuca tratado y no tratado durante la fermentación (0: 100; 40:60; 60:40; 80:20; 100: 0). La SSF se realizó en un bioreactor de bandejas con una humedad de 70% ajustada con solución nutritiva. Se inoculó la suspensión de esporas con un inóculo de 10^7 esporas/g de bagazo seco. El sustrato pre-inoculado se distribuyó en bandejas (0.0045 m^3) hasta obtener espesores de lecho de 2, 4 y 6 cm de (0.15, 0.30 y 0.45 kg de sustrato seco). Las bandejas se colocaron en una habitación con temperatura controlada (28 °C) y una humedad del 97% aproximadamente. La fermentación se llevó a cabo durante 120 h. Para la comparación de reactores, la SSF también se llevó a cabo en un tambor horizontal con 2 Kg de sustrato seco y 60% de humedad inicial ajustado con una solución nutritiva al inóculo e utilizando el mismo que en el de bandejas, el tambor de 0.024 m^3 consistió de una pala acoplada a un eje de motor rotado a velocidad controlada (tres a cuatro veces al día). Después de 20 h de fermentación, el aire saturado se insertó continuamente en el tambor con el fin de controlar la temperatura del sustrato y la humedad. El flujo de aire se mantuvo a 5 L/min. La fermentación se realizó a temperatura ambiente durante 144 h. Los mejores resultados (26.9 g/100 g de bagazo de yuca en seco) se obtuvieron en el bioreactor tambor horizontal usando 100% almidón de bagazo gelatinizado.

Ruíz-Leza *et al.* (2007), desarrollaron en el Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila (UAC) el primer y único prototipo hasta la actualidad tipo columna-charola (figura 1.14) consiste de una columna de 33 cm de altura y 1120 cc, en acrílico con un diámetro de 25 cm (figura 3.13). En su

interior se encuentran ocho charolas perforadas colocadas de forma alternada, las cuales tiene una capacidad de 140 mL cada una. para la producción de pectinasa fúngica en SSF utilizando pomaza de limón. Se monitoreo la producción de pectinasa cada 12 h por 96 h y se calcularon los parámetros cinéticos de la fermentación. El microorganismo empleado fue *Aspergillus niger* Aa-20, la mejor adaptación de este microorganismo al tamaño de partícula fue mayor en la malla 25 con un valor de crecimiento 0.0992 h^{-1} . Con una humedad en el sistema del 30% durante toda la cinética. El consumo de sustrato vario de un valor inicial de 70.65 a 37.02 mgAT /100 mg pomaza de limón al final de la cinética (50%). La cantidad de glucosamina como biomasa cuantificada fue de 8.017 mg glucosa min/g pomaza con una velocidad específica de crecimiento de 0.1269 h^{-1} . La producción de pectinasa fue de 2,181.23 U/L a una concentración de ácido poligalacturónico (APG) de 0.8 g/L.

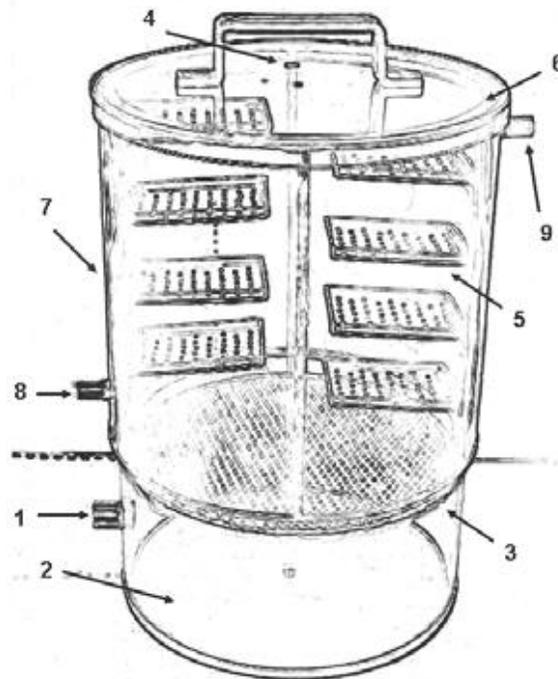


Figura 1.14 Bioreactor columna-charola de la UAC. (1) Entrada de aire estéril, (2) entrada de agua estéril, (3) distribuidor de aire, (4) entrada para el termómetro, (5) charola, (6) chaqueta para el control de temperatura, (7) columna de acrílico, (8) entrada de agua, (9) salida de agua (Ruíz-Leza *et al.*, 2007)

Maciel *et al.* (2008), realizaron la producción de xilanasa por *A. niger* cultivada en sustrato compuesto por bagazo de caña de azúcar y la harina de soja por SSF. Se optimizó mediante la aplicación de diseños experimentales estadísticos los efectos de diversas variables. La mejor actividad de xilanasa se obtuvo en un medio compuesto de 10 g de bagazo de caña de azúcar y harina de soja en la proporción de 65 - 35% respectivamente, humedecido con 85% de contenido inicial de agua con una solución compuesta de sales nutritivas de 0.4g/L de cada una, CuSO₄, KH₂PO₄ 1.5 y CoSO₄ 0.0012, después se incubó durante 4 días a 30 °C. Con estas condiciones optimizadas obtuvo una actividad de Xilanasa de 3.099 UI/g de materia seca.

Mrudula *et al.* (2011), utilizaron *A. niger* para la producción de celulasa por SSF comparando con SmF. La máxima producción de celulasa se alcanza después de 72 h de incubación en SSF y 96 h en SmF. Las actividades CMCasa y PFasa registradas en SSF fueron 8.89 y 3.56 UI/ g de salvado de micelio seco del respectivamente. En la SmF se encontraron las actividades CMCasa y FPasa en 3.29 y 2.3 U por mL de caldo de cultivo. La productividad de celulasa extracelular en SSF fue 14.6 veces mayor que en la SmF. Los parámetros físicos de la fermentación como pH, temperatura, y nutricionales, sustrato, carbono y nitrógeno fueron optimizados. Las condiciones óptimas para la máxima biosíntesis de celulasa por *A. niger* fue pH 6 a 30 °C. Se adicionan lactosa, peptona y desperdicios de coco como sustrato para aumentar la productividad tanto en SmF como en SSF. La relación de humedad de 1: 2 (w/v) fue mejor para la producción óptima de celulasa en SSF.

Singh *et al.* (2011), realizaron la fermentación en estado sólido (SSF) para evaluar el potencial de residuos agrícolas para la producción de celulasa y hemicelulasa utilizando cultivos individuales y mezclados de *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei* en bandejas. Obtuvieron la máxima actividad de celulasa (FP) de 13.57 UI/gramo de sustrato seco (gsc), 22.89 UI/gsc y 24.17 UI/ gsc y actividades de β-glucosidasa de

21.69 UI/gsc, 13.58 UI/ gsc y 24.54 UI/gsc fueron obtenidas con medio de salvado de trigo a las 96 h de período de incubación con *A. niger*, *T. reseei* y cultivos mixtos de *A. niger* y *T. reseei*, respectivamente. Usaron un cultivo mezclado en SSF utilizando paja de arroz enriquecido con salvado de trigo en la proporción 3: 2 que resultó en mayores actividades de celulasa, glucosidasa, endoglucanasa (CMCasa) y xilanasa, en comparación con las actividades obtenidas utilizando monocultivos. Del mismo modo, el aumento de actividades de celulasa, β -glucosidasa, CMCasa y xilanasa de 35,8 UI/gds (96 h), 33.71 UI/gds (96 h), 131.34 UI/gds (120 h) y 3106.34 UI/gds (120 h) en la fermentación en bandejas de plástico (40 cm longitud, 25 cm de ancho y 8 cm de altura) utilizando paja de arroz con salvado de trigo en la proporción de 3: 2. Los resultados de esta investigación muestran que una mayor actividad de celulasa y una combinación óptima de celulasa y β -glucosidasa se puede lograr a través del cultivo mixto en SSF en bandejas.

Kanimozhi *et al.* (2014), se centraron en la producción y optimización de quitosano por SSF y SmF a partir de una nueva cepa de *A. niger* aislada de muestra de suelo, se llevó a cabo la SSF con residuo de soja como sustrato y caldo de dextrosa *Sabouraud* suplementado con glucosa para la SmF. En ambos los métodos de fermentación, se obtuvo un máximo de producción de quitosano en un tiempo de incubación de 12 h. Se estudió la optimización de parámetros físicos tales como el contenido de humedad (35% -55%), la temperatura de incubación (20 °C-50 °C) y pH del medio (5-7). El rendimiento de quitosano máximo se presentó en SSF a pH 6.5 (14 mg/g), el contenido de humedad 35% (14.5 mg/g) y la temperatura de incubación de 30 °C (13 mg/g).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología general

En la figura 2.1 se muestra la metodología del procedimiento de desarrollo del proyecto. Este consistió en dos etapas, (I) Inicio con la selección del microorganismo, cepa, propagación, preparación de inóculo, elección del sustrato, acondicionamiento, caracterización fisicoquímica y fermentación nivel laboratorio. (II) Diseño del bioreactor escala semi-piloto, selección de materiales, construcción, instrumentación y validación.

