

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

**Fermentación en Estado Sólido de Subproductos de la
Industria Arrocera, para el Crecimiento y Esporulación
del Hongo Entomopatógeno *Metarhizium anisopliae***

Por: Blas Dorta D.

Trabajo de Tesis para optar al grado de
Doctor en Ciencias Bioquímicas.
Orientación Industrias Bioquímicas.

Director: Dr. Rodolfo J. Ertola

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas, orientación Industrias Bioquímicas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), bajo la dirección del Dr. Rodolfo J. Ertola

Ms 874



DONACION.....
Fecha **30 MAYO 1997**
211027

a mi madre
a mis hermanos
a Cruz y a Raquel Valentina

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rodolfo J. Ertola por haber dedicado su valiosa experiencia a la dirección del presente trabajo.

Al Dr. Jorge Alfredo Arcas por su crítica permanente a las ideas y estrategias desarrolladas.

A la Lic. Alejandra Bosch por su valioso apoyo en la realización del trabajo experimental.

Al Ing. Agr. Alfonso Vidal por el suministro de los subproductos utilizados en la formulación de los medios de cultivo.

A los Doctores Cristina Añon y Ricardo Samponi por haberme permitido el uso de las instalaciones y equipos del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).

Al Dr. Carlos Mignone por sus oportunas sugerencias.

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV) y a la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho (FUNDAYACUCHO), por haberme otorgado las sucesivas becas, que hicieron posible la realización del presente trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) por haber permitido mi inserción en la Carrera de Doctorado, y haberme facilitado el uso de sus instalaciones y equipos.

A la Embajada de Venezuela en la República Argentina, por haber canalizado mi conexión con la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho, a través del servicio de Valija Diplomática.

A todo el personal del Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI).

A la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

A Cruz y a Raquel Valentina.

CONTENIDO

Introducción.....	1
Características del crecimiento de hongos filamentosos sobre sustratos sólidos.....	4
Factores que afectan el crecimiento de hongos filamentosos en sustratos sólidos.....	10
Aplicaciones de las fermentaciones sólidas.....	15
Empleo de las fermentaciones sólidas en la producción de bioinsecticidas fúngicos.....	16
Características generales de los bioinsecticidas fúngicos.....	16
Producción de bioinsecticidas fúngicos.....	19
Objetivos.....	24
Materiales y métodos.....	25
Microorganismo.....	25
Productos utilizados en la formulación de los medios de cultivo.....	25
Análisis de la composición centesimal del afrecho de arroz.....	26
Determinación de la capacidad de retención de agua del afrecho y la cáscara de arroz.....	26
Medios de cultivo.....	27
Medio de afrecho (MA).....	27
Medio de afrecho-cáscara (MAC).....	27
Caldo de afrecho (CA).....	28
Determinación de la actividad acuosa (a_w) en los medios de cultivo.....	28
Preparación de los inóculos.....	29
Fermentaciones en sustrato sólido sin ai- reación forzada.....	29
Fermentaciones en sustrato sólido con ai- reación forzada.....	29

Cultivos sumergidos.....	30
Determinación del peso seco de la materia fermentada (G_s).....	30
Determinación de la biomasa en las fermentaciones sólidas.....	31
Determinación de M_e	32
Determinación de G_e	32
Determinación de la biomasa en cultivos sumergidos.....	33
Medida del grado de esporulación.....	33
Análisis de la composición elemental de la biomasa.....	34
Medida del consumo de O_2 y producción de CO_2	34
Medida del consumo de azúcares.....	36
Medida de los cambios de volumen de los espacios libres en el seno de la materia fermentada.....	37
Resultados y Discusión.....	38
Diseño de medios de cultivo en base a sub-productos de la industria arrocera.....	39
Componentes básicos y ajuste del contenido de agua.....	39
Efecto de la actividad acuosa inicial sobre la esporulación.....	45
Efecto de la cáscara de arroz sobre la esporulación.....	47
El medio MAC como alternativa en la producción de esporas de <i>M. anisopliae</i>	49
Factores limitantes del crecimiento.....	51
Consideraciones teóricas.....	51
Crecimiento en caldo CA.....	55
Crecimiento en los medios MA y MAC.....	60
Variaciones en los sólidos ini-	

ciales, manteniendo constante la densidad aparente.....	62
Variaciones en la densidad apa- rente, manteniendo constantes los sólidos iniciales.....	71
Estequiometría y cinética del crecimiento y esporulación.....	76
Formulación de balances de materia y energía.....	76
Balances de materia y energía aplica- dos a las fermentaciones sólidas sin aireación forzada en medio MAC.....	88
Estudios cinéticos.....	93
Determinación de la velocidad es- pecífica de crecimiento.....	97
Variaciones en el volumen de los espacios libres interpartículas durante el crecimiento.....	99
Cambios térmicos durante el crecimien- to y generación de gradientes hídricos. Efecto sobre la respuesta esporulativa.....	101
Balance hídrico en las fermentaciones sóli- das sin aireación forzada.....	106
Consideraciones teóricas.....	108
Evaluación de la tranferencia de agua desde el interior al exterior del fer- mentador (W_{lib}).....	110
Balance hídrico en las fermentaciones con la cepa E_6 en el medio MAC.....	114
Efecto de la actividad acuosa sobre el balance hídrico.....	116
Conclusiones generales.....	119
Apéndice.....	123
Referencias.....	126

INTRODUCCION

Los términos "fermentación en estado sólido" o "fermentación de sustratos sólidos" (FSS) han sido aplicados indistintamente, y con algunas imprecisiones, a aquellos procesos en que los microorganismos obtienen sus requerimientos nutricionales a partir de materiales sólidos insolubles o muy poco solubles en agua. Así, las FSS han sido definidas como aquellas fermentaciones en que el sustrato no es líquido (Hesseltine 1972), o como las fermentaciones en que el sustrato no está ni solubilizado ni en suspensión en grandes volúmenes de agua (Raimbault 1980), o en forma más precisa como las fermentaciones en las que el crecimiento de los microorganismos ocurre en ausencia de agua libre (Cannel y Moo-Young 1980).

La definición de Cannel y Moo-Young, a diferencia de las anteriores, establece un límite máximo en el contenido de agua del sustrato para que su fermentación sea considerada en estado sólido. Sin embargo, en los distintos materiales comunmente empleados en FSS (cereales, afrechos, pulpa de madera, tubérculos etc.) es difícil determinar en la práctica los límites exactos en el grado de humectación, a partir de los cuales comienza a aparecer agua libre. No obstante puede hacerse una aproximación al respecto si se conocen las isoterms de adsorción-desorción de agua correspondientes a cada material. Estas pueden construirse a partir de medidas experimentales de los niveles de actividad acuosa (a_w) que

corresponden a distintos grados de humectación del sustrato sólido a ser fermentado, siendo a_w un parámetro termodinámico que relaciona la presión de vapor de la mezcla sólido-agua con la del agua pura. En condiciones de equilibrio, $a_w \times 100$ es igual a la humedad relativa del sistema.

En una isoterma de adsorción de agua, correspondiente a un material orgánico sólido (como por ejemplo un alimento típico) se pueden distinguir tres regiones: A, B, y C (Fig. 1), las cuales se diferencian por la magnitud de las fuerzas de unión predominantes entre el agua y el sólido.

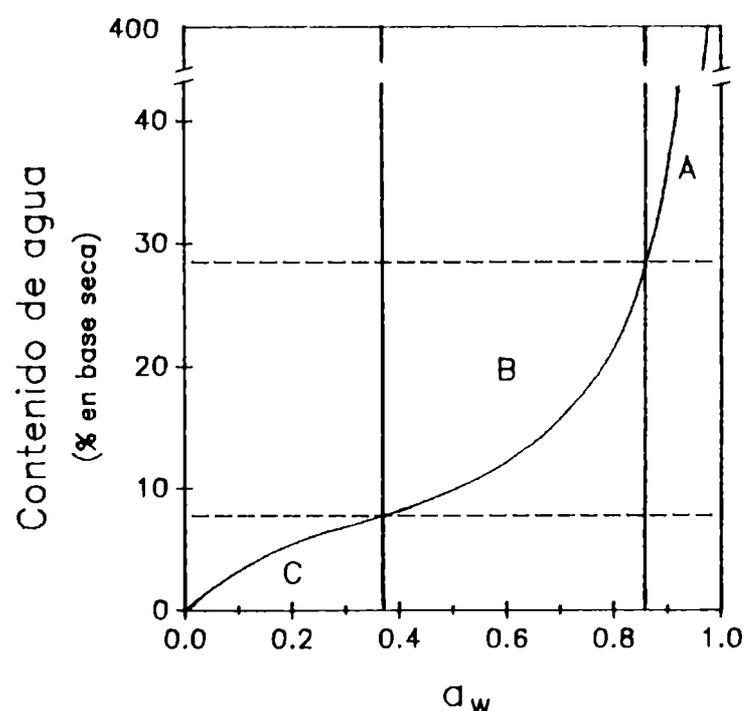


Fig. 1 Representación de una isoterma de adsorción de agua de un alimento sólido característico. (Duckworth 1974), adaptado de Troller y Christian (1978).

En la región C, el agua estaría fuertemente adsorbida en forma de monocapa, comportándose en muchos casos como parte del sólido. En este estado, el agua es de difícil

remoción, requiriéndose gran cantidad de energía para su evaporación.

En la región B de la isoterma el agua se encuentra adsorbida en múltiples capas, siendo las fuerzas de unión más débiles que en la región C. Es en los límites entre ambas regiones donde pequeños cambios en el contenido de agua del sólido, producen cambios considerables en la actividad acuosa del sistema, o lo que es lo mismo, se necesitan grandes cambios en la actividad acuosa para producir una apreciable evaporación o condensación de agua.

A diferencia de las regiones B y C, el cambio brusco de la isoterma en la región A indica la acción de fuerzas muy débiles, por lo que el agua, atrapada mecánicamente en el sistema es considerada libre. Esta región de cambio súbito puede distinguirse en las isotermas descritas para varios cereales, afrechos, pulpa de remolacha, celulosa etc. (Iglesias y Chirife 1982), a valores de a_w comprendidos en el intervalo 0.8 - 0.9. Esos productos son empleados con frecuencia como sustratos en fermentaciones sólidas (Sato *et al.* 1982; Sato *et al.* 1983; Narahara *et al.* 1984; Grajek y Gervais 1987; Gervais *et al.* 1988), con microorganismos cuyos valores óptimos de actividad acuosa (Corry 1978) se ubican en la región de la correspondiente isoterma que indica la presencia de agua libre en el sistema. En consecuencia, la restricción que al respecto es impuesta por la definición de FSS *sensu* Cannel y Moo-Young (1980) tendría que ser reconsiderada.

El concepto de actividad acuosa fue introducido en microbiología (Scott 1953) en sustitución de los parámetros tradicionalmente usados (contenido de agua, presión osmótica, concentración de solutos etc.), para describir los requerimientos hídricos asociados a la actividad microbiana. Desde entonces ha habido gran coincidencia en considerar que durante el desarrollo de procesos fermentativos en sustrato sólido, el estado fisiológico de los microorganismos intervinientes es altamente dependiente del parámetro a_w , como una medida del estado energético del agua dentro del sistema (Brown 1976; Griffin 1977; Narahara 1977; Brown 1978; Troller 1980). Así, la demostración del efecto altamente significativo de la actividad acuosa sobre el crecimiento de *Penicillium roqueforti* en sustrato sólido, bajo condiciones en que las variaciones en el contenido de humedad no modificaron significativamente el desarrollo del hongo (Gervais et al. 1988), es una clara evidencia de que el adecuado suministro de agua para el crecimiento depende de su disponibilidad (a_w) más que de su contenido *per se*.

Características del crecimiento de hongos filamentosos sobre sustratos sólidos

En los últimos años ha habido un progreso significativo en el conocimiento de las bases moleculares del crecimiento y diferenciación celular en hongos filamentosos (Smith 1975; Turian 1977; Smith et al. 1977; Cole 1986). Esto ha permitido la formulación de modelos que describen las principales transformaciones citológicas que tienen lugar durante el

desarrollo vegetativo, caracterizado por la extensión apical de las hifas (Grove et al. 1970; Bartnicki-García et al. 1979) y durante la formación de propágulos reproductivos asexuales o conidias (Cole 1986).

En forma resumida, puede describirse la elongación de las hifas como el proceso que resulta de la síntesis de material celular (principalmente componentes de la pared) en la región apical, y la translocación hacia dicha zona de otros componentes previamente formados: núcleos, mitocondrias, ribosomas etc. (Smith 1975). En la medida en que las hifas crecen van surgiendo ramificaciones en las cercanías de la región apical, y el protoplasma se mueve continuamente ocupando las áreas recién formadas. Como consecuencia, las regiones más viejas de las hifas van quedando vacías.

Por analogía con los sistemas unicelulares, en que cada célula individual constituye una unidad de crecimiento, que aumenta en longitud o diámetro hasta que la división ocurre, se ha definido unidad de crecimiento en hongos filamentosos (Pomeley 1959) como la distancia promedio de elongación de las hifas emergentes previo al surgimiento de una nueva ramificación, o dicho de otro modo, la distancia promedio entre dos ramificaciones contiguas. Así:

$$\text{Unidad de crecimiento } (\mu\text{m}) = \frac{\text{Longitud total de las hifas } (\mu\text{m})}{\text{número de ramificaciones}}$$

Durante el crecimiento, el número de ramificaciones incrementa exponencialmente (Trinci 1974). Así, independien-

temente de la velocidad de elongación de cada unidad de crecimiento, la longitud total de todas las hifas también incrementa exponencialmente (Smith 1975).

De acuerdo con el modelo desarrollado por Trinci (1971) para el crecimiento de hongos filamentosos en superficies planas, como por ejemplo una placa de agar, el incremento en masa de cada colonia, en sus primeras fases de desarrollo, sigue una ley exponencial. Sobrepasado un cierto tamaño, la velocidad de difusión de nutrientes hacia la región central de la colonia es más baja que la velocidad de consumo, lo que conduce a una rápida transición hacia el cese del crecimiento en dicha zona. Como consecuencia, sólo una delgada franja de espesor constante en la región periférica crece exponencialmente. Esto hace que el crecimiento de la colonia, medido por los incrementos en el radio, se aproxime a la linealidad.

Es prácticamente imposible aplicar el modelo de Trinci (1971) al crecimiento de hongos filamentosos sobre los sustratos que comunmente se emplean en fermentaciones sólidas (productos o subproductos de la agroindustria), ya que los mismos, en su mayoría particulados, al ser empacados en pilas o dentro de fermentadores dan lugar a una matriz porosa, cuya estructura es difícil de caracterizar en términos geométricos. Sobre estos sustratos, los hongos filamentosos desarrollan un patrón de crecimiento heterogéneo, con hifas que penetran en el interior de las partículas sólidas, otras firmemente adheridas a su superficie y otras en los espacios aéreos interpartículas (Viesturs et al. 1981; Laukevics et

al. 1984; Laukevics et al. 1985; Desfarges et al. 1986), mostrando cada tipo de hifas características fisiológicas particulares. Este patrón de crecimiento en que el micelio forma una intrincada red en estrecha asociación con la matriz sólida, no permite la directa evaluación de la biomasa por los procedimientos gravimétricos convencionales. En consecuencia, la realización de estudios cinéticos obliga a hacer determinaciones de la biomasa en base a medidas indirectas de algunos de sus constituyentes, o alternativamente a evaluar algún producto metabólico asociado al crecimiento (Moo-Young et al 1983).

