

Diseño para la optimización de un Biorreactor tipo Koji destinado a producción de biomasa fúngica mediante fermentación en estado sólido

Optimized design of a Koji-type Bioreactor for the production of fungal biomass through solid-state fermentation

Rocío de las Nieves Coronel Cristaldo¹, Laura Denisse Santander Díaz¹, Abdón Troche Rotela²

¹Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Cátedra de Biotecnología I (Biorreactores). San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción. Facultad Politécnica. San Lorenzo, Paraguay.

Resumen. Los reactores biológicos aplicados a la producción industrial de bioproductos de interés comercial son una herramienta cada vez más aprovechada y, a partir de esto, ha surgido la necesidad de estudiar la ingeniería aplicada al diseño y construcción de los biorreactores para maximizar el rendimiento de los procesos biológicos que ocurren en él. El análisis de los métodos y herramientas para el control de parámetros básicos y su ajuste de acuerdo al tipo de microorganismo en estudio ha sido el principal interés de esta ciencia, así como también la facilidad con la que se pudieran resolver los inconvenientes que tienen lugar durante el proceso de fermentación. Los biorreactores de operación en estado sólido presentan numerosas ventajas en la utilización para la producción de biomasa fúngica debido a la facilidad en el montaje del mismo y control de condiciones de operación. Con el objetivo de la optimización de un reactor existente para procesos de fermentación, se ha buscado un diseño que posibilite la producción de biomasa fúngica de *T. asperellum* con un control óptimo de la asepsia del cultivo y los parámetros físicos del proceso.

Palabras clave: reactor biológico, biofermentación, bioingeniería.

Abstract. Biological reactors applied to the industrial production of bioproducts of commercial interest have been an increasingly used tool which led to the study of engineering methods such as the design and construction to maximize the performance of the processes that take place inside of the bioreactor. The analysis of the methods and tools for the control of basic parameters and their adjustment according to the type of microorganism has been the main interest of this field of study, as well as the ease with which the inconveniences that occur during the fermentation process can be resolved. Solid-state operation bioreactors have many advantages in the production of fungal biomass due to the easiness of assembly and operating control conditions. The aim of this project was the design and optimization of an existing bioreactor that allows the production of *T. asperellum* fungal biomass with an optimal control of the asepsis and physical factors of fermentation.

Keywords: biological reactor, biofermentation, bioengineering.



10.57201/ieuna2413255

Sección: Artículo original

*Autor correspondiente:
rociocoronel99@gmail.com

Editor de área:

Jorge Rodas, Universidad Nacional de Asunción.

Recibido:

21 de marzo de 2023

Aceptado:

22 de mayo de 2023

Recibido en versión modificada:

18 de julio de 2023

Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una Licencia Creative Commons "CC BY

4.0". 

Declaración de conflicto: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

e-ISSN 2709 -0817

Como citar: Coronel Cristaldo, R. N., Santander Díaz, L. D. y Troche Rotela, A. (2024). Diseño para la optimización de un Biorreactor tipo koji destinado a producción de biomasa fúngica mediante fermentación en estado sólido. *Revista investigaciones y estudios - UNA*, 15(1), 12-26.

Introducción

En la actualidad los procesos fermentativos y biotecnológicos tienen gran importancia, y la aplicación sistematizada de biorreactores en esta área es decisiva, así como sus características particulares. La producción de biomasa a través de esta tecnología, utilizada desde la década de los noventa, ha presentado inconvenientes que arroja resultados ineficientes debido principalmente a inconveniencias técnicas y tecnológicas a superar (Marín Cárdenas et al., 2008).

Desde los años 70, el cultivo de microorganismos ha ido en aumento, ya que, a partir de estos, es posible la producción de incontables metabolitos de valor añadido, con aplicación química, nutricional, farmacéutica, etc., así como la obtención de biomasa para una alternativa a los combustibles fósiles o para la obtención de bio productos (Moreno y Vanegas, 2017).

Un biorreactor constituye un equipo utilizado para la puesta en marcha de una o más reacciones biológicas, a escala piloto y especialmente a escala industrial. Se considera el corazón de un proceso biológico, ya que este es quién proporciona las condiciones de operación adecuadas para que el microorganismo se desarrolle y/o produzca un compuesto bioactivo deseado (Ruíz-Leza et al., 2007).

Los biorreactores más utilizados a nivel industrial están provistos de mecanismos de agitación, dispersión y aireación, así como de sistemas para el control de la temperatura, humedad y pH. Los criterios para el diseño de un biorreactor se basan en el tipo de equipo (tambor, columna, charola, etc.) y la fermentación a llevarse a cabo (sólido o líquido) (Ruíz-Leza et al., 2007). Durand (2003) también hace referencia a la importancia del sustrato utilizado, donde la composición, el tamaño y la capacidad de retención de agua son parámetros importantes a tener en cuenta.

La fermentación en estado sólido (FES) es un proceso en el que los microorganismos crecen en un ambiente sin agua libre o prácticamente mínima. Ha sido foco de estudio en las últimas décadas atendiendo a que permite el uso de residuos sólidos agroindustriales como sustrato en su forma natural y facilita el manejo de los residuos sólidos, además de que presenta una menor producción de aguas residuales (Soccol et al, 2017).