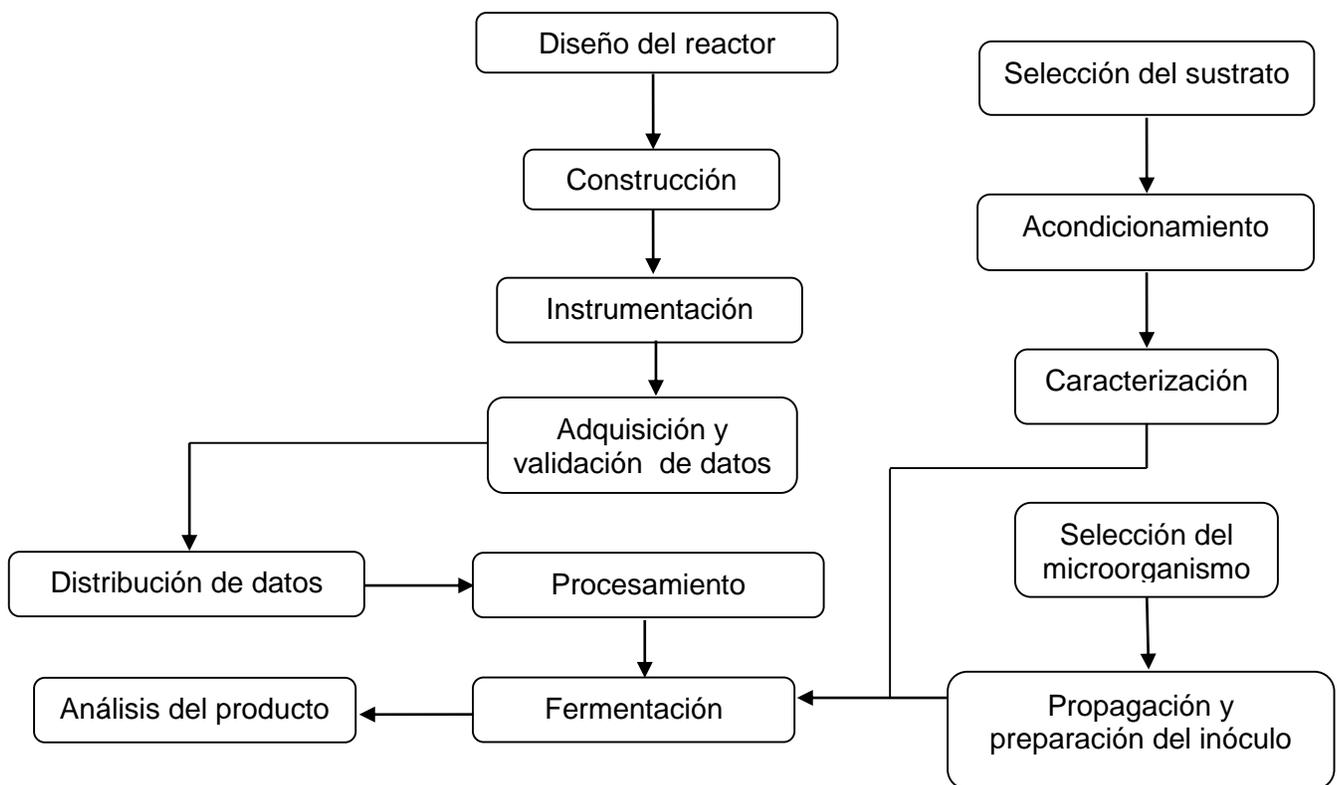


Figura 2.1 Metodología del proceso fermentativo a escala semi-piloto.

2.2 Selección y acondicionamiento del sustrato-soporte

2.2.1 Selección de residuos agroindustriales

Se utilizó como material soporte-sustrato residuos agroindustriales de la zona. El material a utilizar como soporte-sustrato fue el bagazo de caña de azúcar, pulpa y cascarilla de café.

2.2.2 Bagazo de caña

El bagazo (*Saccharum officinarum L.*)(figura2.2), es un residuo lignocelulosico obtenido del Ingenio “La Gloria” ubicado en el municipio de Úrsulo Galván en el estado de Veracruz. Se muestreo en el sitio después de la molienda de caña, en la zona de confinamiento del Ingenio.



Figura 2.2 Bagazo de caña semi - húmedo del Ingenio “La Gloria”.

Inicialmente a la materia prima – bagazo de caña - se le realiza un cribado manual, para retirar el bagazo en polvillo, material extraño y contaminante.

2.2.3 Pulpa y cascarilla de café

Se obtuvieron de la comunidad de Huatusco (figura 2.3), Veracruz con productores locales, el café cereza (*Coffea-arabica*) húmedo se hizo pasar por una despulpadora automática, con el fin de separar la pulpa y la cascarilla del grano.



Figura 2.3 Residuos de café de la región de Huatusco. a) Pulpa y b) cascarilla de café húmedos de la región de Huatusco.

2.2.4 Pretratamiento de los residuos

2.2.5 Secado

El bagazo de caña y los residuos de café contienen entre 50-80% de humedad, por lo que se sugiere realizar un secado con el objetivo de reducir la actividad de agentes microbianos contaminantes. Se realiza una combinación de dos condiciones de secado: (1) Secado solar a temperatura entre 25-30 °C., permite un ahorro de energía y reducir el contenido de humedad. (2) Secado convectivo en un secador en charolas entre 50±5 °C, se acondicionaron las bandejas malla 24 de acero inox 316L (figura 2.4).



Figura 2.4 Secado solar en charolas del bagazo de caña

2.2.6 Molienda

El bagazo, cascarilla y pulpa secos se hacen pasar por separado por un triturador eléctrico moulinex para la reducción del tamaño de partícula.

2.2.7 Tamizado

Posteriormente se utilizó para el bagazo un tamizador automático marca W. S. Tyler modelo RX-812, colocando el sustrato molido en el equipo por periodos de 12 min y clasificado de acuerdo a lo retenido en cada tamiz. Ocupando 6 tamices, el número de malla fue el siguiente: malla 14, 16, 18, 20 y 25 respectivamente (1.41, 1.19, 1.00, 0.841 mm). La pulpa y la cascarilla tenían un número de malla de entre 16-20.

2.2.8 Almacenamiento

Se empacaron las muestras secas y molidas, con 500 g de residuos secos en bolsas de polipropileno con sellado hermético de acuerdo a su granulometría a temperatura ambiente.

2.3 Caracterización fisicoquímica de la materia prima

Las técnicas utilizadas para la caracterización fisicoquímica de la materia prima antes y después del acondicionamiento se describen en la Tabla. 2.1. y 2.2.

Tabla 2.1 Descripción de la caracterización química de la materia prima

Determinación	Descripción de la técnica
Fibra cruda	Determinada por el método NMX-F-090-S-1978.
Extracto etéreo	Realizada con bagazo seco y molido (0.707 μm) bajo la norma mexicana NMX-F-545-1992 con equipo Soxhlet y hexano como agente de arrastre.
Cenizas	Se llevó a cabo en una mufla Thermo Scientific siguiendo la norma mexicana NMX-F-066-S-1978.
Proteína	Realizada mediante NMX-F-068-S-1980 con MicroKjeldahl en muestra seca y desengrasada.

Tabla 2.2 Descripción de la caracterización física de la materia prima

Determinación	Descripción de la técnica
Humedad	Termobalanza Ohaus MB35 Halogen a 65 °C.
pH	Se midió en un potenciómetro Hanna-Instruments en una solución de bagazo deshidratado/agua destilada de 1:10 w/v.
Granulometría	El tamaño de partícula se determinó con tamices malla 16 hasta la 20.
Actividad de agua	Equipo Aqualab serie 3 Mod. TE
Densidad aparente	Se determinó el volumen de 50 g de bagazo (evitando la compactación) en bureta volumétrica determinando el peso de este volumen en balanza analítica OHAUS.
Densidad relativa	Realizada con bagazo en polvo seco, por el método del picnómetro de 50 mL marca Brand.

2.4 Microorganismo

2.4.1 *Aspergillus niger*

El microorganismo elegido es la cepa de *Aspergillus niger* denominada como ITV-18 fue donada por el Instituto Tecnológico de Veracruz, fue trasladada al laboratorio en PDA en caja Petri.

2.4.2 Activación de la cepa de *Aspergillus niger* ITV-18

La activación de la cepa bacteriana conservada a 4 °C, consistió en la siembra de la cepa mediante un asa en medio de PDA, disuelto en agua destilada y vertido en cajas Petri de vidrio, previamente esterilizadas a calor húmedo. El sembrado se realizó empleado el método de estriado en una campana de flujo laminar equipada con luz ultravioleta.

2.4.3. Incubación

Las cajas sembradas fueron cubiertas con una película plástica para evitar contaminación por recirculación de aire del equipo. La incubadora marca Novatech DBO-100 a 35 °C durante 6 días, volteando cada 2 días las cajas para facilitar la esporulación del hongo (Cordova-Lopez *et al.*, 1996).

2.5 Preparación de solución de Tween 80 al 0.1 %

Se formuló una solución de Tween 80 en agua destilada en matraz volumétrico, fue esterilizada con calor seco para su inocuidad tomando 1 mL aforado para 1L de agua destilada.

2.6 Preparación del inóculo

Se obtuvo de las cajas Petri previamente incubadas, mediante el raspado manual con asa metálica y con parrilla de agitación magnética (Ferrer-Marcelo *et al.*, 2011), las dos formas se realizan en campana de extracción de flujo laminar, vertiendo 15 mL en cada caja Petri con crecimiento de hongo de solución de solución Tween 80 al 0.1% o agua estéril, ambas sirven como como medio de retención de esporas, con previa esterilización el Tween debe ser enfriado a temperatura ambiente para evitar dañar el microorganismo. La solución obtenida fue contenida en tubos de ensaye estériles de 30 mL, que fueron almacenados para su conservación en refrigeración a 4 °C. Este inóculo tiene una viabilidad de un año para su propagación y resembrado, para la fermentación es recomendable conservarlo máximo dos semanas.

2.6.1 Crecimiento celular y ajuste del inóculo

Para realizar el conteo de esporas se usó una cámara de Neubauer. El ajuste de la concentración se hizo por la ecuación 2.1:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10000}{\text{número de cuadros}} \quad \text{Ec. 2.1}$$

Para ajustarlo a una concentración de 1×10^6 esporas/mL cuando el conteo no se pudo llevar a cabo por la alta concentración, se llevó a cabo una dilución agua estéril o solución de Tween 80.

2.7 Microscopio Zeiss Primo Star

Para el conteo de esporas en Cámara de Neubauer se empleó un sistema de adquisición de imágenes el cual consiste en una cámara digital de microscopio AxioCamERc5s con sensor MicronMT9P031, 5 Mp de tipo CMOS y conectividad USB y HDMI, acoplada a un microscopio profesional de 4 objetivos de la marca Carl Zeiss, modelo 3708 Primo Star iLED.

2.8 Preparación de solución mineral nutritiva

Se realizó una solución complementaria adicionada al soporte-sustrato, esto para su enriquecimiento y favorecer el crecimiento superficial e intraparticular del hongo. Esta contiene en solución de agua destilada (g/L): 100 $C_{12}H_{22}O_{11}$, 25 NH_4NO_3 , 2.5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.04 $CuSO_4$ (Kumar y Jain 2008) preparada en parrilla de calentamiento con agitación continua, a una temperatura de 50-60 °C para la disolución de los componentes. Se realizó un ajuste de ph hasta llegar a un rango de 4-4.5 con una solución de ácido tartárico, se recomienda esterilizar y preparar máximo un 1 día antes de utilizarse.

