EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA FÚNGICA A PARTIR DE *Pleurotus pulmonarius* EMPLEANDO RESIDUOS DE POSCOSECHA DE MAÍZ

JUAN CAMILO OVIEDO LOPERA

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
POSGRADO DEN CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y ALIMENTARIAS
MEDELLÍN
2014

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA FÚNGICA A PARTIR DE *Pleurotus pulmonarius* EMPLEANDO RESIDUOS DE POSCOSECHA DE MAÍZ

JUAN CAMILO OVIEDO LOPERA

Trabajo de grado para optar al título de Ph. D en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias área de Biotecnología.

Directores
Ph. D. Jose Edgar Zapata Montoya
Ph. D. Ana Elisa Casas Botero

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
POSGRADO DEN CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y ALIMENTARIAS
MEDELLÍN
2014

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

"El Señor ha estado grande con nosotros, y estamos alegres" (Sal 125,3). Después de tantos inconvenientes que se presentaron durante la elaboración de éste trabajo de grado, lo primero que tengo es una oración de gracias a Dios por culminar esta etapa de mi vida.

Este trabajo lo dedico de forma especial a mi esposa Yineth y mis hijos Isabella y Jose David, que son uno de los motores de mi vida y una de las razones por las cuales no deje tirado este trabajo. También quiero dedicarles este trabajo a mis padres Gustavo Oviedo y Amparo Lopera, que aun con todos los años que tengo, han sido un apoyo para mí, mi esposa y mis hijos. Lógicamente y no menos importante a Dios, al que he descubierto como Padre Amoroso en estos años de lucha académica y espiritual.

Este trabajo no hubiera sido posible culminarlo, sin la ayuda de mucha gente que desde su posición ayudó a su feliz término y no quisiera que se me escapara ninguna.

Destaco nuevamente a mi familia, mi esposa Yineth, mis hijos y mis padres quienes siempre fueron mi apoyo y ánimo, sobre todo cuando las cosas salieron mal. Gracias a todos ellos por la paciencia que me tuvieron en este tiempo.

En el libro del Eclesiástico, capitulo 6 verso 14 está escrito: "*Un amigo fiel es un refugio seguro; el que lo halla ha encontrado un tesoro. ¿Qué no daría uno por un amigo fiel? ¡No tiene precio!".* En la experiencia de este proceso doctoral, conté con la buena suerte de encontrar amigos, a quienes quiero agradecerles y mencionarlos

Un apoyo fundamental, fue la Dra Ana Elisa Casas Botero, quien asumió el reto de dirigir su primer estudiante de doctorado conmigo, sus aportes fueron fundamentales, pero más allá de esto, su apoyo constante e impulso me hicieron posible la culminación de este trabajo. La asesoría de la doctora Casa superó mis expectativas en una directora de tesis doctoral. Pido a Dios que la Bendiga siempre, además de mi gratitud por siempre para con ella y espero poder contar con su amistad por muchísimos años.

Otro de los regalos que el Señor me dio en este proceso, fue al Dr. Jaime Alejandro Valencia, al que conocí en el curso de modelación matemática y quien sin ningún interés, me ayudó no solo en el documento, sino en las publicaciones resultantes del mismo. Que Dios lo bendiga profe Jaime Valencia por ayuda y gracias por su amistad.

Quiero resaltar además a la otrora ingeniera hoy magister Laura Marcela Trujillo, quien llegó al proyecto como joven investigadora de Colciencias y se empoderó del proyecto con todo su empeño; gracias a su iniciativa y trabajo, muchas de las cosas del FSC se pudieron realizar. Para ella infinitas gracias y Bendiciones.

Menciono además al ingeniero Luis Fernando Ceballos, quien estuvo a la cabeza de la construcción del FSC y de los rediseños de los distribuidores; el a pesar de estar contratado por servicios, también fue más allá en el trabajo con el bioreactor por todos los aportes que hizo. Mi gratitud para don Luis Fernando.

Quiero agradecer también de manera especial la ayuda permanente del Doctor Hernán Gómez quien siempre estuvo atento a mis inquietudes y además fue propositivo en el análisis estadístico del trabajo. Gracias a todas sus contribuciones, el documento quedo con una robustez estadística que resaltaron todos aquellos que leyeron el trabajo.

Durante todos estos años, conté con el apoyo de estudiantes de pregrado, que hicieron su respetivo trabajo de grado y aportaron a este trabajo; hoy ya son ingenieros agroindustriales o químicos y algunos ya realizaron posgrado; ellos también contribuyeron con la finalización de este proyecto. Ellos son los ingenieros Lucas García, Juliana Pineda, Anguie Beltrán, Jacinto Márquez, Santiago Trujillo, Diana Echeverri y Diana Zuleta.

Quiero destacar además, la ayuda desinteresada de mis compañeras de trabajo, de manera especial a la magister Mabel Milena Torres Tabora, quien desinteresadamente leyó en su tiempo libre el documento y los artículos que publicamos. También a la magister Mónica Cardona, quien prácticamente realizo el diseño artístico de la presentación para la sustentación, lo mismo que la ayuda de la Doctora Diana Vanegas con sus observaciones cuando las solicité. Para ellas gracias por su apoyo y amistad en este largo proceso. Que Dios las proteja.

También quiero agradecer a mi amigo el arquitecto Gustavo Adolfo Cardona, el cual realizó los planos del FSC, más como un favor de amigo que como un servicio prestado, para él bendiciones.

Es importante destacar que el proyecto se llevó a cabo con recursos financieros de la Universidad Pontificia Bolivariana, a través de los grupos de investigación CIBIOT y la Facultad de Ingeniera Agroindustrial. Del CIBIOT, tengo que agradecer a la Doctora Margarita Enid Ramírez por su apoyo administrativo para la culminación del trabajo, ella facilitó la infraestructura del grupo para el desarrollo del trabajo; también al Magister Yesid Vélez por su ayuda con los análisis en el HPLC.

Desde la Facultad el apoyo permanente del Doctor Juan Carlos Palacio en todos los aspectos administrativos.

Resalto además el apoyo en la U de A del Doctor José Edgar Zapata quien acompañó durante todos estos años mi proceso formativo. Muchas gracias para él; de igual forma el interés por la culminación de mi trabajo por parte de la Doctora Dora Benjumea, directora del Posgrado en Química Farmacéutica y el Doctor Juan Carlos Alarcón, Decano de la Facultad.

No puedo dejar de mencionar mi gratitud con mi suegra María Elena Rojo y su hermano Francisco Luis Rojo, quienes nos ayudaron con el cuidado de mis hijos en los momentos en los cuales requería trabajar; esa ayuda fue muy importante, sobre todo porque era tiempo libre de ellos y permito que yo trabajara de forma eficaz.

Para la UPB, no me alcanzaran las palabras por el apoyo con la licencia, la matrícula y ayuda en solucionar los problemas que se presentaron. Espero que Dios siga iluminando esta magna institución y continué con la permanente protección del Sagrado Corazón de Jesús y la intercesión de su Santísima Madre. Gracias y Bendiciones de toda mi familia para la UPB.

CONTENIDO

CONTENIDO .....
LISTA DE FIGURAS .....
LISTA DE TABLAS .....
LISTA DE ECUACIONES .....
LISTA DE ANEXOS .....
1. INTRODUCCIÓN 1
2. OBJETIVOS 4
2.1 OBJETIVO GENERAL 4
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS 4
3. MARCO TEÓRICO 5
3.1 EL MAÍZ 5
3.1.1 La Tusa de maíz 6
3.2 PROTEÍNA UNICELULAR 7
3.3 FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO 8
3.3.1 Parámetros del Proceso 10
3.3.2 Medición de la Biomasa en FES. 13
3.4 MODELOS MATEMÁTICOS DE CRECIMIENTO PARA FES 18
3.4.1 Cinética del Crecimiento Microbiano 18
3.4.2 Redes Neuronales Artificiales (RNA) 21
- La Neurona Biológica 21
- Las Redes Neuronales Artificiales (RNA) 22
- Arquitectura de las RNA 24
- Redes monocapa 24
- Redes multicapa 25
- Aplicaciones de las RNA 26
3.5 BIOREACTORES EN FES 28
3.5.1 Criterios para la selección de un bioreactores FES 28
3.5.2 Clasificación de los bioreactores en FES 29
3.5.3 Bioreactores solidos de columna 30

3.5.4 Bioreactores solidos para enriquecimiento proteico 32
4. MATERIALES Y MÉTODOS 34
4.1 OBTENCIÓN Y PRE TRATAMIENTO DE LA TUSA DE MAÍZ 34
4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA TUSA DE MAÍZ. 34
4.3 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO E INOCULACIÓN DEL *Pleurotus pulmonarius* EN CAJA DE PETRI. 36
4.4 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO PRELIMINAR DEL *Pleurotus pulmonarius* UTILIZANDO TUSA DE MAÍZ EN CAJA DE PETRI 36
4.5 MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO PRELIMINAR DEL *Pleurotus pulmonarius* SOBRE TUSA DE MAIZ POR PDI EN CAJAS DE PETRI 37
4.6 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA EVALUAR LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA EN TUSA DE MAIZ EN LAS CAJAS DE PETRI. 37
4.7 MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA BIOMASA EN LA TUSA DE MAÍZ 38
4.7.1 Determinación de la concentración de proteína total. 38
4.7.2 Determinación de la concentración de ergosterol 39
4.8 MODELACIÓN MATEMÁTICA DEL CRECIMIENTO DEL *Pleurotus pulmonarius* EN LAS CAJAS DE PETRI. 40
4.8.1 Ajuste de crecimiento al modelo de Logístico 40
4.8.2 Ajuste del crecimiento al modelo de Gompertz 40
4.8.3 Análisis del crecimiento celular con RNA 41
4.8.4 Reparametrización del modelo Logístico y de Gompertz 41
4.8.5 Medición y modelación de la biomasa en tusa de maíz PDI en las cajas de Petri. 43
4.9 DISEÑO DE UN BIOREACTOR FES TIPO COLUMNA 43
4.9.1 Modelo base del fermentador sólido 43
4.9.2 Escalado del fermentador de columna 44
4.9.3 Diseño de los distribuidores 45
4.10 OPERACIÓN DEL FSC 48
4.10.1 Carga y operación del FSC 48
4.10.2 Descarga del FSC 49
4.11 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA EVALUAR EL CRECIMIENTO PROTEICO SOBRE TUSA DE MAÍZ EN EL FSC 49
4.12 CALCULO DEL % DE ENRIQUECIMIENTO PROTEICO SOBRE LA TUSA DE MAIZ EN EL FSC 50

4.13 CALCULO DE LA PRODUCTIVIDAD DEL FSC.....51
4.14 CINÉTICA Y MODELADO DEL CRECIMIENTO EN EL FSC.....51
4.15 MEDIDA DE LAS DESLIGNIFICACIÓN EN EL FSC.....52
4.16 MEDIDA DE LA DIGESITIBILIDAD ENZIMATICA EN EL FSC.....53
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....54
5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA TUSA DE MAÍZ.....54
5.2 RESULTADOS DEL CRECIMIENTO PRELIMINAR DEL *Pleuroturs pulmonarius* SOBRE LA TUSA DE MAIZ EN LAS CAJAS DE PETRI.....56
5.3 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL TAMAÑO DE PARTICULA EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA SOBRE TUSA DE MAÍZ EN CAJA DE PETRI.....59
5.3.1 Analisis estadistico del diseño de experimentos.....60
5.3.2 Analisis del enriquecimiento proteico de la tusa de maíz con el *Pleurotus pulmonarius* en la caja de Petri.....62
5.4 MEDICIÓN PRELIMINAR DEL CRECIMIENTO DE LA BIOMASA DEL *Pleurotus pulmonarius* EN TUSA DE MAIZ.....63
5.5 RESULTADOS DE LA MEDICION DEL CRECIMIENTO Y MODELACION DEL *Pleurotus pulmonarius* EN LA CAJA DE PETRI.....65
5.6 CINETICA DE CRECIMIENTO PARA LA REPARAMETRIZACION DE LOS MODELOS LOGISTICO Y DE GOMPERTZ.....75
5.7 ANÁLSIS DEL CRECIMIENTO DEL *Pleurotus pulmonarius* CON RNA...78
5.8 RESULTADO DE LA MEDICION DE BIOMASA Y MODELACION POR PDI 83
5.9 CONSTRUCCION DEL FSC ESCALADA PARA EL ENRIQUECIMIENTO MICELIAR DE LA TUSA DE MAÍZ EN EL FERMENTADOR.....92
5.9.1 Descripción del FSC.....92
5.10 MONTAJES PRELIMINARES EN EL FSC.....97
5.10.1 Primer montaje en el FSC.....97
5.10.2 Segundo Montaje. Primer rediseño en el FSC.....99
5.10.3 Segundo rediseño de los distribuidores en el FSC.....100
5.10.4 Ultimo rediseño de los distribuidores en el FSC.....100
5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN EL FSC 102
5.12 CÁLCULO DEL % DE ENRIQUECIMIENTO PROTEICO DE LA TUSA DE MAÍZ EN EL FSC.....105
5.13 CALCULO DE LA PRODUCTIVIDAD DEL FSC.....106

5.14 MODELACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO MICELIAR DE LA TUSA DE MAÍZ EN EL FSC 107
5.15 RESULTADOS DE LA DESLIGNIFICACIÓN Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* 109
6. CONCLUSIONES 114
7. RECOMENDACIONES 117
BIBLIOGRAFÍA 118
ANEXO A. Método de medición modificado de lignina Klason 137
ANEXO B. Algoritmo para la medición del índice de blanco (IB) 140
ANEXO C. Curva de calibración de proteína por el método de Biuret 142
ANEXO D. Ejemplo curva de calibración en HPLC 143
ANEXO E. Algoritmo de medición de las áreas del micelio en cajas de Petri 144
ANEXO F. Acotado del FSC (cm) 146
ANEXO G. Comportamiento de la humedad y la temperatura para dos ensayos al azar en el interior del FSC 149
8. BIBLIOGRAFIA 151

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta de Maíz tropical. Fuente: (Paliwal et al, 2001). 5
Figura 2. Tusa de maíz. Fuente: (Beltran, A. Pineda, J., 2010) 6
Figura 3. Estructura molecular del ergosterol. Fuente: (Cheng, 2006) 16
Figura 4. Perfiles de crecimiento de la biomasa en FES. Fuente: Modificado (Mitchell et al., 2004)....19
Figura 5. Neurona Biológica. Fuente: (Caicedo, 2009)....21
Figura 6. Estructura de una Neurona Artificial General. Fuente: (Oviedo et al., 2013)....22
Figura 7. Red Neuronal Multicapa típica. Fuente: (Oviedo et al., 2013) 24
Figura 8. Red neuronal monocapa. Fuente: Modificado de (Haykin, 2005) 25
Figura 9. Red neuronal multicapa. Fuente: (Gomez, G. Carreño, J. Zambrano, J., 2011)....26
Figura 10. Clasificación de los bioreactores en FES. Fuente: Modificado de (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006)....30
Figura 11. Ejemplos de bioreactores sólidos a escala laboratorio: a. Modelo IRD; b. Modelo INRA. Fuente: (Durand, 2003) 31
Figura 12. Diagrama de un reactor de lecho empacado, tanto vertical como horizontal. Fuente: Modificado de (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006) 32
Figura 13. Pictograma del fermentador solido base tipo columna. 44
Figura 14. Primer distribuidor de humedad en el FS....45
Figura 15. Primer rediseño del distribuidor de humedad en el FS 46
Figura 16. Segundo rediseño del distribuidor de humedad en el FS 47
Figura 17. Último rediseño del distribuidor de humedad en el FS....48
Figura 18. Registro fotografico de la evaluacion del crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* a diferentes condiciones de humedad. A 60% B. 80%....56
Figura 19. Registro fotografico de la evaluacion del crecimiento del Pleurotus pulmonarius a diferentes condiciones de pH. A. 6 B. 8....56
Figura 20. Registro fotografico de la evaluacion del crecimiento del Pleurotus pulmonarius a través de las sales. A. Con Sales B. Si sales....57
Figura 21. Gráfico de interacciones para el diseño de experimentos en las cajas de Petri para el tamaño de partícula y la temperatura. 60
Figura 22. Curva de crecimiento del Pleurotus pulmonarius en tusa de maíz 63
Figura 23. Comparacion del crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* a los 16 y 30 días. 64
Figura 24. Crecimiento de la biomasa del *Pleurotus pulmonarius* medición en concentración de poteína. 65
Figura 25. Crecimiento de la biomasa del *Pleurotus pulmonarius* medición en concentración de ergosterol. 66
Figura 26. Ajuste de la biomasa al modelo Logístico para las cuatro réplicas de la concentración de proteína en el tiempo 67
Figura 27. Ajuste de la biomasa al modelo Logístico para las cuatro réplicas de la concentración de ergosterol en el tiempo 68
Figura 28. Curva de biomasa modelada mediante la ecuación logística promedio para la concentración de proteína vs tiempo 70

Figura 29. Curva de biomasa modelada mediante la ecuación logística promedio para la concentración de egostero vs tiempo 70
Figura 30. Curvas de biomasa con todos los datos analizados en el CFTOOL para la concentración de proteína vs tiempo 71
Figura 31. Curvas de biomasa con todos los datos analizados en el CFTOOL para la concentración de ergosterol vs tiempo.....72
Figura 32. Simulación de biomasa a partir de todos los datos obtenidos en el CFTOOL para la concentración de proteína vs tiempo.....73
Figura 33. Simulación de biomasa a partir de todos los datos obtenidos en el CFTOOL para la concentración de ergosterol vs tiempo. 74
Figura 34. Normalización de la biomasa para la concentración de proteína.....75
Figura 35. Normalización de la biomasa para la concentración de ergosterol.....75
Figura 36. Modelación reparametrizada de los modelos Logístico y de Gompertz para la concentración de proteína.....77
Figura 37. Modelación reparametrizada de los modelos Logístico y de Gompertz para la concentración de ergosterol.....77
Figura 38. RNA obtenidas con el NFTOOL para el conjunto de datos para la concentración de proteína. 78
Figura 39. RNA obtenidas con el NFTOOL para el conjunto de datos para la concentración de ergosterol.....78
Figura 40. Curvas de biomasa con todos los datos analizados en el CFTOOL para la concentración de proteína vs tiempo. 79
Figura 41. Curva de biomasa con todos los datos analizados en el CFTOOL para la concentración de ergosterol vs tiempo.....79
Figura 42. Ajuste de las curvas de biomasa en función del tiempo empleando RNA de forma individual para la concentración de proteína vs tiempo. 81
Figura 43. Ajuste de las curvas de biomasa en función del tiempo empleando RNA de forma individual para la concentración de ergosterol vs tiempo.....81
Figura 44. Secuencia de crecimiento del hongo para una de las réplicas. 84
Figura 45. Correlacion de las concentración de proteína vs áreas 85
Figura 46. Correlacion de las concentración de ergosterol vs áreas 85
Figura 47. Curva de biomasa modelada mediante la ecuación logística A promedio para la concentración de proteína vs área.....88
Figura 48. Curva de biomasa modelada mediante la ecuación logística A promedio para la concentración de ergosterol vs área 88
Figura 49. Comparacion de las curva de biomasa modeladas para la concentración de proteína vs tiempo. 89
Figura 50. Comparacion de las curva de biomasa modeladas para la concentración de ergosterol vs tiempo. 90
Figura 51. FSC montado y funcionando 93
Figura 52. Recipiente donde se lleva a cabo la fermentación en el FSC.....94
Figura 53. Tapa del vaso de fermentación del FSC.....95
Figura 54. Sistema de calentamiento del FSC.....95
Figura 55. Bomba de aire del FSC.....96
Figura 56. Empaques y tapa del FSC 96

Figura 57. Sistema controlador en el FSC 97
Figura 58. Contaminacion de los primeros réplicas en el FSC 98
Figura 59. Resultado del bioproceso del segundo rediseño del FSC 99
Figura 60. Bioproceso del último rediseño del distribuidor de humedad con suministro de aire.....101
Figura 61. Bioproceso del último rediseño del distribuidor de humedad sin suministro de aire.....101
Figura 62. Modelado de crecimiento del Pleurotus pulmonarius en tusa de maíz en el FSC, según el modelo Logístico 107
Figura 63. Modelado de crecimiento del Pleurotus pulmonarius en tusa de maíz en el FSC, según el modelo Gompertz 108
Figura 64. Modelado de crecimiento del Pleurotus pulmonarius en tusa de maíz en el FSC, a través de las RNA 108
Figura 65. % de digestibilidad para el diseño de experimentos en el FSC. 113

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Perfiles de crecimiento para la FES, con sus respectivas Ecuaciónes diferenciales e integradas. 20
Tabla 2. Ejemplos de enriquecimiento proteico de residuos agroindustriales por FES a escala laboratorio y piloto. 33
Tabla 3. Matriz de Diseño de Experimentos cuantitativa 38
Tabla 4. Matriz de diseño de experimentos para el FSC 50
Tabla 5. Caracterización de la tusa de maíz 54
Tabla 6. Medición del IB para evaluar el crecimiento preliminar 57
Tabla 7. Resumen estadístico de los Índices de Blanco para el crecimiento preliminar 58
Tabla 8. Resultado del diseño de experimentos en las cajas de Petri 59
Tabla 9. Tabla Anova del diseño de experimentos en las cajas de Petri para el tamaño de partícula y la temperatura. 60
Tabla 10. Prueba de Tukey para los efectos simples de temperatura y tamaño de partícula con base en los promedios de proteína. 61
Tabla 11. IB para los16 y 30 días 64
Tabla 12. Coeficientes de la ecuación logística en la biomasa para la concentración de proteína vs tiempo 68
Tabla 13. Coeficientes de la ecuación logística en la biomasa para la concentración de ergosterol vs tiempo 69
Tabla 14. Coeficientes del modelo Logístico arrojados por el CFTOOL para los datos en conjunto de la concentración de proteína vs tiempo y el contenido de ergosterol vs tiempo....72
Tabla 15. Comparación de los coeficientes obtenidos réplica por réplica y todos los datos en conjunto....73
Tabla 16. Tabla resumen de la normalización de los modelos Logístico y de Gompertz para las concentraciones de proteína y ergosterol....76
Tabla 17. Parámetros cinéticos para los ajustes Logísticos de proteína y ergosterol 76
Tabla 18. Comparación de los RMSE obtenidos por las RNA, el modelo Logístico y Gompertz para la concentración de proteína y la concentración de ergosterol en función del tiempo para todos los datos en conjunto 80
Tabla 19. Comparación de los RMSE obtenidos por las RNA, el modelo Logístico y modelo de Gompertz para las curvas de crecimiento empleando concentración de proteína y concentración de ergosterol réplica por réplica....82
Tabla 20. Coeficientes de la ecuación logística A en la biomasa para la concentración de proteína vs área....86
Tabla 21. Coeficientes de la ecuación logística A en la biomasa para la concentración de ergosterol vs área 87
Tabla 22. Comparación de los coeficientes de los datos indivuduales y en conjunto en la ecuación logística A para las concentraciones de proteína y ergosterol. 89
Tabla 23. Resultados del diseño de experimentos 2^2 para el contenido proteico de la tusa de maíz en el FSC....102
Tabla 24. Anova para el análisis del FSC. 103

Tabla 25. Prueba de Tukey para las canastas en el FSC.....103
Tabla 26. Prueba de Tukey para el tamaño de partícula en el FSC 103
Tabla 27. Prueba de Tukey para el porcentaje de inóculo en el FSC.....104
Tabla 28. Resultados del % de enriquecimiento de la tusa de maíz del diseño de experimentos en el FSC 105
Tabla 29. Resultados de la productividad de la tusa de maíz del diseño de experimentos en el FSC 106
Tabla 30. Porcentaje de lignina en la tusa de maíz sin inocular e inoculada con *Pleurotus Pulmonarius*.....109
Tabla 31. Porcentaje Deslignificado de la tusa de maíz después de 25 días de inoculación con el *Pleurotus pulmonarius*.....110
Tabla 32. Porcentaje de digestibilidad in vito de la tusa de maíz después de 25 días de inoculación con el *Pleurotus pulmonarius* 111
Tabla 33. Análisis de varianza para la digestibilidad dentro del FSC.....111
Tabla 34. Prueba de Tukey para el tamaño de partícula 112
Tabla 35. Prueba de Tukey paa el porcentaje de inóculo.....112

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Reacción estequiométrica global de crecimiento microbiano. 13
Ecuación 2. Representación matemática de esta neurona. 23
Ecuación 3. La representación matemática de una RNA multicapa 26
Ecuación 4. Calculo de la concentración de nitrógeno con el titulante 35
Ecuación 5. Coeficiente de determinación 38
Ecuación 6. Ecuación del modelo Logístico 40
Ecuación 7. Modelo de crecimiento de Gompertz 40
Ecuación 8. Modelo de crecimiento Logístico reparametrizado 42
Ecuación 9. Modelo de crecimiento de Gompertz reparametrizado 42
Ecuación 10. Periodo de latencia (ʎ) para la ecuación logística 42
Ecuación 11. Velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}) para la ecuación logística 42
Ecuación 12. Máxima concentración de biomasa (A) para la ecuación logística 42
Ecuación 13. Periodo de latencia (λ) según el modelo de Gompertz 42
Ecuación 14. Velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}) según el modelo Gompertz 42
Ecuación 15. Máxima concentración de biomasa (A) según el modelo Gompertz 42
Ecuación 16. Ecuación Logística A 43
Ecuación 17. Porcentaje de proteína ganada 50
Ecuación 18. Productividad del FSC 51
Ecuación 19. Factor de escalizado de la RNA para la concentración de proteína .52
Ecuación 20. RNA para la concentración de proteína en el FSC 52

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Método de medición modificado de lignina Klason 137
ANEXO B. Algoritmo para la medición del índice de blanco (IB) 140
ANEXO C. Curva de calibración de proteína por el método de Biuret.....142
ANEXO D. Ejemplo curva de calibración en HPLC.....143
ANEXO E. Algoritmo de medición de las áreas del micelio en cajas de Petri.....144
ANEXO F. Acotado del FSC (cm).....146
ANEXO G. Comportamiento de la humedad y la temperatura para dos ensayos al azar en el interior del FSC 149

RESUMEN

El componente proteico es el más costoso en la formulación de los concentrados para ganado, por la cual es necesario buscar fuentes alternativas para suplir la proteína en las dietas de los animales, que está destinado a producir alimentos para humanos. Como alternativa para la producción de proteínas, están las proteínas unicelulares (PUC); una de las formas de producir PUC es a través de los hongos comestibles o setas a partir de las especies *Pleurotus spp,* dentro de la que se destaca el *Pleurotus pulmonariu*s, el cual se produce sobre residuos lignocelulósicos que pueden proceder de residuos de poscosecha de cultivos comercialmente importantes como el maíz. Uno de los residuos de la poscosecha del maíz es la tusa que corresponde aproximadamente al 40% de la mazorca. El proceso en que se lleva a cabo la producción de los hongos comestibles, es la fermentación en estado sólido (FES); ésta se define, como un proceso de fermentación que es desarrollado en un material no soluble que sirve como soporte y fuente de nutrientes en ausencia de fase líquida. La FES se ha empleado en procesos como el compostaje, el ensilaje, producción de enzimas, combustibles, alimentos humanos y para animales, para la degradación de tintas de la industria papelera, entre otros. Este trabajo pretende evaluar un proceso para la obtención de un producto proteico con el *Pleurotus pulmonari*s por medio de la FES, empleando como sustrato la tusa de maíz.

En el trabajo se llevó a cabo una caracterización de la tusa de maíz, luego la determinación preliminar del crecimiento del basidiomiceto, evaluando las variables humedad, pH y contenido de minerales, sobre tusa de maíz, en caja de Petri. Posteriormente se evaluó la influencia de la temperatura y el tamaño de partícula a través de un diseño de experimentos factorial 2^2 en caja de Petri. Con los resultados obtenidos se modeló el crecimiento del *Pleurotus pulmonari*s en caja de Petri, midiendo la biomasa celular a través de los métodos indirectos concentración de proteína y de ergosterol. Los datos se analizaron replica por replica y en conjunto ajustándolos a los modelos Logístico y de Gompertz, además por redes neuronales artificiales (RNA). Adicionalmente, se empleó el procesamiento digital de imágenes (PDI), como herramienta para evaluar el crecimiento del *Pleuroturs pulmonarius* en caja de Petri y para medir el crecimiento del basidiomiceto en la caja de Petri a través del diámetro de crecimiento del micelio. Para los análisis de los datos se emplearon los softwares Matlab, R y el Zunzun.com. Para los análisis estadísticos de empleó el STATGRAPHICS Centurion XV. Con los resultados del ajuste con el modelo Logístico y de Gompertz se obtuvieron los parámetros biológicos de crecimiento: velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}), período de latencia (λ) y la concentración máxima de biomasa (C_{max}). Una vez modelado el crecimiento del *Pleuroturs pulmonarius* sobre tusa de maíz en caja de Petri, el procedimiento se escalizó a un fermentador sólido de columna (FSC). En el FSC, se evaluó la producción de proteína sobre la tusa de maíz con un diseño de experimentos factorial 2^2, evaluando como variables independientes posición de la canasta en el FSC, el

tamaño de partícula y el porcentaje de inóculo. Adicionalmente, se evaluó el porcentaje de enriquecimiento proteico, la productividad del FSC, la deslignificación y la digestibilidad *In Vitro*. La cinética de crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* en el FSC, se modeló escalizando el crecimiento obtenido en la caja de Petri.

La composición de la tusa de maíz, muestra que es un alimento pobre para alimentación animal. De la evaluación del crecimiento preliminar con PDI, se derivó que la humedad y la presencia de sales fueron estadísticamente significativas. De la evaluación del tamaño de partícula y la temperatura en el crecimiento del *Pleurotus pulmonarius*, sobre la tusa de maíz en la caja de Petri, se determinó, que tanto los efectos principales como la interacción tuvieron efecto significativo. Lo anterior permitió deducir que las condiciones de la FES para el *Pleurotus pulmonarius*, sobre la tusa de maíz en la caja de Petri fueron: humedad del 80 %, pH de 8, un tamaño de paticula de 2450 µm a 25 °C con presencia de sales. La modelación del crecimiento arrojó que para el análisis replica por replica para la concentracion de proteina, se obtuvo un r^2 ajustado de 0,9937 y para la concentración de ergosterol de 0,9872, indicando que un buen ajuste; para todos los datos en conjunto los ajustes fueron de 0,958 y 0,828 respectivamente; de esta forma el ajuste del ergosterol bajo considerablemente. Para el análisis con las RNA, los RMSE promedios para el análisis replica por replica, en la concentración de proteina fueron de 0,0640 y para la concentración de ergosterol de 3,6701. Para los datos en conjunto, la concetración de proteina arrojó un RMSE 0,017, mientras que para la concentración de ergosterol el valor fue de 11,394; del análisis con las RNA, se deriva que los resultados evaluados con la concentración de proteína fueron menos dispersos que los de la concentración de ergosterol. Con el PDI, para la medición de la biomasa en FES, se ajustó al modelo matemático Logístico A con un r^2 ajustado de 0,985 para los datos replica por replica y 0,963 para los datos en conjunto, con la concentración proteína. Para la concentración de ergosterol los r^2 ajustados fueron de 0,974 y 0,897 respectivamente.

En el escalado del FSC, el análisis del diseño de experimentos indicó que la posición de la canasta, tamaño de partícula y porcentaje de inóculo, tienen un efecto estadísticamente significativo. La mejor concentración de proteína se obtuvo en la C1, con la combinación el tamaño de partícula 901 µm (fino) con 20% de inóculo, obteniendo un % de enriquecimiento proteico promedio de 335.788% y una productividad promedio de 12,226 g proteína / g Sto * d *L. De otro lado, en el FSC, se obtuvo un 18,553% de deslignificación y los valores de digestibilidad más altos se observaron en las muestras correspondientes a la combinación tamaño de partícula 901 µm (fino) y 20% de porcentaje de inóculo, en la C1 con un valor de 28,52 ± 0,498%; con ese valor la digestibilidad aumentó en un 142,52%, indicando un mejoramiento de la tusa de maíz como alimento para ganado.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia es un país que cuenta con alrededor de 5 millones de hectáreas cultivadas, de los cuales se derivan una cantidad considerable de residuos lignocelulósicos. Estos residuos provienen de cultivos económicamente importantes como son arroz, yuca, maíz, palma africana, algodón y caña de azúcar (Gonzalez, E., 2006). Para el caso del maíz, en Colombia se reportó para el año 2013, una producción de 1´560.000 t (FENALCE, 2010). Se estima que los residuos de la mazorca de maíz pueden ser hasta un 40 % en los que se incluye la tusa de maíz, es decir 624.000 t de residuos en el año 2012 (Oviedo, Juan et al., 2010). Estos residuos de maíz, pueden ser utilizados como sustratos para la fermentación en estado sólido, para la producción de bioetanol(Chu et al., 2012), producción de xilanasas(Garai & Kumar, 2013), pigmentos para textiles(Velmurugan et al., 2011), ensilaje (Paliwal, R. Granados, G. Lafitte, H. Violic, A., 2001), fructo-oligosacáridos(Chapla, Pandit, & Shah, 2012), entre otros.

Las proteínas son sustancias orgánicas que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, que tienen funciones catalíticas, reguladoras, de transporte, estructurales, defensivas, de reserva y energéticas (Mataix, J., 2009) (Latham, M., 2002). Sus unidades más simples se denominan aminoácidos, algunos de los cuales son esenciales para el organismo; es decir, que necesariamente han de ser ingeridos junto con la dieta, ya que el cuerpo no es capaz de producirlos por sí solo, a la velocidad que el organismo lo necesita. Son los alimentos más escasos y de mayor precio y pueden obtenerse de fuentes animales, vegetales o microbianas (Badui, S., 2006).

Las proteínas de origen animal, especialmente las procedentes de ganado, son las más costosas y lentas de producir; en ganadería, cada siete kilos de las proteínas de los piensos se convierten en un kilo de proteínas animales (Primo, E., 1998). De otro lado, la industria que produce alimentos para animales, se encuentra constantemente en búsqueda de nuevos productos que puedan obtenerse en cantidades suficientes y en la mayor brevedad posible para la formulación de sus piensos, sobre todo a base de proteína (GEN, 2008).

El crecimiento de la población, especialmente en las naciones en vías de desarrollo es abrumador esperándose en la primera década del siglo 21 que la población mundial alcance entre cinco y seis billones de personas. La agricultura y ganadería convencional muy posiblemente no sean capaces de suplir la demanda proteica de esta emergente población, proyectándose que el planeta necesitará producir entre los años 1980- 2015 una cantidad de productos agrícolas igual a los generados a través de la historia antes de esa fecha (Chacón, A., 2004). El alimento animal puede presentar una marcada escasez futura, dado que

se necesitará más ganado para suplir la muy abrumadora demanda. Además, la adecuada alimentación animal es un ítem de elevado costo, lo que es determinante en la producción (Suharto, I. Redyowati, S, 1999). Lo anterior conlleva a que se deben buscar fuentes alternativas de proteína para alimentación animal.

La proteína unicelualr (PUC) o SCP (por sus siglas en inglés, single cell protein), se refieren a proteínas producidas por procesos de fermentación controlada por hongos, bacterias, y algas unicelulares y filamentosas (Tacon, A., 1989). Las PUC pueden ofrecer una alternativa para remplazar algunas de las fuentes tradicionales de proteína (soya, harina de pescado, suero descremado de leche) en piensos para el consumo animal. La PUC, ayudarían a solventar el problema de la cada vez más limitada disponibilidad e ingesta de proteína (Phetteplace, H. Jarosz, M. Uctuck, D. Spolrleder, R, 2003).

Una de las alternativas para la obtención de PUC, son los hongos comestibles o setas. Dentro de las setas comestibles se destacan la especies del *Pleurotus spp*., también conocidas con el nombre común o vulgar de seta común, seta de ostra u orellanas; es un basidiomiceto que pertenece al reino fungi. Las especies más conocidas son *Pleurotus pulmonaris* y *Pleurotus ostreatus*. Es una seta de la madera en descomposición, generalmente madera de chopo. La organización para la alimentación y la agricultura (FAO), indicó que la producción mundial de hogos comestibles es de 7 millones de toneladas (Zhang, et al, 2013). Su producción se ha incrementado en los últimos años, debido a que es un alimento completo en cuanto a sus componentes de proteína, micro nutrientes como las vitaminas y compuestos medicinales que pueden ser empleados en aliviar dolores y estimular la circulación, además que ha sustituido parcialmente alimentos convencionales como la soya y la carne. Para la producción de orellanas, usualmente se emplean sustratos lignocelulósicos, en la mayoría de los casos residuos de poscosecha o agroindustriales tales como pastos, residuos de café, caña, fique, maíz, entre otros (Chang, 1999), (Oei, P., 2003), (Scragg, A., 2004). Las especies de *Pleurotus spp*, han sido empleadas para enriquecer sustratos lignocelulosicos con el objeto de convertirlos en alimento para animal. Tal es el caso del cultivo de *Pleurotus eryngii* en bagazo de caña (Okano et al, 2007), *Pleurotus ostreatus* en bagazo de azúcar, cáscaras de almendros o nogales, residuos de maíz, orujo de uvas, residuos del procesamiento de algodón, residuos de la semilla de oliva, hojas de árboles (Koutrotsios et al, 2014), *Pleurotus sajor caju* en paja de trigo y torta de jatrofa, *Pleurotus pulmonarius* en residuos de sorgo (Length, 2010) entre otros.

El cultivo industrial de los hongos comestibles puede hacerse en fermentaciones líquidas o sólidas. La fermentación líquida es aquella donde los componentes solubles en agua se convierten en el nutrimento o sustrato; el cual es empleado por el microorganismo para su metabolismo y la producción de un metabolito de interés (Brand et al, 2004). Por su parte la fermentación en estado sólido (FES)

que involucra una matriz sólida y es llevada a cabo en ausencia o casi ausencia de agua libre. Sin embargo, el sustrato debe poseer la cantidad suficiente de agua para poder permitir el crecimiento y el funcionamiento del metabolismo del microorganismo. La matriz sólida puede ser fuente de nutrientes o simplemente un soporte donde se impregnen estos para permitir el desarrollo del microorganismo (Singhania et al, 2009; Padey et al, 2008). Históricamente, las primeras fermentaciones en estado sólido fueron para la elaboración del pan, queso, el compostaje y la conservación de forrajes. Algunas de las aplicaciones de la FES son la producción de etanol, proteína unicelular, setas, enzimas, ácidos orgánicos y proteínas (Padey et al, 2008). Los procesos de FES, involucran como principales variables la temperatura, actividad acuosa, tamaño de partícula, entre otros. La FES tiene inconvenientes como el escalado de procesos, entre otros (Mitchell, von Meien, Krieger, & Dalsenter, 2004). Dentro de los problemas que tiene la FES, se destacan los inconvenientes para medir la biomasa, su modelación y el escalado de los procesos entre otros (Thomas, Larroche, & Pandey, 2013), (Padey, 2008).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, este trabajo pretende evaluar un proceso para la obtención de un producto proteico con el *Pleurotus pulmonari*s por medio de la FES, empleando como sustrato la tusa de maíz. Para lo cual, se determinarán las características fisicoquímicas de la tusa maíz; se establecerán las condiciones preliminares del crecimiento del basidiomiceto en la tusa de maíz en la caja de Petri, evaluando como variables humedad, pH, presencia de sales, tamaño de partícula y temperatura. Se modelará el crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* en caja de Petri. Una vez llevada a cabo la modelación del comportamiento del crecimiento, se diseñará y construirá un biorreactor para FES tipo columna para la producción de proteína fúngica; se evaluará el efecto del tamaño de partícula y el porcentaje de inoculo frente a la producción proteica a partir de *Pleurotus pulmonariu*s en un fermentador sólido; finalmente se modelará la producción de proteína en el fermentador a partir de la tusa de maíz con *Pleurotus pulmonari*s a través del escalizado de la modelación del crecimiento del basidiomiceto en caja de Petri.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un producto proteico a partir de marlo de maíz por fermentación en estado sólido empleando *Pleurotus pulmonari*s

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Determinar las características fisicoquímicas y bromatológicas de la tusa de maíz.
- Evaluar el efecto de la temperatura, el pH y la humedad frente a la producción proteica a partir de *Pleurotus pulmonari*s sobre la tusa de maíz en caja de Petri.
- Modelar el crecimiento del *Pleurotus pulmonari*s sobre tusa de maíz en caja de Petri.
- Diseñar y construir un biorreactor para FES tipo para la producción de proteína fúngica.
- Evaluar las variables del proceso para la producción de proteína en el fermentador sólido sobre la de maíz con *Pleurotus pulmonari*s con un diseño de experimentos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 EL MAÍZ

La planta de maíz tropical, tiene abundantes hojas y un sistema radical fibroso, normalmente con un solo tallo que tiene hasta 30 hojas. Se pueden desarrollar una o dos yemas laterales en la axila de las hojas en la mitad superior de la planta; las cuales terminan en una inflorescencia femenina la cual se desarrolla en una mazorca cubierta por hojas que la envuelven; esta es la parte de la planta que almacena reservas. En la parte superior de la planta termina en una inflorescencia masculino; esta tiene una espiga central prominente y varias ramificaciones laterales con flores masculinas, todas las que producen abundantes granos de polen (Paliwal et al, 2001). La Figura 1, muestra una planta de maíz.

Figura 1. Planta de Maíz tropical. Fuente: (Paliwal et al, 2001).

El maíz tiene una gran variabilidad en el color del grano, la textura, la composición y la apariencia. Económicamente, los tipos más importantes de maíz cultivados para grano o forraje y ensilaje caen dentro de las categorías más importantes que son maíz duro, reventón, dentado, harinoso, cerosos, dulces, “baby” y con proteínas de calidad (Paliwal et al, 2001).

Actualmente es el cereal más plantado en el mundo con un volumen de producción que supera al trigo y el arroz, ocupando aproximadamente 140´000.000 ha. La producción mundial de maíz entre los años 2009 y 2010 fue de 795´935.000 de t; siendo el 90% maíz amarillo y el 10% maíz blanco. Colombia produjo en el año 2013 1´685.725 t (FENALCE, 2010), con una superficie sembrada de 485.935 ha (FENALCE, 2010) . Del cultivo del maíz en Colombia, dependen económicamente unas 400.000 familias (FENALCE, 2008). Los departamentos con mayor producción son Antioquia, Córdoba, Tolima, Santander y Cundinamarca (FENALCE, 2008), aunque se produce en todo el país debido a su facilidad de adaptación agroecológica.

3.1.1 La Tusa de maíz

Los residuos que se obtienen de la planta de maíz son: el rastrojo, formado por los troncos de los tallos y las raíces, el cual es usado como abono en el mismo terreno. Las hojas y los tallos secos son empleados para forraje, además del maíz una vez se desgrana. También está la tusa, que se obtiene una vez se desgrana la mazorca o el elote, tal como se muestra en la Figura 2 (Maíz y Milpa, 2009)

Figura 2. Tusa de maíz. Fuente: **(Beltran, A. Pineda, J., 2010)**

La tusa constituye alrededor del 40% del cuerpo completo (mazorca – granos – capacho), por lo que se destaca su gran generación dentro de la producción del cultivo de maíz (Beltran, A. Pineda, J., 2010).

La tusa de maíz, se ha empleado para diversas aplicaciones; se han reportado trabajos que han empleado tusa de maíz, a través de réplicas para producción de alimentos animales o suplementos de éstos y fertilizantes (Méndez et al., 2004; Alves et al., 2013). De otro lado, se han reportado aplicaciones industriales a la tusa de maíz (Ortiz et al, 2007)como son la producción de furfurales, xilosa, elaboración de productos abrasivos y de limpieza, producción de etanol, elaboración de ladrillos y cerámicas, producción de carbón activado, producción

de nanofibras, para la remoción de metales pesados, entre otros (Liu et al., 2010; Nasiruddin Khan & Farooq Wahab, 2007; Sun & Webley, 2010; Ziglio, Beatriz. Mazile, Jose. Branco, I. Bastos, R. Rigo, 2007).

3.2 PROTEÍNA UNICELULAR

El término proteína unicelular se emplea para referirse a microorganismos tales como bacterias, levaduras, algas y hongos filamentosos, que son empleados para la producción de proteína para en alimentación humana o animal. El hombre ha consumido microorganismos presentes en alimentos fermentados desde hace siglos y más recientemente, empleó para consumo animal microorganismos derivados de la producción de cerveza y de bebidas alcohólicas (Crueger, W. Crueger, A., 2000).

La proteína unicelular puede generarse a través del crecimiento de un amplio número de especies diferentes de hongos, algas, levaduras y bacterias. Puede denotarse que el principal valor de la biomasa microbiana es su aporte de proteína, teniendo en cuenta que la proteína bacteriana es nutricionalmente similar a la proteína del pescado, mientras que la de levadura mantiene similitudes con la de soya (Crueger, W. Crueger, A., 2000), (Bañez, J, 2010)

A partir de la biomasa microbiana pueden desarrollarse muchos productos derivados dada su riqueza composicional: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, entre otros. El uso de la proteína unicelular en alimentos para animales es el más inmediato y menos tecnificado de todos. Generalmente implica un secado de la biomasa previamente a la inclusión en fórmulas nutricionales (Bañez, J, 2010) (Crueger, W. Crueger, A., 2000) (Garcia, M. Quinetero, R. Lopez, Agustin, 2002).

Principalmente se emplea la producción de proteína unicelular como método alternativo para suplir necesidades alimenticias, debido al alto costo de las fuentes tradicionales. Para la producción de proteína unicelular se han empleado residuos agroindustriales como sustrato para sus fermentaciones, como son desechos de vinaza, desechos de harina de maíz precocida, entre otros. Sin embargo, por el alto costo de su producción, sólo es competitivo en ciertas circunstancias con respecto de las proteínas de origen vegetal (Bañez, J, 2010) (Crueger, W. Crueger, A., 2000) (Garcia, M. Quinetero, R. Lopez, Agustin, 2002).

Bacterias de los géneros *Methilomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Aerobacter* tuvieron en los años 60 gran interés debido a su alta velocidad de duplicación y alto contenido proteico, pero el incremento del costo de los sustratos (metano, metanol, hidrocarburos) limitaron su aplicación. De otro lado, ciertas especies de levaduras, como *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromycees*

fragilis (*K.marxianus*) han sido aceptadas para alimentación humana y producidas continuamente desde la Segunda Guerra Mundial. En la actualidad se producen comercialmente los hongos *Gliocladium deliquescens*, *Paecilomyces varioti* y *Fusarium graminearum* y las algas *Spirulina* y *Chlorella* (Bañez, J, 2010) (Crueger, W. Crueger, A., 2000) (Garcia, M. Quinetero, R. Lopez, Agustin, 2002).

Otra de las alternativas para producción de proteínas unicelulares, son las setas; éstas se definen como cuerpos fructíferos distintivos que pueden ser epígeo (sobre la tierra) o hipógeo (dentro de la tierra), y pueden ser lo suficientemente grandes para poder recogerse manualmente (Herrera, T. Ulloa, M., 2004).

3.3 FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

La fermentación en estado sólido, se puede definir como un proceso de fermentación que es desarrollado en un material no soluble que sirve como soporte y fuente de nutrientes en ausencia de fase líquida (Udo Hölker & Lenz, 2005; Rodríguez Couto & Sanromán, 2005; Velmurugan et al., 2011). La humedad necesaria en las fermentaciones sólidas, es absorbida por la matriz sólida, lo cual se presenta como una ventaja para el crecimiento microbiano debido eficiencia en los procesos de transferencia de oxigeno(Raghavarao, Ranganathan, & Karanth, 2003). Se pueden emplear soportes de tipo natural o inertes(Pandey, Soccol, & Mitchell, 2000). Ejemplos de FES son el compostaje, el ensilaje(Rodríguez Couto & Sanromán, 2005), producción de enzimas(Pandey et al., 2000), combustibles, alimentos humanos y para animales y para la degradación de tintas de la industria papelera (Rodríguez Couto & Sanromán, 2005), entre otros.

Dentro de las características de la FES, se destaca la utilización de cultivos mixtos de microorganismos, opción que no puede ser empleada en las tradicionales fermentaciones sumergidas. Esta característica hace que durante el crecimiento la unión de microorganismos secreten un amplio rango de enzimas, por ejemplo la combinación de los hongos filamentosos y levaduras han sido empleados en conjunto para la sacarificación y fermentación simultaneas(Raimbault, 1998). Otras características de la FES, es que emplea un consumo mínimo de agua, lo que suprime el uso de agentes antiespumantes; tiene baja producción de efluentes y la posibilidad de llevar a cabo el proceso bajo condiciones semi-estériles.

La FES tiene importantes ventajas a nivel económico e industrial comparado con otros bioprocesos. A continuación se mencionan algunas de las ventajas de este proceso(Raimbault, 1998), (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008), (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006).

- Baja inversión de capital. Esta característica hace que este proceso tenga potencial en los países en vía de desarrollo gracias a que los sustratos

están localmente disponibles (principalmente residuos agroindustriales) y tecnología básica puede ser empleada en áreas rurales obteniendo buenos resultados.

- Reducción de los requerimientos de energía, debido a que en la mayoría de los casos, no requieren control de temperatura.
- Medios de cultivo simples, que no necesariamente deben contener suplementos nutricionales o reactivos de alto costo.
- Las materias primás de los sustratos, provienen de desechos agroindustriales, lo que hace que se obtengan a bajo costo y en grandes cantidades.
- Los procesos de remoción de calor son relativamente eficientes, debido a que los procesos aireación son sencillos.
- En muchos casos el material fermentado, es posible almacenarlo sin ninguna operación unitaria, como el secado.

Las principales desventajas de la FES son (Durand, 2003), (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006)

- Dificultades en el escalado de bioreactores. La gran mayoría de las investigaciones sobre las FES se han llevado a cabo a escala de laboratorio[57], teniendo pocos trabajos donde se hayan tratado aspectos de ingeniería y escalado de bioreactores.
- Baja eficiencia del mezclado.
- Dificultad para controlar los parámetros del proceso
- El pH es difícil de monitorear durante la FES y se dificulta su control a lo largo del proceso. Por esto es necesario emplear microorganismos que posean un rango amplio de pH que incluya el óptimo al cual crece sin dificultades (Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S. and Banerjee, 2005)
- Problemas de transferencia de masa y calor**:** la eficiencia, productividad y economía de un proceso fermentativo en estado sólido, depende en gran parte de factores como el fenómeno de transferencia de masa y calor. La transferencia de masa depende de la naturaleza y tipo de microorganismo y su respuesta al ambiente en donde se está desarrollando (Prabhakar, A.*, Krishnaiah, K., Janaun, J. and Bono, 2005). La generación de calor debida a las actividades metabólicas de los microorganismos, la cual es deseada en los procesos de compostaje y ensilaje, afecta de forma considerable los procesos biotecnológicos por la gran cantidad de enzimas producidas durante la fermentación que pueden ser desnaturalizadas al final del proceso (Muller dos Santos, Souza da Rosa, Dal'Boit, Mitchell, & Krieger, 2004). Las altas temperaturas (cercanas a los 70°C) pueden afectar la porosidad del empaque del sustrato, afectando la esporulación y crecimiento de los microorganismos (Prabhakar, A.*, Krishnaiah, K., Janaun, J. and Bono, 2005).

- La separación y cuantificación de la biomasa es un gran reto en las fermentaciones en estado sólido (FES) (Rani & et al., 2009), para lo cual son esenciales los estudios cinéticos. Existen varios métodos como la estimación de la glucosamina, estimación del ergosterol, contenido proteico, cambios en el peso seco y evolución del CO_2, pero todos presentan inconvenientes a la hora de obtener datos precisos sobre el desarrollo del proceso fermentaciones en estado sólido.
- Los costos en la recuperación de los productos son más elevados si se emplean soportes naturales (Singhania, Patel, Soccol, & Pandey, 2009), teniendo en cuenta que su empleo supone una reducción en los costos de producción y con regularidad los resultados obtenidos son mucho mejores comparados con resultados empleando un medio artificial.
- La existencia de pocos diseños disponibles para la operación de bioreactores en condiciones de estado sólido (Rodríguez Couto & Sanromán, 2005).

3.3.1 Parámetros del Proceso

Los principales factores que influyen en el desarrollo de las FES y que es necesario controlar para la optimización del proceso son: tamaño de la partícula, nivel de humedad, actividad acuosa, pH, temperatura, fuente de carbono y las relaciones Carbono/Nitrógeno**,** aireación y agitación.

- Tamaño de partícula: este parámetro afecta la tasa de colonización de los microorganismos, penetración del aire, remoción de CO_2 y extracción del producto de interés. El tamaño óptimo de partícula algunas veces representa un compromiso entre el acceso a los nutrientes y la disponibilidad del oxígeno (Manpreet, et al., 2005). Generalmente tamaños de partícula muy pequeños ofrecen una gran área superficial para que el microorganismo pueda actuar, pero se puede presentar la aglomeración y como consecuencia, pobre crecimiento microbiano. Cuando las partículas son más grandes hay mejor aireación pero limitada área superficial para el ataque microbiano.

