

OBTENCIÓN DE BIOMASA Y EXOPOLISACÁRIDOS DE *Humphreya coffeata* EN
CULTIVO SUMERGIDO

SARA GALLEGO GIRALDO
GISELL ADRIANA GARCÍA GIRALDO

UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
MEDELLIN
2009

OBTENCION DE BIOMASA Y EXOPOLISACÁRIDOS DE *Humphreya coffeata* EN
CULTIVO SUMERGIDO

SARA GALLEGO GIRALDO
GISELL ADRIANA GARCÍA GIRALDO

Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero de Procesos

Asesora:
Luz Deisy Marín Palacio
MSc. en Biotecnología

Coasesora:
Catalina Giraldo Estrada
MSc. en Biotecnología

UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
MEDELLIN
2009

Nota de aceptación

Firma del jurado

Firma del jurado

Medellín, Octubre de 2009

A Dios por darme la oportunidad de vivir en condiciones privilegiadas.

Mi familia por el apoyo incondicional y por darme la mejor formación.

A la universidad EAFIT por darme las herramientas para cumplir mis sueños.

A Gisell por ser la mejor compañera de tesis.

Sara Gallego G.

Agradezco a Dios por las bendiciones que ha traído a mi vida y las oportunidades que me concede.

A mis Padres por su infinito amor y esfuerzo para impulsarme a un gran futuro.

A mis hermanos, Carlos González y Sara Gallego por su apoyo, paciencia y compañía incondicional.

Gisell García G.

Los autores agradecen a las personas que hicieron posible la realización de este proyecto:

Luz Deisy Marín Palacio, MSc. en Biotecnología y asesora del proyecto.

Catalina Giraldo Estrada, MSc. en Biotecnología y coasesora del proyecto.

Personal de los laboratorios de Ingeniería de Procesos: Sigifredo Cárdenas, Edgar Arbeláez y Jhon Jairo Estrada.

Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán y Oscar Vasco.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	15
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. GENERAL	18
3.2. ESPECÍFICOS	18
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
4.1. LOS HONGOS	19
4.2. PHYLUM BASIDIOMYCOTA.....	20
4.3. CULTIVO SUMERGIDO.....	26
4.4. ESCALADO DE BIOPROCESOS	29
5. DISEÑO METODOLÓGICO	32
5.1. MICROORGANISMO	32
5.2. ACTIVACIÓN DE LA CEPA	32
5.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO	32
5.4. MEDIO PARA LA FERMENTACIÓN.....	33
5.5. PROCESO DE ESTERILIZACIÓN	33
5.6. CONDICIONES DEL CULTIVO.....	33
5.7. MEDICIÓN DE BIOMASA	34
5.8. DETERMINACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS)	34
5.9. CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.....	34
5.10. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL	35
5.11. DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
5.12. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS	36
5.13. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE MASA (K_La).....	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR	39

6.2. PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS).....	53
6.3. PERFIL DE pH	59
6.4. CINÉTICA DE PROTEÍNA TOTAL	60
6.5. ESCALAMIENTO DEL PROCESO	62
7. CONCLUSIONES	72
8. RECOMENDACIONES.....	74
9. BIBLIOGRAFÍA.....	89
10. CIBERGRAFÍA.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del 1,3- β -D-glucano	23
Figura 2. Función de potencia vs. Reynolds para un impulsor de turbina de paletas planas.....	67
Figura 3. Método dinámico para determinar K_La	80

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Cinética de crecimiento de <i>H. coffeata</i>	41
Gráfica 2. Valores máximos de peso seco de las cinéticas de crecimiento y biomasa total de las diferentes combinaciones de aireación y agitación.....	43
Gráfica 3. Ajuste de la cinética de crecimiento a los modelos de Gompertz y Sigmoide.....	46
Gráfica 4. Productividad de EPS a las velocidades de agitación y aireación evaluadas.	57
Gráfica 5. Perfil de pH para el cultivo de <i>H. coffeata</i> a las velocidades de agitación y aireación evaluadas.....	59
Gráfica 6. Cinética de proteína total.....	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos con actividad biológica producidos por basidiomicetos	21
Tabla 2. Clasificación científica.	25
Tabla 3. Niveles y combinaciones del diseño experimental.	35
Tabla 4. Resultados de los modelos de Gompertz y Sigmoide.	47
Tabla 5. Parámetros cinéticos de <i>H. coffeata</i> a las velocidades de agitación y aireación evaluadas.	50
Tabla 6. Producción máxima de EPS de <i>H. coffeata</i> a las velocidades de agitación y aireación evaluadas.	53
Tabla 7. Datos del biorreactor a escala de laboratorio.	64
Tabla 8. Propiedades del medio de cultivo.	65
Tabla 9. Ecuaciones para el escalado y resultados.	66
Tabla 10. Datos del biorreactor a escala piloto.	67
Tabla 11. Resultados del proceso de escalamiento.	68

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Modelo cinético de Gompertz	37
Ecuación 2. Modelo cinético Sigmoide	37
Ecuación 3. Modelo de Gompertz modificado	37
Ecuación 4. Modelo Sigmoide modificado	37
Ecuación 5. Balance de masa para el oxígeno.....	79
Ecuación 6. Balance de masa con consumo de oxígeno	79
Ecuación 7. Velocidad de transferencia de O ₂ al medio.	79
Ecuación 8. Velocidad de consumo de O ₂ del microorganismo.....	79

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico para microdeterminación de carbohidratos totales.....	75
ANEXO B. Determinación de azúcares reductores por el método de DNS.....	77
ANEXO C. Metodología para la medición del K _L a	79
ANEXO D. Resultados del análisis de supuestos de normalidad, independencia e igualdad de varianzas	82
ANEXO E. Resultados del análisis de varianza unifactorial	84
ANEXO F. Resultados del análisis de medias.....	85
ANEXO G. Resultados de la prueba de análisis de rangos múltiples.....	86

1. RESUMEN

En los últimos tiempos, la medicina natural para el tratamiento de enfermedades humanas se ha convertido en un apoyo importante para la medicina tradicional. Dentro de este marco, las propiedades medicinales de los hongos han sido reconocidas desde tiempos remotos en países orientales y ahora a nivel mundial (Hincapie *et al.*, 2005). Entre los productos biotecnológicos obtenidos a partir de estos microorganismos con mayor potencial y aplicación industrial están los polisacáridos, de los cuales se han reportado importantes actividades biológicas (Xu *et al.*, 2008). Dentro de los mayores productores de estos metabolitos se encuentra *Ganoderma lucidum*, un basidiomiceto ampliamente estudiado para el tratamiento de múltiples enfermedades (Puerta y Zapata, 2006). *Humphreya coffeata* es un hongo con similaridad taxonómica a *G. lucidum*, lo que sugiere una capacidad de producción de agentes activos similares a los obtenidos por este microorganismo bajo condiciones controladas en cultivo sumergido.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la agitación y aireación en la producción de biomasa y exopolisacáridos (EPS) de un cultivo del basidiomiceto *H. coffeata* a un volumen efectivo de 2 L, en un biorreactor equipado con turbinas tipo Rushton por un período de 10 días a una temperatura de 30 °C y pH inicial de 4.5. La composición del medio fue la misma para todos los ensayos con concentraciones de lactosa 50 g/L, peptona 5 g/L, extracto de levadura 10 g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L y vitamina B₁ 0.05 g/L, previamente reportado como el medio que favoreció la producción de biomasa y EPS a nivel de matraces. Se varió la agitación a 100 rpm, 150 rpm y 200 rpm, y la aireación a valores de 0.5 vvm, 1.0 vvm y 1.5 vvm.

Los resultados indican que el aumento de la aireación favorece la producción de biomasa teniendo un efecto significativo sobre la misma, a diferencia del efecto que tuvo la agitación. El máximo valor fue $28.90 \pm 0.42 \text{ g}_{\text{Biomasa seca}}/\text{L}$ alcanzado el día 10 de la fermentación en el cultivo a 200 rpm – 1.5 vvm, logrando un aumento 1.86 veces sobre lo reportado con *H. coffeata* a nivel de matraces (Porras *et al.*, 2009). La productividad máxima (P_x) fue de $2.89 \text{ g/L}\cdot\text{d}$ para las mismas condiciones, mientras que el rendimiento de sustrato en biomasa (Y'_{xs}) se mantuvo en valores similares para todos los ensayos, el cual estuvo alrededor de $0.9 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{lactosa}}$.

En cuanto a la producción de EPS, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos de la investigación. El máximo valor alcanzado fue de $1.053 \pm 0.151 \text{ g/L}$ para el ensayo a 100 rpm y 1.5 vvm. De igual manera la mayor productividad se encontró bajo estas condiciones con un valor de $0.105 \text{ g/L}\cdot\text{d}$, estando 3.9 veces por debajo respecto a lo reportado en matraces.

Mediante la aplicación de los modelos cinéticos Sigmoide y Gompertz fue posible simular la cinética de crecimiento a 15 días. Para las fermentaciones a 100 rpm – 0.5 vvm, 100 rpm – 1.5 vvm y 200 rpm – 1.5 vvm se predijo una desaceleración de la tasa de reproducción exponencial del microorganismo dando indicios de una fase estacionaria a los 12, 10 y 12 días, respectivamente. Para todos los ensayos el modelo Sigmoide se ajustó satisfactoriamente, excepto para la fermentación con condiciones de 100 rpm – 1.5 vvm, donde Gompertz presentó el mejor ajuste y en la cual se obtuvo la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) más alta, con un valor de 0.413 d^{-1} .

Finalmente, con la combinación de agitación y aireación que favoreció la producción de biomasa, esto es 200 rpm y 1.5 vvm, se realizó el escalado a un biorreactor de 50 L, tomando como criterio el coeficiente volumétrico de

transferencia de masa (K_La), debido a que se trata de un cultivo estrictamente aerobio y el suministro de oxígeno suele ser el factor limitante en esta clase de fermentaciones. Se halló que con el cambio de escala la potencia aumentaría 18 veces mientras que la velocidad de agitación disminuiría a 88 rpm. Además el régimen a este volumen superior sería turbulento.

2. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos representan una fuente potencial para la obtención de diversos productos de origen natural. Su variedad es tan amplia que a pesar de que algunos han sido explotados industrialmente, aun queda una infinidad por estudiar. Un enfoque significativo que se le ha dado a la investigación de los microorganismos es el farmacológico, el cual va en busca de sus bondades en la producción de agentes activos para la elaboración de medicamentos y análisis de sus efectos en tratamientos médicos de enfermedades como hepatitis, hipertensión, hipercolesterolemia y cáncer (Xu *et al.*, 2008; Babitskaya *et al.*, 2005; Zhong y Tang, 2004; Tang y Zhong, 2002; Fang y Zhong, 2002a; Yang y Liao, 1998a).

Dentro de las especies más conocidas en los países orientales se encuentra *Ganoderma lucidum*, un basidiomiceto usado en la medicina tradicional de China y otras regiones como Japón, Korea y Taiwán. Recientes estudios de este hongo han demostrado interesantes actividades biológicas, incluyendo antitumoral y anti-inflamatoria. Los componentes activos asociados a este microorganismo se han identificado como triterpenoides, esteroides, alcaloides, nucleósidos y polisacáridos de tipo β -glucano, sustancias promisorias para el tratamiento de múltiples enfermedades incluyendo infecciones por el VIH (Huang *et al.*, 2009). Dentro de los hallazgos reportados para *G. lucidum* con respecto a sus polisacáridos se estableció que estos disminuyen la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y que poseen actividad antioxidante. Esta actividad se relaciona con compuestos capaces de proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino de procesos que causan excesiva oxidación involucrando especies reactivas del oxígeno (Porrás *et al.*, 2009).

Gran parte de los productos comerciales obtenidos a partir de hongos se extraen de cultivos del cuerpo fructífero los cuales pueden tomar de 3 a 5 meses. Además de ello, esta técnica requiere elevada mano de obra y dificulta el control de calidad del producto que se desea obtener (Fang y Zhong, 2002a). El cultivo sumergido ha surgido como una alternativa prometedora y eficiente para la producción de metabolitos, dado que este proceso puede tomar tan solo de 2 a 3 semanas y bajo condiciones controladas (Wagner *et al.*, 2003).

El cultivo sumergido de los hongos se ve influenciado por diversos factores: el tamaño y edad del inóculo que inciden en el crecimiento celular, morfología y formación de metabolitos valiosos; el pH y la temperatura que pueden afectar la estructura celular, la solubilidad de las sales, el estado iónico de los sustratos, la toma de nutrientes y la biosíntesis de productos (Fang y Zhong, 2002b); el oxígeno disuelto es el encargado de la oxidación de la fuente de carbono y su transformación en células, productos y CO₂, siendo de esta manera una condición vital satisfacer la demanda de este sustrato mediante la aireación y mezclado del cultivo (Hincapie *et al.*, 2005).

Colombia por su ubicación geográfica, su historia geológica, sus tipos de vegetación y clima promete una gran biodiversidad en micoflora, además de las condiciones necesarias para que los hongos puedan biosintetizar compuestos que posiblemente no se encuentren reportados en ningún otro organismo de la misma especie, aunque esté presente en otras partes del mundo (Santafé y Zuluaga, 2007). *Humphreya coffeata* es un hongo nativo que fue aislado del departamento de Córdoba y adaptado al laboratorio, el cual posee características taxonómicas similares a *G. lucidum*, ofreciendo así la posibilidad de compartir las mismas propiedades medicinales. Han sido muy escasas las investigaciones realizadas alrededor de este microorganismo, dentro de los reportes disponibles

en la literatura se encuentra su clasificación taxonómica y la investigación desarrollada por Porras *et al.* (2009), donde se evaluaron las mejores condiciones de cultivo sumergido a nivel de matraces para la producción de biomasa y exopolisacáridos, haciendo uso de modelos utilizados en *G. lucidum*.

En vista que *H. coffeata* puede ser promisorio para la producción de compuestos bioactivos para la medicina tradicional de Colombia en tratamientos de enfermedades, se evaluaron diferentes condiciones de aireación y agitación para la producción de biomasa y exopolisacáridos (EPS), en un biorreactor de volumen efectivo de 2 L. Además, se llevó a cabo el escalamiento del bioproceso a planta piloto para un volumen de 50 L usando como criterio el coeficiente de transferencia de masa (K_La), considerando que este microorganismo puede llegar a ser ampliamente explotado en la industria para la obtención de productos microbianos de utilidad farmacológica y nutracéutica.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Evaluar el efecto de la aireación y velocidad de agitación en la producción de biomasa y exopolisacáridos de un cultivo de *Humphreya coffeata* en un biorreactor de 2 L, con el fin de realizar el escalamiento del bioproceso desde el nivel de laboratorio a escala piloto.

3.2. ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Evaluar el crecimiento de *Humphreya coffeata* con variación en el flujo de aire y velocidad de agitación mediante la medición de biomasa por peso seco.
- 3.2.2. Evaluar el efecto de la aireación y velocidad de agitación en la producción de exopolisacáridos determinando la concentración de carbohidratos totales.
- 3.2.3. Escalar el bioproceso a planta piloto, teniendo como criterio el coeficiente volumétrico de transferencia de masa $K_L a$.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. LOS HONGOS

Los hongos constituyen un conjunto de seres vivos que incluye desde organismos unicelulares a organismos pluricelulares macroscópicos. Están formados por células eucariotas con una pared rígida, y se caracterizan por ser inmóviles, presentar nutrición heterótrofa por absorción y reproducción asexual y sexual (Anónimo, 2009). Pertenecen al reino Fungi, el cual representa un grupo numeroso de microorganismos. En tiempos pasados se sugirió que el número total de especies de hongos no sobrepasaba los 100.000. Sin embargo, en la actualidad este dato se ha estimado en 1.5 millones de especies. Es por ello que estos organismos se han convertido en el segundo grupo más numeroso de especies después de los insectos (Feofilova, 2001). La mayoría de los hongos poseen un papel importante en la naturaleza, en la que se hallan ampliamente distribuidos, degradando y reciclando la materia orgánica muerta a merced de sus numerosas potencialidades metabólicas de tipo quimioheterótrofo (Anónimo, 2009).

Desde tiempos remotos, los hongos han sido considerados como medicamentos eficaces para el tratamiento de diversas enfermedades humanas. Las propiedades medicinales se deben a diferentes componentes celulares y metabolitos secundarios que han sido aislados e identificados a partir del cuerpo fructífero, cultivo sólido o cultivo líquido, los cuales han mostrando efecto antitumoral, antiviral, antibacteriano y antiparasitario (Tang *et al.*, 2007). Estas bondades han intensificado en los últimos tiempos el uso de estos microorganismos en la formulación de alimentos funcionales con base en micelio puro o extractos

mezclados de diversos hongos (Hincapie *et al.*, 2005). En las últimas décadas la producción mundial de hongos ha crecido vertiginosamente. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en el año 2000 alcanzó los 2.6 millones de toneladas, y para el año 2007 ésta llegó a 3.4 millones de toneladas, presentando así un incremento del 30.8% (FAO, 2008). Como principal productor se encuentra China con el 52.5%, seguido de Estados Unidos con el 8.0%, Japón 7.9%, Francia 5.9% y Holanda 3.9%. A nivel de América Latina, México ocupa el primer lugar de producción con el 52% (Ríos, 2007).

Del total de especies de hongos menos de un 10% son conocidos. Muy pocos han sido estudiados desde el punto de vista comercial, y menos de 25 especies son aceptados como alimento. Esto es lamentable, dado que estos microorganismos constituyen una amplia y poco explotada fuente de nuevos productos naturales (Porrás *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2007).

4.2. PHYLUM BASIDIOMYCOTA

Los basidiomicetos constituyen una clase de hongos representada por más de 30.000 especies (Brizuela *et al.*, 1998). La característica común a estos organismos es la presencia de basidios, células especializadas que tras la cariogamia y la meiosis producen 4 (a veces más o menos) basidiósporas en su parte exterior (Santafé y Zuluaga, 2007).

Los basidiomicetos como hongos superiores, se han caracterizado por ser productores de una amplia gama de metabolitos biológicamente activos, que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos, hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos,

antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas (Brizuela *et al.*, 1998). Recientes reportes sugieren que compuestos derivados de basidiomicetos como *Sarcodon scabrosus*, *Coprinus comatus*, *Agaricus campestris*, *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* y *Tricholoma matsutake* poseen actividades antiproliferativas y citotóxicas en células cancerígenas humanas (Porras *et al.*, 2009). En la tabla 1 se presentan algunos de los metabolitos característicos de los basidiomicetos y los microorganismos que los producen.

Dentro de la clasificación de los basidiomicetos los microorganismos pertenecientes a la familia Ganodermataceae género *Ganoderma*, han sido en las últimas décadas uno de los grupos más estudiados principalmente en países asiáticos, debido a su amplio rango de productos de interés farmacológico (Hincapie *et al.*, 2005).