Las técnicas relacionadas a la FES tuvieron origen en Asia para la producción de alimentos, en los años ochenta recuperó el interés de la comunidad científica, tal es así que posteriormente se desarrollaron algunos modelos de biorreactores para estudios a escala de laboratorio. Y si bien los biorreactores de FES poseen sus ventajas y desventajas definidas, hasta la fecha continúa el desarrollo de mejores diseños en respuesta a la demanda de nuevos procesos biotecnológicos llevados a cabo en este tipo de equipo (Vandenberghe et al., 2021).

Los avances publicados en países occidentales en relación a la utilización de fermentación en estado sólido han sido numerosos, y esto se debe principalmente a que el proceso se adapta con éxito al metabolismo de hongos, que son los microorganismos más comunes en los procesos FES

(Durand, 2003) aunque también se reporta la producción de metabolitos secundarios mediante bacterias como *Streptomyces sp.*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* (Robinson et al, 2002).

La utilización de la fermentación en estado sólido apunta principalmente a incrementar la productividad de las fermentaciones, ya que se ha observado que posee un alto rendimiento en períodos de tiempo cortos, facilidad en la separación del producto del sustrato empleado y, a la vez, representa una inversión económica accesible (Robinson et al., 2002).

Estado actual del tema

La FES consiste en el crecimiento de microorganismos sobre materiales sólidos húmedos. A partir de este punto de vista, las condiciones de cultivo no presentan un nivel de esterilidad alto, pero constituyen procesos de bajo contenido de agua y energía, y bajo costo económico, por lo que resultan fáciles de escalar, y a esto se suma el hecho de que el cultivo en sustratos sólidos naturales proporciona una cantidad muy elevada de nutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos, facilitando así su desarrollo (Rodríguez Pérez et al., 2017).

Los biorreactores en bandeja usualmente poseen un diseño muy simple, sin aireación forzada ni mezcla para el sustrato sólido, por lo que son reactores restrictivos en cuanto a la cantidad de sustrato que se puede fermentar, y la parte inferior de las bandejas está perforada para permitir la aireación del sustrato sólido, con cada bandeja dispuesta encima de la otra (Robinson y Nigam, 2003).

Muchos productos emplean "cultivos iniciadores" que se cultivan en FES y estos suelen ser considerados como uno de los ingredientes para preparar un amplio conjunto de productos, tales como licores, vinagre, salsa de soja, bebidas destiladas, entre otros, principalmente en los países occidentales, donde es habitual nombrar a todos estos cultivos iniciadores como "Koji", sin embargo, existen clasificaciones específicas, como el "Qus chino" o el "Nuruk coreano", siendo el Koji de origen japonés. En la mayoría de los casos, el papel de estos iniciadores es producir reservas enzimáticas para hidrolizar macromoléculas de sustrato (Soccol et al., 2017).

Se han reportado numerosos trabajos relacionados al estudio de la FES para obtención de enzimas por *Aspergillus niger* (Costa et al., 2012), crecimiento para *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de café (Rodríguez Pérez et al., 2017), producción de la biomasa proteica a partir de *Candida utilis* (Marín Cárdenas et al., 2008), entre otros.

Método de operación

El biorreactor tipo Koji opera en forma discontinua en condiciones estáticas. Se trata de una cámara cerrada que posee bandejas de acero de 33x43x5 cm (longitud x profundidad x altura) con pequeños orificios para la circulación de aire, en las que se dispone el sustrato inoculado. Es necesario acoplar sistemas electrónicos a modo de realizar un control sobre los parámetros de fermentación, principalmente temperatura y humedad (Soccol et al., 2017; Manan y Webb, 2020).

Análisis de las variables de fermentación

Teniendo en cuenta que la FES en un biorreactor intenta imitar las condiciones de hábitat natural de los microorganismos, los más adecuados para este tipo de tecnología son los hongos filamentosos. Estos poseen la característica de ser bastante flexibles en cuanto sus requerimientos fisicoquímicos y ser resistentes a condiciones no tan favorables (Soccol et al., 2017; Vandenberghe et al., 2021).

Temperatura

Los hongos son organismos mesófilos y cada especie posee diferentes requerimientos nutricionales, así como también condiciones favorables que maximizan la esporulación (Sandoval Vega y Noelthing Zenobio, 2011). Las temperaturas óptimas para el crecimiento de las especies de *Trichoderma* rondan los 25 a 30 grados Celsius (Vásquez, 2010; Pineda-Insusasti et al., 2017).

Iluminación

Se han reportado numerosos estudios acerca de la incidencia del fotoperiodo en el crecimiento de especies fúngicas, no encontrándose efectos significativos sobre el mismo (Silva et al., 2013), sin embargo, se ha evidenciado la influencia de la luz sobre la formación de conidios más resistentes en algunas especies de *Trichoderma* (González, 2000), incluso estableciéndose que la oscuridad inhibe la conidiogénesis (Vásquez, 2010).

Humedad

Durante la FES el microorganismo crece sobre un sustrato al cual se adhiere. Este sustrato no presenta agua libre en su estructura, pero existe un requerimiento de humedad para satisfacer las necesidades básicas del microorganismo (Costa et al., 2012). También un parámetro a tener en cuenta es la capacidad de absorción de agua del sustrato utilizado. Para la mayor parte de organismos del reino Fungi el contenido de humedad requerido varía entre 40-70% (Vandenberghe et al., 2021).