- Nivel de humedad: si el nivel de humedad es insuficiente, no hay una buena difusión de los gases dentro del sustrato, lo que puede ocasionar que el metabolismo celular disminuya o se detenga. La falta de humedad no permite el mantenimiento de las propiedades funcionales de algunas enzimas, lo que crea desequilibrio en la cadena metabólica celular (Gervais & Molin, 2003).

- Actividad acuosa: Es uno de los factores más críticos en una FES (Rodríguez Couto & Sanromán, 2005). Por definición la actividad acuosa (a_W) es la cuantificación del grado de interacción del agua con los demás

componentes del sustrato. Para el agua pura el a_W es 1 y disminuye con la adición de solutos. Las bacterias pueden crecer a valores altos de A_W, mientras los hongos filamentosos y algunas levaduras pueden crecer con bajos a_W (0.6-0.7). Se ha establecido en el caso de las bacterias que la humedad de matriz sólida, no puede ser superior del 70% (Pandey, Soccol & Larroche, 2008); en el caso de las levaduras la humedad puede estar entre un 60-72% (Padey, 2008)y en el caso de los hongos filamentosos, la humedad óptima está entre un 40-80% (w/w), teniendo en cuenta que para un mismo organismo creciendo en diferentes sustratos, el nivel óptimo de humedad puede variar significativamente, la a_w es un factor que puede modificar la predicción del crecimiento (Manpreet, et al., 2005). La a_W también afecta la formación, calidad y características del producto (Padey, 2008).

- Temperatura: El crecimiento microbiano en las FES genera una cantidad significativa de calor que está directamente relacionado con el comportamiento y control de la temperatura dentro del reactor (Dalsenter, Viccini, Barga, Mitchell, & Krieger, 2005) . La temperatura puede aumentar rápidamente, porque la capacidad calórica en la masa fermentada es mucho menor que en el agua. Sin embargo, el calor generado debe ser disipado rápidamente ya que la mayoría de los microorganismos empleados son mesófilos y crecen entre 20 y 40°C y su crecimiento máximo se presenta por debajo de los 50°C (Manpreet, et al., 2005). El aumento de la temperatura tiene un impacto negativo en el proceso, y se ve reflejado principalmente en:

    - Actividad microbiana que se puede acelerar o detener.
    - La deshidratación del medio de cultivo.
    - Problemas en el metabolismo, como defensa ante el calor o la deshidratación.

  El control de la temperatura se ha llevado a cabo empleando métodos convencionales que incluyen el intercambio de calor por los mecanismos de conducción y convección forzada, siendo estos últimos no tan efectivos como los mecanismos de conducción. Los métodos de extracción de calor por convección requieren elevadas tasas de aireación que pueden afectar la humedad del medio. Los métodos no convencionales se refieren al empleo del calor latente de vaporización del agua para eliminar el calor metabólico de forma rápida sin causar daño al micelio (Beltran, A. Pineda, J., 2010)

- pH: El pH del sustrato es uno de los factores más importantes y es determinante en el crecimiento microbiano y la actividad metabólica en las FES (Velmurugan et al., 2011). Cada microorganismo posee un rango de pH en el cual su crecimiento y desarrollo es el deseado. El control del pH es uno de los Problemas que no han sido resueltos en las FES, esto se debe a

la existencia de gradientes de pH por las características heterogéneas del proceso (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008) como la elección de la fuente de nitrógeno, que marca una tendencia en el comportamiento del pH (Gervais & Molin, 2003). Una solución parcial al problema de la variabilidad del pH durante el proceso fermentativo es la formulación del sustrato considerando la capacidad buffer de algunos componentes que son empleados o al uso de soluciones buffer que no tengan influencia negativa en la actividad biológica del microorganismo. Se reporta que los rangos de pH para el crecimiento de las hongos está entre 3.5-6.0, levaduras entre 4.5-7.0 y el rango de las bacterias es un poco por encima de las ultimás (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008). Con algunas excepciones como el *Lactobacillus sp*. que puede crecer con un pH cercano a 2.

- Aireación y Agitación: Estos factores son importantes en las FES por la demanda de O_2 en los procesos aeróbicos y el fenómeno de transporte de masa y energía en los sistemas heterogéneos. La aireación tiene dos funciones fundamentales: suministrar el oxígeno para los procesos metabólicos y la remoción de CO_2, calor, vapor de agua y compuestos volátiles producidos durante el metabolismo (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008). La tasa de aireación depende de la porosidad del medio empleado. Un aspecto para tener en cuenta es la calidad del aire que es suministrado a la entrada del fermentador, en particular la humedad del aire. Se puede emplear aire saturado para evitar el secado del sustrato o evitar cambios en la a_W. Lo heterogéneo del sustrato puede hacer que se presenten canalizaciones de aire lo que genera zonas no aireadas y como consecuencia cambios no deseados en el metabolismo celular. Una solución al problema anterior puede ser la agitación, pero puede afectar la integridad de las células, especialmente en el caso de los hongos donde se presenta daño del micelio.

- Fuente de carbono y relación carbono nitrógeno (C/N): el tipo y fuente de carbono y nitrógeno es uno de los factores más importantes para cualquier proceso fermentativo (Padey, 2008). La fuente de carbono representa la fuente energética que el microorganismo tiene disponible para su crecimiento. Por lo tanto para formular el medio, se debe tener en cuenta la composición de la biomasa (40-50% carbono, 30-50% oxígeno, 6-8% hidrogeno y 1-3% nitrógeno y otros elementos como fósforo, azufre y metales están en cantidades tan pequeñas que no tiene significancia particular) (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008). El nitrógeno es otro factor crucial que determina el crecimiento de los microorganismos y necesita ser calculado o determinado para obtener la cantidad máxima de biomasa. Normalmente, la relación adecuada de C/N en los procesos fermentativos es de 16 (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008), por lo que es muy importante conocer la composición de la biomasa y el

desarrollo esperado durante el proceso, teniendo en cuenta que si no se tienen excesos de materiales en el proceso se obtiene al final residuos que incrementan el costo de producción.

3.3.2 Medición de la Biomasa en FES.

La estimación de la biomasa, un factor esencial para los estudios cinéticos. La biomasa, se puede evaluar de forma directa e indirecta. Cuando se hace una evaluación directa de la biomasa, se debe buscar hacer una extracción de la biomasa del soporte. La recuperación completa de la biomasa fúngica solo es posible bajo circunstancias artificiales y con medios de cultivo que eviten la penetración de la hifa dentro del sustrato. En el caso de las FES, se emplean observaciones microscópicas para hacer una estimación del crecimiento fúngico. El microscopio electrónico de barrido es una herramienta útil para observar el grado de crecimiento en las fermentaciones en estado sólido. Otra herramienta útil es el "microscopio confocal", que se basa en una reacción específica de la biomasa con pruebas específicas del fluorocromo, dando como resultado imágenes en 3D de la biomasa que pueden abrir nuevas maneras de apreciar y medir la biomasa *in-situ* en un futuro cercano (Raimbault, 1998). La ecuación 1 describe la reacción estequiométrica global para el crecimiento microbiano:

Ecuación 1. Reacción estequiométrica global de crecimiento microbiano.

$$Fuente\ de\ carbono + Agua + Oxígeno + Fósforo + Nitrógeno = Biomasa + CO_2 + Metabolitos + Calor$$

La variación en cada uno de los componentes está estrictamente relacionada con los cambios de los otros cuando todos los coeficientes se mantienen constantes. Por lo tanto la medición de uno permite la determinación de la evolución de los otros. Es importante que esta ecuación aplica cuando se considera que no existen variaciones entre los microorganismos, es decir cuando se utiliza un modelo no segregado y no estructurado.

La mayoría de los métodos empleados y considerados útiles para la estimación del crecimiento microbiano en las FES, incluyen réplicas de componentes como ADN, glucosamina, ergosterol y proteína o los réplicas de la actividad metabólica (respirometría) (Ooijkaas, Tramper, & Buitelaar, 1998).

Por su parte, en la medición indirecta de la biomasa se destacan los siguientes procesos:

- Metabolismo respiratorio: el consumo de oxígeno y la liberación de dióxido de carbono resulta del proceso de respiración; el proceso metabólico

mediante el cual los microorganismos aerobios obtienen la mayor parte de la energía necesaria para su crecimiento. Estas actividades metabólicas están asociadas por lo tanto al crecimiento y pueden ser empleadas para la estimación de la síntesis de la biomasa (Raimbault, 1998). Cuando el carbono dentro del sustrato es metabolizado, éste se convierte en biomasa y dióxido de carbono. La producción de dióxido de carbono hace que el peso del sustrato fermentado disminuya durante el crecimiento, y la cantidad de peso perdido pueda relacionarse con el crecimiento microbiano. La estimación del crecimiento usando el dióxido de carbono liberado o la tasa de consumo de oxígeno asume que el metabolismo de estos compuestos está relacionado con el crecimiento microbiano, lo cual significa que la cantidad de biomasa producida por unidad de gas metabolizado puede ser constante (Raimbault, 1998). La medición de la evolución del dióxido de carbono o el consumo de oxigeno es más útil cuando son unidas empleando un modelo de correlación, el cual se emplea para relacionar la biomasa con un parámetro que sea de fácil medición.

- Producción de enzimas extracelulares o metabolitos primarios: otra actividad metabólica que puede ser asociada con el crecimiento es la producción extracelular de enzimas. Frecuentemente se observan buenas correlaciones entre el crecimiento microbiano y la producción de ácidos orgánicos, el cual puede ser medido mediante la estimación del pH o la correlación empleando análisis de los extractos en cromtatografia líquida de alto rendimiento. (HPLC, por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography).

- Contenido de proteína: puede determinarse el contenido de proteína empleando métodos colorimétricos como Lowry (Becker, 1996), Biuret (Williams et al., 2003) o Kjeldahl, en este caso el contenido de proteína es 6.25 veces el valor de nitrógeno. Los valores de proteína medidos con el método de Biuret y Kjeldahl son similares, pero hay que prestar atención a los datos reportados por el método Biuret para las fermentaciones en estado sólido por las interferencias que se pueden presentar por el almidón presente en el sustrato (Raimbault, 1998).

- Ácidos nucleicos: el contenido de ADN ha sido empleado para estimar la biomasa en las fermentaciones en estado sólido. El método se calibra empleando contenido de ADN del micelio contenido en un cultivo sumergido. El contenido de ADN es más alto durante las etapas tempranas de crecimiento y luego disminuye, llegando a una fase estacionaria. Los métodos basados en la determinación del ADN o RNA son confiables solo si hay una pequeña porción de ácido nucleico en el sustrato y no interfiere con sustancias químicas presentes.

- Glucosamina: la glucosamina es un compuesto útil para la estimación de la biomasa fúngica. Las interferencias con este método pueden ocurrir cuando se emplean sustratos de residuos agroindustriales complejos que contienen glucosamina en las glicoproteínas. Lo certero del método de la glucosamina para la estimación de la biomasa fúngica, depende de la estabilidad y la confiabilidad del factor de conversión de la glucosamina a peso seco de micelio. La glucosamina está presente en el micelio entre 67 - 126 mg de micelio por gramo. Una desventaja del método es que su proceso de extracción dura más de 24 horas.

- Ergosterol**:** el ergosterol es el esterol predominante en los hongos. Es un componente específico de la membrana de los hongos y su contenido se cree que está correlacionado con la cantidad de biomasa metabólicamente activa de los hongos (Ekbland, Wallander and Nassholm, 1998) Algunas definiciones más específicas lo describen como un precursor biológico (provitamina A) a la vitamina D_2. Es un componente de las membranas celulares de los hongos, que tiene la misma función que el colesterol en las células animales (Kumaravel, 2007). El ergosterol desempeña un papel importante en el crecimiento de hongos; sin embargo, también está presente en algunas microalgas. En la membrana celular se encuentra en la bicapa lipídica y puede encontrarse en forma libre o esterificada de ácidos grasos, siendo la primera la más abundante (Montgomery et al., 2000). Debido a su especificidad, éste ha sido ampliamente utilizado como un indicador de la biomasa presente en hongos (Niemenmaa, Galkin, & Hatakka, 2008). Se encuentra en las membranas de hongos, está involucrado en numerosas funciones biológicas, como por ejemplo, la regulación de los fluidos en la membrana, la actividad y distribución de las proteínas integrales y el control de los ciclos de las células. Estos hechos hacen del ergosterol y su biosíntesis una vía esencial para el crecimiento de hongos. El contenido de ergosterol en los hongos basidiomicetos se estima que es aproximadamente entre 40% y 85% del total de los esteroles. Este es comúnmente utilizado en la determinación de biomasa fúngica en el suelo, micorrizas, tierra de monte, sedimentos, materiales vegetales y en la detección de hongos en los alimentos, o en hongos comestibles.

  La cantidad de ergosterol depende principalmente de la especie de los hongos y las condiciones de crecimiento; éste varía de acuerdo a las diferentes etapas de crecimiento de los hongos y a su estado nutricional. Existen numerosos métodos para determinar el contenido de ergosterol y para estimar la biomasa presente en los hongos (el contenido de éste depende principalmente del tipo del tipo de cultivos y el método utilizado para la extracción) (Cheng, 2006). A continuación se muestra la estructura molecular del ergosterol en la Figura 3.

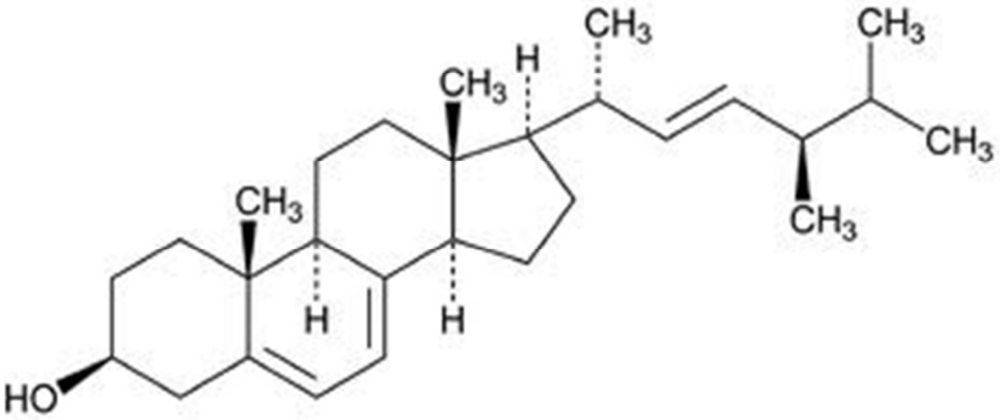


Figura 3. Estructura molecular del ergosterol. Fuente: (Cheng, 2006)

La medición de biomasa en FES, presenta inconvenientes relevantes, fundamentalmente por la dificultad de separar el sustrato de las células microbianas (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008). En el caso de los hongos es más difícil porque el micelio penetra la partícula de sustrato. Generalmente para la estimación del crecimiento del microorganismo se emplean métodos indirectos. Cabe señalar que la eficiencia del método depende en gran parte de la eficiencia del lavado de las células que son extraídas del material fermentado (Padey, 2008)

- Procesamiento digital de imágenes (PDI): una alternativa para la medición de la biomasa en FES es el procesamiento digital de imágenes. Las investigaciones del procesamiento digital de imágenes recientemente han tomado fuerza ya que proporcionan una respuesta rápida, económica y menos laboriosa como lo implican los análisis químicos en laboratorios, además de los recursos que estas implican. Diversos modelos matemáticos han sido empleados para correlacionar el procesamiento digital de imágenes con los tradicionales métodos directos e indirectos actualmente empleados para cuantificación de biomasa, obteniendo resultados satisfactorios para r^2 mayores a 0,9, ya que correlaciones inferiores no puede garantizar la precisión del procesamiento digital de imágenes (Becker, 1996).

  Una imagen puede ser definida como una función de dos dimensiones f(x,y), donde “x” y “y” son las coordenadas espaciales (plano). La amplitud de la función f en algún par de coordenadas (x,y) es llamada intensidad. Cuando “x” y “y” (los valores de la amplitud de la función f), son cantidades discretas finitas, a dicha imagen se le llama imagen digital. Una imagen digital está compuesta de un número finito de elementos y cada uno tiene

una localidad y un valor particular. A éstos elementos se les llama elementos de la imagen o pixeles; siendo este último el término más usado para denotar los elementos de una imagen digital.

La manera básica y original de representar una imagen digital con color en la memoria de la computadora es un bitmap. Un bitmap está formado por filas de pixeles, donde cada uno en particular tiene un valor que determina su color. Este valor está formado por tres números en el rango de 0 a 255, asociados a los colores rojo, verde y azul. Cualquier color visible al ojo humano puede representarse de esta manera. Por ejemplo el color negro se codifica como R=0, V=0, A=0 y el color blanco R=225, V=225, A=225. Desde este punto de vista, una imagen es un arreglo bidimensional de pixeles cada uno codificado en 3 bytes que puede tener 256x256x256=16.8 millones de diferentes colores. Esta técnica se conoce como codificación RGB y está adaptada a la visión humana. Sin embargo hay otras técnicas de codificación donde las cámaras o dispositivos de medición juegan un papel predominante, éstas permiten controlar los índices de la combinación de RVA (En español rojo, verde y azul), para manipular la imagen antes de ser captada, ahorrando un proceso de digitalización en ordenadores y permitiendo obtener intereses particulares al instante de tomar o captar una imagen, momento, escena con la cámara o dispositivo que se esté usando para captar la imagen. Entre estos intereses se encuentra profundidades, efectos visuales o montajes, por mencionar algunos.

El rango de 0 a 255 se acordó por dos razones. La primera debido a que el ojo humano no es lo suficientemente sensible como para diferenciar más de 256 niveles de intensidad para un color y por otro lado es la capacidad de almacenamiento para un byte desde el punto de vista de la computación. En un mapa de bits, los colores se codifican en tres bytes representando su descomposición en los tres colores primarios. Matemáticamente puede interpretarse un color como un vector en el espacio tridimensional de rojo, verde y azul. Bajo esta interpretación pueden aplicarse algunos conceptos de la geometría analítica en el tratamiento de colores y en la generación de filtros o transformaciones.

Varios autores se han dedicado al estudio del PDI usando diferentes basidiomicetos en FES y fermentación líquida; entre ellos se encuentran, el trabajo presentado por Dörge (Dörge, Carstensen, & Frisvad, 2000) quien propuso un método para la identificación directa de especies fúngicas por medio del análisis de PDI con el cual logró identificar las colonias y como se ven después de su crecimiento; este método permite conocer la posición, textura, color, tamaño entre otras características relevantes de cada colonia.

Firrao y colaboradores (Firrao et al., 2010) emplearon el PDI para la medición de micotoxinas en el maíz. Con esta técnica logró cuantificar cantidades fiables de micotoxinas en menos tiempo comparado con los análisis químicos que son más laboriosos y costosos. Además, utilizó un modelo de regresión lineal para correlacionar las micotoxinas encontradas en varias muestras de maíz cuantificadas por HPLC y los valores obtenidos mediante PDI, finalmente encontraron que este es un método eficiente para este tipo de investigaciones y los resultados son similares a los obtenidos por análisis químicos. Duan (Duan, Wang, & Chen, 2012)implementó un protocolo de PDI para evaluar el crecimiento de las colonias fúngicas y otras características en el tiempo, establecieron Ecuaciónes algebraicas para representar las curvas de biomasa y la dimensión de las colonias, estas fueron analizadas en un algoritmo llamado método de error en Matlab versión 7.1, el cual consistía en analizar los parámetros en ciertos rangos de permisibilidad hasta que el error entre los valores calculados en el PDI y los calculados experimentalmente fueran mínimos.

La técnica PDI también fue usada para la cuantificación de biomasa fúngica y crecimiento de los mismos en ecosistemas fluviales, llevando el diámetro de crecimiento fotografiado a un algoritmo planteado por el autor, finalmente logro determinar una correlación de r^2=0,96 (Firrao et al., 2010). Hasta el momento no se ha encontrado ningún estudio que combine el PDI y la FES con el *Pleurotus pulmonarius* usando como sustrato tusa de maíz.

3.4 MODELOS MATEMÁTICOS DE CRECIMIENTO PARA FES

3.4.1 Cinética del Crecimiento Microbiano

El conocimiento de la cinética de crecimiento es fundamental en el tratamiento cuantitativo en los procesos de fermentación; permite además, la predicción del transcurso de la fermentación, la evaluación de las velocidades, rendimientos y productividades, información que es necesaria para evaluar alternativas de producción u optimizar un proceso (Acevedo, F. Genitina, J. Illanes, A, 2002). El comportamiento cinético de una población celular, lo determinan factores genéticos y las variables ambientales; dentro de las variables ambientales se destacan el medio de cultivo, la temperatura, el pH, la actividad acuosa entre otras; aunque se tenga un control estricto de las condiciones iniciales de las anteriores variables, se van a presentar variaciones de las mismas (Acevedo, F. Genitina, J. Illanes, A, 2002), (Jenzsch, M., Simutis, R., Lübbert, A., 2006). El anterior es una fenómeno complejo para las fermentaciones líquidas o sumergidas que son llevados a cabo en fase homogénea y dicha complejidad es aún mayor para FES. Los estudios cinéticos en una FES son difíciles de llevar a cabo debido a lo heterogéneo del proceso, que genera gradientes de concentración tanto en el

sustrato como en la biomasa, razón por la cual la medición de la última es difícil de hacer (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008), (Viccini et al., 2001). La principal razón de la anterior dificultad, es la separación de la biomasa del sustrato, lo que no permite obtener una muestra homogénea durante la fermentación. Estos Problemas son particularmente agudos en el caso de crecimiento de hongos y la producción de micelio (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008).

Para la FES, se han reportado varios perfiles para la cinética del crecimiento (Mitchell et al., 2004), dentro de los cuales se destacan el lineal, Logístico, exponencial y dos fases (Aceleración rápida / Desaceleración lenta). Dichos perfiles se muestran en la Figura 4 y pueden ser descritos matemáticamente a través de las Ecuaciónes empíricas que se muestran en forma de ecuación diferencial y de forma integrada en la Tabla 1.

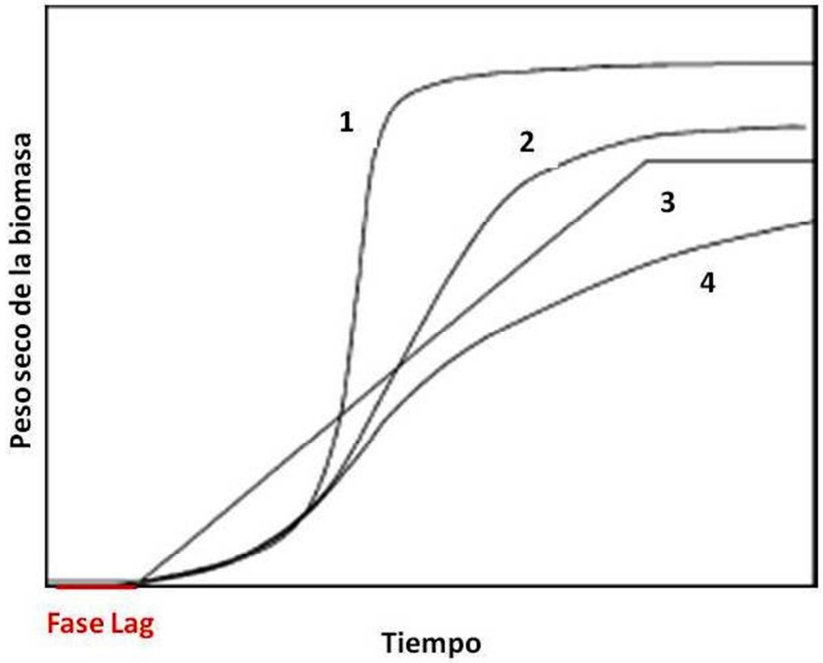


Figura 4. Perfiles de crecimiento de la biomasa en FES. Fuente: Modificado (Mitchell et al., 2004)

Tabla 1. Perfiles de crecimiento para la FES, con sus respectivas Ecuaciónes diferenciales e integradas.

Perfil de Crecimiento	Ecuación Diferencial	Ecuación Integrada
Lineal	$\frac{dx}{dt} = K$	$X = Kt + Xo$
Exponencial	$\frac{dx}{dt} = \mu X$	$X = Xoe^{\mu t}$
Logístico	$\frac{dx}{dt} = \mu X\left(1 - \frac{X}{Xm}\right)$	$X = \frac{Xm}{1 + (\left(\frac{Xm}{Xo}\right) - 1)e^{-\mu t}}$
Dos Fases	$\frac{dx}{dt} = \mu X$, t < t_a	$X = Xoe^{\mu t}$, t < t_a
	$\frac{dx}{dt} = \left[\mu L e^{-k(t-ta)}\right]X$, t >t_a	$X = XAe\left[\frac{\mu L}{k}\left(1 - e^{-k(t-ta)}\right)\right]$, t < t_a

Fuente: Modificado (Mitchell et al., 2004)

Donde X es la concentración de biomasa, t es el tiempo, *K* es la velocidad de crecimiento linear, μ es la constante de velocidad específica de crecimiento, X_0 es la concentración inicial de biomasa, X_m es la concentración máxima posible de biomasa. En el caso del perfil de crecimiento de dos fases, t_a, es el instante en el cual termina la fase exponencial e inicial de la fase de desaceleración; *L* representa la relación de la velocidad específica al inicio de la fase de desaceleración y la velocidad específica de crecimiento exponencial anterior, *k* es la constante de velocidad durante la fase de desaceleración y A es una constante de integración.

Dentro de los modelos matemáticos de crecimiento para FES, el Logístico es uno de los más empleados. El modelo de crecimiento Logístico fue propuesto por Verhulst en 1838 y es un modelo que ilustra la dinámica de crecimiento para la mayoría de los organismos en un hábitat con recursos finitos; también es conocido como la función logística o curva en forma de S. El modelo Logístico ha sido empleado para crecimiento de poblaciones, propagación de enfermedades y la cuantificación de biomasa en bioprocesos tanto en sistemas líquidos (sumergidos) como sólidos (Quiñones, J. Lecompte, A., 2007), (ORLANDONI, 1997; Peleg, Corradini, & Normand, 2007). El perfil de crecimiento Logístico es ampliamente empleado en FES, debido a que es un modelo simple, es una ecuación que puede dar una aproximación adecuada de toda la curva de crecimiento, incluyendo la fase de latencia y cese de crecimiento en las últimás etapas de la fermentación. Para los otros modelos cinéticos, la curva debe separarse en varias fases, con una ecuación diferente para cada una de las ellas (Mitchell et al., 2004).

3.4.2 Redes Neuronales Artificiales (RNA)

Las redes neuronales son una buena alternativa para modelar el crecimiento, debido a que está demostrado que pueden ajustarse a cualquier tipo de función, porque son considerados como aproximadores universales, es decir, que tienen la capacidad de acercarse a cualquier función matemática tanto como se desee, lo anterior se soporta en un teorema matemáticamente probado (Haykin, 2005). En particular, funciones sigmoideas, se ajustan fácilmente por que las neuronas tienen un parámetro relacionado con la función de activación que es una sigmoidea unitaria. Antes de hablar de las aplicaciones de las RNA, se abordarán unas generalidades de las mismas.

- **La Neurona Biológica**

  Las neuronas son células vivas constituidas por los mismos elementos que cualquier célula casi esférica con un diámetro entre 5 y 10 micras que inician con una rama principal llamada axón y varias ramas más cortas denominadas dentritas. El axón, a través de su punto de inicio produce ramas y a menudo suele ramificarse extensamente alrededor de su extremo, tal como lo muestra la Figura 5 (Caicedo, 2009).

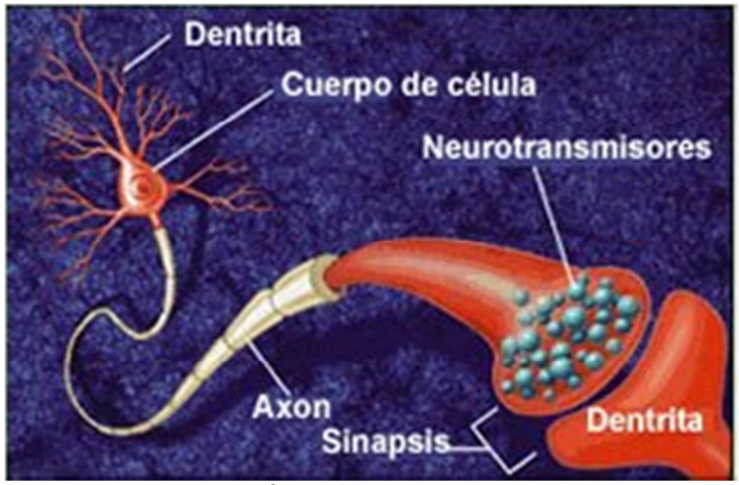


Figura 5. Neurona Biológica. Fuente: **(Caicedo, 2009)**

Dentro de las características que se diferencian de las neuronas con respecto a las demás de las células vivas, está la posibilidad que tienen estas de comunicarse. El proceso de comunicación, comienza con la recepción de las señales por parte de las dendritas y el cuerpo celular; el cuerpo celular es el encargado de combinar las señales, integrar y emitir las señales de salida. Las señales son transportadas a sus terminales por medio del axón, de tal forma

que se pueda transmitir información a un nuevo conjunto de neuronas. Una neurona tiene la capacidad de recibir información de miles de neuronas y puede enviarla a otros miles de éstas. (Caicedo, 2009). Las señales transmitidas por las neuronas son de naturaleza eléctrica y química. Las señales eléctricas son las transportadas por el axón; por su parte, las señales trasmitidas por las terminales del axón y por las dendritas son de origen químico. La transmisión de señales químicas, está mediada por unos neurotransmisores que fluyen a través de una región especial llamada sinapsis, ubicada entre las terminales del axón y las dendritas de las neuronas siguientes (Caicedo, 2009).

- **Las Redes Neuronales Artificiales (RNA)**

Las RNA se inspiran en las redes neuronales biológicas y tienen unas características similares en su organización, además compartidas con las del cerebro humano: aprender, generalizar y abstraer. El aprender, consiste en adquirir un conocimiento de una cosa a través del estudio, ejercicio o experiencia. De acuerdo al ambiente, pueden cambiar su funcionamiento. Generalizan automáticamente por su estructura propia y naturaleza. Finalmente, el abstraer, aislar mentalmente o considerar individualmente las cualidades de un concepto (Hykin, S., 2005), (Basogain, X, 2008). Para tratar de dar una mejor explicación, se mostrará primero un esquema de una neurona artificial, en la Figura 6.

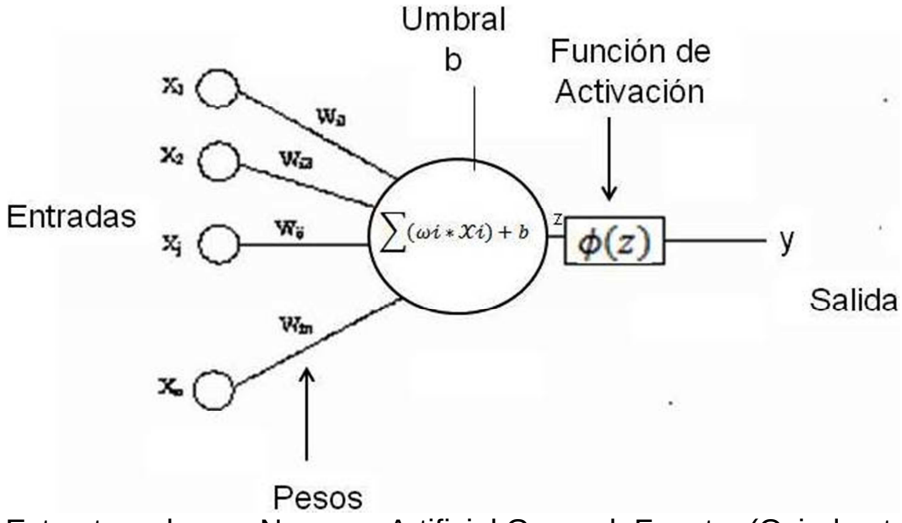


Figura 6. Estructura de una Neurona Artificial General. Fuente: (Oviedo et al., 2013)

Para las RNA, el equivalente a la neurona biológica es el elemento procesador (o elementos procesadores), donde se reciben las señales de entrada. En la neurona biológica, dichas señales de entrada se comunican a través de los neurotransmisores en la sinapsis, que en la neurona artificial se encarga de modificarlas a través de unos pesos. Para la neurona artificial, el elemento procesador tiene varias entradas y las combina, normalmente con una sumatoria fundamental. La sumatoria de las entradas es transformada por una función de transferencia o de activación y se pasa directamente a la salida del elemento procesador (Haykin, 2005), (Caicedo, 2009), (Basogain, X, 2008). La forma como se puede expresar matemáticamente el cálculo de una red está dada por la ecuación 2

Ecuación 2. Representación matemática de esta neurona.

$$Y = \Phi(w*x + b)$$

Donde x son las entradas, w los pesos sinápticos, b los umbrales o bias, Φ es la función de activación. La neurona artificial de forma individual, tiene un nivel bajo de funcionamiento y procesamiento, el verdadero potencial de las neuronas está en su interconexión igual que en el cerebro humano. Una RNA se define como: *"un procesador paralelo másivamente distribuido que tiene una facilidad natural para el almacenamiento de conocimiento obtenido de la experiencia para luego hacerlo utilizable. Se parece al cerebro en dos aspectos:*

I. El conocimiento es obtenido por la red a través de un proceso de aprendizaje.
II. Las conexiones entre las neuronas, conocidas como pesos sinápticos, son utilizadas para almacenar dicho conocimiento." (Haykin, 2005)

Las RNA han sido desarrolladas como generalización de modelos matemáticos con base en las siguientes consideraciones (Basogain, X, 2008):

I. La información es procesada por muchos elementos simples, las neuronas.
II. La comunicación de las neuronas es a través de señales por los de enlaces de conexión.
III. Cada enlace de conexión tiene un peso asociado, el cual, multiplica la señal transmitida.
IV. Cada neurona aplica una función de activación (frecuentemente no lineal) a la entradas de la red (suma de las señales de entrada pesadas).

La distribución de las neuronas dentro de una red neuronal artificial se realiza formado niveles de un número de neuronas determinado. Se denomina capa a un conjunto de neuronas artificiales reciben simultáneamente el mismo tipo de información. En una red se pueden diferenciar tres niveles (Basogain, X, 2008):

- Entrada: es el conjunto de neuronas que recibe directamente la información proveniente de las fuentes externas de la red.
- Oculto: Corresponde a un conjunto de neuronas internas a la red y no tiene contacto directo con el exterior. El número de niveles ocultos puede estar entre cero y un número elevado. Las neuronas de las capas ocultas pueden estar interconectadas en formás diferentes lo que determina, junto con su número, las distintas arquitecturas de las redes neuronales.
- Salida: es el conjunto de neuronas encargadas de transferir la información procesada hacia el exterior. En la Figura 7, se pude ver la estructura de una RNA

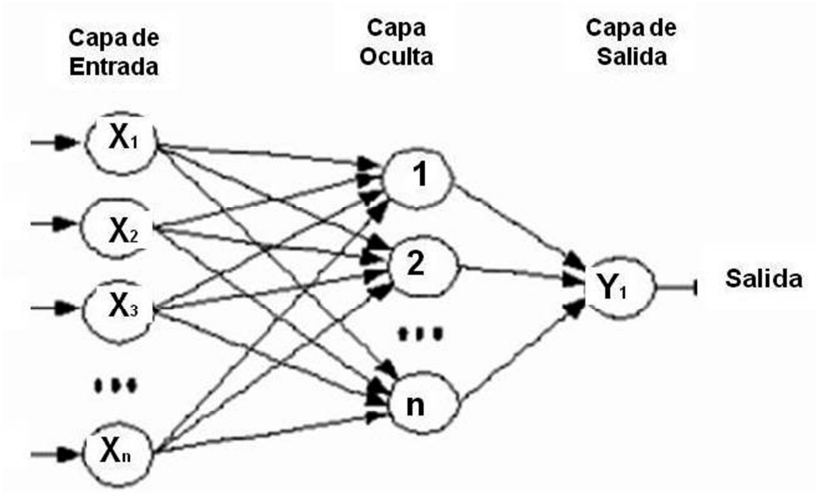


Figura 7. Red Neuronal Multicapa típica. Fuente: (Oviedo et al., 2013)

- **Arquitectura de las RNA**

Se denomina arquitectura de una RNA, a la forma como las neuronas están organizadas en su interior. Las neuronas se agrupan formando capas, que pueden tener muy distintas características. Además las capas se organizan para formar la estructura de la red. De forma general, las redes se pueden dividir en monocapas y multicapa (Basogain, X, 2008), (Oviedo et al., 2013), (Hagan, M. Demunth, H. Beale, M., 1999), que se explicaran a continuación.

- **Redes monocapa**

Las redes monocapa son redes con una sola capa. Para unirse las neuronas crean conexiones laterales para conectar con otras neuronas de su capa. Se consideran que son monocapas, debido a que solo tienen una sola capa de

procesamiento. Cada una de las entradas está conectada a través de su peso correspondiente a cada neurona artificial. En la práctica existen conexiones eliminadas e incluso conexiones entre las salidas y entradas de las neuronas de una capa (Basogain, X, 2008), (Hagan, M. Demunth, H. Beale, M., 1999). La Figura 8 ejemplariza este caso

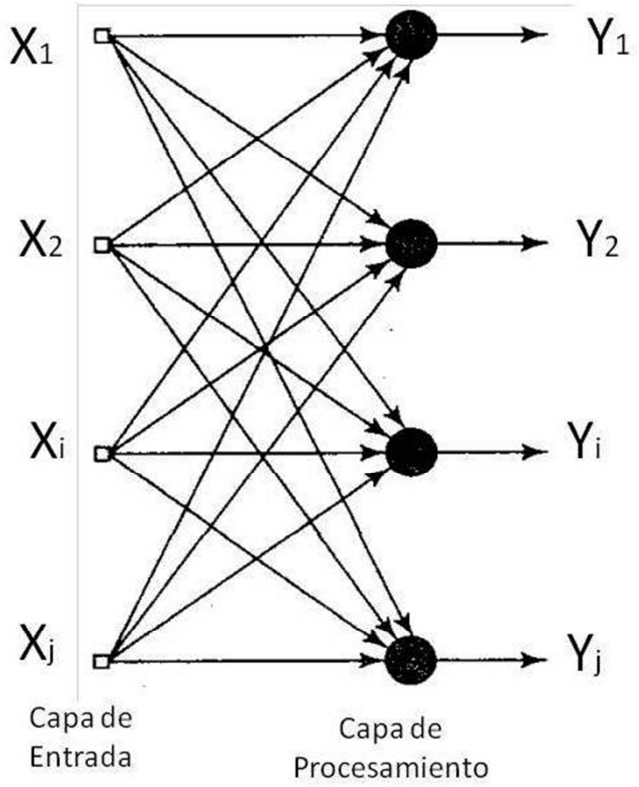


Figura 8. Red neuronal monocapa. Fuente: Modificado de **(Haykin, 2005)**

- **Redes multicapa**

Las redes multicapa están formadas por varias capas de neuronas. La diferencia fundamental, es que hay una nueva capa intermedia entre la entrada y la salida, la cual se llama oculta. Estas redes se pueden a su vez clasificar atendiendo a la manera en que se conexionan sus capas. En muchos casos, las capas están organizadas por el orden en que reciben la señal desde la entrada hasta la salida y están unidas en ese orden. Ese tipo de conexiones se denominan conexiones feedforward o hacia delante. Por otro lado, algunas redes en que las capas parten del orden normal están también unidas desde la salida hasta la entrada en orden inverso en que viajan las señales de información. Las conexiones de este tipo se llaman conexiones hacia atrás, feedback o retroalimentadas (Basogain, X, 2008), (Hagan, M. Demunth, H.

Beale, M., 1999), (Haykin, 2005). En la Figura 9 se muestra un ejemplo de RNA multicapa.

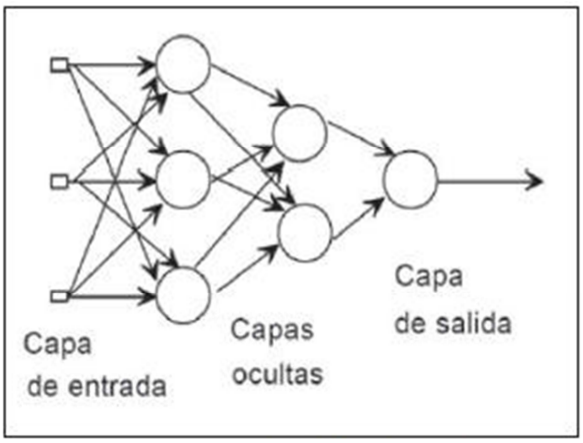


Figura 9. Red neuronal multicapa. Fuente: (Gomez, G. Carreño, J. Zambrano, J., 2011)

Para el caso de varias capas y varias neuronas, se obtiene una ecuación matemática de salida por cada capa de forma matricial, dada por la ecuación 3:

Ecuación 3. La representación matemática de una RNA multicapa

$$\bar{Y}=\bar{\Phi}(\mathbf{W} * \bar{x} + \bar{b})$$

Donde $\bar{Y}$ es el vector de salida de la capa. $\bar{\Phi}$, es la función vectorial de dimensión (número de neuronas) con la función de activación respectiva. W, es la matriz de pesos sinápticos de m filas y n columnas, siendo m el número de neuronas y n el número de entradas de la capa anterior. $\bar{x}$, es el vector de dimensión n con los datos de entrada y $\bar{b}$, el vector de umbrales (bias) de dimensión m.

- **Aplicaciones de las RNA**

Las características especiales de las RNA, le permiten a esta técnica de cálculo, una extensa variedad de aplicaciones. La computación neuronal provee un acercamiento mayor al reconocimiento y percepción humana que los métodos tradicionales de cálculo. Las RNA presentan resultados razonables en aplicaciones donde las entradas presentan ruido o las entradas están incompletas. Algunas de las aplicaciones más importantes son:

a. En aeroespacial, para la simulación de rutas de vuelo, sistemas de control de aeronaves, detección de daños entre otros (Hagan, M. Demunth, H. Beale, M., 1999), (Zhang et al., 2013), (Shu et al., 2013)

b. En la banca, en la aplicación de evaluaciones crediticias (Hagan, M. Demunth, H. Beale, M., 1999).
c. En la defensa, en la dirección de armás, seguimiento y discriminación de objetivos (Hagan, M. Demunth, H. Beale, M., 1999).
d. En sistemas eléctricos, para predecir demandas de consumo energético en regiones (Gómez et al, 2011)
e. En electrónica, en la predicción de códigos, diseño de chips para circuitos integrados, control de procesos (Hagan, M. Demunth, H. Beale, M., 1999), (Singhania et al., 2009).
f. En entretenimiento, para animación y efectos especiales (Hagan, M. Demunth, H. Beale, M., 1999), (Ortega et al., 2013)
g. En el campo financiero, en la tasación de bienes raíces, como asesores de préstamos hipotecarios, detección y clasificación de bonos corporativos, para el análisis de series financieras. (Hagan, M. Demunth, H. Beale, M., 1999), (Cabrera Llanos, 2011)
h. En el área de la manufactura, en procesos de control, diseño y análisis de producto, identificación de partículas en tiempo real, inspección y calidad, diseño de productos químicos, modelación de procesos, diseño de materiales (Hagan, M. Demunth, H. Beale, M., 1999), (Chan, Fu, & Lu, 2008)
i. Para la medicina, ayuda en el análisis de células de cáncer, diseño de prótesis, optimización de trasplantes y reducción de gastos hospitalarios (Hagan, M. Demunth, H. Beale, M., 1999), (Lisboa & Taktak, 2006)
j. En el campo de la Robótica, se emplean para controlar la trayectoria, carretillas elevadoras, sistemas de visión (Hagan, M. Demunth, H. Beale, M., 1999), (Ollero & Merino, 2004)
k. En telecomunicaciones, las RNA se pueden emplear para compresión e imágenes de datos, servicios de información automatizada, traducción en tiempo real (Hagan, M. Demunth, H. Beale, M., 1999), (Hayati & Akhlaghi, 2013)
l. En la ciencia y tecnología de alimentos, se han llevado a cabo trabajos para la optimización de procesos, predicción de la calidad y vida útil de los alimentos, modelado y control de procesos como el de la extrusión, evaluación sensorial en panadería entre otros (Singh, Tatewar, Shastri, & Pandharipande, 2008; Uraikul, Chan, & Tontiwachwuthikul, 2007)

En los bioprocesos, uno de los mayores campos de aplicaciones de las RNA, han sido utilizadas para la optimización de medios de cultivo (Annadurai & Lee, 2007; Desai, Survase, Saudagar, Lele, & Singhal, 2008; Horiuchi, 2002; Nagata & Chu, 2003; Ratna et al., 2009) estimación de la biomasa en fermentación líquida (Jianlin, Tao, & Cuiyun, 2006), mejoramiento de la producción de metabolitos (Furtado et al., 2005; Moreira et al., 2007), desarrollo y modelación de procesos industriales (Ghaffari et al., 2006; Khaouane, Benkortbi, & Hanini, S; Si-Moussa, 2013; Vats & Negi, 2013) caracterización celular y miceliar (Papagianni & Mattey, 2006), entre otros.

Para el caso específico de la FES, las RNA se han empleado en la predicción de la cinética enzimas como la celulosa y xilanasa (Singh et al., 2008), producción de Koji (Hanai et al., 1999), la modelización matemática del crecimiento microbiano (Acuña, Ramirez, & Curilem, 2014; Mazutti et al., 2010); y optimización de fermentaciones (Strapasson, 2003).

3.5 BIOREACTORES EN FES

El equipo donde se realiza el bioproceso o biotransformación se denomina bioreactor o fermentador. El mismo provee todos los servicios que son necesarios para el cultivo, tales como mezclado, control de temperatura, suministro de oxígeno, entradas para adición de nutrientes, control del pH, entre otros (Ruiz et al., 2007).

3.5.1 Criterios para la selección de un bioreactores FES

En términos generales, se podría afirmar que el mejor criterio para seleccionar un bioreactor, es el rendimiento económico del proceso. Sin embargo, los procesos en FES no se han analizado de forma eficiente y precisa para permitir la estimación del capital para el proceso y los costos de explotación. De hecho en la actualidad, la única manera de comparar el desempeño económico de bioreactores, sería construir y operar varios bioreactores y comparar las productividades y los costos de capital y operativos (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006)

Dentro de los principales criterios que hay para el diseño de un bioreactor sólido se destacan: (H. A. Ruíz-Leza, R. M. Rodríguez-Jasso & Aguilar, 2007; Prabhakar, A.*, Krishnaiah, K., Janaun, J. and Bono, 2005; Raghavarao et al., 2003), (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006)

- El tanque debe diseñarse para que funcione asépticamente durante largo tiempo, para evitar la aparición de contaminantes en el bioproceso; además debe ser construido en un material que sea económico, inerte y resistente a la corrosión, abrasión y esterilizado.
- El diseño debe simplificar las tareas de limpieza, esterilización mantenimiento, facilitar las tareas carga y descarga y la recuperación del producto final.
- Debe contar con filtros para la esterilización de aire y sellos para evitar la contaminación exterior.
- El bioreactor debe proporcionar un sistema adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas del microorganismo.
- Se debe garantizar la uniformidad de la biomasa, con el fin de minimizar los gradientes de temperatura, la cual además debe tener un sistema de control.

- Debe contar con un sistema de aireación, para ayudar a la remoción de calor del sistema y a cumplir con el suministro requerido por las células.
- El consumo de energía debe ser el mínimo posible.
- Debe permitir que las células se puedan distribuir uniformemente en el medio, para que utilice la máxima cantidad de sustrato posible.

3.5.2 Clasificación de los bioreactores en FES

Duran (Durand, 2003), clasificó los bioreactores para FES en dos categorías: (i) a escala de laboratorio, empleado sustrato de gramos hasta unos pocos kilogramos, (ii) piloto y a escala industrial, que va desde varios kilogramos a toneladas. La primera categoría incluye varios diseños más o menos sofisticados, mientras que la segunda categoría, es empleada por el sector industrial, es menos variada.

Mitchell y colaboradores (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006), hacen una clasificación más específica de los bioreactores, donde la división se lleva a cabo de acuerdo al funcionamiento del mismo y a su configuración.

- **Grupo I**. Por lo general el sustrato es estático, o el mezclado no es frecuente, y la circulación del aire se da alrededor del sustrato, sin ser forzado a través de él. Ejemplo de este grupo son los bioreactores de bandeja; la Figura 10(a) muestra un bioreactor de bandejas.

- **Grupo II**. En este grupo de bioreactores el lecho o sustrato es estático o con movimiento infrecuente (por ejemplo una vez al día). Pertenecen a este grupo, los bioreactores de lecho empacado. Constan de una columna cilíndrica o de sección transversal rectangular, la cual está orientada verticalmente, con una placa base perforada en su parte inferior, lacual es compatible con una cama de sustrato. El aire entra a través de la placa base. Ver la Figura 10(b)

- **Grupo III**. En este tipo de bioreactores, el sustrato tiene una mezcla intermitente de minutos a horas. El aire se distribuye a través del sustrato. Ejemplos de este son los bioreactores de tambor con agitadores y los bioreactores con tambor giratorio. Ver Figura 10(c).

- **Grupo IV**. En este grupo están los biorreactores en los que el sustrato es agitado y el aire es expulsado con fuerza a través del mismo. Este grupo se puede subdividir en los bioreactores de agitación continua (IVa), y los de agitación intermitentemente con intervalos de minutos a horas entre la mezcla (IVb). Ver Figura 10(d).

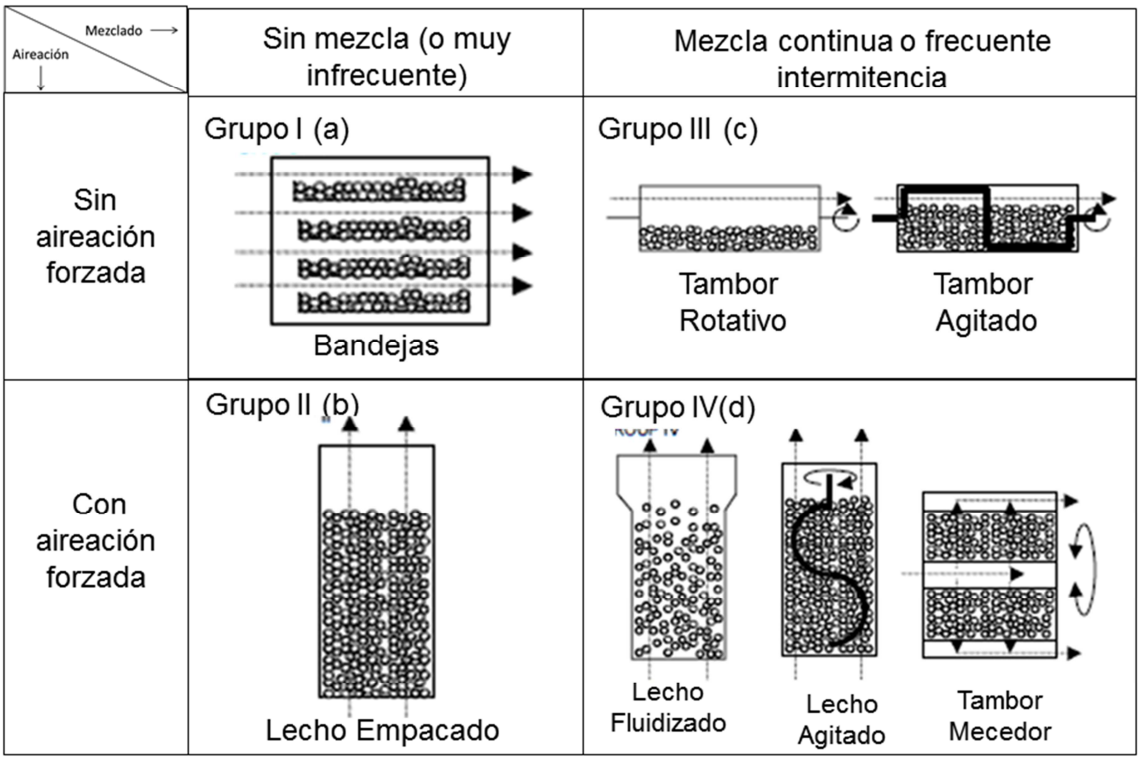
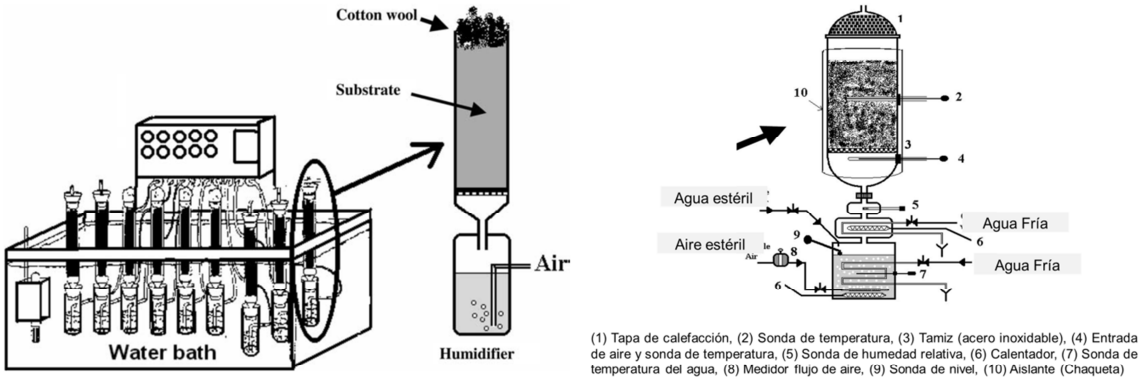


Figura 10. Clasificación de los bioreactores en FES. Fuente: Modificado de (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006)

3.5.3 Bioreactores solidos de columna

Este tipo de bioreactores se encuentran dentro de la clasificación que hace Duran (Durand, 2003) a escala de laboratorio, se destacan dos modelos realizados en Francia: el diseñado por el grupo de investigaciones ORSTOM y el del Instituto Nacional de la Investigación Agronómica (INRA). Las Figuras 11 (a y b), esquematiza ambos diseños. Estos equipos tienen en común las siguientes ventajas: Son equipos económicos y de montaje sencillo; se les puede monitorear y controlar humedad, temperatura, biomasa y CO_2; por el tamaño que tienen es posible conectarles en forma continua de varias columnas. Las desventajas que estos equipos tienen son: tienen canales preferenciales de O_2; dificultad en la toma de muestra, por lo que no es posible seguir una cinética; Problemas en la eliminación de calor, formación de gradientes de concentración de O_2 y nutrientes, entre otros (Durand, 2003), (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006).