Tabla 1. Compuestos con actividad biológica producidos por basidiomicetos (Brizuela *et al.*, 1998).

Naturaleza química	Microorganismos	Actividad biológica
Sesquiterpenos y compuestos relacionados	<i>Merulius</i> , <i>Marasmius</i> , <i>Lentinus</i> , <i>Panaelus</i> , <i>Pleurotellus</i>	Antimicrobiana, antifúngica, antiviral, citotóxica, mutagénica
Diterpenoides	<i>Cyathus</i> , <i>Crinipellis</i>	Citotóxica, antifúngica, antibacteriana
Glicolípidos	<i>Ustilago</i> , <i>Schizonella</i>	Antimicrobiana, citotóxica
Nucleósidos	<i>Clitocybe</i> , <i>Lentinus</i>	Antibacteriana, antiviral

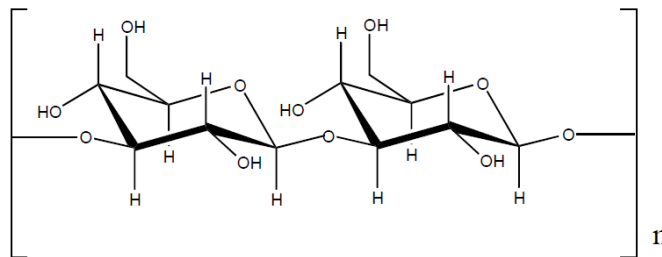
4.2.1. Género *Ganoderma*

Los hongos del género *Ganoderma* han sido muy utilizados en la medicina tradicional China, y en los últimos años se han estudiado sus efectos farmacológicos en pacientes con hepatitis, hiperglicemia, bronquitis crónica, cáncer, distrofia crónica, arterosclerosis, hipertensión, hipercolesterolemia y leucemia obteniéndose resultados promisorios (Santafé y Zuluaga, 2007).

Los compuestos químicos con mayores propiedades bioactivas son los triterpenoides y polisacáridos. Los polisacáridos existen extensamente en los hongos y son además los mayores componentes de las paredes celulares; sin embargo, los triterpenoides son especialmente encontrados en el género *Ganoderma* y los que han sido aislados corresponden principalmente a ácidos ganodéricos, ácidos lucidénicos y ganodérioroles (Berovič *et al.*, 2003).

Los polisacáridos pueden ser de diferente composición química. La mayoría pertenecen al grupo de los β -Glucanos, los cuales poseen enlaces β -(1,3) en la cadena principal (figura 1), y puntos de ramificación β -(1,6) que son necesarios para su acción antitumoral (Tang *et al.*, 2007). El nivel de su actividad está íntimamente relacionado con su peso molecular, las ramificaciones y el grado de solubilidad en agua. Entre más alto sea el peso molecular, menor la cantidad de ramificaciones y mayor la solubilidad en agua, mejor será su actividad (Santafé y Zuluaga, 2007). La calidad y el contenido de sustancias fisiológicamente activas varía de cepa a cepa, y depende también de la ubicación, condiciones de cultivo y del crecimiento del hongo (Berovič *et al.*, 2003).

Figura 1. Estructura del 1,3- β -D-glucano (Hincapie *et al.*, 2005).



Dentro del género *Ganoderma* la especie *Ganoderma lucidum*, conocido también como Reishi o Ling-Zhi, ha sido uno de los microorganismos más utilizados en Asia para estudios preclínicos donde sus fracciones de polisacáridos han demostrado potentes efectos (Russell y Paterson, 2006). *G. lucidum* es un microorganismo que crece libremente en bosques de casi todas las latitudes cálidas del planeta, tanto asiáticas como americanas y amazónicas, más en los climas subtropicales que en los templados (Santafé y Zuluaga, 2007). Sin embargo, la cantidad de setas existentes en la naturaleza no son suficientes para la explotación comercial. Por ello, su cultivo en sustratos sólidos, medio líquido estacionario o cultivo sumergido (éste último con mayor auge en los últimos tiempos), se ha convertido esencial para satisfacer la creciente demanda en los mercados internacionales (Berovič *et al.*, 2003). Actualmente, son diversos los productos con *G. lucidum* o compuestos extraídos a partir de él que pueden encontrarse en el mercado, algunos son: gotas, café, pastillas en cápsulas de gelatina y gel, tónicos, productos cosméticos, crema para las manos y crema dental (Hincapie *et al.*, 2005).

Son múltiples las investigaciones que se han realizado sobre *G. lucidum* para la producción de biomasa y polisacáridos intra y extracelulares. Gran parte de estos estudios se han enfocado en conocer la influencia de las condiciones de operación del cultivo para maximizar sus valores. Algunas de las variables estudiadas

incluyen composición del medio de cultivo, densidad del inóculo, pH, temperatura, agitación y suministro de oxígeno (Huang *et al.*, 2009). El trabajo realizado por Fang y Zhong (2002a) sobre el efecto de la concentración inicial de la fuente de carbono y nitrógeno para la producción de metabolitos a partir de *G. lucidum*, mostró que la glucosa a una concentración de 50 g/L favoreció el crecimiento celular y la formación de polisacáridos intracelulares con valores de 16.7 g/L y 1.19 g/L, respectivamente. Así mismo, el estudio permitió concluir que la combinación de las fuentes complejas de nitrógeno peptona y extracto de levadura resulta óptima para la formación de biomasa y metabolitos. Babitskaya *et al.* (2005) reportaron que *G. lucidum* fue capaz de crecer dentro de un amplio rango de pH (3.0 - 7.5), siendo óptimo un pH inicial comprendido entre 6.0 y 7.0. Sin embargo, la producción de exopolisacáridos se vio estimulada a pH más bajos (4.0 y 6.0). En cuanto a la temperatura, los autores hallaron que valores entre 25 – 30 °C resultaron óptimos tanto para el crecimiento como para la producción de endo y exopolisacáridos (Babitskaya *et al.*, 2005). Otra de las condiciones que influye en el cultivo de microorganismos es la velocidad de agitación, la cual debe mantener un equilibrio entre la transferencia de oxígeno y el esfuerzo cortante, factores que aumentan con el incremento de este parámetro (Wagner *et al.*, 2003). Yang y Liao (1998b) estudiaron un rango de agitación de 50 a 200 rpm a nivel de matraces con una cepa de *G. lucidum*, la densidad más alta de biomasa se obtuvo a 100 rpm, mientras que la producción más alta de EPS se logró a una velocidad de 150 rpm, sugiriendo que el aumento de la agitación estimula la síntesis de estos metabolitos. El impacto del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_La) en un cultivo de *G. lucidum* fue estudiado por Tang y Zhong (2003). En su trabajo reportaron que el nivel inicial del K_La tiene un efecto significativo en el crecimiento celular durante el cultivo. La producción y productividad de polisacáridos extracelulares e intracelulares fue relativamente baja para valores de K_La de 60 h^{-1} , mientras que a valores relativamente altos de K_La (78.2 y 96 h^{-1}) su producción se vio favorecida. En cuanto a la evaluación del oxígeno disuelto (OD), *G. lucidum* creció rápidamente a valores relativamente altos (alrededor del 25 %

de saturación del aire) mientras que a valores de 10 % de saturación presentó limitaciones en su crecimiento. Así mismo, la producción de metabolitos fue superior para valores del 25 % de saturación.

Otro de los enfoques que se le ha dado a los estudios con *G. lucidum* es el efecto de la adición de estimulantes para la producción de biomasa y polisacáridos. Yang *et al.* (2000) por ejemplo, reportaron que algunos ácidos grasos promueven la biosíntesis de metabolitos, encontrando que el ácido palmítico mejoró la producción de polisacáridos y el ácido oleico el crecimiento celular. Huang *et al.* (2009) estudió la adición de aceite de maíz al medio de cultivo. En el trabajo encontraron que al utilizar una cantidad inicial de 2 % de aceite, la biomasa alcanzó un máximo de 12.9 g/L y los polisacáridos 1.038 g/L, comparado a 4.3 g/L y 0.4 g/L que se había obtenido sin adición para la biomasa y polisacáridos, respectivamente.

4.2.2. *Humphreya coffeata*

Es un microorganismo nativo, encontrado en el norte del país en el municipio Tierra Alta, departamento de Córdoba (Porrás *et al.*, 2009). En la tabla 2 se presenta su clasificación científica.

Tabla 2. Clasificación científica (Cybernome, 2008).

Reino	Fungi
Filo	Basidiomycota
Clase	Basidiomycetes
Orden	Ganodermatales
Familia	Ganodermataceae
Género	<i>Humphreya</i>
Especie	<i>coffeata</i>

H. coffeata, perteneciente a la misma familia de *G. lucidum*, podría tener un fuerte potencial para el desarrollo de bioproductos. Estudios realizados por Porras *et al.* (2009) acerca de este hongo, han sido una base primordial para el posterior seguimiento de nuevas investigaciones y el aprovechamiento del mismo siguiendo el modelo biológico usado en *G. lucidum* para la búsqueda de metabolitos de interés en cultivo sumergido. En el trabajo realizado por Porras *et al.*, (2009), se logró la adaptación de la cepa al laboratorio a partir del cuerpo fructífero, y se determinaron las condiciones de cultivo necesarias para la producción de biomasa, obtención y cuantificación de polisacáridos bajo diferentes variables. Los valores que favorecieron una mayor expresión de biomasa y polisacáridos fueron: Lactosa 50 g/L, relación de nitrógeno peptona 5 g/L – extracto de levadura 10 g/L, y pH inicial de 4.5, con valores máximos de 15.5 g/L y 6.9 g/L para biomasa y exopolisacáridos (EPS), respectivamente. A partir de estos resultados se realizó una cinética de crecimiento y producción de exopolisacáridos en cultivo sumergido. Con extractos previamente seleccionados se llevó a cabo la evaluación de la actividad antioxidante, y la estimación biológica mediante evaluación citotóxica y genotóxica. Los resultados arrojaron que *H. coffeata* presenta un efecto citotóxico y genotóxico dependiente de la concentración del extracto. A valores superiores de 250 µg/mL resultó tóxico sobre la línea celular Jurkat, derivada de leucemia en humanos, pero a dicha concentración o inferior presentó un efecto genoprotector. En cuanto a las pruebas antioxidantes, se encontró una buena respuesta al evaluar la captura de radicales superóxido mediante el sistema Fenazina Metasulfato (PMS)/NADH, lo que permite sugerir la utilización de una batería enzimática que puede generar protección celular (Porras *et al.*, 2009).

4.3. CULTIVO SUMERGIDO

Gran parte de los productos comerciales obtenidos a partir de hongos se extraen de cultivos en campo, lo que consume gran cantidad de tiempo y mano de obra.

Mediante esta técnica, se requiere de varios meses para el cultivo del microorganismo y se dificulta el control de calidad del producto que se desea obtener. Es por ello que el cultivo sumergido ha surgido como una alternativa promisorio para la producción eficiente de metabolitos valiosos (Zhong y Tang, 2004). Sin embargo, en este tipo de cultivo es necesario evaluar parámetros que pueden afectar el crecimiento y la formación de polisacáridos extra e intracelulares, ya que su producción está determinada por un amplio rango de variables ambientales, así como también por los efectos de la elaboración del medio de cultivo (Yang y Liao, 1998a). La preparación y tamaño del inóculo, composición del medio, el pH y la temperatura cumplen un papel determinante en el crecimiento celular y la biosíntesis de productos, estos últimos pueden afectar la función de la membrana, estructura y morfología celular (Wang, 1995). Así mismo, la fuente de carbono y nitrógeno son los mayores nutrientes en un proceso biológico para la formación de biomasa y polisacáridos (Fang y Zhong, 2002a).

El cultivo sumergido de hongos se caracteriza por un incremento de la viscosidad del medio en el tiempo, que puede ser debido a múltiples factores como el aumento de la concentración celular, cambios morfológicos del microorganismo o producción de exopolisacáridos que alteran la reología del medio de cultivo. Este aumento de la viscosidad es un fenómeno indeseable pero inevitable, debido a que causa dificultades en el suministro de oxígeno, en la eliminación del dióxido de carbono y en el mezclado del cultivo (Tang *et al.*, 2007).

La aireación y la agitación son factores fuertemente influyentes en la formación de polisacáridos (Yang y Liao, 1998a). La agitación del medio es necesaria para obtener una buena mezcla y por ende, promover la transferencia de masa y energía. Sin embargo, la agitación también crea la fuerza de cizallamiento, la cual puede causar daños a las hifas y provocar cambios morfológicos en el micelio; como consecuencia de ello se tienen variaciones en la tasa de crecimiento y

formación de producto (Tang *et al.*, 2007). En cuanto a la aireación, ésta afecta tanto el crecimiento celular y morfología, como la absorción de nutrientes y la biosíntesis de metabolitos (Zhong y Tang, 2004). Diversos estudios se han realizado para evaluar el efecto de las variables agitación y aireación en cultivos fúngicos a nivel de biorreactores. Lee y colaboradores (2004) trabajaron con el basidiomiceto *Grifola frondosa* en cultivo sumergido evaluando diferentes valores de agitación y aireación para determinar el más favorable tanto para la producción de biomasa como de exopolisacáridos. El rango estudiado fue de 50 – 300 rpm y 0 – 2.5 vvm para agitación y aireación, respectivamente. Los resultados arrojaron que una agitación de 166 rpm y aireación de 1.6 vvm alcanzaron un máximo de biomasa de 16.8 g/L y el valor más alto de EPS, esto es 5.26 g/L. En su trabajo lograron identificar que la aireación causó cambios en la producción de EPS, aparentemente un valor alto de este parámetro mantuvo un nivel elevado de oxígeno disuelto en el cultivo, que además de mejorar el mezclado, favoreció la síntesis de estos metabolitos. Sin embargo, el aumento de la agitación presentó un efecto desfavorable, probablemente por la inactivación de algunas enzimas claves en la formación de los polisacáridos, como resultado del esfuerzo cortante que se generó en el medio de cultivo. Xu *et al.* (2006), trabajaron en cultivo sumergido con el hongo *Paecilomyces tenuipes* con el fin de investigar el efecto del esfuerzo cortante en la producción de biomasa y exopolisacáridos. Para ello evaluaron diferentes intensidades de agitación: 50, 150, 300 y 400 rpm. En sus resultados encontraron que la producción de masa celular aumentaba con el incremento de la agitación de 50 a 300 rpm, alcanzando un máximo valor de 21.06 g/L en el día 10 a 300 rpm. En cuanto al máximo de EPS, se obtuvo a una velocidad de agitación de 150 rpm con un valor de 2.33 g/L en el día 10 de la fermentación.

La concentración de polisacáridos en un prolongado tiempo de fermentación depende fuertemente de la transferencia de oxígeno (Yang y Liau, 1998a). Éste es un parámetro que se ve afectado por diversos factores como la geometría y

características del biorreactor, propiedades del líquido (composición, viscosidad, tensión superficial), energía disipada en el fluido, concentración y morfología de los microorganismos. Su valor depende del caudal de aire inyectado al sistema, velocidad de agitación, mezclado, entre otros (Bandaipheth y Prasertsan, 2006).

4.4. ESCALADO DE BIOPROCESOS

Cuando un proceso se desarrolla a nivel laboratorio es relativamente fácil asegurar condiciones adecuadas en cuanto a control de temperatura, oxigenación y otros parámetros importantes para el crecimiento de células. Sin embargo, para alcanzar los volúmenes de producción comercial de un bioproducto se requiere llevar el proceso a una escala mayor. Esta tarea de escalamiento no es trivial y pocos centros de investigación se dedican a ella. Se trata además de una transferencia tecnológica, para llevar la ciencia al plano comercial (Álvarez, 2005).

El escalamiento involucra el estudio de los problemas asociados a transferir la información obtenida en el laboratorio (mL) a escala de planta piloto (L) y de ésta a escala industrial (m³). En cada una de las etapas de escalamiento se evalúan algunos aspectos del proceso: a escala de matraces agitados (500 ml) o pequeños fermentadores se determinan los mecanismos de control y se mejoran las cepas de producción, se estudia la cinética de crecimiento y selección del medio; a escala piloto (5-500 L) se optimizan las condiciones de operación, se estudian los efectos de flujos, presiones, temperaturas, aireación, velocidades de agitación y control de pH (Quintero, 1999); finalmente a escala industrial se lleva a cabo la producción de biomasa y/o metabolitos de interés a niveles rentables.

En la práctica se utilizan varios criterios para efectuar el cambio de escala, todos ellos basados en resultados empíricos (Quintero, 1999). Algunos de los criterios son: potencia por unidad de volumen, coeficiente de transferencia de oxígeno,

velocidad en la punta del impeler y tiempo de mezclado. La selección del criterio depende de cuál es la variable más importante para el crecimiento del microorganismo y para la obtención del producto deseado (García y Gómez, 2008).

La mayoría de los procesos aerobios a nivel industrial, se llevan a cabo en medios acuosos con sustancias orgánicas y sales, caldos que presentan un comportamiento no newtoniano (Doran, 1999). El oxígeno suministrado en estos cultivos es un nutriente importante para el crecimiento del microorganismo, mantenimiento y producción de metabolitos, que a escasez de éste puede afectar considerablemente su rendimiento. Es por esta razón que en diversos procesos de escalado, la magnitud que se mantiene constante es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_{La}). La concentración de oxígeno disuelto en un cultivo aerobio depende de la tasa de transferencia de la fase gaseosa a la líquida (OTR), velocidad a la cual el oxígeno es transportado a las células y de la tasa de consumo por parte del microorganismo (OUR) para sus funciones metabólicas (García y Gómez, 2008).

En las fermentaciones aeróbicas, el K_{La} se ve afectado por las condiciones hidrodinámicas alrededor de la burbuja de gas. Las relaciones entre K_{La} y los parámetros tales como el diámetro de la burbuja, la velocidad del líquido, la densidad, la viscosidad y la difusividad del oxígeno han sido investigados ampliamente, y se han desarrollado correlaciones empíricas entre el coeficiente de transferencia de masa y las variables importantes de operación. Teóricamente, las correlaciones que permiten la predicción del coeficiente de transferencia de masa están con base en información recolectada de un largo número de experimentos. Sin embargo, en la práctica la exactitud de las correlaciones aplicadas a los sistemas biológicos es generalmente pobre. La razón principal es que la transferencia de masa se ve fuertemente afectada por los aditivos usualmente

presentes en el medio de fermentación. Dado que los líquidos de fermentación contienen niveles variables de sustratos, productos, agentes activos y células, el fenómeno de transferencia de masa resulta ser muy complejo (Doran, 1999).