Sustratos

Los sustratos frecuentemente utilizados para la fermentación en estado sólido son residuos agroindustriales (Vandenberghe et al., 2021), por lo que representan una alternativa ecológica para el manejo de los mismos. Su composición puede ser muy variable, en general, materiales lignocelulósicos como harinas con alto contenido en almidón (Rodríguez Pérez et al., 2017). También se ha reportado que la utilización de diferentes sustratos sólidos para la producción de *Trichoderma spp.* a nivel industrial y semiindustrial tales como cebada, olote o arroz (Chávez-García et al., 2008).

El sustrato más utilizado y con mayores índices de producción de biomasa para cepas del género *Trichoderma* es el arroz, por lo que se decidió utilizar como un control positivo, en relación al olote de maíz que representa un subproducto de la industria agroalimentaria predominante en el país.

Sistemas de medida

Desde un punto de vista analítico, la cuantificación de biomasa fúngica puede ser realizada de forma directa, mediante métodos gravimétricos como peso seco. Sin embargo, en FES, resulta un poco inapropiado pues existe una interacción fuerte entre el micelio y el sustrato, y dependiendo del que sea utilizado, es posible que se produzca un arrastre del mismo al momento de la separación, introduciéndose de esta forma errores en la cuantificación. Es posible reducir estos errores empleando un método basado en la determinación espectrofotométrica, lo cual también mejora la rapidez de dicha evaluación (Rodríguez Pérez et al., 2017). A su vez, es posible realizar conteo de esporas a partir de sustrato fermentado seco en diluciones. Este método se realiza en hemocitómetros (Manan y Webb, 2020).

Materiales y Métodos

Diseño del biorreactor

Partiendo desde el armazón diseñado y construido por alumnos de la cátedra de Biotecnología I (Biorreactores) de la Licenciatura en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción en el año 2019, se realizó un nuevo diseño experimental en base a los requerimientos de *Trichoderma asperellum* TF7.

El suministro de temperatura se realizó mediante la aplicación de una estructura obtenida por impresión 3D de un adaptador para el microventilador acoplado a una lámpara incandescente de 12W. Mientras que la humedad se proporcionó por medio de un humidificador de marca Satellite A-H6605, se diseñó e imprimió un adaptador de dos canales para la conexión de dos mangueras de PVC transparentes a las entradas del fermentador que daban por encima de las bandejas y las conexiones fueron aseguradas con cintillos de plástico.

Todas las partes no electrónicas del equipo ensamblado, así como las dos bandejas de fermentación fueron previamente desinfectadas con lavados sucesivos de hipoclorito de sodio al 1%, agua destilada y alcohol 70%. Por otro lado, la estructura de caja fue desinfectada con 2-fenilfenol 0,1% y etanol 54% del desinfectante aerosol Lysoform® antes y después de su uso.

El sistema de control temperatura y humedad fue por medio de un sensor instalado en la parte superior del fermentador, éste se encontraba conectado a un controlador STC-3028. Por medio de las instrucciones del fabricante, se ajustó el rango de temperatura 25-28 grados Celsius y humedad 80-90%, óptimos para *T. asperellum* TF7.

Se aplicó un fotoperiodo de luz 6500K continua (24 horas) para el cual se utilizó 5 metros de cinta LED tipo SMD2835 con un voltaje de 12V durante todo el proceso.

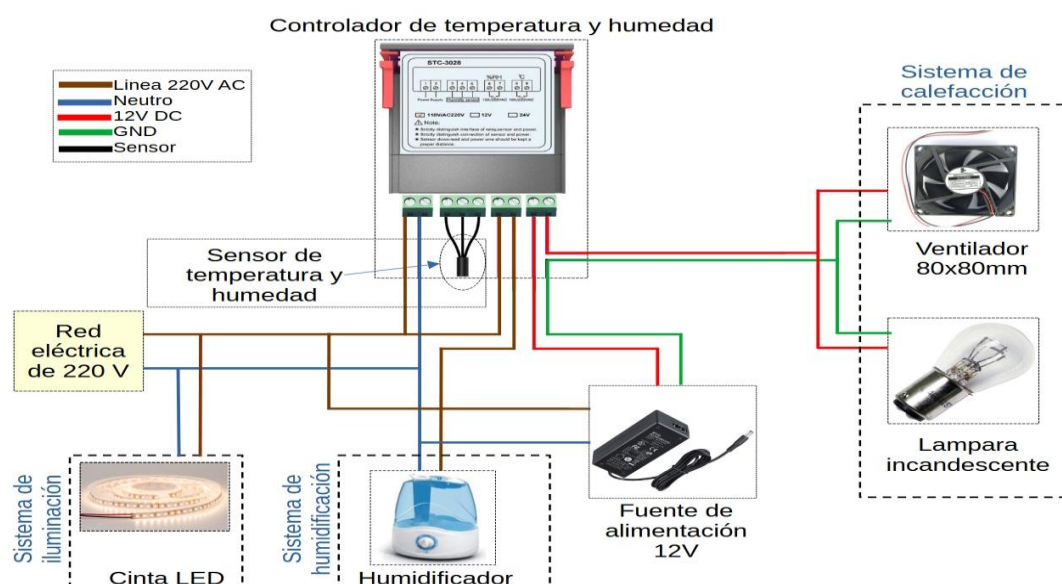


Figura 1. Esquema eléctrico del biorreactor. Partes del sistema eléctrico del biorreactor.
Figure 1. Electrical diagram of the bioreactor. Electrical parts of the bioreactor system.