A. Fermentador Solido del ORSTOM

B. Fermentador Solido del IRD

Figura 11. Ejemplos de bioreactores sólidos a escala laboratorio: a. Modelo IRD; b. Modelo INRA. Fuente: (Durand, 2003)

Dentro de la clasificación realizada por Mitchell y colaboradores(Mitchell, Krieger, & Berovi˘c, 2006), los bioreactores de columna se pueden ubicar dentro del grupo II, explicado en el ítem 1.7.2. Una configuración de este tipo de bioreactores es el lecho empacado. Usualmente tienen forma de columna, donde el sustrato sólido es soportado por una base perforada a través de la cual el aire es forzado. La literatura reporta que los bioreactores de lecho empacado son los más útiles para el desarrollo de productos con procesos eficientes para control y remoción de calor. Este tipo de bioreactores son apropiados para los procesos que no requieren mezcla del sustrato durante la fermentación por los daños físicos que se puedan ocasionar al microrganismo y afectar el proceso de crecimiento (Ali & Zulkali, 2011). Además, los fermentadores sólidos de columna han sido ampliamente empleados para la producción de enzimas, ácidos orgánicos y metabolitos secundarios (T Robinson, Chandran, & Nigam, 2002). Las características básicas de este diseño son:

- La columna puede tener una sección transversal y otra circular.
- La columna puede ser vertical u horizontal, dependiendo de la dirección de las fuerzas causadas por la gravedad.
- La columna puede ser aireada desde un punto o por una columna interior dentro del reactor. La entrada del aire puede ser por la parte superior o inferior del biorreactor.
- Para la remoción de calor se pueden emplear chaquetas de enfriamiento (Tradicional reactor de lecho empacado) o platos insertados dentro del sustrato (Reactor de lecho empacado Zymotis) (Roussos, S. Raimbault, M. Prebois, JP. Lonsane, BK, 1993)

Un esquema de este tipo de bioreactores se muestra en la Figura 12.

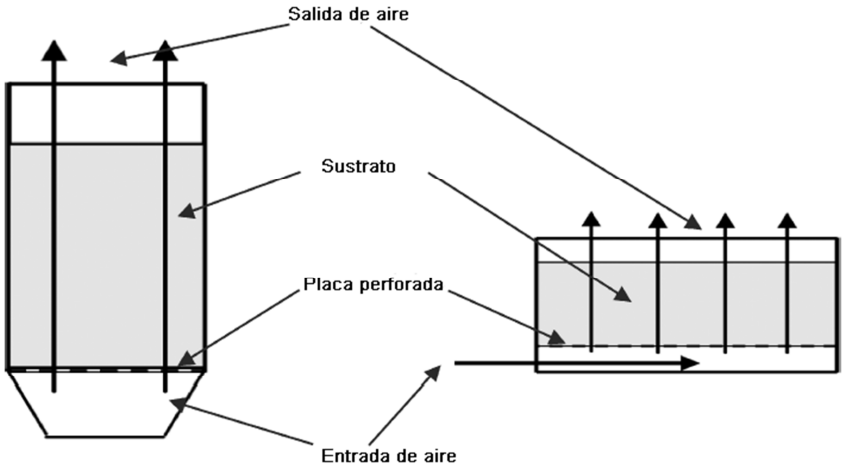


Figura 12. Diagrama de un reactor de lecho empacado, tanto vertical como horizontal. Fuente: Modificado de (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006)

Las principales desventajas asociadas con los reactores de lecho empacado incluyen un crecimiento poco uniforme, poca remoción del calor y Problemas en el escalado. Además las caídas de presión afectan al bioreactor y disminuyen el rendimiento de la fermentación debido a que el sustrato se separa de las paredes del bioreactor, formando un espacio por el cual el aire puede pasar, ocasionando perdida excesiva de humedad y Problemas en la transferencia de masa y calor del sistema (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006)

3.5.4 Bioreactores solidos para enriquecimiento proteico

En la bibliografía, se muestran diferentes fermentadores que emplean tanto varios sustratos como organismos para enriquecerlos proteicamente; en la Tabla 2, se muestran algunos ejemplos:

Tabla 2. Ejemplos de enriquecimiento proteico de residuos agroindustriales por FES a escala laboratorio y piloto.

Tipo de Bioreactor o escala	Volumen	Sustrato	Organismo Microorganismo	% Enriquecimiento Proteico	Fuente Bibliográfica
Cilindro / Columna	0,5 l	Pulpa de remolacha Salvado de trigo Residuos de cítricos	*Neurospora sitophila*	100% 130% 180%	Shojaosadati, Faraidouni, Madadi-Nouei, & Mohamadpour, 1999
Lecho fijo	50 m^3	Pulpa de remolacha azucarera	*Aspergillus tamarii*	22,40%	Xue, Liu, Zhang, Qi, & Lei, 1992
Cilindro de columna	60 l	Pulpa de remolacha azucarera	*Therrnoascus aurantiacus*	206,40%	Grajek, 1988
Cilindro de columna	60 l	Pulpa de remolacha azucarera	*Allescheria terrestris*	195.2	Grajek, 1989
Bandejas	34 l	Cactus	*Saccharomyces cerevisiae*	Hasta 401%	Araújo, Medeiros, Neto, & De, 2005
Cilindro / Columna	4,5 l	Residuos de papa procesada	*Candida utilis*	Entre 11 y 12%	Gélinas & Barrette, 2007
Escala laboratorio	0,25 l	Residuos de piña procesada	*Saccharomyces cerevisiae*	22%	Correia, Magalhães, & Macêdo, 2007
Escala laboratorio	0,5 l	Pulpa de manzana	*Aspergillus niger* *Candida utilis*	20%	Bhalla, T. C. Joshi, M.. 1994
Escala laboratorio	0,25 l	Pastos forrajeros	*Entrophospora sp. NP1 y Bacillus subtilis H8*	Hasta 13,9%	Hsu, Liu, Liu, Chang, & Yang, 2013
Escala laboratorio	0,5 l	Residuos de semillas de girasoles	*Aspergillus tamarii*	24,28%	Hongyan, Q. Zhuang, Q. Zhang, H. 1999
Escala laboratorio	0,5 l	Paja de trigo	*Pleurotus Ostreatus*	63,24%	Ahmadi, Ali-Reza; Arash, Mehri; Ghourchian, Hedayatollah; Lamerad 2014
Cilindro	88 l	Paja de trigo	*Pleurotus Ostreatus* *Pleurotus florida*	5,50%	Fazaeli, 2007
Escala laboratorio	0,25 l	Cáscara de yuca	*Panus tigrinus*	55,16%	Ruqayyah et al., 2014

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN Y PRE TRATAMIENTO DE LA TUSA DE MAÍZ

La tusa de maíz fue obtenida en la Central Mayorista de Antioquia, ubicada en la ciudad de Itagüí y fue llevada a los laboratorios del Centro de Estudios e Investigación en Biotecnología (CIBIOT) y el Grupo de Investigaciones Agroindustriales (GRAIN), pertenecientes a la Escuela de Ingenieras de la Universidad Pontificia Bolivariana. Los requisitos de la tusa para ser llevados al laboratorio eran no tener más de 8 horas de separación de los granos de maíz para disminuir los riesgos de contaminación y no presentar algún tipo de enfermedad visible. Para la desinfección de la tusa, se preparó una solución de hipoclorito de sodio (5 mL/ L de agua) y se dejó sumergida en ella, durante 5 minutos. Una vez pasado el tiempo, fueron lavadas con abundante agua para eliminar los restos del desinfectante. Terminada la desinfección de la tusa, se realizó un proceso de secado, con el objeto de almacenarla. El proceso de secado se llevó a cabo en un horno de convección forzada durante por lo menos 12 horas a 75 °C. La tusa secada fue almacenada en bolsas resellables por un periodo no superior a 30 días para evitar contaminación con hongos filamentosos.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA TUSA DE MAÍZ.

Se realizó la caracterización fisicoquímica de la tusa de maíz según la AOAC del año 1997 (AOAC, 1997). Las pruebas se realizaron por triplicado.

- **Contenido de Humedad**

Se pesaron entre 2 a 5 g de muestra húmeda finamente triturada en un procesador de alimentos. La muestra se secó en un horno de convección forzada por 5 horas a 100 - 110 ° C. Se determinó el peso seco de acuerdo a la norma AOAC 925.10 de 1997 (AOAC, 1997)

- **Contenido de cenizas**

La ceniza es el residuo inorgánico que queda después de quemar materia orgánica. El procedimiento es tal como se describe en Norma AOAC, 923.03 de 1997 (AOAC, 1997): Se pesó entre 2 a 5 g de la muestra finamente triturada, se

calcinó en una mufla por un tiempo de 3 horas entre 500- 550 ºC, posteriormente se determinó el peso de la ceniza.

- **Fibra cruda**

Para esta determinación se utilizó la Norma, AOAC Ba 6-61; 1989 (AOAC, 1997), se pesaron 2 gr de muestra desengrasada en un erlenmeyer de 400mL y se le añadieron 200 mL de ácido sulfúrico al 1.25 N en agitación, se somete a ebullición por 30 minutos, verificando que todo el material quede en contacto con el líquido, se filtró la solución a través de un papel de fibra de vidrio, lavando perfectamente el residuo con agua destilada. El residuo se arrastró con 100 mL de agua destilada caliente a un erlenmeyer al cual se le añadieron 100 mL de NaOH 2.5 N en agitación y se sometió a ebullición por 30 minutos reponiendo las pérdidas de volumen con agua destilada, se filtró la solución a través de un papel de filtro de fibra de vidrio, lavando con agua destilada los restos que quedaron adheridos a las paredes del erlenmeyer, se transfirió el residuo a una cápsula de porcelana previamente tarada, se secó a 110 °C y se llevó a peso constante, finalmente se introdujo la capsula de porcelana a una mufla a 500 °C durante 3 horas y se dejó enfriar en el desecador y se pesó nuevamente.

- **Contenido de proteína**

Se determinó por el método de Kjeldahl, tal como se describe a continuación. Se pesaron entre 0.5-1.5 gramos de muestra sólida, la cual fue llevada al tubo de digestión, donde se adicionaron 2 pastillas catalizadoras y 15mL de Ácido sulfúrico concentrado. Los tubos se colocaron en el soporte para realizar la digestión de la muestra empleando, en un Digestor automático DKL, Velp.

Al finalizar la digestión, realizó la destilación de la muestra empleando Unidad de destilación automática (Velp Scientifica), Ubicar el recipiente colector del ácido bórico Finalmente se realizó una titulación potenciométrica, para la determinación de la cantidad de proteína empleando un equipo de titulación automaticaTitrando 888– Metrohm. Para determinar la cantidad de nitrógeno se empleó la ecuación 4.

Ecuación 4. Calculo de la concentración de nitrógeno con el titulante

$$ppm\ N\ = \frac{(Voument\ de\ titulante\ consumido) \times concentracion\ titulante\ \times 1400 \times factor\ dilucion}{Peso\ muestra}$$

- **Medición de la lignina y la digestibilidad *In Vitro***

Adicional al análisis anterior, se evaluó la digestibilidad de la tusa, tanto por el contenido de lignina, a través del método modificado de Klason descrito en el Anexo A.

4.3 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO E INOCULACIÓN DEL *Pleurotus pulmonarius* EN CAJA DE PETRI.

Luego del pre tratamiento, se procedió a la preparación del medio de cultivo incluyendo tusa de maíz. La preparación fue así: El sustrato para la FES está compuesto entre 10 y 15 g de tusa pretratrada, 1% de CaO, 0,01% $CuSO_4*5H_2O$ y agua de grifo hasta ajustar la humedad requerida. Las cajas fueron esterilizadas durante 20 minutos a 121 °C. Para la inoculación se emplearon trozos de 1 cm de diámetro del cultivos de *Pleurotus pulmonarius* en agar PDA. Las cajas inoculadas fueron incubadas en la oscuridad a diferentes condiciones de acuerdo a los tratamientos propuestos para el establecimiento del tiempo de cultivo y de la temperatura de incubación, como se explicará más adelante.

La semilla (spwan) del basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius* se adquirió en el laboratorio de tejidos vegetales de la Universidad de Antioquia. Con la semilla se preparó el inóculo para la FES, el cual se cultivó en agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) producido por el laboratorio Merck®. La preparación se llevó a cabo según especificaciones técnicas del fabricante. Se sembraron aproximadamente 0.5 g de la semilla de *Pleurotus pulmonarius* sobre el agar y se llevó a una cámara de incubación a 30 °C y en oscuridad, durante 15 días.

4.4 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO PRELIMINAR DEL *Pleurotus pulmonarius* UTILIZANDO TUSA DE MAÍZ EN CAJA DE PETRI

Con el objetivo de determinar cuáles son las variables más importantes del crecimiento del basidiomiceto en la tusa de maíz, se hizo un ensayo preliminar, con el cual se pretendía determinar cualitativamente a través del PDI, evaluar la invasión de micelio del basidiomiceto en la tusa de maíz en caja de Petri. Las variables preliminares seleccionadas fueron humedad (60 y 80%), pH (6 y 8) y mezcla de sales minerales (Presencia y Ausencia). La mezcla de sales estuvo compuesta de 0.04 mg/ 100 mL de MgSO4; 0.2 mg/100 mL de K2HPO4, y 0.2 mg/100 mL de $(NH4)_2SO_4$, debido a que como mencionan Padey y colaboradores (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008), son tres de los factores físico-químicos más importantes dentro de la FES. Las cajas de Petri fueron llevadas en un recipiente de plástico recubierto con papel Kraft y almacenadas en oscuridad, durante el tiempo el tiempo de la fermentación y se hicieron por triplicado.

4.5 MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO PRELIMINAR DEL *Pleurotus pulmonarius* SOBRE TUSA DE MAIZ POR PDI EN CAJAS DE PETRI

Con el objeto de hacer una medición de la invasión del micelio en la tusa de maíz, a través del PDI, a cada una de las cajas de Petri, se les mide la intensidad de color, como método indirecto para la determinar la vigorosidad del micelio. El procedimiento consiste en tomar una fotografía con una cámara digital de 14 megapixeles a una altura de 12 cm y una resolución 4x wide 27 mm – woxmm, sobre un fondo negro. A cada fotografía, se le medió el índice de blanco (IB) en el ToolBox de procesamiento de imágenes de Matlab a través del algoritmo que aparece en el Anexo B. La escala de medición que se empleó, fue la técnica de codificación RGB (Por sus siglas en inglés Red, Green and Blue), que va desde 0 hasta 1; donde el 0, corresponde a la combinación para negro (ausencia de color) y 1 a la combinación para el maximo color blanco que se podría obtener. La medición del color en basidiomicetos como indicador del vigor en el crecimiento de basidiomicetos ya ha sido empleada por Mamede y colaboradores (Mamede et al., 2006). El tiempo de duración de los ensayos fue 30 días, debido a que fue en el que se observó que el micelio habia invadido completamente la tusa de maíz, en la mayoría de los réplicas

4.6 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA EVALUAR LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA EN TUSA DE MAIZ EN LAS CAJAS DE PETRI.

Teniendo en cuenta los resultados preliminares, obtenidos en la medición cuantitativa del crecimiento miceliar del *Pleurotus pulmonarius* en la tusa de maíz, se realizó un diseño de experimentos factorial 2^2 para evaluar el efecto de la temperatura y el tamaño de partícula sobre el crecimiento celular en caja de Petri, expresado en términos del contenido de proteína. Las variables independientes fueron temperatura y tamaño de partícula, cada uno con dos niveles: 35° C y 25°C para la temperatura; para el tamaño de partícula 2450 µm y 910 µm. La variable respuesta fue la concentración de proteína. La matriz se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Matriz de Diseño de Experimentos cuantitativa

Variable	T(°C)	Tam. Partícula (µm)	Variable Respuesta
Nivel Superior	35 °C	2450 µm	
Nivel Inferior	25 °C	910 µm	
Experimentos			Contenido de Proteína (g Proteína/ g Sustrato)
1	35 °C	2450 µm	
2	35 °C	910 µm	
3	25 °C	2450 µm	
4	25 °C	910 µm	

El anterior diseño fue realizado por triplicado. Finalmente, los datos obtenidos fueron procesados en STATGRAPHICS 5.5. Adicional a lo anterior, se calculó el coeficiente de determinación R^2, a través de la ecuación 5.

Ecuación 5. Coeficiente de determinación

$$R^2 = \frac{SCT - SCE}{SCT}$$

Donde:

- SCT, es la suma de cuadrados totales.
- SCE, es la suma de cuadrados de los residuos.

4.7 MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA BIOMASA EN LA TUSA DE MAÍZ

Con el fin de establecer los parámetros de crecimiento, se llevó a cabo la determinación de la biomasa por los métodos indirectos de concentración de proteína y concentración de ergosterol, ampliamente empleados para la medición de biomasa en FES (Bhargav, S. Panda, B. Ali, M. Javed, 2008)

4.7.1 Determinación de la concentración de proteína total.

Se determinó por el método colorimétrico indirecto de Biuret (Fernández, E. Galván, A., 2005), previa extracción del sustrato. Para la extracción, se llevó a cabo la metodología propuesta por Braaksma y Schaaap (Braaksma & Schaap, 1996): Se empleó para la extracción una solución amortiguadora de fosfato y NaCl con una concentración de 50 mM y pH de 8; la anterior solución se debe almacenar a 4 °C y utilizarla siempre fría para la extracción. Se pesaron 1.5 gramos de muestra, que fueron extraídos con 20 mL de la solución anterior y en

un mortero para macerarla. Posteriormente, la mezcla fue llevada a agitación orbital durante 60 minutos a 180 rpm. Terminada la agitación, fue filtrada y se empleó para la determinación de la proteína total.

Para la cuantificación de la proteína total, se empleó el método de Biuret modificado por Resende y colaboradores (Rezende, Barbosa, Flora, Vasconcelos, & Endo, 2002). Para la determinación de proteína por el método de Biuret se realizó una curva de calibración utilizando una solución patrón de albumina de bovino, tal como aparece en el Anexo C.

4.7.2 Determinación de la concentración de ergosterol

Para la determinación de la concentración de ergosterol, primero se efectuó un proceso de extracción, empleando los métodos combinados de Brodie (Brodie, Edwards, & Clipson, 2003) y colaboradores y Ribeiro Silva (Ribeiro, Ricardo, 2004). Una muestra de aproximadamente 5 g se transfirió a un frasco tapa rosca de 250 mL, donde se adicionaron 20 mL de metanol, 5 mL de etanol y 2 g de KOH. La mezcla fue llevada a agitación orbital durante 20 minutos a 250 rpm. Terminada la agitación, el frasco con la mezcla, fue sometido a un proceso de sonicación a 40º C durante 5 minutos en un equipo ultrasonido marca Elma, operado a 4,5 Amperios y 60Hz. Paso siguiente, las muestras fueron sometidas a saponificación en un baño María Maxthermo operado a 120V y 6 Amperios a una temperatura de 75º C durante 35 minutos. Una vez finalizado el paso anterior, las muestras se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se transfirieron a un tubo de centrifuga de 50 mL, donde se les adicionaron 5 mL de agua destilada y desionizada. Seguidamente, a cada muestra se le adicionaron 10 mL de hexano grado HPLC y se agitaron por 1 minuto. Después, se centrifugó cada muestra en un equipo Boeco Germany R: U320R a 7000 rpm durante 10 minutos. Cuando se terminó la centrifugación, se removió la capa de hexano y se repitió el proceso desde el paso en la adición de hexano dos veces más, para obtener una cantidad suficiente de hexano para la posterior cuantificación del ergosterol.

Para la medición del ergosterol, se implementó el protocolo del laboratorio de análisis instrumental del CIBIOT perteneciente a la UPB. Este método utilizó una columna C18 250x4.6mm, una fase móvil de metanol, con un flujo de 1.5 mL/min a una temperatura de 30°C y detección UV-VIS a 280nm. La elaboración de una de las curvas de calibración aparece en el Anexo D.

4.8 MODELACIÓN MATEMÁTICA DEL CRECIMIENTO DEL *Pleurotus pulmonarius* EN LAS CAJAS DE PETRI.

Para determinar el comportamiento del crecimiento del basidiomiceto, se realizó un ajuste matemático de la cinética de crecimiento. Con los datos obtenidos en las cajas de Petri, se construyeron las curvas de la cinética de la biomasa para las concentraciones de proteína y ergosterol en Microsoft Excel®. Para el ajuste de los datos se emplearon los modelos de crecimiento Logístico y de Gompertz, además que se analizaron con redes neuronales artificiales (RNA). En los tres modelos, el análisis se llevó a cabo tanto para cada una de las réplicas y para todos los datos en conjunto.

4.8.1 Ajuste de crecimiento al modelo de Logístico

El modelo Logístico, se obtuvo a través del ajuste de los datos experimentales réplica por réplica, tanto para la concentración de proteína como para la concentración de ergosterol; a través del software R. Los datos en conjunto se analizaron en el CFTOOL de Matlab®. El modelo de crecimiento Logístico, se muestra en la Ecuación 6.

Ecuación 6. Ecuación del modelo Logístico

$$x(t) = \frac{\beta 1}{1 + e^{(\beta 2 + \beta 3 * t)}}$$

Donde x es la concentración de biomasa que puede ser expresada en concentración de proteína (g de proteína/ g sustrato) o en concentración de ergosterol (µg de ergosterol/ g sustrato); β_1; β_2 y β_3 son los coeficientes de la ecuación logística, que se obtienen mediante ajuste y *t* el tiempo en días.

4.8.2 Ajuste del crecimiento al modelo de Gompertz

El modelo de crecimiento de Gompertz, se obtuvo a través del ajuste de los datos experimentales réplica por réplica, tanto para la concentración de proteína como para la concentración de ergosterol; a través del software en línea Zunzun.Los datos en conjunto se analizaron en el CFTOOL de Matlab®. La Ecuación 7, describe el modelo de crecimiento de Gompertz.

Ecuación 7. Modelo de crecimiento de Gompertz

$$y=\beta_1*\exp(-\exp(\beta_2-\beta_3*x))$$

El significado de cada una de las variables, es la misma que se describió en la ecuación 6.

4.8.3 Análisis del crecimiento celular con RNA

Las RNA aparecen como herramientas para modelar el crecimiento en FES, sobre todo cuando se sabe poco de un fenomeno, tal como sucedió al inicio de este trabajo (U Hölker, Höfer, & Lenz, 2004; Thomas et al., 2013; Zhang et al., 2012). En una red neuronal, las neuronas se pueden conectar en capas y organizarse en forma paralela para el procesamiento, creando una red. Esta red puede tener un número de capas y neuronas variables según lo requiera el problema específico; el algoritmo de aprendizaje busca obtener los denominados pesos y umbrales que minimicen el error con respecto a los datos originales. Es un concepto similar al ajuste de mínimos cuadrados en la regresión lineal usada ampliamente en estadística (Hykin, S., 2005). Para este caso de varias capas y varias neuronas, se obtiene una ecuación matemática de salida por cada capa de forma matricial,como se mostró en la ecuación 3. Para el análisis con las RNA, el tipo de red empleada fue la denominada Backpropagation por su algoritmo de aprendizaje, también conocida como la red neuronal de propagación. Este tipo de RNA encuentra una relación funcional de los datos de entrada con respecto a los datos de salida, en este caso para encontrar un modelo de la cinética del crecimiento de biomasa. Para el procesamiento de las RNA se empleó el toolbox de redes neuronales de Matlab®, NFTOOL. El NFTOOL por defecto, utilizó una configuración de dos capas: la primera, (capa oculta), emplea una función de activación sigmoidea; la otra capa, (de salida), emplea la función de activación lineal. Se seleccionaron cuatro neuronas en la capa oculta y una neurona en la capa de salida entrenándose hasta el ajuste.

4.8.4 Reparametrización del modelo Logístico y de Gompertz

En los items 4.8.1 y 4.8.2, se lograron ajustar los datos de biomasa en términos de la concentración de proteína y de la concentración de ergosterol al modelo Logístico y de Gompertz a través de los coeficientes β_1, β_2 y β_3, de los cuales el β_1 es una aproximación de la concentración máxima de la biomasa; sin embargo no aparecen pametros cinéticos como la velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}) o la fase de adaptación; para la obtención de dichos parámetros se recurre a la repametrización empleada por Zwietering y colaboradores (Zwietering et al., 1990) donde se pueden calcular además de la velocidad máxima específica de crecimiento, el período de latencia (λ) y la concentración máxima de biomasa (C_{max}) para los modelos de crecimiento Logístico y de Gompertz; la reparemetrización explica desde el punto de vista biológico, los datos obtenidos en ambos modelos. Las Ecuaciones 8 y 9 muestran los modelos Logistico y de Gompertz reparametrizados respectivamente.

Ecuación 8. Modelo de crecimiento Logístico reparametrizado

$$y = \frac{A}{\left\{1 + exp\left[\frac{4\mu max}{A}(\lambda - t) + 2\right]\right\}}$$

Ecuación 9. Modelo de crecimiento de Gompertz reparametrizado

$$y = A * exp\left\{-exp\left[\frac{\mu max * e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\}$$

El valor *e* corresponde al número de Euler. De acuerdo a la reparametrización de la Ecuación 7, los parámetros cinéticos (periodo de latencia, velocidad específica de crecimiento y máxima concentración de biomasa), se muestran en las Ecuaciónes de la 10 a 12.

Ecuación 10. Periodo de latencia (ʎ) para la ecuación logística

$$\lambda = \frac{(\beta 2 - 2) * A}{4 * \mu max}$$

Ecuación 11. Velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}) para la ecuación logística

$$\mu max = \frac{\beta 1 * \beta 3}{4}$$

Ecuación 12. Máxima concentración de biomasa (A) para la ecuación logística

$$\mathrm{A} = \beta 1$$

Los parámetros cinéticos del modelo de Gompertz, período de latencia, velocidad específica de crecimiento y máxima concentración de biomasa se muestran en las Ecuaciones 13 a 15 respectivamente.

Ecuación 13. Periodo de latencia (**λ**) según el modelo de Gompertz

$$\lambda = \frac{\beta 2 - 1}{\beta 3}$$

Ecuación 14. Velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}) según el modelo Gompertz

$$\mu max = \frac{\beta 1 * \beta 3}{e}$$

Ecuación 15. Máxima concentración de biomasa (A) según el modelo Gompertz

$$\mathrm{A} = \beta 1$$

4.8.5 Medición y modelación de la biomasa en tusa de maíz PDI en las cajas de Petri.

Con el objeto de obtener una alternativa de medir la biomasa en FES, se llevó a cabo una medición de las áreas de crecimiento del micelio, modificando el método empleado por Smits y colaboradores (Smits et al., 1998) con el PDI. Antes de que se llevaran las muestras a cuantificarles tanto la concentración de proteína como la de ergosterol, se tomó la fotografía para medir el área. La toma de la fotografía, se realizó con una cámara digital de 14 megapixeles a una altura de 12 cm y una resolución 4x wide 27 mm – woxmm, sobre un fondo negro. Las fotos se tomaron para todas las cajas de la réplica; una vez tomada la fotografía, se procedió a medir la biomasa, como lo describen los numerales 4.7.1 y 4.7.2. Cada grupo de fotografías eran almacenadas en una carpeta correspondiente al día en que eran tomadas. A cada fotografía, se le media el área a través de un algoritmo en el toolbox del procesamiento digital de Matlab, que aparece en el Anexo E y se correlacionaron tanto con la concentración de proteína como con la concentración de ergosterol para ajustarlas a un modelo logístico con el software en línea Zunzun y el CFTOOL de Matlab. El modelo al que se ajustó la correlación de las áreas tanto para las concentraciones de proteína como para la concentración de ergosterol, fue el Logístico A, que se muestra en la Ecuación 16.

Ecuación 16. Ecuación Logística A

$$\boldsymbol{y = \frac{\beta_1}{1 + \beta_2 * e^{(-\beta_3 x)}}}$$

El coeficiente β_1, indica el área máxima de crecimiento que se podría obtener, el β_2 adimensional y β_3, está asociada al tiempo.

4.9 DISEÑO DE UN BIOREACTOR FES TIPO COLUMNA

4.9.1 Modelo base del fermentador sólido

El fermentador base que se tomó como modelo, fue un fermentador tipo columna, de acuerdo a un diseño previo del grupo de investigaciones CIBIOT, de la UPB. El esquema del fermentador base, se muestra en la figura 13.

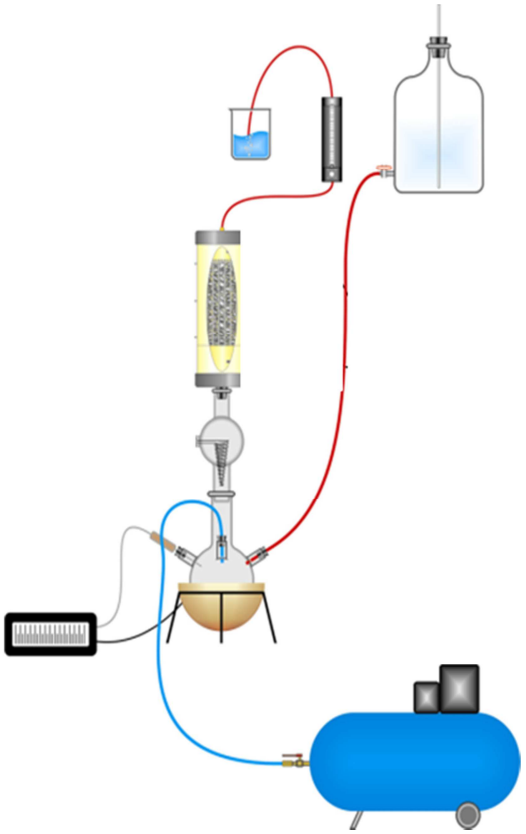


Figura 13. Pictograma del fermentador solido base tipo columna.

Los criterios de selección del fermentador tipo columna, como el mostrado en la figura 13, fueron lo económico y sencillo del montaje, además de la producción de biomasa por unidad de volumen; este modelo particular, cuenta con una altura de lecho de 10 cm, un sistema de distribución de vapor de agua través de un sistema de tubos verticales atornillados sobre una placa perforada, una resistencia para el calentamiento del agua y un sistema de suministro de aire para transportar el agua caliente. Por el material, no era posible esterilizarlo a través de un tratamiento físico, sino a través de tratamiento químico, ya que estaba construido en pvc.

4.9.2 Escalado del fermentador de columna

Con el objetivo de tener un fermentador solido al cual se le pudieran monitorear variables esterilizar y aumentar el volumen de producción, se llevó a cabo un escalado geométrico, con el objetivo de conservar las principales característica del modelo base; al fermentador escalado, se le instaló un controlador de temperatura para el agua que a mantener hidratado el sustrato y se le conectará un software de adquisición de datos.

4.9.3 Diseño de los distribuidores

Debido a los problemas de contaminación presentados durante las fermentaciones, se llevaron a cabo, diferentes diseños en los distribuidores de humedad donde se detectaron contaminaciones; el primer diseño se muestra en la figura 14.

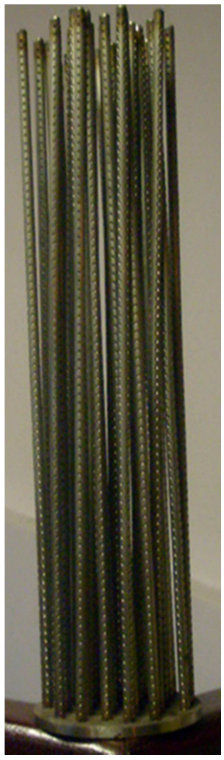


Figura 14. Primer distribuidor de humedad en el FS

El primer distribuidor de la figura 14, contaba con 31 cilindros concéntricos, distribuido homogéneamente en la base de circular. Cada cilindro tiene un diámetro de 1 mm. Con este distribuidor se llevaron a cabo 8 fermentaciones. En vista de los problemas con la contaminación, se llevó a cabo el primer rediseño, que aparece en la figura 15.

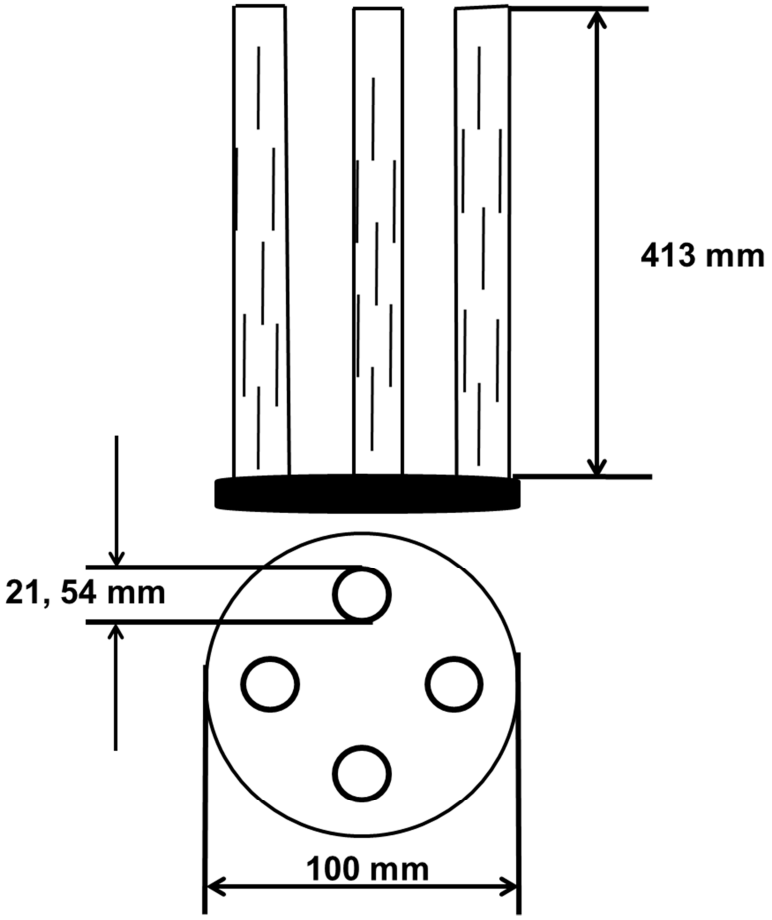


Figura 15. Primer rediseño del distribuidor de humedad en el FS

El primer rediseño, mostrado en la figura #, tiene con cuatro tubos de cpvc, de 2,54 cm, homogeneamente distribuidos en la base del módulo de fermentación, con las perforaciones de 10 cm alrededor del mismo. Con el primer rediseño, se llevaron a cabo 3 fermentaciones. Debido a los problemas de contaminacion, se planteó un segundo, rediseño el cual se muestran en la figura 16.

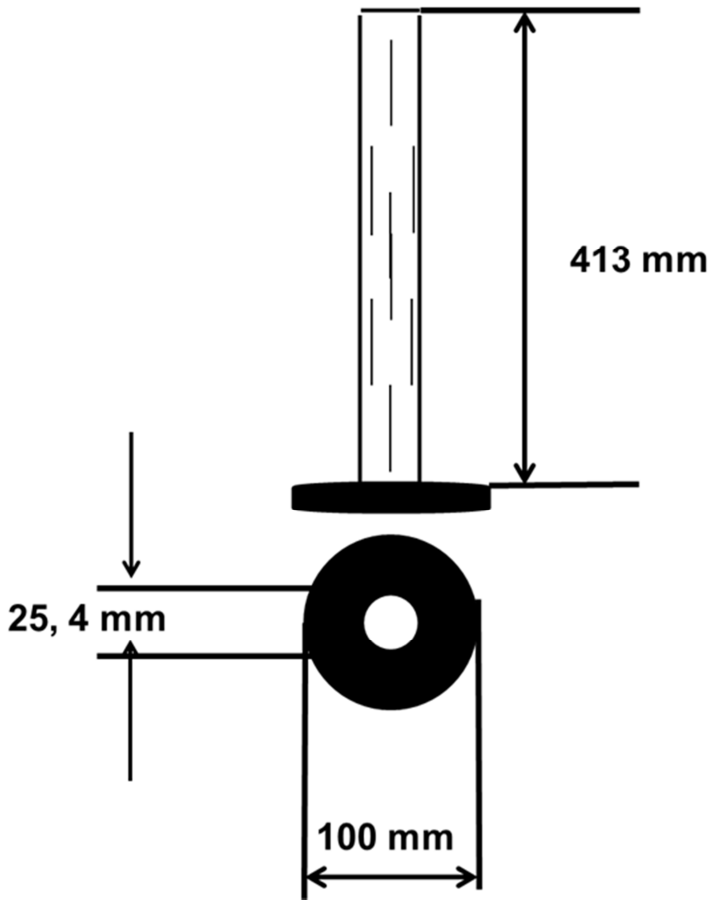


Figura 16. Segundo rediseño del distribuidor de humedad en el FS

El segundo rediseño, consiste en un tubo de concéntrico de 2, 54 cm de diámetro, con las mismas perforaciones a su alrededor de los tubos distribuidores de la figura anterior (6). Dicho distribuidor se construyó en acero inoxidable. Con dicho distribuidor, se llevaron a cabo tres fermentaciones.

Debido a la persistencia de los problemas de contaminación, se hizo un tercer rediseño, el cual aparece en la figura 7. Dicho rediseño, consistió en modificar en adicionar al sistema anterior, cuatro módulos o canastas homogéneamente distribuidas a lo largo del tubo; para este rediseño, se llevaron a cabo dos ensayos con suministro de aire y dos sin suministro de aire.

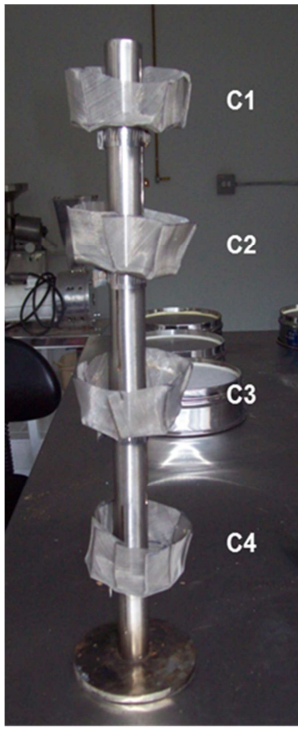


Figura 17. Último rediseño del distribuidor de humedad en el FS.

4.10 OPERACIÓN DEL FSC

Antes de realizar el montaje, el reactor fue lavado y esterilizado a 121 °C durante 30 minutos; el FSC que se empleó se puede desmontar para facilitar este proceso.

4.10.1 Carga y operación del FSC

Al tener listo el sustrato con el inóculo y el equipo de fermentación apto para el procedimiento, se realiza la carga del sustrato que va dentro del FSC. Al realizar el montaje del equipo se debe:

- Realizar medición de las variables durante el proceso fermentativo: Humedad, temperatura.
- Extracción de muestras para medición de proteína y digestibilidad

Para todos los montajes, se requería un pre-inóculo de adaptación antes de llevarlo el bioproceso al FSC, teniendo en cuenta que la preparación del montaje se debía hacer con uno o dos días de anticipación.

4.10.2 Descarga del FSC

Al finalizar la etapa de fermentación, se realiza el desmontaje de la columna de fermentación, y el producto obtenido después de realizar los análisis correspondientes: medición de las concentraciones de proteína y ergosterol, lignina y digestibilidad enzimática.

Para los tres primeros distribuidores, las condiciones de fermentacion fueron: sustrato con un 80% de humedad, pH 8 y presencia de sales; la fermentacion se llevó a cabo durante 25 días, con aireacion. Se realizó un preinoculo de 5 días antes, en el sustrato y previamente, se esterilizaron tanto el fermentador solido y el sustrato.

4.11 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA EVALUAR EL CRECIMIENTO PROTEICO SOBRE TUSA DE MAÍZ EN EL FSC

Teniendo en cuenta que la importancia del tamaño de partícula y el porcentaje de inoculo para la FES (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008), se hizo un diseño de experimentos factorial del orden 2^2 donde los niveles del tamaño de partícula son 2223 µm y 901 µm; los niveles del porcentaje de inoculo fueron 30% y 20%; adicional al tamaño de partícula y el porcentaje de inoculo, se evaluó la posición de la canasta en el FSC. La variable respuesta fue la concentración de proteína. El contenido de proteína se calculó por el método de Kjendal tal como se explicó en el ítem 2.2. La matriz del diseño se muestra en la Tabla 4:

Tabla 4. Matriz de diseño de experimentos para el FSC

No. Ensayo	TAMAÑO DE PARTÍCULA	% INOCULO	Modulo	Variable respuesta
1	2322 µm (Grueso) (+)	30% (+)	C1	Concentración de Proteína g Proteína/ g Sustrato
			C2	
			C3	
			C4	
2	2322 µm (Grueso) (+)	20% (-)	C1	
			C2	
			C3	
			C4	
3	901 µm (Fino) (-)	30% (+)	C1	
			C2	
			C3	
			C4	
4	901 µm (Fino) (-)	20% (-)	C1	
			C2	
			C3	
			C4	

El análisis estadístico se realizó en el Statgraphics Centurion XV.

4.12 CALCULO DEL % DE ENRIQUECIMIENTO PROTEICO SOBRE LA TUSA DE MAIZ EN EL FSC

Con la determinación del porcentaje de proteína se calculó el % de enriquecimiento proteico de la tusa de maíz, según el método modificado de Schmidt y Furlong (Schmidt & Furlong, 2012) que aparece en la Ecuación 17

Ecuación 17. Porcentaje de proteína ganada

$$\%PG = \left(\frac{CF - CI}{CI}\right) * 100$$

Donde,

- %PG, porcentaje de proteína ganada.
- CF, es la concentración de proteína enriquecida en la tusa al final del bioproceso.
- CI, es la concentración de proteína de la tusa al inicio del bioproceso.

4.13 CALCULO DE LA PRODUCTIVIDAD DEL FSC

Ademas del contenido de proteína y el % de enriquecimiento proteico sobre la tusa de maíz en el FSC, se calculó la productividad del fermentador, según Mitchell y colaboradores (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006) que se describe en la Ecuación 18.

Ecuación 18. Productividad del FSC

$$Productividad = \frac{Pf - Po}{t * V}$$

Donde,

- Pf, es la cantidad o concentración de producto obtenido al final del bioproceso, (g proteína/ g sustrato).
- Po, es la cantidad o concentración de producto al inicio de bioproceso, (g proteína/ g sustrato).
- t, del bioproceso, (días)
- V, el volumen del FSC, (litros)

4.14 CINÉTICA Y MODELADO DEL CRECIMIENTO EN EL FSC

Una de las dificultades de los FSC, es establecer la cinética de crecimiento celular, como se mencionó en el marco teórico (Durand, 2003), (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006). Con los datos obtenidos de los modelos ajustados de los modelos Logístico y de Gompertz, además de las RNA del ítem 2.8, se modeló el crecimiento de la biomasa del *Pleurotus pulmonarius* en el FSC. Tanto el ajuste a los modelos matemático de crecimiento como a las RNA se analizaron con Matlab en el CFTOOL y el NFTOOL respectivamente. De acuerdo a los datos obtenidos en la caja de Petri y teniendo en cuenta que estas últimas al igual que las canastas del FSC, tienen geometría cilíndrica, la modelación del crecimiento se hace teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- Para el caso del modelo Logístico y de Gompertz:

    a. Se asume que el comportamiento del crecimiento del basidiomiceto en la caja de Petri es el mismo en todas las canastas del FSC, basado en la geometría cilíndrica de las canastas del FSC y las cajas de Petri.
    b. La concentración inicial de proteína es la tusa sin inocular.

c. La concentración final de proteína, es la que corresponde a los valores arrojados en el diseño de experimentos en el FSC, propuesto en la Tabla 4.

- Para el caso de las RNA:
  a. Se asume que la función de la red neuronal está dada por:

$$y = Frn * (t)$$

Dónde:
y, es la concentración de proteína a los 25 días, según el diseño de experimentos
t, es el tiempo en días, es decir 25
F_{rn}, es la RNA arrojada en la Figura 34, para todos datos de proteína en conjunto.

b. El cálculo de la proteína en la caja de Petri con el modelo de red neuronal a los 25 días se da por la siguiente función:

$$Y_{P_25} = Frn * (25)$$

Con la anterior función se calcula el factor de escalizado (F_{Escal}), el cual está dado por la siguiente Ecuación 19:

.

Ecuación 19. Factor de escalizado de la RNA para la concentración de proteína

$$F_{Escal} = y / Y_{P_25}$$

c. Con lo anterior, la nueva RNA para el FSC se muestra en la Ecuación 20:

Ecuación 20. RNA para la concentración de proteína en el FSC

$$y_{FSC} = F_{Escal} * Frn * (t)$$

4.15 MEDIDA DE LAS DESLIGNIFICACIÓN EN EL FSC

Terminado el bioproceso, paralelo a la medición de la proteína, se llevó a cabo la medición de la lignina, tal como se describió en el Anexo A, haciendo el cálculo de la cantidad de lignina eliminada.

4.16 MEDIDA DE LA DIGESITIBILIDAD ENZIMATICA EN EL FSC

Una vez terminado el bioproceso en el fermentador, con el objeto de complementar la medida de la deslignificación, se midió la digestibilidad enzimatica de la tusa de maiz invadida con el micelio del *Pleurotus pulmonarius*, de acuerdo al método reportado por Aufrere y modificado por Sampoux y colaboradores (Aufrere, 1978; Sampoux et al., 2011). El procedimiento consisite en llevar una muestra seca de 500 mg a un bano maria a 40°C, con 50 ml de una solucion de HCl-Pepsina (0.2 gr de pepsina por 100 mL de HCl 1N), empleando crisoles filtrantes. Transcurridas 24 horas se filtró el contenido con ayuda de vacío y se lavó con abundante agua. En una segunda etapa se añadieron 50 mL de una solución de celulasa en una solución buffer de acetato de sodio de 0.5M, pH 4.5. Después de 24 horas de incubación, en las mismas condciones de la primera fase, se anade a cada crisol 1 mL de ácido acético, se filtró el contendo y se lava abundantemente el residuo. Los crisoles se introducen en un horno durante 24 horas a 65 °C y se calcula por diferencia de peso. Este procedimiento se realizó por duplicado.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA TUSA DE MAÍZ

La caracterización de la tusa de maíz, se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Caracterización de la tusa de maíz

Componente	%	Desviación estándar
Humedad	59,73	0,799
Cenizas	1,41	0,127
Fibra	35,28	0,432
Proteína	3,58	0,255

La importancia de la humedad del sustrato, radica en la disponibilidad de los nutrientes para el buen crecimiento y desarrollo del hongo; por el valor obtenido en este trabajo, es conveniente aumentarla, aunque sin sobrepasar el valor máximo, porque como afirma, Orzúa y colaboradores (Orzúa et al., 2009). La presencia de un alto contenido de humedad, provoca que el sustrato se compacte y, por lo tanto, no haya una adecuada penetración de oxígeno. Sánchez y Royse (Sánchez y Royse, 2001) afirman que la humedad de los sustratos para basidiomicetos del género *Pleurotus* debe estar entre el 50 y el 80%; algunos autores estrechan dicho rango, como es el caso de Rodriguez y colaboradores (Rodriguez et al., 2008) donde se menciona un rango de 65 a 75%.

Las cenizas representan el material inorgánica presente en una muestra, que no es susceptible a degradarse (Dormond H; Boschini C; Bourrillón A., 1998) , en forma de minerales como fósforo, potasio, calcio y magnesio. La bibliografía tiene resultados encontrados en cuanto a las necesidades de minerales, sobre todo cuando los sustratos son residuos agroindustriales en los cuales se contiene la mayoría de éstos. En cuanto al contenido de cenizas, el resultado de 1,41% ± 0,127, es similar al reportado por Cardona y colaboradores (Cardona et al., 2002), que fue de 1,6%.

La fibra bruta o cruda está compuesta de celulosa, hemicelulosa y lignina; en referencia a lo que tiene que ver con lignina, el contenido arrojado en este trabajo para la tusa de maíz fue de 14,56% ± 0,161. Este valor está muy cercano al reportado por (Zych, D., 2008)con un rango de 6,7 a 13,9% y a los valores registrados según Cuervo y colaboradores (Cuervo, L; Folch, J y Quiroz, R., 2009) con un contenido de 15% de lignina. En términos generales, los valores de la lignina encontrados en la bibliografía para tusa de maíz, están en un rango de

valores entre el 15 y el 20%. (Cruz, Domínguez, Domínguez, & Parajó, 2000; Liu et al., 2010; Rodríguez Couto & Sanromán, 2005). El contenido de lignina, ejerce un efecto negativo sobre la digestión total en los rumiantes, ya que la lignina es totalmente indigestible (Bach, A. Calsamiglia, S., 2006), y a mayor contenido de lignina menor será su digestibilidad (Bach, A. Calsamiglia, S., 2006). Este tipo de compuestos son de difícil digestión para la mayoría de los organismos vivos y se debe recurrir a tratamientos químicos o por la acción de los denominados hongos de podredumbre blanca, donde se destacan las setas que esporulan en los troncos, las raíces de los árboles o en los residuos agroindustriales (Luley, Christopher, 2006). El contenido de la fibra bruta arrojado en la Tabla 5 de 35,28% ± 0,432, se aproxima al obtenido por Ansah y colaboradores (Ansah et al., 2012), donde caracterizaron tusa de maíz para alimentación animal y al de Ortega y colaboradores (Ortega et al., 2005) para el cultivo de hongos del tipo *Pleurotus spp*., con valores de 35,50% y 35,80% respectivamente.

Valores reportados por la literatura para todo el cuerpo de la mazorca, muestran contenidos de proteína del 8% (Patiño, E., 2004), lo que muestra que más del 50% de la proteína está presente en el grano, mientras que otros residuos como la cáscara de banano, presentan contenidos del 10.45% de proteína, lo que indica que el que el desecho de la mazorca, no es el residuo con mayor contenido proteico. El contenido de proteína en la tusa de maíz, mostrado en la Tabla 5, es de 3,58% ± 0,255.

La caracterización de la tusa de maíz obtenida en éste trabajo, está muy próxima a los trabajos realizados por Patiño (Patiño, E., 2004) y Miura et al (Miura et al., 2004), en la mayoría de los componentes: humedad entre el 60 y 65 %, cenizas entre el 1 y el 1.5%, fibra bruta alrededor del 30% y proteína entre 3 y 5 %.

Con los resultados obtenidos hasta aquí, se puede deducir que la tusa de maíz sin ningún tratamiento, no aporta nutrientes significativos y tiene baja digestibilidad, sin embargo por su reducido valor económico, es ampliamente empleada para alimentar diferentes especies de ganado (Cruz et al., 2000; Rodríguez Couto & Sanromán, 2005), (Bach, A. Calsamiglia, S., 2006); de otro lado, tal como se anotó anteriormente, se puede aumetar su digestibilidad, por la acción de basidiomicetos, específicamente el *Pleurotus pulmonarius*, con lo cual además, se enriquecería con la proteína miceliar del hongo, para mejorar las propiedades nutricionales de la tusa y pueda ser empleada para alimentación animal (Davila y Vásquez, 2006).