La evaluación de la biomasa en fermentaciones sólidas, siguiendo las estrategias antes mencionadas, lejos de ser un problema resuelto, presenta serias limitaciones.

En primer lugar cabe destacar los posibles errores que se pueden cometer cuando se hacen inferencias sobre la biomasa total, en base a medidas de alguno de sus componentes, si el mismo está presente en muy baja proporción y/o varía en contenido en las distintas fases del crecimiento. Este inconveniente se presenta con algunos de los métodos disponibles, basados en determinaciones de: ADN, ARN, ATP (Wang et al. 1979); N-acetilglucosamina (Ride y Drysdale 1972; Swift 1973; Aidoo et al. 1981); ergosterol (Matcham et al. 1985).

Si bien otros componentes de la biomasa, como es el caso de las proteínas, son más abundantes, su utilidad en la evaluación del crecimiento (Ehresmann et al. 1973; Moreira et

al. 1978; Wang et al. 1979) depende de su bajo contenido en el sustrato sólido a ser fermentado, siendo las condiciones ideales aquellas en que el sustrato debe ser suplementado con una fuente de nitrógeno inorgánico.

En segundo término habría que mencionar la dificultad de operar con muestras representativas, dada la estructura heterogénea de la materia fermentada. Esta limitación puede ser superada cuando los procesos son realizados en pequeña escala, ya que en esas circunstancias la materia fermentada puede ser procesada en su totalidad para hacer los análisis correspondientes.

En procesos realizados a gran escala es una práctica frecuente evaluar el crecimiento en base a medidas de consumo de oxígeno (Harris 1979; Sato et al. 1983) o producción de dióxido de carbono (Carrizales et al. 1981). Si bien estas variables son una expresión del funcionamiento del sistema en su globalidad (independientemente del grado de heterogeneidad de la materia fermentada), su uso en la estimación de la biomasa se restringe a la fase de crecimiento activo, en sistemas que operan bajo condiciones de aireación forzada. Bajo estas condiciones es posible calcular velocidades de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono, en base a medidas de la composición de gases en la entrada y la salida del fermentador. Sin embargo, estas variables no pueden ser medidas como una respuesta global del sistema en procesos fermentativos realizados sin aireación forzada (procesos en bandejas, composteros etc.), por lo que en la práctica estos sistemas son difíciles de caracterizar en

términos cinéticos.

Desde el punto de vista práctico, el cambio morfológico más importante en el desarrollo de hongos filamentosos en sustratos sólidos es la esporulación, ya que su inicio marca las etapas finales en la acumulación de biomasa.

Esta habilidad para cambiar de la forma de crecimiento vegetativo (filamentoso) a la forma reproductiva, generalmente esférica (conidias), es el resultado de modificaciones significativas en la expresión genética, en respuesta a alteraciones fisicoquímicas ambientales. La consecuencia es el establecimiento de un nuevo patrón de desarrollo con características metabólicas y morfológicas propias (Turian 1974).

La conidiogénesis ocurre generalmente a través de dos mecanismos o formas de desarrollo: blástico y tálico (Cole 1986). El desarrollo blástico se caracteriza por la diferenciación apical o lateral de una hifa fértil, mediante el ensanchamiento y síntesis *de novo* de material celular y la formación de un septo basal. El desarrollo tálico ocurre por la conversión de segmentos enteros de una hifa en conidias terminales o intercaladas (conidias holotálicas), o por conversión y desarticulación de un segmento de hifa en muchas conidias (conidias árticas). Aunque en el desarrollo tálico puede ocurrir un pequeño alargamiento con síntesis secundaria de pared celular, las conidias tálicas son morfogenéticamente diferentes de las blásticas, en las que el crecimiento *de novo* es una característica básica.

Por lo general se asocia el inicio de la esporulación con el cese del crecimiento vegetativo, debido al agotamiento de nutrientes o al efecto de algún otro factor limitante (Moo-Young *et al.* 1979; Raimbault y Alazard 1980; Ulmer *et al.* 1981; Viesturs *et al.* 1981; Chahal y Moo-Young 1981; Cole 1986; Larroche *et al.* 1988).

Cuando las velocidades específicas de incorporación y utilización de nutrientes son constantes, se considera que el crecimiento del hongo es balanceado, en cuyo caso se mantiene la morfología vegetativa (Bu'Lock 1975). Bajo esas condiciones el desarrollo miceliar es regulado por interacciones génicas más que por factores ambientales (Smith *et al.* 1981).

Cualquier modificación ambiental que conduzca a un crecimiento no balanceado, con alteraciones metabólicas significativas, podría cambiar el patrón de expresión génica característico del desarrollo vegetativo y dar inicio a la diferenciación de estructuras productoras de conidias. De acuerdo con Smith (1977), el desarrollo vegetativo y la esporulación deben ser considerados como procesos que compiten por intermediarios metabólicos limitantes, más que fenómenos mutuamente excluyentes.

Factores que afectan el crecimiento de hongos filamentosos en sustratos sólidos

El carácter particulado de los materiales que generalmente se emplean en fermentaciones sólidas, sumado a la naturaleza polimérica de sus principales constituyentes

(celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón etc.), conduce a la identificación de tres grupos de factores que afectan la dinámica de la bioconversión de estos materiales por hongos filamentosos.

En primer lugar están los factores que derivan de la macromorfología de las partículas, esto es, tamaño y forma, relación superficie/masa, naturaleza cristalina o amorfa, porosidad, difusividad dentro de las partículas, transferencia de masa desde y hacia la superficie, propiedades de adsorción-desorción de agua. Estos factores determinan la velocidad a la cual las distintas macromoléculas del sustrato se hacen **accesibles** al ataque por enzimas extracelulares.

En segundo término están los factores que afectan las actividades enzimáticas involucradas en la hidrólisis total o parcial de las macromoléculas mencionadas (pH, temperatura, humedad, concentración de sustrato y productos etc.), para dar lugar a subunidades que puedan atravesar la membrana celular. Estos factores determinan la velocidad a la cual los distintos compuestos asimilables se hacen **disponibles**.

En fermentaciones sólidas, los términos **accesibilidad** y **disponibilidad** de nutrientes están ligados al concepto de sustrato limitante, es decir, el sustrato de cuya concentración depende la velocidad específica de crecimiento durante el desarrollo de un determinado proceso.

Si el sustrato limitante debe estar disuelto para poder ser utilizado por el microorganismo (Moo-Young **et al.** 1983), entonces en la medida en que su solubilización desde las

partículas sólidas sea más rápida que su consumo, su concentración en la fase acuosa del medio de cultivo será saturante. Bajo esas condiciones la velocidad de consumo dependerá de la concentración celular, más que de los factores que derivan de la macromorfología de las partículas y/o de los que afectan las actividades enzimáticas extracelulares. Esta situación ha sido descrita en muchos sistemas fermentativos en sustratos sólidos (Raimbault 1980; Viesturs et al. 1981; Laukevics et al. 1984; Desfarges et al. 1986), donde la acumulación de azúcares reductores ha sido evidente. No obstante, altos niveles de estos azúcares puede traer aparejado una inhibición del crecimiento vegetativo (Viesturs et al. 1981). Por el contrario, si la velocidad de solubilización de nutrientes desde las partículas sólidas llega a hacerse más baja que la velocidad de consumo, entonces la velocidad de crecimiento dependerá de alguno de los factores antes mencionados que afectan la **accesibilidad** y/o **disponibilidad** de nutrientes (Huang y Chou 1989). Frente a este tipo de limitaciones, es una práctica común hacer el tratamiento previo de los materiales a ser fermentados, mediante procedimientos que alteren la macromorfología de las partículas, como son: **el empleo de vapor a alta presión** (Ulmer y Tengerdy 1981; Hecht et al. 1985; Doppelbauer et al. 1987), **molienda** (Tassinari y Macy 1977; Detroy et al. 1980; Kelsey y Shafizadeh 1980), **tratamiento con alcali** (Detroy et al. 1980; Ghosh et al. 1980; Detroy et al. 1981; Hecht et al. 1985). Alternativamente puede incrementarse la disponibilidad

de nutrientes mediante la suplementación con enzimas hidrolíticas (Larroche *et al.* 1988).

En el tercer grupo de factores que pueden afectar el crecimiento de hongos filamentosos en sustratos sólidos, se incluyen los relacionados con la estructura de la matriz que se obtiene cuando el material a ser fermentado es empacado en pilas o dentro de fermentadores. En estas circunstancias, el espesor de la matriz y el volumen de los espacios libres interpartículas juegan un papel fundamental en la transferencia de gases y de calor, especialmente en procesos fermentativos realizados sin aireación forzada.

Si el volumen de los espacios interpartículas es suficientemente grande, no serían necesarios el mezclado continuo y la aireación, ya que el oxígeno contenido en dichos espacios podría ser suficiente para cubrir la demanda durante el crecimiento. Sin embargo, en los sistemas en que los espacios libres son reducidos, puede requerirse el mezclado periódico para facilitar el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono con el ambiente. No obstante, esta práctica puede ocasionar la ruptura del micelio con la consecuente inhibición del crecimiento (Silman 1980; Viesturs *et al.* 1981).

El patrón de crecimiento mostrado por los hongos filamentosos en sustratos sólidos, en que una parte del micelio se desarrolla en los espacios libres interpartículas, hace que una reducida disponibilidad de esos espacios (rápidamente colonizables) pueda llegar a ser un factor limitante, aún bajo condiciones de óptimo intercambio de

gases con el ambiente. Este tipo de limitación o impedimento estérico al desarrollo del micelio ha sido descrita en fermentaciones sólidas de materiales lignocelulósicos (Laukevics *et al.* 1985) como responsable de los bajos rendimientos en biomasa que caracteriza a estos procesos.

En fermentaciones sólidas con aireación forzada, la mayor parte del calor generado por metabolismo puede ser transferido al aire como calor latente de vaporización de agua (Sato *et al.* 1982). En consecuencia, los incrementos en temperatura en el seno de la materia fermentada podrían ser evitados a expensas de una disminución en su contenido de agua, causado por evaporación. Sin embargo, esta estrategia es de aplicación limitada, ya que una disminución significativa en el contenido de agua del sistema puede afectar negativamente al crecimiento. Por el contrario, en fermentaciones sin aireación forzada, la ausencia de una corriente de aire fluyendo a través del sistema hace que la disipación del calor generado sea más dependiente de las propiedades térmicas y de las características geométricas de la matriz sólida, es decir, la conductividad térmica, el espesor del lecho, el área normal al flujo de calor.

La naturaleza misma de los materiales que generalmente se emplean en fermentaciones sólidas, sumado al bajo contenido de agua que caracteriza a estos procesos, hace que la conductividad térmica de la matriz sólida sea baja. Así, un incremento en el espesor de la matriz (característico del escalado de los procesos) puede disminuir significativamente

el coeficiente de transferencia térmica, con la consecuente acumulación de calor dentro del sistema y la elevación de la temperatura a niveles muchas veces incompatibles con el crecimiento.

Aplicaciones de las fermentaciones sólidas

Durante siglos, la bioconversión de sustratos sólidos ha sido aprovechada por el hombre a través de las llamadas **fermentaciones sólidas tradicionales**, cuyos principales exponentes los constituyen las fermentaciones alimentarias orientales, la maduración de quesos, el ensilaje y el composteo.

En la actualidad existe un renovado interés en el uso de las fermentaciones sólidas, motivado en parte por algunas ventajas comparativas frente a las clásicas fermentaciones sumergidas, como son: bajos costos de inversión en equipos, menor demanda energética, mayores productividades volumétricas, facilidad en la recuperación de productos, se evita el tratamiento de grandes volúmenes de líquidos residuales, menores riesgos de contaminación etc. (Hesseltine 1972). Ello ha permitido su gran difusión en procesos tales como: el enriquecimiento proteico de productos y subproductos agroindustriales (Raimbault y Alazard 1980; Viesturs **et al** 1981; Ulmer y Tengerdy 1981; Hecht **et al.** 1982; Rousos **et al.** 1983; Laukevics **et al.** 1984; González **et al.** 1985; Hours **et al.** 1985; Carrizales y Jaffé 1986; Rodríguez **et al.** 1986), el incremento en la digestibilidad de materiales lignocelulósicos destinados a la dieta animal (Zadrazil y Brunert 1982;

Levonen-Munoz **et al.** 1983; Agosin y Odier 1985; Nicolini **et al.** 1987; Rolz **et al.** 1987), la producción de enzimas (Hankin y Anagnostakis 1975; Toyama 1976; Silman 1980; Qadeer **et al.** 1980; Nishio **et al.** 1981; Zetelaki-Horvath 1984; Thompson y Eribo 1984; Deschamps y Huet 1985; Hours 1988), la producción de metabolitos (Ikeda **et al.** 1972; Kumar y Lonsane 1987; Kirimura **et al.** 1988), La producción de micotoxinas (Hesseltine 1972; Linderfelser y Ciegler 1974), la producción de esporas para ser usadas en transformaciones orgánicas (Singh **et al.** 1968; Sala y Burgos 1972; Elliott 1972; Vezina y Singh 1975; Larroche **et al.** 1988) y la producción de esporas para ser usadas en el control de plagas, aspecto que será tratado a continuación.

Empleo de las fermentaciones sólidas en la producción de bioinsecticidas fúngicos.

Características generales de los bioinsecticidas fúngicos.

A partir de los trabajos de Metschnikoff a finales del siglo pasado, sobre el uso de *Metarhizium anisopliae* en el control de larvas de *Anisoplia austriaca*, ha habido un especial interés en el desarrollo de la patología de insectos, teniendo como una de sus metas principales el control biológico de plagas. Desde entonces, una extensa variedad de hongos, bacterias, virus y nemátodos han sido identificados como entomopatógenos, constituyendo los hongos el grupo más prominente, pues se conocen más de 700 especies pertenecientes a alrededor de 90 géneros, como agentes

causales de infección (Alves 1986).

A diferencia de las bacterias, virus y nemátodos, los cuales deben ser ingeridos por el insecto para que la infección ocurra, los hongos entomopatógenos normalmente invaden a través de la cutícula, por lo que su acción se extiende a los estados de desarrollo en que la alimentación está ausente (huevos, pupas) y a aquellos adultos que por sus prácticas alimentarias (succionadores), son difíciles de controlar vía ingestión del agente.

La infección se inicia con la germinación de las esporas del hongo sobre la cutícula del insecto, proceso que requiere en muchos casos la presencia de una fuente de carbono exógena (Smith y Grula 1981; Hunt et al. 1984). En algunas especies puede observarse la formación de apresorios y una punta de penetración en la parte apical del tubo germinal (Alves 1986). El efecto mecánico de estas estructuras, combinado con la acción de proteasas, quitinasas y lipasas (Smith et al. 1981; Persson et al. 1984; Leger et al. 1986a, 1986b, 1986c; Brey et al. 1986) facilita la penetración del tubo germinativo hasta la cavidad general del cuerpo, donde ocurre la invasión de los distintos órganos y tejidos. Esta fase de la infección va acompañada generalmente por la producción de toxinas y metabolitos de bajo peso molecular con actividad insecticida (Claydon y Grove 1982; Dunphy y Nolan 1982; Farges y Robert 1986), los cuales, conjuntamente con el bloqueo mecánico del aparato digestivo causado por el crecimiento vegetativo, y otros daños físicos

(acción histolítica), llevan a la muerte del insecto. Seguidamente las hifas comienzan a emerger por los espiráculos y regiones intersegmentares, para dar lugar a un abundante crecimiento y esporulación sobre la superficie del insecto. Las esporas así producidas pueden ser descargadas al ambiente e iniciar un nuevo ciclo de infección (Milner 1981; Smitley et al. 1986; Glare et al. 1986; Eilenberg et al. 1986; Cooper y Sweeney 1986).