Controlador de temperatura y humedad: Es el modelo STC-3028 que consta de una interfaz dual LED para las dos magnitudes que controla y además de una botonera de programación.

El controlador consta de una fuente de alimentación interna de Corriente Alterna de 110-220 V y 50/60 Hz. Las magnitudes que mide son la temperatura y la humedad. El rango de temperatura de medición es de $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim +80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el rango de medición de humedad es de $00\% \text{ HR} \sim +100\% \text{ HR}$.

El controlador tiene una precisión de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ $0,1\% \text{HR}$. La capacidad de contacto de salida de relé es de 10A. Este controlador consta de un sensor integrado, longitud de línea de 1 metro.

El material de la carcasa del controlador es de plástico ignífugo ABS y tiene un peso neto 120 g y un peso bruto 140 g.

Las características del controlador son:

1. Capacidad de controlar la temperatura y la humedad al mismo tiempo.
2. Capacidad de conectarse con equipos de refrigeración/calefacción y humidificador/deshumidificador al mismo tiempo.
3. La función de calefacción/refrigeración se puede configurar por separado para proteger el controlador de temperatura de cambios violentos. Igual que el control de humedad.
4. Compatibilidad con la calibración de temperatura y humedad.
5. Ventana de visualización doble. Con capacidad de mostrar la temperatura/humedad medida y configurar la temperatura/humedad al mismo tiempo.

Sensor de temperatura y humedad: El módulo digital de temperatura y humedad AM2120 es un sensor compuesto de temperatura y humedad con una salida de señal digital calibrada. Aplica tecnología de adquisición de módulo digital especial, temperatura y tecnología de detección de humedad, para garantizar que el dispositivo tenga una alta confiabilidad y una excelente estabilidad a largo plazo. El sensor tiene las ventajas de una excelente calidad, una respuesta ultrarrápida, una

gran capacidad anti-interferencias y una alta rentabilidad. Cada sensor está calibrado de forma precisa, los coeficientes de calibración se almacenan en forma de programa en la computadora de un solo chip y se denominan en el proceso de procesamiento de la señal de detección dentro del sensor. La interfaz de bus único estándar hace que la integración del sistema sea fácil y rápida. Debido al tamaño ultra pequeño y el consumo de energía muy bajo, la distancia de transmisión de la señal puede alcanzar más de 20 metros, lo que la convierte en la mejor elección para todo tipo de aplicaciones e incluso las aplicaciones más exigentes.

Sistema de calefacción: El sistema de calefacción consta de 12v 21W lámpara y un ventilador de 12 V de alta calidad con doble rodamiento de bolas y tecnología sin escobillas. Los materiales principales están hechos de PBT termoplástico. El tamaño del ventilador es de 80x80x25mm, sus valores de tensión nominal de 12 VCC con una corriente nominal de 0.2A y un consumo de energía nominal de 2,4W. El flujo de aire de 12,18 CFM (pies³/min) ~ 36,48 CFM (pies³/min) y un nivel de ruido de <10dB(A) ~ <33dB(A).

Sistema de humidificación: El dispositivo humidificador es ultra-silencioso, y su diseño permite el ahorro de energía. Consta de ajuste de niebla suave y se apaga automáticamente cuando el tanque está vacío. Consta con las lámparas empotradas para la mejor visualización del líquido. El dispositivo tiene un indicador de humidificación que permite cambiar y ajustar el humidificador según el volumen de niebla necesario.

Sistema de iluminación: El sistema de iluminación consiste en una cinta LED cuyas especificaciones son las que siguen; es de color blanco similar a luz diurna con temperatura de color 6000-6500K. La cinta consta de LEDs del tipo 2835 de un solo color cuya cantidad de LEDs son de 300 piezas. La longitud de la tira de luz es de 5 metros. Tiene 2140 lúmenes y un ángulo de radiación 120°. Consta de protección de ingreso IP20. Su adaptador de corriente tiene una potencia de 24W y un voltaje de trabajo de 12V Corriente Continua de salida y un voltaje de entrada 100-240 V Corriente Alterna a una frecuencia de 50/60 Hz.