2.9 Fermentación en estado sólido

2.9.1 Fermentación a nivel laboratorio

Se realizaron ensayos en caja petri teniendo como variable el pretratamiento de: tamaño de partícula, se probaron diferentes sustratos y combinaciones de los mismos, además de trabajar en estado aséptico y no aséptico, esto con el fin de llevar a cabo la fermentación a nivel semi-piloto con las mejores condiciones en el bioreactor.

2.10 Bioreactor

2.10.1 Diseño

A continuación se describe de manera general el reactor, componentes y servicios auxiliares requeridos, las especificaciones se encuentran en la sección de resultados. El diseño seleccionado fue el de un bioreactor columna-charola, que consta de manera general una columna cilíndrica con charolas en su interior distribuidas de manera uniforme en un soporte central.

2.10.2 Configuración y construcción

Se realizó considerando la elección de la configuración típica columna-charola y se realizó en tres etapas diferentes: (1) diseño del cuerpo principal del reactor, consta de una columna cilíndrica lisa ensanchada en los extremos (2) diseño de las charolas, se diseñaron charolas cilíndricas soportadas estructura interna y accesorios secundarios. La estructura interna consta de tres espárragos de acero sujetos mediante un soporte triangular que de igual forma soporta las charolas. (3) Instrumentación y servicios auxiliares, dado que los procesos fermentativos requieren el monitoreo de ciertas variables y suministro de algunos servicios. En el capítulo 3 se describen de manera detalla las medidas y materiales del reactor.

2.11 Instrumentación

Las variables importantes en los procesos fermentativos son temperatura, humedad y flujo de aire, es por esto, que se requirió instrumentar con higrómetro, rotámetro y tener un flujo de aire controlado.

2.11.1 Sensor de temperatura-humedad

El sensor Datasheet SHT21 (figura 2.5) marca Sensirion, monitorea temperatura y humedad relativa de ambientes cerrados, tiene una sensibilidad de ± 0.1 en la adquisición de datos.

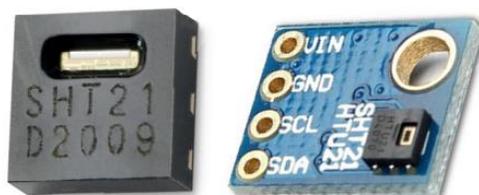


Figura 2.5 Sensor comercial de uso industrial SHT21.

2.11.2 Calibración

La calibración del sensor se realizó tomando como referencia un termómetro de mercurio marca LAUKA para la temperatura y para el porcentaje de humedad relativa un higrómetro marca AZUMM con parilla de calentamiento y vapor de agua calculando el porcentaje de desviación con la ecuación 2.2.

$$\text{Desviación (\%)} = \left(\frac{\text{Valor de referencia} - \text{Valor experimental}}{\text{Valor de referencia}} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 2.2}$$

2.12 Servicios Auxiliares

2.12.1 Sistema de flujo de aire

Este ensamble comprende un compresor, filtros de aire y rotámetro. El aire se alimenta a través de un compresor Marca Dental Blanck de 48 L libre de aceite, para evitar la fuga de aceite al reactor. La cantidad de aire utilizada se midió con un rotámetro de columna graduada de 0-0.5 L. Para la purificación del aire del compresor se utilizaron filtros de flujo micrométrico de la marca SMN de 5 a 0.01 μm . El primer filtro es un filtro regulador de con manómetro con un elemento filtrante de 0.5, el segundo de 0.03 y el tercero de 0.01 μm , estos últimos no cuentan con sistema de regulación de presión, todo el tren de filtraje es de $\frac{1}{4}$ de pulgada.

2.12.2 Humidificador

Se hace pasar aire comprimido en un vaso humidificador con agua esterilizada a 120°C durante 15 min. Para mantener la temperatura adecuada del aire se requirió de un baño termostático marca Thermo Neslab Ex 7 con rango de temperatura de -25° C a 150° C sensibilidad de $\pm 0.01^\circ\text{C}$ con recirculación de agua ajustado a 35 °C en el cual se sumergió el vaso humidificador.

2.13 Conexiones

En todas las conexiones de salida y entrada de aire se utilizaron conectores rectos de $\frac{1}{4}$ de pulgada, conectados a manguera de poliuretano con resistencia al calor y esterilización, de 6 mm de diámetro.

2.14 Condiciones de la fermentación en el bioreactor

Los residuos orgánicos mencionados se enriquecieron con solución mineral para incrementar el crecimiento del hongo. Se esterilizaron durante 15 min a 1 atm de presión en autoclave. Para llevar a cabo la fermentación, el sustrato fue impregnado con solución mineral en una relación 1:1 peso: volumen para posteriormente adicionar el inóculo con la relación 1:1 volumen/peso. El aire humidificado estéril del reactor se mantuvo a temperatura ambiente dentro del laboratorio (25-28 °C), con una humedad relativa en un rango de 55-60% mantenida con aire humidificado con una tasa de 100-120 mL/min. El crecimiento microbiano se evaluó por la generación de biomasa a través de cinéticas.

2.15 Cuantificación de biomasa

Se cuantifico por peso seco, es una determinación directa de medición de biomasa. Después de la fermentación se toma una muestra representativa del soporte-sustrato, de 1gr se realiza un lavado con solución de Twenn 80 al 0.01%, en una relación 1: 20 p:v, en parrilla con agitación magnética por 15 min para desprender el hongo en el sustrato. Esta solución es filtrada a través de papel para filtrado de poro grueso (18-16 μm) para eliminar el sustrato, seguido de un filtrado con bomba de vacío a través de papel poro fino (1 μm) con el fin de retener el hongo. Se secó el papel en estufa a 65 °C por 4 h hasta peso constante. El peso será expresado en gramos de materia seca por gramos de sustrato.

$$\text{Peso seco} \left(\frac{\text{mS}}{\text{g}} \right) = \frac{(\text{Peso del papel filtro} + \text{Muestra seca}) - (\text{Peso final del papel filtro})}{\text{Peso de la muestra}} \quad \text{Ec. 2.3}$$

2.17 Cinética de crecimiento

Se realizó un muestreo cada 48 h durante 8 días para evaluar el crecimiento del hongo.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Sustrato-soporte

Para la fermentación en medio sólido se utilizaron residuos que pueden actuar como soporte inerte (Roussos Perraud-Gaime 1996), sustrato (Caridad 2007, Soccol *et al.*, 1994) o en dualidad de soporte-sustrato (Pandey 2000 y Mussatto *et al.*, 2012). El uso de medios de fermentación de función dual, soporte-sustrato, es común para los procesos de SSF, dado que aunque no permite la fácil evaluación cuantitativa de los parámetros relacionados con el metabolismo microbiano (crecimiento, consumo de sustrato y formación de productos) como lo ofrece un sustrato inerte, brinda al microorganismo una fuente de nutrientes, por el origen orgánico, además de ser suplementada con soluciones minerales, para no depender en exceso de la calidad de la materia prima y que esta incremente su valor proteico para distintos usos.

3.2 Análisis de la materia prima

Al soporte-sustrato recolectado inicialmente, se les determinó humedad y actividad de agua, estos resultados se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Porcentaje de humedad y actividad de agua del soporte-sustrato utilizado.

	Humedad (%)	a_w
Bagazo de caña	60-68	0.62-0.69
Pulpa de café	75-80	0.78-0.82
Cascarilla de café	66-74	0.68-0.73

Los rangos mostrados son susceptibles a la contaminación por microorganismos (Haug 1993). Dado lo anterior, se realizó un secado solar, esto permitió reducir aproximadamente el secado por convección a la mitad de tiempo en estufa (2 h), hasta alcanzar una humedad ($\%H < 10$) y actividad de agua ($a_w < 0.1$) menores a las de origen (figura 3.1). Estos parámetros son suficientemente bajos para evitar el

crecimiento de hongos, levaduras y mohos que pudiera fermentar la materia prima. Posteriormente se realizaron análisis fisicoquímicos en base seca.



Figura 3.1 Materia prima seca y molida. a) bagazo de caña, cascarilla y pulpa de café secos
b) bagazo malla 16, cascarilla y pulpa en un rango de malla 16-20.

3.3 Análisis Químicos

Los resultados de todos los análisis reportados a continuación fueron realizados por triplicado y se muestra la desviación estándar obtenida en cada caso. Los resultados se muestran en la Tabla 3.2 y 3.3 y se comparan con trabajos previos de varios autores:

Tabla 3.2 Resultados de la caracterización química del bagazo de caña *Saccharum officinarum L.*

Determinación	Antecedentes (%)	Contenido (%)
Fibra Cruda	70 (Licona, 2013)	50.83 ±1.16
Extracto etéreo	3.28 (Revelo 2011)	4.42 ±1.08
Cenizas	3.6 (García-Torres <i>et al.</i> , 2011)	3.25 ±0.24
Proteína	1.20 (Licona, 2013)	1.12 ±0.32

Tabla 3.3 Resultados de la caracterización química de la cascarilla y pulpa de café (*Coffea-arabica*)

Determinación	Antecedentes (%)	Cascarilla (%)	Antecedentes (%)	Pulpa (%)
Fibra Cruda	---	11.52 ±0.56	---	13.58 ±0.73
Extracto etéreo	---	4.85 ±0.70	1.72 (Munguía 2015)	2.44 ±0.35
Cenizas	---	1.41 ±0.03	6.66 (Blandón-Castaño <i>et al.</i> , 1999)	11.06 ±0.85
Proteína	---	0.64 ±0.17	13.24 (Aguilar-Rivera 2014)	8.11 ±0.27

Los resultados de la caracterización fisicoquímica muestran que los valores reportados son próximos a las caracterizaciones reportadas, excepto el de fibra cruda ya que difiere en un 28 % del experimental. Este resultado es bajo para ambos sustratos, dado que no se realizó una hidrólisis, se adicionó una solución mineral para complementar el aporte nutricional de la materia prima.

3.4 Análisis Físicos

Los resultados de las pruebas físicas realizadas se muestran en la Tabla 3.4, 3.5 y 3.6.