Las condiciones de humedad y temperatura requeridas por la mayoría de los hongos entomopatógenos para su supervivencia en aplicaciones a campo, germinación, penetración e inicio de un nuevo ciclo de esporulación sobre la superficie del insecto, constituyen la principal restricción en su uso como agentes de control (Shields et al. 1981; Doberski 1981; Lingg y Donaldson 1981; Zimmermann 1982). Es por ello que una buena parte de la investigación que actualmente se realiza, en relación al uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas, hace énfasis en la selección y desarrollo de cepas con máximo potencial epizootico, estudiando aspectos tales como: capacidad de esporulación sobre insectos muertos, capacidad de dispersión, velocidad de invasión y desarrollo *in vivo*, temperatura y humedad óptimas y estabilidad en el ambiente. Este enfoque está reemplazando lentamente a las evaluaciones rápidas basadas en un único criterio, como por ejemplo la patogenicidad (CL_{50})¹ o la virulencia (TL_{50})², determinadas normalmente en laboratorios, bajo condiciones

¹ Concentración letal media

² Tiempo requerido para reducir a la mitad la población de insectos

controladas de humedad y temperatura. La caracterización de cepas en base a esos únicos parámetros, condujo con frecuencia en el pasado al desarrollo de bioinsecticidas fúngicos de baja eficiencia en aplicaciones a campo.

Producción de bioinsecticidas fúngicos

Dadas las restricciones que imponen las condiciones microclimáticas a la acción de los bioinsecticidas fúngicos en aplicaciones a campo, la producción de estos agentes de control apunta hacia las formas de desarrollo más resistentes, es decir, las conidias.

La conidiación puede ocurrir en cultivos sumergidos con una amplia variedad de hongos filamentosos (Vézina y Singh 1975), obteniéndose rendimientos de alrededor de 10^{10} - 10^{11} conidias/L. Sin embargo, algunos hongos entomopatógenos, como son: **Beauveria bassiana**, **Beauveria tenella**, **Metarhizium anisopliae**, **Nomurea rileyi**, **Spicaria prasina** y **Paecilomyces farinosus** son dimórficos, y cuando crecen en cultivos sumergidos agitados y con aireación, producen una mezcla de micelio y células levaduriformes denominadas blastosporas (Roberts y Yendol 1971). Estas células pueden ser producidas en masa con relativa facilidad, pero su uso en el control de plagas está limitado por su baja viabilidad en condiciones de sequedad, o por la dependencia de una fase de conidiación a partir de las mismas, luego de su aplicación a campo (Holdom y Van de Klashorst 1986). Es por ello que los cultivos sumergidos han tenido poca aceptación en la producción de bioinsecticidas fúngicos. Su uso se restringe a la fase de

crecimiento vegetativo, en cuyo caso es necesaria una segunda etapa en la producción, donde el micelio y/o blastosporas obtenidos son inducidos a la conidiación sobre un sustrato sólido.

Las fermentaciones sólidas han constituido hasta el presente la alternativa más viable para el crecimiento y conidiación de hongos entomopatógenos a escala industrial. Los métodos más difundidos, utilizados en la producción de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* y otros deuteromicetos, se basan en la fermentación de arroz descascarado, no pulido. Para ello se emplean sacos de polipropileno (resistentes a la esterilización), de 35 cm x 22 cm, o frascos de vidrio de 1 L de capacidad, conteniendo respectivamente 300 g y 100 g de arroz precocido y autoclavado, con un contenido de agua de alrededor de 25% en base húmeda (Alves 1986).

Los cultivos son iniciados con esporas (10^6 - 10^7 esporas/g) y las incubaciones se realizan en cuartos termostatzados (27 ± 1 °C) durante 12 - 16 días, obteniéndose rendimientos de alrededor del 10% en masa fúngica, lo que equivale a 10^9 esporas/g de arroz.

Un método alternativo ha sido desarrollado por la empresa brasilera **Labormax Produtos Químicos Ind. e Com. Ltda.** (método **Biomax^R**), que consiste en una primera fase de germinación sobre arroz contenido en sacos de polipropileno, y una segunda fase de crecimiento vegetativo y esporulación en bandejas abiertas, incubadas en cuartos termostatzados.

Los rendimientos que se obtienen son también del orden de 10^9 esporas/g de arroz. En general, el escalado de estos procesos consiste simplemente en un incremento en el número de unidades de fermentación (sacos, frascos o bandejas).

Entre los hongos entomopatógenos que se producen actualmente a nivel industrial (Tabla 1), **Metarhizium anisopliae** es tal vez el mejor conocido. Su espectro de acción abarca a más de 200 especies pertenecientes a los órdenes Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Homoptera.

Tabla 1 Algunos bioinsecticidas fúngicos producidos a nivel comercial

Patógeno	Producto	País
Metarhizium anisopliae	Biomax	Brasil
	Combio	Brasil
	Metabiol	Brasil
	Metaquino	Brasil
Beauveria bassiana	Boverin	URSS
	Biotrol	USA
	Boveriol	Brasil
Verticillium lecanii	Vertalec	Inglaterra

La mayor difusión en el uso de **Metarhizium anisopliae** ha tenido lugar en Brasil, donde ha venido desplazando a los insecticidas químicos convencionales (Alves 1986) en el control de importantes plagas que afectan a la caña de azúcar (**Mahanarva posticata** y **Diatraea saccharalis**), pastizales (**Deois zulia**), soja (varias especies pertenecientes a los géneros **Nezara** y **Piezodorus**), y bananeras (**Cosmopolites sordidus**) entre otros.

Generalmente se requieren altos niveles de inóculo en las aplicaciones a campo (alrededor de 10^{12} conidias/Hectárea), para que este hongo pueda ser utilizado eficientemente como bioinsecticida (Alves 1986; Wraight y Roberts 1987). De allí la importancia de que los métodos empleados en su producción proporcionen altos rendimientos en esporas a bajo costo.

Los rendimientos que normalmente se obtiene a través de los métodos disponibles, basados en la fermentación de arroz son lo suficientemente altos como para que dichos métodos sean considerados económicamente viables. No obstante, es posible desarrollar procedimientos alternativos tendentes a disminuir los costos de operación, si el arroz (comercialmente valioso en la alimentación humana) es reemplazado por subproductos agroindustriales (generalmente más baratos) que proporcionen los requerimientos nutricionales necesarios para el desarrollo del hongo.

Dadas las características del crecimiento fúngico sobre arroz, esencialmente superficial, es evidente que la mayor parte de los requerimientos nutricionales son suministrados por las capas más externas del grano (pericarpio, capa aleuronífera, germen y tegumentos seminales). Estas capas son eliminadas por abrasión durante el procesamiento del arroz para el consumo humano ("arroz blanco"), generándose un subproducto que se incluye dentro de la categoría de los afrechos, del cual Argentina produce alrededor de 40.000 toneladas métricas por año (dato suministrado por la Cátedra

de Cerealicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata).

En algunos países como La India, Nepal, Pakistan, Thailandia, Egipto y México, el afrecho de arroz es utilizado como una importante materia prima en la producción de aceites comestibles (Yokochi 1974). No obstante, en Argentina, donde la producción de oleaginosas es marcadamente alta, dicha práctica no resulta rentable, por lo que el afrecho se constituye en un subproducto barato, utilizado fundamentalmente en la suplementación de alimentos para animales.

Es así como la alta disponibilidad a bajo costo, sumado a sus características nutricionales, inferidas sobre la base de su origen (capas más externas del grano, donde el crecimiento fúngico ocurre con relativa abundancia - Alves 1986), el afrecho de arroz se constituye en un candidato potencial para ser usado como sustrato en fermentaciones sólidas, dirigidas a la producción del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.

OBJETIVOS

El presente estudio está dirigido al desarrollo de un proceso fermentativo en sustrato sólido, para ser utilizado como alternativa en la producción de esporas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. Ello contempla evaluar la factibilidad del uso de afrecho de arroz como componente básico de bajo costo, en el diseño de medios de cultivo que ofrezcan ventajas comparativas frente a los medios, que para tal fin, han sido utilizados tradicionalmente.

Se intenta la caracterización del crecimiento y la esporulación de *M. anisopliae* en dichos medios, tanto en términos cinéticos y estequiométricos, como a través de la identificación de los factores limitantes involucrados. Se pretende con ello obtener información básica sobre el funcionamiento del sistema, que sirva de referencia para un posible escalado del proceso.

MATERIALES Y METODOS

1. Microorganismo

Para la realización del presente trabajo se utilizó el hongo filamentoso entomopatógeno **Metarhizium anisopliae**, Clase **Deuteromycete** Familia **Moniliaceae**.

Los aislados A₄, A₁₉, E₆, M y MT fueron gentilmente suministrados por el Dr. João Lúcio de Azevedo, Instituto de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidad de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. El aislado BJ-1110 perteneciente al cepario del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), fue obtenido originalmente en la localidad de Coronel Suárez, provincia de Buenos Aires, por el Instituto Spegazzini, La Plata. Las cepas eran mantenidas mediante su crecimiento rutinario sobre arroz descascarado, no pulido, de acuerdo con el procedimiento descrito por Alves (1986).

2. Productos utilizados en la formulación de los medios de cultivo

En la formulación de los medios de cultivo se utilizaron dos subproductos derivados de la industria arrocera: afrecho y cáscara de arroz, los cuales fueron suministrados por el Ing. Alfonso Vidal de la Estación Experimental Ing. Agr. Julio Hirschhorn de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. Estos subproductos, obtenidos rutinariamente por los procedimientos convencionales empleados en el descas-

carado y pulido de arroz, basados en abrasión, eran almacenados por separado en sacos de polietileno y mantenidos a 4°C hasta ser usados.

3. Analisis de la composición centesimal del afrecho de arroz

Los contenidos de fibra cruda, proteínas ($N_{total} \times 6.25$), almidón, azúcares reductores solubles, lípidos y cenizas fueron determinados por los métodos convencionales descritos en AOAC, Official Methods of Analysis (1984).

4. Analisis de la composición elemental del afrecho de arroz

Los contenidos porcentuales de carbono, hidrógeno y nitrógeno de muestras de afrecho de arroz, fueron determinados por el Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires (UBA), utilizando los métodos correspondientes, descritos en AOAC, Official Methods of Analysis (1984). El contenido de oxígeno se calculó por diferencia con el 100%, tomando como referencia las composiciones de C, H, N y cenizas. El contenido de cenizas se determinó por pesada, luego de la incineración de las muestras en una mufla a 650°C.

5. Determinación de la capacidad de retención de agua del afrecho y la cáscara de arroz.

La determinación estuvo basada en la imbibición del afrecho y la cáscara en un exceso de agua destilada, seguido

del drenaje del exceso de agua por gravedad y posterior evaluación de la fracción de agua retenida.

Las muestras de afrecho y cáscara (5 g en base seca) fueron primeramente hidratadas hasta el 30% de humedad (en base húmeda) y autoclavadas a 120°C durante 20 minutos.

Cada muestra autoclavada fue transferida a una columna de vidrio (2.2 cm de diámetro y 20 cm de largo) y suplementada con 30 ml de agua. Las columnas, cerradas en ambos extremos (Fig. 2) fueron mantenidas en posición vertical durante 12 horas a temperatura ambiente.

Concluida la fase anterior, se permitió el drenaje por gravedad del exceso de agua, hasta que cada columna acusó un peso húmedo constante. Seguidamente se determinaron los contenidos de humedad y de materia seca en cada muestra, luego de su secado en una estufa a 60°C hasta peso constante.

6. Medios de cultivo

6.1. Medio de afrecho (MA)

Constituido por afrecho de arroz hidratado, cuyo contenido de agua, tal como se indica en los respectivos experimentos, varió entre 2.8% y 68% en base húmeda.

6.2. Medio de afrecho-cáscara (MAC)

Basado en mezclas de afrecho de arroz y cáscara de arroz, en las proporciones que se detallan en los respectivos experimentos, con un contenido de agua que varió entre 9% y 49% en base húmeda.

Los medios mencionados, empleados en fermentaciones sólidas, eran preparados en frascos de vidrio prepesados y esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Seguidamente, y una vez fríos, los frascos eran pesados con el objeto de evaluar las posibles pérdidas de agua ocurridas durante la esterilización, las cuales eran corregidas al hacer la inoculación.

6.3. Caldo de afrecho (CA)

Constituido por un extracto acuoso de afrecho de arroz. El mismo era preparado mediante ebullición durante 30 minutos de una suspensión de afrecho al 2% en agua destilada, y posterior pasaje a través de filtros Whatman N° 1. La esterilización se realizó en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

7. Determinación de la actividad acuosa (a_w) en los medios de cultivo.

La humedad relativa en condiciones de equilibrio ($a_w \times 100$) fue medida en los medios MA y MAC, preparados con contenidos de agua que variaron entre 2.8% y 68% para el medio MA y entre 9% y 49% para el medio MAC. En este último la relación afrecho-cáscara fue 1:1.

Las determinaciones fueron hechas a 28°C utilizando un analizador Novasina Thermoconstanter Humidat TH-2 (Zurich, Switzerland). Cada determinación estuvo acompañada de la respectiva medida del contenido de humedad, para lo cual, la muestra analizada era secada a 105°C hasta peso constante

8. Preparación de los inóculos.

Las suspensiones de esporas para los inóculos eran preparadas a partir de cultivos esporulados de dos semanas, desarrollados sobre granos de arroz (Alves 1986), mediante la adición de Tween 80 al 0.1% y agitación manual. La concentración de esporas era determinada mediante el uso de una cámara de Neubauer.

9. Fermentaciones en sustrato sólido sin aireación forzada.

Estas fermentaciones se llevaron a cabo con los medios de cultivo **MA** y **MAC** preparados en botellas de vidrio de 250 ml, 500 ml y 1000 ml, con diámetros internos de 5.5 cm, 7.5 cm y 8.7 cm respectivamente. Los medios fueron inoculados a una concentración de 10^6 esporas/g de materia seca, e incubados durante dos semanas a 28°C en un cuarto termostatzado, en presencia de luz artificial continua y una humedad relativa cercana al 90%. Estas condiciones han sido reportadas como óptimas para el crecimiento y esporulación de **M. anisopliae** sobre granos de arroz (Alves, 1986). Durante las incubaciones las botellas permanecieron estacionarias y en posición vertical.

10. Fermentaciones en sustrato sólido con aireación forzada.

Estas fermentaciones se llevaron a cabo en tres tipos de columnas de vidrio (apéndice), empacadas con medio **MAC**. Este medio, preparado en erlenmeyer de 1000 ml, era

inoculado a una concentración de 10^6 esporas/g de materia seca antes de ser transferido a las columnas. Esta última operación se llevaba a cabo en un banco de flujo laminar.

Las incubaciones se realizaron a 28°C , en presencia de luz artificial continua, durante los tiempos especificados en los respectivos experimentos.

Cada columna era acoplada a un sistema de humectación de aire (apéndice), el cual fue suministrado en forma continua a un caudal de 0.34 L/h x g de materia seca inicial.

11. Cultivos sumergidos

Las fermentaciones en cultivos sumergidos se realizaron empleando el medio CA, inoculado con 10^6 esporas/ml. Se utilizaron sistemas discontinuos ("Batch") en erlenmeyer de 1000 ml, con un volumen de trabajo de 100 ml. Las incubaciones se realizaron en un cuarto termostatzado a 28°C , utilizando un agitador orbital New Brunswick modelo G25 (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NY, USA), con una excentricidad de 2.5 cm, operado a 200 rpm.