5.2 RESULTADOS DEL CRECIMIENTO PRELIMINAR DEL *Pleuroturs pulmonarius* SOBRE LA TUSA DE MAIZ EN LAS CAJAS DE PETRI

Para cuantificar el crecimiento del basidiomiceto en la tusa de maíz, se midió el blanco del micelio invadido en la tusa de maíz a través del PDI, como forma indirecta del vigor del hongo. Dicho proceso se realizó con un algoritmo del toolbox de procesamiento digital en Matlab, el cual se encuentra en el Anexo 2. A continuación en las Figuras de 18 a 20, se presenta la evaluación preliminar del efecto de la humedad, el pH y el contenido de sales sobre el crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maiz, en las cjas de Petri.

Figura 18. Registro fotografico de la evaluacion del crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* a diferentes condiciones de humedad. A 60% B. 80%

Figura 19. Registro fotografico de la evaluacion del crecimiento del Pleurotus pulmonarius a diferentes condiciones de pH. A. 6 B. 8

A B

Figura 20. Registro fotografico de la evaluacion del crecimiento del Pleurotus pulmonarius a través de las sales. A. Con Sales B. Si sales

De las Figuras 18 a 20, se puede evidenciar que hay una diferencia en los réplicas de crecimiento entre 60 y 80% de humedad, mostrando una invasión completa en el 80% de humedad; sin embargo, para pH y las sales no hay una diferencia comparable luego de 30 días. Con el propósito de encontrar una diferencia cuantitativa, se procedió a medir la intensidad del blanco en cada uno de las réplicas. En la Tabla 6, se muestran los valores de la medición del índice de blanco (IB) para cada uno de las réplicas.

Tabla 6. Medición del IB para evaluar el crecimiento preliminar

Variable	Promedio IB	Desviación Estándar	Coeficiente Variación (%)
Humedad 60 %	0,498	0,031	4,563
Humedad 80 %	0,828	0,015	1,792
pH 6	0,619	0,015	2,476
pH 8	0,628	0,016	2,474
Con Sales	0,634	0,007	1,167
Sin Sales	0,613	0,003	0,494

De la Tabla 6, se puede decir que los promedios de índice de blanco con mayor diferencia son los del contenido de humedad, mientras que los del pH y la adición o no de sales están muy cercanos. Las desviaciones estándar están por debajo de 0,05 para todos los casos y los porcentajes de los coeficientes de variación se encuentran por debajo del 5%, indicando que hay confiabilidad en los datos. Con el ánimo de encontrar diferencia estadísticamente significativa, se realizó un análisis estadístico de t de student, suponiendo que tienen varianzas iguales, en el software Statgraphics. El resumen estadístico de dicho análisis se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Resumen estadístico de los Índices de Blanco para el crecimiento preliminar

Análisis	60%	80%	pH 6	pH 8	Con Sales	Sin Sales
Promedio	0,487	0,828	0,620	0,628	0,634	0,613
Desviación Estándar	0,022	0,015	0,015	0,016	0,007	0,003
Coeficiente de Variación	4,57%	1,79%	2,47%	247,10%	1,17%	0,49%
Prueba t	-25,5343		-0,779276		5,42869	
Valor P	2,3775E-7 *		0,465434		0,00161949 *	

Para los datos obtenidos en la Tabla 7, se ejecutó una prueba-t para comparar las medias de las dos muestras. También construyó los intervalos de confianza para cada media y para la diferencia entre las medias. En el caso de la humedad el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, abarca desde -0,374 hasta -0,309. Para el pH desde -0,035 hasta 0,018. Para las sales desde 0,012 hasta 0,031. Según lo anterior, para el caso del porcentaje de humedad y la presencia de sales, los intervalos no contienen el valor 0, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras, con un nivel de confianza del 95,0%. En el caso del pH, no hay diferencia significativa entre las medias de las dos muestras de datos, porque el intervalo no contiene el valor 0.

Los resultados de la Tabla 7, pueden usarse para la prueba t, con el fin de evaluar hipótesis específicas acerca de la diferencia entre las medias de las poblaciones de las cuales provienen las dos muestras. Así, la prueba puede determinar si la diferencia entre las dos medias es igual a 0 (es decir los IB son iguales) contra la hipótesis alterna, donde la diferencia no es igual a 0. Según los resultados obtenidos de la Tabla 7, para el caso de la humedad y el contenido de sales, los valores de P aparecen señalados con un asterisco y son de 2,3775E-7 y 0,00162 respectivamente, menores de 0,05 por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula a favor de la alterna. En el caso del pH, el valor P es de 0,465, por lo tanto no se puede rechazar la hipótesis nula, es decir los IB son diferentes de 0.

Tomado los resultados anteriores para el contenido de humedad (Figura 20), los resultados correspondientes al 80% mostraron un buen desarrollo del hongo y permitió que el micelio invadiera rápidamente todo el sustrato; lo anterior se debe a que la humedad es un factor que está íntimamente relacionado con el mismo concepto de FES y con las características del sustrato; la importancia del agua en la FES se debe al hecho que la mayoría de las células viables tienen un contenido de humedad entre el 70 y 80% (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008). De otro lado, el rápido crecimiento del micelio puede evitar el desarrollo de microorganismos no deseables en el proceso.

Para el pH no se observaron diferencias en la invasión del micelio entre los niveles evaluados, esto debido probablemente a que el rango seleccionado corresponde a los valores de pH en los que presenta un mayor crecimiento la mayoría de los hongos, tal como lo afirma Carrillo (Carrillo, L, 1998), quien postula que el

crecimiento de los hongos puede estar entre un pH de 4 a 8, presentando los mejores rendimientos entre 5.5 y 6.5, con lo cual podría explicarse que no hubo una diferencia evidente, aunque como afirman Álvarez colaboradores (Alvarez, M. Larrea, P. Paredes, M., 2010) el pH se ve influenciado por efectos como la humedad.

En cuanto a las sales, a pesar de las similitudes en el crecimiento tanto con presencia o ausencia de sales, autores como Ramos y colaboradores (Ramos, M; Ricardo, J., 2007) afirman que las sales son útiles para el buen crecimiento de los hongos, especialmente para aumentar el contenido proteico de los sustratos lignocelulósicos.

Con los resultados obtenidos del crecimiento preliminar del *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maíz en las cajas de Petri, los mejores resultados son humedad del 80%, pH de 6 y con presencia de sales.

5.3 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL TAMAÑO DE PARTICULA EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA SOBRE TUSA DE MAÍZ EN CAJA DE PETRI

Obtenidos los resultados del crecimiento preliminar y el tiempo del bioproceso, se llevo a cabo un diseño de experimentos factorial, con el objeto de determinar la influencia de la temperatura y el tamaño de partícula en la producción de la proteína sobre la tusa de maíz con el *Pleurotus pulmonarius,* durante 30 días. Los valores tomados para el diseño factorial se basaron en otros trabajos en FES para el basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius.* Los resultados del diseño de experimentos para determinar el enriquecimiento de la tusa, con respecto al contenido proteico inicial de la misma, en cajas de Petri se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultado del diseño de experimentos en las cajas de Petri

No.	Combinación		Resultados		
	Temperatura (°C)	Tamaño Partícula (µm)	g Proteína g Sustrato	% Ganancia	Desviación Estandar
1	35	2450	0,515	36,647	0,023
2	35	910	0,441	16,983	0,065
3	25	2450	1,213	221,946	0,339
4	25	910	0,663	75,989	0,070

5.3.1 Analisis estadistico del diseño de experimentos

Con los resultados de la Tabla 8, se hizo el analisis estadistico en primer lugar a traves del analisis de varianza, el cual se muestra en la Anova de la Tabla 9.

Tabla 9. Tabla Anova del diseño de experimentos en las cajas de Petri para el tamaño de partícula y la temperatura.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Tamaño de Partícula	0,2645	1	0,2645	8,47	0,0196
B:Temperatura	0,5944	1	0,5944	19,05	0,0024
INTERACCIONES					
AB	0,1919	1	0,1919	6,15	0,0381
RESIDUOS	0,2497	8	0,0312		
TOTAL (CORREGIDO)	1,3004	11			

De la Tabla Anova, se muestra que tanto la temperatura como el tamaño de partícula y su interacción tienen un efecto significativo sobre el contenido de proteína en el sustrato, por tener un Valor-P menor a 0.05. Sin embargo, es más relevante estudiar la interacción, que los efectos principales. Para ver la importancia de la interacción, se muestra a continuación el gráfico correspondiente, en la Figura 21.

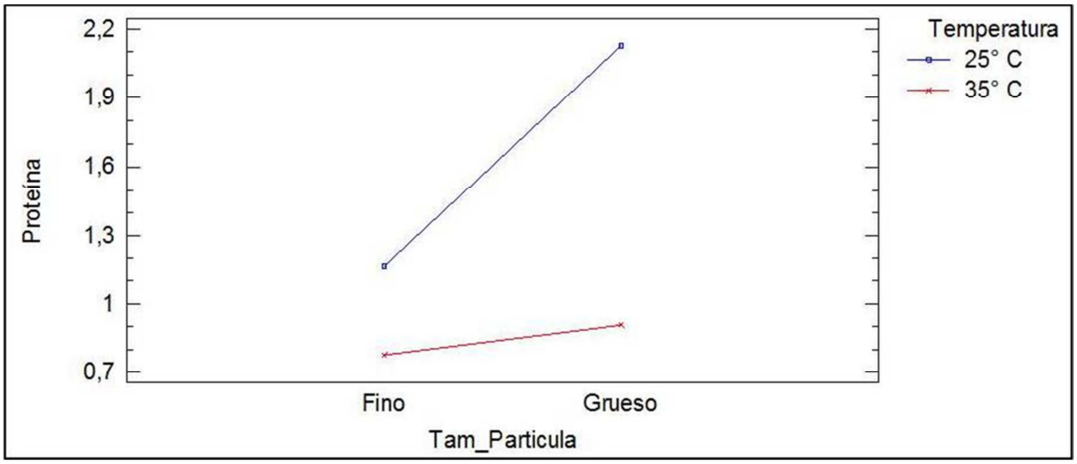


Figura 21. Gráfico de interacciones para el diseño de experimentos en las cajas de Petri para el tamaño de partícula y la temperatura.

En el gráfico de interacción se muestra que las líneas de los efectos no son paralelas, lo que indica que hay interacción entre los dos factores. Se utilizó la

prueba Tukey para corroborar los efectos simples de la temperatura y del tamaño de partícula sobre el contenido de proteína; los resultados de dicho análisis se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Prueba de Tukey para los efectos simples de temperatura y tamaño de partícula con base en los promedios de proteína.

	910 µm	2450 µm	Efecto Simple Tamaño de Particula
25 °C	0,663	1,213	0,550
35 °C	0,441	0,515	0,074
Efecto Simple Temperatura	-0,222	-0,698	

*

Para la prueba de Tukey con una confianza del 95%, tres réplicas y 8 grados de libertad, el valor del límite honesto LHS(T) es de 0,5903; cualquier número (Valor Absoluto) mayor o igual al LHS(T) es significativo y se señala con un asterisco, para este caso 0,698 en el efecto simple de la temperatura. En la Tabla 12, se observa que la combinación más recomendable es tamaño de partícula de 2450 µm a 25 °C puesto que supera significativamente al correspondiente a 35 °C. También podría decirse para el caso del tamaño de partícula grueso, que cuando se pasa de 25 a 35 °C presenta una disminución significativa en la proteína en un valor de 0,698 g Proteína/ g de Sustrato.

Ademas de lo anterior, se calculó el R^2 o el coeficiente de determinación. Para hallar el coeficiente de determinación, se aplicó la ecuación 5; el valor el coeficiente de determinación para el anterior diseño es de 0,808; éste resultado, puede considerarse adecuado para las consideraciones de crecimiento miceliar del *Pleurotus pulmonarius* sobre tusa de maíz. Es importante anotar que un valor alto de R^2 no indica que la relación de las variables temperatura y tamaño de partícula, sea necesariamente lineal, es decir no implica que la temperatura sea un buen predictor lineal del tamaño de partícula o viceversa. El coeficiente R^2 aumenta con el esparcimiento de los valores de temperatura aunque el ajuste lineal no sea bueno. Por otra parte, $R^2 \approx 0$ puede indicar que no hay dependencia lineal de tamaño de partícula con temperatura o que la dependencia es no lineal. Así, R^2 no mide idoneidad del modelo (Díaz Cadavid, Abel, 2009). Por lo general, los valores cercanos de los coeficientes de determinación, se muestran para superficies de respuestas como el trabajo presentado por Sudhakar y Nagarajan (Sudhakar y Nagarajan, 2010), que reportan un valor del 0,9959.

5.3.2 Analisis del enriquecimiento proteico de la tusa de maíz con el *Pleurotus pulmonarius* en la caja de Petri.

De los resulatados del diseño experimental para la evaluación del contenido proteico (Tabla 8), se destaca de manera especial la réplica 3, con un contenido proteíco de 1,213 g proteína/ g de sustrato, el cual obtuvo un incremento de casi el 222% del contenido proteico, con respecto a la tusa sin tratar. Un incremento superior fue reportado por Dhillon, Kaur y Brar (2013) con un incremento del 500% de proteína con *Candida utilis* y *Pleurotus ostreatus* en pulpa de manzana (Dhillon, Kaur, & Brar, 2013). El enriquecimiento proteico en la tusa de maíz, podría explicarse entre otras razones desde la biodegradación de la celulosa, hemicelulosa y la lignina; este último proceso, es catalizado por las actividades de los complejos enzimáticos de las oxidorreductasas, lacasas y peroxidasas. Dichos complejos enzimáticos, se encuentran en los hongos descomponedores de la madera, en los que se incluye el *Pleurotus pulmonarius*, además del incremento nutricional de residuos lignocelulósicos entre otros, a través la proteína (Knežević et al., 2013).

De otro lado, la mayoría de los organismos cultivados en tejidos lignocelulósicos, pueden producir células ricas en proteínas que permanecen en el sustrato después del proceso de fermentación, contribuyendo a un aumento en el contenido de proteína (Villas-Bôas, Esposito, & Mitchell, 2002) . El aumento en el nivel de proteína, es uno de los objetivos de la bioconversión de los residuos lignocelulósicos a través de microrganismos o basidiomicetos en residuos agroindustriales, además de aumentar la digestibilidad y mejorar el sabor del producto.

En la bibliografía se encuentran trabajos para la producción de PUC, con hongos filamentosos, como los realizados por Álvarez y colaboradores (Alvarez, M. Larrea, P. Paredes, M., 2010) en el cual se tenía como sustrato el banano de rechazo y se alcanzó un aumento en la proteína del 9,56% empleado *Aspergillus niger*. Por su parte, Brizuela y colaboradores (Brizuela, 1998) pudieron enriquecer proteicamente los residuos de la cosecha de caña hasta niveles entre 6 y 10 %, con el hongo filamentoso *Aspergillus terreus*. En el caso de basidiomicetos, Membrillo y colaboradores (Membrillo et al., 2011) lograron obtener 809 µg proteína/g seco de sustrato con Pleurotus ostreatus en bagazo de caña y Darwish y colaboradores (Darwish, Bakr, & Abdallah, 2012) lograron incrementar el contenido proteico 2,75 veces con Pleurotus ostreatus empleando tallos de maíz como sustrato; estos autores lograron aumentar 3,3 veces el contenido proteico de los tallos de maíz, empleado *Saccharomyces cerevisiae* como ingrediente para la fermentación.

Con los resultados del crecimiento preliminar y del diseño de experimentos, las mejores condiciones para la fermentacion solida del *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maiz son humedad del 80 %, pH de 6, un tamaño de paticula de 2450 µm a 25

°C con presencia de sales, obteniendo un valor de proteína de 1,213 g de proteína/ g de sustrato, obteniendo un enriquecimiento del 221,946% ± 0,339. Con éstos resultados, se procece a hacer la modelación matemática del crecimiento.

5.4 MEDICIÓN PRELIMINAR DEL CRECIMIENTO DE LA BIOMASA DEL *Pleurotus pulmonarius* EN TUSA DE MAIZ

Con el objeto de conocer el tiempo que se demoraba el basidiomiceto en invadir completamente la caja de petri de forma vigorosa, se evaluó el crecimiento estimado de la biomasa producida en un medio con tusa y humedad del 80% . En la Figura 22, se muestra la curva de crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* sobre la tusa de maíz en caja de Petri

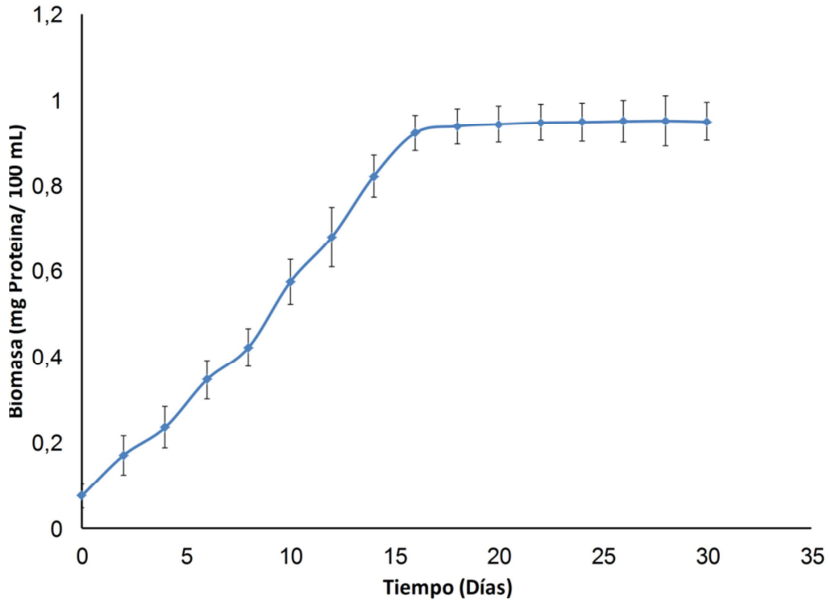
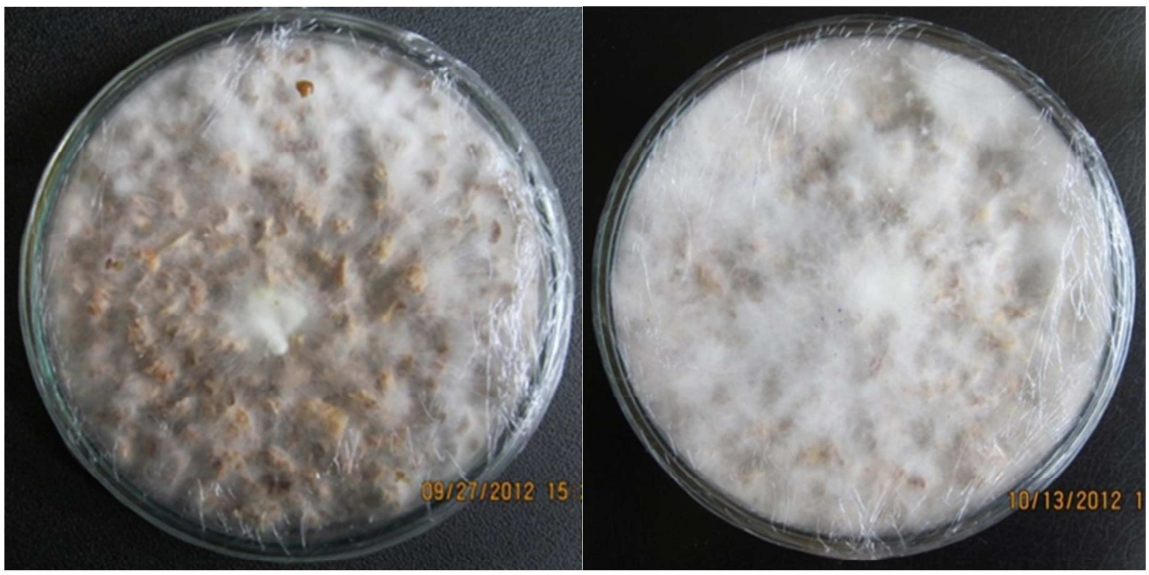


Figura 22. Curva de crecimiento del Pleurotus pulmonarius en tusa de maíz

En la Figura 22 se observa que el máximo crecimiento se presentó a los 28 días; mostrando una concentración de 0,952 ± 0,0583 mg de proteína/ 100 mL; la curva anterior, no mostró fase de adaptación, indica una fase exponencial que va hasta los 16 días con una concentración de 0,923 ± 0,0411 mg de proteína/ 100 mL. De allí en adelante, alcanzó la fase estacionaria, al mismo tiempo, ese era el tiempo aproximado que se demoraba el basidiomiceto en invadir completamente la tusa de maíz en la caja de Petri, sin embargo, este no tenía vigorosidad, es decir la tusa de maíz en la caja de Petri tenía una apariencia de haber invadido todo el sustrato, tal como lo muestra la Figura 23A.



A. 16 días de crecimiento **B. 30 días de crecimiento**

Figura 23. Comparacion del crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* a los 16 y 30 días.

Sin embargo, cuando el cultivo se dejaba hasta los 30 días mostraba más vigorosidad tal como lo muestra la Figura 23B. Para encontrar una diferencia cualitativa, se llevó a cabo la medición del IB, tal como la analizada en el item 3.2. La Tabla 11, muestra los resultados de dicha medición.

Tabla 11. IB para los16 y 30 días

Medición IB	16 Días	30 Días
Promedio	0,557	0,730
DesvEsta	0,017	0,015
CV	3,024	2,097

En la Tabla 11, se muestra una diferencia evidente en las vigorosidades medidas indirectamentre a través del IB, entre los basidiomicetos medidios a los 16 y a los 30 días. Lo anterior llevó a tomar la desición de tomar 30 días, para evaluar el crecimieto del *Pleurotus pulmonarius* en la tusa de maíz, para las siguientes pruebas. Darwish y colaboradores (Darwish et al., 2012), enriquecieron residuos del maíz en 28 días.

La funcion de crecimiento de la Figura 22, se aproxima a la fiuncion logistica, tipo S, que es un modelo no estructurado, empírico y descriptivo, obtenido con datos experimentales, que a pesar de su simplicidad matemática, es una ecuación que

puede dar una adecuada aproximación del crecimiento celular (ORLANDONI, 1997; Peleg et al., 2007); (Quiñones, J. Lecompte, A., 2007)

5.5 RESULTADOS DE LA MEDICION DEL CRECIMIENTO Y MODELACION DEL *Pleurotus pulmonarius* EN LA CAJA DE PETRI

Con el objeto de conocer de una forma más precisa el crecimiento del basidiomiceto en la tusa de maiz, se procedió a medir la cinética del *Pleurotus pulmonarius* y ajustarla a algunos modelos matemáticos. Para medir la biomasa, se recurrió además de la concentración de proteína, a cuantificar la concentración de ergosterol, ampliamente empleada para medir biomasa en FES (Mitchell et al., 2004). Se llevaron a cabo cuatro réplicas del mismo experimento, con las condiciones definidas al final del ítem 4.6. A continuación se muestra el crecimiento de la biomasa del *Pleurotus pulmonarius* por medio de la concentración de proteína y la concentacion de ergosterol en las Figuras 24 y 25 respectivamente en las cajas de Petri.

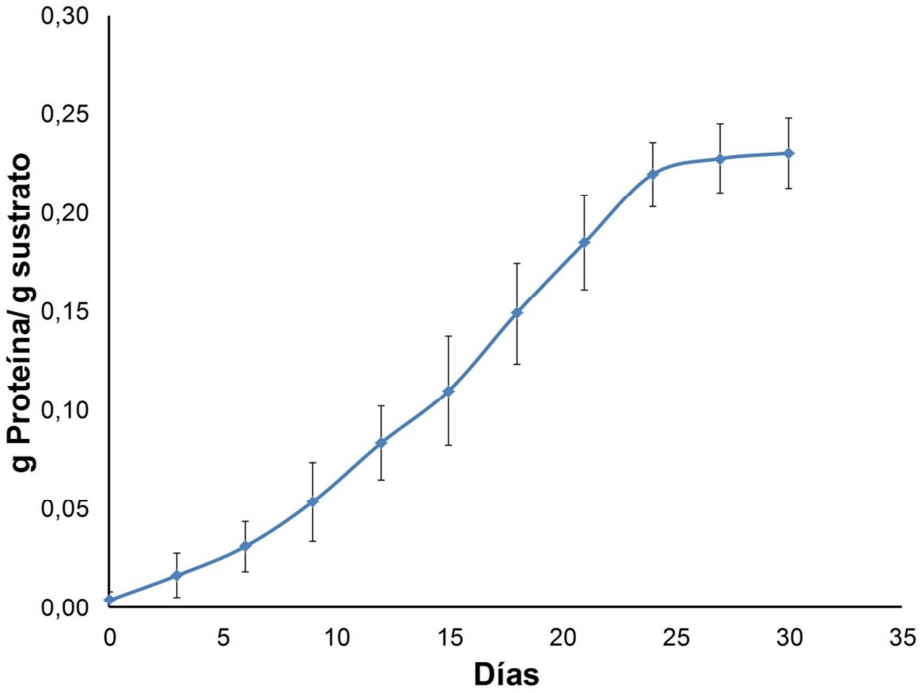


Figura 24. Crecimiento de la biomasa del *Pleurotus pulmonarius* medición en concentración de poteína.

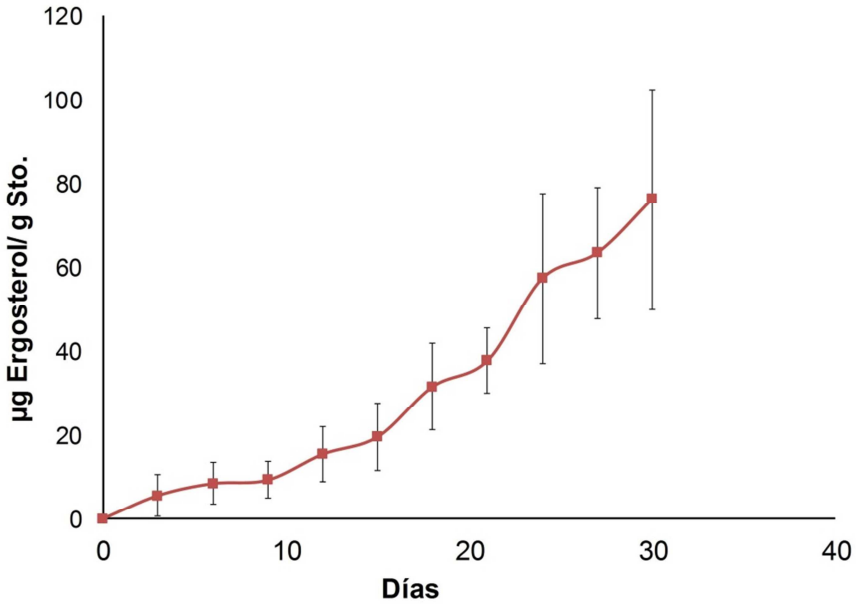


Figura 25. Crecimiento de la biomasa del *Pleurotus pulmonarius* medición en concentración de ergosterol.

En el caso de la concentración de proteína, el máximo valor de producción de proteína para todas las réplicas se presentó a los 24 días; de allí en adelante la biomasa se estabilizó, debido a que se llegó a la fase estacionaria de crecimiento celular. El promedio del rendimiento máximo en las cuatro réplicas fue de 0,230 ± 0,0161 g de proteína/ g de sustrato. Por su parte, en la concentración de ergosterol, el promedio del rendimiento máximo alcanzado fue de 76,238 µg ± 26,3859 de ergosterol/ g de sustrato, sin embargo no llego a la fase estacionaria como en el caso de la concentración de proteína. Como lo muestra la Figura 25, la concentración de ergosterol no llegó a la fase estacionaria; algunas razones para explicar este comportamiento, pueden ser sustentadas a partir del mismo metabolismo del ergosterol, el cual puede variar por razones como la etapa de desarrollo, la edad y estado fisiológico del hongo, además de la calidad de la fuente de carbono (Djajakirana, G. Joergensen, R. Meyer, B, 1996). De otro lado, el ergosterol en el micelio de los hongos en la fase estacionaria en algunos casos es entre el 10 y 12% menor, que el ergosterol contenido del micelio en la fase de crecimiento (Gessner & Chauvet, 1993). De otro lado Newell y colaboradores (Newell, SY. Miller, JD. Fallon, RD, 1987), encontraron picos más pronunciados en la concentración de ergosterol, después de la fase de crecimiento exponencial, cuando se suponía que el crecimiento debía culminar; a este respecto Czaczyk, K y colaboradores (Czaczyk, Trojanowska, & Stachowiak, 2002) encontraron también, que el ergosterol aumentó después de una prolongada fase estacionaría.

El ajuste de los datos al modelo no estructurado con ecuación logístico para cada réplica se realizó con el software R. Los resultados para las concentraciones de proteína y de ergosterol se muestra en la Figura 26 y 27 respectivamente.

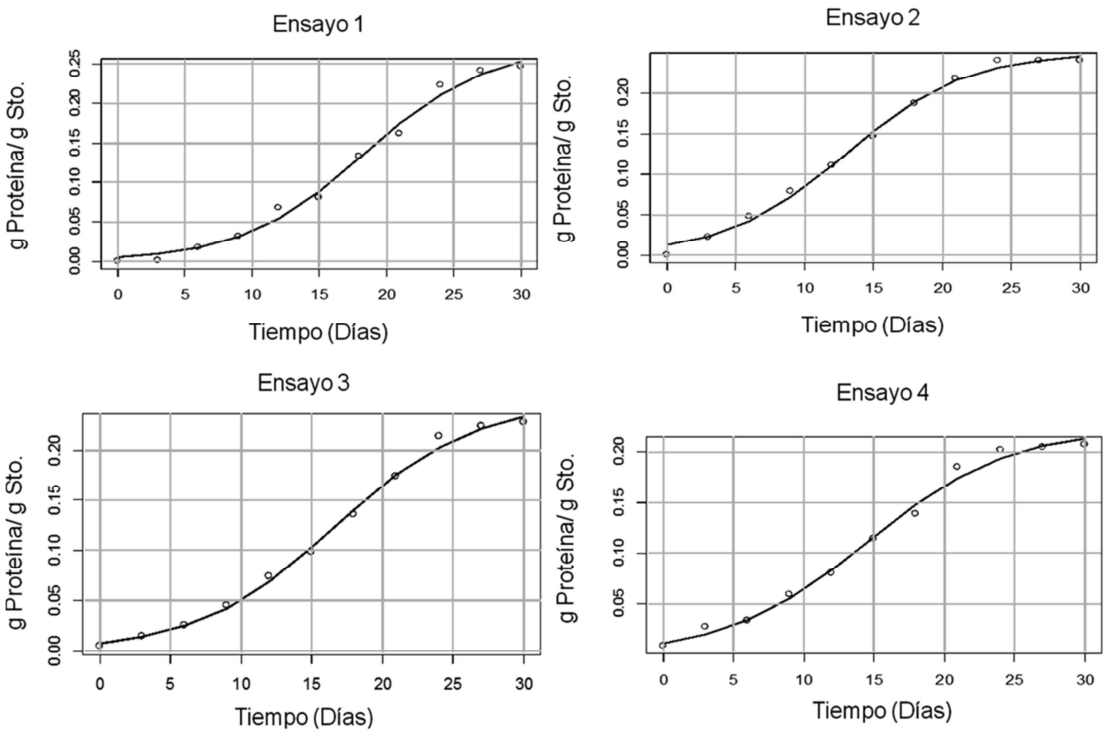


Figura 26. Ajuste de la biomasa al modelo Logístico para las cuatro réplicas de la concentración de proteína en el tiempo

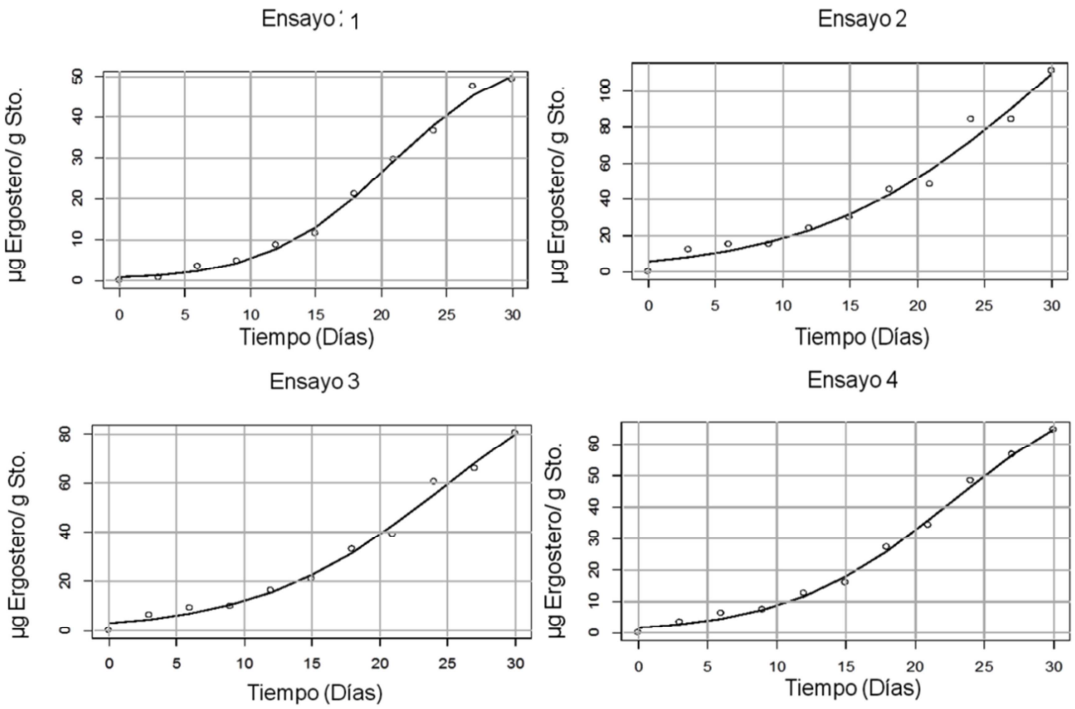


Figura 27. Ajuste de la biomasa al modelo Logístico para las cuatro réplicas de la concentración de ergosterol en el tiempo

Para cada réplica se determinaron los parámetros del modelo logístico y los dichos parámetros se promediaron; los promedios se muestran en las Tablas 12 y 13 para las concentraciones de proteína y ergosterol, respectivamente.

Tabla 12. Coeficientes de la ecuación logística en la biomasa para la concentración de proteína vs tiempo

Coeficientes	Valor Promedio	Desv. Estándar
β_1(g proteína/ g Sto.)	0,2489	0,0204
β_2	3,3378	0,5113
β_3 (Dias^{-1})	-0,2131	0,0121
r^2 Ajustado	0,9937	-

Los valores mostrados en la Tabla 12, indican un buen ajuste para el caso de la concentración de proteína al modelo Logístico, con un valor r^2 ajustado promedio de 0,9937. En cuanto a los coeficientes, de las réplicas, todos mostraron una desviación estándar baja, indicando poca dispersión en los valores. El coeficiente β_1, es un indicador de la máxima concentración de biomasa que se podría obtener, en este caso el valor promedio es 0,2489 ± 0,0204 g proteína/ g sustrato. El

parámetro β_2 es adimensional y β_3 debe estar expresado en días^{-1}. Los coeficientes promedio para la ecuación logística obtenidos para la concentración de ergosterol, se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Coeficientes de la ecuación logística en la biomasa para la concentración de ergosterol vs tiempo

Coeficientes	Valor Promedio	Desv. Estándar
β_1(g proteína/ g Sto.)	116,146	65,8616
β_2	3,8661	0,3845
β_3 (Dias^{-1})	-0,1633	0,0384
r^2 Ajustado	0,9872	-

Para el caso de la concentración de ergosterol, se obtuvo un r^2 promedio de 0,9872; dicho ajuste en términos generales es alto. Los coeficientes β_2 y β_3 arrojaron desviaciones bajas, sin embargo para el β_1 la desviación fue alta (de casi 66), debido a la alta dispersión de los datos. Dicha dispersión es debida muy probablemente a los gradientes de concentración y que no hay una distribución homogénea que se presenta en la FES (Viccini, Mitchell, & Krieger, 2003), (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008). Los coeficientes β_1, β_2 y β_3, tienen el mismo significado que los explicados para la concentración de proteína; para el caso de la concentración de ergosterol máxima promedio alcanzada, el valor fue de 116,146 ± 65,862 µg ergosterol/ g sustrato. Es importante resaltar que estas curvas se muestran aún en una fase de crecimiento, es decir no llegaron a la fase estacionaria en los 30 días de evaluación. Con los valores promedios obtenidos en los coeficientes del modelo Logístico, se obtiene las curvas modeladas de biomasa para la concentraciones de proteína y ergosterol en función del tiempo y sus resultados se muestran en las Figuras 28 y 29 respectivamente.

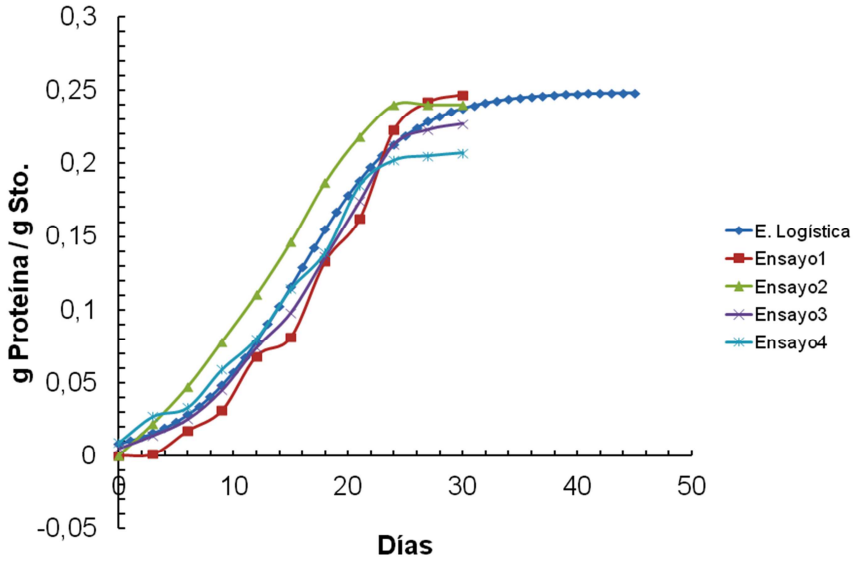


Figura 28. Curva de biomasa modelada mediante la ecuación logística promedio para la concentración de proteína vs tiempo

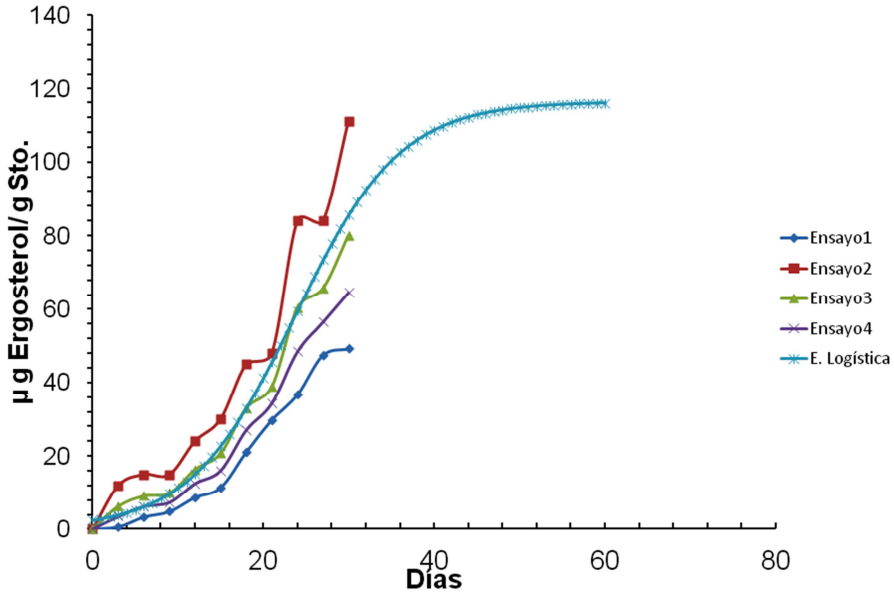


Figura 29. Curva de biomasa modelada mediante la ecuación logística promedio para la concentración de egostero vs tiempo

En las Figuras 28 y 29, aparecen las 4 réplicas de la curva de biomasa obtenidas experimentalmente y

El modelo Logístico, se ha empleado en FES para modelar el crecimiento de varios organismos tales como basidiomicetos del género *Pleurotus* (Sarikaya y

Ladisch, 1997; Téllez et al., 2008), hongos filamentosos, como *Mucor bacilliformis* (Lareo et al., 2006), *Aspergillus niger* (Fanaei & Vaziri, 2009; Hamidi-Esfahani, Shojaosadati, & Rinzema, 2004) y *Trichoderma reesei* (Smits et al., 1998*)*. También se ha empleado para el modelado de la levadura *Kluyveromyces marxianus* (Mazutti et al., 2010).

Adicional a los datos analizados réplica por réplica, se llevó a cabo un ajuste con todos los datos obtenidos experimentalmente en función del tiempo para la concentración de proteína y para la concentración de ergosterol. Dicho ajuste se llevó a cabo en el CFTOOL de Matlab; las Figuras 30 y 31 muestran el ajuste de todos los datos obtenidos en función del tiempo.

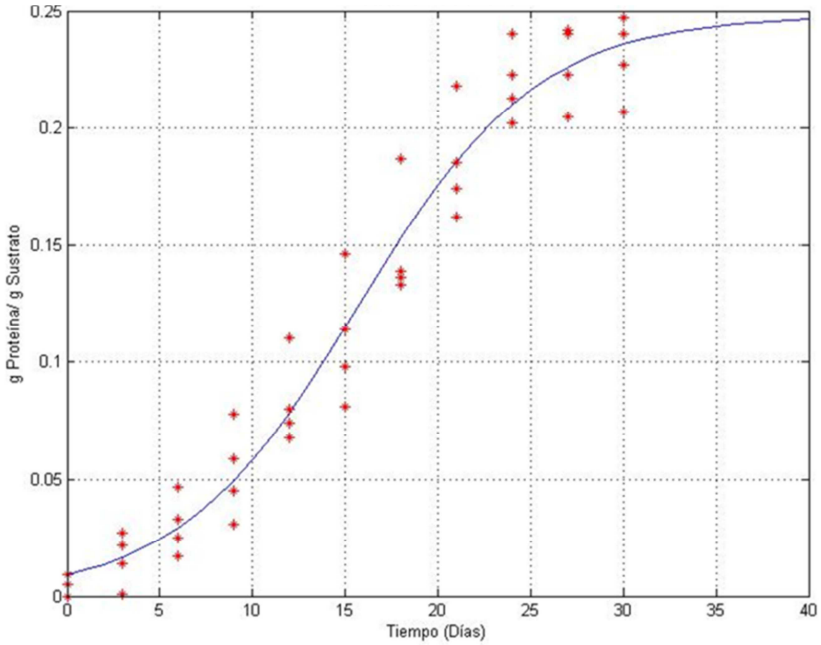


Figura 30. Curvas de biomasa con todos los datos analizados en el CFTOOL para la concentración de proteína vs tiempo

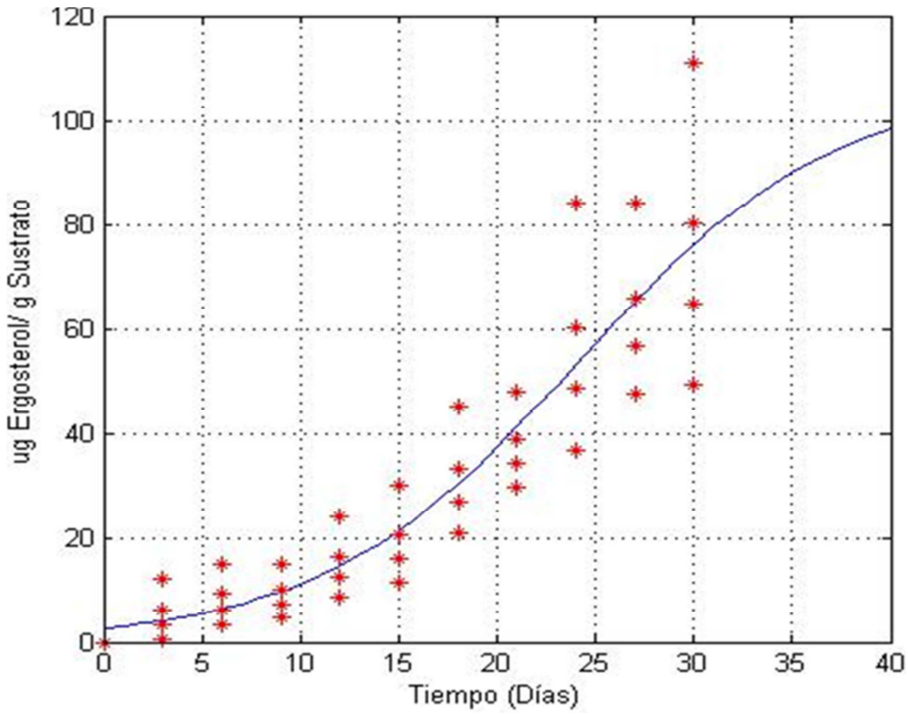


Figura 31. Curvas de biomasa con todos los datos analizados en el CFTOOL para la concentración de ergosterol vs tiempo

En la Tabla 14, aparecen resumidos los coeficientes obtenidos con su respectivo r^2 ajustado. Estos resultados se validaron con el programa R, obteniendo resultados similares.

Tabla 14. Coeficientes del modelo Logístico arrojados por el CFTOOL para los datos en conjunto de la concentración de proteína vs tiempo y el contenido de ergosterol vs tiempo

Coeficientes CFTOOL	Datos Concentración Proteína	Datos Concentración Ergosterol
β_1(g proteína/ g sto.)	0,284	107,000
β_2	3,251	3,681
β_3 (Dias^{-1})	-0,207	-0,153
r^2 Ajustado	0,958	0,828

En la Tabla 15, se muestra la comparación de los coeficientes de la ecuación logística para los resultados obtenidos réplica por réplica y para todos los datos.

Tabla 15. Comparación de los coeficientes obtenidos réplica por réplica y todos los datos en conjunto

Coeficientes	Conc. Proteína Réplica por Réplica (Promedio)	Concentración de Proteína Datos Completos	Conc. Ergosterol Réplica por Réplica (Promedio)	Concentración Ergosterol Datos Completos
β_1(g proteína/ g sto.)	0,2489	0,2841	116,146	107
β_2	3,3378	3,251	3,8661	3,681
β_3 (Dias^{-1})	-0,2131	-0,2069	-0,1633	-0,153
r^2 Ajustado	0,9937	0,9583	0,9872	0,828

La Tabla 16 muestra los resultados obtenidos de los parámetros, siendo similares ambos ajustes, sobre todo para la proteína; en el caso del ergosterol, la mayor diferencia está en el coeficiente β_1. El promedio de los ajustes individuales muestran valores de r^2 bastante buenos, y solo el ergosterol muestra un coeficiente menor de 0,9. De otro lado, se obtuvo una modelación con los datos promedio y los datos individuales, tanto para la concentración de proteína como para la concentración de ergosterol. Los comportamientos de dichas modelaciones se muestran en las Figuras 32 y 33.

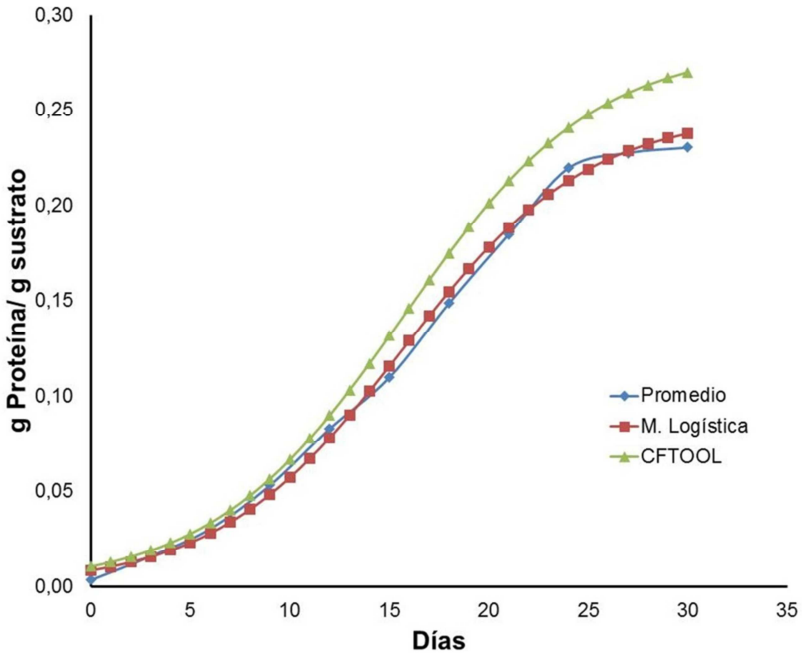


Figura 32. Simulación de biomasa a partir de todos los datos obtenidos en el CFTOOL para la concentración de proteína vs tiempo.

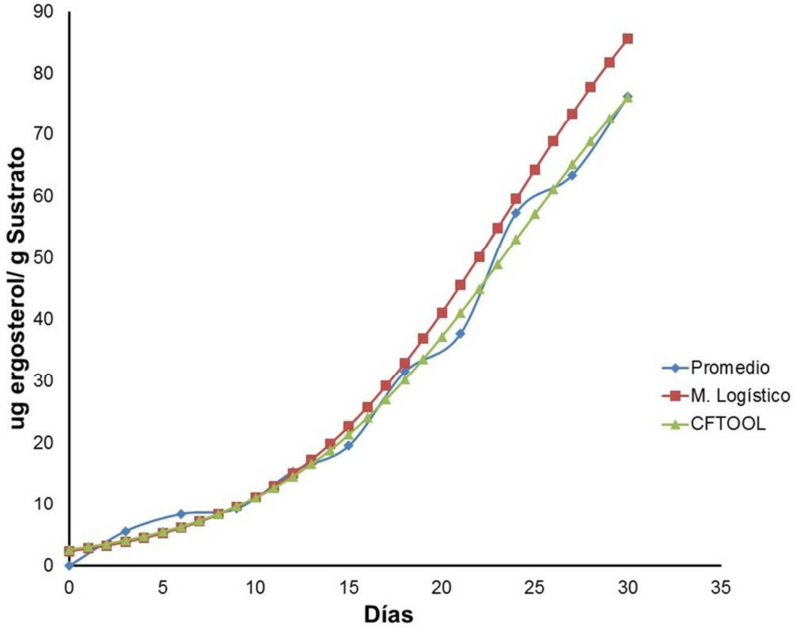


Figura 33. Simulación de biomasa a partir de todos los datos obtenidos en el CFTOOL para la concentración de ergosterol vs tiempo.

De acuerdo con las Figuras 32 y 33, se muestran para el caso de la modelación con la proteína el modelo réplica por réplica está por encima del modelo con todos los datos; en el caso de la modelación del ergosterol, el modelo de todos los datos se encuentra por debajo al modelo réplica por réplica. Comparando los coeficientes obtenidos en el modelo réplica por réplica, con el de todos los datos, se puede observar que en este caso el ajuste del r^2 disminuye.

En el caso de la concentración de proteína el r^2 es de 0,9583 y para el contenido de ergosterol es r^2 es de 0,828, los cuales fueron menores al r^2 para cada uno de los réplicas o modelo individual. Esta disminución es probablemente debida a la dispersión de los datos, propia del fenómeno de la FES, como lo han explicado autores como Mazutti colaboradores (Mazutti et al., 2010), Padey y colaboradores (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008) Viccini y colaboradores (Viccini et al., 2003) y como se había mencionado anteriormente. A pesar de que estos r^2 son inferiores para todos los datos, se pueden emplear para modelar de forma apropiada el crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maíz. De Jager y colaboradores (De Jager, Sheldon, & Edwards, 2009), obtuvieron para una FES r^2 entre 0,89 y 0,75 para el modelo Logístico, los cuales son inferiores a los obtenidos en este trabajo. Desde el punto de vista estadístico el modelo obtenido con todos los datos seria el que más se ajustaría al fenomeno; el otro modelo, de los datos réplica por réplica, es un resumen de los modelos particulares.

5.6 CINETICA DE CRECIMIENTO PARA LA REPARAMETRIZACION DE LOS MODELOS LOGISTICO Y DE GOMPERTZ

Adicional a lo anterior y con el objeto de conocer las diferentes fases de crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* en la tusa de maíz en un sistema cerrado, se recurrió a la normalización de los datos (Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & van 't Riet, 1990), tanto para la concentración de proteína como para la concentración de ergosterol, tal como lo muestran las Figuras 34 y 35.