Tabla 3.4 Resultados de la caracterización física del bagazo de caña

Determinación	Antecedentes	Resultado
ph	5.8 (García-Torres <i>et al.</i> , 2011)	5.63 ±0.23
Granulometría	----	1 mm
Humedad	6.23 (Licona, 2013)	6.51 ±0.48
a_w	0.55 (Licona, 2013)	0.733 ±0.13
Densidad aparente	----	0.1083 ±0.12 gr/cm ³
Densidad relativa	----	0.1036 ± 0.07

Tabla 3.5 Resultados de la caracterización física de la pulpa de café

Determinación	Antecedentes	Resultado
Humedad	8.87 (Aguilar-Rivera 2014)	6.94 ±0.92
ph	4.4 (Aguilar-Rivera 2014)	4.91 ±0.21
Granulometría	---	0.841-0.595 mm
a_w	---	0.533 ±0.347
Densidad aparente	----	0.69 ±0.01 g/cm ³
Densidad relativa	----	0.76 ±0.03 g/cm ³

Tabla 3.6 Resultados de la caracterización física de la cascarilla de café

Humedad	5.8 (García, 2008)	7.11 ±0.53
ph	5.5 (García 2008)	4.2 ±0.08
Granulometría	---	1.00-0.707 mm
a_w	---	7.34 ±0.13
Densidad aparente	----	0.280 ±0.02 gr/cm ³
Densidad relativa	----	0.209 ±0.001 g/cm ³

--- No existen datos reportados

Los resultados de la caracterización química no difieren significativamente de los reportados actualmente, el ph de los tres sustratos están en un rango ácido, esto es benéfico para el crecimiento microbiano fúngico. El tamaño de partícula fue difícil de controlar es por esto que se manejó en el rango citado anteriormente. Los resultados de las densidades fueron importantes para cálculos de volumen de ocupación que se presenta más adelante.

3.4 Fermentación en medio sólido nivel laboratorio

3.5 Evaluación del tamaño de partícula del bagazo de caña

Se realizó una mezcla de sustrato pulpa, cascarilla y bagazo de caña (figura 3.2) en porcentajes del 70, 15 y 15 % respectivamente esto es citado por Ávila en el 2015 obteniendo mejores resultados de crecimiento (8.7×10^5 esporas/mL) de la cepa ITV-18 que solo sembrando en bagazo o residuos de café, en esta mezcla la pulpa y la cascarilla actúan como sustrato y el bagazo como soporte (Pandey *et al.*, 2000), este último permite una mejor difusión de oxígeno en el desarrollo de la fermentación dado que la pulpa de café y cascarilla tienden a aglomerarse por la humedad y solo permite el crecimiento superficial del hongo afectando su desarrollo interparticular (Mitchell *et al.*, 2006).



Figura 3.2 Mezcla de bagazo de caña, cascarilla y pulpa de café.

Los pretratamientos como el uso de microondas, ultrasonido, hidrólisis ácida y tamaño de partícula de los residuos de café para el crecimiento de la cepa utilizada fue citado también por Ávila 2013 y ninguno de estos resulto significativo por lo tanto solo se evaluó el tamaño de partícula del bagazo de caña en la mezcla de sustratos. Se realizaron 3 fermentaciones con 3 réplicas cada uno, durante 7 días, se inició con la resiembra de la cepa obteniendo un inóculo concentrado de 1.1×10^7 esporas/mL y se tuvo como variables los siguientes tamaños de partícula, 1.18 mm, 1mm y 850 μm (malla 16, 18 y 20 respectivamente). La variable de respuesta fue la evaluación del crecimiento microbiano por conteo de esporas en una alícuota de fermento en cámara de Neubauer.

En la figura 3.3 se muestra la cepa ITV-18 utilizada en la fermentación, la figura 3.4 muestra las esporas en solución de Tween 80 que fueron contadas en cámara de Neubauer al terminó de los días de incubación para evaluar el crecimiento microbiano.

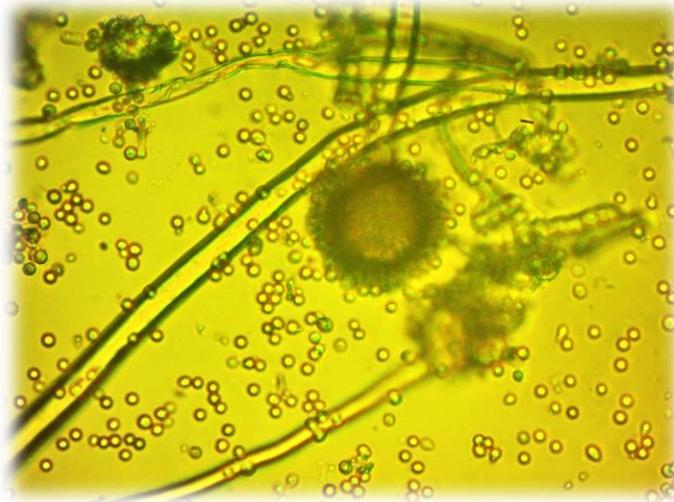


Figura 3.3 *Aspergillus niger* ITV-18 en objetivo 40x

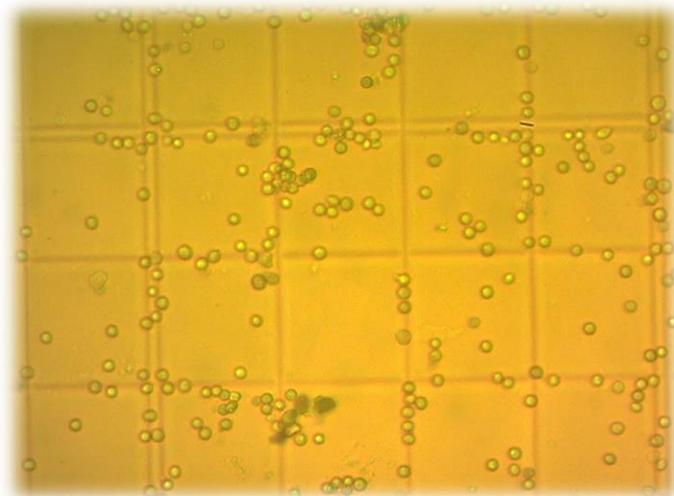


Figura 3.4 Esporas de *A. niger* en cámara de Neubauer.

En la tabla 3.7 se muestran los resultados del conteo de esporas después de la fermentación (ecuación 2.1).

Tabla 3.7 Resultados de crecimiento microbiano del *A. Niger* (esporas/mL)

Tamaño de partícula	Observaciones ($\times 10^7$)		
	1	2	3
Malla 16	5.22	6.27	5.61
Malla 18	4.21	5.45	3.96
Malla 20	4.77	5.83	4.86

Se realizó un análisis de varianza con NCSS 2007 se muestra en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8 Análisis de varianza del crecimiento de *A. Niger* en la mezcla de sustratos

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: MALLA	2	2.020622	1.010311	2.40	0.171639	0.313680
Total (Adjusted)	6	2.527667	0.4212778			
Total	8	4.548289				
	9					

* Term significant at alpha = 0.05

Este análisis muestra que no hay diferencias significativas entre los diferentes tamaños de partícula. Pero el gráfico de la figura 3.5 de comparación de medias, muestra que es mejor utilizar malla 16 dado que se obtiene mayor crecimiento que los otros dos tamaños, con un promedio de 5.7×10^7 esporas/mL.

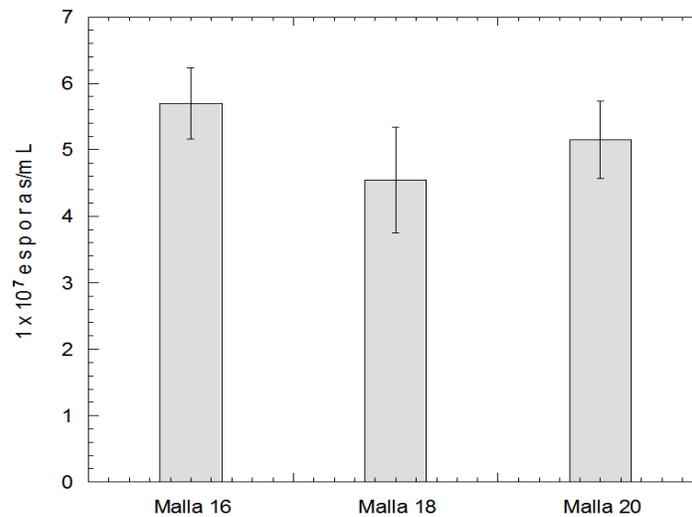


Figura 3.5 Gráfica de comparación de medias de tamaño de partícula

3.6 Estado no aséptico

El estado no aséptico implica eliminar la etapa de esterilización por calor seco o húmedo del sustrato, esto implica ahorro de energía y tiempo, se basa en los bajos requerimientos de agua de los hongos eliminando otro tipo de microorganismos invasores en el sustrato dado que ya se ha realizado un secado previo ($a_w < .10$) solo se centra en la pureza del inóculo, esto fue citado por primera vez por Barrios-González en (1988) y retomado por Miranda en el (2003).

Se realizaron 6 ensayos con 10 g de la mezcla en caja Petri sin esterilizar inoculados con inóculo concentrado (1.1×10^7 esporas/mL) y añadiendo solución nutritiva e incubaron durante 7 días. La evaluación del estado no aséptico se lleva a cabo inspeccionando la presencia de otro hongo en el sustrato cada 2 días la cepa de *niger* de este trabajo presentó un color grisáceo característico de fácil identificación. En la tabla 3.9 se muestra los resultados del proceso fermentativo.

Tabla 3.9 Evaluación del estado aséptico en la mezcla residuos de café bagazo

Experimento	Crecimiento		
	A. <i>Niger</i> ITV-18	A. <i>Awamori</i>	B. <i>Flavus</i>
1	X	X	✓
2	✓	X	X
3	✓	X	X
4	✓	✓	X
5	✓	X	✓
6	✓	✓	X

✓: Presentó crecimiento X: No presentó crecimiento

Se presentan algunas imágenes del crecimiento característico del *A. niger* (figura 3.6 y 3.7) y de la contaminación que se presentó en la FES en la evaluación del estado no aséptico.



Figura 3.6 Crecimiento de ITV-18 fermentado en mezcla de residuo de café y bagazo.