12. Determinación del peso seco de la materia fermentada (G_s)

En las fermentaciones sólidas, el peso seco de la materia fermentada (sustrato + biomasa + productos) era obtenido luego de su secado a 60°C hasta peso constante. No obstante, en los cultivos sumergidos, donde era posible separar la biomasa del resto de la materia fermentada, la

suma de los pesos secos de ambos componentes proporcionó el valor de G_s .

13. Determinación de la biomasa en las fermentaciones sólidas

Debido a que en este tipo de fermentaciones se hace prácticamente imposible separar la biomasa fúngica del resto de la materia fermentada, se procedió a estimar la biomasa en forma indirecta, en base a medidas de N-acetilglucosamina, utilizando el método de Ride y Drysdale (1972). Sin embargo, dado que el contenido de N-acetilglucosamina en las esporas es diferente que en el micelio, se hizo necesario corregir los valores de N-acetilglucosamina obtenidos al hacer las determinaciones a partir de la materia fermentada global. Para esto era necesario conocer además el peso de una spora y el recuento total de esporas en la muestra analizada. Así, para el cálculo de la concentración de biomasa se utilizó la siguiente expresión:

$$X = [R M_e (G_m - G_e) + G] / G_m$$

donde:

X = g de biomasa/g de materia fermentada

R = N^0 de esporas/g de materia fermentada

G = mg de glucosamina/g de materia fermentada

M_e = peso de una spora (g)

G_m = mg de glucosamina/g de micelio

G_e = mg de glucosamina/g de spora

Los parámetros M_e y G_e fueron determinados a partir de esporas obtenidas de cultivos de *M. anisopliae* sobre granos de arroz (Alves, 1986). Las esporas fueron separadas del resto de la materia fermentada utilizando un tamiz de trama 200 y secadas a 60°C hasta peso constante.

13.1. Determinación de M_e

A partir de muestras de esporas, de peso conocido, se prepararon suspensiones utilizando Tween 80 al 0.1% en agua destilada. Estas suspensiones fueron sometidas a tres pulsos de sonicación, con una duración de dos segundos por pulso, usando un sonicador Megason (Ultrasonic Instruments International Ltd., Farmingdale, NY, USA), operado a la máxima potencia. Esta operación permitía disgregar pequeños grumos sin causar la ruptura de las esporas. Seguidamente se procedió a realizar el recuento, utilizando una cámara de Neubauer, lo que permitió determinar la relación peso de esporas/ N^0 de esporas y por ende el valor de M_e .

13.2. Determinación de G_e

A partir de muestras de esporas, de peso conocido, se procedió a la determinación de G_e mediante el método de Ride y Drysdale (1972).

13.3. Determinación de G_m

Para la determinación de G_m se utilizó micelio proveniente de cultivos de *M. anisopliae* en medio CA,

desarrollados en erlenmeyer, tal como se indica en (11). El micelio fue cosechado como se indica en (14), y la determinación de N-acetilglucosamina se efectuó sobre muestras secadas a 60°C hasta peso constante, empleando el método de Ride y Drysdale (1972).

14. Determinación de la biomasa en los cultivos sumergidos

La determinación de biomasa en cultivos sumergidos, utilizando el medio CA, se efectuó por pesada. El micelio fue cosechado por filtración de volúmenes conocidos de cultivo a través de filtros Whatman N° 1 prepesados. El micelio fue lavado con dos volúmenes de agua destilada y secado a 60°C hasta peso constante.

15. Medida del grado de esporulación

Para la evaluación del grado de esporulación, la totalidad de la materia fermentada correspondiente a cada cultivo, era resuspendida en 25 ml de Tween 80 al 0.1% / g de materia seca inicial. Las suspensiones eran agitadas durante 10 minutos usando una barra magnética y luego filtradas a través de un tamiz de trama 50. El proceso se repitió dos veces, y los filtrados colectados se juntaron. Luego se procedió a hacer el recuento de esporas mediante el uso de una cámara de Neubauer.

16. Analisis de la composición elemental de la biomasa

Los contenidos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y cenizas de la biomasa fueron determinados tal como se indica en (4). Los análisis fueron realizados por separado en muestras de esporas y micelio, las cuales fueron obtenidas según el procedimiento descrito en (13).

17. Medida del consumo de O₂ y producción de CO₂

En las fermentaciones en sustrato sólido con aireación forzada, la fracción molar de CO₂ era determinada en los gases de salida de cada columna utilizando un analizador Horiba PIR-2000, (Horiba Instruments, Irvine, California, USA), acoplado a un registrador-integrador Spectra-Physics SP-4270, (Spectra-Physics, San Jose, California, USA). La fracción molar de O₂ era determinada mediante el uso de un analizador Beckman OM-14 (Beckman Instruments, Inc. Schiller Park, Illinois, USA).

La corriente de gases a ser analizada se hacía pasar, a través de una pequeña columna empacada con Dehydrite (Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, USA), para retener la humedad. Las determinaciones eran hechas al mismo caudal de salida de la columna, siempre que éste no sobrepasara los 30 L/h. En aquellas circunstancias en que el caudal a la salida de la columna era superior a dicho valor, el exceso era derivado al ambiente a través de una válvula colocada entre la salida de gases de la columna y la entrada al analizador.

Las velocidades de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono fueron calculadas separadamente, mediante la diferencia entre la velocidad a la que cada gas ingresa al fermentador y la velocidad a la que sale del mismo, de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$r_{O_2} = C_1 (X_{O_2})_1 - C_2 (X_{O_2})_2 \quad (1)$$

$$r_{CO_2} = C_1 (X_{CO_2})_1 - C_2 (X_{CO_2})_2 \quad (2)$$

donde:

C_1 = Caudal (L/h) a la entrada del fermentador

C_2 = Caudal (L/h) a la salida del fermentador

$(X_{O_2})_1$ = Fracción molar de O_2 en el aire de entrada

$(X_{O_2})_2$ = Fracción molar de O_2 en los gases de salida

$(X_{CO_2})_1$ = Fracción molar de CO_2 en el aire de entrada

$(X_{CO_2})_2$ = Fracción molar de CO_2 en los gases de salida

No obstante, por conveniencia desde el punto de vista práctico, C_2 era expresado en función de C_1 ; para lo cual se recurrió al hecho de que el nitrógeno del aire no interviene en el proceso, en cuyo caso:

$$C_1 (X_{N_2})_1 = C_2 (X_{N_2})_2 \quad (3)$$

donde $(X_{N_2})_1$ y $(X_{N_2})_2$ son las fracciones molares de nitrógeno en el aire de entrada y los gases de salida respectivamente. Así, las ecuaciones (1) y (2) modificadas para los fines de cálculo fueron las siguientes:

$$r_{O_2} = -C_1(X_{N_2})_1 \frac{(X_{O_2})_2}{1-(X_{O_2})_2-(X_{CO_2})_2-(X_{H_2O})_2} - \frac{(X_{O_2})_1}{1-(X_{O_2})_1-(X_{CO_2})_1-(X_{H_2O})_1} \quad (4)$$

$$r_{CO_2} = C_1(X_{N_2})_1 \frac{(X_{CO_2})_2}{1-(X_{O_2})_2-(X_{CO_2})_2-(X_{H_2O})_2} - \frac{(X_{CO_2})_1}{1-(X_{O_2})_1-(X_{CO_2})_1-(X_{H_2O})_1} \quad (5)$$

donde:

$$(X_{N_2})_1 = 1-(X_{O_2})_1-(X_{CO_2})_1-(X_{H_2O})_1 \quad (6)$$

siendo $(X_{H_2O})_1$ y $(X_{H_2O})_2$ las fracciones molares de H_2O en el aire de entrada y los gases de salida respectivamente. El valor de $(X_{H_2O})_1$ era calculado a partir de la presión de vapor de agua a la temperatura de funcionamiento del sistema de humectación (Apéndice); mientras que el de $(X_{H_2O})_2$ era considerado cero, ya que, tal como se mencionó anteriormente, los gases eran secados antes de ser analizados.

Debido a que el caudal (C_1) era expresado en L/h, r_{O_2} y r_{CO_2} calculadas, también estaban expresadas en L/h (en las condiciones de presión y temperatura de los sistemas de humectación y condensación).

18. Medida del consumo de azúcares

Tanto en los cultivos en sustrato sólido como en los sumergidos, el consumo de azúcares (reductores) se calculó por diferencia entre el contenido inicial y final, luego de la digestión de las muestras respectivas con amiloglucosidasa SIGMA grado II (A-7255), de acuerdo con el

procedimiento descrito por Raimbault (1980). El contenido de azúcares reductores en cada muestra fue determinado por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959).

19. Medida de los cambios de volumen de los espacios libres en el seno de la materia fermentada

Los cambios de volumen de los espacios libres (poros) en el seno de la materia fermentada, fueron medidos durante el desarrollo de los procesos fermentativos en sustrato sólido con aireación forzada, siguiendo una estrategia similar a la empleada en la determinación de volúmenes de exclusión en cromatografía de gases. Para ello se aplicaban pulsos periódicos (cada 12 horas) de CO₂ en la corriente de gases a la entrada de cada columna y se medían los respectivos tiempos de retención (t_r), utilizando un registrador-integrador Spectra-Physics SP-4270 (Spectra-Physics, San Jose, California, USA), acoplado a un analizador Horiba PIR-2000 (Horiba Instruments, Irvine, California, USA). Cada medida de t_r estuvo acompañada de la respectiva medida de caudal. Así, el volumen de espacios libres o volumen intersticial (V_i) fue calculado mediante:

$$V_i \text{ (L)} = t_r \text{ (h)} \times \text{Caudal (L/h)}$$

RESULTADOS Y DISCUSION

Componentes básicos y ajuste del contenido de agua.

Efecto de la actividad acuosa inicial sobre la esporulación

Efecto de la cáscara de arroz sobre la esporulación.

El medio MAC como alternativa en la producción de esporas de *M. anisopliae*.

Componentes básicos y ajuste del contenido de agua.

Una de las principales ventajas que ofrecen las fermentaciones en estado sólido es la posibilidad de usar medios de cultivo relativamente simples, en lo que a su elaboración se refiere. Estos, en su expresión más sencilla consisten en uno o más componentes sólidos (cereales, pulpa de madera, tubérculos, raíces, etc.) hidratados. No obstante, dependiendo de los requerimientos nutricionales del microorganismo utilizado, puede hacerse necesaria su suplementación con sales, factores de crecimiento, etc.

En la formulación de los medios sólidos utilizados en el presente trabajo, se partió de afrecho de arroz como componente básico (medio MA), el cual fue suplementado con cáscara de arroz para dar origen al medio MAC. En ambos casos se procedió a fijar el grado de hidratación, compatible con el crecimiento y esporulación de *M. anisopliae*.

Se determinaron las isotermas de adsorción de agua correspondientes a cada componente (afrecho y cáscara) por separado, y a una mezcla de ellos en proporción 1:1 (Fig. 1.1).

Cada conjunto de datos experimentales fue sometido a un análisis de regresión no lineal, con el objeto de probar la bondad de ajuste de varias ecuaciones de dos parámetros (Tabla 1.1), reportadas previamente para describir las isotermas de adsorción de agua de una amplia variedad de productos alimenticios (Iglesias y Chirife 1982).

Tabla 1.1 Ecuaciones empleadas en el ajuste de isotermas de adsorción de agua en alimentos (Iglesias y Chirife, 1982).

Ecuación	Referencia
$\ln (1/a_w) = A B^x$	(Bradley 1936)
$a_w = \exp(-A x^B)$	(Halsey 1948; Iglesias et al 1975)
$1 - a_w = \exp(-A x^B)$	(Henderson 1952)
$\ln[x+(x^2+x_{0.5})^{1/2}] = B a_w + A$	(Iglesias y Chirife 1978)
$x = B[a_w/(1-a_w)] + A$	(Iglesias y Chirife 1981)
$x = (B/\ln a_w) + A$	(Labuza et al. 1972)
$x = A[a_w/(1-a_w)]^B$	(Oswin 1946)
$x = A - B \ln(1-a_w)$	(Smith 1947)

(x) es el contenido de humedad (% en base seca) en todas las ecuaciones, excepto en la de Smith, en la cual se puede expresar tanto en base seca como húmeda.

($x_{0.5}$) es el contenido de humedad para $a_w = 0.5$

A y B son parámetros estadísticos, usados en la descripción de las isotermas.

Se demostró que la ecuación de **Smith** fue la que mejor se ajustaba ($r > 0.995$), siendo para el medio **MA**:

$$wc = - 0.00746 - 9.7651 \ln (1 - a_w) \quad (1.1)$$

para el medio **MAC**:

$$wc = 3.8977 - 6.8077 \ln (1 - a_w) \quad (1.2)$$

y para la cáscara:

$$wc = 2.6636 - 6.5589 \ln (1 - a_w) \quad (1.3)$$

En base al correspondiente análisis de la varianza (tabla 1.2), resulta evidente, por el valor de **F** observado, que una porción altamente significativa de la varianza de **wc** queda explicada por la regresión sobre a_w , cuando se aplica el modelo de Smith.

Tabla 1.2 Análisis de la varianza de la regresión de wc sobre a_w , al aplicar el modelo de Smith a los datos experimentales.

Componente	Fuente de variación	SC	GL	CM	F
Afrecho	Modelo	11270.310	2	5635.155	1124.000
	Error	35.094	7	5.013	
Afrecho + cáscara (1:1)	Modelo	5348.841	2	2674.421	684.824
	Error	27.337	7	3.905	
Cáscara	Modelo	3062.025	2	1531.012	513.098
	Error	8.951	7	2.983	

SC = suma de cuadrados

CM = cuadrados medios

GL = grados de libertad

El correspondiente límite unilateral de F al nivel del 1% de probabilidad es 9.55.

Las ecuaciones (1.1), (1.2) y (1.3), representadas gráficamente en la Fig. 1.1, fueron usadas para calcular los contenidos de agua, a los cuales debían ser preparados los

medios **MA** y **MAC** (este último con una relación afrecho-cáscara de 1:1), para proporcionar valores de actividad acuosa inicial en el intervalo 0.835-0.999. En este intervalo se ubican los valores de a_w mínimos para el crecimiento de una gran cantidad de hongos filamentosos (Corry 1978).

A partir de las isotermas descritas por las ecuaciones 1.1 y 1.2 se deduce que los valores de actividad acuosa, incluidos en el mencionado intervalo, pueden ser alcanzados en el medio **MAC**, con un contenido de agua inferior al requerido para el medio **MA**; llegando a ser las diferencias del 17%, para valores de a_w cercanos a 0.999.