Producción del hongo *Trichoderma asperellum* en sustrato sólido dentro del biorreactor

Sustrato y tratamiento

Se lavaron los sustratos arroz parbolizado y 14 olotes de maíz (Amaro et al., 2015), tres veces con agua de canilla y luego tres veces con agua destilada. Posteriormente, se llevó a cabo la molienda de los olotes de maíz previamente cortados en partes pequeñas para facilitar el triturado. Una vez obtenido el triturado de los olotes se llevó a estufa durante 4 horas a 90°C (Palacios-Rojas, 2018), luego se procedió a colocar tanto los granos de arroz como el triturado de olotes en frascos de vidrios previamente desinfectados y se autoclavó durante 15 minutos a 121°C para después ser distribuidos 600 gramos en cada una de las bandejas. El arroz parbolizado fue suplementado con melaza al 1% para acelerar el proceso de fermentación pues esta presenta nutricionalmente un contenido alto en hidratos de carbono simples y azúcares, además de vitaminas del grupo B y

muchos minerales, entre los que se acentúan el hierro, el magnesio y el cobre, los cuales son elementos esenciales para los requerimientos nutricionales de *Trichoderma*. Asimismo, *Trichoderma* utiliza como fuente de nitrógeno algunos compuestos tales como aminoácidos, sulfatos y nitritos, los que se encuentran presentes como componentes de la melaza (Allori et al., 2017).

Condiciones de la fermentación

Se definieron 3 parámetros a controlar durante el proceso de fermentación. El parámetro de temperatura fue definido entre 25 y 28 grados Celsius. También se realizó control sobre la humedad del ambiente establecida entre 80 y 90%. El parámetro de fotoperiodo fue definido en luz blanca continua (24 horas) durante todo el proceso, llevado a cabo con luces LED. Dos de estos parámetros (temperatura y humedad) fueron monitoreados mediante el controlador STC-3028 con sensor propio.

El sistema de suministro de humedad a través del humidificador fue realizado con agua destilada y recargado en tres ocasiones, mientras que el ensamblaje del microventilador a la lámpara incandescente fue cubierto por un pedazo de papel en la parte posterior a modo de inducir una mayor generación de calor.

Inoculación

Dentro de la cabina de flujo laminar del laboratorio de Biotecnología Industrial se dispusieron en bandejas diferentes, los sustratos olote de maíz triturado y arroz. A ambos se le agregaron 25 explantes de *T. asperellum* TF7, respectivamente. Ambas bandejas fueron cerradas con papel aluminio para su transporte hasta el fermentador y una vez introducidas, se conectó el sistema completo al tomacorriente.

Resultados y Discusión

Ensamblaje de las partes de biorreactor.

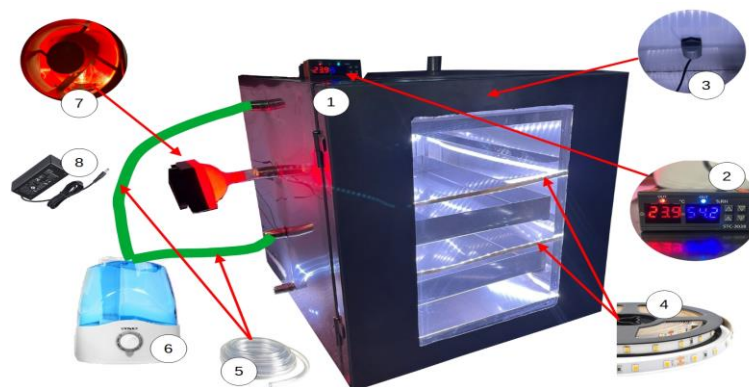


Figura 2. Esquema del funcionamiento del biorreactor.

Figure 2. Diagram of the operation of the bioreactor.

1. Gabinete del biorreactor: Es la parte principal del equipo y está construido en acero. Tiene un tamaño de 35x45x45 cm (longitud x profundidad x altura) y 2 cm de grosor. En su interior se

encuentran las bandejas soportadas por una estructura desmontable donde se colocan el sustrato y el hongo para su inoculación, además está instalado el sistema de iluminación y el sensor de temperatura y humedad. Consta de una puerta capaz de ser cerrada herméticamente y en el centro de la misma tiene un cristal para la visualización del proceso y su control.

2. Controlador de temperatura y humedad: Este dispositivo está en la parte superior del gabinete para su visualización óptima. En sus bornes están conectados los cables de alimentación con energía eléctrica alterna 220V 50 Hz, el cual permite el encendido del controlador; y también se encuentra conectado el sensor de temperatura y humedad. Para cada magnitud física a controlar el controlador consta de un display y un relé de control. En su display se visualiza la temperatura medida en Celsius y la humedad medida en porcentaje. Tiene un sistema de control ON/OFF que le permite mantener los parámetros controlados en un rango específico, que son configurados por el operador del biorreactor.

3. Sensor de temperatura y humedad: Este dispositivo está ubicado en el interior del biorreactor, adherido a la parte superior de las bandejas con una cinta doble faz. El cable del sensor tiene salida por un orificio superior para poder conectarse al controlador y medir estos parámetros.

4. Sistema de iluminación: Por medio de una cinta LED que se encuentra encendida permanentemente durante todo el proceso biológico. La cinta LED está energizada con 12 V con un adaptador o fuente de energía que convierte la corriente alternada de 220v a corriente continua de 12V.

5. Mangueras transparentes de PVC: Permiten la unión del humidificador al gabinete a través de dos orificios en el costado derecho del mismo. Es transparente solamente con el propósito de verificar que no haya condensaciones de la niebla o vapor frío de agua.