Cuando el coeficiente de transferencia de masa es requerido para ampliar la escala del equipo, otro factor relacionado a las condiciones hidrodinámicas limita la aplicabilidad a las correlaciones. La fase de gas en una escala pequeña en tanques agitados se encuentra dispersa por todo el cultivo, en contraste cuando es una escala mayor. Este resultado se debe a la diferencia de los regímenes hidrodinámicos presentes en una pequeña y grande escala. Las correlaciones de transferencia de masa para tanques a nivel de laboratorio tiende a sobreestimar la capacidad de transferencia de oxígeno de una escala comercial (Doran, 1999).

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. MICROORGANISMO

El microorganismo de trabajo fue *Humphreya coffeata*, donado por el laboratorio de biotecnología de la Universidad EAFIT de Medellín, previamente aislado del municipio Tierra Alta, departamento de Córdoba (Colombia).

5.2. ACTIVACIÓN DE LA CEPA

La cepa madre se conservó en PDA a 4 °C. A partir de ésta se llevó a cabo un repique que fue conservado en aceite mineral, del cual se realizó la respectiva activación para cada fermentación, haciendo la siembra en PDA e incubando a 30 °C por un período de 7 días.

5.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Para la preparación del inóculo se siguió el procedimiento descrito por Fang y Zhong (2002a) para *G. lucidum*, en un medio de cultivo con la siguiente composición (g/L): glucosa 35, peptona 5, extracto de levadura 2.5, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 y vitamina B₁ 0.05; el pH inicial se ajustó a 4.5 con HCl 1M. Se prepararon cuatro erlenmeyers de 250 mL con 50 mL de medio, y se inocularon con 3 discos de agar de diámetro aproximado de 1 cm. Los matraces fueron llevados a un agitador orbital New Brunswick Scientific C1 Classic Series, a 140 rpm y 30 °C durante 7 días. Los cuatro erlenmeyers se utilizaron como inóculo de la fermentación.

5.4. MEDIO PARA LA FERMENTACIÓN

Se prepararon 1.8 L de medio de fermentación reportado por Porras *et al.* (2009), con la siguiente composición (g/L): lactosa 50, peptona 5, extracto de levadura 10, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 y vitamina B₁ 0.05. Las fermentaciones se llevaron a cabo en el biorreactor Bioengineering CH8636 equipado con turbinas tipo Rushton y un volumen efectivo de 2 L, por un periodo de 10 días.

5.5. PROCESO DE ESTERILIZACIÓN

Los medios de cultivo tanto para el inóculo como para la fermentación, y el biorreactor utilizado en el estudio, fueron esterilizados en autoclave horizontal a 121 °C y 15 psi durante 20 minutos, de acuerdo a los procedimientos establecidos por el laboratorio de biotecnología de la Universidad EAFIT.

5.6. CONDICIONES DEL CULTIVO

El cultivo de *H. coffeata* permaneció a una temperatura constante de 30 °C y pH inicial de 4.5. Las condiciones de aireación y velocidad de agitación se variaron entre 0.5 vvm – 1.5 vvm y 100 rpm – 200 rpm, respectivamente (ver numeral 5.11).

Los ensayos se realizaron por duplicado y se muestreo un volumen de 10 mL a las 0 h, 9 h, 20 h y a partir de allí cada 24 h durante 10 días, para hacer los análisis de biomasa, azúcares reductores, producción de exopolisacáridos y contenido de proteína total.

5.7. MEDICIÓN DE BIOMASA

La medición de la biomasa se realizó a través de la técnica de peso seco. Para ello, la muestra fue filtrada al vacío, previo secado y pesado del papel filtro Whatman. Con agua destilada, se hizo la remoción de los restos de medio presente en el papel filtro. La biomasa húmeda se secó a 50 °C durante 24 horas, garantizando un peso constante. El filtrado fue almacenado para posterior cuantificación de azúcares reductores y determinación de exopolisacáridos. Al final del cultivo se recolectó la biomasa total del fermentador y se determinó su peso seco bajo las condiciones ya descritas.

5.8. DETERMINACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS)

Para la determinación y cuantificación de EPS se empleó el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Para ello se tomó 0.5 mL del filtrado colectado por muestra y se realizó la precipitación de EPS con adición de 2 mL de etanol al 96%. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas en un equipo marca Hettich Universal 32R, a 4500 rpm por 20 min. Los componentes insolubles se resuspendieron en 2 mL de NaOH 1M a 60 °C durante una hora (Fang y Zhong, 2002a). Una vez finalizado el anterior procedimiento, se aplicó el método del fenol-ácido sulfúrico a las muestras usando una curva de calibración de glucosa con concentraciones entre 10 y 100 mg/L (Anexo A).

5.9. CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

El contenido de azúcares reductores se determinó por el método del Ácido 3,5-Dinitro Salicílico (DNS) (Miller, 1959). El procedimiento se aplicó al sobrenadante obtenido de la precipitación de los EPS con etanol al 96% y posterior

centrifugación a 4500 rpm durante 20 min. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con lactosa con concentraciones entre 0.2 y 4 g/L (Anexo B).

5.10. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

El contenido de proteína total se determinó por el método de Lowry (1951). El procedimiento se aplicó a los extractos obtenidos después de la filtración de la biomasa. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con BSA (Albúmina Sérica Bovina) con concentraciones entre 0.016 y 0.4 g/L.

5.11. DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño de experimentos consistió en un diseño factorial con 2 factores: aireación (vvm) y velocidad de agitación (rpm), y 2 niveles de valores extremos, para un total de 4 tratamientos, más un quinto experimento con un punto central de cada factor. Los niveles y las combinaciones se especifican en la tabla 3.

Tabla 3. Niveles y combinaciones del diseño experimental.

Experimento No.	Variables	
	Velocidad de agitación (rpm)	Aireación (vvm)
1	100	0.5
2	100	1.5
3	200	0.5
4	200	1.5
5	150	1.0

Se realizó el análisis de supuestos de normalidad, independencia e igualdad de varianzas de los test de Cochran, de Barlett y de Hartley. La comprobación del comportamiento normal de las variables se realizó mediante la prueba de Shapiro - Wilks. Confirmadas estas condiciones, se procedió a realizar el análisis de varianza unifactorial con un nivel de confianza del 95 % para determinar el efecto de los factores en las variables dependientes y así establecer si hay diferencia significativa entre los tratamientos y cuál de ellos presenta el mejor resultado. El software empleado fue Statgraphics Plus 5.0.

5.12. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Los parámetros cinéticos calculados fueron biomasa producida (ΔX), velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$), rendimiento observado de sustrato en biomasa (Y'_{xs}), productividad de biomasa (P_x) y productividad de exopolisacáridos (P_{exo}).

La cantidad de biomasa producida en gramos se calculó mediante la diferencia entre la cantidad máxima alcanzada y la cantidad correspondiente al momento cero de la fermentación, multiplicada por el volumen total del cultivo. El rendimiento observado de sustrato en biomasa (Y'_{xs}) se calculó como la relación entre la biomasa producida en gramos (ΔX) y el consumo total de sustrato en gramos (ΔS). Para hallar la productividad de biomasa, se relacionó la biomasa total producida al final del cultivo, teniendo unidades de g/L·d. Finalmente la productividad de exopolisacáridos se determinó mediante la relación de producción de EPS y el día en que se alcanzó dicha producción.

Para determinar la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) se llevó a cabo la aplicación de dos modelos cinéticos: Gompertz y Sigmoide, a través de una regresión no lineal mediante el paquete estadístico Sigmaplot 2.0. Dichos modelos

se representan por las siguientes ecuaciones, donde a, b y c son constantes sin un significado específico (Zwietering *et al.*, 1990):

$$Ln(X) = a \cdot e^{\wedge} [-e^{\wedge} (b - c \cdot t)] \quad \text{Ecuación 1. Modelo cinético de Gompertz}$$

$$Ln(X) = \frac{a}{[1 + e^{\wedge} (b - c \cdot t)]} \quad \text{Ecuación 2. Modelo cinético Sigmoide}$$

La modificación matemática de dichas ecuaciones permite obtener el modelo en términos de parámetros con significado biológico como son A ($Ln(X_{m\acute{a}x})$), λ (tiempo de la fase lag) y velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) (Zwietering *et al.*, 1990), quedando de la siguiente forma:

$$Ln(X) = A \cdot e^{\wedge} \left\{ -e^{\wedge} \left[\frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot e^{\wedge} (\lambda)}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Ecuación 3. Modelo de Gompertz modificado}$$

$$Ln(X) = \frac{A}{\left\{ 1 + e^{\wedge} \left[\frac{4\mu_{m\acute{a}x}}{A} (\lambda - t) + 2 \right] \right\}} \quad \text{Ecuación 4. Modelo Sigmoide modificado}$$

La selección del modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales para la predicción del comportamiento de la biomasa en el tiempo, se llevó a cabo mediante la comparación del número de iteraciones y el error estándar de las constantes, siendo el más apropiado aquel que presentó el número más bajo de ambos parámetros. De esta manera se tomó la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) arrojada por el modelo seleccionado.

5.13. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE MASA ($K_L a$)

Para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($K_L a$) inicial del cultivo se empleó el método dinámico. Este método se basa en el balance de oxígeno disuelto en el biorreactor, midiendo la evolución de la concentración del oxígeno durante la interrupción de la aireación del caldo, y su posterior aireación (Anexo C). Tiene la ventaja de ser un método sencillo y relativamente exacto (Alcón, 1999).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

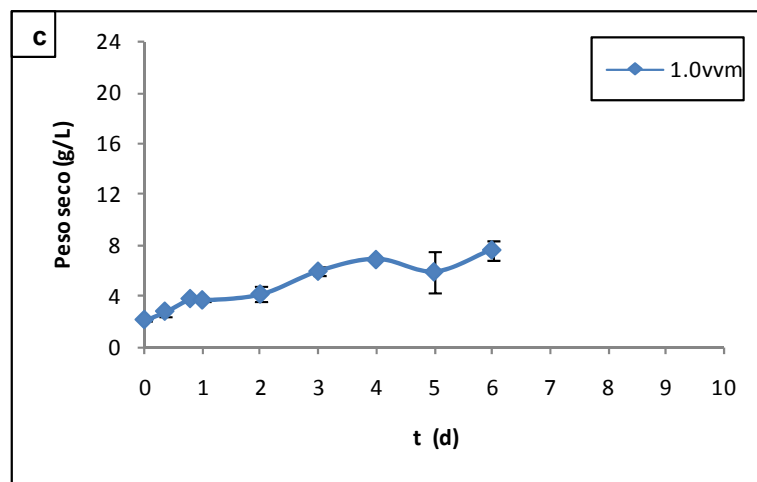
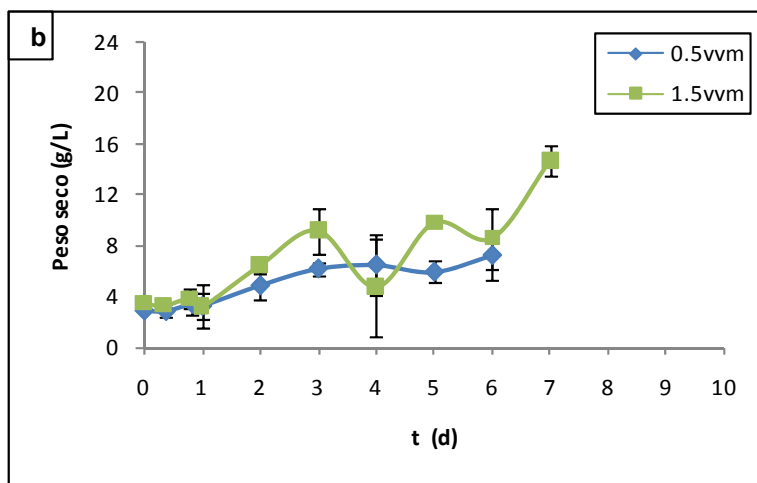
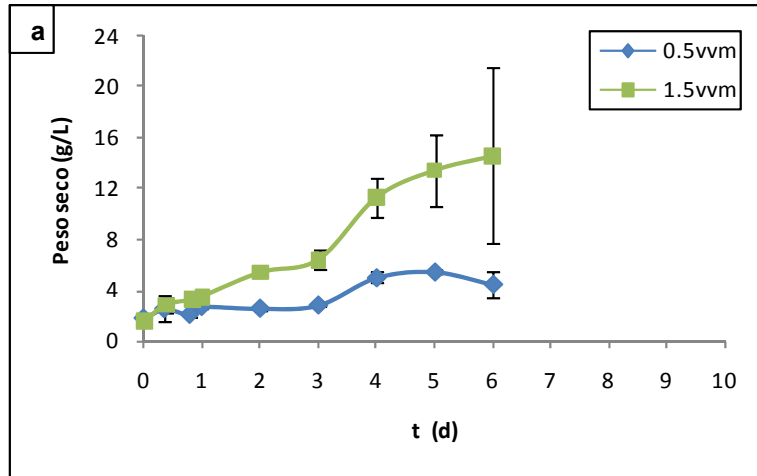
6.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR

Durante el cultivo sumergido de microorganismos, son múltiples los factores químicos y ambientales que influyen en la producción de biomasa celular. Dentro de estos últimos se encuentran la aireación y la agitación los cuales son necesarios para promover la transferencia de masa y energía así como también la absorción de nutrientes. Sin embargo, valores elevados de los mismos puede ocasionar efectos negativos en el cultivo por la creación de la fuerza de cizallamiento y represión en la generación de los productos de interés (Tang *et al.*, 2007, Zhong y Tang, 2004, Yang y Liao, 1998a). En el presente estudio se realizaron fermentaciones tipo batch para el basidiomiceto *H. coffeata* con el fin de evaluar el efecto de la aireación y agitación en su crecimiento, usando un medio de cultivo con lactosa a una concentración de 50 g/L, pH inicial de 4.5 y temperatura de 30 °C. La gráfica 1 muestra la cinética de crecimiento para las condiciones de aireación y agitación evaluadas.

Cuando el microorganismo fue sometido a las condiciones de 100 rpm y 0.5 vvm, se observó que la cantidad de biomasa presente en el cultivo se mantuvo en valores similares durante los primeros 3 días de fermentación indicando un posible período de latencia (gráfica 1.a). Esta etapa del cultivo se caracteriza por cambios en la composición química de las células antes de poder dar inicio a la multiplicación celular (Varela, 2009), y su duración se ve afectada por el tamaño y edad del inóculo, concentración de nutrientes y síntesis de nuevas enzimas que permita al microorganismo adaptarse a las condiciones del ambiente (Shuler y Kargi, 1992). Es evidente que el cultivo de *H. coffeata* presentó un período

prolongado de latencia, lo que puede deberse a una respuesta lenta de la maquinaria enzimática del microorganismo (Varela, 2009). Cabe considerar que la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación fue superior a la concentración del medio del inóculo, lo que influye también en su tiempo de adaptación. Esta etapa puede minimizarse o eliminarse cuando las condiciones nutricionales tanto en el pre-cultivo como en la fermentación son las mismas (Wagner *et al.*, 2003). Superada esta fase, se dio inicio a un crecimiento acelerado del microorganismo que se extendió hasta el día 5 de la fermentación, alcanzando un valor máximo de biomasa de 5.46 ± 1.00 g/L. Es importante considerar que aproximadamente a partir del día 6 de la fermentación la toma de muestra se dificultó por la forma de crecimiento del microorganismo, dado que se adhería a las paredes y partes del biorreactor. Esto conduce a que los datos reportados en las cinéticas de crecimiento a partir de dicho día no sean confiables ni representativos del cultivo de *H. coffeata*. Este crecimiento fue acompañado de una disminución del líquido disponible en el cultivo el cual era absorbido por la biomasa, dificultando así el retiro del mismo en cada muestreo. A ello se suma que la muestra fue tomada siempre en el mismo punto del biorreactor, y una vez se había evacuado el material celular presente en ese espacio, no era posible obtener una muestra representativa del cultivo. Las razones expuestas limitan así la determinación de las fases del cultivo a partir del día 6 para la mayoría de los ensayos. Al evaluar la cinética de crecimiento a la misma velocidad de agitación esto es 100 rpm, con un aumento en la tasa de aireación a 1.5 vvm, es evidente que la producción de biomasa estuvo favorecida por dicho cambio. Tal como lo muestra la gráfica 1.a, bajo estas condiciones el cultivo no presentó una fase de adaptación, indicando una buena respuesta del microorganismo al nuevo ambiente. La cinética muestra una fase de reproducción exponencial que se extiende hasta el día 6 de fermentación alcanzando un valor máximo de peso seco de 14.65 ± 4.84 g/L. Los elevados errores estándar que se visualizan en esta cinética se pueden adjudicar a los inconvenientes ya descritos en cuanto a la toma de muestra y crecimiento del microorganismo.

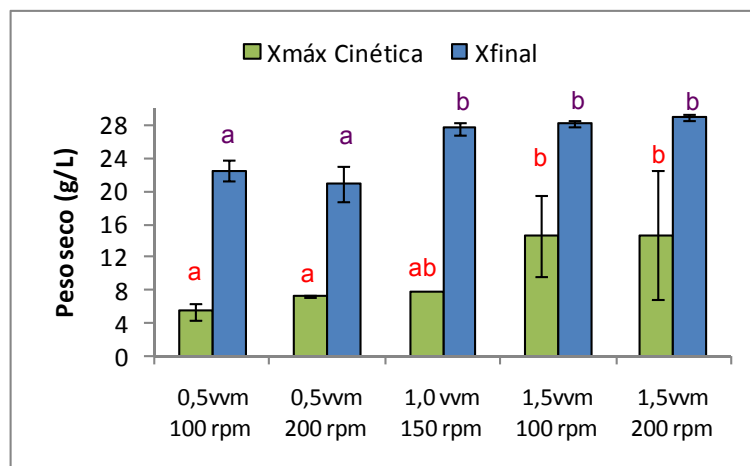
Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *H. coffeata* (a) 100 rpm, (b) 200 rpm, (c) 150 rpm.