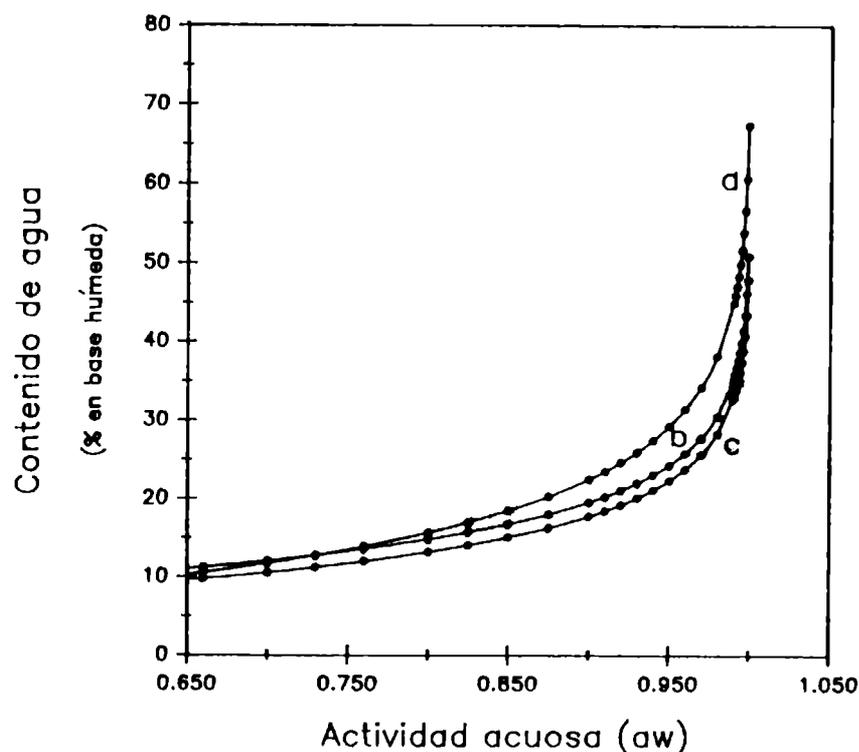


Fig. 1. Isotermas de adsorción de agua, ajustadas por las ecuaciones (1.1), (1.2) y (1.3), correspondientes a: medio **MA** (a), medio **MAC** (b) y cáscara (c). El contenido de cáscara en el medio **MAC** fue de 50% (en base seca).

Este hecho tiene implicaciones prácticas importantes, pues

indica que el agregado de cáscara incrementa la disponibilidad de agua en el medio de cultivo.

Como es sabido, durante las fermentaciones sólidas ocurren pérdidas de agua por evaporación, como consecuencia de la disipación de calor metabólico (Sato *et al.* 1982; Narahara *et al.* 1984). Los efectos de estas pérdidas (deseccación) pueden ser contrarrestados en parte, si los medios de cultivo se preparan con contenidos de humedad inicial altos. No obstante, cuando se usan sustratos amiláceos, cuya capacidad de retención de agua es por lo general relativamente baja (Fleming *et al.* 1974; French 1984), resulta difícil lograr los niveles de humedad requeridos, sin que el medio de cultivo se torne en una pasta, con la consecuente reducción en el volumen de los

Tabla 1.2 Capacidad de retención de agua del afrecho y la cáscara de arroz.

	$\frac{\text{g H}_2\text{O}}{\text{g}^*}$	% (en base húmeda)
Afrecho	1.566 ± 0.052	61
Cáscara	1.074 ± 0.071	51

* Peso del material en base seca.

espacios libres interpartícula. Esta situación se puso de manifiesto cuando se preparó el medio MA, a valores de actividad acuosa superiores a 0.997, pues los contenidos de agua requeridos (>60% en base húmeda) superaban la capacidad de retención de agua del afrecho (Tabla 1.2). Sin embargo, el

agregado de 50% de cáscara (en base seca) permitió reducir el contenido de agua a 47-50% para los mencionados valores de a_w , además de proporcionar un notable incremento en el volumen de los espacios libres interpartícula, tal como lo sugiere la diferencia en densidad aparente entre los medios MA y MAC (Tabla 1.3).

La suplementación de medios de cultivo con soportes lignocelulósicos (relativamente inertes), con alta capacidad de retención de agua, ha sido propuesta como una forma alternativa de asegurar condiciones adecuadas de humedad en fermentaciones en estado sólido de sustratos amiláceos (Sato et al. 1982; Oriol et al. 1988).

Tabla 1.3 Densidad aparente de los medios de cultivo MA y MAC.

Medio de cultivo	Contenido de cáscara (% en base seca)	Densidad ^a aparente
MA ^b	0	0.527 ± 0.012
MAC ^b	50	0.243 ± 0.014
MAC ^{c d}	41.6	0.253 ± 0.006
	45.4	0.268 ± 0.007
	55.5	0.245 ± 0.018
	62.5	0.250 ± 0.010

(a) Valores promedio de 9 repeticiones

(b) El valor de actividad acuosa estimado fue 0.998

(c) El contenido de agua fue de 47% (en base húmeda)

(d) Las variaciones en el contenido de cáscara, entre 41.6 y 62.5%, no produjeron diferencias significativas en la densidad aparente, al nivel del 5% de probabilidad, de acuerdo con el procedimiento de Tukey.

Efecto de la actividad acuosa inicial sobre la esporulación

Se evaluó la respuesta esporulativa de las cepas E_6 y BJ-1110 en fermentaciones sólidas sin aireación forzada, llevadas a cabo con los medios MA y MAC, preparados a distintos valores de actividad acuosa.

El máximo grado de esporulación (1.8×10^{10} y 0.5×10^{10} esporas/g de afrecho inicial, para E_6 y BJ-1110 respectivamente) se observó con el medio MAC a valores de a_w inicial comprendidos entre 0.997 y 0.999 (Fig. 1.2), poniendo en evidencia el requerimiento de altos niveles de disponibilidad acuosa. No obstante, cuando se utilizó el medio MA, la respuesta esporulativa óptima tuvo lugar en un intervalo más amplio de a_w .

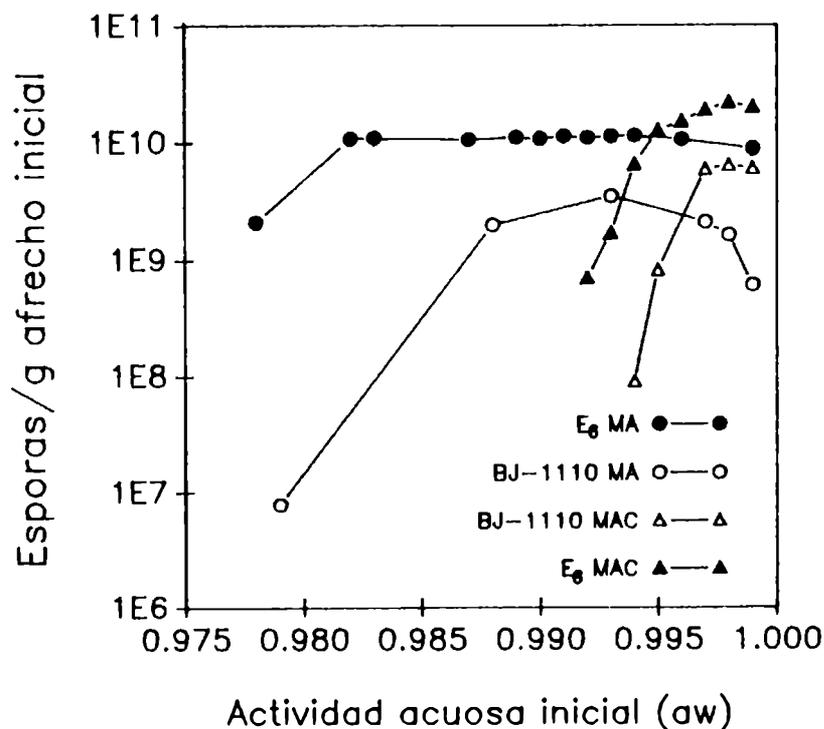


Fig. 1.2 Respuesta esporulativa de las cepas E_6 y BJ1110 de *M. anisopliae*, en los medios MA y MAC preparados a distintas actividades acuosas iniciales. El contenido de cáscara en el medio MAC fue 50% (en base seca).

Se ha establecido que el valor mínimo de a_w para el crecimiento de hongos filamentosos es una característica especie-específica (Pitt 1975). Sin embargo ese valor puede ser alterado como consecuencia de variaciones en las propiedades fisicoquímicas del medio de cultivo, incluida la disponibilidad de nutrientes (Corry 1978).

Tomando en cuenta el efecto dilutorio de la cáscara, resulta evidente que la concentración de nutrientes solubles es más alta en el medio MA que en el medio MAC. Esto explica la marcada disminución en el límite inferior de a_w óptimo observado, ya que la capacidad de adaptación a valores bajos de a_w puede ser ganada en presencia de altos niveles de solutos, o perdida en su ausencia (Scarr 1968).

Al permitir ser operado dentro de márgenes más amplios de a_w iniciales, el medio MA se presenta como más flexible que el medio MAC, en relación a los requerimientos hídricos de *M. anisopliae*. Sin embargo, bajo condiciones óptimas de a_w inicial, los rendimientos alcanzados en el medio MAC, expresados como esporas/g de afrecho inicial, fueron dos veces superiores (Fig. 1.2). Estas diferencias tendrían que ser analizadas en el marco de los múltiples factores que limitan el crecimiento de hongos filamentosos en sustratos sólidos, aspectos que serán tratados en detalle más adelante. No obstante, dadas las diferencias en estructura entre ambos medios, generadas principalmente por la presencia de cáscara, pareciera que algunos factores tales como disponibilidad de espacios para el crecimiento (Laukevics et al. 1985) y/o

limitación en la transferencia de gases (Moo-Young et al. 1983) deberían estar involucrados.

Efecto de la cáscara de arroz sobre la esporulación

Una de las propiedades que caracteriza a la cáscara de arroz es su extramadamente baja digestibilidad, aún luego de su tratamiento a elevadas temperaturas (De Lhoneux et al. 1988). Está constituida principalmente por fibra cruda y sílice (Hawkey 1974), presentándose este último componente como una estructura sólida sobre la epidermis y como un sistema disperso en su interior (De Lhoneux et al. 1988).

En ensayos preliminares, realizados en nuestro laboratorio, se demostró que *M. anisopliae* no puede crecer sobre cáscara lavada y autoclavada sin el agregado de nutrientes y factores de crecimiento (datos no mostrados). Esto sugiere que los requerimientos nutricionales para el crecimiento de *M. anisopliae* en el medio MAC son aportados principalmente por el afrecho, cuya composición se muestra en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4 Composición del afrecho de arroz.

Constituyente	Contenido (% en base seca)
Extracto no nitrogenado	57.72
Fibra cruda	8.00
Proteínas*	14.44
Lípidos	8.93
Cenizas	10.91

* Calculado como $N_{total} \times 6.25$

Así, la cáscara actuaría como un soporte relativamente inerte, dándole al medio de cultivo propiedades físicas características, tales como una alta relación superficie/volumen y la generación de espacios libres interpartículas, que facilitarían la transferencia de gases.

Tanto la cantidad de cáscara (H), como su contenido porcentual en base seca (h), en el medio MAC, fueron evaluados en relación a la respuesta esporulativa de la cepa BJ-1110.

Tabla 1.5 Efecto de la cáscara sobre la respuesta esporulativa de la cepa BJ-1110 en el medio MA.

H					
5 g		10 g		15 g	
h (%)	esporas totales x 10 ¹⁰	h (%)	esporas totales x 10 ¹⁰	h (%)	esporas totales x 10 ¹⁰
45.4	3.95 A	45.4	7.48 A	55.5	6.43 A
41.6	3.80 A	50.0	5.93 AB	62.5	6.09 A
50.0	3.15 A	41.6	5.44 BC	45.4	4.29 B
55.5	2.49 A	55.5	5.25 BC	50.0	3.30 BC
62.5	2.27 A	62.5	3.92 C	41.6	2.41 C
$\bar{x}=3.13$ C		$\bar{x}=5.60$ A		$\bar{x}=4.50$ B	

H = cantidad de cáscara; h = contenido de cáscara (% en base seca); \bar{x} = media.

Los valores dentro de cada columna (promedio de tres repeticiones), que están seguidos de la misma letra, no son significativamente diferentes de acuerdo con el procedimiento de Tukey (P < 0.05). Las medias entre las columnas son significativamente diferentes de acuerdo con el mismo procedimiento.

El contenido de agua inicial fue 47% (en base húmeda).

La producción de esporas totales fue afectada significativamente cuando se varió H, alcanzándose los más altos valores de recuento (5.6×10^{10}) con 10 g de cáscara (Tabla 1.5). Sin embargo, el correspondiente análisis de la varianza demostró la existencia de interacción significativa entre H y h, lo que indica que el efecto de las variaciones en el contenido de cáscara dependió de la cantidad de cáscara usada. Para bajos valores de H (5 g), no se observaron diferencias significativas en la producción de esporas totales al variar h. Sin embargo, para valores de H más altos si se observaron diferencias significativas, alcanzándose la máxima producción a valores de h de 45.4%-50% y 55.5%-62.5%, para 10 y 15 g de cáscara respectivamente.

El medio MAC como alternativa en la producción de esporas de *M. anisopliae*.

En base a los resultados anteriores se decidió usar el medio MAC, constituido por 10 g de afrecho y 10 g de cáscara (H=10g y h=50%), para medir la respuesta esporulativa de otras cepas de *M. anisopliae*.

Tabla 1.6 Respuesta esporulativa de varias cepas de *Metarhizium anisopliae* en medio MAC.

	Cepas					
	E ₆	A ₁₉	A ₄	MT	M	BJ-1110
Rendimiento*	15.3 A	12.0 B	9.3 B	6.1 C	5.9 D	5.8 D
Viabilidad (%)	99	88	99	98	97	85

* Esporas/g de afrecho inicial ($\times 10^9$). Los valores medios (basados en ocho repeticiones), que están seguidos de la misma letra, no son significativamente diferentes, de acuerdo con el procedimiento de Tukey ($P < 0.05$). El medio de cultivo contenía 10 g de afrecho + 10 g de cáscara, a una actividad acuosa inicial estimada en 0.998.

Los rendimientos alcanzados con las cepas E₆, A₁₉, A₄, MT y M fueron satisfactorios, comparados con el correspondiente a la cepa BJ-1110 (Tabla 1.6). Estos, expresados como esporas/g de afrecho inicial variaron entre 5.8×10^9 y 15.3×10^{10} , dependiendo de la cepa usada.

En la actualidad, los métodos de producción de esporas de *M. anisopliae* a gran escala, más difundidos, se basan en la fermentación de granos de arroz; obteniéndose rendimientos de alrededor del 10% de masa fúngica (0.1 g de masa fúngica/g de arroz), lo que equivale a 10^9 esporas/g (Alves 1986).

Es evidente que los rendimientos alcanzados con el medio MAC, referidos a la unidad de masa de sustrato, son de 5 a 15 veces superiores. Si se considera a su vez que el valor comercial del afrecho y la cáscara, al tratarse de subproductos es más bajo que el del arroz, resulta bastante atractivo el uso del medio MAC¹ en el desarrollo de procesos fermentativos a gran escala, para la producción de esporas de *M. anisopliae*.

¹ En todo el desarrollo que sigue, salvo que se indique lo contrario, la relación afrecho: cáscara en el medio MAC es 1:1



Consideraciones teóricas.

Crecimiento en caldo CA.

Crecimiento en los medios MA y MAC.

Variaciones en los sólidos iniciales, manteniendo constante la densidad aparente.

Variaciones en la densidad aparente, manteniendo constantes los sólidos iniciales.