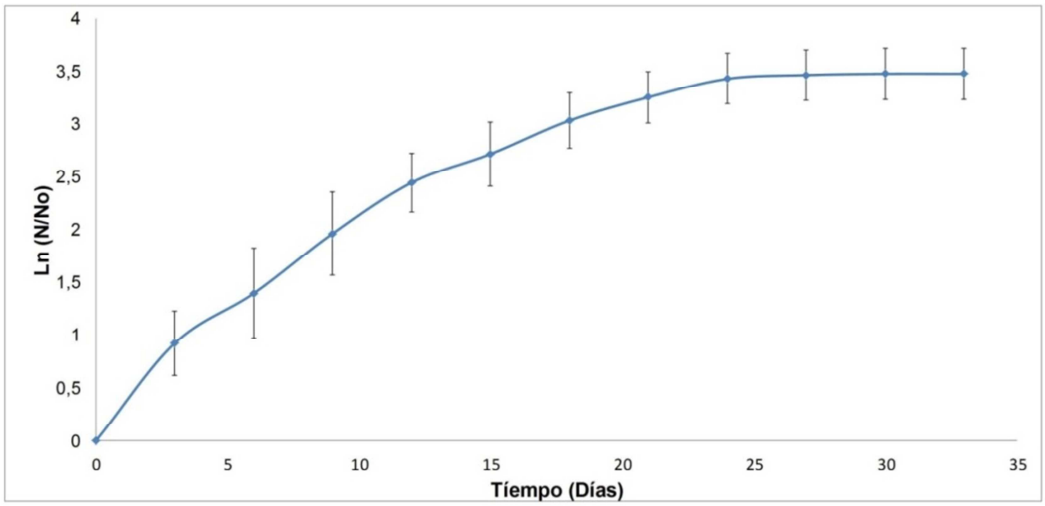


Figura 34. Normalización de la biomasa para la concentración de proteína

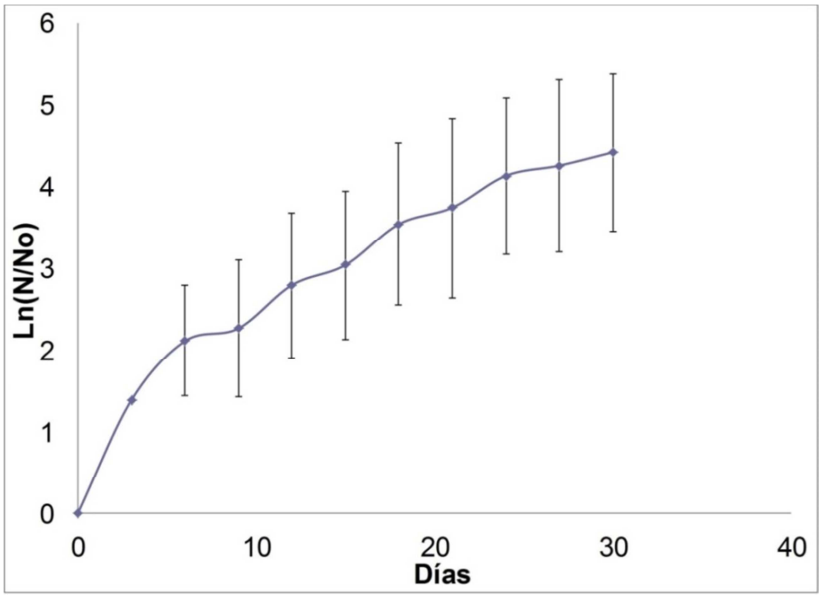


Figura 35. Normalización de la biomasa para la concentración de ergosterol

Con lo anterior, los parámetros de las ecuaciónes Logística y de Gompertz normalizadas para la concentración de proteína y de ergosterol aparecen en la Tabla 16.

Tabla 16. Tabla resumen de la normalización de los modelos Logístico y de Gompertz para las concentraciones de proteína y ergosterol

Parámetro	Concentración de Proteína		Concentración de Ergosterol	
	Logístico	Gompertz	Logístico	Gompertz
β_1	3,445	3,553	4,365	4,523
β_2	1,958	0,931	1,552	0,710
β_3	0,238	0,160	0,175	0,122
r^2 Ajustado	0,916	0,929	0,704	0,716
SSE	4,686	4,136	27,530	26,440
RMSE	0,3381	0,318	0,820	0,803

De las Figuras 34 y 35 se puede observar que existe más dispersion en los datos para la concentración de ergosterol que para la concentración de proteína. De otro lado los r^2 ajustados para la concentración de proteína estan alrededor de 0,92 que son aceptables, mientras que para la concentración de ergosterol tanto el modelo Logístico como el de Gompertz, son de 0,704 y 0,716, ajustes banstante modestos. En la Tabla 17 aparecen los parámetros cinéticos para la Ecuación Logística y el modelo de Gompertz tanto para la concentración de proteína como para la concentración de ergosterol.

Tabla 17. Parámetros cinéticos para los ajustes Logísticos de proteína y ergosterol

Parámetro	Concentración de Proteína		Concentración de Ergosterol	
	Logístico	Gompertz	Logístico	Gompertz
A	3,445	3,553	4,365	4,523
μmax	0,205	0,209	0,142	0,203
ʎ	≈ 0	≈ 0	-3,440	-2,381
C_{max}	0,227	0,253	78,649	92,112

Donde A es adimensional y las unidades de ʎ es días; las unidades de μmax son días^{-1} De acuerdo a los datos de la Tabla 18, se desprenden las gráficas modeladas del modelo Logístico y Gompertz tanto para la concentración de proteína como para la concentración de ergosterol en las Figuras 36 y 37, respectivamente.

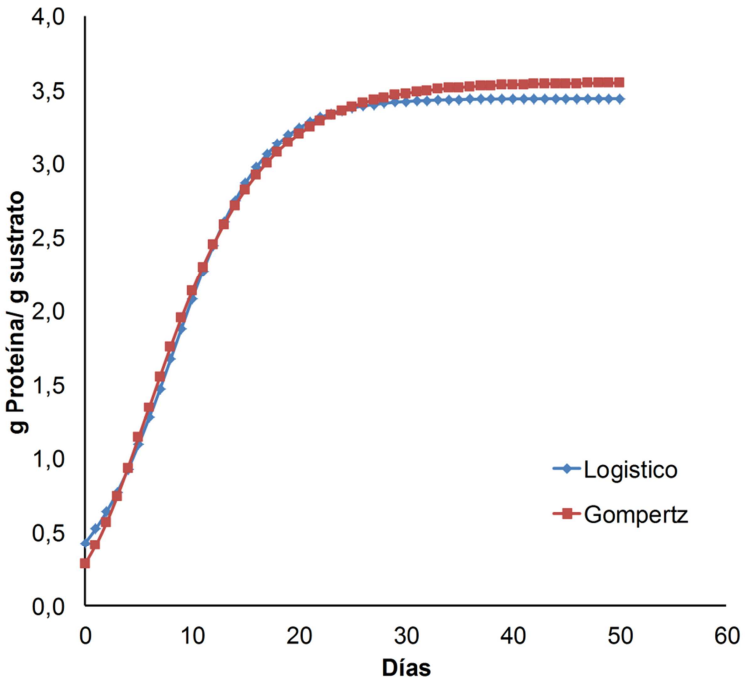


Figura 36. Modelación reparametrizada de los modelos Logístico y de Gompertz para la concentración de proteína

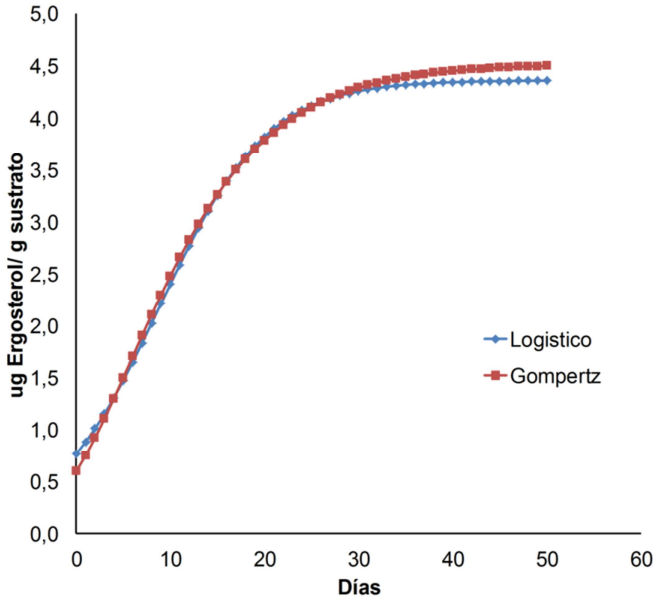


Figura 37. Modelación reparametrizada de los modelos Logístico y de Gompertz para la concentración de ergosterol.

Con los resultados obtenidos hasta aquí, se puede afirmar que los ajustes réplica por réplica arrojan mejores ajustes que el de todos los datos en conjunto. De otro

lado, la medición de la biomasa medida con la concentración de proteína en ambos análisis mostró mejores ajustes, debido a una menor dispersión de los datos.

5.7 ANÁLSIS DEL CRECIMIENTO DEL *Pleurotus pulmonarius* CON RNA

Con lo anterior, entrenando la red neuronal con el NFTOOL, se obtuvieron los parámetros como se muestran en las Figuras 38 y 39 para las concentraciones de proteiana y ergosterol respectiva.

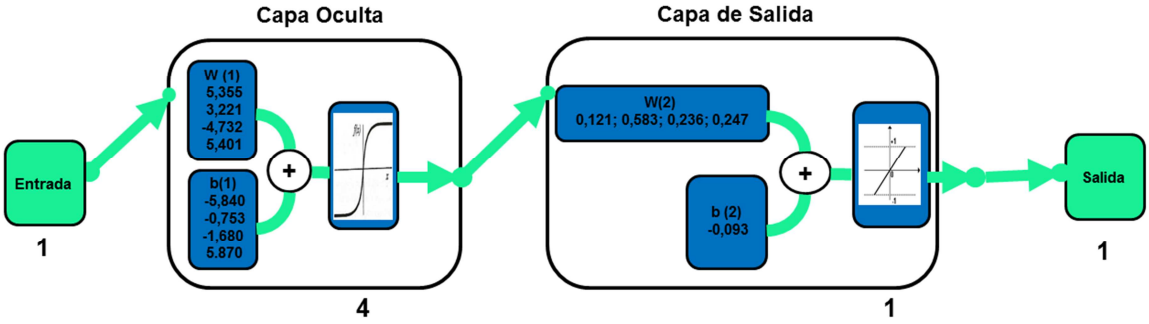


Figura 38. RNA obtenidas con el NFTOOL para el conjunto de datos para la concentración de proteína.

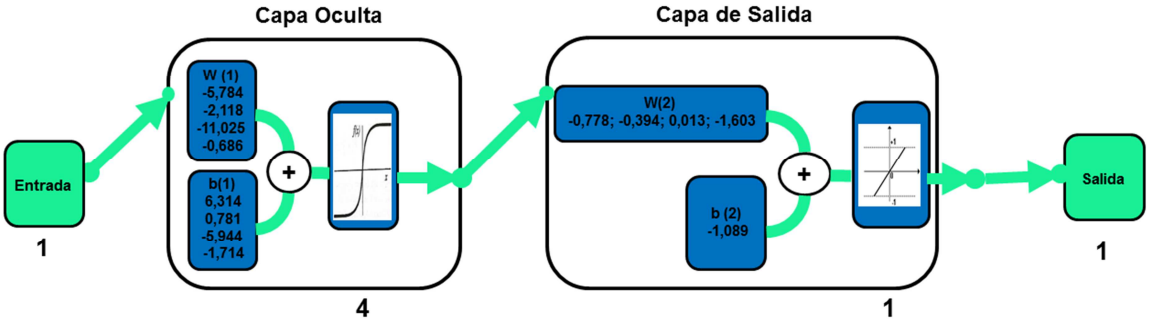


Figura 39. RNA obtenidas con el NFTOOL para el conjunto de datos para la concentración de ergosterol.

Con la red neuronal entrenada, se obtuvieron los modelos de las Figuras 40 y 41, para la concentración de proteína y ergosterol, respectivamente.

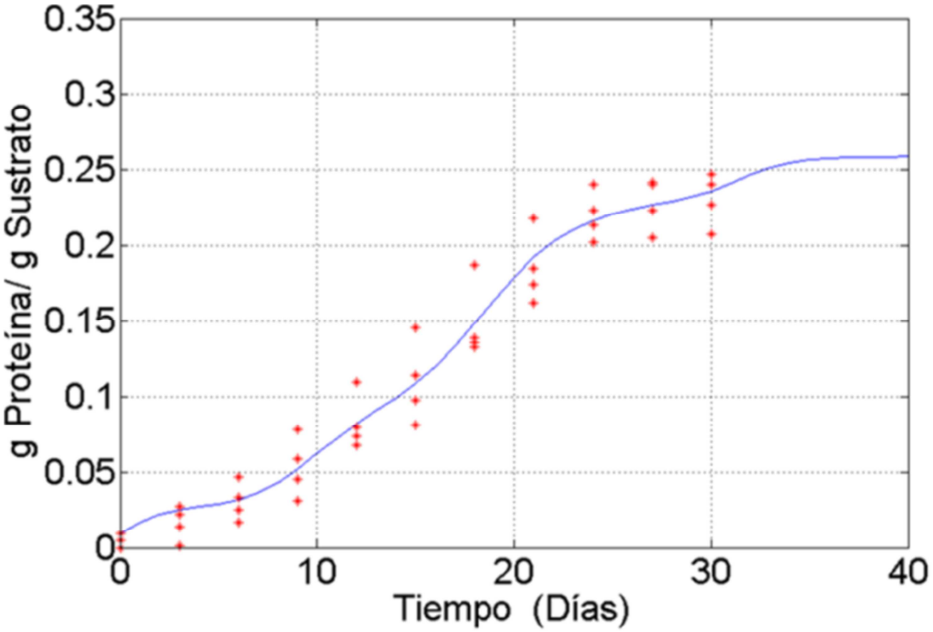


Figura 40. Curvas de biomasa con todos los datos analizados en el CFTOOL para la concentración de proteína vs tiempo.

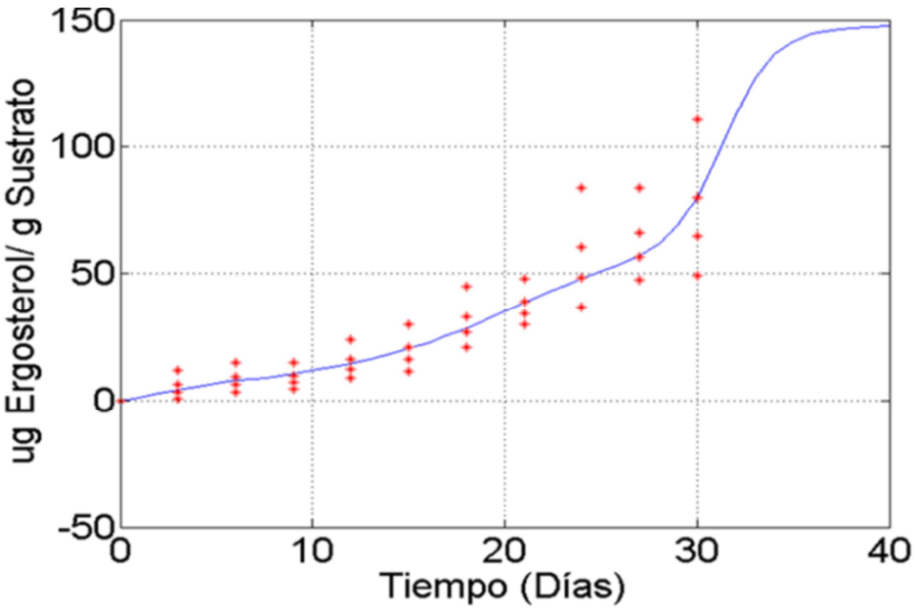


Figura 41. Curva de biomasa con todos los datos analizados en el CFTOOL para la concentración de ergosterol vs tiempo.

Como criterio del análisis del error, se empleó la sumatoria media del error cuadrático ó Desviación típica de los errores (RMSE, por sus iniciales en inglés) los cuales aparecen en la Tabla 18, donde se compararan con los obtenidos por el

modelo Logístico, el de Gompertz y las RNA. RMSE se emplea para medir la dispersión de los errores, es decir, que tanto se acercan o se alejan los valores de pronóstico de los valores reales. Si el valores del RMSE es pequeños, significa que los valores del pronóstico son muy aproximados a los valores reales, en el caso contrario los valores del pronostico son grandes (Arango, C., 2009).

Tabla 18. Comparación de los RMSE obtenidos por las RNA, el modelo Logístico y Gompertz para la concentración de proteína y la concentración de ergosterol en función del tiempo para todos los datos en conjunto

Tipo de Ajuste	**R.M.S.E.**
RNA Concentración de Proteína	0,017
Modelo Logístico Concentración Proteína	0,3381
Modelo de Gompertz Concentración de Proteína	0,3176
RNA Concentración de Ergosterol	11,394
Modelo Logístico Concentración de Ergosterol	11,34
Modelo de Gompertz Concentración de Ergosterol	11,38

Comparando los resultados del RMSE mediante las RNA, con el modelo Logístico y el modelo de Gompertz para la concentración de proteína, se puede observar que los valores obtenidos para las RNA son casi 20 o 19 veces menores respectivamente. En el caso de la concentración de ergosterol, los valores de las RMSE son prácticamente iguales. Estos resultados indican que los tres métodos podrían predecir el comportamiento del crecimiento para el *Pleurotus pulmonarius* en FES empleando tusa de maíz como sustrato. Tal como se mencionó en la introducción, uno de los grandes inconvenientes y retos que enfrenta la FES es la medición y modelación del crecimiento. Ejemplo de implementación de RNA en fermentaciones es el trabajo realizado por Desai y colaboradores (Desai et al., 2008) arrojando valores de RMSE de 0,11 y 0,73.

De igual forma que con los modelos Logísticos, también se analizaron los datos réplica por réplica tanto para la concentración de proteína como para la concentración de ergosterol; en las Figuras 42 y 43 se muestran dichos resultados respectivamente.

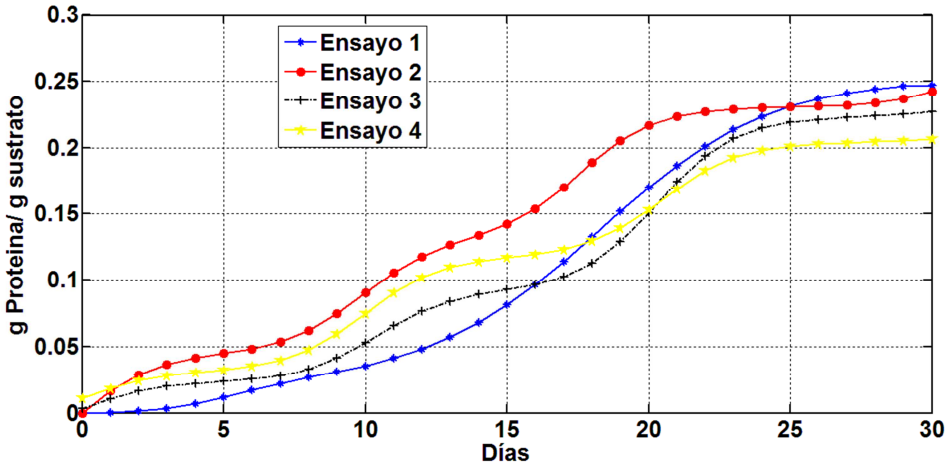


Figura 42. Ajuste de las curvas de biomasa en función del tiempo empleando RNA de forma individual para la concentración de proteína vs tiempo.

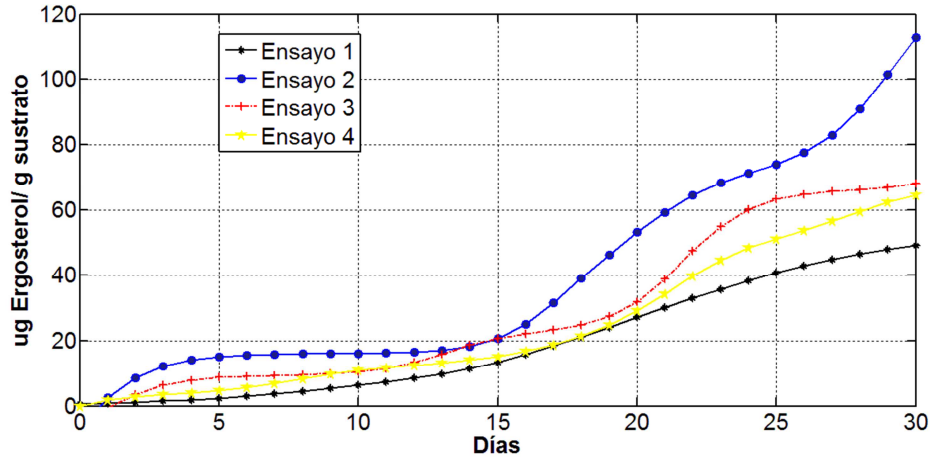


Figura 43. Ajuste de las curvas de biomasa en función del tiempo empleando RNA de forma individual para la concentración de ergosterol vs tiempo.

La Tabla 19, resume los RMSE para cada uno de las réplicas de la concentración de proteína y concentración de ergosterol tanto para el modelo Logístico como para las RNA.

Tabla 19. Comparación de los RMSE obtenidos por las RNA, el modelo Logístico y modelo de Gompertz para las curvas de crecimiento empleando concentración de proteína y concentración de ergosterol réplica por réplica

RÉPLICA	RMSE					
	Concentración de Proteína			Concentración de Ergosterol		
	RNA	Modelo Logístico	Modelo de Gompertz	RNA	Modelo Logístico	Modelo de Gompertz
Réplica 1	0,0960	0,0079	0,0092	1,1953	1,1254	1,3856
Réplica 2	0,0680	0,0048	0,0067	6,8728	5,3641	5,3812
Réplica 3	0,0760	0,0046	0,0068	4,7330	2,5047	2,8014
Réplica 4	0,0159	0,0059	0,0084	1,8794	1,2492	1,5209
Promedio	**0,0640**	**0,0058**	**0,0077**	**3,6701**	**2,5608**	**2,7723**

De la Tabla 19, se puede observar que para la concentración de proteína el RMSE de las RNA individules, fue aproximadamente 11 veces menor que el del modelo Logístico y 8,3 veces menor que el modelo de Gompertz. Para la concentración de ergosterol, también el RMSE promedio de las RNA, fue 1,43 veces que el del modelo Logístico y 1,32 veces menor que el del modelo de Gompertz. Cabe mencionar que se usaron redes neuronales de igual tamaño tanto para la concentración de proteína como para la concentración de ergosterol; sin embargo, es posible aumentar el número de neuronas, si se quiere un mejor ajuste (Hykin, S., 2005), sobre todo para el de caso de la proteína donde las RNA arrojaron un RMSE aproximadamente 11 veces mayor que el obtenido por el modelo Logístico. Karakuzu y colaboradores (Karakuzu, Türker, & Öztürk, 2006), emplearon la red neuronal feed forward (backpropagation) en un proceso de fermentación, para la estimación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en un proceso por lote alimentado y encontraron un buen ajuste a su modelo experimental; de esta manera se corrobora que las RNA pueden ser empleadas para modelar bioprocesos.

De los resultados de la modelación, aunque los ajustes réplica por réplica arrojaron mejores r^2 ajustados, es mejor tomar los datos todos en conjunto; adicional, lo mejores ajustes, fueron dados para la concentración de proteína y por lo cual se pueden emplear tanto el modelo modelo de Gompertz como el Logístico.

Los resultados de la modelación matemática, muestran que los datos se ajustaron de manera satisfactoria a los modelos Logístico y de Gompertz de forma muy satisfactoria, debido a los r^2 ajustados por encima del 0,95 tanto para la concentración de proteína como para la concentración de ergosterol; Los análisis llevados a cabo réplica por réplica mostraron un valores de r^2 ajustados superiores al ajuste de todos los datos en conjunto. Ambas formas de analizar los datos pueden emplearse como método de análisis y de modelación.

Por su parte las RNA, son una buena estrategia para modelar el crecimiento, debido al RMSE obtenidos.

Tanto para los modelos de Gompertz y Logístico, los mejores ajustes fueron para la concentración de proteína, al igual que los valores más bajos de RMSE en los análisis por RNA. En todos los casos la concentración de ergosterol, mostró mayor dispersión de los datos.

El proceso de reparametrización, permitió la obtención de los parámetros cinéticos del Pleurotus pulmonarius en tusa de maíz, además la identificación de las etapas de crecimiento: crecimiento exponencial y fase estacionaria.

5.8 RESULTADO DE LA MEDICION DE BIOMASA Y MODELACION POR PDI

Con el objetivo de implementar un método para la medición de la biomasa en FES y comparar las mediciones de la concentración de proteína y ergosterol, se buscó una alternativa para medir el crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maíz y hacer su respectiva modelación con el modelo que presentó el mejor ajuste. A continuación se muestra en la Figura 44 la secuencia de crecimiento para una de las muestras, con el fin de evidenciar el crecimiento y el cambio del basidiomiceto en el tiempo.

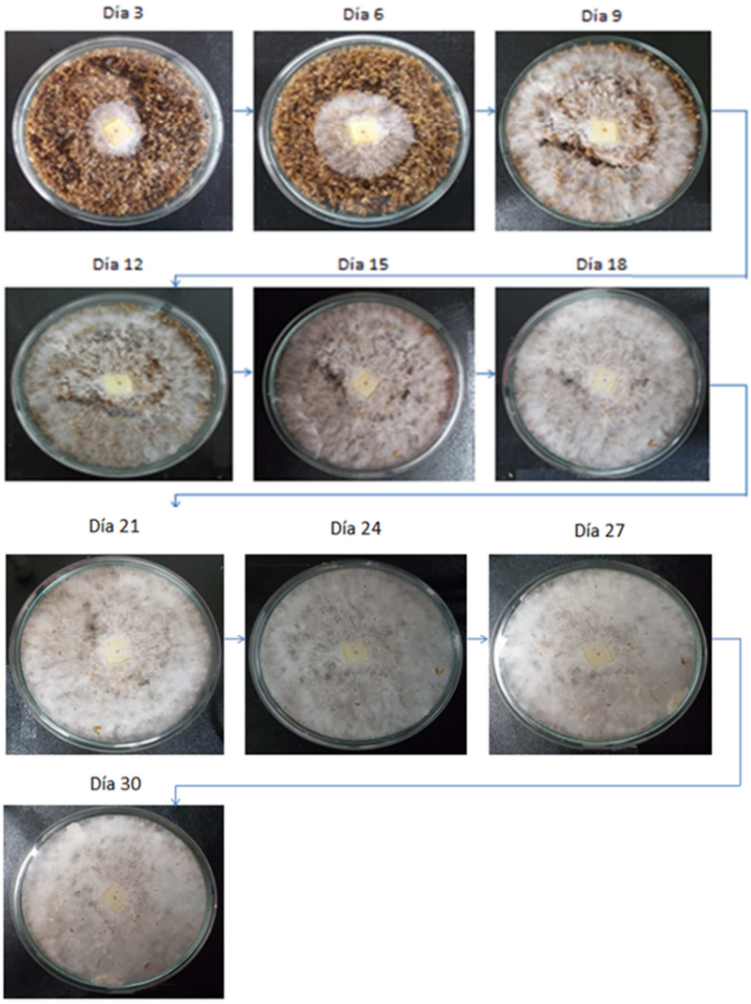


Figura 44. Secuencia de crecimiento del hongo para una de las réplicas.

En la Figura 44 se puede observar que en el día 12, la tusa de maíz está prácticamente invadida, cubriendo prácticamente toda el área del medio de cultivo; el resto de los días el micelio se fortaleció, invadiendo toda la tusa de maíz en la caja de Petri. A cada caja de Petri, se le tomó una fotografía para luego medirle el área a través del algoritmo que está en el Anexo 5, como se explicó en el apartado 4.8.5 y luego se le midieron de forma paralela la concentración de proteína y la concentración de ergosterol. El proceso anterior se hizo por triplicado. Con los datos anteriores se construyeron las gráficas de las Figuras 45 y 46 para la concentración de proteína y las concentraciones de ergosterol respectivamente.

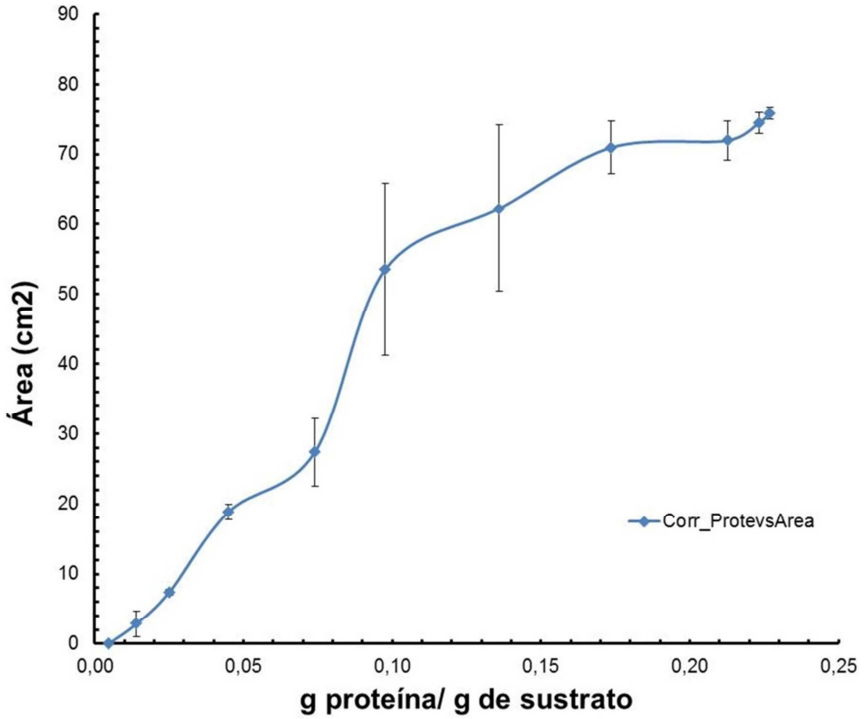


Figura 45. Correlacion de las concentración de proteína vs áreas

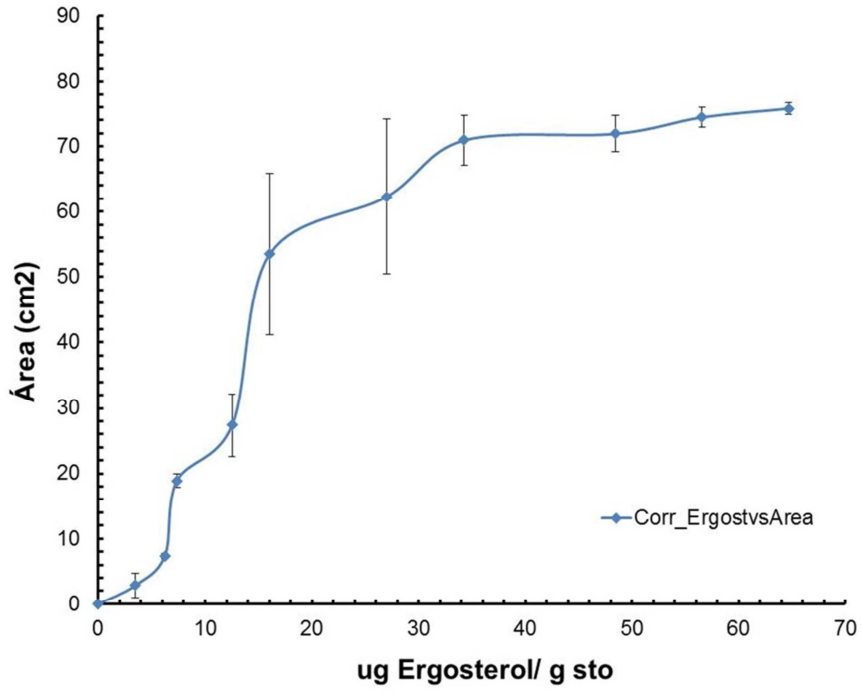


Figura 46. Correlacion de las concentración de ergosterol vs áreas

De las Figuras 45 y 46, se puede observar que la correlación entre áreas y las concentraciones tanto de proteína como de ergosterol, tienen una tendencia sigmoidal. Comienza de una forma lenta los primeros días, luego aumenta el crecimiento o la invasión de la caja de Petri de una forma exponencial y finalmente se estabiliza al invadir totalmente el sustrato presente en la caja. Este comportamiento se puede explicar por dos razones: la primera, el crecimiento de este tipo de hongo es radial, lo cual explica porque se inocula en el centro del sustrato y de la caja. La segunda razón, es que el crecimiento radial facilita el procesamiento digital de las imágenes, pues es una Figura geométrica "constante" durante todo el proceso de crecimiento, debido a que las circunferencias son Figuras descritas según la geometría analítica, esto permite facilidad en el momento de definir un modelo que cumpla con las variables presentes y con base a los parámetros deseados. El crecimiento máximo promedio de áreas para las cuatro réplicas fue de 73.517 ± 4,559 cm^2.

De acuerdo al modelo de crecimiento logístico, se llevó a cabo el mismo analisis matemático, modelacion y reparametrizacion según lo llevado a cabo en el item 4.8.4. Para este caso, el modelo Logístico al que mejor se ajustaron tanto para la concentración de proteína como la de ergosterol, obtenido en el software zunzun, fue la ecuación Logística A, que se muestra en la ecuación número 6. En las Tablas 20 y 21 aparacen los coeficientes de la Ecuación Logística A, ajustada para las correlaciones de biomasa y área tanto para la concentración de proteína como para la de ergosterol.

Tabla 20. Coeficientes de la ecuación logística A en la biomasa para la concentración de proteína vs área

Coeficientes	Promedios	Desviación estándar
$\beta_1(cm^2)$	74,428	3,113
β_2	49,372	59,510
β_3	41,250	13,735
r^2 Ajustado	0,985	-

Tabla 21. Coeficientes de la ecuación logística A en la biomasa para la concentración de ergosterol vs área

Coeficientes	Promedios	Desviación estándar
$\beta_1(cm^2)$	71,791	2,031
β_2	34,407	31,641
β_3	0,248	0,091
r^2 Ajustado	0,974	-

Los valores mostrados en la Tabla 20, indican un muy buen ajuste para el caso de la concentración de proteína al modelo Logístico, con un valor r^2 promedio de 0,9845. Se observa la relación entre el área y la concentración de biomasa, a medición que el área del hongo se va expandiendo dentro de la caja de Petri la concentración de biomasa va aumentando, esta tendencia se reflejó en las imágenes, pero finalmente al observar que el r^2 ajustado promedio para el valor de las áreas para este procedimiento mostró una correlación de r^2>0,90, obteniendo un resultado aceptable para establecer un modelo matemático viable. En cuanto a los coeficientes de las réplicas, todos mostraron una desviación estándar baja debido a la baja dispersión en los valores de los mismos. Para el caso de la Tabla 21, referente a la concentración de ergosterol, muestran un buen ajuste aunque es menor que al de la proteína. El área máxima a la que se podría llegar para este caso es de 71,791 ± 2,031 cm^2, correspondiente al coeficiente β_1.

La modelación para las correlaciones de biomasa contra el área, para los datos analizados réplica por réplica se muestra en las Figuras 47 y 48.

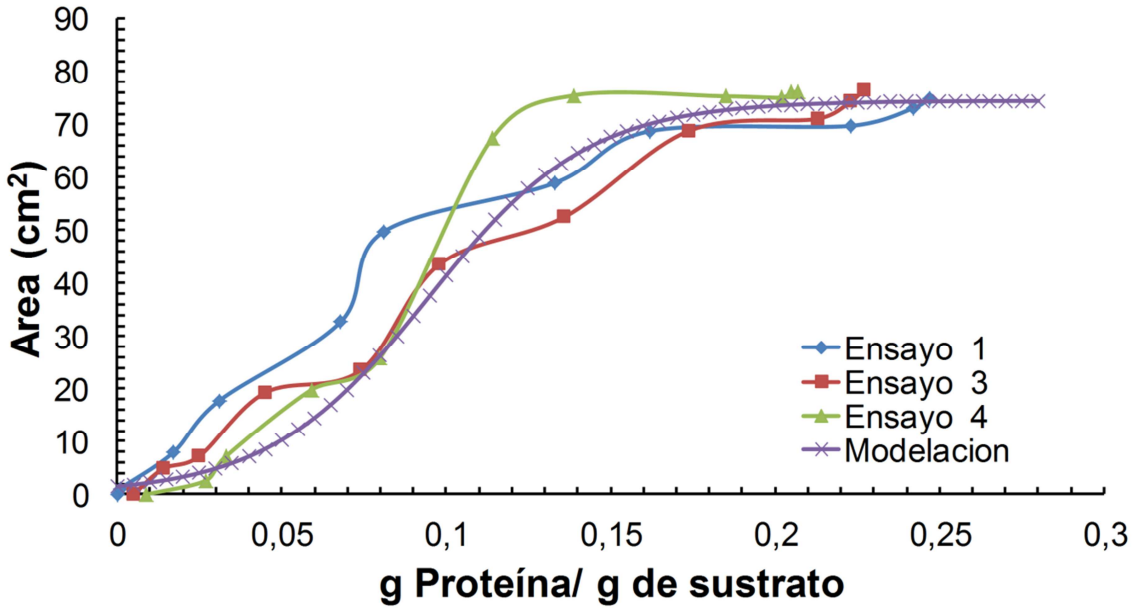


Figura 47. Curva de biomasa modelada mediante la ecuación logística A promedio para la concentración de proteína vs área

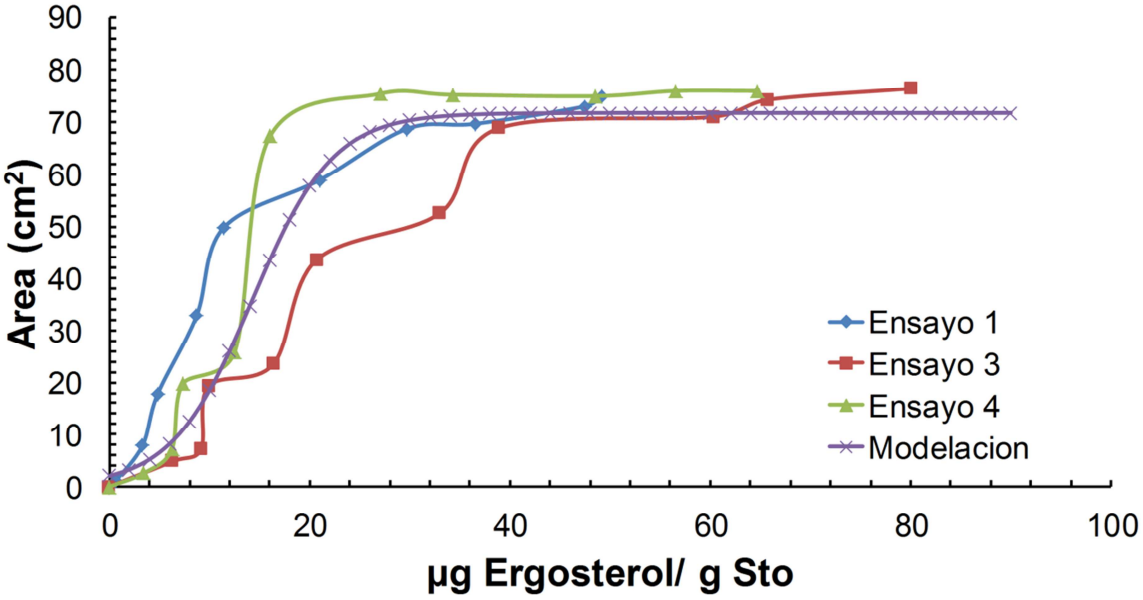


Figura 48. Curva de biomasa modelada mediante la ecuación logística A promedio para la concentración de ergosterol vs área

Para el caso del analisis dado para los datos en conjunto, los resultados del CFTOOL de Matlab y su respectiva comparacion con los datos en promedio, aparece en la Tabla 22.

Tabla 22. Comparación de los coeficientes de los datos indivuduales y en conjunto en la ecuación logística A para las concentraciones de proteína y ergosterol.

Coeficientes	Conc. Proteína Datos Promedios	Conc. Proteína Datos en conjunto	Conc. Ergosterol Datos Promedios	Conc. Ergosterol Datos en conjunto
$\beta_1(cm^2)$	74,428	73,95	71,791	72,5
β_2	49,372	23,05	34,407	15,21
β_3	41,250	38,2	0,248	0,195
r^2 Ajustado	0,985	0,963	0,974	0,897

En las Figuras 49 y 50, aparecen las comparaciones de las modelaciones de las de los datos individuales y en conjunto tanto para la concentración de proteína como para la concentración de ergosterol.

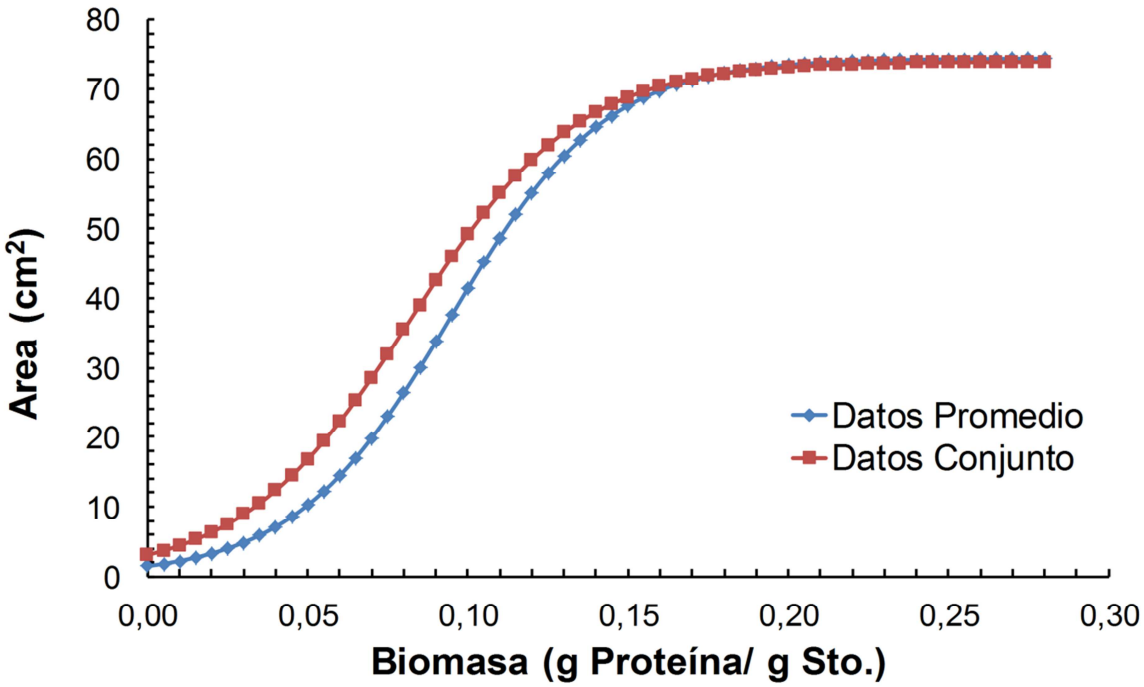


Figura 49. Comparacion de las curva de biomasa modeladas para la concentración de proteína vs tiempo.

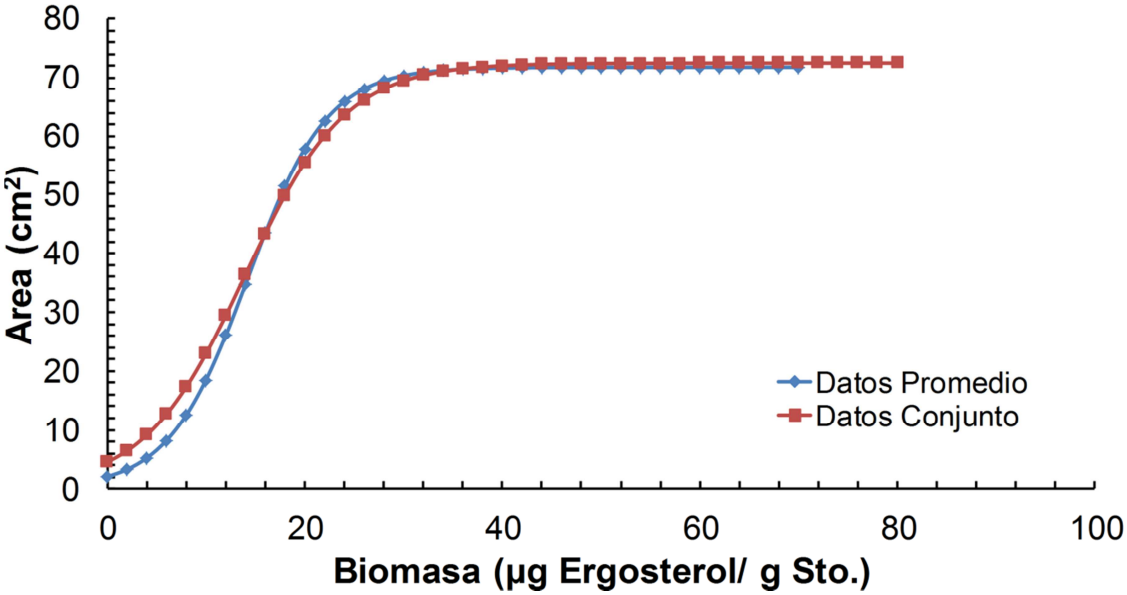


Figura 50. Comparacion de las curva de biomasa modeladas para la concentración de ergosterol vs tiempo.

Tanto para la concentración de proteína como para la concentración de ergosterol, existe una diferencia debido a la dispersión de los datos y sobretodo porque uno es un promedio y el otro reúne todos los datos, sin embargo, la diferencia no es representativa para los dos coeficientes más importantes que son β_1 y el r^2 ajustado, pues las áreas máximás que alcanza el hongo se diferencia por décimás y el r^2 ajustado se mantiene por encima de 0.95, a excepción de todos los datos en conjunto de la concentración de ergosterol. Los valores de r^2 ajustados por encima de 0,95 son deseados y bastante alto si se compara con los encontrados en bibliografía. Por otro lado, se puede observar que el β_2 si presenta una diferencia evidente, sin embargo, como se mencionó antes, tanto β_2 y β_3 son adimensionales y son valores que simplemente varían con respecto a tiempos y velocidades de crecimiento desde la parte experimental, y para el caso del modelo, son valores muy pequeños pues se encuentran en el denominador y multiplicando valores muy pequeños, lo cual implica dar valores pequeños que no van a afectar mucho al numerador y por ende al valor final de la concentración de biomasa, en otras palabras si fueran valores representativos, los valores de r^2 no hubieran dado tan altos.

El PDI, se ha empleado para la determinacion de biomasa, como lo muestran los trabajos realizados por Dorge y colaboradores (Dörge et al., 2000), donde presentó un método para la identificación directa de especies fúngicas por medio del análisis de PDI; este método permite conocer la posición, textura, color, tamaño entre otras características relevantes de cada colonia. Por su parte Firrao y colaboradores (Firrao et al., 2010), empleó el PDI para la cuantificación de

micotoxinas en el maíz. Con esta técnica logró cuantificar cantidades fiables de micotoxinas en unos cuantos minutos en comparación a los análisis químicos que son más laboriosos y costosos. Duan (Duan et al., 2012) implementó un protocolo de procesamiento digital de imágenes para evaluar el crecimiento de las colonias fúngicas y otras características en el tiempo, establecieron ecuaciones algebraicas para representar las curvas de biomasa y la dimensión de las colonias, estas fueron analizadas en un algoritmo llamado método de error en Matlab versión 7.1, el cual consistía en analizar los parámetros en ciertos rangos de permisibilidad hasta que el error entre los valores calculados en el procesamiento digital de imágenes y los calculados experimentalmente fueran mínimos.

En cuanto a los ajustes obtenidos para mediciones de biomasa por PDI, se puede mencionar el trabajo realizado por Montgomery y colaboradores (Montgomery, Monreal, Young, & Seifert, 2000), para la determinación de la biomasa fúngica del suelo a través de la concentración de ergosterol realizó una cinética para determinar el contenido total de éste esterol, y se correlaciona estrechamente con una producción total de biomasa seca durante el crecimiento de cada una de las especies de hongos, reportando un r^2=0.95. Díaz y colaboradores (Díaz et al., 2010), caracterizaron la evolución de las estructuras macro y micro de colonias *R. Oligosporus* en medio sólido, además realizaron una cinética para la medición de glucosamida en el micelio como biomasa y la longitud de las hifas de la colonia, la correlación de ambos procedimientos arrojo un valor de r^2=0.96. Wijekoon y colaboradores (Wijekoon, Goodwin, & Hsiang, 2008) empleó el PDI para evaluar los cambios de color en hojas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con *Colletotrichum destructivum,* debido a la severidad que causan las enfermedades fúngicas foliares y evaluó los resultados en el software Scion Image, mostrando una correlación de r^2= 0.81. Los ajustes obtenidos en este trabajo, mostraron valores superiores o iguales en muchos casos, mostrando que la medición de biomasa por PDI para FES, puede ser útil, más específicamente para el *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maíz.

De la correlación del crecimiento de las áreas con las concentraciones de biomasa, se obtuvieron ajustes satisfactorios tanto para la concentración de proteína como para la concentración de ergosterol, para los datos promediados réplica por réplica. Para los datos en conjunto, los resultados indican que la concentración de ergosterol no logró obtener un r^2 ajustado de 0,9. El PDI, se puede emplear como método para cuantificar la biomasa del *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maíz.

Finalmente, de los análisis obtenidos de los modelo de Gompertz, Logístico, RNA y PDI, los mejores ajustes y RMSE se obtuvieron con las concentraciones de proteína. Por lo anterior, además de la dispersión de los datos con la concentración de ergsoterol, para el análisis del fermentador sólido, se llevaran a cabo únicamente con la concentración de proteína, es decir no se analizó el

crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maíz en el fermentador sólido, con la concentración de ergosterol.

5.9 CONSTRUCCION DEL FSC ESCALADA PARA EL ENRIQUECIMIENTO MICELIAR DE LA TUSA DE MAÍZ EN EL FERMENTADOR.

El fermentador diseñado y construido de acuerdo al escalado, fue un fermentador sólido de columna (FSC). El FSC, acotado con cada una de sus partes aparece en el Anexo F.

5.9.1 Descripción del FSC

En la Figura 51 aparece el FSC montado y funcionando, describiendo de forma general sus partes.

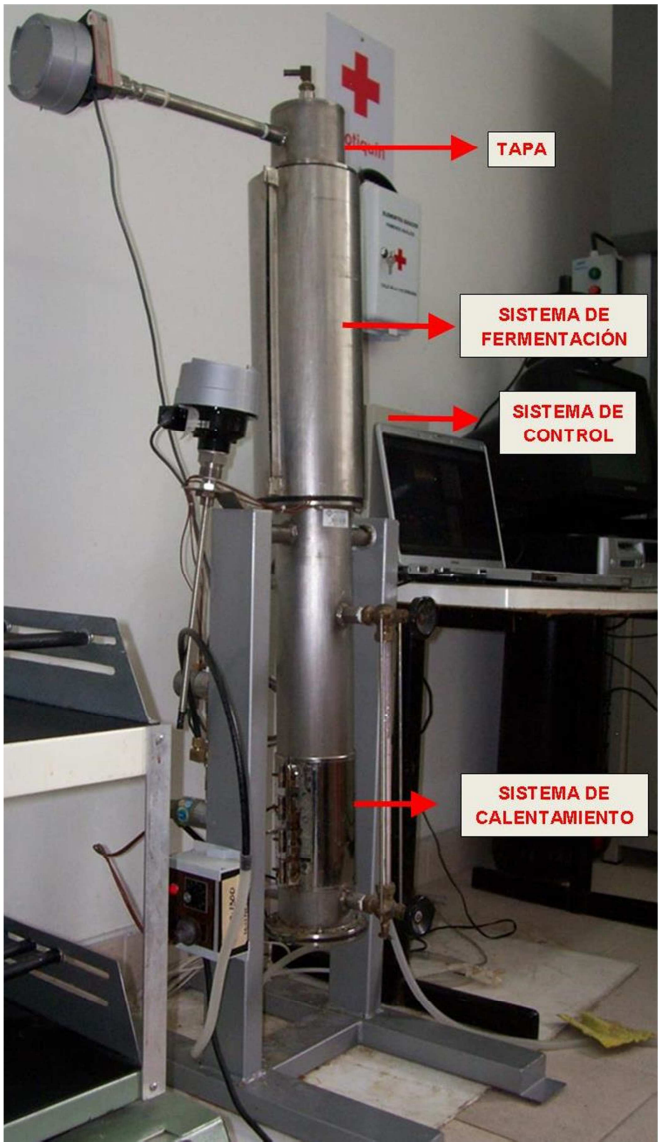


Figura 51. FSC montado y funcionando

En la Figura 52, se muestra el modulo (recipiente) del FSC, donde se lleva a cabo el bioproceso para la producción de proteína. En dicho recipiente, se introduce además el distribuidor de vapor de agua y las canastas donde se lleva a cabo el bioproceso. El volumen total del vaso de fermentación es 4L y con las canastas es de 1,1L.