Al aumentar la velocidad de agitación a 200 rpm y manteniendo la aireación en un valor de 0.5 vvm (gráfica 1.b), se observa que el crecimiento celular de *H. coffeata* tuvo un comportamiento similar a lo obtenido a 100 rpm y 0.5 vvm, lo que sugiere que la agitación no influyó notoriamente en el crecimiento del microorganismo. Con este aumento de la agitación, podría decirse que el cultivo experimentó una etapa de adaptación durante las primeras 24 horas de fermentación (día 1). Superada esta fase se inició el crecimiento exponencial que se extendió hasta el día 4. El punto correspondiente al día 5 presenta una disminución que puede ser resultado de la desaceleración de la tasa de reproducción del microorganismo o de las dificultades expuestas en la toma de muestra. El aumento de la concentración celular al día siguiente (día 6), sugiere que dicha reducción fue resultado de los inconvenientes en la toma de muestra, dado que en este día se alcanzó el valor máximo de peso seco correspondiente a 7.23 ± 0.17 g/L. Debido a los problemas en la toma de muestra no es posible determinar el comportamiento real del microorganismo para los siguientes días de fermentación. En cuanto a la cinética de crecimiento a 200 rpm y 1.5 vvm expuesta en la gráfica 1.b, no resulta clara una diferenciación de fases debido a la forma dispersa de la misma. Inicialmente se presentó una etapa de adaptación durante el primer día de fermentación. Posteriormente, el cultivo experimentó un crecimiento exponencial que se evidencia hasta el día 3. A partir de allí, el comportamiento fue irregular presentado altibajos hasta el día 7, punto en el cual alcanzó su máximo valor de biomasa correspondiente a 14.71 ± 7.79 g/L. La gráfica no permite determinar una fase estacionaria en el cultivo. Al evaluar el punto central correspondiente a 150 rpm y 1.0 vvm, el cultivo no presentó una fase de adaptación. Tal como muestra la gráfica 1.c, la multiplicación celular se mantuvo exponencialmente hasta el día 4 de la fermentación, donde posteriormente se inició un período de altibajos posiblemente por las razones ya expuestas de crecimiento y toma de muestra. El máximo valor de peso seco fue de 7.695 ± 0.085 g/L alcanzado el día 6 de la fermentación.

Al final de cada fermentación, la biomasa fue recolectada y filtrada para obtener la producción total de cada ensayo. Dado que el microorganismo crecía adherido a las paredes y partes del biorreactor, los valores máximos de biomasa reportados en las cinéticas difieren con la biomasa extraída al final del cultivo. Los datos de biomasa máxima correspondientes a las cinéticas de crecimiento y los de la producción total de masa celular obtenido el último día de fermentación (día 10), se presentan en gráfica 2.

Gráfica 2. Valores máximos de peso seco de las cinéticas de crecimiento y biomasa total de las diferentes combinaciones de aireación y agitación.



Las letras identifican grupos homogéneos y grupos no homogéneos

En la gráfica 2 es posible visualizar como con el aumento de la aireación la producción de biomasa fue superior, mostrando diferencias significativas independientemente de la velocidad del impulsor (Anexo G). Este comportamiento se asemeja al reportado por Xu y Yun (2004) con el hongo *Paecilomyces tenuipes*, en donde los cambios de la aireación en un rango de 0 a 3.5 vvm, mostraron que con su incremento se presentaba también un aumento de la biomasa celular, posiblemente por el efecto positivo que traía ello en la transferencia de oxígeno.

Dado que los resultados de biomasa final son más representativos que lo reportado en las cinéticas de crecimiento, la comparación con el trabajo realizado por Porras *et al.* (2009) con *H. coffeata* a nivel de matraces se realizó con estos valores. En el estudio mencionado, el crecimiento de este microorganismo bajo las mismas condiciones de pH inicial, temperatura y composición del medio de cultivo alcanzó un valor de 15.5 g/L el día 21, esto es, el último día de fermentación, presentando así una diferencia de 86 % con respecto a lo máximo obtenido a escala mayor: 28.90 g/L. Esto demuestra que con condiciones controladas de temperatura, agitación y aireación la producción de biomasa se ve favorecida.

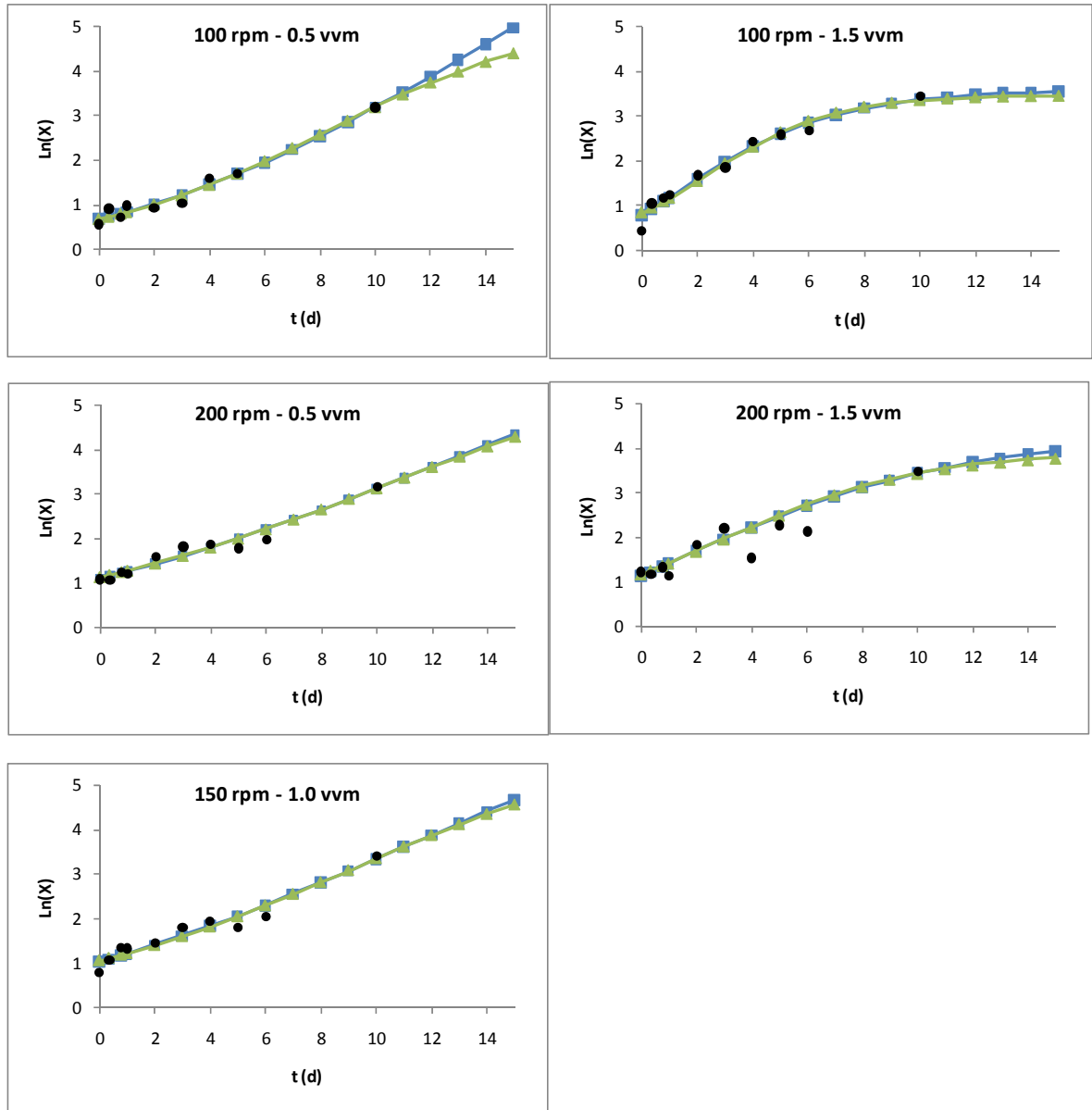
Los resultados obtenidos por Hincapie *et al.* (2005) con *G. lucidum* haciendo variaciones de pH a valores de 5, 5.5 y 6; y tasa de aireación a 1 vvm y 1.5 vvm, arrojaron que la mejor combinación para la obtención de biomasa era 5.5 y 1.5 vvm, respectivamente, alcanzando un valor de 8.373 g/L. De igual manera, Puerta y Zapata (2006) trabajaron con este microorganismo evaluando la influencia de la presencia y ausencia de luz, y encontraron que *G. lucidum* tiene mayor crecimiento en ausencia, con un valor máximo de 13.65 g/L bajo condiciones de 100 rpm y 1.5 vvm. A pesar de tratarse de un microorganismo diferente, estos resultados son comparables con *H. coffeata* por la similitud taxonómica entre ambos. Es evidente que la tasa de aireación 1.5 vvm favoreció el crecimiento celular tanto para los estudios mencionados como para el presente. Además, *H. coffeata* superó en valor la biomasa producida con *G. lucidum* 3.5 veces con respecto al primer trabajo mencionado y 2.1 veces con respecto al segundo. Otros trabajos con *G. lucidum* se han desarrollado por diferentes autores. Berovic *et al.* (2003) trabajaron en un fermentador de 10 L a 300 rpm y 1.0 vvm. La cantidad máxima de biomasa alcanzada fue de 9.6 g/L usando como fuente de carbono glucosa y un pH inicial de 5.0. Zhang *et al.* (2007) obtuvieron un valor de 15.56 g/L de concentración celular de *G. lucidum* al trabajar en un fermentador de 10 L con una aireación de 1.0 vvm y glucosa como fuente de carbono. Xu *et al.* (2008) sometieron un cultivo de *G. lucidum* a variaciones en la composición del medio

con una velocidad de 125 rpm y aireación de 0.6 vvm encontrando que el medio complejo favoreció la producción de masa celular con un valor de 21.53 g/L. Las diferencias que se presentan entre los diversos estudios obedecen a que el crecimiento varía de cepa a cepa, ubicación y condiciones del cultivo (Berovic *et al.*, 2003).

6.1.1. Modelos cinéticos para las curvas de crecimiento de *H. coffeata*

Con el fin de conocer el comportamiento del cultivo de *H. coffeata* durante los días que se dificultó la toma de muestra y predecir su crecimiento en un lapso de tiempo más prolongado al trabajado, se llevó a cabo la modelación de los datos por la ecuación Sigmoide y de Gompertz aplicando un análisis de regresión no lineal, usando para ello el paquete estadístico Sigmaplot 2.0. La selección de dichos modelos se realizó considerando que describen únicamente el número de microorganismos, sin incluir el consumo de sustrato (Zwietering *et al.*, 1990). Esto debido a que durante las fermentaciones no fue posible determinar el comportamiento real del azúcar residual, dado que en el crecimiento del microorganismo se presentó absorción del líquido disponible en el medio y por ello la concentración del sustrato se mantuvo en valores altos. Para la aplicación de los modelos se tomaron los valores reportados en las cinéticas hasta el día 6 y el valor máximo alcanzado el día 10 de la fermentación. En la gráfica 3 se presentan los modelos de las cinéticas para las condiciones de agitación y aireación evaluadas.

Gráfica 3. Ajuste de la cinética de crecimiento a los modelos de Gompertz y Sigmoide. (●) Experimental, (—■—) Gompertz, (—▲—) Sigmoide.



Los parámetros arrojados por los modelos, junto con el coeficiente de correlación y los errores estándar se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de los modelos de Gompertz y Sigmoide.

Condiciones	100 rpm 0.5vvm		100 rpm 1.5 vvm		200 rpm 0.5 vvm		200 rpm 1.5 vvm		150 rpm 1.0 vvm	
	Gompertz	Sigmoide	Gompertz	Sigmoide	Gompertz	Sigmoide	Gompertz	Sigmoide	Gompertz	Sigmoide
$\mu_{\text{máx}}(\text{d}^{-1})$	0.368	0.307	0.413	0.394	0.249	0.24	0.278	0.277	0.268	0.269
A	14.07	5.33	3.6	3.45	11.89	6.46	4.34	3.9	10.06	6.12
λ	1.47	-0.43	-1.86	-1.92	-2.47	-3.05	-4.12	-4.08	-2.46	-2.46
R²	0.972	0.972	0.972	0.964	0.959	0.958	0.954	0.951	0.953	0.950
Nº Iteraciones	8	6	8	9	12	8	8	8	13	9
Error estándar a	20.56	2.23	0.29	0.25	21.27	5.54	1.03	1.61	14.73	4.62
Error estándar b	17.82	3.88	0.33	0.44	28.46	11.08	1.48	1.38	19.27	8.65
Error estándar c	10.34	1.18	0.59	0.36	18.11	2.93	2.48	1.08	13.26	2.58

En la gráfica 3 es posible visualizar que ambos modelos se ajustan satisfactoriamente a los valores experimentales seleccionados en cada fermentación. Sin embargo, para algunos de estos no es posible establecer una fase estacionaria, dado que se observa un crecimiento exponencial marcado desde el momento cero que parece continuar aun después de 15 días de cultivo, especialmente para las condiciones de aireación de 0.5 vvm y 1.0 vvm. Para el ensayo a 100 rpm y 0.5 vvm, tanto el modelo de Gompertz como el Sigmoide muestran la predicción de una fase exponencial. Sin embargo, éste último presenta una desaceleración a partir del día 12 indicando lo que podría ser una aproximación a la etapa estacionaria. El experimento a 100 rpm y 1.5 vvm muestra claramente el inicio de un fase estacionaria aproximadamente a partir del día 10, cumpliéndose para ambos modelos aplicados. Así mismo, el ensayo a 200 rpm y 1.5 vvm presenta una tendencia que sugiere una desaceleración del crecimiento celular cerca del día 12. Sin embargo, para los ensayos a 200 rpm – 0.5 vvm y 150 rpm – 1.0 vvm, la predicción arroja un crecimiento exponencial que parece continuar después de 15 días de fermentación. Es importante considerar que los valores de las constantes a, b y c arrojados por los modelos para estos últimos ensayos presentaron errores estándar elevados con respecto a los arrojados para los experimentos donde se obtuvo una disminución de la tasa de reproducción exponencial del microorganismo (Tabla 4), indicando así que la proyección de los datos para estas fermentaciones no es muy acertada.

Aunque a partir de la gráfica 3 es posible pensar que tanto el modelo Sigmoide como el de Gompertz se ajustan satisfactoriamente a los datos experimentales, la determinación exacta de cual describe mejor su cinética de crecimiento se puede realizar teniendo en cuenta algunos valores arrojados por el programa estadístico, como son el número de iteraciones y los errores estándar de las constantes de los modelos (Tabla 4). Al considerar dichos valores, puede notarse que para la mayoría de los ensayos el modelo Sigmoide presentó el menor número de iteraciones y los errores estándar más bajos, excepto para la fermentación a 100

rpm y 1.5 vvm, donde el de Gompertz arrojó mejores resultados. Para el experimento a 200 rpm y 1.5 vvm, el número de iteraciones fue el mismo entre los modelos; sin embargo los errores estándar fueron inferiores para el Sigmoide, por lo cual puede tomarse este modelo como el mejor para describir la cinética de crecimiento de *H. coffeata* bajo estas condiciones. Al considerar el coeficiente de correlación R^2 , se puede visualizar que para todos los ensayos se encuentran valores prácticamente iguales en ambos modelos por lo cual dicho parámetro no se consideró para determinar el modelo más ajustado.

6.1.2. Determinación de parámetros cinéticos

La velocidad máxima de crecimiento fue determinada tanto por el modelo Sigmoide como por el de Gompertz (Tabla 4). Sin embargo, el valor de este parámetro cinético se tomó del modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales, tal como se expuso anteriormente. En la tabla 5 se muestran sus valores. Con respecto a la productividad de biomasa, esta fue calculada a partir de la producción total alcanzada en el último día de fermentación, esto es en el día 10. Finalmente, para la determinación del rendimiento observado de sustrato en biomasa se consideró la concentración inicial y final de biomasa, y el azúcar residual junto al volumen filtrado al término de cada experimento, para determinar así los gramos presentes al final del cultivo. Los valores de estas variables se presentan en la tabla 5.

Bajo las condiciones de 100 rpm – 1.5 vvm se obtuvo el valor más alto de velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) de *H. coffeata*, con un valor de 0.413 d^{-1} . Esto coincide con el hecho de que bajo estas condiciones el microorganismo alcanza la fase estacionaria en un lapso de tiempo más corto con respecto a las demás combinaciones de agitación y aireación, tal como se muestra en la modelación de la gráfica 3. Las velocidades máximas de crecimiento con valores

Tabla 5. Parámetros cinéticos de *H. coffeata* a las velocidades de agitación y aireación evaluadas.

Agitación (rpm)	Variable	Aireación (vvm)	
		0.5	1.5
100	$\mu_{\text{máx}}$ (d^{-1})	^(a) 0.307	^(b) 0.413
	P_x (g/L·d)	2.249	2.812
	ΔX (g)	41.58	52.08
	ΔS (g)	44.03	58.96
	Y'_{xs} (g/g)	0.944	0.883
200	$\mu_{\text{máx}}$ (d^{-1})	^(a) 0.240	^(a) 0.277
	P_x (g/L·d)	2.093	2.890
	ΔX (g)	38.51	53.08
	ΔS (g)	49.98	60.78
	Y'_{xs} (g/g)	0.771	0.873
150		1.0	
	$\mu_{\text{máx}}$ (d^{-1})	^(a) 0.269	
	P_x (g/L·d)	2.763	
	ΔX (g)	51.08	
	ΔS (g)	54.64	
	Y'_{xs} (g/g)	0.935	

^(a) Sigmoide, ^(b) Gompertz

más bajos se encontraron para las fermentaciones a 200 rpm – 0.5 vvm y 150 rpm – 1.0 vvm, ensayos para los cuales la modelación no mostró el inicio de una etapa estacionaria en el tiempo que fue evaluado. Porras *et al.* (2009), reporta una velocidad específica de crecimiento (μ_x) para *H. coffeata* de 0.46 d^{-1} bajo las mismas condiciones de composición de medio de cultivo, temperatura y pH inicial a nivel de matraces, indicando que la $\mu_{\text{máx}}$ alcanzada en esta investigación es

superior a lo reportado en la escala mayor. Posiblemente la configuración del equipo, las partes mecánicas y los cambios ambientales que sufre el microorganismo en el biorreactor ocasionaron una disminución en su velocidad de crecimiento. Al comparar con trabajos realizados con *G. lucidum* se encuentran notables diferencias para este parámetro. En el estudio realizado por Zhang y colaboradores (2007), se reporta una $\mu_{\text{máx}}$ de 1.77 d^{-1} en donde el cultivo alcanza la fase estacionaria en tan solo 3 días. Xu *et al.* (2008) determinaron que para una cepa de *G. lucidum* en medio complejo, la velocidad específica de crecimiento (μ_x) era de 1.35 d^{-1} alcanzando la fase estacionaria aproximadamente al cuarto día de fermentación. Estas diferencias sugieren que *H. coffeata* presenta un crecimiento más lento a las condiciones evaluadas respecto a lo que puede alcanzar *G. lucidum*.

La mayor productividad de biomasa alcanzada en el biorreactor corresponde a las condiciones de 200 rpm y 1.5 vvm con un valor de $2.89 \text{ g/L}\cdot\text{d}$. En la investigación realizada por Porras *et al.* (2009) se obtuvo una productividad de $0.738 \text{ g/L}\cdot\text{d}$, siendo 4 veces inferior de lo alcanzado en el presente trabajo. Estos resultados indican que bajo las condiciones y el volumen trabajado (2 L) es posible obtener mayor cantidad de biomasa en un período de tiempo más corto con respecto a la escala menor (matraces).