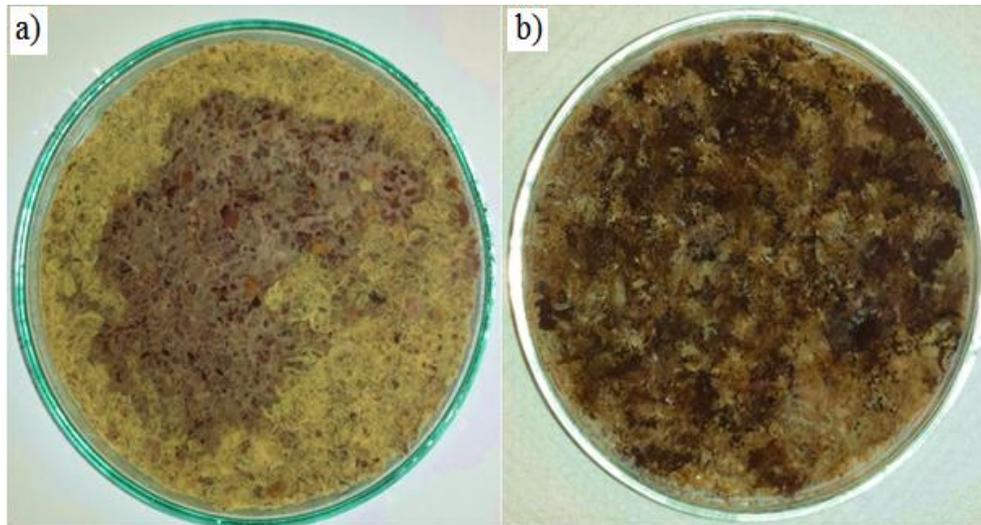


Figura 3.7 Contaminación de cultivo en la FES: a) Crecimiento de *Aspergillus flavus* alrededor de *A. niger* b) Crecimiento de *Aspergillus Awamori* en las orillas se observa presencia de *A. niger*

Los resultados muestran que solo 2 experimentos mantuvieron el cultivo puro sin contaminación de otros hongos presentes en el medioambiente, es por esto que se descartó el estado no aséptico como una opción viable.

3.7 Elección del Bioreactor

En la selección del bioreactor se consideraron diferentes configuraciones reportadas en la literatura y las ventajas y desventajas que ofrecen cada uno (Pandey 1999, Robinson *et al.*, 2002; Durand 2002; Mitchell *et al.*, 2006; Ruíz-Leza *et al.*, 2007), desde los aspectos básicos del diseño de un fermentador en medio sólido, hasta los avances más recientes en cuanto a automatización del proceso. Para la selección de diseñado del bioreactor columna-charola, evaluamos las similitudes al de un reactor de bandejas convencional y de columna estéril, encontrando las siguientes ventajas y desventajas citadas en la tabla 3.10:

Tabla 3.10 Ventajas y desventajas del diseño columna-charola

Ventajas	Desventajas
La aireación forzada, ni el control de temperatura son necesarios en lechos menores a 5 cm de altura.	El espesor de lecho es una limitante a grandes volúmenes.
Si se requiere aireación la distribución de O ₂ es mejor que un reactor de columna estéril, ya que el lecho esta seccionado.	La esterilización del reactor es más complicada, por el cuerpo interno de soporte en las bandejas.
No hay generación significativa de calor metabólico por la distribución del sustrato.	Dificultad en el muestro dentro del reactor.
Los fenómenos de transferencia de masa son depreciables, ya que no se trabaja con un lecho empacado.	La temperatura y la humedad relativa son los únicas variables externas controlables.
El mezclado del lecho no es necesario a escala piloto.	
<p>La distribución del inóculo es más fácil ya que se aplica superficialmente en cada bandeja además de que el volumen por gramo de sustrato es menor.</p> <p>Simplicidad del diseño y construcción debido a la diversidad de materiales reportados de construcción de bandejas (Pandey 1999)</p> <p>Es un diseño que combina las mejores características de los reactores de columna estéril y bandejas.</p> <p>Puede operar en condiciones no asépticas dependiendo de las condiciones medioambientales (Miranda 2003).</p>	

3.8 Diseño del bioreactor columna-charola

El resultado del diseño de los componentes del bioreactor se muestra a continuación en la figura 3.8.

Figura 3.8 Bioreactor columna-charola: a) Brida superior, b) brida bipartida superior, c) placa distribuidora de aire, d) charola, e) columna de vidrio, f) soporte interno, g) brida bipartida inferior y h) brida inferior.

3.8.1 Estructura del bioreactor

a) Bridas Superior e inferior

Estas bridas ofrecen un sellado hermético, además de sujetar el soporte interno, dado que alinean los espárragos en su posición original con la brida inferior, cuenta con orificios para la entrada de aire y recuperación de lixiviados.

b) Placa distribuidora de aire

Esta placa de acero T316L (figura 3.9) tiene la finalidad de distribuir el aire humidificado que entra en la parte superior, consta de 18 orificios de 10 mm de diámetro distribuidos del centro hacia el exterior de la placa de manera equidistante.

Figura 3.9 Placa de distribución uniforme de aire

c) Charolas

Las charolas de acero T316L con un espesor calibre 18, malla # 24 con un diámetro de 18 cm con una altura de borde 2 cm y con capacidad para 50 g de sustrato.

d) Columna

Consta de un cilindro de vidrio de boro-silicato (Figura 3.10) de 18.6 cm diámetro y, 50 cm de largo con un gap de 5 mm, para un volumen de 13.6 L. Con un interior ensanchado y esmerilado en los extremos.

Figura 3.10 a) Dimensiones de la columna de vidrio

e) Soporte interno

Lo conforman tres espárragos (figura 3.11) de 6.35 mm de espesor y largo 543 mm, roscados en ambos extremos. A lo largo son insertados soportes triangulares de acero T316L de 145 mm, que actúan como base de las charolas.

Figura 3.11 Soporte interno: a) vista frontal, b) vista isométrica

f) Bridas superior e inferior

Sujetan el soporte interno, alinean los espárragos en su posición original con la brida inferior, cuenta con orificios para la entrada de aire y recuperación de lixiviados (figura 3.12). Tienen un sellado hermético dado que contienen empaques circulares para evitar el contacto metal-vidrio. Cuentan con entradas de 1/4 y 1/8 de pulgada para las conexiones y al interior de la columna.

Figura 3.12 Bridas superior e inferior

g) Bridas bipartidas superior e inferior

Hechas de acero T304 sirven para sujetar y fijar las bridas superior e inferior, también cuentan con empaques.

3.9 Reactor Columna-Charola UAC

En la tabla 3.11 y 3.12 se enumeran las diferencias que existen entre el reactor construido en el Tecnológico de Orizaba (ITO) y el bioreactor columna charola de la UAC (figura 1.14).

Tabla 3.11 Características del bioreactor desarrollado en el Instituto Tecnológico de Orizaba

Columna Cilíndrica					
Ø externo	Altura	Volumen	Capacidad Total	Control de	Operación
Mm	mm	Lt	100% (g)	Temperatura	Aséptica
200	500	13.59	450	Aire humidificado	Si
Bandejas					
Numero Bandejas	Largo/Ancho	Altura	Volumen	Capacidad 100%	Material de Construcción
	mm	Mm	cm3	g	Vidrio Pyrex/Ac. Inox
	166	20	432.85	50	

Tabla 3.12 Características del bioreactor desarrollado en la Universidad Autónoma de Coahuila

Columna Cilíndrica					
Ø externo	Altura	Volumen	Capacidad Total	Control de	Operación
Mm	mm	Lt	100% (g)	Temperatura	Aséptica
330	254	21.72	121.31	Pared de agua	Si
Bandejas					
Numero Bandejas	Largo/Ancho	Altura	Volumen	Capacidad 100%	Material de Construcción
	mm	Mm	cm3	g	Acrílico
9	140-100	10	140	15.16	

El bioreactor de la UAC tiene mayor volumen de ocupación al distribuir las bandejas de manera alternada (figura 3.13) con el fin de contar con una aireación homogénea, esto disminuye su volumen de trabajo total (107 g) a comparación del diseñado en el ITO (436 g) que para tener una homogeneidad del aire de entrada se diseñó la placa distribuidora de aire mencionada.

El diseño en estos reactores es sencillo, y la variedad de materiales actuales permiten construir equipos económicos, desde el cuerpo principal hasta las bandejas.

El bioreactor reportado por Ruiz-Leza *et al.*, 2007, aunque es un diseño económico, presenta la dificultad de operación en estado aséptico, por el material de la columna principal, que es acrílico, la distribución alternada de las charolas limita el espacio efectivo. En el caso del bioreactor diseñado cuenta con materiales como vidrio de borosilicato y diferentes tipos de ac. Inoxidable facilitan que puede ser esterilizado por autoclave o calor seco.

3.10 Instrumentación

Se construyó un higrómetro para el monitoreo de humedad relativa (%) y temperatura (°C) la figura 3.13 muestra sus componentes. El dispositivo diseñado consta de un sensor de temperatura y humedad Datasheet SHT21, conectado a la tarjeta de desarrollo Arduino Nano basada en el microcontrolador ATmega328, el cual almacena los datos de temperatura y porcentaje de humedad obtenidos del sensor, en una memoria SD con seguimiento cronológico de estas variables, y con la dualidad de un módulo de adquisición de estos datos en tiempo real DS1307. A su vez estos datos son enviados a la computadora mediante protocolo de comunicación serial a una aplicación realizada en el programa C# (figura3.14).