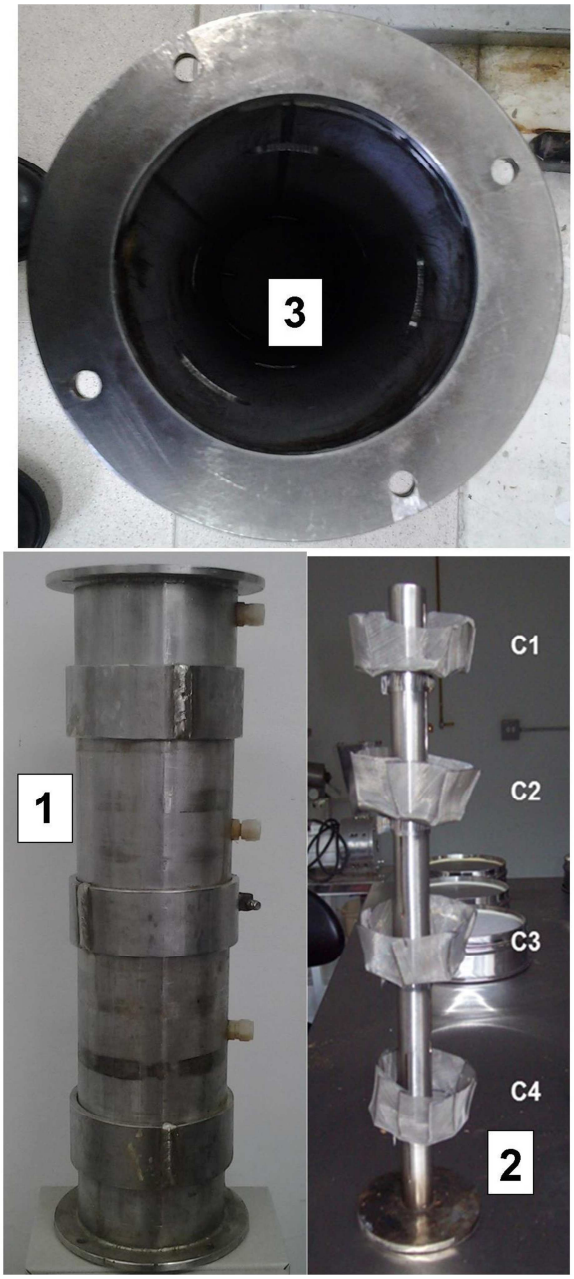


Figura 52. Recipiente donde se lleva a cabo la fermentación en el FSC.

1. Vaso de fermentación; 2. Distribuidor de humedad y canastas para el bioproceso; 3. Vista superior del vaso de fermentación.

En la parte superior del vaso de fermentación, se encuentra una tapa con una válvula para liberar la presión en el sistema; adicional, tiene una salida para la medición de la humedad relativa próxima a la ciudad de Medellín donde se llevó a cabo el proceso, tal como lo muestra la Figura 53.

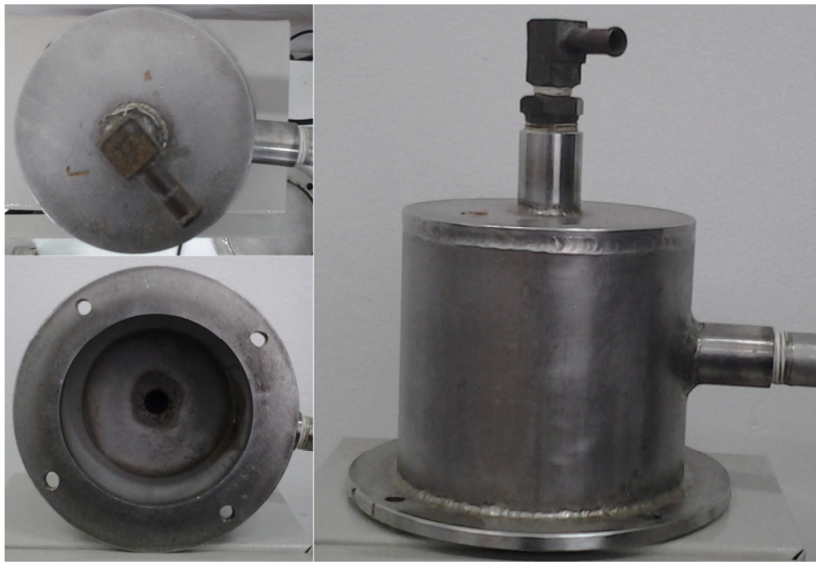


Figura 53. Tapa del vaso de fermentación del FSC.

En la parte inferior del vaso de fermentación, se encuentra el sistema de calentamiento que tiene un medidor de nivel de agua y una resistencia para calentarla y mantenerla a 25°C ± 2°C, esto se muestra en la Figura 54.

Figura 54. Sistema de calentamiento del FSC.

El sistema de aireación, empleó una bomba que suministro aire a un flujo de 18000 L/Hr el cual se hizo de forma intermitente. El aire fue esterilizado con un filtro de un poro de 2µm. En la Figura 55, se muestra la bomba empleada.

Figura 55. Bomba de aire del FSC

Adicional a lo anterior, al final del montaje en el sistema de aireación hay una tapa en acero inoxidable, que se puede ver en la Figura 56 A. Entre la tapa y el fermentador y el fermentador y el sistema de aireación el sellado se hace a través de empaques, como lo se muestra en la Figura 56 B.

A. **B.**

Figura 56. Empaques y tapa del FSC

A. Tapa al final del reactor. B. Empaque para los sellos

Finalmente, el FSC, cuenta con un sistema de medición de datos, a través de un sistema de control de la American National Instruments® para los sistemas de temperatura y humedad relativa. La Figura 57, muestra el sistema de control, el cual en sistema completo del FSC, se encontraba asegurado en una caja metálica.

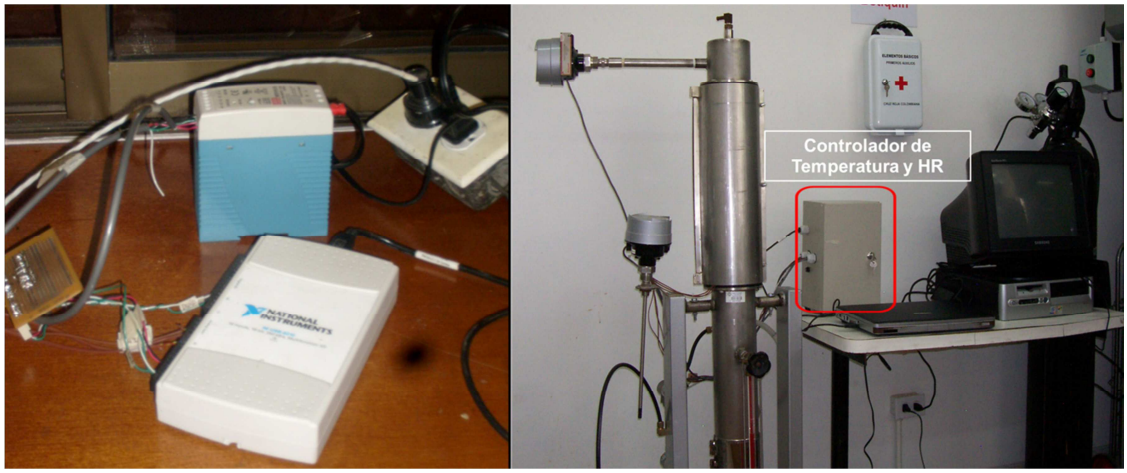


Figura 57. Sistema controlador en el FSC

5.10 MONTAJES PRELIMINARES EN EL FSC

5.10.1 Primer montaje en el FSC

Con las mejores condiciones obtenidas en la caja de Petri, es decir, la humedad del 80 %, pH de 6, un tamaño de partícula de 2450 µm a 25 °C con presencia de sales, se realizaron los primeros montajes en el FSC. Para ello, se llevaron a cabo réplica 8 réplicas con una duración de 25 días cada uno, debido a la modelación empleada en el ítem 3.5. La cantidad aproximada de sustrato, es de 1200 g, equivalente a un 80% del volumen del módulo de fermentación del FSC y un 20 % de inóculo. Para estos primeros resultados, se presentó un proceso de contaminación del sustrato, tal como lo muestra la Figura 58. Los montajes de dicha Figura fueron tomados al azar.

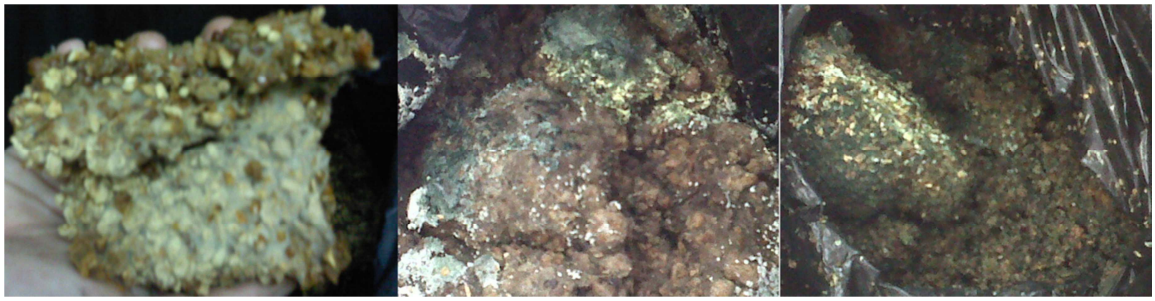


Figura 58. Contaminacion de los primeros réplicas en el FSC

Durante este primer tipo de ensayos, ninguno de los montajes dio muestra de crecimiento por parte del *Pleurotus pulmonarius* en el sustrato. Con el objetivo de conocer los principales grupos o microorganismo implicados en la contaminación del proceso, se llevó a cabo una determinación de los microrganismos o principales grupos de microorganismo en el sustrato. Dicho análisis se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la escuela de ingenierías de la UPB; dicho análisis arrojó como principales hongos el *Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Penicillum spp, Trichoderma spp* entre otros. De otro lado, se detectaron bacterias mesófilas, donde se destacaron la presencia de *Bacillus spp*. El *Aspergillus niger,* el *Penicillum spp* y la *Trichoderma spp,* ya se habían identificado en algunas réplicas de contaminación en la caja de Petri. Stamets y Chilto (Stamets, P. Chilton, J., 1983) señalan que los principales vectores de contaminación en un cultivo de basidiomicetos son el cultivador, el aire, el sustrato, el micelio y las herramientas y equipos involucrados en el proceso. De acuerdo a lo anterior, las probables causas de contaminación están asociadas al sustrato y al aire suministrado. En el capítulo de materiales y métodos se mencionó que la tusa no tenía un tiempo mayor a 8 horas de obtenida y fue desinfectada con hipoclorito de sodio; la mayoría de los mircroorganismos detectados anteriormente, son resistentes a dichos tratamientos ya sea por su tipo de esporas o la asociación con otros microrganismos, formando biopelículas que son resistentes a tratamientos químicos, dentro de los cuales se incluyen los clorados (Diaz, Carolina, 2011), (Fraise, A. Lambert, P. Maillard, J., 2004). Es importante resaltar además que uno de los hongos contaminantes detectados fue de la especie *Trichoderma spp,* también llamado “moho verde” el cual ha sido reportado como contaminante de cultivos de hongos comestibles donde se incluyen especies de *Pleurotus ssp* (Romero, 2009), (Perez, 2006). Los microrganismos contaminantes encontrados en este trabajo, coinciden con los señalados por Rodriguez y Jaramillo (Rodriguez y Jaramillo, 2005) y Perez y colaboradores (Perez, 2006) donde se menciona la presencia de *Aspergillus spp*, *Trichoderma spp*, *Penicillum spp*, entre otros. En cuanto a la contaminación por el aire, la bomba tomaba el aire del ambiente circundante de la UPB, el cual entra al laboratorio del GRAIN por medio de dos equipos de aire acondicionado controlado; dichos equipos aunque cuentan con filtros, a los que se les hace limpieza y desinfección periódicamente, los cuales no son lo suficientemente

pequeños para impedir la entrada de algún tipo de material particulado. Cabe resaltar que los microorganismos mencionados anteriormente son microbiota del ambiente, que se encuentran en la mayoría de las urbes como es el caso de la ciudad de Medellín. Las esporas de los hongos, son el grupo más numeroso de microorganismos presente en la atmosfera, que por lo general cuentan con un tamaño de 3 a 100 µm (Xue et al., 1992). Probablemente en la carga del FSC, las esporas de estos microorganismos pudieron llegar a depositarse en el sustrato, transportadas por el aire.

Otra de la causas a la que se le podría atribuir la contaminación tan fuerte del medio, fue al distribuidor del medio, el cual contaba con un orificios realizados con láser de 1 mm de diámetro, como aparece en la Figura 14, y que a pesar de haber sido lavado, desinfectado y esterilizado, parecía albergar esporas de los hongos filamentosos antes descritos, los cuales con la ayuda del vapor de agua se pudieron transportar por todo el módulo de fermentación. Por lo anterior, se decidió llevar a cabo otro diseño de distribuidor de humedad.

5.10.2 Segundo Montaje. Primer rediseño en el FSC

En vista de los problema presentados anteriormente, se optó por emplear otro sistema de distribución de la humedad en el FSC. El esquema del rediseño del distribuidor se muestra la Figura 15. Con este diseño se realizaron 3 réplicas de 25 días en los cuales se siguió presentando contaminación aunque por primera vez apareció crecimiento evidente del *Pleurotus pulmonarius,* como lo muestra la Figura 59.

Figura 59. Resultado del bioproceso del segundo rediseño del FSC

5.10.3 Segundo rediseño de los distribuidores en el FSC

De acuerdo a los resultados obtenidos, se planteó un segundo rediseño, tal como se muestró en la Figura 16. Tanto para el primer como para el segundo rediseño, se contó con suministro permanente de aire. Para este segundo rediseño, se realizó una réplica adicional sin suministro de aire y hubo una evidente con disminución de microflora indeseada. Todos los anteriores rediseños, emplean aproximadamente el 80% del volumen del módulo de fermentación del FSC, que corresponde un promedio aproximado de 1200 g de sustrato preparado y un 20% de inóculo son semilla de *Pleurotus pulmonarius*.

5.10.4 Ultimo rediseño de los distribuidores en el FSC

Finalmente, se optó por cambiar la forma de distribuir el sustrato en el FSC; el cambio fundamental fue acomodar el sustrato en canastas a lo largo del distribuidor de humedad, tal como lo muestra la Figura 17.

De esta manera, se construyó el distribuidor en acero inoxidable; las canastas fueron de alambre de acero de alta resistencia (120 a 160 kg. de resistencia por mm^2) y una distancia entre dos alambres contiguos de 0,534 mm, de referencia comercial No. 40, lo que permite el paso del agua y que la tusa de maiz se mantenga estable. El espesor tan pequeño no se convierte en una barrera de calor determinante. Las canastas elaboradas, tienen un diametro de 100 mm y en las que es posible albergar un preso promedio de 35,20 g de sustrato. El acotado del distribuidor y las canastas se puede observar en el Anexo F.

Para evaluar el crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* con este nuevo rediseño, se hicieron primero dos ensayos por duplicado: uno suminstrando aire al sistema y el otro sin aire. Los réplicas con aire presentaron contaminacion tal como lo muestra la Figura 60.

Figura 60. Bioproceso del último rediseño del distribuidor de humedad con suministro de aire.

Para el caso del último rediseño sin suministro de aire, las dos réplicas no presentaron contaminación con hongos filamentosos y hubo un crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* en la tusa de maíz, como lo muestra la Figura 61.

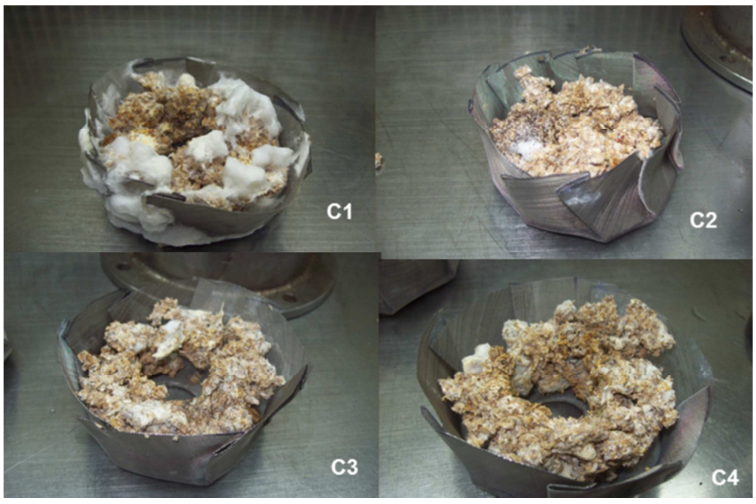


Figura 61. Bioproceso del último rediseño del distribuidor de humedad sin suministro de aire

De acuerdo a lo anterior, el tercer rediseño con un solo distribuidor de la humedad, 4 canastas distribuidas homogéneamente por el tubo distribuidor y sin suministro de aire, fue el montaje al que se decidió evaluarle la producción de proteína

miceliar en la tusa de maíz con el *Pleurotus pulmonarius*. Se conservó la temperatura de 25°C, debido a que a esa temperatura se presentaron los resultados de la Figura 60. Sin embargo, por los cambios presentados en el proceso y en diseño del FSC, se llevó a cabo un diseño de experimentos donde reevaluó nuevamente el tamaño de partícula, que probablemente tendrá una influencia diferente, debida al cambio de presión en el sustrato, por la forma en que éste se asentó en el FSC (Schmidt & Furlong, 2012). La otra variable, fue el porcentaje de inóculo empleado, variable importante en el FES a nivel de bioreactores (Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. , 2008). El nuevo diseño es un factorial 2^2, explicado en el capítulo de materiales y métodos en la Tabla 4. Los resultados del contenido del % proteína en la tusa de maíz, se muestra en la Tabla 23.

Tabla 23. Resultados del diseño de experimentos 2^2 para el contenido proteico de la tusa de maíz en el FSC

TAMAÑO DE PARTICULA	% INOCULO	Modulo	g Proteína/ g Sto Promedio	Desviación Estandar	Promedio proteína (g proteína/ g Sto)
2322 µm Grueso (+)	30% (+)	C_1	2,886	0,287	2,128
		C_2	1,780	0,179	
		C_3	1,748	0,284	
		C_4	2,100	0,191	
2322 µm (+)	20% (-)	C_1	2,844	0,352	2,362
		C_2	2,127	0,279	
		C_3	2,198	0,174	
		C_4	2,279	0,989	
901 µm (-)	30% (+)	C_1	2,976	0,271	2,823
		C_2	2,854	0,211	
		C_3	2,628	0,137	
		C_4	2,835	0,214	
901 µm (-)	20% (-)	C_1	3,576	0,138	3,061
		C_2	3,309	0,139	
		C_3	2,878	0,404	
		C_4	2,479	0,512	

5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN EL FSC

A continuación, se llevará a cabo el análisis estadístico del contenido de la proteína miceliar obtenida en el FSC. Al igual que en el caso de la caja de Petri, se realizará a través de una análisis de varianza. Se evaluaron tres efectos: la canasta en el FSC, tamaño de partícula y % de inóculo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Anova para el análisis del FSC.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	
EFECTOS PRINCIPALES						
A:Canasta	3,773	3	1,258	9,260	0,0001	*
B:Tamaño de Partícula	5,789	1	5,789	42,650	0,0000	*
C:% Inóculo	0,660	1	0,660	4,860	0,0341	*
INTERACCIONES						
AB	0,974	3	0,325	2,390	0,0850	
AC	0,440	3	0,147	1,080	0,3699	
BC	0,000	1	0,000	0,000	0,9845	
RESIDUOS	4,751	35	0,136			
TOTAL (CORREGIDO)	**16,389**	**47**				

La Tabla 24, muestra que los efectos principales, canasta, tamaño de partícula y porcentaje de inóculo, tienen un efecto estadísticamente significativo (P<0,05), por ello aparecen señaladas con un asterisco; sin embargo, las interacciones (AB, canasta tamaño de partícula; AC, canasta: % Inóculo, canasta: % Inóculo; CB, tamaño de partícula: % inóculo), no tienen efecto estadísticamente significativo.

Para comparar los promedios de los efectos principales que resultaron significativos, se utilizó la prueba de Tukey, empleando un nivel de significancia α 0,05. En las Tablas 25 a la 27 se muestran dichas comparaciones, para las canastas, tamaño de partícula y el % de inóculo respectivamente.

Tabla 25. Prueba de Tukey para las canastas en el FSC

Canasta	Observaciones	Medias	Grupos Homogéneos	
C3	12	2,365	X	
C4	12	2,423	X	
C2	12	2,517	X	
C1	12	3,070		X

Tabla 26. Prueba de Tukey para el tamaño de partícula en el FSC

Tamaño de partícula	Observaciones	Media	Grupos Homogéneos	
2322 µm	24	2,246	X	
901 µm	24	2,941		X

Tabla 27. Prueba de Tukey para el porcentaje de inóculo en el FSC

Porcentaje de Inóculo	Casos	Media LS	Grupos Homogéneos	
30%	24	2,476	X	
20%	24	2,711		X

De la Tabla 25 se puede mencionar, que la C1, superó a las otras tres en cuanto a la concentración de proteína obtenida con un valor promedio de 3,070 g proteína/ g de sustrato. Entre las canastas 2, 3 y 4 no hubo una diferencia estadísticamente significativa; de esta manera, se ratifica lo que se analizó después de la Tabla 23.

En la Tabla 26, se muestra que el tamaño promedio de 901 µm (Fino) obtuvo una concentración promedio de 2,941 g proteína/ g de sustrato, diferente estadísticamente al arrojado por el tamaño promedio de 2322 µm (Grueso), con un valor de 2,246 g proteína/ g de sustrato. Lo anterior indica que un tamaño fino (901 µm) de partícula superó en un 23,63% al tamaño de 2322 µm (Grueso).

La prueba de Tukey para él % de inóculo (Tabla 27), arrojo una diferencia significativa entre los niveles del 20% y 30% debido a que para el 20% de inóculo se obtuvo una concentración promedio de 2,711 g proteína/ g de sustrato contra 2,476 g proteína/ g de sustrato, arrojado por el 30% de inóculo. Lo anterior indica que con un 20% de inóculo, se logra un mayor contenido de proteína que con un 30%.

De la Tabla 24, se puede observar que las mejores concentraciones de proteína son las 3,576 ± 0,138 y 3,309 ± 0,139 g proteína/ g sto, correspondientes a C1 y C2 respectivamente, de la combinación 901 µm (fino) y 20% de inóculo; de las combinaciones promedio, la mejor combinación fue la mencionada anteriormente.

Al igual que en el ítem 4.6, se calculó el coeficiente de determinación con la ecuación 7; dicho valor fue de 0,71. El análisis del ítem 3.4 referente al R^2 aplica para éste análisis; en la bibliografía para diseños de experimentos con fermentadores en FES, se ha reportado valores de 0,85 como el reportado por Mahanama y colaboradores (Mahanama et al., 2012). El valor del coeficiente de determinación puede considerarse aceptable. Dentro de las razones que se podrían atribuir al valor de 0,71 como coeficiente de determinación en el FSC, podrían mencionarse los inconvenientes en la distribución de la humedad y la temperatura que se presentó en el interior del equipo, y que arrojó una diferencia estadísticamente significativa en el contenido de proteína en la C1 con respecto a las otras tres. El comportamiento de la humedad y la temperatura de dos ensayos al azar en los montajes realizados se pueden observar en el Anexo G.

Los resultados obtenidos en el FSC, muestran entonces que la mejor combinación de tamaño de partícula fue el tamaño fino (901 µm) con 20% de inóculo, con una concentración promedio de todas las canastas de 336, 788 %.

5.12 CÁLCULO DEL % DE ENRIQUECIMIENTO PROTEICO DE LA TUSA DE MAÍZ EN EL FSC

De la Tabla 23, también puede deducirse que para todas las combinaciones, la C1 arrojó los mejores porcentajes de proteína producida. Además del contenido de proteína obtenido, también se calculó el % de enriquecimiento de la tusa de maíz con proteína miceliar, según la Ecuación 17, modificada de Schmidt y Furlong (Schmidt & Furlong, 2012). Los resultados del % de enriquecimiento, se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Resultados del % de enriquecimiento de la tusa de maíz del diseño de experimentos en el FSC

TAMAÑO DE PARTÍCULA	% INOCULO	Modulo	% Enriquecimiento	Desviación Estándar	% Enriquecimiento Promedio / Ensayo
2322 µm GRUESO (+)	30% (+)	C1	311,828	0,287	203,763
		C2	154,032	0,179	
		C3	149,462	0,284	
		C4	199,731	0,191	
2322 µm GRUESO (+)	20% (-)	C1	305,914	0,352	237,097
		C2	203,495	0,279	
		C3	213,710	0,174	
		C4	225,269	0,989	
901 µm FINO (-)	30% (+)	C1	324,731	0,271	302,890
		C2	307,258	0,211	
		C3	275,000	0,137	
		C4	304,570	0,214	
901 µm FINO (-)	20% (-)	C1	410,323	0,138	336,788
		C2	372,312	0,139	
		C3	310,753	0,404	
		C4	253,763	0,512	

5.13 CALCULO DE LA PRODUCTIVIDAD DEL FSC

Tambien de la Tabla 23, se calculó la productividad del FSC, según Mitchell y colaboradores (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006), tal como se indicó en la Ecuación 18. Los resultados de la productividad, se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Resultados de la productividad de la tusa de maíz del diseño de experimentos en el FSC

TAMAÑO DE PARTÍCULA	% INÓCULO	Modulo	g Proteína/ g Sto*d*L Productividad FSC	g Proteína/ g Sto*d*L Productividad Promedio FSC
2322 µm (+)	30% (+)	C1	11,318	7,387
		C2	5,578	
		C3	5,412	
		C4	7,240	
2322 µm (+)	20% (-)	C1	11,103	8,600
		C2	7,377	
		C3	7,749	
		C4	8,169	
901 µm (-)	30% (+)	C1	11,788	10,993
		C2	11,152	
		C3	9,979	
		C4	11,054	
901 µm (-)	20% (-)	C1	14,901	12,226
		C2	13,519	
		C3	11,279	
		C4	9,206	

En la bibliografía, se encuentran otros residuos agroindustriales que han sido aprovechados para el enriquecimiento con proteína celular de hongos o levaduras, a través de bioprocesos en FES, como por ejemplo pulpa de manzana, harina de canola, vainas de algarroba, tallos de uva, cáscaras de naranja, bagazo de caña de azúcar. (Tim Robinson & Nigam, 2003).

Los resultados obtenidos en cuanto a la producción de proteína obtenida en la Tabla 24, se pueden comparar con los resultados de la Tabla 2. De la Tabla 2, se destacan los trabajos realizados por Shojaosadati y colaboradores (Shojaosaditi et al., 1999), Grajek (Grajek, 1988) y Araújo y colaboradores (Araújo et al., 2005), debido a que con por la acción de hongos filamentosos y levaduras, lograron enriquecimientos proteicos de 180, 206,4 y 401% respectivamente. De los

trabajos mencionados anteriormente, solo el enriquecimiento obtenido por Araújo y colaboradores, superó los obtenidos en este estudio.

También puede observarse que en la Tabla 2, que los trabajos realizados con basidiomicetos del género *Pleurotus*, el mayor porcentaje de enriquecimiento lo obtuvo el trabajo realizado por Ahmadi, A y colaboradores (Ahmadi A et al, 2014) donde con *Pleurotus Ostreatus* en paja de trigo, obtuvo un enriquecimiento de la proteína en 63, 24%.

Los anteriores análisis, mostraron que en el FSC, la mejor concentración de proteína se obtuvo en la C1, con la combinación el tamaño fino (901 µm) con 20% de inóculo, obteniendo un % de enriquecimiento proteico promedio de 335.788% y una productividad promedio de 12,226 g proteína / g Sto * d *L.

5.14 MODELACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO MICELIAR DE LA TUSA DE MAÍZ EN EL FSC

De acuerdo a los criterios del ítem 2.11 de materiales y métodos en las Figuras 62 y 63, se muestra la cinética modelada del Pleurotus *pulmonarius* en el FSC.

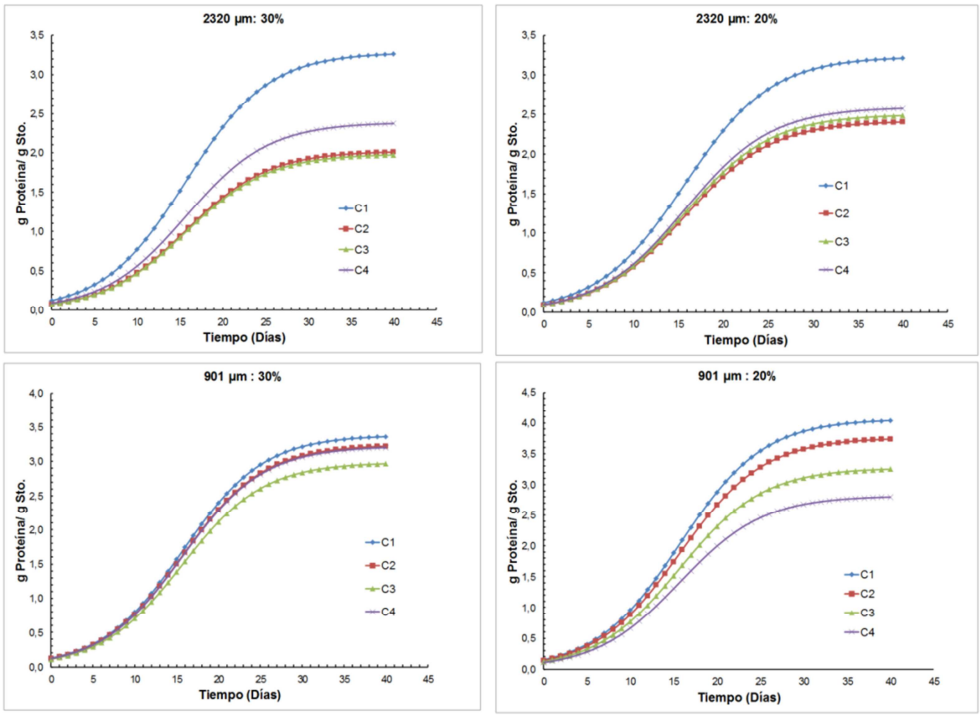


Figura 62. Modelado de crecimiento del Pleurotus pulmonarius en tusa de maíz en el FSC, según el modelo Logístico

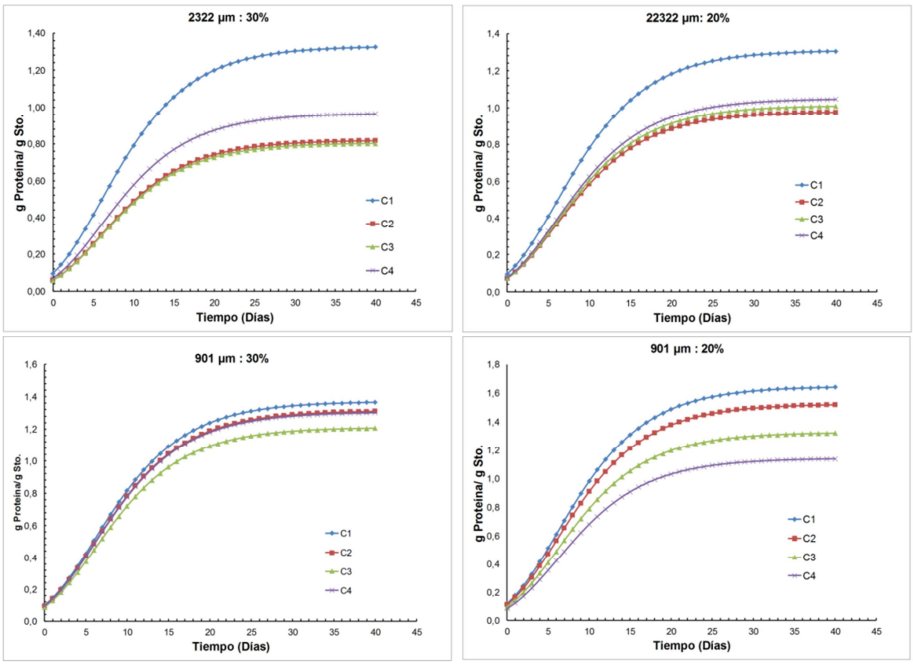


Figura 63. Modelado de crecimiento del Pleurotus pulmonarius en tusa de maíz en el FSC, según el modelo Gompertz

Según lo anterior, la modelización del crecimiento del del *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maíz en el FSC, a través de RNA, se muestran en la Figura 64.

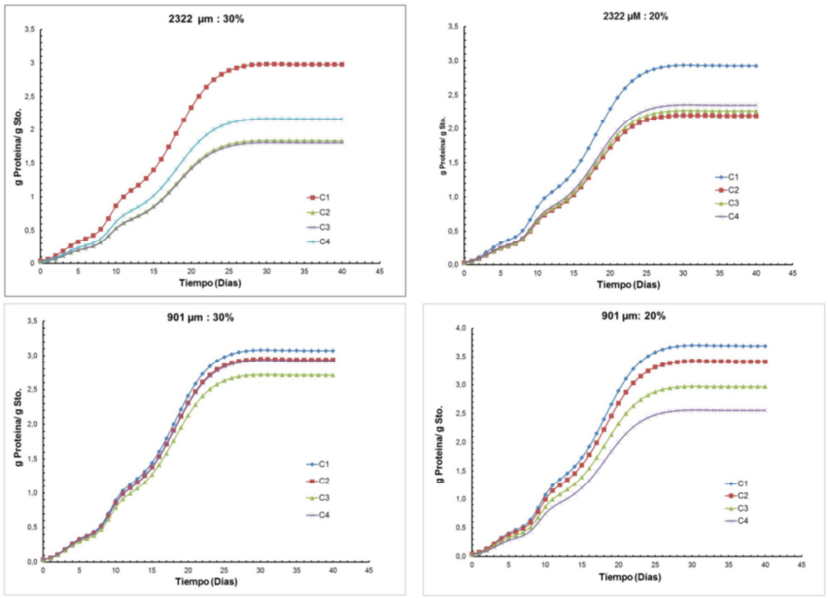


Figura 64. Modelado de crecimiento del Pleurotus pulmonarius en tusa de maíz en el FSC, a través de las RNA

Desde la Figura 60 a la 63, se muestra el modelado del crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* en el FSC. Según esas Figuras, el escalizado desde la caja de Petri hasta la mejor combinación del FSC (fino [901 µm] y 20%), fue superior 2,52 veces en cuanto a la concentración de proteína (g proteína/ g sustrato). Con respecto al % de enriquecimiento, el escalizado desde la caja de Petri hasta la mejor combinación del FSC fue 1,5 veces mayor. Adicional a lo anterior, la productividad promedio de las canastas en el FSC, para la combinación tamaño de partícula fino (901 µm) y 20% de inóculo fue de 12,226 g proteína/ g sustrato*d*L.

5.15 RESULTADOS DE LA DESLIGNIFICACIÓN Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*

Tal como se mencionó en el apartado de materiales y métodos, se llevó a cabo la medida de la deslignificación y la digestibilidad in vitro, con el objeto de hacer una aproximación de que lo digestible que sea para alimentación animal. Como los valores analizados en todas las canastas fueron muy similares, se reportará el valor promedio de todas las canastas, tal como la Tabla 30.

Tabla 30. Porcentaje de lignina en la tusa de maíz sin inocular e inoculada con *Pleurotus Pulmonarius*

Tusa de maíz	Promedio lignina soluble (%)	Promedio lignina Klason (% insoluble)	Promedio lignina total (%)	Desviación Estándar
Sin inocular	0,041650	14,52	14,5617	0,1864
A los 25 días de inoculada	0,039976	11,82	11,8600	0,2952

El contenido de lignina soluble en la tusa de maíz analizada con el espectrofotómetro UV mostrada en la Tabla 30, arrojó valores que matemáticamente no son significativos, por el valor tan bajo, con un porcentaje de 0,041650% y 0,039976% para la tusa sin inocular e inoculada, por ende estos valores no se tuvieron en cuenta en la cuantificación de la lignina.

La capacidad para deslignificar de los hongos de la podredumbre blanca se vio reflejada en los resultados mostrados en la Tabla 30, donde hubo una disminución del contenido del lignina de 14,52 a 11,82%, demostrando así que este tipo de hongo tiene un efecto favorable en los procesos de deslignificación (Hage, et al., 2010).

Los hongos tales como los del género *Pleurotus* son descomponedores de materiales lignocelulósicos. La podredumbre blanca suele producirse por los hongos que atacan principalmente la lignina (Prescott, S. Dunn, C., 1984). Las

enzimas segregadas por estos hongos son responsables de las transformaciones químicas, la ligninasa es la enzima que degrada la lignina (Prescott, S. Dunn, C., 1984). El *Pleurotus Pulmonarius* por ser un hongo de podredumbre blanca tiene la capacidad de disminuir el contenido de lignina de la tusa de maíz así como lo muestra la Tabla 31, hubo una disminución del contenido de lignina en la tusa tratada, esto se debe a su capacidad de producir ligninasa. Estos organismos secretan varias enzimas extracelulares que son esenciales para la transformación inicial de la lignina y que en conjunto logran su mineralización (transformando hasta dióxido de carbono y agua) (Dávila, Gustavo. Vásquez, 2006).

Tabla 31. Porcentaje Deslignificado de la tusa de maíz después de 25 días de inoculación con el *Pleurotus pulmonarius*

Tusa de maíz	**Promedio lignina total (%)**	**Porcentaje de deslignificación**
Sin inocular	14,56	18,553
A los 25 días de inoculada	11,86	

El porcentaje de lignina eliminado mostrado en la tabla 31 fue de 18,553 % en un periodo de 25 días, un valor bajo comparado con los resultados obtenidos por Wan y Li (Wan & Li, 2012), donde se menciona valores de 2,9 a 25,4% entre los días 7 y 14 después de haber sido inoculado, siendo para este estudio una etapa donde la degradación de la lignina aumento rápidamente durante esos días.

Para el estudio realizado por Wan y Li (Wan & Li, 2012), el máximo valor deslignificado por la *C. subvermispora* en el rastrojo de maíz fue de 39,2%, llevado a cabo a 42 días de haber sido cultivado (Wan & Li, 2012). Mientras que la deslignificación hecha por el *P. pulmonarius* en la tusa de maíz fue de aproximadamente 13,2% durante 25 días. Lo anterior, muestra la capacidad deslignificante del *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maíz.

Además de la deslignificación, se llevó a cabo la medición de la digestibilidad *in vitro*; en este análisis, la disgestibilidad *in vitro* de la tusa de maíz sin tratar, arrojó como resultado un valor de 11,76%. Los resultados de la digestibilidad en el FSC, se muestran en la Tabla 33, de acuerdo al tratamiento realizado con el diseño de experimentos descrito en la Tabla 24.

Tabla 32. Porcentaje de digestibilidad in vito de la tusa de maíz después de 25 días de inoculación con el *Pleurotus pulmonarius*

TAMAÑO DE PARTÍCULA	% INOCULO	MODULO	Digestibilidad Promedio	Desviación Estándar	% de aumento digestibilidad
2322 µm (Gruesos) (+)	**30%** (+)	**C1**	12,15%	0,175	3,32
		C2	14,79%	0,305	25,77
		C3	16,71%	0,585	42,09
		C4	15,68%	0,375	33,33
2322 µm (Gruesos) (+)	**20%** (-)	**C1**	19,08%	0,015	62,22
		C2	21,56%	0,023	83,29
		C3	20,75%	0,121	76,47
		C4	21,46%	0,032	82,48
901 µm (Finos) (-)	**30%** (+)	**C1**	20,52%	0,098	74,49
		C2	19,39%	0,054	64,91
		C3	20,58%	0,215	75,03
		C4	17,54%	0,044	49,15
901 µm (Finos) (-)	**20%** (-)	**C1**	28,52%	0,498	142,52
		C2	17,51%	0,486	48,89
		C3	17,82%	0,236	51,50
		C4	18,20%	0,023	54,73

Al igual que en el caso del enriquecimiento, se llevó a cabo el análisis de varianza para evaluar la significancia de las variables, tamaño de partícula, porcentaje de inóculo y canasta en la digestibilidad en el FSC. Los resultados del análisis de varianza, se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33. Análisis de varianza para la digestibilidad dentro del FSC

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	
EFECTOS PRINCIPALES						
A:Canasta	7,142	3	2,381	0,24	0,866	
B:Tamaño de Partícula	54,358	1	54,358	5,50	0,039	*
C:% Inóculo	91,301	1	91,301	9,24	0,011	*
INTERACCIONES						
AB	39,877	3	13,293	1,35	0,310	
AC	8,158	3	2,719	0,28	0,842	
BC	0,626	1	0,626	0,06	0,806	
RESIDUOS	108,680	11	9,880			
TOTAL (CORREGIDO)	283,934	23				

Los resultados arrojados por la anova en la Tabla 33, indican que tanto el tamaño de partícula como el porcentaje de inóculo, son estadísticamente significativos (marcados con asterisco), por tener un valor de 0,039 y 0, 011 respectivamente, ambos menores de 0,05 con un 95% de confianza. Por su parte, la canasta, y todas las interacciones mostraron un valor P>0,05 razón por la cual, no son estadísticamente significativas.

Para comparar los promedios de los efectos principales que resultaron significativos, se utilizó la prueba de Tukey, empleando un nivel de significancia α 0,05. En las Tablas 34 y 35 se muestran dichas comparaciones, para el tamaño de partícula y % de inóculo respectivamente.

Tabla 34. Prueba de Tukey para el tamaño de partícula

Tamaño de Partícula	Observaciones	Medias	Grupos Homogéneos	
2322 µm	12	17,903	X	
901 µm	12	21,095		X

Tabla 35. Prueba de Tukey paa el porcentaje de inóculo

% Inóculo	Observaciones	Medias	Grupos Homogéneos	
30%	12	17,430	X	
20%	12	21,568		X

En la Tabla 34, se muestra que el tamaño promedio de 901 µm (Fino) proporcionó una digestibilidad promedio de 21,095%, diferente estadísticamente al arrojado por el tamaño promedio de 2322 µm (Grueso), con un valor de 17,903%. Lo anterior indica que un tamaño fino (901 µm) de partícula superó en un 22,79% al tamaño de 2322 µm (Grueso) en la digestibilidad de la tusa de maíz.

La prueba de Tukey para él % de inoculo (Tabla 35), arrojo una diferencia significativa entre los niveles del 20% y 30% debido a que para el 20% de inoculo se obtuvo una digestibilidad promedio de 21,568%, contra 17,430%., arrojado por el 30% de inoculo. Lo anterior indica que con un 20% de inóculo, se logra una digestibilidad 19,19% mayor que con un 30% de inóculo.

Los valores de digestibilidad más altos se observaron en las muestras correspondientes a la combinación tamaño de partícula (901 µm) fino y 20% de porcentaje de inoculación, en la C1 con un valor de 28,52 ± 0,498%; con ese valor la digestibilidad aumentó en un 142,52%. El porcentaje de digestibilidad más bajo, lo arrojo la combinación tamaño de partícula (2322 µm) grueso y 30% de inóculo en C1; con dicho valor la digestibilidad tuvo un aumento del 3,32%

La medición de la digestibilidad *In Vitro*, llevada a cabo, con enzimas ha sido realizada también por Araiza y colaboradores (Araiza et al., 2013) de maíz y manzana, con el objetivo de emular el procedimiento llevado a cabo en el rumen; de ésta manera, se tiene un aproximado de lo digestible que puede ser el alimento para el animal. En términos generales, la digestibilidad *In Vitro* en el FSC, no se muestra una tendencia como lo indica la Figura 65.

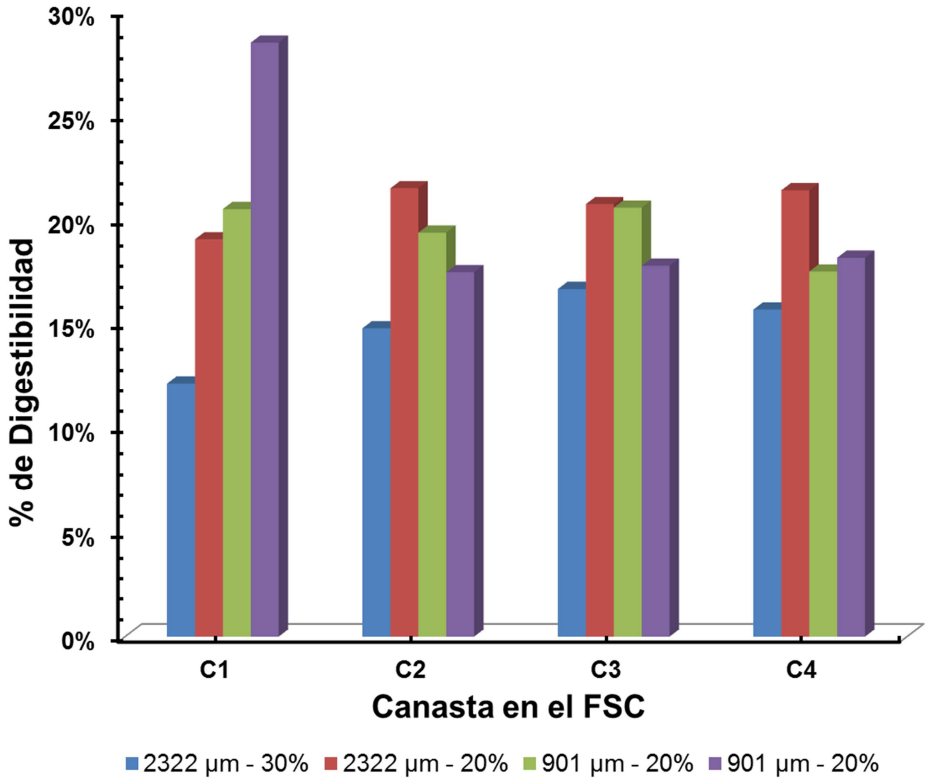


Figura 65. % de digestibilidad para el diseño de experimentos en el FSC.

Las especies de *Pleurotus sp.* se consideran entre las mejores especies degradadoras de materiales lignocelulósicos, reportando hasta un 80% de reducción de lignina y celulosa presentes en los sustratos. Esta cualidad hace que estos hongos sean atractivos para ser empleados para aumentar la digestibilidad y valor nutricional de los residuos lignocelulósicos en general, convirtiéndolos en materiales con un mayor aporte proteico y una marcada disminución en la lignina que es una sustancia no deseable y que deteriora la calidad de los alimentos empleados para nutrición animal (Montoya, S. y Restrepo, G., 2006), provenientes de residuos lignocelulósicos.

Lo anterior indica, que la mejor digestibilidad promedio obtenida en el FSC, fue de 20,51% con un tamaño de partícula de 901 µm (fino) y con un 20% de inóculo, además que la deslignificación promedio de todo el FSC fue de 18.553%.

6. CONCLUSIONES

- La caracterización fisicoquímica de la tusa de maíz, indica que es nutricionalmente una alimento pobre para la alimentación animal, entre otras características por su composición proteica de 3,58% ± 0,255 y un contendido de lignina de 14,56% ± 0,161. Además cuenta con una digestibilidad baja de 11.76%.

- Las mejores condiciones para el crecimiento preliminar del *Pleurotus pulmonarius* sobre la tusa de maíz, en caja de Petri fueron: humedad del 80%, pH de 8 y con presencia de sales. Tanto la humedad como la presencia de sales mostraron una diferencia estadística significativa (P>0,05).

- Los resultados del diseño de experimentos en la caja de Petri, indicaron que la mejor concentracion de proteína se obtuvo con la combinación un tamaño de paticula de 2450 µm a 25 °C, obteniendo un valor de proteína de 1,213 g de proteína/ g de sustrato, equivalente a un enriquecimiento del 221,946% ± 0,339, en 30 días. El coeficinete de determinacion de dicho diseño dio un valor de 0,808, valor que puede considerarse bueno para un diseño de experimentos factorial.

- El modelo de crecimiento de la biomasa para el *Pleurotus pulmonarius* obtenido a través de la medición de la concentración de proteína y el contenido del ergosterol en tusa de maíz, se ajustó de forma adecuada para el crecimiento Logístico y para las RNA.

- Para el modelo Logístico, el mejor ajuste se obtuvo para la concentración de proteína con valores de R^2 ajustados de 0,9935 para el análisis réplica por réplica y 0,9583 para todos los datos en conjunto. Por su parte para la concentración de ergosterol, los valores de r^2 ajustado para réplica por réplica fueron de 0,9872 y 0,828 para todos los datos en conjunto.

- Con el proceso de reparametriación, fue posible obtener los parámetros cinéticos: máxima concentración de biomasa (A), la máxima velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) y el período de latencia (λ) para el modelo Logístico, dichos valores para la concentración de proteína fueron 3,445; 0,205 $dias^{-1}$, 0 días y 0,227 g proteína/g sto. Los mismos parámetros cinéticos del modelo de Gompertz, para la concentración de proteína fueron 3,553, 0,209 $días^{-1}$, 0 días y 0,253 g proteína/g sto

- Para el caso de las concentraciones de ergosterol, los parámetros cinéticos A, μ_{max} y λ para el modelo Logístico fueron de 4,365, 0,142 $dias^{-1}$, 0 días y 78,649 µg ergosterol/ g de sto. Dichos parámetros para el modelo de

Gompertz fueron de 4,523, 0,203 dias^{-1}, 0 días y 92,112 µg ergosterol/ g de sto respectivamente.

- En el análisis de las RNA, para la concentración de proteína el RMSE de las RNA individules, fue aproximadamente 11 veces menor que el del modelo Logístico y 8,3 veces menor que el modelo de Gompertz. En el caso de la concentración de ergosterol, el RMSE promedio de las RNA, fue 1,43 veces menor que el del modelo Logístico y 1,32 veces menor que el del modelo de Gompertz. De esta forma se puede indicar que las RNA, pueden ser empleadas de forma efectiva para modelar el crecimiento del del *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maíz en caja de Petri. El RMSE de la concentración de proteína, fue mejor que el de la concentración de ergosterol debido a una menor dispersión de los datos en la concentración de proteína.

- Con el PDI, se logró obtener método de medición de la biomasa del *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maíz en caja de Petri, correlacionando las áreas de crecimiento del micelio con las concentraciones de proteína y de ergosterol. Se logró obtener obteniendo un r^2 ajustado promedio de 0,985 para el método réplica por réplica y de 0,963 para todos los datos en conjunto, para la concentración de proteína. En el caso de la concentración de ergosterol, los r^2 ajustados fueron de 0,974 y 0,897 respectivamente.

- La modelación de la cinética en el FSC, fue posible obtenerla, debido al escalizado que se llevó a cabo del crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* en tusa de maíz en caja de Petri, a través de la concentración de proteína que tanto para los modelos de crecimiento Logístico y de Gompertz como las RNA.

- De acuerdo a los problemas de contaminación, se requirió hacer tres rediseños de los distribuidores de humedad en el FSC. Con el último rediseño, se llevó a cabo un diseño de experimentos factorial, donde la mejor combinación para la producción de proteína fue tamaño de partícula de 901 µm (fino) y 20% de inóculo, con los que se obtuvo en promedio 3, 061 g de proteína/ g de sustrato; un enriquecimiento proteico de la tusa de maíz promedio del 336,788% y una productividad del FSC de 12, 226 g de proteína/ g Sto *d*L.

- El análisis de varianza del diseño de experimentos para la producción de proteína, indicó que para la producción de proteína en el FSC, la posición de la canasta, tamaño de partícula y porcentaje de inóculo, tienen un efecto estadísticamente significativo ($P<0,05$); de otro lado, el modelo arrojó un coeficiente de deterimación de 0,71 el cual es aceptable para un diseño de experimentos.

- El *Pleurotus pulmonarius* en el FSC, obtuvo una deslignificación del 18, 553% y aumento la digestibilidad *in vitro* de la tusa de maíz entre 3.32% y 142,52%.

7. RECOMENDACIONES

- Explorar variables para incrementar tanto el enriquecimiento proteico como la digestibilidad de la tusa dentro del FSC.

- Implementar un rediseño del FSC, con el objeto de homogenizar el enriquecimiento proteico tal como se presentó en la C1.

- Realizar superficie de respuesta con el objeto de optimizar las variables el tamaño de partícula y el porcentaje de inoculo dentro de del FSC.

- Llevar a cabo un rediseño en la estructura del FSC, para implementar la medición de biomasa a través del PDI, como el que se realizó en la caja de Petri.