En general, el rendimiento observado de sustrato en biomasa (Y'_{xs}) fue similar en todas las condiciones de fermentación, el cual estuvo alrededor de $0.9 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{lactosa}}$. A nivel de matraces, Porras y colaboradores (2009) obtuvieron un rendimiento de $0.52 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{lactosa}}$, al trabajar bajo la misma concentración de sustrato (50g/L), estando así cerca del 40 % por debajo de lo alcanzado en el presente estudio. Es importante considerar que para el ensayo que se obtuvo la mayor cantidad de biomasa total, esto es 200 rpm – 1.5 vvm, el consumo de

sustrato fue mayor respecto a las demás condiciones, reflejado en el valor de ΔS mostrado en la tabla 5.

6.1.3. Análisis estadístico para la productividad de biomasa (P_x)

En el análisis estadístico se consideró como variable respuesta la productividad de biomasa en las diferentes combinaciones de agitación y aireación. Para comprobar la normalidad de los datos se realizó la prueba de Shapiro-Wilks con 95 % de confiabilidad. El valor P calculado fue de 0.3316, estando por encima del nivel de significancia (0.05). Así mismo, puede observarse que los puntos en la gráfica de probabilidad normal se encuentran alineados a 45 °, indicando de esta manera que la variable se distribuye normalmente (Anexo D). La comprobación de varianzas arrojó que no existen diferencias significativas entre las desviaciones típicas de los tratamientos dado que el menor de los P-valores es superior o igual a 0.05. Finalmente el supuesto de independencia se cumplió dado que en la gráfica de residuales no se sigue un patrón definido (Anexo D). Posteriormente, se procedió a realizar el análisis de varianza unifactorial para evaluar el efecto de la agitación y aireación en la variable dependiente. Para la agitación se encontró que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, arrojando un valor P de 0.7365. Caso contrario ocurrió con la aireación, donde el valor P fue de 0.0023, indicando que existe diferencia significativa entre los tratamientos para la productividad de biomasa (Anexo E). De igual manera, en la gráfica de medias es posible visualizar lo mencionado anteriormente (Anexo F). El análisis de rangos múltiples muestra que para el factor aireación algunos tratamientos son no homogéneos, por lo cual existe diferencia entre los mismos, refiriéndose a las condiciones 0.5 vvm - 1.0 vvm, y 0.5 vvm - 1.5 vvm. Sin embargo, los tratamientos a 1.0 vvm y 1.5 vvm se obtuvieron en grupos homogéneos, lo que quiere decir que no existe diferencia significativa entre estos (Anexo G). De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se determinó bajo que combinación se obtuvo la media

más alta en productividad de biomasa, considerando que el factor aireación tuvo impacto sobre la misma. De esta manera se concluyó que las condiciones que mejoran la productividad de biomasa son aireación 1.5 vvm y agitación 200 rpm.

6.2. PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS)

La producción de EPS a partir de una cepa de *H. coffeata* se cuantificó a través del método propuesto por Dubois *et al.* (1956), en donde las concentraciones están dadas en equivalentes de glucosa en g/L. Los datos de producción máxima de estos metabolitos a las diferentes velocidades de agitación y aireación evaluadas se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Producción máxima de EPS de *H. coffeata* a las velocidades de agitación y aireación evaluadas.

Agitación (rpm)	Aireación (vvm)	EPS _{máx} (g/L)	Tiempo (d)
100	0.5	--	--
100	1.5	1.053 ± 0.151	10
200	0.5	0.292 ± 0.292	9
200	1.5	0.234 ± 0.192	7
150	1.0	0.338 ± 0.288	8

Para las diferentes combinaciones de aireación y velocidad de agitación se puede observar que la producción de EPS estuvo favorecida por las condiciones de 100 rpm y 1.5 vvm alcanzando una producción de 1.053 g/L en el día 10. En el estudio realizado por Porras *et al.* (2009) con *H. coffeata* a nivel de matraces se reportó

una concentración de EPS de 6.9 g/L al trabajar bajo la misma concentración de lactosa, pH inicial y temperatura, logrando de esta manera una producción 6.5 veces más de lo alcanzado a la escala de biorreactor de 2 L. Este hecho puede deberse a múltiples factores, entre ellos se tiene que los productos asociados al crecimiento con frecuencia decrecen en el escalado de un proceso aerobio debido a que en un biorreactor se tiene un entorno muy dinámico con grandes heterogeneidades espaciales y temporales, las cuales pueden inducir múltiples respuestas fisiológicas en las células que a su vez consumen energía y recursos, generando así reducciones en el rendimiento de productos (Hewitt y Nienow, 2007). De igual manera, este comportamiento fue evidente en el trabajo realizado por Yang y Liao (1998a) en donde la formación de exopolisacáridos a partir de una cepa de *G. lucidum* disminuyó al pasar del matraz (1.71 g/L) a biorreactor (1.3 g/L), atribuyendo este hecho al esfuerzo cortante que se experimenta en este último. En cuanto a la producción de EPS en el fermentador de 2 L equipado con una turbina tipo Rushton, dichos autores encontraron que una agitación de 400 rpm favorecía la secreción de polisacáridos al medio, y que una aireación de 1.0 vvm tenía un efecto favorable en la misma.

Investigaciones realizadas por Hincapie *et al.* (2005) y Puerta y Zapata (2006) con *G. lucidum*, presentan valores notablemente superiores a lo alcanzado por *H. coffeata* al hacer uso del mismo equipo utilizado para estos estudios. Hincapie y colaboradores (2005) reportaron una producción de 5.34 g/L bajo una aireación de 1.5 vvm y agitación de 100 rpm, siendo así 5 veces superior a lo obtenido con *H. coffeata*. Puerta y Zapata (2006) encontraron que la máxima concentración de EPS fue de 3.88 g/L, esto en ausencia de luz y condiciones de 100 rpm y 1.5 vvm, presentando de esta manera una producción 3.7 veces por encima de lo alcanzado en el presente trabajo. Así mismo, en el estudio de Zhang y colaboradores (2007) se reportó un valor superior de EPS alcanzando un valor máximo de 3.02 g/L. Aunque en las investigaciones mencionadas la aireación de 1.5 vvm favoreció la producción de polisacáridos, se ha encontrado que en el

trabajo de Babitskaya *et al.* (2005) el comportamiento es inverso a éste, dado que la concentración de estos metabolitos fue de 10 g/L y 9.2 g/L para una aireación de 0.5 vvm y 1.5 vvm respectivamente, concluyendo así que una menor tasa de aireación incrementa la concentración del producto. Posiblemente el hecho de que *H. coffeata* sea un microorganismo estrictamente aerobio requiera mayores flujos de oxígeno para producir metabolitos de interés, de ahí que las condiciones que lo favorecieron se encuentre a la mayor tasa de aireación (1.5 vvm).

Es evidente que la concentración de exopolisacáridos reportada con *H. coffeata* se encuentra en valores muy bajos respecto a los estudios mencionados con *G. lucidum* a nivel de biorreactor. Diversas pueden ser las causas que afectaron la obtención de estos metabolitos, entre ellas las condiciones de trabajo. La eficacia de los procesos biotecnológicos en el cultivo de hongos está determinada por la fabricación del medio de cultivo, calidad de la fuente de carbono y nitrógeno, y parámetros ambientales como temperatura, pH y oxígeno, factores que influyen tanto en el crecimiento como en la generación de metabolitos, teniendo efectos sobre la morfología, la estructura de las células, la actividad fisiológica, la tasa de crecimiento y la capacidad de asimilar una u otra fuente de nutrientes (Babitskaya *et al.*, 2005). La concentración de sustrato resulta clave para la obtención del producto de interés. Estudios realizados con *G. lucidum* muestran que las concentraciones que favorecen el crecimiento micelial pueden no hacerlo para la formación de bioproductos. Xu *et al.* (2008), reportaron que a una concentración de glucosa de 40 g/L, la biomasa alcanzó un máximo valor de 18.95 g/L, mientras que la producción de metabolitos se mantuvo en valores bajos, alrededor de 0.30 g/L. Esto sugirió que la represión catabólica que ocurre a concentraciones elevadas de glucosa u otros azúcares pudo tener un efecto negativo para la obtención de los productos de interés. La concentración de la fuente de carbono adicionada al cultivo de *H. coffeata* fue de 50 g/L, lo que podría sugerir una revisión de dicho valor para determinar si realmente favorece la producción de EPS a partir de este microorganismo.

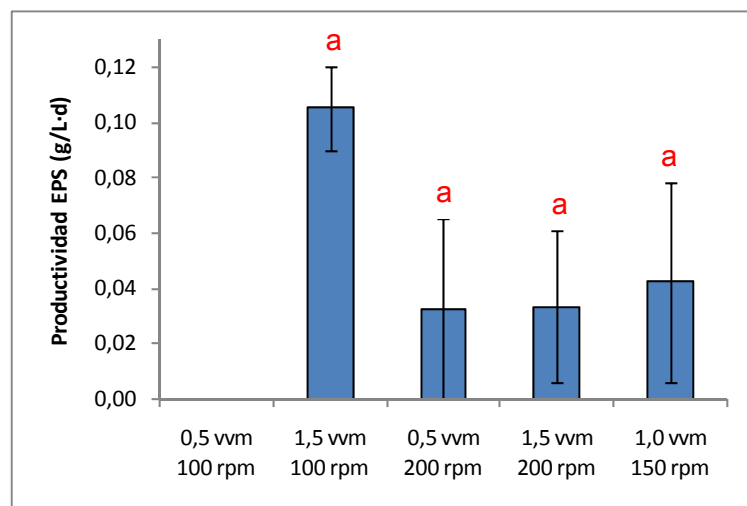
En los trabajos con *G. lucidum* son diversas las condiciones óptimas reportadas para su cultivo en medio sumergido. Esto ha llevado a que algunos investigadores se oriente al estudio de las fermentaciones de dos etapas, en donde una de ellas se centra en las condiciones óptimas para el crecimiento micelial y la otra en la obtención de metabolitos de interés. Kim *et al.* (2006) por ejemplo, encontraron que el pH que favorecía la producción de biomasa era inferior que para la formación de EPS, con valores de 4.0 y 5.0 respectivamente, lo que los llevó a aplicar un proceso en dos etapas en el que el pH fue inicialmente adecuado para acelerar el período de producción de biomasa, seguida de una fase a diferentes pH que se adaptaba a la síntesis óptima de EPS. Esta metodología puede ser una alternativa que permita obtener con *H. coffeata* los mejores resultados en la formación de exopolisacáridos. Otra posibilidad de favorecer la producción de polisacáridos sería lo propuesto por Wagner *et al.* (2004), donde se investigó los efectos de la glucosa entre la morfología y la fisiología. Allí se trabajaron tres cultivos, en el primero se adicionó glucosa a 35 g/L desde el día cero, en el segundo el cultivo se mantuvo sin glucosa y en el tercero se añadió esta fuente de carbono en el día 17. La adición de glucosa en el tercer cultivo estimuló la producción de EPS estando 1.6 veces por encima de la producida en el primer cultivo. Estos resultados fueron asociados a los eventos ocurridos morfológicamente en el pellet. Es así como la comprensión de los cambios morfológicos de las células en un cultivo puede ser una estrategia para mejorar la obtención de los metabolitos de interés, y en este caso específico para la producción de EPS a partir de *H. coffeata*.

Otra de las causas que puede estar asociada a la producción baja de EPS por parte de *H. coffeata* está relacionada con el crecimiento que se presentó durante el cultivo. Según Wagner *et al.* (2004), la adhesión que presenta la biomasa en el equipo puede ser causa de la acumulación de EPS. Durante la fermentación la biomasa es cubierta por una sustancia gelatinosa que reacciona fuertemente con

el método del fenol-ácido sulfúrico indicando la presencia de exopolisacáridos. Si dicha sustancia permanece sobre el micelio del cultivo, el líquido que es extraído en cada muestra para la cuantificación de estos metabolitos puede estar deficiente en el contenido de los mismos, arrojando resultados que no corresponden a su concentración real. Yang y Liau (1998) expusieron un caso similar con *G. lucidum* en donde se encontró que los polisacáridos recién formados se adherían al micelio, disminuyendo de esta manera la secreción de estos al medio de cultivo.

Las productividades de EPS a partir de *H. coffeata* a las diferentes velocidades de agitación y aireación se muestran en la gráfica 4.

Gráfica 4. Productividad de EPS a las velocidades de agitación y aireación evaluadas.



Las letras identifican grupos homogéneos

La mayor productividad para *H. coffeata* se presentó bajo las mismas condiciones en las que se obtuvo la máxima producción de EPS, esto es a 1.5 vvm y 100 rpm, con un valor de 0.105 g/L·d. A nivel de matraces, Porras *et al.* (2009) reportaron una productividad máxima de 0.41 g/L·d, 3.9 veces mayor a lo alcanzado en la

presente investigación. De igual manera se obtuvieron grandes diferencias con las investigaciones de Hincapie *et al.* (2005) y Puerta y Zapata (2006) con *G. lucidum*, donde las productividades fueron 0.67 g/L·d y 0.485 g/L·d respectivamente, esto es 6.3 y 4.6 veces mayor a lo reportado.

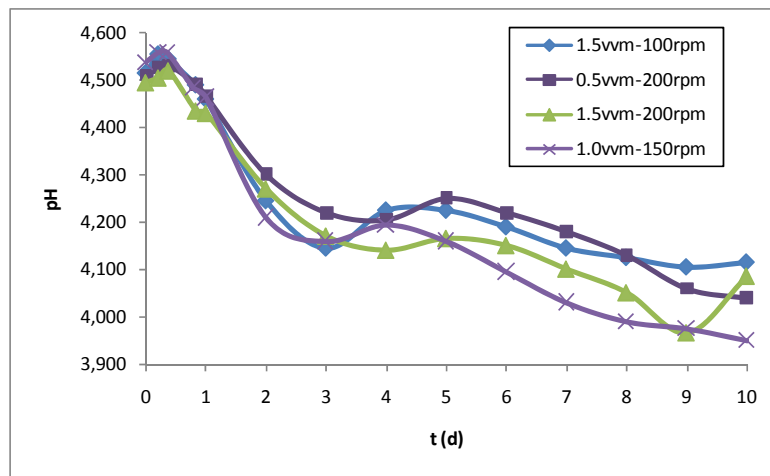
6.2.1. Análisis estadístico para la productividad de EPS (P_{exo})

En el análisis estadístico se consideró como variable respuesta la productividad de exopolisacáridos en las diferentes combinaciones de agitación y aireación. Para comprobar la normalidad de los datos se realizó la prueba de Shapiro-Wilks con 95 % de confiabilidad. El valor P calculado fue de 0.0514, estando por encima del nivel de significancia (0.05). Así mismo, puede observarse que los puntos en la gráfica de probabilidad normal se encuentran alineados a 45 °, indicando de esta manera que la variable se distribuye normalmente (Anexo D). La comprobación de varianzas arrojó que no existen diferencias significativas entre las desviaciones típicas de los tratamientos dado que el menor de los P-valores es superior o igual a 0.05. Finalmente el supuesto de independencia se cumplió dado que en la gráfica de residuales no se sigue un patrón definido (Anexo D). Posteriormente se procedió a realizar el análisis de varianza unifactorial para evaluar el efecto de la agitación y aireación en la variable dependiente. Para la agitación se encontró que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, arrojando un valor P de 0.8629. De igual manera ocurrió con la aireación, donde el valor P fue de 0.2806 (Anexo E). Adicionalmente, en la gráfica de medias es posible visualizar lo mencionado anteriormente (Anexo F). El análisis de rangos múltiples muestra que tanto para el factor agitación y aireación los tratamientos son homogéneos, por lo cual no existe diferencia entre los mismos (Anexo G). De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se determinó que para la producción de EPS puede elegirse cualquiera de las combinaciones estudiadas.

6.3. PERFIL DE pH

Para el cultivo de *H. coffeata* se utilizó un pH inicial de 4.5. Sin embargo, durante la fermentación se presentaron cambios en este parámetro. En la gráfica 5 se muestra el perfil de pH durante el cultivo del microorganismo.

Gráfica 5. Perfil de pH para el cultivo de *H. coffeata* a las velocidades de agitación y aireación evaluadas.



En la gráfica 5, se puede visualizar que el pH presentó un comportamiento similar en todas las condiciones de operación trabajadas, teniendo una tendencia a disminuir a partir del primer día de fermentación. Según Avtonomova *et al.* (2006) la acidificación observada del medio de cultivo en hongos descomponedores de la madera, como por ejemplo *G. lucidum*, puede ser debido a la acumulación de ácidos orgánicos, incluyendo el ácido oxálico. Ensayos realizados por estos autores, demostraron que los valores finales de pH inferiores a 4.0 pueden ser estresantes para el cultivo sumergido de *G. lucidum*. El efecto perjudicial de los bajos valores de pH pueden ser mitigados ya sea aumentando el pH inicial del medio, mediante la adición de una sal de buffer, o reduciendo la concentración de

la fuente de carbono. Cada uno de estos métodos tiene sus propias desventajas: altos valores de pH inicial resulta desfavorable para el crecimiento de hongos en las primeras etapas, el aumento de la concentración de fosfatos (como sales buffer) o la disminución de la concentración de sustrato resultan perjudiciales en el rendimiento del micelio (Avtonomova *et al.*, 2006).