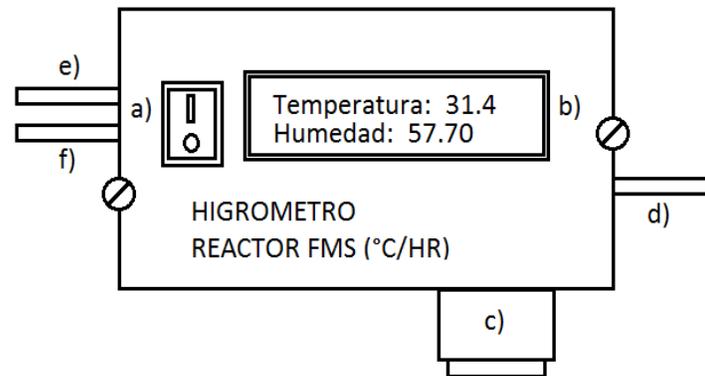


Figura 3.13 Higrómetro a) botón de encendido/apagado. b) display LCD de 16 caracteres c) módulo para tarjeta SD d) cable del sensor SHT21 e) cable USB para conexión a PC f) cable de 5 volts para alimentación

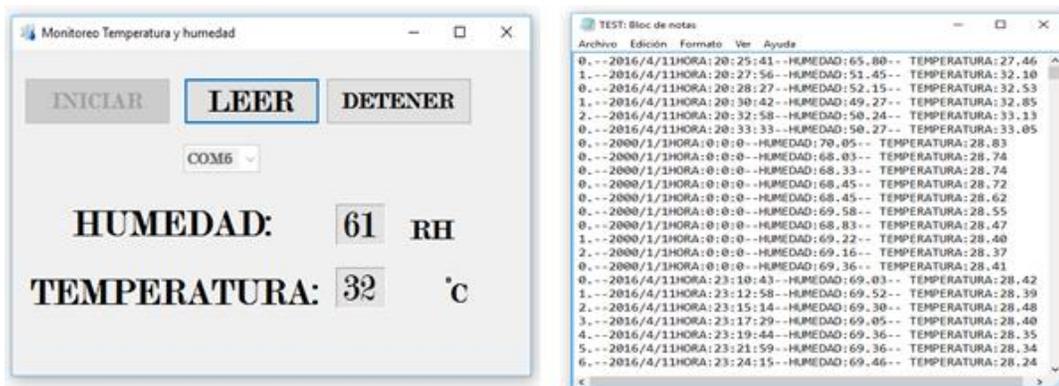


Figura 3.14 De izq. a der. Interfaz desarrollada para la adquisición de datos y almacenamiento periódico de datos de temperatura-humedad.

3.10.1 Validación de los datos de temperatura y humedad

La temperatura se midió con un termómetro Lauka de mercurio y la humedad con un higrómetro digital Azumm estos se tomaron como referencia y se comparó con las mediciones proporcionadas por el higrómetro. La temperatura fue de 0 a 50 °C y la humedad relativa (HR) de 60-90 % en ambos con intervalos de 5 unidades los valores se muestran en la tabla 3.13 y 3.14.

Tabla 3.13 Datos de temperatura del termómetro de referencia y el higrómetro diseñado

T. Mercurio (°C)	0	5.2	10.2	15.5	10.2	20.2	25.6	30.8	35.4	40.2	45.2	50.2
Higrómetro (°C)	0.2	5.2	10.2	15.6	10.1	20.4	25.6	30.6	35.2	40.4	45.8	50.6

Tabla 3.14. Datos de humedad relativa del higrómetro de referencia y el realizado

Azumm %HR	60	65	70	75	80	85	90
Higrómetro % HR	60.4	65.2	70	75.4	80.6	86	90.2

La desviación promedio (ecuación 2.2) de temperatura fue de 0.18 °C y 0.23% para la humedad relativa esto fue corregido en la protocolo de comunicación del programa C#.

3.11 Validación del bioreactor columna-charola

3.11.1 Montaje del sistema de fermentación en medio sólido

La figura 3.15 muestra los componentes del sistema de fermentación en medio sólido.

Figura 3.15 Diagrama esquemático del montaje del sistema fermentativo. a) Compresor libre de aceite 1 de 48 L., b) filtro de 5 μm (incluye en manómetro y válvula de regulación de flujo), llave de paso, válvula de seguridad y manómetro, c) manguera de poliuretano de 1/4", d) higrómetro, e) tren de filtrado: filtros micronicos: 0.01, 0.03 μm , filtro de 5 μm con válvula de regulación de flujo, f) vasos humidificador, g) baño termostático, h) bioreactor columna-charola de 13.59 L y i) sensor de higrómetro

3.12 Fermentación a escala semi-piloto

Se pesaron 40 g de la mezcla de sustrato previamente esterilizados en cada charola, inoculada (2.2×10^6 esporas/mL). Se monitoreó el crecimiento microbiano por peso seco (ecuación 2.2) la evolución del pH del sustrato y la temperatura en el interior del reactor.

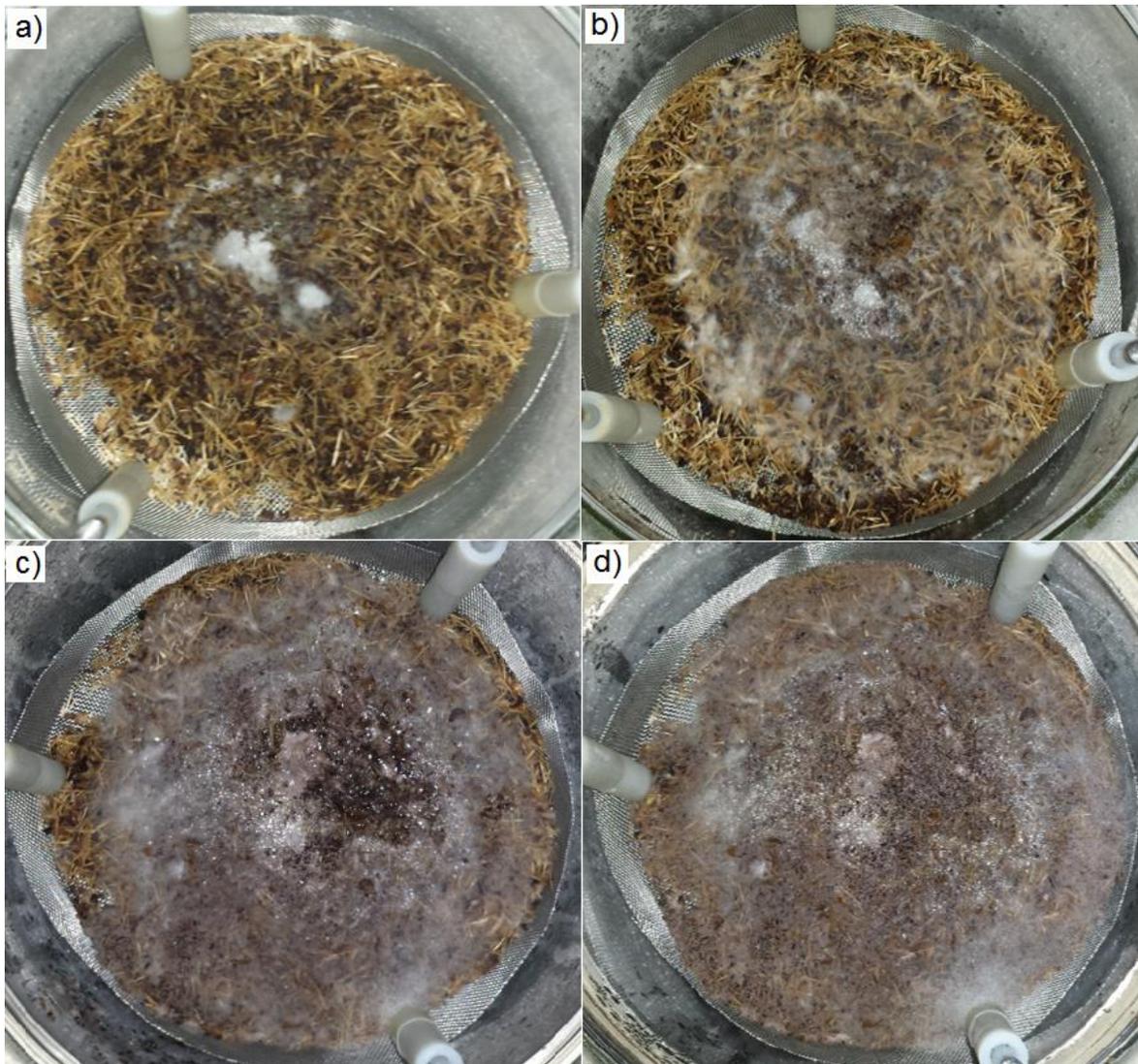


Figura 3.16 Crecimiento del *A. niger* al interior del reactor columna-charola: a) Dos días b) cuatro días c) seis días y d) ocho días de fermentación.

En la figura 3.16 se observa un crecimiento típico del hongo, dado que en los primeros días de fermentación crece de manera superficial y posteriormente crece en los espacios interparticulares, creciendo alrededor de la mezcla de sustratos.

En la figura 3.17 se muestra el extracto recuperado al inicio y al final de la fermentación, el cambio de color es debido a la biomasa en suspensión recuperada de la mezcla de sustratos.

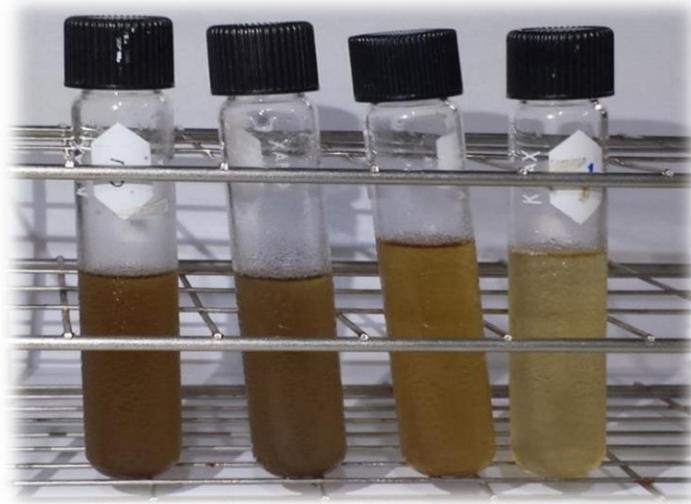


Figura 3.17 Biomasa recupera en solución de twenn 80 al 0.01%. De der. a izq. dos, cuatro, seis y ocho días de fermentación.