- Realizar un diseño de experimentos donde se evalúen otras variables diferentes a las tomadas en este trabajo con el objeto de aumentar el contenido proteico de la tusa.

- Evaluar otros sustratos agroindustriales para enriquecimiento proteico tanto con basidiomicetos como con hongos filamentosos.

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, F. Genitina, J. Illanes, A. (2002). Fundamentos de ingeniería bioquímica. Valparaiso: Ediciones universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaiso.

Acuña, G., Ramirez, C., & Curilem, M. (2014). Software sensors for biomass concentration in a SSC process using artificial neural networks and support vector machine. Bioprocess and Biosystems Engineering, 37(1), 27–36. doi:10.1007/s00449-013-0925-3

Ali, H. K. Q., & Zulkali, M. M. D. (2011). Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation : A Review. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 25(2), 255–266.

Alvarez, M. Larrea, P. Paredes, M. (2010). Fermentación sólida del banano de rechazo utilizando Aspergillus niger para alimento animal. Ambato: Universidad Técnica.

Alves, H., Pires, W., Neto, F., Oliveira, N., & Pasquini, D. (2013). Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites, 44, 427–436.

Annadurai, G., & Lee, J.-F. (2007). Application of artificial neural network model for the development of optimized complex medium for phenol degradation using Pseudomonas pictorum (NICM 2074). Biodegradation, 18(3), 383–92. doi:10.1007/s10532-006-9072-8

Ansah, T., Agbolosu, A. A., Teye, G. A., Akwasi, A., & Opoku-agyeman, M. (2012). Evaluation of Corn Cob on the Growth Performance of Grasscutter (Thryonomys swinderianus). Evaluation of Corn Cob on the Growth Performance of Grasscutter, 45(1), 7–10.

AOAC. (1997). ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICA CHEMISTS,. I - II, 16. Virginia, Arlington, Estados Uniddos.

Araiza, E. Delgado, E. Carrete, F. Medrano, H. Solís, A. Murillo, M.Murillo, M. Haubi, C. (2013). Degradabilidad ruminal *in situ* y digestibilidad *in vitro* de diferentes formulaciones de ensilados de maíz-manzana adicionados con melaza. Avances en Investigación Agropecuaria, 17(2), 76-96.

Arango, C. (2009). DEFINICIÓN, DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA PROPUESTA METODOLÓGICA PARA DETERMINAR EL MODELO DE INVENTARIOS PARA PRODUCTOS TERMINADOS EN LAS EMPRESAS QUE FABRICAN ELEMENTOS DE FIJACIÓN EN COLOMBIA. Medellín: Escuela de Ingeniería de la organización, Facutlad de Minas. Trabajo presentado para optar al título de Magíster en Ingeniería Administrativa.

Araújo, L. D. F., Medeiros, A. N., Neto, A. P., & De, L. (2005). Protein Enrichment of *Cactus Pear* (O puntia ficus - indica M ill) Using *Saccharomyces cerevisiae* in Solid-State Fermentation, 48(June), 161–168.

Aufrere, J. (1978). Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. Annales De Zootechnie, 31(2), 111–130.

Bach, Alex. Calsamiglia, Sergio. (2006). XXII CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA. LA FIBRA EN LOS RUMIANTES: ¿QUÍMICA O FÍSICA? (págs. 99-113). Barcelona: FEDNA.

Badui, S. (2006). Química de los Alimentos (Cuarta ed.). Ciudad de Mexico: Pearson.

BAÑEZ SANZ, J Manuel. (s.f.). Curso Química Industrial Alimentaria: Biotecnología. Recuperado el 3 de Abril de 2013, de http://www.eis.uva.es/~jmbsanz/presentaciones/proteina_unicelular.doc

Basogain, X. (12 de 2008). Redes Neuronales Artificiales y sus Aplicaciones. (U. d. Vasco, Editor) Recuperado el 8 de Marzo de 2014, de Redes Neuronales Artificiales y sus Aplicaciones: http://cvb.ehu.es/open_course_ware/castellano/tecnicas/redes_neuro/contenidos/pdf/libro-del-curso.pdf

Becker, J. C. (1996). Biotechnology. A laboratory course. New York: Academic Press.

Beltran, A. Pineda, J. (2010). Valorización de la tusa de maíz para la producción de proteína con *Pleurotus pulmonarius*. Medellín: Trabajo de grado de Ingeniero Químico. Medellín, Universidad Pontificia Bolivariana. Escuela de Ingenierias.

Bhargav, S. Panda, B. Ali, M. Javed, S. (2008). Solid-state fermentation systems-an overview. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 22(1), 49–70. doi:10.1080/07388550590925383

Braaksma, A. Schaap, D. (1996). Protein analysis of the common mushroom *Agaricus bisporus*. Postharvest Biology and Technology, 7, 119-127.

Braaksma, A., & Schaap, D. J. (1996). *Agaricus bisporus*. Postharvest Biology and Technology, (7), 119–127.

Brand, D et al. (2000). Biological detoxificaon of coffe husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. Enzyme and microbial technology, 27(16), 127.

Brand, D., Pandey, A., Roussos, S., & Soccol, C. R. (2000). Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. Enzyme and Microbial Technology, 27(1-2), 127–133.

Brizuela, M. A. (1998). Enriquecimento proteico de resíduos de cosecha cañera por FES con hongos filamentosos. Laborat acta, 10(3), 85-88.

Brodie, E., Edwards, S., & Clipson, N. (2003). Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. FEMS Microbiology Ecology, 45(2), 105–14. doi:10.1016/S0168-6496(03)00126-0

Cabrera Llanos, A. y. (2011). XVI Congreso Internacional de Contaduria, Administracion e Informatica. En UNAM (Ed.), Redes neuronales diferenciales: Una alternativa confiable para analizar series financieras (págs. 1-13). México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Caicedo, E. L. (2009). Generalidades sobre redes neuronales artificiales. En E. L. Caicedo, Una aproximación práctica a las Redes Neuronales Artificiales (págs. 13-36). Cali: Universidad del Valle.

Cardona, M. Sorza, J. Posada, Sandra. Carmona, J. Ayala, S. Alavarez, O. (2002). Establecimiento de una base de datos para la elaboración de tablas de contenido nutricional de alimentos para animales. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 15(2), 240-246.

Cardoso, N. (2005). Improvement of trypanocidal metabolitesvproduction by *Aspergillus fumigatus* using neural networks. Microbiological Research(160), 141-148.

Carrillo, L. (1998). Micología de los Alimentos. Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. Salta: Interamericana de España, McGraw-Hill.

Crueger, W. Crueger, A. (2000). Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Zaragoza, España: Acribia.

Cruz, J. M., Domínguez, J. M., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2000). Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol. Food Biotechnology, 14(1-2), 79–97. doi:10.1080/08905430009549981

Cuervo, L; Folch, J y Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. Revista BioTecnología, 13(3), 11-25.

Czaczyk, K., Trojanowska, K., & Stachowiak, B. (2002). Inhibition of Ergosterol Biosynthesis in Fungal Plant Pathogens by Bacillus sp . Polish Journal of Environmental Studies, 11(5), 593–597.

Chacón, A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular (scp) en la agricultura y la industria. Agronomía mesoamericana, 15(1), 93-106.

Chan, W. L., Fu, M. W., & Lu, J. (2008). An integrated FEM and ANN methodology for metal-formed product design. Engineering Applications of Artificial Intelligence, 21(8), 1170–1181. doi:10.1016/j.engappai.2008.04.001

Chang, S. (1999). World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. China. Int. J. Med. Mush, 1, 291–300.

Chapla, D., Pandit, P., & Shah, A. (2012). Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. Bioresource Technology, 115, 215–21. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.083

Cheng, Y. (2006). Ergosterol to fungal spore concentrations conversion factors: determination and application to ambient aerosols. Engineering program. University of science and technology., 5-7.

Chu, Q., Li, X., Ma, B., Xu, Y., Ouyang, J., Zhu, J., … Yong, Q. (2012). Bioethanol production: an integrated process of low substrate loading hydrolysis-high sugars liquid fermentation and solid state fermentation of enzymatic hydrolysis residue. Bioresource Technology, 123, 699–702. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.118

Darwish, G. a. M. a., Bakr, a. a., & Abdallah, M. M. F. (2012). Nutritional value upgrading of maize stalk by using *Pleurotus ostreatus* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid state fermentation. Annals of Agricultural Sciences, 57(1), 47–51. doi:10.1016/j.aoas.2012.03.005

Dávila, Gustavo. Vásquez, R. (2006). Flore. Mensaje Bioquímico, XXX, 29–55.

De Jager, D., Sheldon, M. S., & Edwards, W. (2009). Modelling growth kinetics of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in a pressurised membrane gradostat reactor (MGR). Enzyme and Microbial Technology, 45(6-7), 449–456. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.08.010

Desai, K. M., Survase, S. a., Saudagar, P. S., Lele, S. S., & Singhal, R. S. (2008). Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: Case study of fermentative production of scleroglucan. Biochemical Engineering Journal, 41(3), 266–273. doi:10.1016/j.bej.2008.05.009

Dhillon, G. S., Kaur, S., & Brar, S. K. (2013). Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 27, 789–805. doi:10.1016/j.rser.2013.06.046

Díaz Cadavid, Abel. (2009). Regresión lineal simple. En A. D. Cadavid, Diseño estadístico de experimentos (págs. 189-214). Medellín: Editorial Universidad de Antioquia.

Díaz, B. H. C., Aparicio, A. J., Chanona-Pérez, J. J., Calderón-Domínguez, G., Alamilla-Beltrán, L., Hernández-Sánchez, H., & Gutiérrez-López, G. F. (2010). Morphological characterization of the growing front of *Rhizopus oligosporus* in solid media. Journal of Food Engineering, 101(3), 309–317. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.06.028

Djajakirana, G. Joergensen, R. Meyer, B. (1996). Ergosterol and microbial biomass relationship in soil. Biology and Fertility of Soils, 22(4), Biology and Fertility of Soils.

Dörge, T., Carstensen, J. M., & Frisvad, J. C. (2000). Direct identification of pure *Penicillium* species using image analysis. Journal of Microbiological Methods, 41(2), 121–33. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10889309

Dormond H; Boschini C; Bourrillón A. (1998). Efecto de los dos niveles de cascara de banano maduro sobre la producción láctea en ganado lechero. Agronomía Costarricense., 22, 43-49.

Duan, Y., Wang, L., & Chen, H. (2012). Digital image analysis and fractal-based kinetic modelling for fungal biomass determination in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 67, 60–67. doi:10.1016/j.bej.2012.04.020

Durand, A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 13(2-3), 113–125. doi:10.1016/S1369-703X(02)00124-9

EKBLAD, ALF. WALLANDER, HAKAN. NA$SHOLM, T. (1998). Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. New Phytologist, (138), 143–149.

Ekblan, A. Kan Wallander, T. Sholm, T. (1997). Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in Ectomycorrhizas. Ecology Building, Sweden., 2-5.

El Hage, R., Chrusciel, L., Desharnais, L., & Brosse, N. (2010). Effect of autohydrolysis of Miscanthus x giganteus on lignin structure and organosolv delignification. Bioresource Technology, 101(23), 9321–9. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.143

Fanaei, M. A., & Vaziri, B. M. (2009). Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 48(1), 446–451. doi:10.1016/j.cep.2008.06.001

FENALCE. (2008). Resumen de sensibilidades características generales por producto. (Fenalce, Ed.) Recuperado el 2 de Agosto de 2009, de http://fenalce.net/archivos/RiesgoFrenteTLC.doc

FENALCE. (2010). El cultivo del maíz, historia e importancia. El Cerealista (93), 10-19.

Fernández, E. Galván, A. (2005). Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. (E. Universidad de Córdoba, Ed.) Recuperado el 27 de Junio de 2009, de 27. Métodos para la cuantificación de proteínas: http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf

Firrao, G., Torelli, E., Gobbi, E., Raranciuc, S., Bianchi, G., & Locci, R. (2010). Prediction of milled maize fumonisin contamination by multispectral image analysis. Journal of Cereal Science, 52(2), 327–330. doi:10.1016/j.jcs.2010.06.017

Fox, J. (Enero de 2002). Nonlinear Regression and Nonlinear Least Squares. Appendix to An R and S-PLUS Companion to Applied Regression. Recuperado el 5 de OCTUBRE de 2012, de http://cran.r-project.org/doc/contrib/Fox-Companion/appendix-nonlinear-regression.pdf

Furtado, N. A. J. C., Duarte, M. C. T., de Albuquerque, S., Mello, C., & Bastos, J. K. (2005). Improvement of trypanocidal metabolites production by *Aspergillus fumigatus* using neural networks. Microbiological Research, 160(2), 141–148. doi:10.1016/j.micres.2004.10.007

Garai, D., & Kumar, V. (2013). A Box–Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. Industrial Crops and Products, 44, 352–363. doi:10.1016/j.indcrop.2012.10.027

Garcia, M. Quinetero, R. Lopez, Agustin. (2002). BIOTECNOLOGIA ALIMENTARIA. Mexico: Limusa.

GEN, D. d. (18 de Junio de 2008). Materia Primas para la Industria de los Concentrados. Entrevisa de Trabajo. Medellín.

Gervais, P., & Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation, 13(July 2002), 85–101.

Gessner, M. O., & Chauvet, E. (1993). Ergosterol-to-Biomass Conversion Factors for Aquatic Hyphomycetes. Applied and Environmental Microbiology, 59(2), 502–7. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=202134&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Ghaffari, a, Abdollahi, H., Khoshayand, M. R., Bozchalooi, I. S., Dadgar, a, & Rafiee-Tehrani, M. (2006). Performance comparison of neural network training algorithms in modeling of bimodal drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, 327(1-2), 126–38. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.07.056

Gomez, G. Carreño, J. Zambrano, J. (2011). Herramienta de software para el pronóstico de demanda horaria de potencia eléctrica en el sistema eléctrico de codesa S. A. ESP. 15(28), 7-22.

Gonzalez, E. (2006). Use of the agroindustrial residuals for the obtaining of products industrial interest. Revista Ambiental. Agua, Aire y Suelo, I(2), 15-26.

Grajek, W. (1988). Production of Protein by Thermophilic Fungi from Sugar-Beet Pulp in Solid-state Fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 32, 255–260.

H. A. Ruíz-Leza, R. M. Rodríguez-Jasso, R. R.-H., & Aguilar, J. C. C.-E. y C. N. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. REVISTA MEXICANA DE INGENIERÍA QUÍMICA, 6(1), 33–40.

Hagan, M. Demunth, H. Beale, M. (1999). Introduction. En M. D. Hagan, Neural Network Design (pág. 730). Colorado: Campus Pub. Service, University of Colorado Bookstore.

Hamidi-Esfahani, Z., Shojaosadati, S. a., & Rinzema, a. (2004). Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on A. niger growth in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 21(3), 265–272. doi:10.1016/j.bej.2004.07.007

Hanai, T., Honda, H., Ohkusu, E., Ohki, T., Tohyama, H., Muramatsu, T., & Kobayashi, T. (1999). Application of an artificial neural network and genetic algorithm for determination of process orbits in the koji making process. Journal of Bioscience and Bioengineering, 87(4), 507–12. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16232506

Hayati, M., & Akhlaghi, B. (2013). An extraction technique for small signal intrinsic parameters of HEMTs based on artificial neural networks. AEU - International Journal of Electronics and Communications, 67(2), 123–129. doi:10.1016/j.aeue.2012.07.012

Haykin, S. (2005). Multilayer Perceptrons. En S. Haykin, Neural Networks. A comprehensive Foundation. (pág. 823). Patparganj: Pearson Prentice Hall.

HERRERA, Teofilo. ULLOA, Miguel. (2004). El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. (Tercera ed.). México: Fondo de cultura economica,.

Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation--are there any biotechnological advantages? Current Opinion in Microbiology, 8(3), 301–6. doi:10.1016/j.mib.2005.04.006

Hölker, U., Höfer, M., & Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 64(2), 175–86. doi:10.1007/s00253-003-1504-3

Hölter, U. y Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation – Are there any biotechnological advantages? Current Opinion in Microbiology, 8, 301-306.

Horiuchi, J.-I. (2002). Fuzzy modeling and control of biological processes. Journal of Bioscience and Bioengineering, 94(6), 574–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233352

Hykin, S. (2005). Multilayer Perceptrons. En S. Hykin, Neural Networks. A comprehensive Foundation (págs. 178-274). Patparganj: Pearson Prentice Hall.

Jenzsch, M., Simutis, R., Lübbert, A. (2006). Optimization and Control of Industrial Microbial Cultivation Processes. Engineering in Life Sciences , 117-124.

Jianlin, W., Tao, Y. U., & Cuiyun, J. I. N. (2006). On-line Estimation of Biomass in Fermentation Process Using Support * Vector Machine. Chinese J. Chem. Eng, 14(3), 383–388.

Karakuzu, C., Türker, M., & Öztürk, S. (2006). Modelling, on-line state estimation and fuzzy control of production scale fed-batch baker's yeast fermentation. Control Engineering Practice, 14(8), 959–974. doi:10.1016/j.conengprac.2005.05.007

Khan, N. W. (2007). Characterization of chemically modified corncobs and its application in the removal of metal ions from aqueous solution. Journal of Hazardous Materials(141), 237-244.

Khaouane, L., Benkortbi, O., & Hanini, S; Si-Moussa, C. (2013). MODELING OF AN INDUSTRIAL PROCESS OF PLEUROMUTILIN FERMENTATION USING

FEED- FORWARD NEURAL NETWORKS. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 30(01), 105–116.

Knežević, A., Milovanović, I., Stajić, M., Lončar, N., Brčeski, I., Vukojević, J., & Cilerdžić, J. (2013). Lignin degradation by selected fungal species. Bioresource Technology, 138, 117–23. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.182

Koutrotsios, G., Mountzouris, K. C., Chatzipavlidis, I., & Zervakis, G. I. (2014). Bioconversion of lignocellulosic residues by Agrocybe cylindracea and *Pleurotus ostreatus* mushroom fungi - Assessment of their effect on the final product and spent substrate properties. Food Chemistry, 161, 127–35. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.121

Kuan, C. Yuen, K. Bhat, R. Liong, M. (2011). Physicochemical characterization of alkali treated fractions from corncob and wheat straw and the production of nanofibres. Food Research International(44), 2822–2829.

Kumaravel Rajakumar, Susan L. Greenspan, Stephen B. Thomas, and Michael F. Holick. (2007). SOLAR Ultraviolet Radiation AND Vitamin D. American Journal of Public Health., 97(10), 1746-1754 .

Lareo, C., Sposito, A. F., Bossio, A. L., & Volpe, D. C. (2006). Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. Enzyme and Microbial Technology, 38(3-4), 391–399. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.06.009

Latham, M. (2002). NUTRICIÓN HUMANA EN EL MUNDO EN DESARROLLO (Vol. 29). Roma: Colección FAO: Alimentación y nutrición.

Length, F. (2010). Conversion of sorghum stover into animal feed with white-rot fungi : *Pleurotus ostreatus* and Pleurotus pulmonarius, 9(11), 1706–1712.

Lisboa, P. J., & Taktak, A. F. G. (2006). The use of artificial neural networks in decision support in cancer: a systematic review. Neural Networks : The Official Journal of the International Neural Network Society, 19(4), 408–15. doi:10.1016/j.neunet.2005.10.007

Liu, K. Lin, X. Yue, J. Li, X. Fang, X. Zhu, M. Lin, J. Qu, Y. Xiao, L. (2010). High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. Bioresource Technology(101), 4952–4958.

Liu, K., Lin, X., Yue, J., Li, X., Fang, X., Zhu, M., … Xiao, L. (2010). High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. Bioresource Technology, 101(13), 4952–4958. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.013

Luley, Christopher. (Abril de 2006). SOCIEDAD INTERNACIONAL DE ARBORICULTURA. (I. Hispania, Ed.) Recuperado el 18 de Junio de 2012, de Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en árboles urbanos: http://www.isahispana.com/treecare/articles/decay-fungi.aspx

Mahanama, R., Berenjian, A., Dehghani, F., & Kavanagh, J. (2012). Modeling the Effect of Bed Height and Particle Size for Vitamin K2 Production in a Static Bed Fermenter. Engineering Letters, 20(February), 1–4.

Maíz y Milpa. (3 de Junio de 2009). EL MAÍZ - LA MILPA. Recuperado el 10 de Marzo de 2010, de http://maiz.librostextos.com/aprovechamiento-de-los-residuos-del-maiz/#more-6>

Mamede, R., Montini, D. C., Raimundo, J., Passos, D. S., & Ferreira, A. (2006). (LENTINULA EDODES (BERK .) PEGLER) ON AGAR MEDIUM. Brazilian Journal of Microbiology, 37, 90–95.

Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S. and Banerjee, U. . (2005). Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. Malalaysian Jounal of Microbiology, 1(2), 1–9.

Mataix, J. (2009). Nutrición Alimentación Humana. Nutrientes y Alimentos (Vol. I). Barcelona, España: Oceano.

Mazutti, M. a, Zabot, G., Boni, G., Skovronski, A., de Oliveira, D., Di Luccio, M., … Treichel, H. (2010). Mathematical modeling of Kluyveromyces marxianus growth in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 37(4), 391–400. doi:10.1007/s10295-009-0685-x

Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., & Loera, O. (2011). Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by Pleurotus ostreatus growing on sugar cane bagasse. Bioresource Technology, 102(2), 1581–1586. doi:10.1016/j.biortech.2010.08.091

Méndez, Getulio. Ríos de los Álvarez, Leyla. Combellas, Josefina. Colmenares, Omar. Álvarez, Ramón. (2004). Uso de tusa de maíz en dietas que contienen gallinaza sobre el comportamiento productivo de ovinos en crecimiento. Zootecnia Tropical, 22, 15-27.

Mitchell, D. a., von Meien, O. F., Krieger, N., & Dalsenter, F. D. H. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 17(1), 15–26. doi:10.1016/S1369-703X(03)00120-7

Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M. (2006). Solid-State Fermentations Bioreactors. Fundamentals of Design and Operation. Germany: Springer.

Mitchell, David et al. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 17, 15–26.

Miura, S., Arimura, T., Itoda, N., Dwiarti, L., Feng, J. I. N., Bin, C. U. I. H., & Okabe, M. (2004). Production of L -Lactic Acid from Corncob, 97(3), 153–157.

Montgomery, H. ., Monreal, C. ., Young, J. ., & Seifert, K. . (2000). Determinination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. Soil Biology and Biochemistry, 32(8-9), 1207–1217. doi:10.1016/S0038-0717(00)00037-7

Montgomery, H. M. (2000). Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v.32, 1207-1217.

Montoya, S. y Restrepo, G. (Enero-Diciembre de 2006). Evaluación de la síntesis de proteína a partir del crecimiento vegetativo de Pleurotus sp. Sobre residuos de algarrobo y uva pasa. Revista Universidad de Caldas, 23-31.

Moreira, G. a., Micheloud, G. a., Beccaria, A. J., & Goicoechea, H. C. (2007). Optimization of the *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* HD-1 δ-endotoxins production by using experimental mixture design and artificial neural networks. Biochemical Engineering Journal, 35(1), 48–55. doi:10.1016/j.bej.2006.12.025

Muylder, E. V. (1989). Incorporation of brewery activated sludge-single cell proteins (BSCP) in diets for *Clarias geriepinus* B. fingerlings. Aquaculture - A BIOTECHNOLOGY IN PROGRESS, 639-644.

Nagata, Y., & Chu, K. H. (2003). Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms. Biotechnology Letters, 25(21), 1837–42. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14677708

Nasiruddin Khan, M., & Farooq Wahab, M. (2007). Characterization of chemically modified corncobs and its application in the removal of metal ions from aqueous solution. Journal of Hazardous Materials, 141(1), 237–244. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.06.119

Newell, SY. Miller, JD. Fallon, RD. (1987). Ergosterol content of saltmarsh fungi: effect of growth conditions and mycelial age. Mycologia, 688-695.

Niemenmaa, O., Galkin, S., & Hatakka, A. (2008). Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. International Biodeterioration & Biodegradation, 62(2), 125–134. doi:10.1016/j.ibiod.2007.12.009

Oei, P. (2003). Mushroom Cultivation appropriate technology for mushroom growers (Tercera ed.). Holanda: Backhuys Publishers.

Okano, K., Fukui, S., Kitao, R., & Usagawa, T. (2007). Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on in vitro digestibility and chemical composition. Animal Feed Science and Technology, 136(3-4), 240–247. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.08.024

Ollero, A., & Merino, L. (2004). Control and perception techniques for aerial robotics. Annual Reviews in Control, 28(2), 167–178. doi:10.1016/j.arcontrol.2004.05.003

Ooijkaas, L. P., Tramper, J., & Buitelaar, R. M. (1998). Biomass Estimation of Coniothyrium Minitans in Solid-State Fermentation. Enzyme and Microbial Technology, 22(6), 480–486. doi:10.1016/S0141-0229(97)00246-9

Orlandoni, G. (1997). Modelos de crecimiento de poblaciones biológicas : Un enfoque de dinámica de sistemas. Economía, XXII(23), 115–146.

Ortega, G. Bueno, G. Betancourt, D. Álvarez, I. González, A. (2005). Biotransformacion de Residuos Lignocelulosicos con Hongos *Pleurotus*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 36.

Ortega, J., Shaker, N., Togelius, J., & Yannakakis, G. N. (2013). Imitating human playing styles in Super Mario Bros. Entertainment Computing, 4(2), 93–104. doi:10.1016/j.entcom.2012.10.001

Ortiz-tovar, M. G., López-miranda, J., Cerrillo-soto, M. A., Juárez-reyes, A., Favela-torres, E., Soto-cruz, N. O., & Ortiz-tovar, G. (2007). Redalyc.Effect of solid substrate fermentation on the nutritional quality of agroindustrial residues.

Orzúa, Carmen; Contreras, Juan; Rodríguez, Raúl; Noe, Cristóbal. (2009). Tratamiento de residuos agroindustriales por fermentación fúngica en medio sólido. Acta Química Mexicana (AQM), 1(1).

Outi Niemenmaa, S. G. (2008). Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. Department of Applied Chemistry and Microbiology. University of Helsinki, 4-6.

Oviedo, Juan et al. (2010). Tusa de Maiz enriquecida con micelio de basidiomicetos (Pleurotus pulmonarius) para alimentación animal. En ACTA (Ed.), 10 Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bogotá.

Oviedo, Juan. Casas, Ana. Ramírez, Margarita. Valencia, Jaime. (2013). 11° Congreso Interamericano de Computación Aplicada a la Industria de Procesos. En P. U. Perú (Ed.), Análisis para la medición de la biomasa en Fermentación en estado sólido empleando redes neuronales y modelo logístico (pág. 10). Lima: CIT.

Padey, A. S. (2008). Current Developments in Solid-state Fermentations. New Delhi: Asiatech Publishers, INC (Springer).

Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. (2008). Current Developments in Solid-state Fermentations. New Delhi: Asiatech Publishers, INC (Springer).

Paliwal, R. Granados, G. Lafitte, H. Violic, A. (2001). EL MAÍZ EN LOS TRÓPICOS: Mejoramiento y producción. (F. P. Series, Editor) Recuperado el 30 de Marzo de 2013, de http://www.fao.org/DOCREP/003/X7650S/X7650S00.HTM

PALIWAL, Ripusudan. GRANADOS, Gonzalo. LAFITTE, Honor. VIOLIC, Alejandro. (2001). FAO. Recuperado el 30 de Marzo de 2013, de EL MAÍZ EN LOS TRÓPICOS: Mejoramiento y producción.: http://www.fao.org/DOCREP/003/X7650S/X7650S00.HTM

Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. Process Biochemistry, 35(10), 1153–1169. doi:10.1016/S0032-9592(00)00152-7

Papagianni, M., & Mattey, M. (2006). Morphological development of Aspergillus niger in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. Microbial Cell Factories, 5, 3. doi:10.1186/1475-2859-5-3

Patiño, E. (2004). Enriquecimiento Proteico de tusa de maíz por fermentación en estado sólido utilizando el *Pleurotus pulmonarius*. Medellín: Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Pontificia Bolivariana.

Peleg, M., Corradini, M. G., & Normand, M. D. (2007). The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. Food Research International, 40(7), 808–818. doi:10.1016/j.foodres.2007.01.012

Perez, L. C. (2006). Principales contaminantes que afectan el cultivo de hongos comestibles en el INIFAT. Agrotecnia de Cuba, 30(1).

Phetteplace, H. Jarosz, M. Uctuck, D. Spolrleder, R. (2003). Animal Sciences - Colorado State University. Recuperado el 18 de Febrero de 2009, de Animal Sciences - Colorado State University: http://ansci.colostate. edu/documents/renut/2000/hp00.htmL.

Prabhakar, A.*, Krishnaiah, K., Janaun, J. and Bono, A. (2005). An overview of Engineering Aspects of Solid State Fermentation. Malaysian Journal of Microbiology, 1(2), 10–16.

Prescott, S. Dunn, C. (1984). Microbiología Industrial. AVI, Press.

Primo, E. (1998). Química de los Alimentos. Síntesis.

Quiñones, J. Lecompte, A. (2007). Modelos exponencial y logístico de la población en el Suroeste de Puerto Rico. Revista de invsetigacion360 °, I(3).

Raghavarao, K. S. M. ., Ranganathan, T. ., & Karanth, N. . (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 13(2-3), 127–135. doi:10.1016/S1369-703X(02)00125-0

Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Biotechnology, 1(2), 174–188. doi:10.2225/vol1-issue3-fulltext-9

Rajakumar, K. T. (2007). Ergosterol. American Journal of Public Health. Vol. 97, No. 10.

Ramos, M; Ricardo, J. (2007). Fermentación en estado sólido (I). Producción de alimento animal. Tecnología Química, XXVII(3), 17-22.

Ratna, V., Kumar, R., Rami, S., Donthireddy, R., Nikku, Y., & Garapati, H. R. (2009). Optimization of medium constituents for Cephalosporin C production using response surface methodology and artificial neural networks, 1, 69–74.

Rezende, M. I., Barbosa, A. D. M., Flora, A., Vasconcelos, D., & Endo, A. S. (2002). XYLANASE PRODUCTION BY TRICHODERMA HARZIANUM RIFAI BY SOLID STATE FERMENTATION ON SUGARCANE BAGASSE, 67–72.

Ribeiro, Ricardo. (2004). ERGOSTEROL PARA A DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA DOS FUNGOS *Lentinus crinitus Berk. e Psilocybe castanella Peck*. EM BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS. Sao Paulo, Brasil: Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,Instituto de Biociências de Rio Claro.

Robinson, T., & Nigam, P. (2003). Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 13(2-3), 197–203. doi:10.1016/S1369-703X(02)00132-8

Robinson, T., Chandran, B., & Nigam, P. (2002). Removal of dyes from an artificial textile dye effluent by two agricultural waste residues, corncob and barley husk. Environment International, 28(1-2), 29–33. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12046951

Rodríguez Couto, S., & Sanromán, M. a. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. Biochemical Engineering Journal, 22(3), 211–219. doi:10.1016/j.bej.2004.09.013

Rodriguez, Claudia; Hernández, Ricardo; Suárez, Christian; Borrero, Marta. (2008). Evaluación de crecimiento y producción del Pleurotus ostreatus sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. Universitas Scientiarum, 13(2), 128 – 137.

Rodríguez, N. V. y Jaramillo, C. L.Cultivo de Hongos comestibles del genero Pleurotus sobre residuos agrícolas de la zona cafetera. Boletín técnico No.27/ 2005. ISSN 0120-047X (2005).

Rodriguez, S. Sanroman, M. (Octubre de 2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. Journal of Food Engineering, 76(3), 291–302.

Roise, et al. (January de 2004). Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. Bioresource Technology, 91(1), 85–91.

Romero, O. H. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. Revista Colombiana de Biotecnología, XI(2), 143-151.

Roussos, S. Raimbault, M. Prebois, JP. Lonsane, BK. (1993). Zymotis, A Large Scale Solid State Fermenter. The Humana Press Inc., 38-51.

Sampoux, J.-P., Baudouin, P., Bayle, B., Béguier, V., Bourdon, P., Chosson, J.-F., … Viguié, A. (2011). Breeding perennial grasses for forage usage: An experimental assessment of trait changes in diploid perennial ryegrass (*Lolium perenne L*.) cultivars released in the last four decades. Field Crops Research, 123(2), 117–129. doi:10.1016/j.fcr.2011.05.007

Sánchez, José. Royse, Daniel. (2001). Capítulo III. Crecimiento y fructificación. En J. R. Sánchez, La biología y el cultivo de *Pleurotus spp* (págs. 49-66). San Cristóbal de las Casas, Chiapas: UTEHA, NORIEGA EDITORES.

Sarikaya, A., & Ladisch, M. R. (1997). An Unstructured Mathematical Model for Growth of *Pleurotus ostreatus* on Lignocellulosic Material in Solid-State Fermentation Systems, 62.

Scragg, A. (2004). BIOTECNOLOGÍA PARA INGENIEROS: Sistemas Biológicos en procesos tecnológicos. México: Limusa.

Schmidt, C. G., & Furlong, E. B. (2012). Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. Bioresource Technology, 123, 36–41. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.081

Shingania, R et al. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 44, 13–18.

Shojaosadati, S. a., Faraidouni, R., Madadi-Nouei, a., & Mohamadpour, I. (1999). Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila*. Resources, Conservation and Recycling, 27(1-2), 73–87. doi:10.1016/S0921-3449(98)00086-X

Shu, J., Zhang, Z., Gonzalez, I., & Karoumi, R. (2013). The application of a damage detection method using Artificial Neural Network and train-induced vibrations on a simplified railway bridge model. Engineering Structures, 52, 408–421. doi:10.1016/j.engstruct.2013.02.031

Silverio, H. Flauzio, W. Olveira, N. Pasquini, D. (2013). Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites. Industrial Crops and Products(44), 427– 436.

Singh, A., Tatewar, D., Shastri, P. N., & Pandharipande, S. L. (2008). Application of ANN for prediction of cellulase and xylanase production by *Trichoderma reesei* under SSF condition, 15(January), 53–58.

Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 44(1), 13–18. doi:10.1016/j.bej.2008.10.019

Smits, J. P., Tramper, A. R. J., Sonsbeek, H. M. Van, & Hage, J. C. (1998). The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology, 0229(97), 50–57.

Stamets, P. Chilton, J. (1983). The mushroom cultivation. A practical guide to Growing mushrooms at home. Agarikon Press.

Strapasson, R. A. (2003). OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO BIOPROCESSO DE ÁCIDO FUMÁRICO A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS ,.

SUDHAKAR.P;, & Nagarajan, P. (2010). Production of Chitinase by Solid State Fermentation from Rice Bran. International Journal of Environmental Science and Development, 1(5), 435–440. doi:10.7763/IJESD.2010.V1.84

Suharto, I. Redyowati, S. (1999). United Nations University website. Recuperado el 12 de Abril de 2009, de Mini-fermentation technology to produce single-cell protein from molasses: http://archive.unu.edu/unupress/food/UNU06/cap_8.htm

Sun, Y. Webley, P. (2010). Preparation of activated carbons from corncob with large specific surface area by a variety of chemical activators and their application in gas storage. Chemical Engineering Journal(162), 883–892.

Sun, Y., & Webley, P. a. (2010). Preparation of activated carbons from corncob with large specific surface area by a variety of chemical activators and their application in gas storage. Chemical Engineering Journal, 162(3), 883–892. doi:10.1016/j.cej.2010.06.031

Tacon, A. (1989). FAO. Recuperado el 20 de Enero de 2014, de Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación: http://www.fao.org/docrep/field/003/ab492s/AB492S09.htm

TAPPI. (16 de Junio de 2006). Technical Association of the Pulp and Paper Industry. Acid-insoluble lignin in Wood and pulp (reaffirmation of T 222 om-06). TAPPI.

Téllez-Téllez, M., Fernández, F. J., Montiel-González, a M., Sánchez, C., & Díaz-Godínez, G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 81(4), 675–9. doi:10.1007/s00253-008-1628-6

Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 81, 146–161. doi:10.1016/j.bej.2013.10.013

Uraikul, V., Chan, C. W., & Tontiwachwuthikul, P. (2007). Artificial intelligence for monitoring and supervisory control of process systems. Engineering Applications of Artificial Intelligence, 20(2), 115–131. doi:10.1016/j.engappai.2006.07.002

Vats, S., & Negi, S. (2013). Use of artificial neural network (ANN) for the development of bioprocess using Pinus roxburghii fallen foliages for the release of polyphenols and reducing sugars. Bioresource Technology, 140, 392–8. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.106

Velmurugan, P., Hur, H., Balachandar, V., Kamala-Kannan, S., Lee, K.-J., Lee, S.-M., … Oh, B.-T. (2011). Monascus pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. Journal of Bioscience and Bioengineering, 112(6), 590–4. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.08.009

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

Viccini, G., Mitchell, D. A., Boit, S. D., Gern, J. C., Rosa, A. S., Costa, R. M., & Dalsenter, F. D. H. (2001). Analysis of Growth Kinetic Profiles in Solid-State Fermentation, 39(40), 1–23.

Villas-Bôas, S. G., Esposito, E., & Mitchell, D. A. (2002). Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. Animal Feed Science and Technology, 98(1-2), 1–12. doi:10.1016/S0377-8401(02)00017-2

Wan, C., & Li, Y. (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. Biotechnology Advances, 30(6), 1447–57. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.03.003

Wijekoon, C. P., Goodwin, P. H., & Hsiang, T. (2008). Quantifying fungal infection of plant leaves by digital image analysis using Scion Image software. Journal of Microbiological Methods, 74(2-3), 94–101. doi:10.1016/j.mimet.2008.03.008

Williams, K. M., Arthur, S. J., Burrell, G., Kelly, F., Phillips, D. W., & Marshall, T. (2003). An evaluation of protein assays for quantitative determination of drugs. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 57(1), 45–55. doi:10.1016/S0165-022X(03)00082-4

Xue, M., Liu, D., Zhang, H., Qi, H., & Lei, Z. (1992). A pilot process of solid state fermentation from sugar beet pulp for the production of microbial protein. Journal of Fermentation and Bioengineering, 73(3), 203–205. doi:10.1016/0922-338X(92)90161-M

Zhang, Y., Xu, J.-L., Yuan, Z.-H., Qi, W., Liu, Y.-Y., & He, M.-C. (2012). Artificial Intelligence Techniques to Optimize the EDC/NHS-Mediated Immobilization of Cellulase on Eudragit L-100. International Journal of Molecular Sciences, 13(7), 7952–62. doi:10.3390/ijms13077952

Zhang, Zhicai. Li Jiashao. Feng, Fan. Liu, Dan. Pang, Qiaoxia. Li, Ming. Chen, K. (2013). Optimization of Nutrition Constituents for Xylanase Activity by Rhizopus stolonifer Under Solid-State Fermentation on Corncob. Bioresource, 8(2), 2018–2032.

Ziglio, B. Mazile, J. Branco, I. Bastos, R. Rigo, M. (2007). ELABORAÇÃO DE PÃES COM ADIÇÃO DE FARINHA DE SABUGO DE MILHO. REVISTA CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS, 9(1), 116-128.

Ziglio, Beatriz. Mazile, Jose. Branco, I. Bastos, R. Rigo, M. (2007). Elaboração de Pães com Adição de Farinha de Sabugo de Milho Bread-making with corncob flower. REVISTA CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS, 9(1), 115–128.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology, 56(6), 1875–81. Retrieved from

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184525&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Zych, D. (Agosto de 2008). The viability of corn cobs as a bioenergy feedstock. Recuperado el 11 de Octubre de 2011, de The viability of corn cobs as a bioenergy feedstock.: http://renewables.morris.umn.edu/biomass/documents/Zych-TheViabilityOfCornCobsAsABioenergyFeedstock.pdf

ANEXO A. Método de medición modificado de lignina Klason

Para la medición de la lignina Klason fue necesario hacer una extracción de sólidos solubles en medio acuoso y medio orgánico. Este método se realizó de acuerdo a la norma Tappi 222 modificada para las condiciones del laboratorio del Grupo de investigación CIBIOT de la Universidad Pontificia Bolivariana (TAPPI, 2006).

La medición del contenido de lignina se realizó para dos tipos de muestra, una para la tusa de maíz sin ser inoculada y la otra posterior a la FES salida del fermentador tipo columna. Inicialmente se tomó la tusa de maíz sin ser inoculada y se secó en un horno de convección forzada a 105 °C por 24 horas, hasta llegar a peso constante. Con la tusa de maíz ya seca, se llevó al digestor tipo Randall en el cual se realizaron 3 réplicas; se pesó 1 g de muestra por cada réplica y se envolvieron en sobres cada uno, atados con un hilo. Para la extracción de acuosos, en cada uno de los recipientes del Randall se midieron 100 mL de agua destilada. Este procedimiento se llevó a cabo en 3 etapas, calentamiento, inmersión y lavado, por 3 horas y 15 minutos. La primera etapa tuvo una duración de 15 minutos hasta que el equipo alcanzó una temperatura de 205 °C, la segunda etapa duró 30 minutos a 205 °C y la tercera etapa duró 150 minutos a 205 °C. Terminada la extracción se tomaron los sobres que contenían las muestras y se secaron en un horno de convección forzada a 60 °C por 24 horas hasta llegar a peso constante.

Para la extracción de sólidos solubles orgánicos, se realizó el mismo procedimiento de la extracción de los acuosos, en este caso se parte de la muestra a la que se le había realizado la extracción de sólidos solubles acuosos. En este procedimiento se utilizaron etanol y tolueno en relación 1:3, luego se mezclaron hasta obtener una solución homogénea. Al igual que con los acuosos se realizaron 3 réplicas y se programó el Randall para extracción de orgánicos por 3 horas y 35 minutos. La extracción con medio orgánico consta de cuatro etapas calentamiento, inmersión, lavado y recuperación, las primeras tres etapas se realizaron de la misma manera que en medio acuoso y la cuarta etapa duró 20 minutos y se recuperaron los solventes orgánicos en un rotoevaporador.

Las muestras se secaron a 60 °C por 24 horas hasta llegar a peso contaste. Los extraíbles acuosos y orgánicos se analizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 210nm.

Terminado el paso anterior, la muestra se lleva a la cuantificación de la lignina por el método Klason. Inicialmente se pesan aproximadamente 0.8 g de muestra libre de sólidos solubles. Se utilizó 1 mL ácido sulfúrico al 72% de concentración, para hacerle una digestión ácida a la muestra. Esta digestión ácida consistió en

someter la muestra en contacto con el ácido en agitación constante por un periodo de 2 horas en un tubo de réplica. Después de la digestión, se adicionó a la muestra agua destilada en un volumen de 250 a 300 mL. Se transfirió la muestra a un Erlenmeyer de 300mL y se llevó a una autoclave a 121 ° C y 15 psi por 1 hora.

Luego de terminar el procedimiento en el autoclave, la solución en el Erlenmeyer, se dejó enfriar, se filtró en papeles de filtro de 125 mm de diámetro previamente llevados a peso constante y se lavó con abundante agua para retirar el ácido en su totalidad. El papel filtro que contenía la lignina, se secó en un horno de convección forzada a 60 °C por 24 horas hasta llegar a peso constante, luego se llevó a un crisol, de peso conocido y posteriormente a una mufla para calcinar la muestra, con el fin de obtener el peso de las cenizas de la muestra, que permita determinar el contenido de lignina Klason, medido de acuerdo a la ecuación 5:

Porcentaje Lignina Klason

$$\%\, Lignina\ Klason = A * \frac{100}{W}$$

Dónde:

- A: Peso de la lignina, g
- W: Peso seco de la muestra, g

El filtrado del ácido se analizó en un espectrofotómetro UV-Vis marca Shimadzu, a una longitud de onda de 210nm, con el fin de medir el contenido de lignina soluble que pudiera haberse desprendido, calculando la concentración de la solución para luego multiplicarla por el volumen total de la solución contenido en el erlenmeyer, utilizando la ecuación 6:

Medición de la absorbancia

$$c = \frac{Abs}{\varepsilon * b}$$

Dónde:

- c: Concentración de la muestra, g/L
- Abs: Absorbancia medición
- ε: Coeficiente de absorción para lignina, L/g*cm
- b: longitud de paso de luz, cm

El contenido de lignina total se determinó como la suma de lignina soluble más la lignina Klason. La anterior ecuación permitió calcular el contenido de lignina soluble, ésta sumada con la lignina Klason permite calcular el contenido de lignina total. Cuando se logró la invasión de todo el sustrato en el fermentador de

columna, cuantificó la lignina total a la muestra, empleando el procedimiento descrito anteriormente.

ANEXO B. Algoritmo para la medición del índice de blanco (IB)

```
%Captura de datos de color pixel
% Proceso imagen  #
% grupo #
%

archis ={'IMG_0241.jpg'};

u =length(archis)

for d =1:u
    arch = archis{d}
    A=imread(arch);
    imshow(A)
    text(20, 2500, arch, 'color',[1 1 1])

    tt = size(A)
    fila = tt(1)
    colm = tt(2)

    xlabel(['columnas: ',num2str(colm)])
    ylabel(['filas: ',num2str(fila)])

    mc = zeros(1,3);
    title('seleccione puntos en area de hongo')
    qq= 150   %numero de puntos a seleccionar
    for n = 1:qq

        b = ginput(1);
        line(b(1),b(2),'Marker','o','color','k')

        b = round(b);
        p = reshape(A(b(2),b(1),:),1,3);
        mc(n,:)=double(p);
        disp('punto numero')
        n

        s=['posicion',num2str(b),' valor RGB: ',num2str(p)];

        title(s)
    end

    text(20,40,[num2str(n),' puntos muestra'],'color',[1 1 1])
    pause
    indiceW = mean(mean(mc))/255
    title(['Indice de Blanco: ',num2str(indiceW)])
    pause
    input('Recuerde salvar la grafica')
    close
```

```
    clear A
end

disp('Fin de proceso')
```

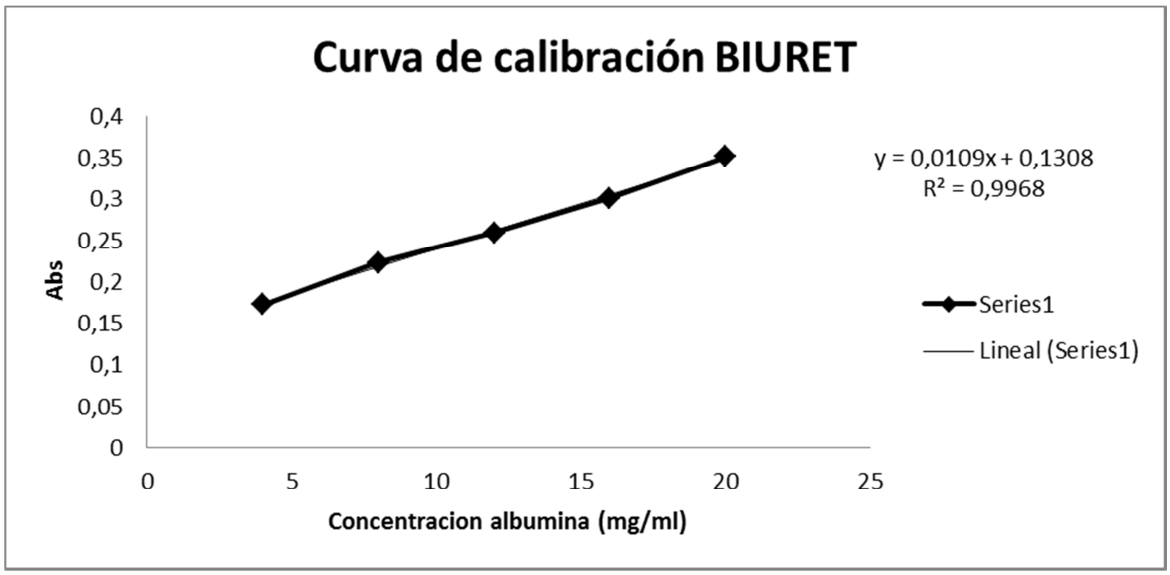
ANEXO C. Curva de calibración de proteína por el método de Biuret

Tabla. Cuantificación de proteínas por el método de Biuret

Tubos	Estándar (20 mg/mL) (mL)	H_2O (mL)	R. Biuret (mL)
Blanco	0	1	10
1	0.25	0.75	10
2	0.5	0.5	10
3	0.75	0.25	10
4	1	0	10
Para las Muestras	1	0	10

Fuente: (Fernández, E. Galván, A., 2005)

Se mezcló bien y se dejó en reposo por 30 min a temperatura ambiente para el desarrollo del color; luego se leyó la absorbancia a 545 nm el blanco para ajustar el 100% de transmitancia o el 0.0 de absorbancia.