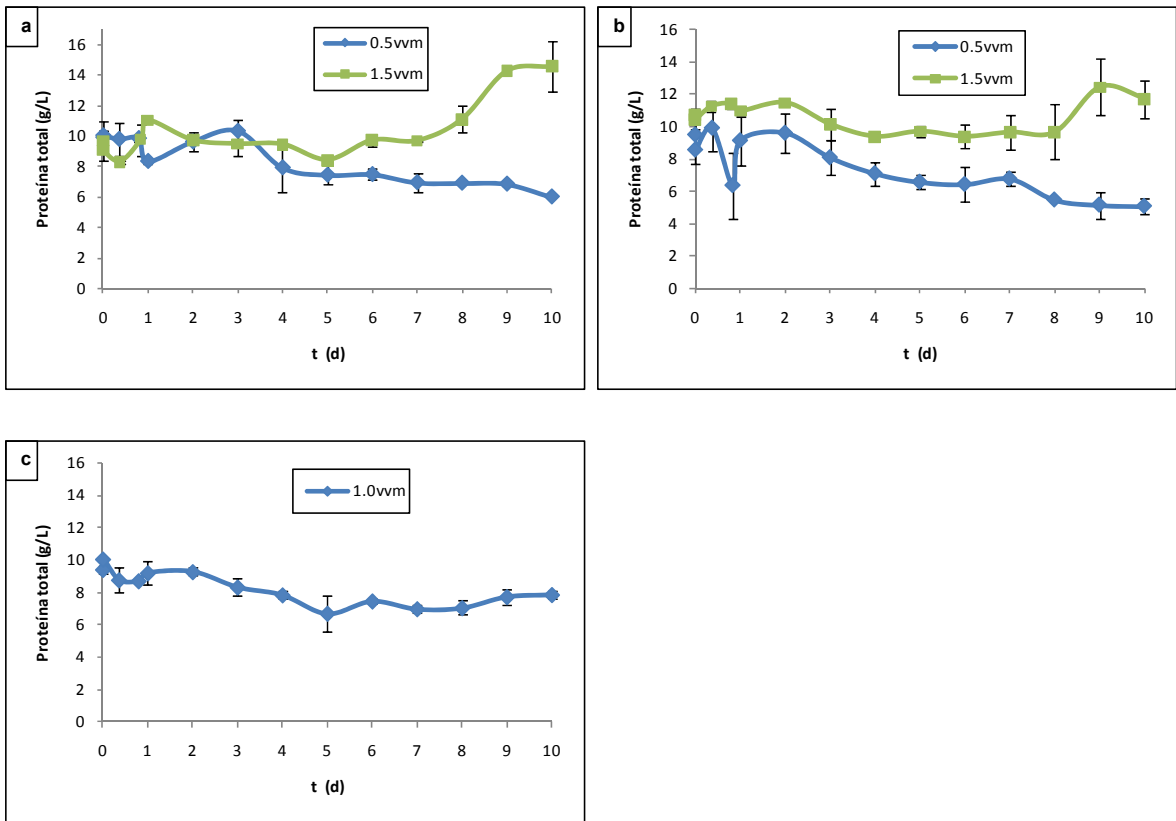
Lee y colaboradores (1999) evaluaron el efecto del pH en la morfología y producción de metabolitos de *G. lucidum*. En su trabajo reportaron que al someter el cultivo a un pH inicial de 6.0, éste se redujo a 2.6 al no ser controlado, visualizando un cambio en la morfología del microorganismo al pasar de pellet a forma filamentosa en las últimas etapas del cultivo. De esta manera se contempló la posibilidad de que el pH influye en la morfología, que a su vez afecta la producción de metabolitos. El hecho de no tener un control del pH en el cultivo realizado con *H. coffeata*, pudo afectar la secreción de los EPS al medio de cultivo.

6.4. CINÉTICA DE PROTEÍNA TOTAL

Con el fin de conocer el comportamiento del contenido de proteína total en el cultivo, se realizó su cinética cuantificando la concentración extracelular por el método de Lowry (1951).

Bajo las condiciones de 100 rpm y 0.5 vvm (gráfica 6.a) la proteína en el medio se mantuvo constante durante el primer día de fermentación. Posteriormente, presentó un aumento hasta el día 3, lo que sugiere que la velocidad de generación de proteína fue mayor que la velocidad de consumo de la misma durante este lapso de tiempo. La máxima concentración de proteína extracelular se presentó el día 3 con un valor de 10.352 g/L, a partir de allí se inició un descenso que se mantuvo hasta el último día de fermentación. Este comportamiento indica que la

Gráfica 6. Cinética de proteína total. (a) 100 rpm, (b) 200 rpm, (c) 150 rpm.



velocidad de generación fue menor que la de consumo alcanzando un valor mínimo de 6.011 g/L en el día 10. A diferencia del caso anterior, la cinética de proteína bajo la misma velocidad de agitación y una aireación de 1.5 vvm (gráfico 6.a), presentó una tendencia de aumento a partir del día 5 arrojando un valor máximo de 14.594 g/L en el día 10. Cuando la velocidad de agitación se incrementó a 200 rpm manteniendo una aireación de 0.5 vvm (gráfica 6.b) pudo verse una tendencia similar al obtenido por 100 rpm y 0.5 vvm. El valor máximo de concentración de proteína sucedió al inicio de la fermentación siendo de 9.932 g/L a las 9 h, mientras que la concentración mínima se presentó en el día 10 con 5.073 g/L. En cuanto a la cinética de proteína total a 200 rpm y 1.5 vvm (gráfica 6.b) se visualizó una tendencia de aumento al igual que el obtenido a 100 rpm y

1.5 vvm, la máxima concentración se alcanzó en las últimas etapas de la fermentación con 12.437 g/L.

Comparando los anteriores resultados se puede decir que la aireación parecer ser un factor influyente en la producción de proteínas extracelulares de *H. coffeata*, a diferencia de lo que podría ser con la velocidad de agitación. Las condiciones que favorecieron la producción de las mismas fueron 100 rpm y 1.5 vvm, esto es 1.2 veces mayor que las reportadas a 200 rpm y 1.5 vvm. Es así como bajo las primeras condiciones mencionadas se obtiene que la velocidad de formación de proteínas es mayor a la velocidad de consumo.

Evaluando el punto central de los ensayos (100 rpm y 1.0 vvm) (gráfica 6.c), se observó una disminución hasta el día 5 con una concentración mínima de 6.72 g/L, a partir de allí se presentó un leve incremento continuando con valores casi constantes hasta el final de la fermentación. El valor máximo de proteína se mantuvo a las 5 h con un valor de 10.051 g/L. Estas condiciones intermedias no favorecieron la producción de proteínas comparado con las demás combinaciones.

6.5. ESCALAMIENTO DEL PROCESO

En los procesos de fermentación aerobios es necesario proporcionar al microorganismo la cantidad de oxígeno suficiente para que éste satisfaga sus requerimientos metabólicos. La utilización de los nutrientes, principalmente la oxidación de la fuente de carbono y su posterior transformación en biomasa, productos y dióxido de carbono, sólo es posible con el suficiente aporte de oxígeno desde la fase gaseosa (Alcón, 1999). De esta manera, para la obtención de elevados rendimientos en procesos de alta densidad celular es necesario el control de las interacciones entre el comportamiento microbiano y los fenómenos de transferencia, debido a que la transferencia de gas se convierte eventualmente

en un factor limitante. Este cuello de botella resulta significativo en reactores a gran escala donde la dispersión del gas es heterogénea y el suministro de energía es limitado. Esto hace que el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, K_La , sea uno de los parámetros más relevantes para cuantificar la transferencia de masa gas-líquido en procesos aerobios (Fyferling *et al.*, 2008).

La transferencia de oxígeno en un biorreactor tipo tanque agitado es función de numerosas variables, tales como las propiedades físicas del líquido (viscosidad, tensión superficial, densidad), la geometría del tanque y del agitador, el tipo de difusor empleado y las condiciones de operación. Este elevado número de variables hace que existan múltiples correlaciones empíricas para predecir el valor de K_La (Alcón, 1999). De las correlaciones expuestas en la literatura, la propuesta por Van't Riet (1979) puede ser aplicada a soluciones electrolíticas no coalescentes, siendo apropiada para el medio de cultivo empleado en esta investigación. La correlación para determinar el valor de K_La es (Asenjo, 1995):

$$k_La = 0.026 \left(\frac{P}{V} \right)^{0.4} v_s^{0.5}$$

Donde: P: Potencia (W)
V: Volumen de trabajo (m³)
v_s: Velocidad superficial del aire (m/s)

Para el escalamiento del proceso, se tomaron las condiciones bajo las cuales se obtuvo la mayor cantidad de biomasa, ya que *H. coffeata* puede llegar a ser un microorganismo potencial en la industria de alimentos. En cuanto a la biomasa de hongos se ha reportado que estos aportan un gran valor nutritivo y son una excelente fuente de proteínas, bajos en grasa y libres de colesterol. En los últimos años el consumo de hongos ha aumentado, especialmente en la dieta de la comunidad vegetariana, preparando los alimentos a partir del cuerpo fructífero (Ghorai *et al.*, 2009). Sin embargo, la alternativa de los procesos fermentativos resulta ser muy eficiente, por el bajo tiempo que demanda comparado con el

cultivo en campo. Es posible que a partir de *H. coffeata* se puedan preparar alimentos funcionales, tal como ha sido el caso con *G. lucidum*.

Debido a que algunas propiedades reológicas del medio de cultivo como la viscosidad varían a lo largo de la fermentación, el escalado se llevó a cabo teniendo en cuenta las condiciones iniciales del proceso, es decir, tomando el K_{La} inicial hallado experimentalmente a través del método dinámico (Anexo C). Para ello se utilizó un medio de cultivo estéril con el fin de garantizar una mejor reproducción de los resultados.

6.5.1. Determinación de los parámetros de escalado

Los datos requeridos para el escalado como parámetros de operación, dimensiones del biorreactor a escala de laboratorio y propiedades del medio de cultivo se presentan en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Datos del biorreactor a escala de laboratorio.

Parámetro	Valor
D (m)	0.124
D_i (m)	0.045
n_i (rpm)	200
n_i (rps)	3.33
Q (m^3/s)	5×10^{-5}
V (m^3)	2×10^{-3}
v_s (m/s)	4.42×10^{-3}
K_{La} (s^{-1})	0.0016

Donde: D: Diámetro interno del biorreactor
D_i: Diámetro del impulsor
n_i: Velocidad de agitación
Q: Caudal de aire
V: Volumen de trabajo en el biorreactor
v_s: Velocidad superficial del aire
K_La: Coeficiente volumétrico de transferencia de masa

Tabla 8. Propiedades del medio de cultivo.

Propiedad	Valor
Densidad (g/cm ³)	1.045
Viscosidad (cP)	1.084

Las ecuaciones referentes a los cálculos de escalado se presentan en la tabla 9, con sus respectivos resultados.

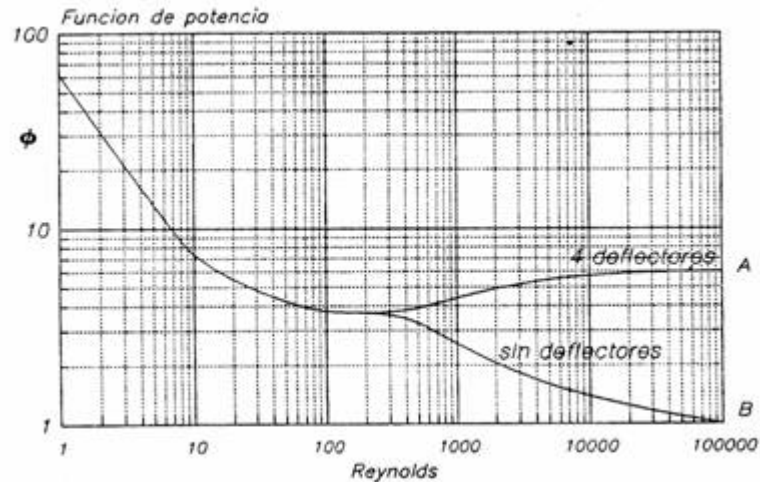
Tabla 9. Ecuaciones para el escalado y resultados.

Parámetro	Ecuación	Resultado
Caudal de aire en el biorreactor de 2 L	$Q = Aireación \times V$	$5 \times 10^{-5} m^3 / s$
Número de Reynolds (2 L)	$Re = \frac{nD_i^2 \rho}{\mu}$	6500.64
Potencia entregada al fluido sin gasear ⁽¹⁾ (2 L)	$P = \phi \cdot \rho \cdot n^3 D_i^5$	0.0414W
Potencia total sin aireación ⁽²⁾ (2 L)	$P_T = P\sqrt{2}$	0.0586W
Número de aireación (2 L)	$A_E = \frac{Q}{nD_i^3}$	0.165
Relación de Potencia entregada al fluido sin gasear y gaseado (2 L)	$\frac{P_g}{P} = 0.35 + \frac{0.65}{1 + (16.67)A_E}$	0.524
Potencia entregada al fluido gaseado (2 L)	$P_g = 0.524P$	0.031W
Velocidad superficial del aire (2 L)	$v_s = \frac{Q}{A}$	$4.42 \times 10^{-3} m / s$
Relación de volúmenes entre el biorreactor de laboratorio y escala piloto	$\frac{V_G}{V_P}$	25
Relación de diámetros	$\frac{D_{iG}}{D_{iP}} = \left(\frac{V_G}{V_P}\right)^{1/3}$	2.92
Velocidad de agitación en el biorreactor de 50 L	$n_G = n_P \times \left(\frac{D_{iG}}{D_{iP}}\right)^{-1.3/1.7}$	88rpm
Caudal de aire en el biorreactor de 50 L	$Q_G = Q_P \times \left(\frac{n_G}{n_P}\right) \left(\frac{D_{iG}^3}{D_{iP}^3}\right)$	$5.5 \times 10^{-4} m^3 / s$
Aireación en el biorreactor de 50 L	$\left(\frac{Q}{V}\right)_G = \frac{n_G}{n_P} \times \left(\frac{Q}{V}\right)_P$	0.66vvm
Potencia por unidad de volumen (50 L)	$\left(\frac{P}{V}\right)_G = \left(\frac{n_G}{n_P}\right)^3 \left(\frac{D_{iG}}{D_{iP}}\right)^2 \left(\frac{P}{V}\right)_P$	21.36W / m ³
Potencia en el biorreactor de 50 L	$P = P_T \left(\frac{n_G}{n_P}\right)^3 \left(\frac{D_{iG}}{D_{iP}}\right)^5$	1.068W

⁽¹⁾ Con la figura 2 es posible calcular la función de potencia, considerando un reactor con 4 placas deflectoras.

⁽²⁾ Potencia suministrada por los dos impulsores.

Figura 2. Función de potencia vs. Reynolds para un impulsor de turbina de paletas planas. McCabe *et al.* (2002).



Las dimensiones del biorreactor de 50 L calculadas mediante el proceso de escalamiento, se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Datos del biorreactor a escala piloto.

Parámetro	Valor
D (m)	0.35
D _i (m)	0.13
n _i (rps)	1.47
Q (m ³ /s)	5.5x10 ⁻⁴
V (m ³)	50x10 ⁻³
v _s (m/s)	5.69x10 ⁻³

Los datos de diseño del biorreactor a escala piloto obtenidas por el proceso de escalamiento son comparables con los datos reportados por algunos autores en la

literatura. Junker (2004) por ejemplo, realizó el escalamiento a un biorreactor de 30 L para el cual obtuvo un diámetro interno de 0.306 m, siendo 14 % inferior a lo hallado en este trabajo para un volumen de 50 L, lo que resulta coherente por la diferencia de volúmenes. De igual manera, otros parámetros como diámetro del impulsor, caudal de aire y velocidad superficial mantuvieron valores apropiados para la escala de 30 L comparado con la de 50 L. Los datos reportados por el autor corresponden a $D_i = 0.102$ m, $Q = 7.5 \times 10^{-4}$ m³/s y $v_s = 6.6 \times 10^{-3}$ m/s. Por otro lado, Puerta y Zapata (2006) reportaron las especificaciones de diseño para un biorreactor de 40 L con un diámetro interno de 0.332 m, diámetro del impulsor de 0.124 m, caudal de aire de 6.4×10^{-4} m³/s y velocidad superficial de 7.4×10^{-3} m/s, siendo comparables con los obtenidos a un volumen de 50 L.

En la tabla 11 se presentan algunos de los parámetros de operación del biorreactor de 2 L y de 50 L obtenidos por el proceso de escalamiento, para lo cual se consideró el $K_L a$ constante durante el desarrollo de los cálculos.

Tabla 11. Resultados del proceso de escalamiento.

Parámetro	2 L	50 L
$K_L a$ (s ⁻¹)	0.0067	0.0067
P/V (kW/m ³)	0.029	0.021
$N_i D_i$ (rpm*s)	0.15	0.20
P (W)	0.0586	1.0679
n_i (rpm)	200	88
Re_i	6500.64	24480

La determinación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($K_L a$) por el método dinámico arrojó un valor de 0.0016 s^{-1} estando 4 veces

por debajo de lo obtenido con la correlación de Van't Riet (1979): 0.0067 s^{-1} . Esta diferencia puede deberse a que la precisión de las correlaciones aplicadas a los sistemas biológicos es generalmente pobre (Doran, 1999). Su valor tan bajo se debe principalmente a que la transferencia de masa está fuertemente afectada por diversos factores durante el cultivo; por ejemplo la solubilidad del oxígeno disminuye con la presencia de compuestos en medio acuoso como es el sustrato en un medio de cultivo, reduciendo de esta manera la transferencia de oxígeno al sistema. Así mismo, la presencia de células interfiere en la transferencia, debido a que éstas pueden causar rompimiento y coalescencia de burbujas reduciendo el área interfacial (Doran, 1999). Adicionalmente, la geometría del tanque, el tipo de dispersor, tasa de aireación, el tipo de agitador y número de estos, así como su velocidad, tienen una influencia marcada en el valor del coeficiente de transferencia de oxígeno (García y Gómez, 2008). La adición de antiespumante al medio de cultivo tiene también un efecto en el valor de $K_L a$. Esta sustancia es causante de una disminución en la tensión superficial del líquido, lo cual puede aumentar el área interfacial al reducir el diámetro de la burbuja pero al mismo tiempo puede disminuir la movilidad de la interface gas-líquido reduciendo así K_L . Este último resulta ser mayor, generando un impacto neto negativo en el valor de $K_L a$ (Doran, 1999). El bajo valor del coeficiente de transferencia de masa experimental hace pensar que el cultivo de *H. coffeata* pudo verse limitado por el suministro de oxígeno. Sin embargo, la cantidad de biomasa obtenida al final de cultivo superó las concentraciones que han sido reportadas con *G. lucidum*. Tang y Zhong (2003) por ejemplo, reportaron que un $K_L a$ de 0.022 s^{-1} favoreció la producción de biomasa de *G. lucidum*, alcanzando un valor máximo de 15.62 g/L . Así mismo, notaron que a este coeficiente de transferencia de masa se obtuvo la mayor cantidad de EPS. Posiblemente para la producción de polisacáridos a partir de *H. coffeata* sea necesario mejorar la transferencia de oxígeno en el cultivo aumentando el valor de $K_L a$, con miras a obtener mejores rendimientos en la síntesis de estos metabolitos.

De la tabla 11 se puede deducir que utilizando K_{La} como criterio de escalamiento la potencia por unidad de volumen (P/V) disminuiría 1.37 veces al pasar de una escala de 2 L a 50 L, la potencia (P) aumentaría 18 veces y la velocidad de agitación (n_i) disminuiría 2.3 veces como resultado del aumento del volumen del fermentador. El valor obtenido para el número de Reynolds asegura que el sistema se encontraría en régimen turbulento, lo cual es una de las condiciones recomendadas para que exista un buen mezclado (Hincapie *et al.*, 2005). Además de las comparaciones mencionadas anteriormente, es importante hacer una revisión de los valores de algunos de los parámetros obtenidos para el biorreactor de 50 L. En promedio, el consumo de potencia por unidad de volumen para equipos con capacidad superior a 300 m³ es de 1 – 3 kW/m³ (Junker, 2004), lo que sugiere que para biorreactores a escala piloto se tendría un promedio de 0.1 – 0.3 kW/m³. El resultado obtenido para este parámetro a una escala de 50 L fue notablemente inferior a lo supuesto para una escala piloto, sugiriendo que un cultivo bajo estas condiciones de operación podría presentar deficiencias en el mezclado, y con ello una baja producción del producto de interés. Se recomienda utilizar otros criterios de escalamiento para conocer el comportamiento de estas variables al aumentar el volumen del biorreactor.