6. Sistema de humidificación: Consta del humidificador y un adaptador para bifurcar a las mangueras de PVC, el equipo genera vapor frío utilizando oscilaciones de ultrasonido. El dispositivo humidificador al estar diseñado para usar en piezas grandes no necesita un ventilador extra para introducir la humedad dentro del biorreactor, haciendo práctica su implementación. El reservorio que tiene el humidificador permite largas horas de humidificación sin necesidad de estar recargando de forma frecuente.

7. Sistema de calefacción: Consta de tres piezas principales para su funcionamiento, la primera es el ventilador o cooler que aspira aire frío del entorno para hacerlo pasar por la segunda pieza que es una lámpara incandescente, la cual se calienta al encenderse, y finalmente la tercera parte es un adaptador que fija el sistema a un orificio al costado del biorreactor y finalmente pasando al interior del biorreactor el aire calentado causando el aumento de la temperatura interior del biorreactor. El sistema está en contacto con un relé del controlador que apaga y enciende según la necesidad del dispositivo. El conjunto se alimenta con un voltaje continuo de 12V que sale del adaptador de energía.

8. Adaptador de energía: Es el conversor de corriente alterna de 220V a corriente continua 12V que son necesarias para el funcionamiento de la cinta LED y el sistema de calefacción.

Crecimiento del hongo *Trichoderma asperellum* mediante el biorreactor

Se observa el sustrato olote de maíz triturado (Figura 3) y los granos de arroz parbolizado (Figura 4) en la hora 0 del proceso de fermentación, luego del pre-tratamiento de los mismos para asegurar su esterilidad.



Figura 3. Sustrato olote inoculado con *Trichoderma asperellum* TF7 al inicio de la fermentación.

Figure 3. Crushed corn cob substrate inoculated with *Trichoderma asperellum* TF7 at the start of the fermentation.



Figura 4. Inoculación de los explantes de *Trichoderma asperellum* TF7 en el sustrato arroz-melaza.

Figure 4. Inoculation of the explants of *Trichoderma asperellum* TF7 in the rice-molasses substrate.

Se registró el crecimiento del hongo de color verdoso en el olote de maíz a las 72 horas de ser inoculado (Figura 5), mientras que el arroz parbolizado suplementado con melaza al 1% a las 48 horas (Figura 6).

La fermentación se llevó a cabo durante 72 horas y se pudo observar un crecimiento de biomasa elevado debido a las condiciones de fermentación utilizadas que fueron óptimas, tal como lo mencionan otros autores en sus pruebas de efecto y temperatura de la luz en aislados de *Trichoderma spp.*



Figura 5. Crecimiento de *Trichoderma asperellum* TF7 en arroz parbolizado suplementado con melaza al 1%.

Figure 5. Growth of *Trichoderma asperellum* TF7 in parboiled rice supplemented with 1% molasses.



Figura 6. Crecimiento de *Trichoderma asperellum* TF7 en olote de maíz triturado.

Figure 6. Growth of *Trichoderma asperellum* TF7 in crushed corn cob.

A final de la fermentación se obtuvo 17,6 y 17,7 g de esporas secas para olote de maíz y arroz-melaza, respectivamente, separadas del sustrato mediante un proceso de tamizado. A partir de esto, se realizó una serie de diluciones para el conteo de esporas del hongo, donde se puede observar que el sustrato arroz-melaza produce una mayor cantidad de esporas (Figura 7).

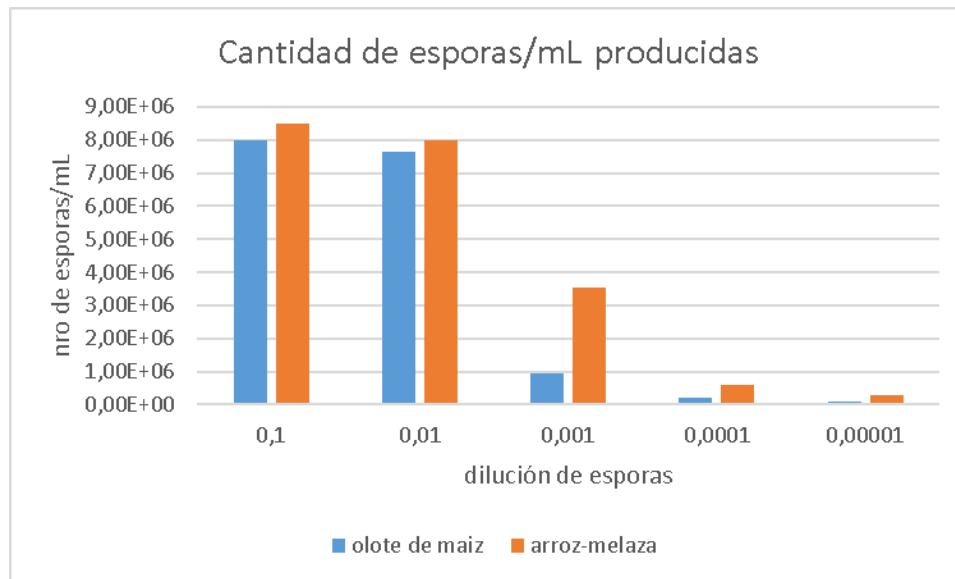


Figura 7. Comparación entre las esporas observadas en cada una de las diluciones de ambos sustratos.
Figura 7. Comparison between the spores observed in each of the dilutions of both substrates.