ANEXO D. Ejemplo curva de calibración en HPLC

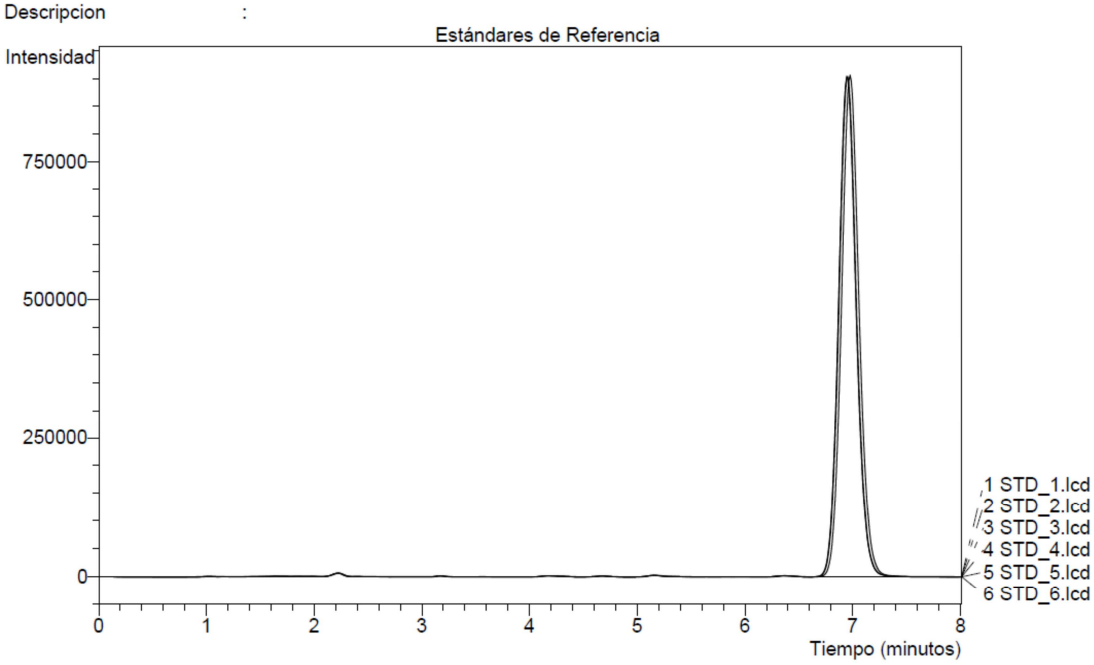
Universidad Pontificia Bolivariana

CENTRO DE INVESTIGACION EN BIOTECNOLOGIA CIBIOT

Resultados Cromatograficos

Nombre de la muestra : STD_1
Tipo de muestra : Standard
Fecha de analisis : 2/8/2011 1:59:46 PM
Fecha de procesado : 2/8/2011 2:46:04 PM
Datos : STD_1.lcd
Metodo : Ergosterol.lcm
Secuencia : Secuencia 2011-01-17 Celulosa.lcb
Cantidad de muestra : 1
Factor de dilucion : 1
Volumen de inyeccion : 10 uL

Descripcion :



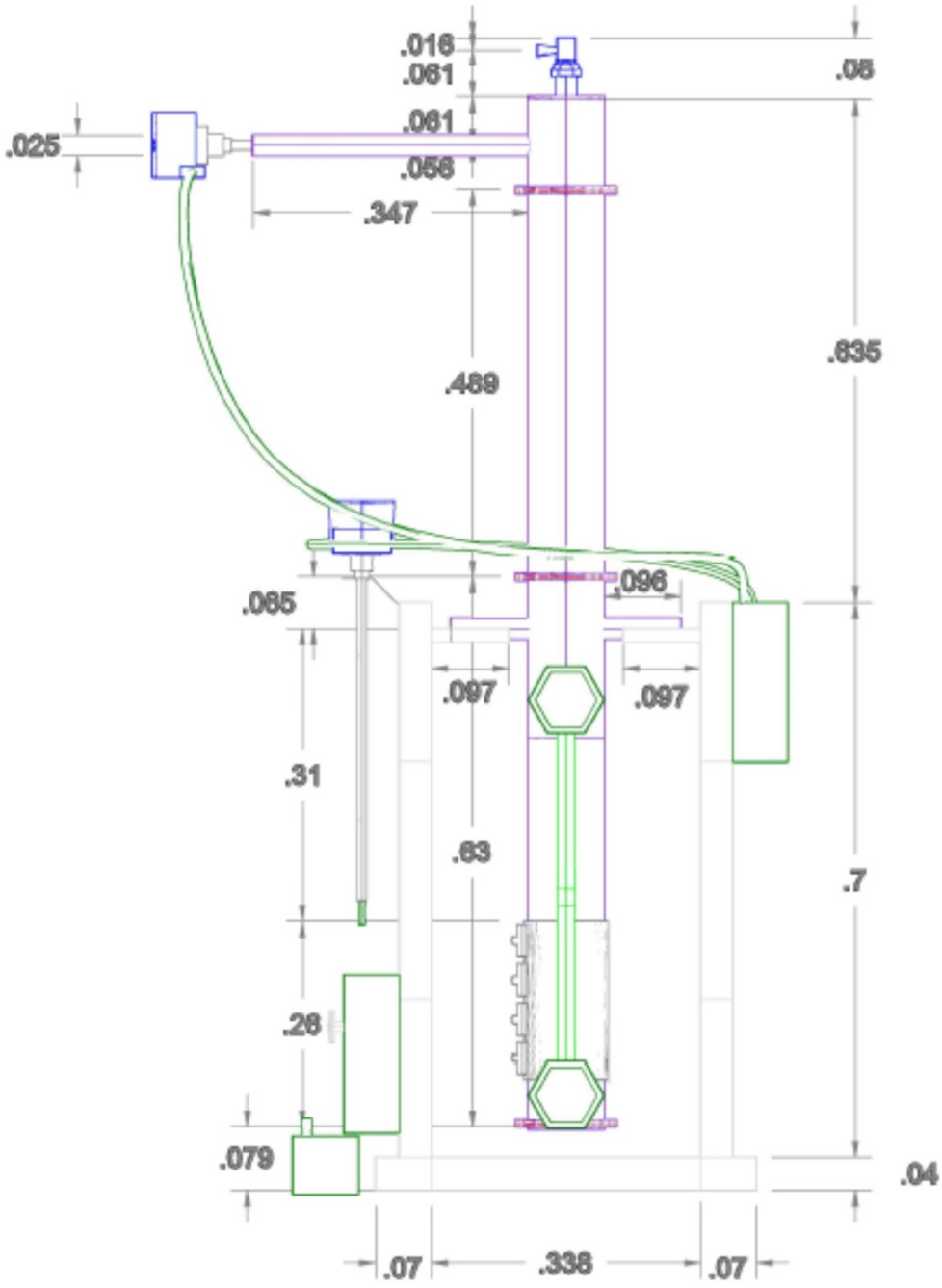
ANEXO E. Algoritmo de medición de las áreas del micelio en cajas de Petri.

```
% Medición del área del hongo en la caja de Petri,
% teniendo en cuenta HUECOS DE HONGO
% Se restan las áreas sin hongo
% ensayo usando Método de Moler
%

%====Imagen ================
file='IMG_0241.jpg'
A=imread(file);
image(A)%CAMBIA POR IMSHOW
text(20, 2500, file, 'color',[1 1 1])

tt = size(A);%2592        3888
fila = tt(1);
colm = tt(2);
xlabel(['Horizontal: ',num2str(colm)])
ylabel(['Vertical: ',num2str(fila)])


d1=10;% factor de escala
      % diametro real en cms
      % de la probeta
title('Ingresar 2 puntos para escala HORIZONTAL')
D=ginput(2)%
line(D(:,1),D(:,2),'color','r','Marker','o')

d2x=norm(D(1,:)-D(2,:))%
fex=d1/d2x% factor de escala horizontal en cm/pixel

title('Ingresar 2 puntos para escala VERTICAL')
D=ginput(2)
line(D(:,1),D(:,2),'color','r','Marker','o')

d2y=norm(D(1,:)-D(2,:))%
fey=d1/d2y%factor de escala vertical en cm/pixel

s =['Factores de escala: ','fex: ',num2str(fex),' fey: ',num2str(fey)]
title(s)

disp('Enter para iniciar ')
disp('captura de punto poligono exterior')
pause()


% obtencion de poligono de
p=ginput
o1 = line([p(:,1);p(1,1)],[p(:,2);p(1,2)],'color','y')
x=[p(:,1);p(1,1)];
```

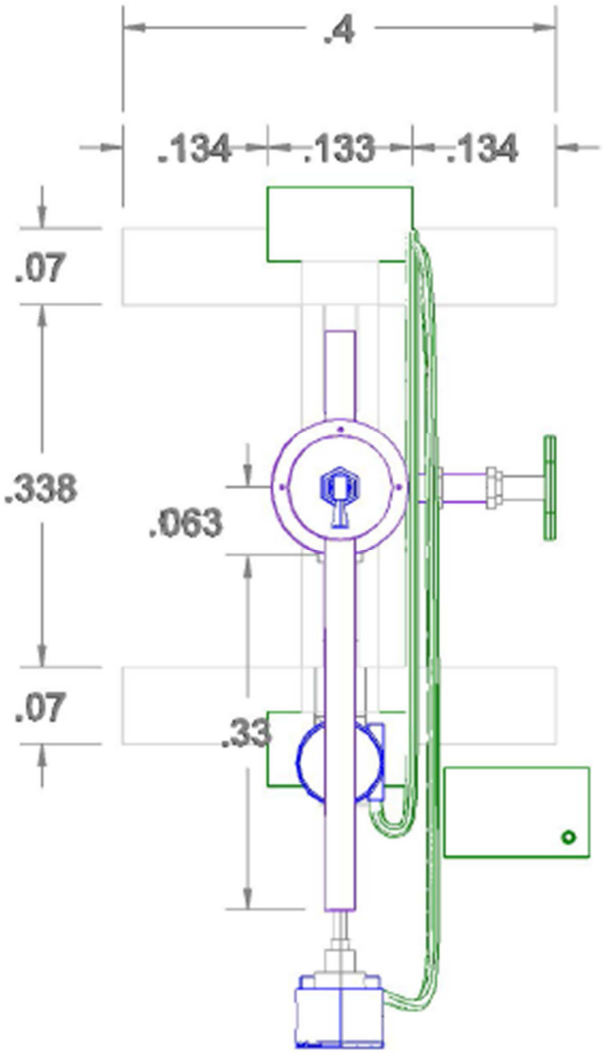
```
y=[p(:,2);p(1,2)];

% formula Moler pag 19 chap quad
% area poligon
n=length(x)%
area1=(x'*y([2:n 1]) - x([2:n 1])'*y)/2;
text(20,40,[num2str(n),' puntos polig'],'color',[1 1 1])

% 4.4486e+004 en pixeles
aa1=area1*(fex*fey)%
text(20,100,['Area(cm2): ',num2str(aa1)],'color',[1 1 1])

Nh = input('Cuanto huecos existen? ')
contador = 1
yt = 100
while contador <= Nh
    p=ginput
    line([p(:,1);p(1,1)],[p(:,2);p(1,2)],'color',rand(1,3))
    x=[p(:,1);p(1,1)];
    y=[p(:,2);p(1,2)];
    n=length(x)%
    area=(x'*y([2:n 1]) - x([2:n 1])'*y)/2;
    yt=yt + contador*60;
    text(20,yt,[num2str(n),' puntos hueco',num2str(contador)],'color',[1
1 1])
    aa=area*(fex*fey)%
    text(20,yt+60,['Area(cm2): ',num2str(aa)],'color',[1 1 1])
    AA(contador)=aa;
    contador = contador+1;
end
AA
Atotal = aa1 - sum(AA)
text(20,yt+120,['Area total(cm2): ',num2str(Atotal)],'color',[1 1 1])

input('Salvar figura antes de seguir ')
close all
clear all
clc
```

ANEXO F. Acotado del FSC (cm)

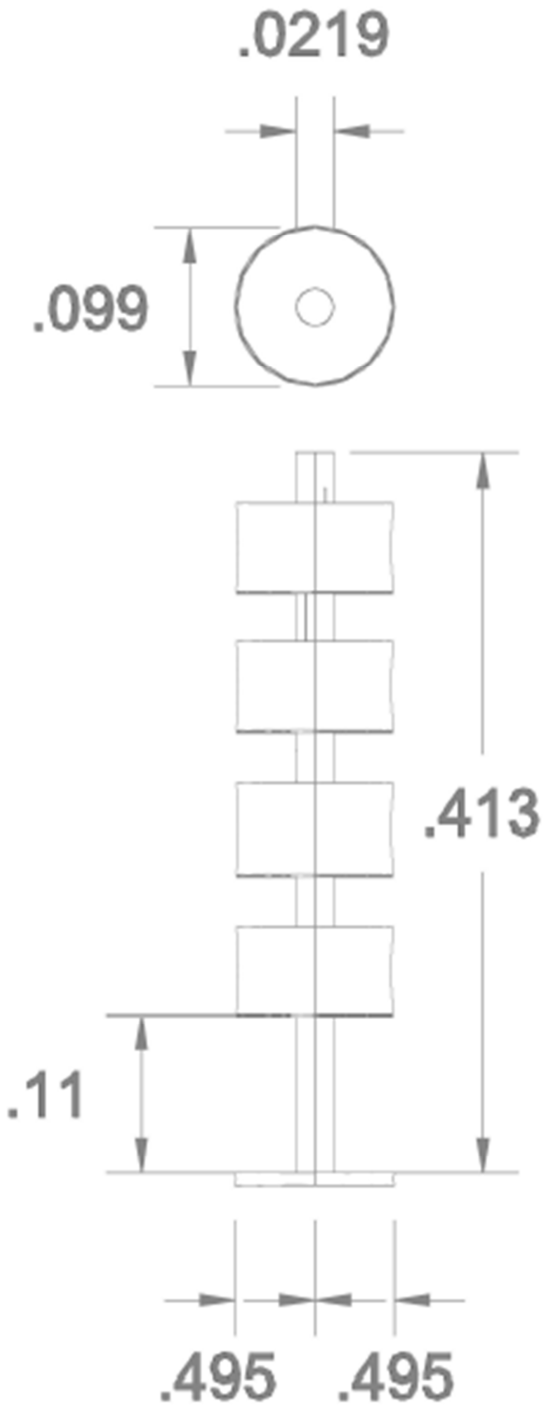
Vista Frontal



Vista superior

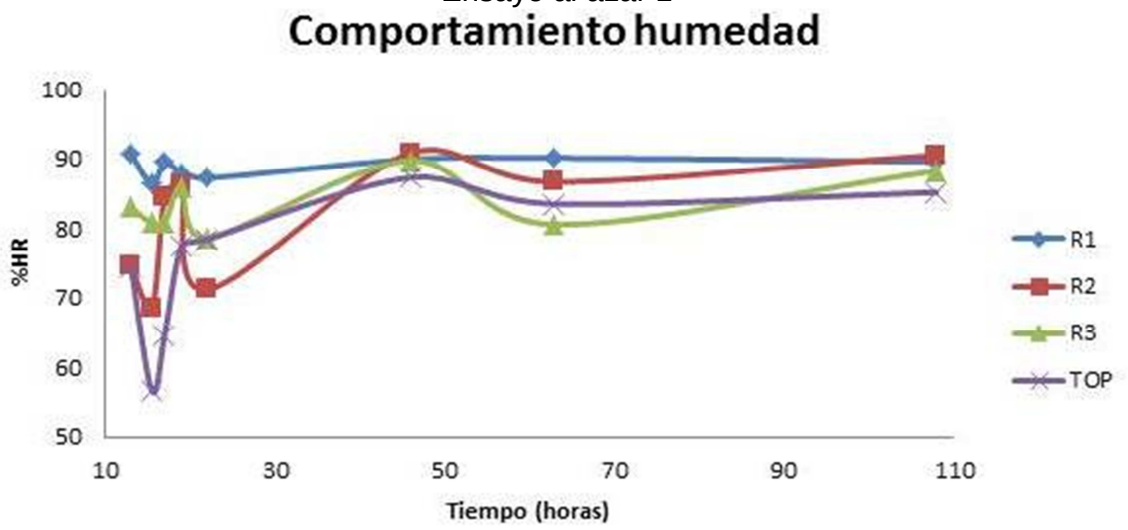


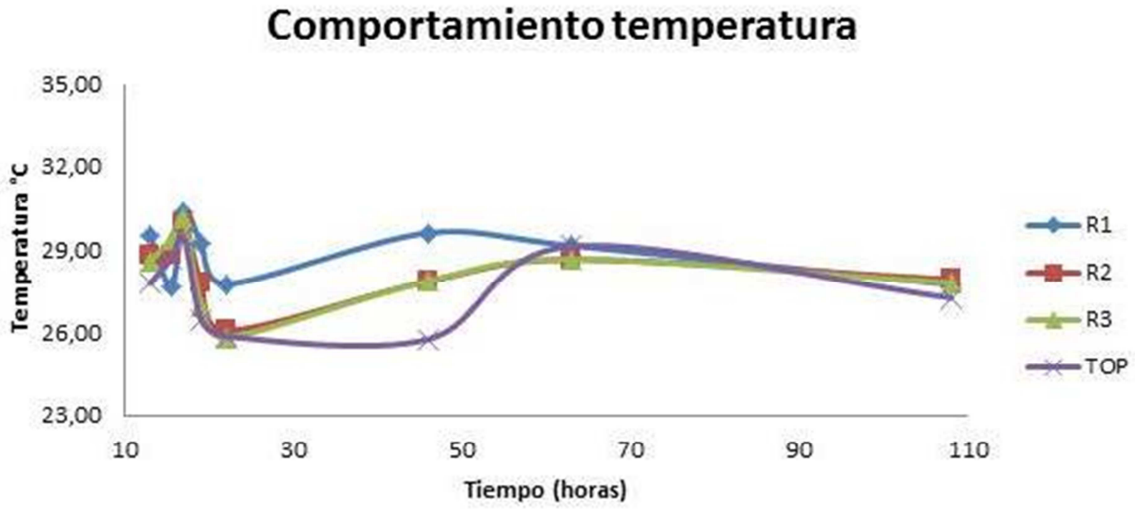
Distribuidor de humedad y canastas



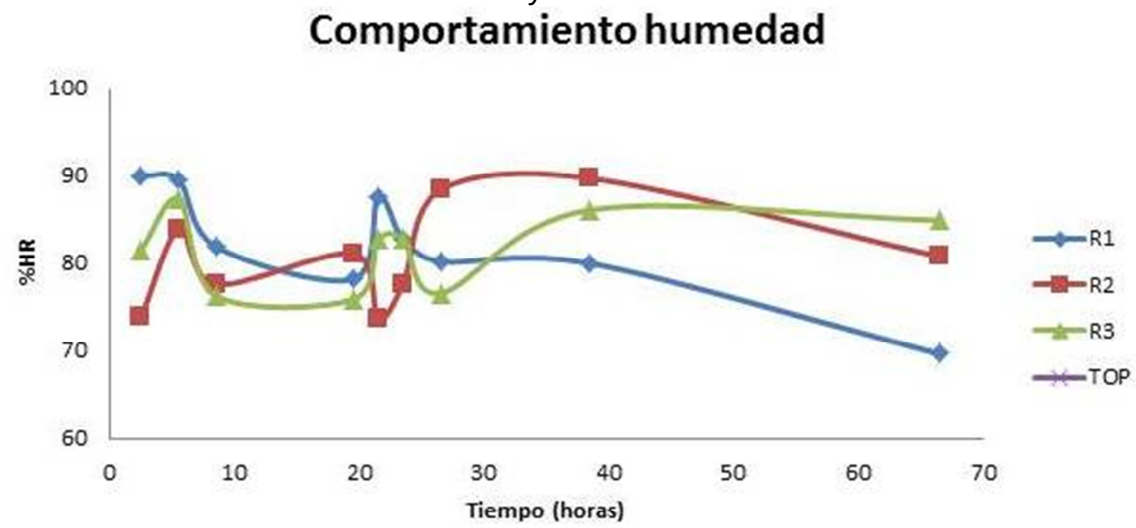
ANEXO G. Comportamiento de la humedad y la temperatura para dos ensayos al azar en el interior del FSC

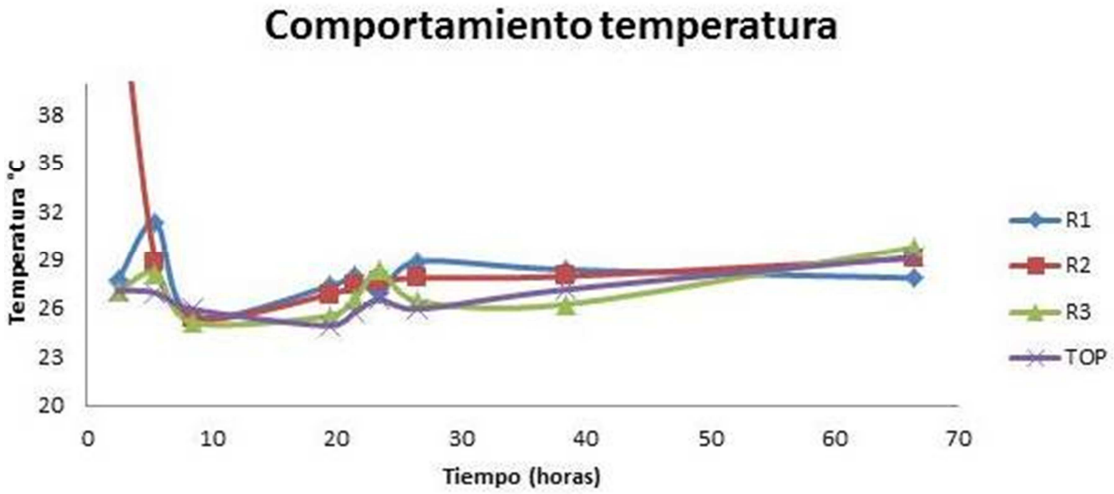
Ensayo al azar 1





Ensayo al azar 2





8. BIBLIOGRAFIA

Acevedo, F. Genitina, J. Illanes, A. (2002). Fundamentos de ingeniería bioquímica. Valparaiso: Ediciones universitarias de Valparaiso de la Universidad Católica de Valparaiso.

Acuña, G., Ramirez, C., & Curilem, M. (2014). Software sensors for biomass concentration in a SSC process using artificial neural networks and support vector machine. Bioprocess and Biosystems Engineering, 37(1), 27–36. doi:10.1007/s00449-013-0925-3

Ali, H. K. Q., & Zulkali, M. M. D. (2011). Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation : A Review. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 25(2), 255–266.

Alvarez, M. Larrea, P. Paredes, M. (2010). Fermentación sólida del banano de rechazo utilizando Aspergillus niger para alimento animal. Ambato: Universidad Técnica.

Annadurai, G., & Lee, J.-F. (2007). Application of artificial neural network model for the development of optimized complex medium for phenol degradation using Pseudomonas pictorum (NICM 2074). Biodegradation, 18(3), 383–92. doi:10.1007/s10532-006-9072-8

AOAC. (1997). ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICA CHEMISTS,. I - II, 16. Virginia, Arlington, Estados Uniddos.

Araiza, E. Delgado, E. Carrete, F. Medrano, H. Solís, A. Murillo, M.Murillo, M. Haubi, C. (2013). Degradabilidad ruminal in situ y digestibilidad in vitro de diferentes formulaciones de ensilados de maíz-manzana adicionados con melaza. Avances en Investigación Agropecuaria, 17(2), 76-96.

Arango, C. (2009). DEFINICIÓN, DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA PROPUESTA METODOLÓGICA PARA DETERMINAR EL MODELO DE INVENTARIOS PARA PRODUCTOS TERMINADOS EN LAS EMPRESAS QUE FABRICAN ELEMENTOS DE FIJACIÓN EN COLOMBIA. Medellín: Escuela de Ingeniería de la organización, Facutlad de Minas. Trabajo presentado para optar al título de Magíster en Ingeniería Administrativa.

Aufrere, J. (1978). Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. Annales De Zootechnie, 31(2), 111–130.

Bach, A. Calsamiglia, S. (2006). XXII CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA. LA FIBRA EN LOS RUMIANTES: ¿QUÍMICA O FÍSICA? (págs. 99-113). Barcelona: FEDNA.

Badui, S. (2006). Química de los Alimentos (Cuarta ed.). Ciudad de Mexico: Pearson.

Bañez, J. (2010). Curso Química Industrial Alimentaria: Biotecnología. Recuperado el 3 de Abril de 2013, de http://www.eis.uva.es/~jmbsanz/presentaciones/proteina_unicelular.doc

Basogain, X. (12 de 2008). Redes Neuronales Artificiales y sus Aplicaciones. (U. d. Vasco, Editor) Recuperado el 8 de Marzo de 2014, de Redes Neuronales Artificiales y sus Aplicaciones: http://cvb.ehu.es/open_course_ware/castellano/tecnicas/redes_neuro/contenidos/pdf/libro-del-curso.pdf

Becker, J. C. (1996). Biotechnology. A laboratory course. New York: Academic Press.

Beltran, A. Pineda, J. (2010). Valorización de la tusa de maíz para la producción de proteína con Pleurotus pulmonarius. Medellín: Trabajo de grado de Ingeniero Químico. Medellín, Universidad Pontificia Bolivariana. Escuela de Ingenierias.

Bhargav, S. Panda, B. Ali, M. Javed, S. (2008). Solid-state fermentation systems-an overview. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 22(1), 49–70. doi:10.1080/07388550590925383

Braaksma, A. Schaap, D. (1996). Protein analysis of the common mushroom Agaricus bisporus. Postharvest Biology and Technology, 7, 119-127.

Braaksma, A., & Schaap, D. J. (1996). Agaricus bisporus. Postharvest Biology and Technology, (7), 119–127.

Brand, D et al. (2000). Biological detoxificaon of coffe husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. Enzyme and microbial technology, 27(16), 127.

Brizuela, M. A. (1998). Enriquecimiento proteico de residuos de cosecha cañera por FES con hongos filamentosos. Laborat acta, 10(3), 85-88.

Brodie, E., Edwards, S., & Clipson, N. (2003). Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. FEMS Microbiology Ecology, 45(2), 105–14. doi:10.1016/S0168-6496(03)00126-0

Cabrera Llanos, A. y. (2011). XVI Congreso Internacional de Contaduria, Administracion e Informatica. En UNAM (Ed.), Redes neuronales diferenciales: Una alternativa confiable para analizar series financieras (págs. 1-13). Méxio: Universida Nacional Autónoma de México.

Caicedo, E. L. (2009). Generalidades sobre redes neuronales artificiales. En E. L. Caicedo, Una aproximación práctica a las Redes Neuronales Artificiales (págs. 13-36). Cali: Universidad del Valle.

Cardona, M. Sorza, J. Posada, Sandra. Carmona, J. Ayala, S. Alavarez, O. (2002). Establecimiento de una base de datos para la elaboración de tablas de contenido nutricional de alimentos para animales. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 15(2), 240-246.

Cardoso, N. (2005). Improvement of trypanocidal metabolitesvproduction by Aspergillus fumigatus using neural networks. Microbiological Research(160), 141-148.

Carrillo, L. (1998). Micología de los Alimentos. Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. Salta: Interamericana de España, McGraw-Hill.

Chacón, A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular (scp) en la agricultura y la industria. Agronomía mesoamericana, 15(1), 93-106.

Chan, W. L., Fu, M. W., & Lu, J. (2008). An integrated FEM and ANN methodology for metal-formed product design. Engineering Applications of Artificial Intelligence, 21(8), 1170–1181. doi:10.1016/j.engappai.2008.04.001

Chang, S. (1999). World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on Lentinus edodes (Berk.) Sing. China. Int. J. Med. Mush, 1, 291–300.

Chapla, D., Pandit, P., & Shah, A. (2012). Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. Bioresource Technology, 115, 215–21. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.083

Cheng, Y. (2006). Ergosterol to fungal spore concentrations conversion factors: determination and application to ambient aerosols. Engineering program. University of science and technology., 5-7.

Chu, Q., Li, X., Ma, B., Xu, Y., Ouyang, J., Zhu, J., … Yong, Q. (2012). Bioethanol production: an integrated process of low substrate loading hydrolysis-high sugars liquid fermentation and solid state fermentation of enzymatic hydrolysis residue. Bioresource Technology, 123, 699–702. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.118

Crueger, W. Crueger, A. (2000). Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Zaragoza, España: Acribia.

Cruz, J. M., Domínguez, J. M., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2000). Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol. Food Biotechnology, 14(1-2), 79–97. doi:10.1080/08905430009549981

Cuervo, L; Folch, J y Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. Revista BioTecnología, 13(3), 11-25.

Czaczyk, K., Trojanowska, K., & Stachowiak, B. (2002). Inhibition of Ergosterol Biosynthesis in Fungal Plant Pathogens by Bacillus sp . Polish Journal of Environmental Studies, 11(5), 593–597.

Dalsenter, F. D. H., Viccini, G., Barga, M. C., Mitchell, D. a., & Krieger, N. (2005). A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. Process Biochemistry, 40(2), 801–807. doi:10.1016/j.procbio.2004.02.007

Darwish, G. a. M. a., Bakr, a. a., & Abdallah, M. M. F. (2012). Nutritional value upgrading of maize stalk by using Pleurotus ostreatus and Saccharomyces cerevisiae in solid state fermentation. Annals of Agricultural Sciences, 57(1), 47–51. doi:10.1016/j.aoas.2012.03.005

Dávila, Gustavo. Vásquez, R. (2006). Flore. Mensaje Bioquímico, XXX, 29–55.

De Jager, D., Sheldon, M. S., & Edwards, W. (2009). Modelling growth kinetics of Streptomyces coelicolor A3(2) in a pressurised membrane gradostat reactor (MGR). Enzyme and Microbial Technology, 45(6-7), 449–456. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.08.010

Desai, K. M., Survase, S. a., Saudagar, P. S., Lele, S. S., & Singhal, R. S. (2008). Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: Case study of fermentative production of scleroglucan. Biochemical Engineering Journal, 41(3), 266–273. doi:10.1016/j.bej.2008.05.009

Dhillon, G. S., Kaur, S., & Brar, S. K. (2013). Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 27, 789–805. doi:10.1016/j.rser.2013.06.046

Díaz Cadavid, Abel. (2009). Regresión lineal simple. En A. D. Cadavid, Diseño estadístico de experimentos (págs. 189-214). Medellín: Editorial Universidad de Antioquia.

Díaz, B. H. C., Aparicio, A. J., Chanona-Pérez, J. J., Calderón-Domínguez, G., Alamilla-Beltrán, L., Hernández-Sánchez, H., & Gutiérrez-López, G. F. (2010). Morphological characterization of the growing front of Rhizopus oligosporus in solid media. Journal of Food Engineering, 101(3), 309–317. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.06.028

Diaz, Carolina. (2011). Adherencia y colonización de Pseudomonas fluorescens sobre sustratos solidos: influencia de la topografia y composición química de la superficie. (U. N. Plata, Ed.) La Plata: Tesis Doctoral, Departamento de Química. .

Djajakirana, G. Joergensen, R. Meyer, B. (1996). Ergosterol and microbial biomass relationship in soil. Biology and Fertility of Soils, 22(4), Biology and Fertility of Soils.

Dörge, T., Carstensen, J. M., & Frisvad, J. C. (2000). Direct identification of pure Penicillium species using image analysis. Journal of Microbiological Methods, 41(2), 121–33. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10889309

Dormond H; Boschini C; Bourrillón A. (1998). Efecto de los dos niveles de cascara de banano maduro sobre la producción láctea en ganado lechero. Agronomía Costarricense., 22, 43-49.

Duan, Y., Wang, L., & Chen, H. (2012). Digital image analysis and fractal-based kinetic modelling for fungal biomass determination in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 67, 60–67. doi:10.1016/j.bej.2012.04.020

Durand, A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 13(2-3), 113–125. doi:10.1016/S1369-703X(02)00124-9

Ekblan, A. Kan Wallander, T. Sholm, T. (1997). Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in Ectomycorrhizas. Ecology Building, Sweden., 2-5.

Fanaei, M. A., & Vaziri, B. M. (2009). Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 48(1), 446–451. doi:10.1016/j.cep.2008.06.001

FENALCE. (2008). Resumen de sensibilidades características generales por producto. (Fenalce, Ed.) Recuperado el 2 de Agosto de 2009, de http://fenalce.net/archivos/RiesgoFrenteTLC.doc

FENALCE. (2010). El cultivo del maíz, historia e importancia. El Cerealista(93), 10-19.

Fernández, E. Galván, A. (2005). Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. (E. Universidad de Córdoba, Ed.) Recuperado el 27 de Junio de 2009, de 27. Métodos para la cuantificación de proteínas:

http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf

Firrao, G., Torelli, E., Gobbi, E., Raranciuc, S., Bianchi, G., & Locci, R. (2010). Prediction of milled maize fumonisin contamination by multispectral image analysis. Journal of Cereal Science, 52(2), 327–330. doi:10.1016/j.jcs.2010.06.017

Fox, J. (Enero de 2002). Nonlinear Regression and Nonlinear Least Squares. Appendix to An R and S-PLUS Companion to Applied Regression. Recuperado el 5 de OCTUBRE de 2012, de http://cran.r-project.org/doc/contrib/Fox-Companion/appendix-nonlinear-regression.pdf

Fraise, A. Lambert, P. Maillard, J. (2004). Principles and Practice of Desinfection preservation and sterilization. (4th ed.). Blackwell Publishing.

Garai, D., & Kumar, V. (2013). A Box–Behnken design approach for the production of xylanase by Aspergillus candidus under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and Parthenium hysterophorus L. Industrial Crops and Products, 44, 352–363. doi:10.1016/j.indcrop.2012.10.027

Garcia, M. Quinetero, R. Lopez, Agustin. (2002). BIOTECNOLOGIA ALIMENTARIA. Mexico: Limusa.

GEN, D. d. (18 de Junio de 2008). Materia Primas para la Industria de los Concentrados. Entrevisa de Trabajo. Medellín.

Gervais, P., & Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation, 13(July 2002), 85–101.

Gessner, M. O., & Chauvet, E. (1993). Ergosterol-to-Biomass Conversion Factors for Aquatic Hyphomycetes. Applied and Environmental Microbiology, 59(2), 502–7. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=202134&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Ghaffari, a, Abdollahi, H., Khoshayand, M. R., Bozchalooi, I. S., Dadgar, a, & Rafiee-Tehrani, M. (2006). Performance comparison of neural network training algorithms in modeling of bimodal drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, 327(1-2), 126–38. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.07.056

Gomez, G. Carreño, J. Zambrano, J. (2011). Herramienta de software para el pronóstico de demanda horaria de potencia eléctrica en el sistema eléctrico de codesa S. A. ESP. 15(28), 7-22.

Gonzalez, E. (2006). Use of the agroindustrial residuals for the obtaining of products industrial interest. Revista Ambiental. Agua, Aire y Suelo, I(2), 15-26.

Grajek, W. (1988). Production of Protein by Thermophilic Fungi from Sugar-Beet Pulp in Solid-state Fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 32, 255–260.

H. A. Ruíz-Leza, R. M. Rodríguez-Jasso, R. R.-H., & Aguilar, J. C. C.-E. y C. N. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. REVISTA MEXICANA DE INGENIERÍA QUÍMICA, 6(1), 33–40.

Hagan, M. Demunth, H. Beale, M. (1999). Introduction. En M. D. Hagan, Neural Network Design (pág. 730). Colorado: Campus Pub. Service, University of Colorado Bookstore.

Hamidi-Esfahani, Z., Shojaosadati, S. a., & Rinzema, a. (2004). Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on A. niger growth in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 21(3), 265–272. doi:10.1016/j.bej.2004.07.007

Hanai, T., Honda, H., Ohkusu, E., Ohki, T., Tohyama, H., Muramatsu, T., & Kobayashi, T. (1999). Application of an artificial neural network and genetic algorithm for determination of process orbits in the koji making process. Journal of Bioscience and Bioengineering, 87(4), 507–12. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16232506

Hayati, M., & Akhlaghi, B. (2013). An extraction technique for small signal intrinsic parameters of HEMTs based on artificial neural networks. AEU - International Journal of Electronics and Communications, 67(2), 123–129. doi:10.1016/j.aeue.2012.07.012

Haykin, S. (2005). Multilayer Perceptrons. En S. Haykin, Neural Networks. A comprehensive Foundation. (pág. 823). Patparganj: Pearson Prentice Hall.

Herrera, T. Ulloa, M. (2004). El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. (Tercera ed.). México: Fondo de cultura economica,.

Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation--are there any biotechnological advantages? Current Opinion in Microbiology, 8(3), 301–6. doi:10.1016/j.mib.2005.04.006

Hölker, U., Höfer, M., & Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 64(2), 175–86. doi:10.1007/s00253-003-1504-3

Hölter, U. y Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation – Are there any biotechnological advantages? Current Opinion in Microbiology, 8, 301-306.

Horiuchi, J.-I. (2002). Fuzzy modeling and control of biological processes. Journal of Bioscience and Bioengineering, 94(6), 574–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233352

Hykin, S. (2005). Multilayer Perceptrons. En S. Hykin, Neural Networks. A comprehensive Foundation (págs. 178-274). Patparganj: Pearson Prentice Hall.

Jenzsch, M., Simutis, R., Lübbert, A. (2006). Optimization and Control of Industrial Microbial Cultivation Processes. Engineering in Life Sciences , 117-124.

Jianlin, W., Tao, Y. U., & Cuiyun, J. I. N. (2006). On-line Estimation of Biomass in Fermentation Process Using Support * Vector Machine. Chinese J. Chem. Eng, 14(3), 383–388.

Karakuzu, C., Türker, M., & Öztürk, S. (2006). Modelling, on-line state estimation and fuzzy control of production scale fed-batch baker's yeast fermentation. Control Engineering Practice, 14(8), 959–974. doi:10.1016/j.conengprac.2005.05.007

Khan, N. W. (2007). Characterization of chemically modified corncobs and its application in the removal of metal ions from aqueous solution. Journal of Hazardous Materials(141), 237-244.

Khaouane, L., Benkortbi, O., & Hanini, S; Si-Moussa, C. (2013). MODELING OF AN INDUSTRIAL PROCESS OF PLEUROMUTILIN FERMENTATION USING FEED- FORWARD NEURAL NETWORKS. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 30(01), 105–116.

Knežević, A., Milovanović, I., Stajić, M., Lončar, N., Brčeski, I., Vukojević, J., & Cilerdžić, J. (2013). Lignin degradation by selected fungal species. Bioresource Technology, 138, 117–23. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.182

Kuan, C. Yuen, K. Bhat, R. Liong, M. (2011). Physicochemical characterization of alkali treated fractions from corncob and wheat straw and the production of nanofibres. Food Research International(44), 2822–2829.

Kumaravel Rajakumar, Susan L. Greenspan, Stephen B. Thomas, and Michael F. Holick. (2007). SOLAR Ultraviolet Radiation AND Vitamin D. American Journal of Public Health., 97(10), 1746-1754 .

Latham, M. (2002). NUTRICIÓN HUMANA EN EL MUNDO EN DESARROLLO (Vol. 29). Roma: Colección FAO: Alimentación y nutrición.

Length, F. (2010). Conversion of sorghum stover into animal feed with white-rot fungi : Pleurotus ostreatus and Pleurotus pulmonarius, 9(11), 1706–1712.

Lisboa, P. J., & Taktak, A. F. G. (2006). The use of artificial neural networks in decision support in cancer: a systematic review. Neural Networks : The Official Journal of the International Neural Network Society, 19(4), 408–15. doi:10.1016/j.neunet.2005.10.007

Liu, K. Lin, X. Yue, J. Li, X. Fang, X. Zhu, M. Lin, J. Qu, Y. Xiao, L. (2010). High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. Bioresource Technology(101), 4952–4958.

Liu, K., Lin, X., Yue, J., Li, X., Fang, X., Zhu, M., … Xiao, L. (2010). High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. Bioresource Technology, 101(13), 4952–4958. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.013

Luley, Christopher. (Abril de 2006). SOCIEDAD INTERNACIONAL DE ARBORICULTURA. (I. Hispania, Ed.) Recuperado el 18 de Junio de 2012, de Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en árboles urbanos: http://www.isahispana.com/treecare/articles/decay-fungi.aspx

Maíz y Milpa. (3 de Junio de 2009). EL MAÍZ - LA MILPA. Recuperado el 10 de Marzo de 2010, de http://maiz.librostextos.com/aprovechamiento-de-los-residuos-del-maiz/#more-6>

Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S. and Banerjee, U. . (2005). Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. Malalaysian Jounal of Microbiology, 1(2), 1–9.

Mataix, J. (2009). Nutrición Alimentación Humana. Nutrientes y Alimentos (Vol. I). Barcelona, España: Oceano.

Mazutti, M. a, Zabot, G., Boni, G., Skovronski, A., de Oliveira, D., Di Luccio, M., … Treichel, H. (2010). Mathematical modeling of Kluyveromyces marxianus growth in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 37(4), 391–400. doi:10.1007/s10295-009-0685-x

MÉNDEZ, Getulio, RÍOS DE LOS ÁLVAREZ Leyla, COMBELLAS Josefina, COLMENARES Omar y ÁLVAREZ Ramón. (2004). Uso de tusa de maíz en dietas que contienen gallinaza sobre el comportamiento productivo de ovinos en crecimiento. Zootecnia Tropical, 22, 15-27.

Mitchell, D. a., von Meien, O. F., Krieger, N., & Dalsenter, F. D. H. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 17(1), 15–26. doi:10.1016/S1369-703X(03)00120-7

Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M. (2006). Solid-State Fermentations Bioreactors. Fundamentals of Design and Operation. Germany: Springer.

Mitchell, D., Krieger, N., & Beroviˇc, M. (2006). Introduction to Solid State Fermentation Bioreactors. In Solid-State Fermentation Bioreactors. Fundamentals of Design and Operationle (pp. 33–43). Berl: Springer-Verlag. doi:10.1007/3540312854

Mitchell, David et al. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 17, 15–26.

Miura, S., Arimura, T., Itoda, N., Dwiarti, L., Feng, J. I. N., Bin, C. U. I. H., & Okabe, M. (2004). Production of L -Lactic Acid from Corncob, 97(3), 153–157.

Montgomery, H. ., Monreal, C. ., Young, J. ., & Seifert, K. . (2000). Determinination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. Soil Biology and Biochemistry, 32(8-9), 1207–1217. doi:10.1016/S0038-0717(00)00037-7

Montgomery, H. M. (2000). Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v.32, 1207-1217.

Montoya, S. y Restrepo, G. (Enero-Diciembre de 2006). Evaluación de la síntesis de proteína a partir del crecimiento vegetativo de Pleurotus sp. Sobre residuos de algarrobo y uva pasa. Revista Universidad de Caldas, 23-31.

Muller dos Santos, M., Souza da Rosa, A., Dal'Boit, S., Mitchell, D. a, & Krieger, N. (2004). Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? Bioresource Technology, 93(3), 261–8. doi:10.1016/j.biortech.2003.11.007

Muylder, E. V. (1989). Incorporation of brewery activated sludge-single cell proteins (BSCP) in diets for Clarias geriepinus B. fingerlings. Aquaculture - A BIOTECHNOLOGY IN PROGRESS, 639-644.

Nagata, Y., & Chu, K. H. (2003). Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms. Biotechnology Letters, 25(21), 1837–42. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14677708

Nasiruddin Khan, M., & Farooq Wahab, M. (2007). Characterization of chemically modified corncobs and its application in the removal of metal ions from aqueous solution. Journal of Hazardous Materials, 141(1), 237–244. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.06.119

Newell, SY. Miller, JD. Fallon, RD. (1987). Ergosterol content of saltmarsh fungi: effect of growth conditions and mycelial age. Mycologia, 688-695.

Niemenmaa, O., Galkin, S., & Hatakka, A. (2008). Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions.

International Biodeterioration & Biodegradation, 62(2), 125–134. doi:10.1016/j.ibiod.2007.12.009

Oei, P. (2003). Mushroom Cultivation appropriate technology for mushroom growers (Tercera ed.). Holanda: Backhuys Publishers.

Ollero, A., & Merino, L. (2004). Control and perception techniques for aerial robotics. Annual Reviews in Control, 28(2), 167–178. doi:10.1016/j.arcontrol.2004.05.003

Ooijkaas, L. P., Tramper, J., & Buitelaar, R. M. (1998). Biomass Estimation of Coniothyrium Minitans in Solid-State Fermentation. Enzyme and Microbial Technology, 22(6), 480–486. doi:10.1016/S0141-0229(97)00246-9

ORLANDONI, G. (1997). Modelos de crecimiento de poblaciones biológicas : Un enfoque de dinámica de sistemas. Economía, XXII(23), 115–146.

Ortega, G. Bueno, G. Betancourt, D. Álvarez, I. González, A. (2005). Biotransformacion de Residuos Lignocelulosicos con Hongos Pleurotus. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 36.

Orzúa, Carmen; Contreras, Juan; Rodríguez, Raúl; Noe, Cristóbal. (2009). Tratamiento de residuos agroindustriales por fermentación fúngica en medio sólido. Acta Química Mexicana (AQM), 1(1).

Outi Niemenmaa, S. G. (2008). Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. Department of Applied Chemistry and Microbiology. University of Helsinki, 4-6.

Oviedo, Juan et al. (2010). Tusa de Maiz enriquecida con micelio de basidiomicetos (Pleurotus pulmonarius) para alimentación animal. En ACTA (Ed.), 10 Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bogotá.

Oviedo, Juan. Casas, Ana. Ramirez, Margarita. Valencia, Jaime. (2013). 11° Congreso Interamericano de Computación Aplicada a la Industria de Procesos. En P. U. Perú (Ed.), Análisis para la medición de la biomasa en Fermentación en estado sólido empleando redes neuronales y modelo logístico (pág. 10). Lima: CIT.

Padey, A. S. (2008). Current Developments in Solid-state Fermentations. New Delhi: Asiatech Publishers, INC (Springer).

Padey, A. Soccol, C. Larroche, C. . (2008). Current Developments in Solid-state Fermentations. New Delhi: Asiatech Publishers, INC (Springer).

Paliwal, R. Granados, G. Lafitte, H. Violic, A. (2001). EL MAÍZ EN LOS TRÓPICOS: Mejoramiento y producción. (F. P. Series, Editor) Recuperado el 30 de Marzo de 2013, de http://www.fao.org/DOCREP/003/X7650S/X7650S00.HTM

PALIWAL, Ripusudan. GRANADOS, Gonzalo. LAFITTE, Honor. VIOLIC, Alejandro. (2001). FAO. Recuperado el 30 de Marzo de 2013, de EL MAÍZ EN LOS TRÓPICOS: Mejoramiento y producción.: http://www.fao.org/DOCREP/003/X7650S/X7650S00.HTM

Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. Process Biochemistry, 35(10), 1153–1169. doi:10.1016/S0032-9592(00)00152-7

Papagianni, M., & Mattey, M. (2006). Morphological development of Aspergillus niger in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. Microbial Cell Factories, 5, 3. doi:10.1186/1475-2859-5-3

Patiño, E. (2004). Enriquecimiento Proteico de tusa de maíz por fermentación en estado sólido utilizando el Pleurotus pulmonarius. Medellín: Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Pontificia Bolivariana.

Peleg, M., Corradini, M. G., & Normand, M. D. (2007). The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. Food Research International, 40(7), 808–818. doi:10.1016/j.foodres.2007.01.012

Perez, L. C. (2006). Principales contaminantes que afectan el cultivo de hongos comestibles en el INIFAT. Agrotecnia de Cuba, 30(1).

Phetteplace, H. Jarosz, M. Uctuck, D. Spolrleder, R. (2003). Animal Sciences - Colorado State University. Recuperado el 18 de Febrero de 2009, de Animal Sciences - Colorado State University: http://ansci.colostate. edu/documents/renut/2000/hp00.htmL.

Prabhakar, A.*, Krishnaiah, K., Janaun, J. and Bono, A. (2005). An overview of Engineering Aspects of Solid State Fermentation. Malaysian Journal of Microbiology, 1(2), 10–16.

Prescott, S. Dunn, C. (1984). Microbiología Industrial. AVI, Press.

Primo, E. (1998). Química de los Alimentos. Síntesis.

Quiñones, J. Lecompte, A. (2007). Modelos exponencial y logístico de la población en el Suroeste de Puerto Rico. Revista de invsetigacion360 °, I(3).

Raghavarao, K. S. M. ., Ranganathan, T. ., & Karanth, N. . (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 13(2-3), 127–135. doi:10.1016/S1369-703X(02)00125-0

Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Biotechnology, 1(2), 174–188. doi:10.2225/vol1-issue3-fulltext-9

Rajakumar, K. T. (2007). Ergosterol. American Journal of Public Health. Vol. 97, No. 10.

Ramos, M; Ricardo, J. (2007). Fermentación en estado sólido (I). Producción de alimento animal. Tecnología Química, XXVII(3), 17-22.

Ratna, V., Kumar, R., Rami, S., Donthireddy, R., Nikku, Y., & Garapati, H. R. (2009). Optimization of medium constituents for Cephalosporin C production using response surface methodology and artificial neural networks, 1, 69–74.

REZENDE Maria Inês et al. (Enero de 2002). Xinalase Production By Trichoderma Harzianuam Rifay By Solid State Fermentation on Sugarcane Bagasse. Brazilian Journal of Microbiology, 33(10), 1-8.

Rezende, M. I., Barbosa, A. D. M., Flora, A., Vasconcelos, D., & Endo, A. S. (2002). XYLANASE PRODUCTION BY TRICHODERMA HARZIANUM RIFAI BY SOLID STATE FERMENTATION ON SUGARCANE BAGASSE, 67–72.

Ribeiro, Ricardo. (2004). ERGOSTEROL PARA A DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA DOS FUNGOS Lentinus crinitus Berk. e Psilocybe castanella Peck. EM BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS. Sao Paulo, Brasil: Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,Instituto de Biociências de Rio Claro.

Robinson, T., & Nigam, P. (2003). Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 13(2-3), 197–203. doi:10.1016/S1369-703X(02)00132-8

Robinson, T., Chandran, B., & Nigam, P. (2002). Removal of dyes from an artificial textile dye effluent by two agricultural waste residues, corncob and barley husk. Environment International, 28(1-2), 29–33. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12046951

Rodríguez Couto, S., & Sanromán, M. a. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. Biochemical Engineering Journal, 22(3), 211–219. doi:10.1016/j.bej.2004.09.013

Rodriguez, Claudia; Hernández, Ricardo; Suárez, Christian; Borrero, Marta. (2008). Evaluación de crecimiento y producción del Pleurotus ostreatus sobre

diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. Universitas Scientiarum, 13(2), 128 – 137.

Rodriguez, S. Sanroman, M. (Octubre de 2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. Journal of Food Engineering, 76(3), 291–302.

Roise, et al. (January de 2004). Yield, mushroom size and time to production of Pleurotus cornucopiae (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. Bioresource Technology, 91(1), 85–91.

Romero, O. H. (2009). Características de Trichoderma harzianum, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. Revista Colombiana de Biotecnología, XI(2), 143-151.

Roussos, S. Raimbault, M. Prebois, JP. Lonsane, BK. (1993). Zymotis, A Large Scale Solid State Fermenter. The Humana Press Inc., 38-51.

Sampoux, J.-P., Baudouin, P., Bayle, B., Béguier, V., Bourdon, P., Chosson, J.-F., … Viguié, A. (2011). Breeding perennial grasses for forage usage: An experimental assessment of trait changes in diploid perennial ryegrass (Lolium perenne L.) cultivars released in the last four decades. Field Crops Research, 123(2), 117–129. doi:10.1016/j.fcr.2011.05.007

Sánchez, José. Royse, Daniel. (2001). Capítulo III. Crecimiento y fructificación. En J. R. Sánchez, La biología y el cultivo de Pleurotus spp (págs. 49-66). San Cristóbal de las Casas, Chiapas: UTEHA, NORIEGA EDITORES.

Schmidt, C. G., & Furlong, E. B. (2012). Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus Rhizopus oryzae. Bioresource Technology, 123, 36–41. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.081

Scragg, A. (2004). BIOTECNOLOGÍA PARA INGENIEROS: Sistemas Biológicos en procesos tecnológicos. México: Limusa.

Shingania, R et al. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 44, 13–18.

Silverio, H. Flauzio, W. Olveira, N. Pasquini, D. (2013). Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites. Industrial Crops and Products(44), 427– 436.

Singh, A., Tatewar, D., Shastri, P. N., & Pandharipande, S. L. (2008). Application of ANN for prediction of cellulase and xylanase production by Trichoderma reesei under SSF condition, 15(January), 53–58.

Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 44(1), 13–18. doi:10.1016/j.bej.2008.10.019

Stamets, P. Chilton, J. (1983). The mushroom cultivation. A practical guide to Growing mushrooms at home. Agarikon Press.

Strapasson, R. A. (2003). OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO BIOPROCESSO DE ÁCIDO FUMÁRICO A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS ,.

Suharto, I. Redyowati, S. (1999). United Nations University website. Recuperado el 12 de Abril de 2009, de Mini-fermentation technology to produce single-cell protein from molasses: http://archive.unu.edu/unupress/food/UNU06/cap_8.htm

Sun, Y. Webley, P. (2010). Preparation of activated carbons from corncob with large specific surface area by a variety of chemical activators and their application in gas storage. Chemical Engineering Journal(162), 883–892.

Sun, Y., & Webley, P. a. (2010). Preparation of activated carbons from corncob with large specific surface area by a variety of chemical activators and their application in gas storage. Chemical Engineering Journal, 162(3), 883–892. doi:10.1016/j.cej.2010.06.031

Tacon, A. (1989). FAO. Recuperado el 20 de Enero de 2014, de Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación: http://www.fao.org/docrep/field/003/ab492s/AB492S09.htm

TAPPI. (16 de Junio de 2006). Technical Association of the Pulp and Paper Industry. Acid-insoluble lignin in Wood and pulp (reaffirmation of T 222 om-06). TAPPI.

Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 81, 146–161. doi:10.1016/j.bej.2013.10.013

Uraikul, V., Chan, C. W., & Tontiwachwuthikul, P. (2007). Artificial intelligence for monitoring and supervisory control of process systems. Engineering Applications of Artificial Intelligence, 20(2), 115–131. doi:10.1016/j.engappai.2006.07.002

Vats, S., & Negi, S. (2013). Use of artificial neural network (ANN) for the development of bioprocess using Pinus roxburghii fallen foliages for the release of polyphenols and reducing sugars. Bioresource Technology, 140, 392–8. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.106

Velmurugan, P., Hur, H., Balachandar, V., Kamala-Kannan, S., Lee, K.-J., Lee, S.-M., … Oh, B.-T. (2011). Monascus pigment production by solid-state fermentation

with corn cob substrate. Journal of Bioscience and Bioengineering, 112(6), 590–4. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.08.009

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

Viccini, G., Mitchell, D. A., Boit, S. D., Gern, J. C., Rosa, A. S., Costa, R. M., & Dalsenter, F. D. H. (2001). Analysis of Growth Kinetic Profiles in Solid-State Fermentation, 39(40), 1–23.

Villas-Bôas, S. G., Esposito, E., & Mitchell, D. A. (2002). Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. Animal Feed Science and Technology, 98(1-2), 1–12. doi:10.1016/S0377-8401(02)00017-2

Wan, C., & Li, Y. (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. Biotechnology Advances, 30(6), 1447–57. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.03.003

Wijekoon, C. P., Goodwin, P. H., & Hsiang, T. (2008). Quantifying fungal infection of plant leaves by digital image analysis using Scion Image software. Journal of Microbiological Methods, 74(2-3), 94–101. doi:10.1016/j.mimet.2008.03.008

Williams, K. M., Arthur, S. J., Burrell, G., Kelly, F., Phillips, D. W., & Marshall, T. (2003). An evaluation of protein assays for quantitative determination of drugs. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 57(1), 45–55. doi:10.1016/S0165-022X(03)00082-4

Zhang, Y., Xu, J.-L., Yuan, Z.-H., Qi, W., Liu, Y.-Y., & He, M.-C. (2012). Artificial Intelligence Techniques to Optimize the EDC/NHS-Mediated Immobilization of Cellulase on Eudragit L-100. International Journal of Molecular Sciences, 13(7), 7952–62. doi:10.3390/ijms13077952

Ziglio, B. Mazile, J. Branco, I. Bastos, R. Rigo, M. (2007). ELABORAÇÃO DE PÃES COM ADIÇÃO DE FARINHA DE SABUGO DE MILHO. REVISTA CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS, 9(1), 116-128.

Ziglio, Beatriz. Mazile, Jose. Branco, I. Bastos, R. Rigo, M. (2007). Elaboração de Pães com Adição de Farinha de Sabugo de Milho Bread-making with corncob flower. REVISTA CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS, 9(1), 115–128.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology, 56(6), 1875–81. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184525&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Zych, D. (Agosto de 2008). The viability of corn cobs as a bioenergy feedstock. Recuperado el 11 de Octubre de 2011, de The viability of corn cobs as a bioenergy feedstock.: http://renewables.morris.umn.edu/biomass/documents/Zych-TheViabilityOfCornCobsAsABioenergyFeedstock.pdf