En la figura 3.18 se puede observar el crecimiento del hongo alrededor de una partícula de bagazo de caña

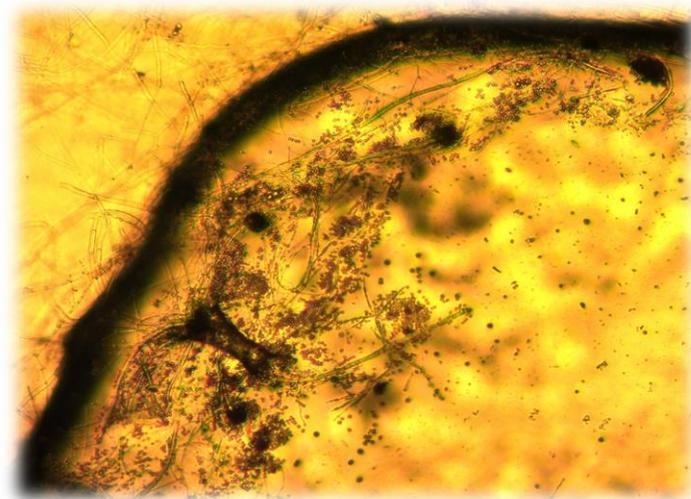


Figura 3.18. *A. niger* creciendo alrededor del bagazo de caña

Se realizaron tres fermentaciones para la validación del reactor los resultados de generación de biomasa, pH y temperatura son un promedio de tres repeticiones cada una. Los resultados de la biomasa se muestran en la figura 3.19.

Figura 3.19 Cinética de crecimiento microbiano del *A. niger* sobre la mezcla de sustratos

Se puede observar que en el día 6 se encontró el crecimiento máximo de biomasa para las tres corridas realizadas (22.72, 23.83 y 20.6025 g de sustrato/g de biomasa respectivamente) el seguimiento del crecimiento se detuvo en el día 7 dado que hubo un descenso de la producción de biomasa.

En la actualidad no hay investigaciones realizadas referidas a la generación de biomasa en mezcla residuos de café-bagazo de caña a nivel semipiloto o piloto, sólo el anteriormente citado de Ávila 2015 desarrollado en caja Petri y haciendo un recuento de biomasa por conteo de esporas, que es un método diferente al peso seco. Los trabajos de biomasa fúngica son comunes en macrohongos como *Pleurotus pulmonarius* y *Pleurotus ostreatus* dado que son hongos comestibles y la

biomasa obtenida es el peso fresco del hongo producido. Solo se hizo la comparación en cuanto a características de diseño porque el reactor desarrollado por Ruíz-Leza en el 2005 por ser el único reactor en su tipo citado, este se validó a través de la obtención de la enzima pectinasa en un residuo de pomaza de limón aunque utilizó una cepa de *A. niger*, las enzimas son metabolitos secundarios segregados por el hongo de acuerdo a una ruta metabólica específica para la su obtención, mientras que la biomasa es un metabolito primario, es por esto que no sería válida una comparación de rendimientos.

El monitoreo ph de la mezcla de sustratos se muestra en la figura 3.20 a continuación.

Figura 3.20 Monitoreo del pH durante el proceso fermentativo

El aumento de pH presenta un aumento característico de los procesos metabólicos del *A. Niger* y en general de los hongos filamentosos (Carrasco *et al.*, 2003) dado que la mezcla de sustratos no fue ajustada a un pH menor (2-3) con alguna solución ácida (ácido tartárico), los medios ácidos facilitan la velocidad del crecimiento del microorganismo (Michell *et al.*, 2006).

En los datos de temperatura fueron considerados todos los registros del higrómetro, dado que se programó para el registro de datos cada 20 min., se consideró la mínima, intermedia y mayor temperatura de cada 24 h. Los datos de temperatura mostrados en la figura 3.21 fueron obtenidos a través del higrómetro con el sensor en el interior del reactor.

T i e m p o (d i a s)

Figura 3.21 Monitoreo de temperatura al interior del bioreactor

Se observa que no hubo un aumento de temperatura por la generación metabólica, esto debido a que la masa de sustrato (360 g) no genera calor suficiente por la actividad microbiana produzca un aumento apreciable. En el desarrollo de la fermentación 3 existe un descenso en la temperatura es demuestra que el aire humidificado caliente no es suficiente para mantener una temperatura estable dentro de la columna debido al entorno.

CONCLUSIONES

Y

RECOMENDACIONES

El bagazo de caña y la mezcla de residuos de café utilizados como soporte-sustrato presentó un crecimiento promedio a nivel caja Petri de 5.7×10^6 esporas/mL este fue 35 % menor al reportado por Ávila (8.7×10^5 esporas/mL). El análisis de varianza resulto no significativo para el tamaño de partícula, aunque se obtiene un mayor rendimiento en el tamaño de 1.19 mm para el bagazo de caña en la mezcla de sustratos.

La etapa de crecimiento no aséptico resultó una opción no viable debido a que presentó contaminación por otros dos tipos de hongos (*A. Awamori* y *A. Flavus*) debido a las condiciones medioambientales locales promedio de alta humedad (HR>60%) y la temperatura ambiente media (22-25 °C).

El uso de los residuos de la zona como soporte-sustrato de la mezcla a través del enriquecimiento proteico con solución de macronutrientes facilita el seguimiento de crecimiento de biomasa por peso seco sin interferencias en su cuantificación debido a que no se está sujeto a la disponibilidad de nutrientes del sustrato.

El diseño columna charola facilita la transferencia de oxígeno (Ruíz-Leza *et al.*, 2008), ya que el sustrato no actúa como un lecho empacado si no como un lecho fraccionado, por etapas y elimina los problemas de remoción de calor metabólico que se presenta en reactores de columna estéril o empacada, debido a las alturas de los lechos.

Se evita el daño micleal dado que el lecho no es agitado para mejorar aireación, que es uniforme por la forma cilíndrica, y la humedad se concentra a lo largo del lecho por ser rejillas perforadas, esto son factores importantes estos problemas se presentan en configuraciones de tambor horizontal y tambor rotario.

La cinética de crecimiento microbiano mostró que a partir de sexto día existe un rendimiento máximo promedio de 23.3 g de biomasa/g de sustrato teniendo como base 40 g de materia prima, es decir se logró una conversión de 58.25 %.

El incremento de pH es una variable que se debe controlar, esto es perjudicial para el crecimiento del hongo, adicionando alguna solución acida antes de la esterilización para la regulación de un ph entre 2 y 3 para maximizar la generación de biomasa.

No hubo aumento de la temperatura debido al crecimiento del hongo dentro del reactor aunque el aire humidificado caliente no es suficiente para mantener la temperatura interior deseada.

RECOMENDACIONES

Diseñar una trituradora o molino semi-industrial dado que las existentes a escala industrial no brindan una disminución del tamaño de partícula adecuado, pues esta variable maximiza los rendimientos del crecimiento microbiano.

Considerar otros métodos de conteo de biomasa como el crecimiento apical del micelio mediante la obtención de imágenes en las charolas o por respirometría, monitoreando el consumo de oxígeno esto con la finalidad de que el reactor no sea abierto para el muestreo y facilitar el seguimiento de biomasa.

Colocar una chaqueta de calentamiento a la columna de vidrio, para evaluar si la temperatura del aire saturado es una variable critica, y evitar la dependencia del aire saturado para mantener la temperatura interna en el espacio gaseoso del reactor.

Adaptar una charola en el fondo del reactor para la recuperación de lixiviados, aunque se drena por la parte inferior por las salidas diseñadas estas pueden ser utilizadas para otros fines.

Automatizar el proceso del aire humidificado, adicionando una válvula reguladora de aire y un actuador que active el compresor solo cuando la humedad dentro del reactor seas menor al 60 % pues no se requiere humidificación constante por la capacidad de retención de la matriz sólida.

Optimizar el proceso de producción de biomasa después de la automatización esto con el fin de obtener productos de alto valor agregado como lo son los ácidos orgánicos o los enzimas, estos metabolitos secundarios son secretados por el microorganismo utilizado en este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ávila M, K., Tejero. A, J., Luna, S, G., Cerecero, Enríquez, R. Evaluación del crecimiento de *A. niger* ITV-18 sobre residuos de café y bagazo de caña por fermentación en estado sólido. XVI Congreso Nacional de Biotecnología, Guadalajara 2015.
2. Aguilar-Rivera, Noé., Rustrian, E., Reyes Alvarado, L, 2014. Papel amate de pulpa de café (*coffea arabica*) (residuo de beneficio húmedo). *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, **10**(3): 103-117.
3. Bermúdez, R., Morris, H., Donoso, C., Martínez, C., Ramos, E. 2003. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. florida. *Cubana Invest. Biomed*, **22**(4): 226-231.
4. Barrios-González J., H. González, A. Mejía. 1988. Effect of particle size, packing density and agitation on *penicillin* production in solid state fermentation. *Biotech. Adv.* **1**(11): 539-547.
5. Blandón-Castaño, G., Dávila-Arias, M, T., Rodríguez-Valencia, N. (1999). Caracterización microbiológica y físico-química de la pulpa de café sola y con mucílago, en proceso de lombricompostaje. *Cenicafé*, **50**(1): 5-23.
6. Bhargav, S., Panda, B., Ali, M., Javed, S. 2008. Solid-state fermentation: An overveiew. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **22**(1): 49-70.
7. Botella, C., De Ory, I., Webb, C., Cantero, D., Blandino, A. 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamory* on grape pomace. *Biochem. Eng. J.*, **26**(2-3): 100-106.
8. Botella, C., Diaz, A., De Ory, I., Webb, C., Blandino, A. 2007. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochem*, **42**(1): 98-101.
9. Blandino, A., Dravillas, K., Cantero, D., Pandiella, S., Webb, C. 2001. Utilisation of whole wheat fluor for the production of extracellular pectinase by some fungal strains. *Process Biochem*, **37**(5): 497-503.
10. Blandón-Castaño, G. Dávila-Arias., M, T. Rodríguez-Valencia, N. 1999. Caracterización microbiológica y físico-química de la pulpa de café sola y con mucílago, en proceso de lombricompostaje. *Cenicafé*, **50**(1): 5-23.