El proceso se realizó mediante cámara de Neubauer y las diluciones de esporas se realizaron con Tween 20 a partir de la biomasa obtenida por tamización de los sustratos.

Si bien la cantidad de biomasa en peso seco obtenida es mayor en el sustrato olote de maíz, se observó una mayor cantidad de esporas obtenidas en el sustrato arroz-melaza. Esto se debe a que, durante el proceso de separación por tamizado, parte de la biomasa del olote fue arrastrada, mientras que el tamizado en el sustrato arroz-melaza fue más eficiente.

Conclusión

El diseño desarrollado fue capaz de cumplir con los requisitos de un proceso fermentativo: control eficiente de los parámetros temperatura y humedad durante todo el proceso. No obstante, no fueron analizados los parámetros de transferencia de oxígeno y agitación, que se consideran puntos débiles de los sistemas de fermentación en estado sólido.

Si bien el tipo de biorreactor demanda una menor energía para la esterilización debido a su diseño, los dispositivos utilizados para el montaje del biorreactor permitieron un control relativamente alto de esterilidad. Las limitaciones en lo que se refiere a la esterilización de un biorreactor tipo Koji debido a que son equipos de gran tamaño lo que dificulta la esterilización por autoclavado, y hechos de material corrosible que no pueden ser esterilizados fácilmente mediante métodos químicos convencionales representa una desventaja al momento de realizar una fermentación en estado sólido. Una de las alternativas para mitigar este inconveniente es la implementación de una combinación de distintas

técnicas de desinfección para evitar contaminaciones durante la inoculación o los procesos de muestreo para medición de biomasa.

También es importante resaltar que un paso fundamental antes de realizar el proceso de inoculación es el pretratamiento de los sustratos a utilizarse pues esto supone una forma de biodisponer los nutrientes que requieren los microorganismos para su crecimiento.

El sistema se caracteriza por ser flexible en cuanto a modificaciones para una mayor optimización, siendo posible el acople de un sistema de registro de datos durante todo el tiempo de fermentación.

Perspectivas a futuro del BR en bandeja y aplicaciones

El diseño de biorreactores a escala piloto es de gran interés debido a que permiten modelar más a fondo los procesos biológicos asociados al uso de estos equipos y facilita la realización de procesos de escalado con mayor eficiencia.

Detrás de los productos de interés comercial que pueden ser obtenidos a través de los fermentadores existe un amplio campo de estudio que une los factores asociados al tipo de proceso biológico y el análisis de las variables que podrán ser controladas con el equipo.

La fermentación en estado sólido se aplica de forma masiva a la producción de hongos, ya sea comestibles o microscópicos, para la obtención de biomasa o metabolitos secundarios propios del microorganismo, y el análisis de las tecnologías aplicadas al control de los parámetros de una fermentación representan un paso fundamental para definir metodologías que garanticen la calidad y viabilidad de los cultivos.

Los biorreactores con operación en estado sólido constituyen una alternativa muy importante para la revalorización de subproductos de industrias alimentarias o agroindustrias, que son tratados como desechos y en muchos casos implican altos niveles de polución ambiental, por lo que este tipo de reactor biológico es una herramienta ecológica para la obtención de productos de interés.

Cabe resaltar que la utilización de estos equipos conlleva una revisión profunda acerca del tipo de fermentación y las variables a incluir, esto debido principalmente a que los factores como flujo de aire y homogeneización del cultivo son difíciles de manejar; no obstante, considerando las ventajas que posee el sistema de FES en biorreactores tipo Koji, éste constituye una herramienta potencialmente muy útil, y es de gran relevancia continuar con el desarrollo de diseños optimizados paralelamente con el análisis de los fenómenos de transporte que involucran la fermentación, para llegar a cubrir la demanda de control de todos los parámetros relacionados.

Agradecimientos

Queremos agradecer principalmente a la Dra. Andrea Arrúa por su constante guía para la realización de este proyecto, así como al Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT) por brindarnos las puertas abiertas cuando lo necesitamos. Al Dr. Gilberto Benítez, a los Lic. José Escurra y Lic. Shaun McGahan por su predisposición de siempre a ayudarnos, a los Lic. Gustavo Domínguez,

Lic. Leticia Casco y colaboradores que nos dieron la oportunidad de optimizar su biorreactor, a todo el Departamento de Biotecnología por el apoyo durante las tardes de trabajo en la facultad.

Fuente de Financiamiento

Sin financiamiento externo.

Contribución de autores

Concepción del estudio: R.N.C.C., L.D.S.D., A.T.R. **Diseño del experimento:** R.N.C.C., L.D.S.D., A.T.R. **Ejecución del experimento:** R.N.C.C., L.D.S.D., A.T.R. **Verificación del experimento:** R.N.C.C., L.D.S.D., A.T.R. **Análisis/interpretación de datos:** R.N.C.C., L.D.S.D., A.T.R. **Análisis estadísticos:** **Preparación del manuscrito:** R.N.C.C., L.D.S.D., A.T.R. **Edición y revisión del manuscrito:** R.N.C.C., L.D.S.D., A.T.R. **Aprobación de la versión final del manuscrito:** R.N.C.C., L.D.S.D., A.T.R.