Mediante la aplicación del método dinámico para la determinación de K_{La} , fue posible calcular la velocidad de consumo de oxígeno (Q_{O_2}) por parte de *H. coffeata* arrojando un valor de 0.0024 g/L·h. Según Dutta (2008), el requerimiento de oxígeno por parte de las células está alrededor de 1 g/L·h, aunque puede variar significativamente de acuerdo al tipo de microorganismo. Posiblemente por tratarse de un organismo de crecimiento lento como es el caso de los hongos, el consumo de oxígeno de *H. coffeata* puede ser igualmente a una tasa más baja con respecto a lo que puede encontrarse con otros microorganismos. Así mismo, la velocidad específica de consumo de oxígeno se encontró en un valor bajo, esto

es 0.011 h^{-1} , lo que podría relacionarse con la fase de adaptación que posiblemente experimentaba el microorganismo al momento de realizar esta medición.

7. CONCLUSIONES

La producción de biomasa a partir de una cepa de *H. coffeata* en cultivo sumergido con variaciones en la velocidad de agitación y tasa de aireación en un biorreactor de 2 L, se favoreció por el incremento de esta última, presentándose diferencias significativas entre los niveles 0.5 vvm - 1.0 vvm y 0.5 vvm - 1.5 vvm. Caso contrario ocurrió con la velocidad del impulsor, dado que no se presentaron diferencias significativas sobre el crecimiento celular entre las variaciones realizadas, esto es 100 rpm, 150 rpm y 200 rpm. La combinación de aireación y agitación que arrojó el máximo valor de biomasa celular de *H. coffeata* corresponde a 1.5 vvm y 200 rpm, respectivamente; con una producción total de 28.90 ± 0.42 g/L alcanzada el último día de fermentación. Así mismo, la máxima productividad de biomasa se obtuvo bajo estas condiciones con un valor de 2.89 ± 0.042 g/L·d.

La cinética de crecimiento de *H. coffeata* bajo las condiciones trabajadas fue ajustada satisfactoriamente al modelo cinético Sigmoide para todos los ensayos, excepto para la fermentación a 1.5 vvm y 100 rpm, para la cual la ecuación de Gompertz obtuvo un mejor ajuste por presentar un número de iteraciones y error estándar más bajos respecto al sigmoide. Bajo dichas condiciones se obtuvo la máxima velocidad de crecimiento con un valor de 0.413 d⁻¹, alcanzando según el modelo la fase estacionaria aproximadamente el día 10 de fermentación.

La variación de la velocidad de agitación y tasa de aireación no presentó diferencias significativas para la obtención de exopolisacáridos (EPS) a partir de una cepa de *H. coffeata* en un medio de cultivo con lactosa a una concentración de 50 g/L. La producción máxima fue de 1.053 ± 0.151 g/L, a una velocidad de 100

rpm y aireación de 1.5 vvm. Igualmente bajo estas condiciones se obtuvo la máxima productividad con un valor de 0.105 g/L·d.

El escalado del bioproceso de un volumen de 2 L a 50 L a partir de condiciones predeterminadas que favorecieron la producción de biomasa (200 rpm – 1.5 vvm) y utilizando como criterio el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_La), arrojó que la potencia por unidad de volumen (P/V) disminuiría 1.37 veces, la potencia (P) aumentaría 18 veces y la velocidad de agitación (n_i) disminuiría 2.3 veces como resultado del aumento del volumen del fermentador. Además, por el valor arrojado para el número de Reynolds se pudo determinar que el sistema se encontraría en régimen turbulento. Las dimensiones del equipo a 50 L sugieren un diámetro total de 0.35 m y diámetro del impulsor de 0.13 m, los cuales resultan coherentes de acuerdo a su tamaño al ser comparado con reportes en la literatura.

El aumento de escala de un cultivo de *H. coffeata* desde el nivel de matraces a un biorreactor de volumen efectivo de 2 L, favoreció la producción de biomasa presentando un incremento del 86 % con respecto a la escala menor. Sin embargo, la síntesis de exopolisacáridos (EPS) no superó la producción alcanzada en matraces, estando 6.5 veces por debajo de lo reportado.

8. RECOMENDACIONES

Evaluar la producción de biomasa y EPS a partir de *H. coffeata* en un biorreactor de diferente configuración ya sea con cambios en la ubicación y forma de los baffles o combinación de impulsores para la agitación. Esto con el fin de evitar o disminuir la adhesión del microorganismo a las partes del equipo lo que dificulta la cuantificación del producto de interés.

Evaluar el efecto de la presencia de impulsores que desarrollan un flujo axial en un cultivo de *H. coffeata*, como es el caso de la turbina de paletas con un ángulo de 45° recomendada por diversos autores para mejorar la transferencia de oxígeno en fermentaciones miceliales viscosas.

Evaluar la producción de EPS en diferentes clases de biorreactores como son el Airlift y las columnas de burbujeo que carecen de partes mecánicas para la agitación, lo que puede evitar la adhesión del microorganismo al mismo y mejorar la expresión de los metabolitos en el medio de cultivo.

Determinar el consumo de oxígeno de *H. coffeata* en el biorreactor bajo las condiciones trabajadas.

Realizar controles de otras variables en el cultivo de *H. coffeata* tales como pH, que influyen en la producción de los metabolitos de interés.

Diseñar un sistema para la toma de muestra que permita obtener datos representativos en la cuantificación de biomasa.

Evaluar la producción de otros metabolitos de interés tales como ácidos ganodericos (GA) e intrapolisacáridos (IPS).

ANEXO A

Método colorimétrico del fenol – ácido sulfúrico para microdeterminación de carbohidratos totales

Fundamentos teóricos

El contenido total de carbohidratos en casi todas las fuentes; alimentos líquidos, extractos líquidos, materiales de celulosa pueden ser determinados. Azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados dan un color de amarillo-naranja muy estable cuando reaccionan con fenol ácido sulfúrico.

Fenol + ácido sulfúrico
Azúcar simple -----> color naranja-amarillo

La intensidad del color naranja es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes y esta absorbancia puede ser medida a 492 nm. El complejo es estable por una buena cantidad de tiempo y alcanzará su máximo desarrollo a los 30 minutos. La cantidad total de carbohidratos en la solución de ensayo puede ser determinada con referencia a una curva estándar de calibración preparada, para esto se debe seleccionar como estándar el carbohidrato presente en mayor cantidad en la muestra; sacarosa es utilizada para la mayoría de las plantas, lactosa para muestras conteniendo productos lácteos, glucosa y fructosa para extractos y medios.

Preparación de reactivos:

- **Preparación del stock de glucosa de 400 mg/L:** tomar 0.0400 g de glucosa anhidra grado reactivo con exactitud hasta la décima de mg, disolver, ajustar a aforo de 100 mL con agua desionizada, empaquetar en viales de 1 mL, rotular correctamente y almacenar en congelador para su posterior uso (usar un vial cada vez que se haga un ensayo).

- **Preparación del reactivo de fenol 5%:** tomar 5 g de fenol grado reactivo pesados con exactitud hasta la décima de g; disolver y aforar a 100 mL con agua desionizada, almacenar en frasco ámbar, rotular correctamente, éste reactivo es muy estable y debe ser mantenido a la temperatura del laboratorio.

Procedimiento:

Preparación de la curva de calibración:

Nº Dilución	Blanco	1	2	3	4	5	6
Glucosa 400 mg/L (μ L)	0,0	25	50	100	150	200	250
H ₂ O destilada (μ L)	1000	975	950	900	850	800	750
mg/L de glucosa	0,0	10	20	40	60	80	100

- Preparar en cada tubo limpios y secos las soluciones de la curva patrón, las muestras problema diluida si es necesario y agua desionizada como blanco. 1.0 mL de solución en total.
- Adicionar 0.5 mL del reactivo de fenol al 5%.
- Rápidamente adicional de una sola vez 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado tratando de no deslizarlo por las paredes del tubo.
- Agitar en Vortex inmediatamente tubo por tubo después de cada adición para capturar algunos restos de ácido por las paredes del tubo.
- Dejar incubar 10 minutos fuera de la luz directa del sol.
- Poner en baño de agua a 30 °C por 30 minutos.
- Leer absorbancia a 492 nm y realizar la curva absorbancia vs concentración

ANEXO B

Determinación de azúcares reductores por el método de DNS

Fundamentos teóricos:

Este método colorimétrico hace uso de la ley de Beer Lambert. En el azúcar reductor se presenta la oxidación de glucosa del grupo funcional aldehído presente y el grupo cetona en fructosa. Simultáneamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico es reducido a un compuesto nitroaminado colorido de pardo oscuro a marrón según la concentración de los azúcares (3-amino, 5-ácido nitrosalicílico), cuya intensidad de color se mide en espectrofotómetro a 540 nm. Esta técnica tiene la ventaja de ser un método preciso y rápido en comparación con los que utilizan derivados fenólicos. Es útil en la determinación de azúcares reductores en solución. Presenta desventaja por la presencia de polifenoles que ocasionan la reducción del reactivo.

Preparación de reactivos:

- **Preparación de la solución estándar (stock) de lactosa:** tomar 0.400 g de lactosa con exactitud hasta la décima de mg, disolver, ajustar a foro de 100mL con agua desionizada, empacar en viales y almacenar en congelador para su posterior uso.
- **Preparación del DNS:** pesar 4 g de hidróxido de sodio grado reactivo, 75 g de tartrato de sodio y potasio y disolverlos juntos con 150 mL de agua desionizada. Aparte pesar 2.5 g de DNS, disolver con 60 mL de agua desionizada. Agregar lentamente y con agitación la solución del DNS a la solución de tartrato y NaOH anteriormente preparadas. Filtrar, embasar en frasco ámbar y rotular adecuadamente según la norma del laboratorio con

fecha de vencimiento incluida (3 meses máximo), mantener a la temperatura del laboratorio.

Procedimiento:

Preparación de la curva de calibración:

Nº Dilución	Blanco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Stock Lactosa (mL)	0,0	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125	0,150	0,250	0,313	0,375	0,438	0,500
H ₂ O destilada (mL)	0,500	0,475	0,450	0,425	0,400	0,375	0,350	0,250	0,188	0,125	0,063	0,000
g/L de Lactosa	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0

- Preparar en cada tubo (soluciones de curva patrón, las muestras problema diluida si es necesario y agua como blanco) 0.5 mL de solución en total.
- Adicionar 0.5 mL del reactivo DNS a cada tubo.
- Agitar todos los tubos en Vortex.
- Llevar a ebullición por 5 minutos en baño maría.
- Enfriar hasta temperatura ambiente.
- Adicionar a cada tubo 5 mL de agua destilada y agitar en Vortex.
- Dejar en reposo 15 minutos y leer a 540 nm.
- Realizar la curva de absorbancia vs concentración.

ANEXO C

Metodología para la medición del K_{La}

Fundamento teórico:

El K_{La} es el coeficiente de transferencia de masa de oxígeno, el cual es un parámetro que predice la transferencia de oxígeno entre la burbuja de aire que entra al biorreactor y el medio de cultivo.

$$\frac{dC_{o_2}}{dt} = k_L a \times (C_{sat} - C_{o_2}) \quad \text{Ecuación 5. Balance de masa para el oxígeno.}$$

En la medición del K_{La} con microorganismos, se debe tener en cuenta la velocidad de consumo de oxígeno del mismo (esta velocidad de consumo depende de cada microorganismo), de esta manera se tiene el siguiente balance de masa:

$$\frac{dC_{o_2}}{dt} = k_L a (C^* - C_{o_2}) - Q_{o_2} \quad \text{Ecuación 6. Balance de masa con consumo de oxígeno}$$

$$N_{o_2} = k_L a (C^* - C_{o_2}) \quad \text{Ecuación 7. Velocidad de transferencia de } O_2 \text{ al medio.}$$

$$Q_{o_2} = q_{o_2} * x \quad \text{Ecuación 8. Velocidad de consumo de } O_2 \text{ del microorganismo.}$$

Donde:

K_{La} : coeficiente de transferencia de oxígeno (1/s).

C^* : concentración de saturación del oxígeno (ppm).

C_{o_2} : concentración de oxígeno en el medio líquido (ppm).

N_{o_2} : velocidad de transferencia de oxígeno al medio líquido (ppm/s).

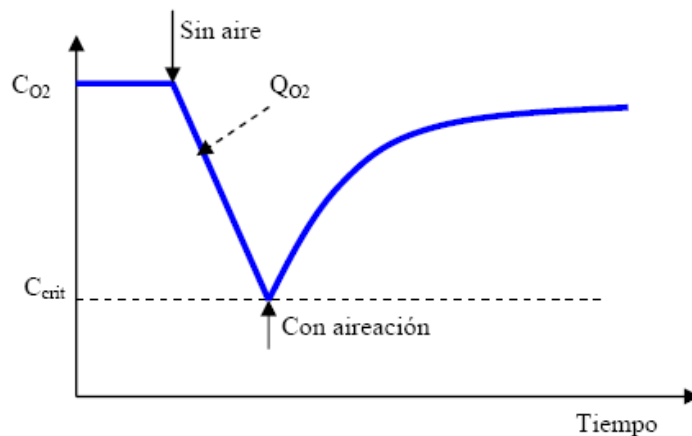
Q_{o_2} velocidad de consumo de oxígeno por parte del microorganismo (ppm/s).

q_{O_2} : velocidad específica de consumo de oxígeno por parte del microorganismo (1/s)

X: concentración de biomasa (ppm).

La determinación del K_La por el método dinámico se representa en la figura 3.

Figura 3. Método dinámico para determinar K_La .



Procedimiento:

Medición experimental del K_La :

Luego de tener dentro del reactor el medio de cultivo saturado con oxígeno (1.8 L), con los microorganismos (200 mL), se detiene la bomba de aire y se comienza a cuantificar la caída de concentración de oxígeno en el tiempo. Tomar los valores de oxígeno disuelto cada 30 s. La concentración de O_2 final no debe ser inferior a la concentración crítica de oxígeno para el microorganismo, la cual está generalmente entre un 5 a 10% de la concentración de saturación.

Se procede a graficar C_{O_2} vs t donde la pendiente de esta línea recta será Q_{O_2} que se considera como constante dentro de la ecuación de balance de masa.

Cuando el valor de C_{O_2} llegue a la concentración crítica de oxígeno, se procede a encender la bomba de aire hasta que C_{O_2} se estabilice. Tomar los valores de oxígeno disuelto cada 30 s.

Para determinar el $K_L a$:

1. Graficar C_{O_2} vs t .
2. Ajustar los datos a un polinomio que represente adecuadamente la experimentación.
3. Derivar la ecuación con respecto al tiempo, y encontrar los valores de esta derivada para cada tiempo en particular.
4. Graficar $\frac{dC_{O_2}}{dt}$ vs C_{O_2} donde: $m = -k_L a$, Intercepto = $(k_L a \times C^* - Q_{O_2})$

Al finalizar el ensayo tomar dos muestras de biomasa y determinar su concentración por peso seco.

ANEXO D

Resultados del análisis de supuestos de normalidad, independencia e igualdad de varianzas

- Productividad de biomasa (P_x):

Diagnósticos

Shapiro-Wilks P-valor = 0.3316

Autocorrelación en Lag 1 = 0.0489085 +/- 0.619796

Comprobación de varianzas

Contraste C de Cochran: 0.602872 P-valor = 0.424333

Contraste de Bartlett: 1.14414 P-valor = 0.686711

Contraste de Hartley: 4.33986

Test de Levene: 0.776735 P-valor = 0.495844

Gráfico de probabilidad normal

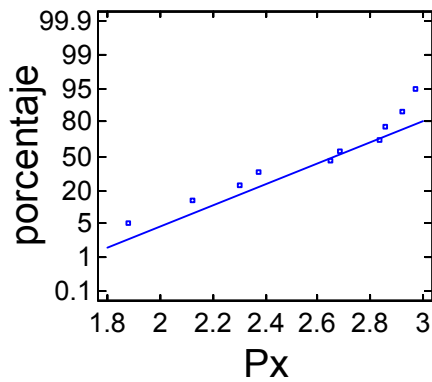
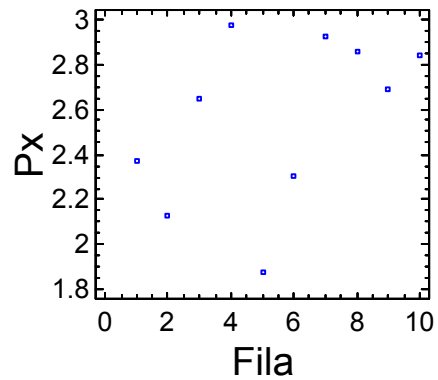
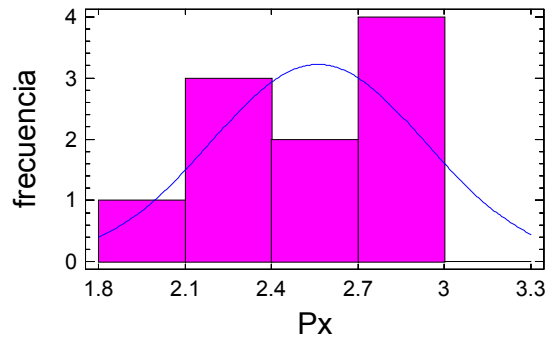


Gráfico de residuales



Histograma para P_x



- Productividad de exopolisacáridos (P_{exo}):