Consideraciones teóricas

En fermentaciones aerobias, la bioconversión del sustrato (transformación del sustrato en biomasa y productos) va acompañada, por lo general, de una disminución en el peso de la materia fermentada (Levonen et al. 1983; Laukevics et al. 1984; Yadav 1987). Si esta pérdida de peso es expresada en base húmeda, su magnitud (ΔG_h) estaría dada por:

$$\Delta G_h = (G_h) - (G_h)_0 \quad (2.1)$$

donde (G_h) y $(G_h)_0$ representan los pesos húmedos de la materia fermentada, al final y al inicio del proceso respectivamente (Fig 2.1). De manera equivalente, la magnitud de ΔG_h puede ser estimada mediante la diferencia en peso entre los componentes, que durante el crecimiento ingresan al sistema (oxígeno fundamentalmente) y los que egresan del mismo (dióxido de carbono, agua y otros productos

metabólicos volátiles), pudiéndose expresar de la siguiente manera:

$$\Delta G_h = \Delta O_2 - \Delta CO_2 - \Delta P' - W_{lib} \quad (2.2)$$

donde ΔO_2 es el peso del oxígeno consumido y ΔCO_2 , $\Delta P'$ y W_{lib} son respectivamente los pesos de dióxido de carbono, productos volátiles y agua liberados del fermentador.

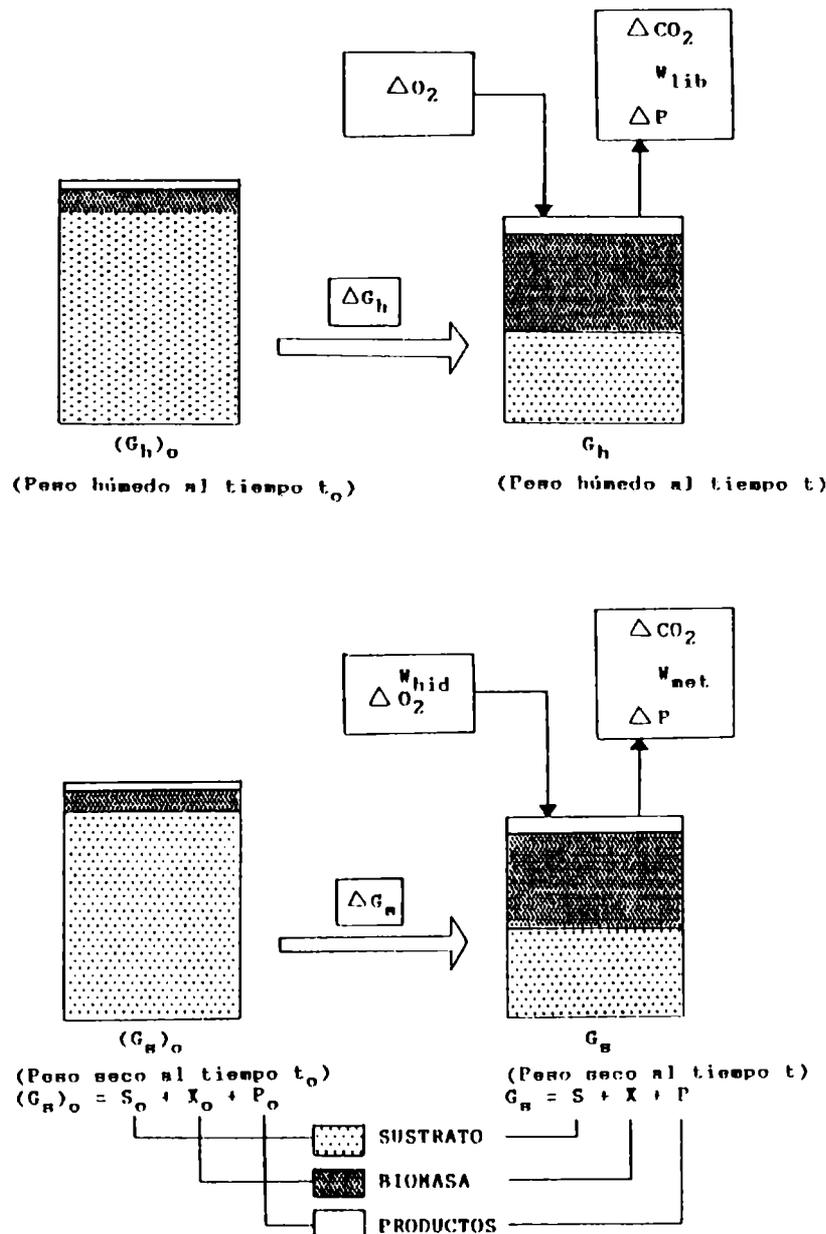


Fig. 2.1 Representación esquemática de un proceso fermentativo aerobio.

ΔO_2 = oxígeno consumido; ΔCO_2 = dióxido de carbono producido; $\Delta P'$ = productos volátiles formados; W_{hid} = agua consumida para la hidrólisis de almidón; W_{met} = agua producida por metabolismo; W_{lib} = agua liberada al ambiente desde el fermentador; ΔG_h = pérdida de peso húmedo; ΔG_s = pérdida de peso seco.

Cuando ΔG se expresa en base seca, su magnitud (ΔG_s) estaría dada por:

$$\Delta G_s = (G_s) - (G_s)_0 \quad (2.3)$$

donde (G_s) y $(G_s)_0$ representan los pesos secos de la materia fermentada, al final e inicio del proceso respectivamente. En este caso, al hacer el balance de los componentes que ingresan y egresan del sistema (Fig 2.1), debe considerarse el incremento en peso debido al agua que se consume para la hidrólisis de polisacáridos (W_{hid}), y la disminución en peso debida al agua que se genera por metabolismo (W_{met}). Así, ΔG_s podría expresarse como:

$$\Delta G_s = \Delta O_2 + W_{hid} - \Delta CO_2 - W_{met} - \Delta P' \quad (2.4)$$

Haciendo un balance de materia al tiempo t se obtiene:

$$S_0 + X_0 + P_0 + \Delta O_2 + W_{hid} = S + X + P' + \Delta CO_2 + W_{met} + \Delta P' \quad (2.5)$$

Reordenando:

$$\Delta O_2 + W_{hid} = (S - S_0) + (X - X_0) + (P - P_0) + \Delta CO_2 + W_{met} + \Delta P' \quad (2.6)$$

La ecuación (2.6) puede ser reescrita como:

$$\Delta O_2 + W_{hid} = \Delta S + \Delta X + \Delta P + \Delta CO_2 + W_{met} + \Delta P' \quad (2.7)$$

donde: $\Delta S = (S - S_0)$ representa el peso de los sólidos consumidos; $\Delta X = (X - X_0)$ y $\Delta P = (P - P_0)$ representan respectivamente los pesos secos de la biomasa producida y los productos no volátiles formados.

Sumando (2.4) y (2.7) se obtiene:

$$\Delta G_s = \Delta S + \Delta X + \Delta P \quad (2.8)$$

Así, la magnitud de la pérdida de peso seco de la materia fermentada puede obtenerse del balance entre el peso de los sólidos consumidos y el peso de la biomasa y de los productos metabólicos no volátiles formados.

Tanto en fermentaciones sólidas como en sistemas sumergidos, cuando se usan medios de cultivo de naturaleza compleja, es de esperar que alguno de sus componentes pueda llegar a ser limitante del crecimiento; bien sea porque se agota o porque deja de estar disponible o accesible (Moo-Young et al. 1983; Laukevics et al. 1984).

Como ya fue establecido, S_0 representa el peso total de los sólidos constituyentes del medio de cultivo. Si se incrementa el valor de S_0 , manteniendo constantes las proporciones en que se hallan los distintos constituyentes, entonces bajo condiciones de limitación por sustrato, sólo una fracción constante ($\beta = -\Delta S/S_0$) es consumida.

Si se divide la ecuación (2.8) por βS_0 se obtiene:

$$\frac{\Delta G_s}{\beta S_0} = \frac{\Delta S}{\beta S_0} + \frac{\Delta X}{\beta S_0} + \frac{\Delta P}{\beta S_0} \quad (2.9)$$

siendo:

$$\frac{\Delta S}{\beta S_0} = -1 \quad (2.10)$$

$$\frac{\Delta X}{\beta S_0} = Y_{x/s} \quad (2.11)$$

$$\frac{\Delta P}{\beta S_0} = Y_{p/s} \quad (2.12)$$

donde $Y_{x/s}$ e $Y_{p/s}$ son los rendimientos en biomasa y

productos no volátiles, expresados por unidad de masa de sólidos consumidos.

Sustituyendo (2.10), (2.11) y (2.12) en (2.9) y reordenando se obtiene:

$$\Delta G_s = \beta(Y_{x/s} + Y_{p/s} - 1) S_o \quad (2.13)$$

Bajo condiciones de limitación por sustrato $Y_{x/s}$ es constante, y si la formación de los productos representados por P está asociada al crecimiento, es decir, su velocidad de producción varía proporcionalmente a la velocidad específica de crecimiento (μ), entonces $Y_{p/s}$ también es constante. En tales circunstancias, la gráfica de ΔG_s contra S_o sería una recta que pasaría por el origen y cuya pendiente estaría dada por $\beta(Y_{x/s} + Y_{p/s} - 1)$. La proporcionalidad entre ΔG_s y el consumo de sustrato hidrocarbonado (fuente de carbono y energía), ha sido propuesta (Mignone 1982) como una alternativa para el cálculo de rendimientos en biomasa, en cultivos sumergidos en presencia de sólidos en suspensión.

Crecimiento en caldo CA

A partir de caldo CA, preparado tal como se indica en materiales y métodos, se hicieron diluciones seriadas con el objeto de obtener medios de cultivo con diferentes concentraciones de sólidos totales, pero sin alterar las proporciones en que se hallaban los distintos constituyentes. Se realizaron cultivos sumergidos con la cepa E_6 en dichos medios, para los cuales el valor de S_o (peso de sólidos al inicio del proceso) varió entre 1.3 y 13 g/L, con volúmenes

de trabajo de 100 ml por cultivo.

El crecimiento activo se extendió hasta aproximadamente 105 horas, luego de una fase de retardo de 24 horas (Fig. 2.2). El examen microscópico de los cultivos permitió evidenciar niveles de esporulación inferiores a 2.3×10^5 esporas/g de sólidos iniciales. Estos valores, cuando son expresados en términos de masa, tomando como referencia el valor de M_e mostrado en la Tabla 2.3, representan menos del $5.02 \times 10^{-5}\%$ de la biomasa total, cuantificada a las 115 horas de proceso, lo cual concuerda con la limitada capacidad de conidiación que con frecuencia muestran los hongos filamentosos cuando se desarrollan en cultivos sumergidos (Roberts y Yendol 1971).

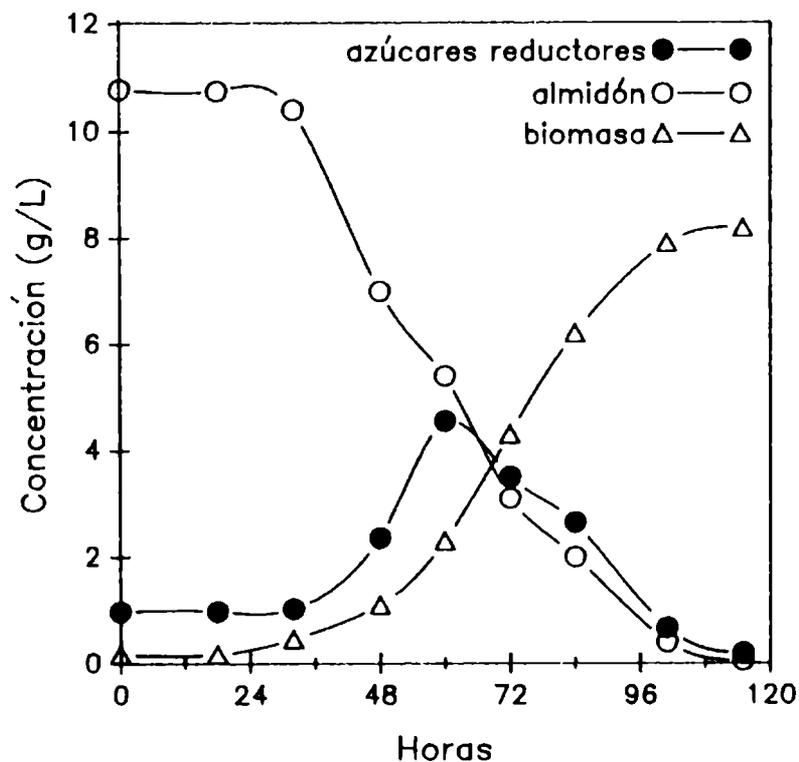


Fig. 2.2 Crecimiento de la cepa E_6 en cultivos sumergidos, utilizando caldo CA. La concentración de sólidos iniciales fue 13 g/L, para un volumen de trabajo de 100 mL.

Con los distintos valores de S_0 ensayados, no se observaron diferencias significativas en los rendimientos en biomasa, referidos a azúcares reductores, cuyo consumo, al igual que la hidrólisis de almidón, superó el 96.5% (Tabla 2.1). Este comportamiento, característico de procesos fermentativos en los que el crecimiento fue limitado por sustrato (Pirt 1975), da bases para asumir que hubo un consumo proporcional de los demás constituyentes biodegradables del medio de cultivo, en cuyo caso:

- a) Los incrementos en la biomasa (ΔX) tendrían que poder ser explicados por la regresión lineal sobre los sólidos consumidos (ΔS).
- b) Los sólidos consumidos tendrían que ser proporcionales a los sólidos iniciales.

Tabla 2.1 Parámetros del crecimiento de la cepa E_6 en caldo CA a distintas concentraciones de sólidos iniciales (S_0).

S_0	Y	Hidrólisis de almidón %	azúcares ^a consumidos %
0.13	0.74	98.40	97.65
0.26	0.67	100.00	98.30
0.39	0.73	98.00	97.83
0.52	0.66	99.30	99.20
0.65	0.69	99.40	96.78
0.78	0.69	100.00	98.90
0.91	0.67	98.70	98.00
1.10	0.63	98.46	96.95
1.30	0.66	99.01	96.60

(a) azúcares reductores.

Y = rendimiento en biomasa referido a azúcares reductores consumidos.

Los valores de Y (promedio de tres repeticiones) no son significativamente diferentes, de acuerdo con el procedimiento de Tukey ($P < 0.05$).

Mediante la diferencia entre el peso seco de la materia fermentada libre de biomasa, a las 115 horas de proceso, y el peso de sólidos iniciales (S_0), se obtuvieron los valores de ΔS . No obstante, debe aclararse que estos valores, así calculados, constituyen una aproximación a los valores reales, puesto que los posibles productos metabólicos no volátiles, representados por P (Fig. 2.1), no pudieron ser separados de la materia fermentada por razones de índole práctico.

Los respectivos análisis de regresión de ΔX sobre ΔS y de ΔS sobre S_0 demostraron el comportamiento lineal esperado (Figs. 2.3 y 2.4), lo que permite inferir que para el proceso que está siendo analizado, tanto el rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$), referido a los sólidos consumidos, como la fracción de sólidos utilizados ($\beta = -\Delta S/S_0$) son constantes para los diferentes valores de S_0 ensayados.

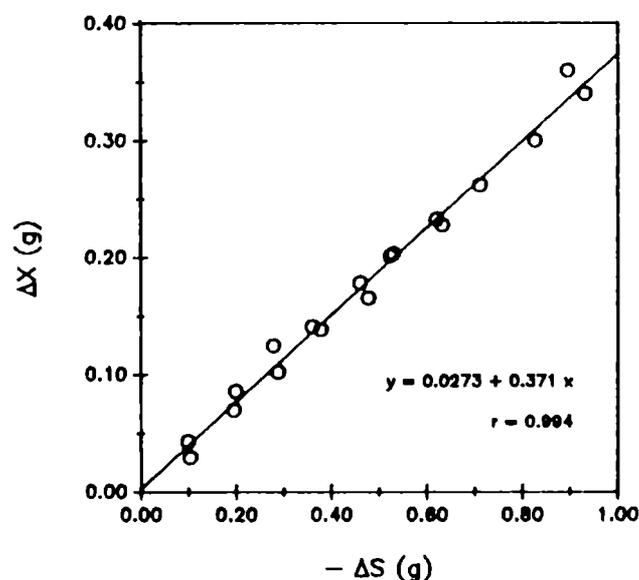


Fig. 2.3 Regresión lineal de ΔX sobre $-\Delta S$, para cultivos de la cepa E_6 , desarrollados sobre caldo CA durante 115 horas. Los valores de S_0 estuvieron comprendidos entre 0.13 y 1.3 g, para volúmenes de trabajo de 100 ml.