Referencias Bibliográficas

- Amaro, J., Romero-Arenas, O., Rivera, T. & Huerta, L. (2015). Producción de *Trichoderma viride* en diferentes sustratos agrícolas. Congreso Latinoamericano de Agroecología. La Plata, Argentina.
- Allori Stazonelli, E., Yasem de Romero, M.G. y Ploper, L.D. (2017). Evaluación de sustratos para la producción de esporas de *Trichoderma* y estudio del crecimiento en arroz de las cepas antagonistas TPT03, TPT02, MRT35 y MRT40. *Revista agronómica del noroeste argentino*, 37(1), 57-66. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2314-369X2017000100006&lng=es&tlng=es
- Chávez-García, M., Montaña-Lara, J., Martínez-Salgado, M., Mercado-Reyes, M., Rodríguez, M., y Quevedo-Hidalgo, B. (2008). Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma sp.* *Universitas Scientiarum*, 13(3), 245-251. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832008000300003&lng=en&tlng=es.
- Costa, M., Torres M. y Reyes, A. (2012). Caracterización de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* producidas en fermentación sólida. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 208-215 http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752012000100019&lng=en&tlng=es.
- Durand, A. (2003). Diseños de biorreactores para fermentación en estado sólido. *Revista de ingeniería bioquímica*, 13 (2-3), 113–125. doi:10.1016/s1369-703x(02)00124-9 .
- González, A., Mas, S., Cabeza, D. y Campos, M. (2000). Influencia de la luz solar en el crecimiento y esporulación del biofungicida *Trichoderma viride*. *Tecnología química*, 20(1): 92-98.
- Manan, M. & Webb, C. (2020). Newly designed multi-stacked circular tray solid-state bioreactor: analysis of a distributed parameter gas balance during solid-state fermentation with influence of variable initial moisture content arrangements. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(16). <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00307-9>.
- Marín Cárdenas, A., García Rodríguez, A., Herrera Coello, N., y Gómez Rodríguez, L. (2008). Estudio del proceso de fermentación de la tecnología simplificada de producción de biomasa proteica por

- escalado inverso del biorreactor de una planta industrial. *Revista Centro Azúcar*, 35(1). http://centroazucar.uclv.edu.cu/index.php/centro_azucar/article/view/489.
- Moreno, E. y Vanegas, D. (2017). Diseño y construcción de un biorreactor esterilizable y de bajo costo para el estudio de crecimiento de microorganismos (Tesis de grado). Universidad Distrital Francisco José de Caldas]. Repositorio Institucional de la Universidad Francisco José de Caldas RIUD <https://repository.udistrital.edu.co/handle/11349/12989>.
- Palacios-Rojas, N. (2018). Calidad nutricional e industrial de Maíz: Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz "Evangalina Villegas" CDMX, México. CIMMYT <https://repository.cimmyt.org/handle/10883/19667>.
- Pineda-Insuasti, J. A., Benavides-Sotelo, E. N., Duarte-Trujillo, A. S., Burgos-Rada, C. A., Soto-Arroyave, C. P., Pineda-Soto, C. A., Fierro-Ramos, F. J., Mora-Muñoz, E. S., y Álvarez-Ramos, S. E. (2017). Producción de biopreparados de *Trichoderma spp*: una revisión. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(1), 47-52 <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223153894008.pdf>.
- Robinson, T. y Nigam, P. (2003). Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 197-203. doi:10.1016/S1369-703X(02)00132-8.
- Robinson, T., Singh, D., y Nigam, P. (2002). Fermentación en estado sólido: Una tecnología microbiana promisoría para la producción de metabolitos secundarios. *Vitae*, 9(2),27-36 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169818107003>.
- Rodríguez Pérez, S., Crescencia Arone, M. A., Soria Calzadillo, J., Aguilera Rodríguez, I. A. y Serrat Díaz, M.J. (2017). Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos". *Afinidad. Revista de Ingeniería Química teórica y aplicada*, 74(577) <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/320783>.
- Ruiz-Leza, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J. C. y Aguilar, C. N. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 33-40.
- Sandoval Vega, M. C. y Noeltling Zenobio, M. C. (2011). Producción de conidios de *Trichoderma harzanium rifai* en dos medios de multiplicación. *Fitosanidad*, 15(4),215-221. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=2091236p82003>.
- Silva, J., Santos, N., Halfeld-Viera, B., Nechet, K. y Morandi, M. (2013). Determinación de la temperatura y fotoperiodo ideales para el crecimiento y esporulación de *Trichoderma* en medio líquido. *Congreso Interinstitucional de Iniciación Científica* N° 13422 <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/90709/1/2013AA40.pdf>
- Socol C., Scopel E., Junior L., Grace S., Lorenci, A. y Porto de Souza, L. (2017). Recent developments and innovations in solid-state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 52-71 <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>.
- Vandenbergh, L. P. S., Pandey, A. y Carvalho, J. C. (2021). Solid-state fermentation technology and innovation for the production of agricultural and animal feed bioproducts. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 1, 142–165. doi:10.1007/s43393-020-00015-7.
- Vásquez J. A. (2010). Caracterización microbiológica y producción de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en cultivo artesanal. (Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana). Repositorio Institucional de la Pontificia Universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8662/tesis615.pdf?sequence=1&isAllowed=y>