Diagnostics

Shapiro-Wilks P-value = 0,0514

Lag 1 autocorrelation = 0,0116389 +/- 0,619796

Comprobación de varianzas

Contraste C de Cochran: 0.804251 P-valor = 0.0839642

Contraste de Bartlett: 1.99524 P-valor = 0.145436

Contraste de Hartley: 139.724

Test de Levene: 4.39576 P-valor = 0.0579908

Gráfico de probabilidad normal

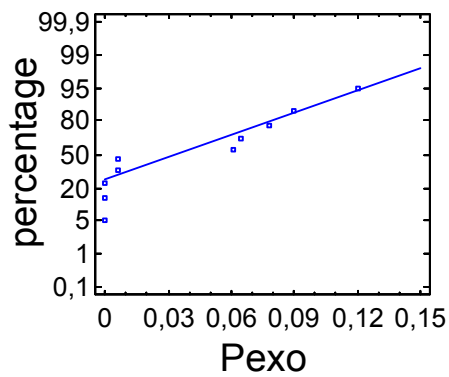
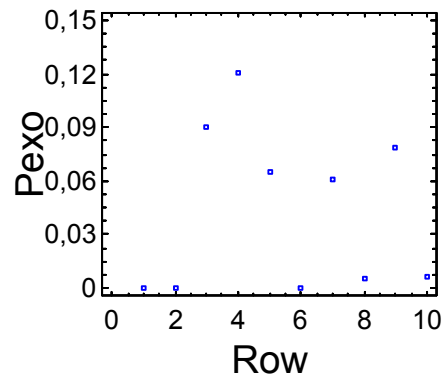
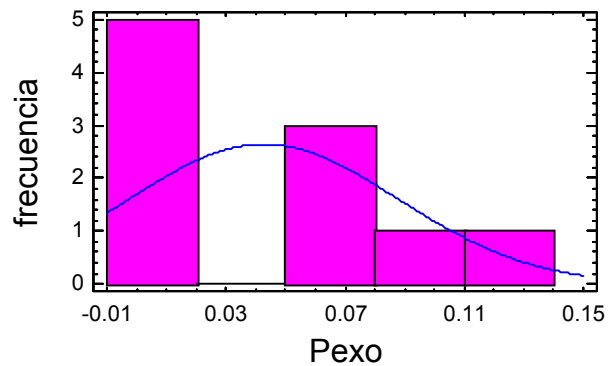


Gráfico de residuales



Histograma para Pexo



ANEXO E

Resultados del análisis de varianza unifactorial

Tabla ANOVA para P_x según agitación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Val
Entre grupos	0.104154	2	0.0520772	0.32	0.736
Intra grupos	1.14037	7	0.16291		
Total (Corr.)	1.24452	9			

Tabla ANOVA para P_x según aireación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Val
Entre grupos	1.02542	2	0.512712	16.38	0.002
Intra grupos	0.219097	7	0.0312996		
Total (Corr.)	1.24452	9			

Tabla ANOVA para P_{exo} según agitación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Val
Entre grupos	0.0007614	2	0.0003807	0.15	0.862
Intra grupos	0.017693	7	0.00252757		
Total (Corr.)	0.0184544	9			

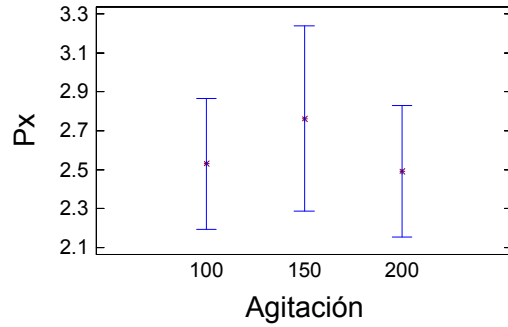
Tabla ANOVA para P_{exo} según aireación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Val
Entre grupos	0.0056189	2	0.00280945	1.53	0.280
Intra grupos	0.0128355	7	0.00183364		
Total (Corr.)	0.0184544	9			

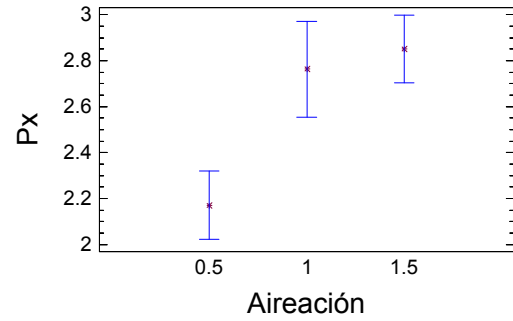
ANEXO F

Resultados del análisis de medias

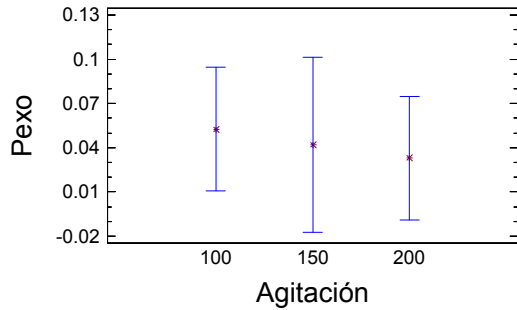
Medias y 95.0 Porcentajes Intervalos LS



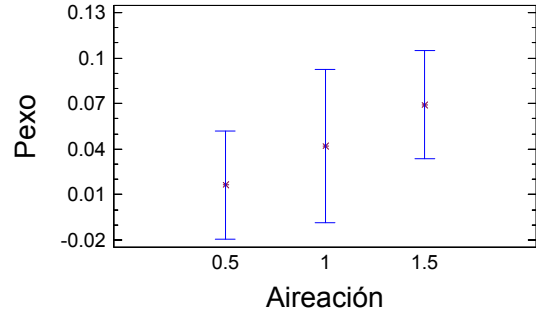
Medias y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



Medias y 95.0 Porcentajes Intervalos LSC



Medias y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



ANEXO G

Resultados de la prueba de análisis de rangos múltiples

Contraste múltiple de rangos para biomasa máxima de las cinéticas de crecimiento según agitación

Método: 95.0 porcentaje LSD

Agitación	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
150	2	7.695	4.70983	X
100	4	10.0575	3.33035	X
200	4	10.9725	3.33035	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
100 - 150	2.3625	13.64
100 - 200	-0.915	11.137
150 - 200	-3.2775	13.64

* indica una diferencia significativa.

Contraste múltiple de rangos para biomasa máxima de las cinéticas de crecimiento según aireación

Método: 95.0 porcentaje LSD

Aireación	Frec.	Media	Grupos homogéneos
0.5	4	6.35	X
1	2	7.695	XX
1.5	4	14.68	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
0.5 - 1	-1.345	10.1938
0.5 - 1.5	*-8.33	8.32316
1 - 1.5	-6.985	10.1938

* indica una diferencia significativa.

Contraste múltiple de rangos para biomasa final según agitación

Método: 95.0 porcentaje LSD

Agitación	Frec.	Media	Grupos homogéneos
200	4	24.9338	X
100	4	25.3073	X
150	2	27.6265	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
100 - 150	-2.31925	8.18673
100 - 200	0.3735	6.68444
150 - 200	2.69275	8.18673

* indica una diferencia significativa.

Contraste múltiple de rangos para biomasa final según aireación

Método: 95.0 porcentaje LSD

Aireación	Frec.	Media	Grupos homogéneos
0.5	4	21.7092	X
1	2	27.6265	X
1.5	4	28.5318	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
0.5 - 1	*-5.91725	3.3792
0.5 - 1.5	*-6.8225	2.7591
1 - 1.5	-0.90525	3.3792

* indica una diferencia significativa.

Contraste múltiple de rangos para P_x según agitación

Método: 95.0 porcentaje LSD

Agitación	Frec.	Media	Grupos homogéneos
200	4	2.492	X
100	4	2.52975	X
150	2	2.7625	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
100 - 150	-0.23275	0.826546
100 - 200	0.03775	0.674872
150 - 200	0.2705	0.826546

* indica una diferencia significativa.

Contraste múltiple de rangos para P_x según aireación

Método: 95.0 porcentaje LSD

Aireación	Frec.	Media	Grupos homogéneos
0.5	4	2.171	X
1	2	2.7625	X
1.5	4	2.85075	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
0.5 - 1	*-0.5915	0.362296
0.5 - 1.5	*-0.67975	0.295813
1 - 1.5	-0.08825	0.362296

* indica una diferencia significativa.

Contraste múltiple de rangos para P_{exo} según agitación

Método: 95.0 porcentaje LSD

Agitación	Frec.	Media	Grupos homogéneos
200	4	0.033	X
150	2	0.042	X
100	4	0.0525	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
100 - 150	0.0105	0.102955
100 - 200	0.0195	0.084062
150 - 200	0.009	0.102955

* indica una diferencia significativa.

Contraste múltiple de rangos para P_{exo} según aireación

Método: 95.0 porcentaje LSD

Aireación	Frec.	Media	Grupos homogéneos
0.5	4	0.01625	X
1	2	0.042	X
1.5	4	0.06925	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
0.5 - 1	-0.02575	0.0876902
0.5 - 1.5	-0.053	0.0715988
1 - 1.5	-0.02725	0.0876902

* indica una diferencia significativa.

9. BIBLIOGRAFÍA

ALCÓN, A. Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: Aplicación a la producción de Xantano. Madrid, 1999. Tesis para optar al grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Ingeniería química.

AVTONOMOVA, A. V.; KRASNOPOL'SKAYA, L. M.; MAKSIMOV, V. N. Optimization of Nutrient Medium for Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. En: Microbiology, Vol. 75, No. 2 (2006). pp. 148 – 153.

ASENJO, J. Bacterial, Yeast, and Fungal Cultures Scale-Up. En: Bioreactor System Design. U.S.A: Editorial Marcel Dekker inc. 1995. pp. 470-483.

BABITSKAYA, V.G.; SHCHERBA, V.V.; PUCHKOVA, T.A.; SMIRNOV, D.A. Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*: Factors Affecting Their Production. En: Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 41, No. 2 (2005). pp. 169–173.

BANDAIPHET, C. y PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, K_La in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. En: Carbohydrate Polymers, No. 66 (2006). pp. 216–228.

BEROVIČ, M.; HABIJANIČ, J.; ZORE, I.; WRABER, B.; HODZAR, D.; BOH, B.; POHLEVEN, F. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. En: Journal of Biotechnology No. 103 (2003). pp. 77–86.

BRIZUELA, M.A.; GARCÍA, L.; PÉREZ, L.; MANSUR, M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. En: Revista Iberoamericana de Micología, No. 15 (1998). pp. 69-74.

DORAN, P. Mass Transfer. En: Bioprocess Engineering Principles. London: Academic Press Limited. 1999. pp. 202 – 205.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. En: Division of Biochemistry, Vol. 28, No.3 (1956). pp. 350-356.

DUTTA, R. Agitation and aeration. En: Fundamentals of Biochemical Engineering. Springer. Capítulo 9. 2008. pp. 221.

FANG, Q.H.; ZHONG, J.J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites – ganoderic acid and polysaccharide. En: Biochemical Engineering Journal, No. 10 (2002a). pp. 61–65.

FANG, Q.H.; ZHONG, J.J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. En: Process Biochemistry, No. 37 (2002b). pp. 769–774.

FEOFILOVA, E.P. The Kingdom Fungi: Heterogeneity of Physiological and Biochemical Properties and Relationships with Plants, Animals, and Prokaryotes (Review). En: Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 37, No. 2 (2001). pp. 124–137.

FYFERLING, M.; URIBELARREA, J.; GOMA, G.; MOLINA-JOUVE, C. Oxygen transfer in intensive microbial culture. En: Bioprocess and Biosystems Engineering, Vol. 31 (2008). pp. 595 – 604.

GARCÍA O., F. y GÓMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. En: Biotechnology Advances, No. 27 (2008). pp. 153–176.

GHORAI, S.; PROSAD, S.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. En: Food Research International, Vol. 42 (2009). pp. 577 – 587.

HEWITT, C.; NIENOW, A. The scale-up of microbial batch and fed-batch fermentation processes. En: Advances in Applied Microbiology, Vol. 62 (2007). pp. 105 – 133.

HINCAPIE, A.S.; MARTÍNEZ, L.; TOBÓN, Y.V. Medellín, 2005. Diseño para la obtención de micelio y metabolitos de *Ganoderma lucidum* en un sistema de fermentación discontinuo. Trabajo de grado. Universidad EAFIT, Departamento de Ingeniería de Procesos. Área de Biotecnología.

HUANG, H.C.; CHEN, C.I.; HUNG, C.N.; LIU, Y.C. Experimental analysis of the oil addition effect on mycelia and polysaccharide productions in *Ganoderma lucidum* submerged culture. En: Bioprocess and Biosystems Engineering, No. 32 (2009). pp. 217–224.

JUNKER, B. Scale-Up Methodologies for Escherichia coli and Yeast Fermentation Processes. En: Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 97 No. 6 (2004). pp. 347 – 364.

KIM, H.; PARK, M.; YUN, J. Culture pH Affects Exopolysaccharide Production in Submerged Mycelial Culture of *Ganoderma lucidum*. En: Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 134 (2006). pp. 249 – 262.

LEE, K.; LEE, S.; LEE, H. Bistage Control of pH for Improving Exopolysaccharide Production from Mycelia of *Ganoderma lucidum* in an Air-Lift Fermentor. En: Journal of bioscience and bioengineering, Vol. 88, No. 6 (1999). pp. 646 – 650.

LEE, B.; BAE, J.; PYO, H.; CHOE, T.; KIM, S.; HWANG, H.; YUN, J. Submerged culture conditions for the production of mycelia biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. En: Enzyme and Microbial Technology, No. 35 (2004). pp. 369–376.

LOWRY, O.H., Protein measurement with the folin phenol reagent. En: Journal of Biological Chemistry, No. 193 (1951). pp. 265-275.

MCCABE, W. L., SMITH, J C., HARRIOTT, P. Operaciones Unitarias en Ingeniería Química. 6 edición México: Editorial McGraw-Hill. 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. En: Analytical Chemistry, Vol. 31, No.3 (1959). pp. 426-428.

PORRAS, S.M.; VALDEZ-CRUZ, N. A.; ROJANO, B.; AGUILAR, C.; ROCHA-ZAVALA, L.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. Mycelial submerged culture of *Humphreya coffeata* for the production of valuable bioactive metabolites,

cytotoxicity, genotoxicity and antioxidant activity. En: International Journal of Medicinal Mushrooms (2009) (In press).

PUERTA, J.; ZAPATA, P. 2006. Diseño conceptual de un proceso para la elaboración de un producto funcional a partir de *Ganoderma lucidum*. Trabajo de grado. Universidad EAFIT, Departamento de Ingeniería de Procesos. Área de Biotecnología.

QUINTERO, R. Transferencia de oxígeno y diseño de fermentadores. En: Ingeniería Bioquímica. 1ed. México D.F: Editorial Alhambra, S.A. 1999. pp. 81-95.

RUSELL, R.; PATERSON, M. *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. En: Phytochemistry, No. 67 (2006). pp. 1985 – 2001.

SANTAFÉ, G.; ZULUAGA, J. Búsqueda de compuestos bioactivos en hongos de la familia Ganodermataceae del departamento de Córdoba. Montería, 2007. Proyecto de investigación. Universidad de Córdoba. Departamento de química.

SHULER, M.; KARGI, F. How cells grow. En: Bioprocess engineering: basic concepts. New Jersey: Editorial Prentice Hall. 1992. pp. 154 – 157.

TANG, Y.J.; ZHONG, J.J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. En: Enzyme and Microbial Technology, No. 31 (2002). pp. 20–28.

TANG, Y.J.; ZHONG, J.J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. En: Enzyme and Microbial Technology, No. 32 (2003). pp. 478–484.

TANG, Y.J.; ZHU, L.W.; LI, H.M.; LI, D.S. Submerged Culture of Mushrooms in Bioreactors – Challenges, Current State-of-the-Art, and Future Prospects. En: Food Technology and Biotechnology, No. 45 (2007). pp. 221–229.

WAGNER, R.; MITCHELL, D.A.; LANZI, G.; LOPES DE ALMEIDA, A.; BEROVIČ, M. Current Techniques for the Cultivation of *Ganoderma lucidum* for the Production of Biomass, Ganoderic Acid and Polysaccharides. En: Food Technology and Biotechnology, No. 41(2003). pp. 371–382.

WAGNER, R.; MITCHELL, D.A.; LANZI, G.; LOPES DE ALMEIDA, A. Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. En: Journal of Biotechnology, Vol. 114 (2004). pp. 153–164.

WANG, Y.C. Effects on exopolysaccharide and oxalic acid production in cultures of *Sclerotium gluconicum*. En: Enzyme and Microbial Technology, No. 17 (1995). pp. 124–30.

XU, C.; YUN, J. Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from *Paecilomyces tenuipes* C240 in a stirred-tank fermenter. En: Enzyme and Microbial Technology, No. 35 (2004). pp. 33–39.

XU, C.; KIM, S.; HWANG, H.; YUN, J. Production of exopolysaccharides by submerged culture of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes* C240 in stirred-tank and airlift reactors. En: Bioresource Technology, No. 97 (2006). pp. 770–777.

XU, P.; DING, Z.Y.; QIAN, Z.; ZHAO, C.X.; ZHANG, K.C. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. En: Enzyme and Microbial Technology, No. 42 (2008). pp. 325–331.

YANG, F.C.; LIAU, C.B. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. En: Process Biochemistry, Vol. 33, No. 5 (1998a). pp. 547-553.

YANG, F.C.; LIAU, C.B. Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures. En: Bioprocess Engineering, No. 19 (1998b). pp. 233 – 236.

YANG, F.C.; KE, Y.; KUO, S. Effect of fatty acids on the mycelia growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. En: Enzyme and Microbial Technology, No. 27 (2000). pp. 295–301.

ZHANG, J. G.; CHEN, X. M.; HE, X. S. A Study on the Synthetic Characteristics of the Extracellular Polysaccharide (EPS) of *Ganoderma lucidum* Cultured in Batch Fermentation Using a Kinetic Model. En: Chinese Journal of Biotechnology, Vol. 23, No. 6 (2007). pp. 1065 – 1070.

ZHONG, J.J.; TANG, Y.J. Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms for Production of Valuable Bioactive Metabolites. En: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, No. 87 (2004). pp. 25–59.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN'T RIET, K. Modeling of the Bacterial Growth Curve. En: Applied and Environmental Microbiology, Vol. 56, No. 6 (1990). pp. 1875-1881.

10. CIBERGRAFÍA

ÁLVAREZ, M. 2005. La biotecnología en el contexto de la ciudad del conocimiento.

En: http://www.mty.itesm.mx/die/ddre/transferecia/Transferecia69/Investigacion_69/Investigacion2_69.htm. (Consulta: Octubre, 2008).

ANÓNIMO. Los Hongos. En: <http://uab-gtip.uab.es/Apuntsmicro/hongos.pdf> (Consulta: Marzo, 2009).

CYBERNOME.

En: <http://www.cybertruffle.org.uk/cgi-bin/nome.pl?organism=2380&glo=esp>. (Consulta: Septiembre, 2008)

FAO.

En: http://www.fao.org/index_es.htm. (Consulta: Junio, 2009).

RÍOS, S. 2007. En: <http://www.oem.com.mx/elsoldepuebla/notas/n532635.htm>. (Consulta: Junio, 2009).

VARELA, G. Fisiología y metabolismo bacteriano.

En: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2011.pdf> (Consulta: Julio, 2009).