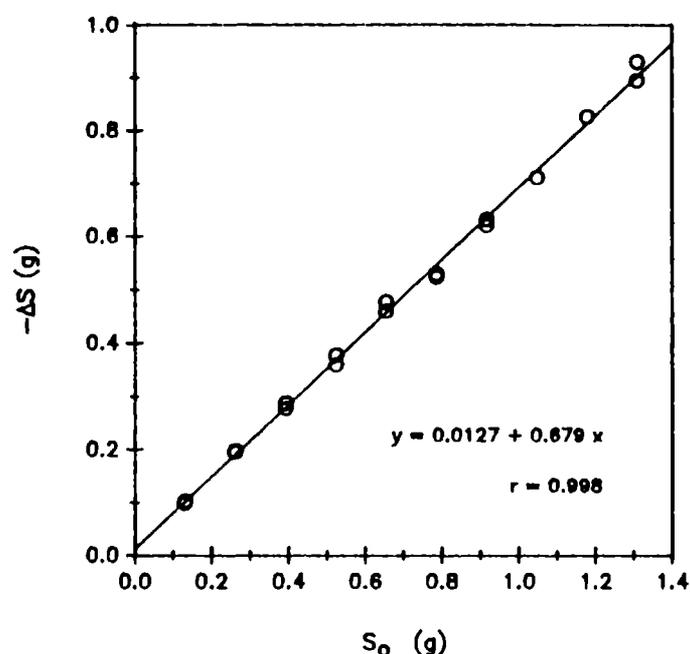


Fig. 2.4 Regresión lineal de $-\Delta S$ sobre S_0 , para cultivos de la cepa E_6 , desarrollados sobre caldo CA, durante 115 horas, con volúmenes de trabajo de 100 ml.

Se determinó la pérdida de peso seco de los cultivos (ΔG_S), para cada condición de S_0 , como la diferencia en peso de la materia fermentada seca al final y al inicio del proceso.

Al graficar $-\Delta G_S$ contra S_0 (Fig. 2.5) se observó la linealidad predicha por la ecuación 2.13; lo que demuestra que con $Y_{x/s}$ y β constantes (Figs. 2.3 y 2.4), $Y_{p/s}$ también fue constante. Así, la proporcionalidad entre $-\Delta G_S$ y S_0 podría ser utilizada como un índice de la existencia de limitación por sustrato, especialmente en los cultivos en sustrato sólido utilizando los medios MA y MAC, en los que por dificultades prácticas no puede separarse la biomasa del resto de la materia fermentada.

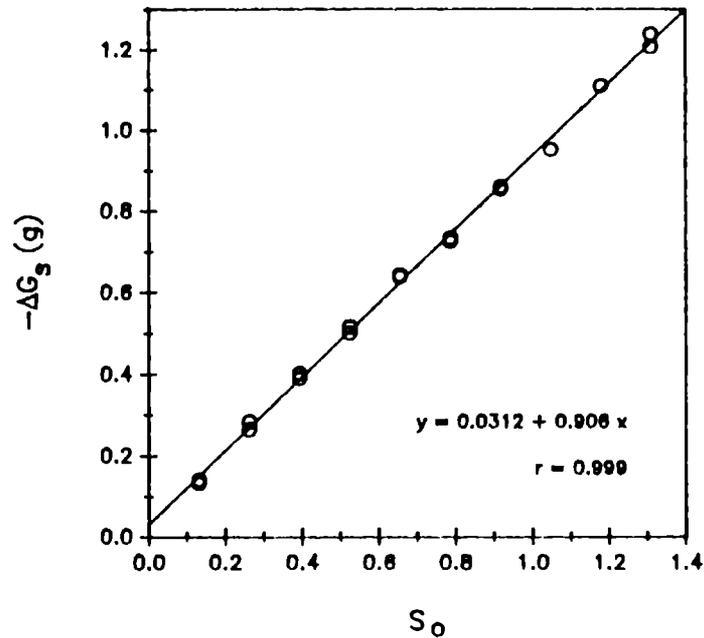


Fig. 2.5 Regresión lineal de $-\Delta G_s$ sobre S_0 , para cultivos de la cepa E_6 , desarrollados durante 115 horas sobre caldo CA, con volúmenes de trabajo de 100 ml.

Crecimiento en los medios MA y MAC

Se realizaron fermentaciones sólidas sin aireación forzada utilizando los medios de cultivo MA y MAC, preparados a distintos valores de S_0 .

Dadas las características físicas de dichos medios de cultivo, un incremento en el valor de S_0 conduce inevitablemente a:

- 1) Una disminución en el grado de porosidad (aumento de la densidad aparente) si se mantiene constante el volumen aparente.
- 2) Un incremento en el volumen aparente si se mantiene constante el grado de porosidad, en cuyo caso habría

que considerar una variable adicional, el espesor del lecho, el cual dependería de las dimensiones del fermentador (Fig. 2.6).

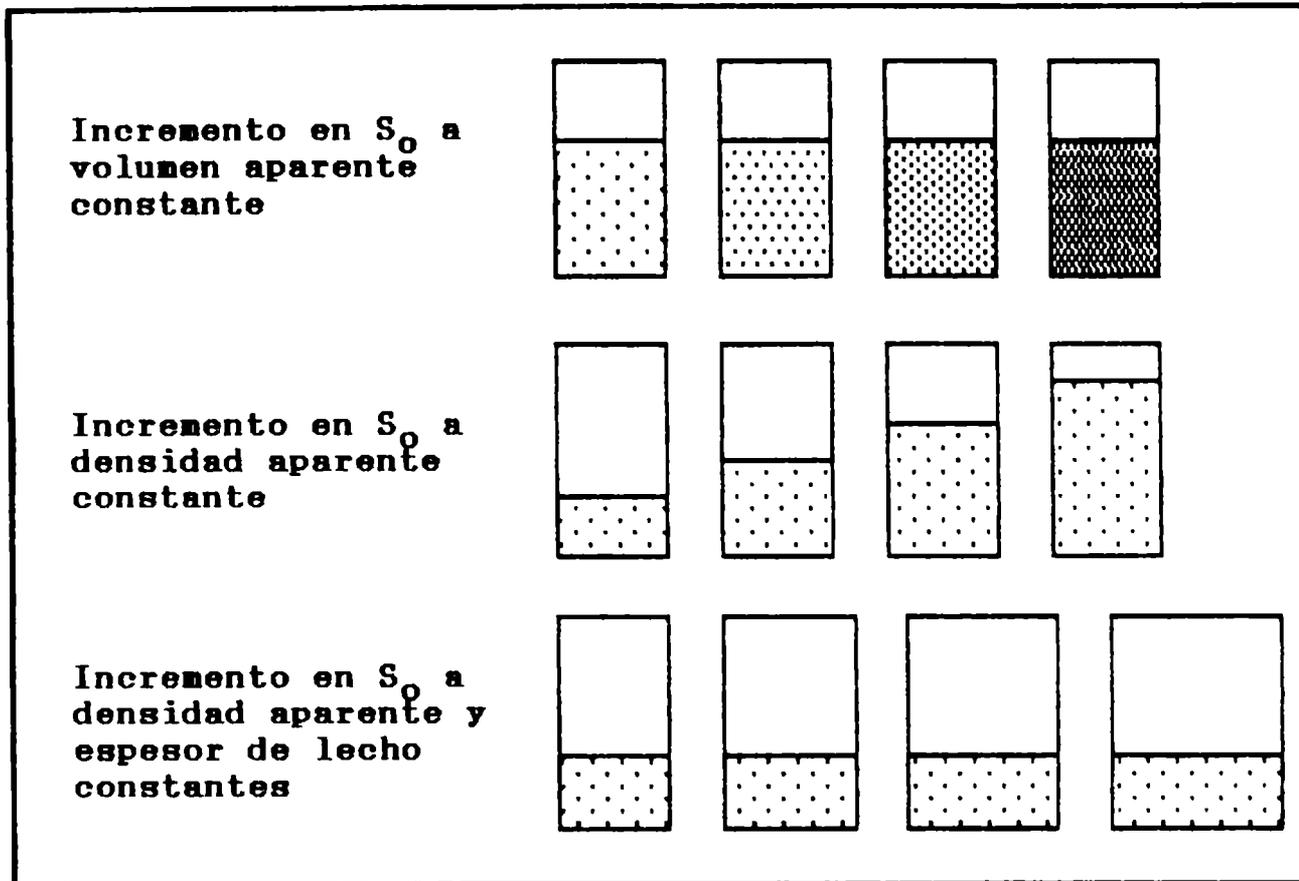


Fig. 2.6 Algunas de las posibles modificaciones del lecho, como consecuencia de variaciones en el peso de los sólidos iniciales (S_0)

En base a lo anterior, fue necesario considerar varias posibles estrategias a seguir en el estudio del efecto de S_0 sobre algunos parámetros de cultivo ($Y_{x/s}$, β etc.), ya que las distintas variables introducidas al modificar el valor de S_0 podían dar lugar a condiciones de limitación del crecimiento no imputables a la disponibilidad y accesibilidad de sustrato. Son algunas de ellas: reducción en los espacios disponibles para el crecimiento; limitación en la transferen-

cia de oxígeno, dióxido de carbono, nutrientes, calor etc. El efecto combinado de todos estos factores, ha sido reportado como parcialmente responsable de los más bajos rendimientos en biomasa que generalmente se obtienen en fermentaciones sólidas, cuando se comparan con los correspondientes cultivos sumergidos (Zadrazil y Brunnet 1981; Moo-Young et al. 1983; Laukevics et al. 1984; Laukevics et al. 1985).

Variaciones en los sólidos iniciales, manteniendo constante la densidad aparente.

Tanto para el medio MA como para el MAC, al incrementar S_0 , utilizando fermentadores de 7,5 cm de diámetro, fue posible obtener lechos con densidad aparente constante, como lo demuestra la proporcionalidad observada entre S_0 y el volumen aparente del medio de cultivo (Fig. 2.7). Bajo estas condiciones se realizaron cultivos sin aireación forzada con la cepa E_6 , cuantificándose, al término de 360 horas de proceso: la biomasa total producida (micelio + esporas), el grado de hidrólisis de almidón, el recuento de esporas totales, el consumo de azúcares reductores y las pérdidas de peso seco de la materia fermentada.

Las determinaciones de biomasa fueron hechas indirectamente en base a medidas de N-acetilglucosamina, practicadas sobre la materia fermentada global. Esto obligó, tal como se especifica en materiales y métodos a cuantificar tanto los contenidos de N-acetilglucosamina de las esporas y del micelio (G_e y G_m respectivamente) como el peso de una

espora (M_e). Debe aclararse que las estimaciones de biomasa en base a medidas indirectas de alguno de sus componentes, son aplicables si se introducen las correcciones correspondientes a las variaciones en su contenido, ocurridas durante los distintos estados de desarrollo (Moo-Young et al. 1983).

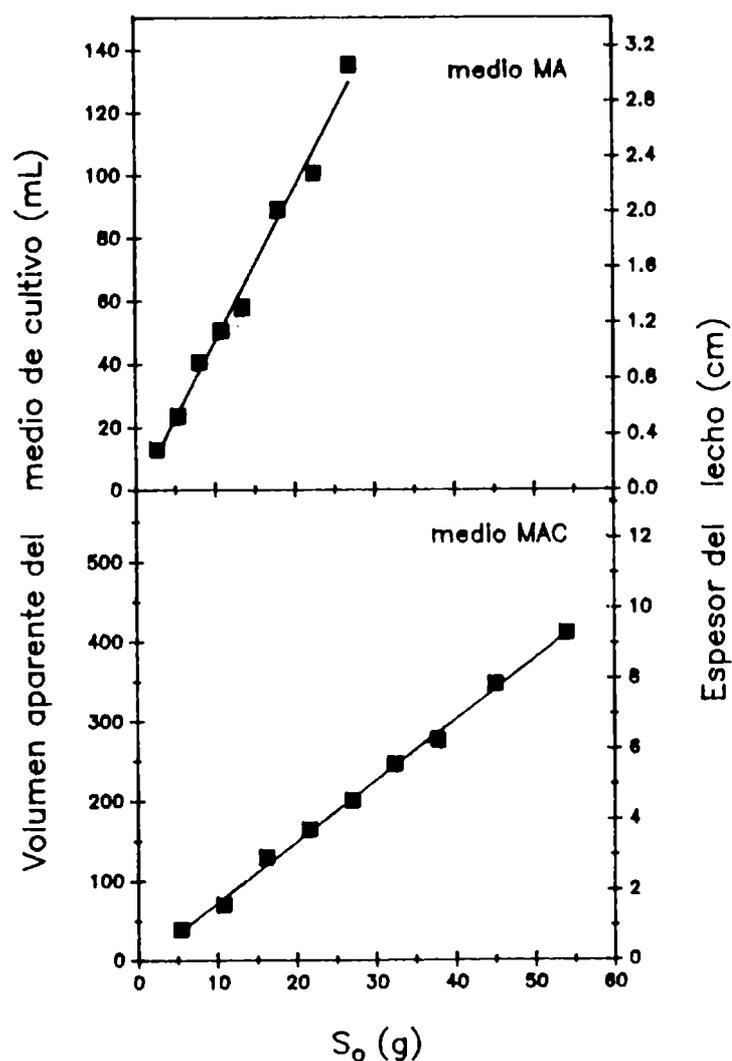


Fig. 2.7 Cambios en el volumen aparente y espesor del lecho, como consecuencia de variaciones en el peso de sólidos iniciales, para los medios MA y MAC, empaquetados en fermentadores cilíndricos de 7.5 cm de diámetro.

Ante la imposibilidad de separar la biomasa de micelio del resto de la materia fermentada, cuando se utilizaron los

medios MA y MAC, se partió de micelio cosechado en caldo CA para determinar el correspondiente contenido de N-acetilglucosamina. Este no varió significativamente con la edad, durante el crecimiento activo (Tabla 2.2). No obstante, con las cepas ensayadas, sólo se observaron ligeras diferencias en el contenido de N-acetilglucosamina en el caso de BJ-1110, cuando se comparó el micelio con las correspondientes esporas (Tabla 2.3).

Tabla 2.2 Contenido de N-acetilglucosamina en el micelio de la cepa E₆, cosechado a distintos tiempos durante el crecimiento en caldo CA.

Tiempo de proceso (h)	N-acetilglucosamina (mg/g)
48	35.98 A
60	33.94 A
72	33.86 A
84	34.25 A
101	36.10 A
172	29.34 B

Los valores de N-acetilglucosamina (promedios de tres repeticiones), que están seguidos de la misma letra, no son significativamente diferentes de acuerdo con el procedimiento de Tukey (P<0.05).

Tabla 2.3 Contenidos de N-acetilglucosamina de micelio y esporas de las cepas E₆ y BJ-1110 de *Metarhizium anisopliae*.