11. Carrasco, T., Valiño, E., Ibarra, A., García, Y., Pérez, T. 2003. Efecto negativo de la humedad en la fermentación en estado sólido del bagazo de caña de azúcar. *Revista cubana de Ciencia Agrícola*, **1**(37):1, 36-41.
12. Camargo, P, F., Vandenberghe, L, P., Soccol, C, R. 2005. Relation between citric acid production by solid-state fermentation from cassava bagasse and respiration of *Aspergillus niger* LPB 21 in semi-pilot scale. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **48**(1): 29-36.
13. Cordova-Lopez., J., Gutik-rez-Rojas, M., Huerta, S., Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E. 1996. Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation. *Biotechnology techniques*, **10**(1): 1-6.
14. Díaz-Plascencia, D., Rodríguez-Muela, C., Mancillas-Flores, P., Angulo, C., Salvador, F., Ruíz, O., Mena, S., Elías, A. 2010. Producción de proteína microbiana a partir de manzana de desecho con fermentación en estado sólido a 32 °C. *Revista electrónica de Veterinaria*, **11**(10): 1-9.
15. Díaz-Plascencia, D., Rodríguez-Muela, C., Mancillas-Flores, P., Angulo, C., Salvador, F., Ruíz, O., Mena, S., Elías, A. 2011. Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos mediante fermentación sólida sumergida. *Revista electrónica de Veterinaria*, **12**(1): 1-10.
16. Diorio, L., Forchiassin, F., Papinutti, V., Sueldo, D. 2003. Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomucotina). *Rev. Iberoam. Micol*, **20**(1): 11-15.
17. Durand, A. 2003. Biorreactor design for solid fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**(2-3): 113-125.
18. Durand, A., Renaud, R., Almanza, S., Maratray, J., Diez, M., y Desgranges C. 1993. Solid state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant. *Biotechnology Advances*, **11**(3): 591- 597.
19. Echeverría, J., López, P., Mato, S. 2003. Alternativas para la alimentación animal utilizando fermentación en estado sólido. *Revista Avanzada Científica*, **6**(1): 1-5.

20. Ferrer, J., Páez, G., Mármol, Z., Ramones, E., Chandler, C., Marín, M., Ferrear, A. 2001. Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. *Bioresource. Technol*, **76**(1): 39-44.
21. Ferrer, J, R., Machado, L, J., Brieva, J. 2014. Fermentación en estado sólido: Una alternativa biotecnológica para el aprovechamiento de residuos agroindustriales. *Revista Tecnocientífica URU*, **1**(1): 11-22.
22. Ferrer-Marcelo, Y., León-Rodríguez, M., Michelena-Álvarez, G., Dustet-Mendoza, J, C., Duque-Ortiz, A., Ibañez-Fuentes, M, L., Tortoló-Cabañas, K. 2011. Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, **45**(1): 3-12.
23. García, J, A. 2008. Evaluación de la cascarilla de café para utilizarse como sustrato en cultivo sin suelo de hortalizas. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico. México.
24. García-Torres, R., Rios-Leal, E., Martínez-Toledo, Á., Ramos-Morales, F, R., Cruz-Sánchez, J. S., Cuevas-Díaz, M, D, C. 2011. Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. *Revista internacional de contaminación ambiental*, **27**(1): 31-39.
25. Gualtieri, M, J., Villalta, C., Díaz, L, E, Medina, G., Lapenna, E., Rondón, M, E. (2007). Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* usando residuos de pulpa de *Coffea arabica* L. *Rev. Inst. Nac. Hig*, **38**(2), 31-37.
26. Gualtieri, M., Sánchez, C, J, A. 2003. Producción de proteína unicelular de levaduras crecidas en desechos de harina de maíz precocida (*Zea mays*). *Revista de la Facultad de Farmacia*, **45**(2), 17-22.
27. Gutiérrez Ramírez, L.A y Gómez Rave, A.J. 2008. Determinación de proteína total de *Candida utilis* y *Sacharomyces cerevisiae* en bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación*, **5**(1): 61-64.
28. Hesseltine, C, W. 1972. Solid state fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, **14**(4): 517-681.

29. Kanimozhi, S., Ramya, D., Menaga, Gandhi, M, R. 2014. Production and optimization of chitosan from *Aspergillus niger* by solid state and submerged fermentation and evaluation of its antibacterial and antioxidant activity. *Drug Invention Today*, **6**(2): 141-148.
30. Kar, B., Banerjee, R., Bhattacharyya, B, C. 1999. Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **23**(3): 173-177.
31. Kumar, A., Jain, V, K. 2008. Solid state fermentation studies of citric acid production. *African Journal of Biotechnology*, **7**(5): 644-650.
32. Kwon-Chung, K.J. and Bennett, Jhon. 1992. Medical Micology. *Filadelfia-London: Lea & Febiger*, **1**(1): 223-234.
33. Licon, A, A, I. 2013. Obtención de la fibra dietética nutricional de valor agregado a partir de bagazo de caña. Tesis de Maestría. Instituto Politecnico Nacional. México.
34. Maciel, G, M., Vandenberghe, L, PS., Haminiuk, C, W, I., Fendrich, R, C., Bianca, B, E, D., Silva Brandalize, T, Q., Pandey, A., Soccol, C, R. 2008. Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using statistical experimental designs. *Food Technol. Biotechnol.* **46**(2): 183–189.
35. Melek, S., González, A., Mas, D, S. 2001. Influencia de algunos parámetros en la fermentación en estado sólido del hongo *Trichoderma viride*. *Tecnol. Quim*, **21**(1): 82-87.
36. Miranda, L, O., Tomasini, A., Mejia, A., Barrios Gonzalez, J. 2003. Efecto del mezclado y de la adición de agua y lactosa sobre la producción de *penicilium chysogenum* por fermentación en estado sólido. *Información Tecnológica*, **14**(1): 125-130.
37. Mitchell, D, A., Berovič, M., Krieger, N. 2002. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology annual Review*, **8**(1): 183-200.

38. Mitchell, D, A., Von Meien, O, F. 1999. Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the zymotis packed-bed bio-reactor for solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**(2): 127-135.
39. Mitchell, D, A., D., Krieger, N., Berovič, M. 2006. Solid-State Fermentation Bioreactors. Fundamentals of Design and Operation. Heidelberg: Springer. Estados Unidos.
40. Haug, R. T. (1993). The practical handbook of compost engineering. Lewis Publishers. Estados Unidos.
41. Moo-Young M., Moreira, A, R., Tengerdy, R., P. 1983. Principles of the Solid Substrate Fermentation in the filamentous fungi. Edward Arnold Publishers. England.
42. Mrudula, S., Murugammal, R. 2011. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, **42**(3): 1119-1127.
43. Munguía, A, G. 2015. Comportamiento productivo y características de la canal en ovinos alimentados con pulpa de café. Tesis de Maestría. Colegio de postgraduados. México.
44. Mussatto, S, I., Ballesteros L, F., Martins, S., Teixeira, A. J. 2012. Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. Intech. Croatia.
45. Nizamuddin, S., Sridevi, A., Narasimha, G. 2008. Production of [beta]-galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, **7**(8), 1096.
46. Ogbonna, J. C., Mashima, H., Tanaka, H. 2001. Scale up of fuel ethanol production from gar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresource Technology*, **76**(1): 1-8.
47. Oviedo, J, C., Casas, A, E., Valencia, J, A., Zapata, J, E. 2014. Análisis de la medición de la biomasa en fermentación en estado sólido empleando el modelo logístico y redes neuronales. *Información tecnológica*, **25**(4), 141-152.
48. Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**(2-3): 81-84.

49. Pandey, A., Soccol, C, R., Mitchell, D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, **35**(20): 1153–1169.
50. Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C., Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Sci.*, **77**(1): 149-152.
51. Pandey, A., Soccol, C, R., Nigam, P., Soccol, Vanete, T. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, **74**(20): 69-80.
52. Pastrana L. 1996. Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, **1**(3):4-12.
53. Paz-Lago, D., & Hernández, M. (2000). Purificación y caracterización parcial de la enzima xilanasas a partir del preparado comercial Novoban 240. *Cultivos Tropicales*, **21**(2), 27-32.
54. Pineda-Insuasti, J, A., Ramos-Sánchez, L, B., Soto-Arroyave, C, P. 2014. Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido: una revisión. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*, **48**(2), 13-23.
55. Prado, F, C., Vandenberghe, L, P, S., Woiciechowski, A, L., Rodríguez-León, J., Soccol, C, R. 2005. Citric acid production by solid-state fermentation on a semi-pilot scale different percentages of treated cassava bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **22**(4): 547–555.
56. Rahardjo, Y., Sie, S., Weber, F. 2005. Effect of low oxygen concentrations on growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. *Biomol. Eng.*, **21**(6): 163-172.
57. Raimbault, M., Alazard, D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid state fermentation. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechn.*, **9**(3): 199-209.
58. Revelo V, D. A. 2011. Extracción de la cera del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) mediante tratamiento de explosión de vapor y tratamiento de combinación de solventes heptano/hexano/agua. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.

59. Ricardo, M. C. J., & Sánchez, L. B. R. 2007. Fermentación en estado sólido (I). *Producción de alimento animal. Tecnología Química*, **27**(3), 17-22.
60. Rivela, I., Rodríguez Couto, S., Sanromán, A. 2001. Extracellular ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in new solid-state bioreactor. *Biotechnology Letters*, **22**(18): 1443-1447.
61. Roussos, S., Perreud-Gaime, I. 1996. Fisiología de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, **1**(1): 341-348.
62. Robinson, T., Singh, D., Nigam, P. 2009. Fermentación en estado sólido: una tecnología microbiana promisorio para la producción de metabolitos secundarios. *Vitae*, **9**(2): 27-36.
63. Romero, G, S. 2001. Producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación líquida y fermentación sólida. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
64. Ruíz-Leza, H, A., Jasso, R, M, R., Esquivel, J. C. C., Herrera, R. R., Aguilar, C, N. Desarrollo de un bioreactor para la producción de pectinasa fúngica en medio sólido utilizando pomaza de limón. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Yucatán 2005.
65. Ruíz-Leza, H, A., Rodríguez-Jasso, R, M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J, C., Aguilar, C, N. 2007. Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, **6**(1): 33-40.
66. Sáez, V, A., Flores, V. L., Réndon A, C. 2002. Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *Revista Universidad AEFT*, **1**(128): 33-41.
67. Singh, D, G., Singh, O, H., Kaur, S, Bansal, Kaur, B, S. 2011. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Industrial Crops and products*, **34**(1): 1160–1167.

68. Suryanarayan, S. 2000. Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. *Biochemical Engineering Journal*, **13**(2-3): 189-195.
69. Van de Lagemaat, J., Pyle, L. 2001. Solid state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. *Chemical Engineering Journal*, **84**(2): 115-123.
70. Viniegra-González G. 1997. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitations and monitoring. *Advances in Solid State Fermentation*. USA.
71. Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C., Romero-Gómez, S., Díaz-Godínez, G., Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, **13**(2): 157-167.