Cepa	G _m	G _e	M _e
E ₆	34.96 ± 0.91	33.56 ± 1.22	12.57 ± 0.24
BJ-1110	35.56 ± 0.53	40.54 ± 1.10	21.72 ± 0.18

G_m = mg de N-acetilglucosamina/g de micelio; G_e = mg de N-acetilglucosamina/g de esporas; M_e = peso (g) de 10¹² esporas.

Al incrementar S_0 hasta valores de 10.8 y 27.0 g, para los medios MA y MAC respectivamente, se observó un incremento proporcional en la biomasa total (ΔX). Adicionalmente, las pérdidas de peso seco de la materia fermentada también fueron proporcionales a S_0 , tal como lo predice la ecuación 2.13, cuando se opera bajo condiciones de limitación por sustrato (Fig. 2.8). En estas circunstancias, los rendimientos en esporas fueron independientes de S_0 , con valores promedio de 8.1×10^9 y 15.2×10^9 esporas/g de afrecho inicial, para los medios MA y MAC respectivamente.

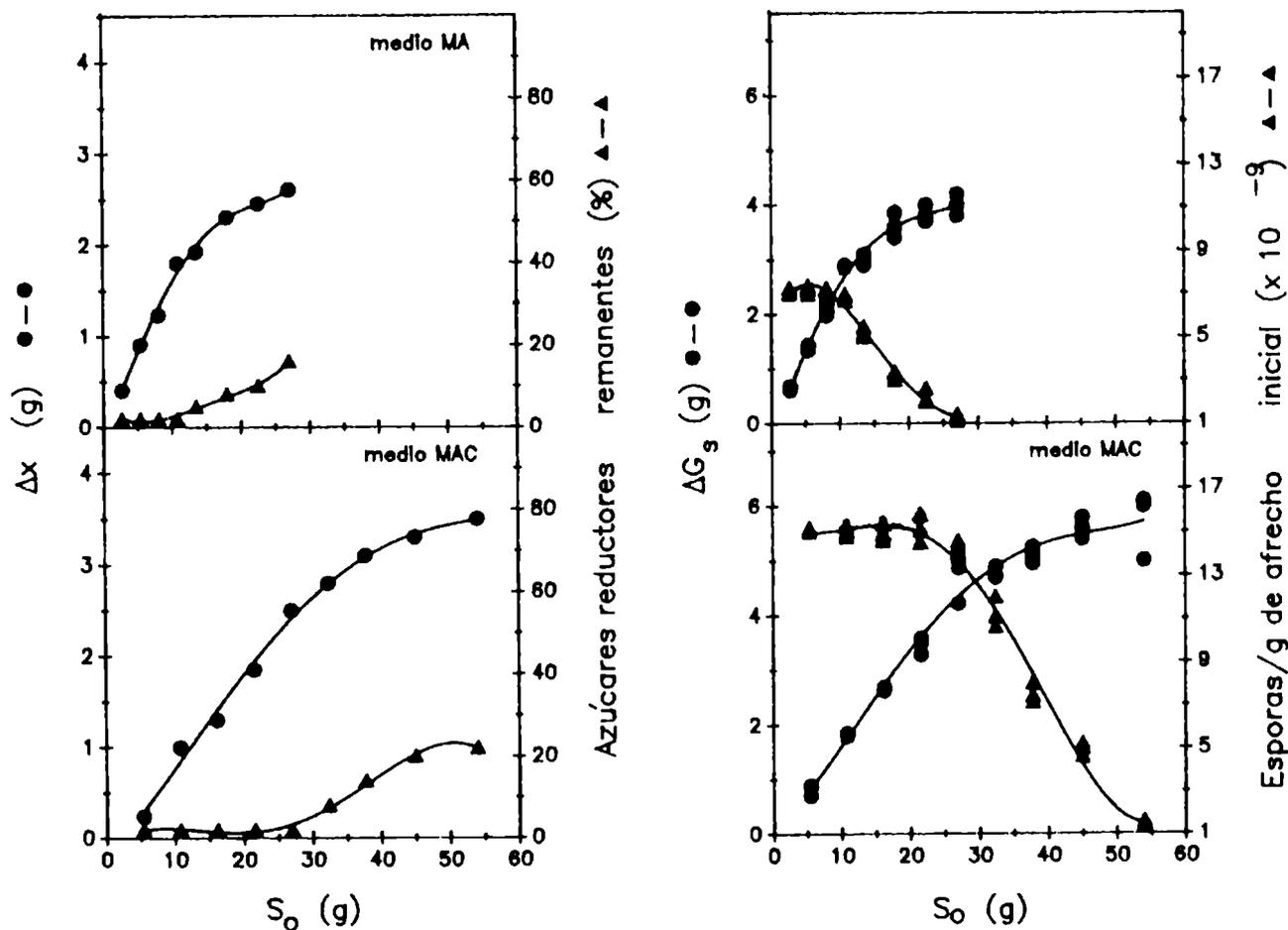


Fig. 2.8 Parámetros de crecimiento de la cepa E_6 en los medios MA y MAC a distintos valores de sólidos iniciales (S_0). Las densidades aparentes, estimadas al inicio de los procesos, fueron: 0.53 (medio MA) y 0.25 (medio MAC). Se usaron fermentadores cilíndricos de 7.5 cm de diámetro.

A valores de S_0 superiores a 10.8 g para el medio **MA** y 27.0 g para el medio **MAC**, se observó un marcado cambio en la proporcionalidad antes señalada, acompañado de un incremento en los niveles de azúcares reductores remanentes, lo que sugiere que bajo esas condiciones otros factores limitantes, no directamente relacionados con la disponibilidad y/o accesibilidad de sustrato, se hicieron manifiestos. Entre esos factores habría que descartar una posible reducción en los espacios disponibles para el crecimiento, ya que como fue demostrado previamente, el grado de porosidad de los medios de cultivo no fue afectado al incrementar S_0 dentro del intervalo de valores ensayados (Fig. 2.7). No obstante, dado que el espesor del lecho sí incrementó proporcionalmente a S_0 (Fig. 2.7), es probable que superados los valores de S_0 antes mencionados, los cuales corresponden a espesores de lecho de aproximadamente 1.2 y 4.3 cm para los medios **MA** y **MAC** respectivamente, el intercambio $O_2 - CO_2$ con el ambiente, así como también la disipación de calor metabólico hayan sido afectados.

La presión parcial de CO_2 en los espacios porosos del lecho sólido es un factor crítico para el crecimiento y formación de producto en fermentaciones sólidas. Si bien la biomasa no es marcadamente afectada a bajas presiones parciales de O_2 , si es altamente dependiente de la acumulación de CO_2 (Nyiri y Lengyel 1968; Bajracharya y Mudgett 1980; Ulmer *et al.* 1981), cuyos efectos inhibitorios pueden ser eliminados mediante una adecuada ventilación

(Ulmer et al. 1981).

En ensayos realizados con la cepa E_6 en medio **MAC**, utilizando fermentadores cilíndricos de distintas dimensiones, se observó que los valores de espesor de lecho, a los cuales $-\Delta G_s$ fue proporcional a S_0 , no dependieron del diámetro del fermentador (Fig. 2.9). Para las diferentes condiciones de ensayo, dicha proporcionalidad se observó a espesores de lecho inferiores a un máximo de 4 cm. Este valor podría ser utilizado como referencia para un posible escalado del proceso, a través de sistemas en bandejas, como los empleados en las fermentaciones sólidas tradicionales.

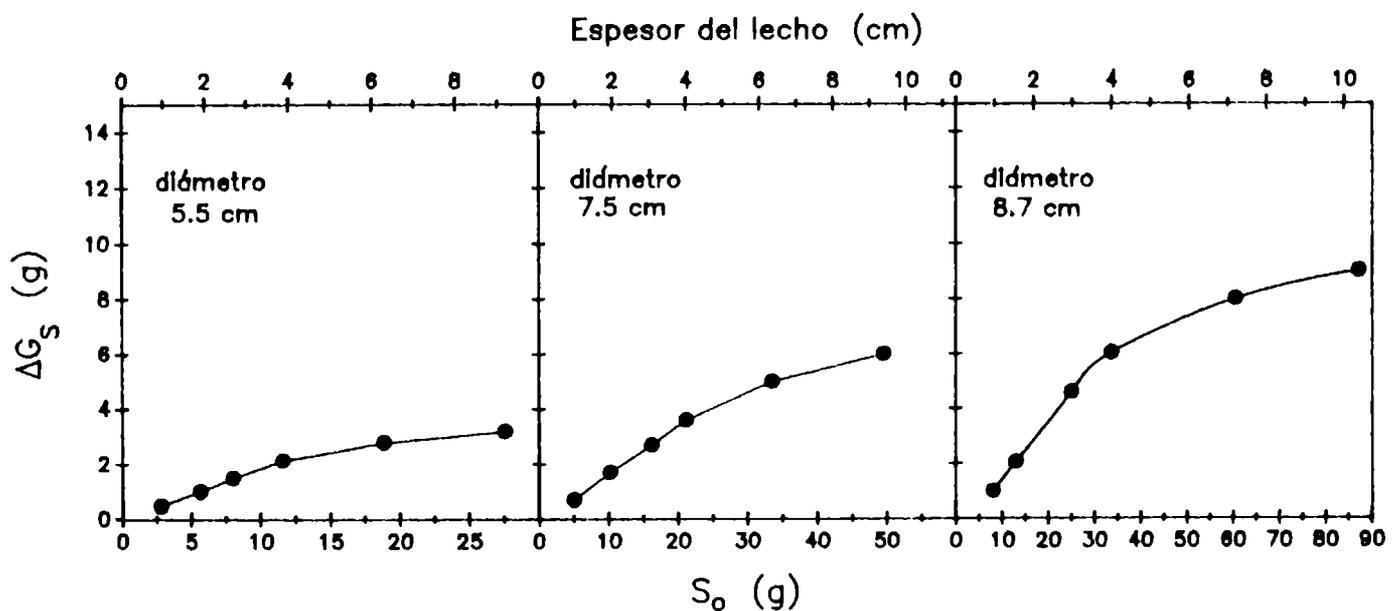


Fig. 2.9 Efecto del diámetro del fermentador sobre la proporcionalidad entre ΔG_s y S_0 en cultivos de la cepa E_6 , desarrollados durante 360 horas en medio **MAC**, preparado a distintos valores de sólidos iniciales. En las diferentes condiciones de operación la densidad aparente del medio de cultivo se mantuvo constante (0.25 g/mL).

Todo lo anterior hace suponer que en las fermentaciones sólidas que están siendo analizadas, dado un determinado grado de porosidad del medio de cultivo, debe existir un espesor de lecho crítico (e_c), por debajo del cual la cantidad de biomasa acumulada sólo dependerá de cuan disponibles o

accesibles se encuentren los distintos constituyentes biodegradables del sustrato sólido. Así, bajo condiciones de operación con espesores de lecho inferiores al crítico y a densidad aparente constante, un incremento en la productividad volumétrica de biomasa (g de biomasa/volumen aparente de lecho x tiempo), sólo sería posible si el sustrato sólido a ser fermentado es sometido a tratamiento previo, mediante procedimientos que conduzcan a incrementar la disponibilidad y accesibilidad de sustrato (Hidrólisis enzimática, ruptura de la estructura cristalina de los constituyentes macromoleculares etc.). Por otro lado, a espesores de lecho superiores al crítico, la optimización del proceso debe contemplar el uso de mecanismos que contrarresten las limitaciones impuestas por la reducción en el suministro de oxígeno, acumulación de dióxido de carbono y otros productos metabólicos tóxicos, la generación de calor etc.

En la discusión precedente se ha hecho referencia a algunos de los posibles factores limitantes del crecimiento de hongos filamentosos en sustrato sólido, bajo condiciones impuestas de operación, en que la disponibilidad de espacios (volumen de espacios interpartículas por unidad de masa de sólidos iniciales) fue la misma para los distintos procesos llevados a cabo.

La disponibilidad de espacios y la eventual ocupación de los mismos por el micelio, han sido considerados como aspectos importantes a ser incluidos en el desarrollo de

modelos cinéticos de crecimiento de hongos filamentosos (Koch 1975). Este crecimiento, típicamente ramificado, conduce a la formación de un micelio de estructura laxa, en cuya conformación actúan además: un autotropismo negativo (las hifas tienden a crecer alejándose unas de las otras) y una respuesta quimiotrópica negativa a productos metabólicos tóxicos que se acumulan en el microambiente circundante (Bull y Trinci 1977). Como consecuencia, la densidad de empaquetamiento del micelio en los espacios disponibles, esto es, $\psi_x = V_m/V_x$, donde V_m es el volumen celular total y V_x es el volumen de los espacios disponibles (Laukevics et al. 1985), es considerablemente menor que la que resultaría de un crecimiento no ramificado y con las hifas organizadas en una configuración paralela compacta.

En base a consideraciones geométricas se puede inferir que el valor de ψ_x en el micelio estaría condicionado por: la longitud de la unidad de crecimiento (distancia promedio entre dos ramificaciones contiguas), el ángulo de cada ramificación, la capacidad de las hifas para doblarse y rodear las partículas de sustrato y las interacciones entre hifas que se aproximan por acción mecánica, producto de mezclado, peso del propio sustrato etc. (Laukevics et al. 1985). Estas consideraciones permitirían suponer, para cada especie de hongo filamentoso, la existencia de valores de ψ_x inferiores a un valor máximo característico, los cuales serían observables bajo condiciones óptimas de crecimiento; en cuyo caso, una vez ocupados los espacios disponibles y alcanzado valores de ψ_x cercanos al máximo, el crecimiento

se haría independiente de la concentración de sustrato limitante y se detendría eventualmente. En base a estos argumentos se ha propuesto un límite teórico máximo de 30 g/L, para la concentración de biomasa alcanzable en fermentaciones sólidas (Laukevics et al. 1985), las que por lo general se caracterizan por la presencia de niveles apreciables de sustrato remanente (Oriol et al. 1988).

Tabla 2.4 Rendimientos en biomasa de la cepa E_6 , desarrollada en los medios MA y MAC a distintos valores de sólidos iniciales

Afrecho inicial (g)	biomasa/afrecho (g/g)		biomasa/volumen aparente (g/L)	
	MA	MAC	MA	MAC
2.7	0.16	0.18	40.9	10.8
5.4	0.17	0.21	42.0	16.4
8.1	0.14	0.20	29.0	14.7
10.8	0.16	0.18	36.6	12.1
13.5	0.16	0.19	37.0	13.2
18.0	0.15	0.18	30.5	12.6
22.5	0.10	0.17	22.8	10.8
27.0	0.11	0.14	22.2	9.7

Las densidades aparentes, estimadas al inicio de los procesos fueron: 0.53 (medio MA) y 0.25 (medio MAC).

Bajo las condiciones experimentales utilizadas en las fermentaciones con los medios MA y MAC, no se hizo evidente una limitación del crecimiento debido a una reducida disponibilidad de espacios. Los rendimientos en biomasa, referidos al peso de afrecho inicial, fueron similares en ambos medios (Tabla 2.4), a pesar de la marcada diferencia en el grado de porosidad existente entre ellos. En consecuencia, los rendimientos volumétricos (peso de biomasa por unidad de

volumen aparente de lecho) fueron de 2 a 3 veces inferiores en el medio MAC (Tabla 2.4). Esto dejó abierta la posibilidad de que el sistema pudiese ser operado a valores mayores de densidad aparente; con lo cual, al reducirse el volumen aparente por unidad de masa de sólidos iniciales, se incrementarían los rendimientos volumétricos antes señalados.

Variaciones en la densidad aparente, manteniendo constantes los sólidos iniciales.

Se realizaron cultivos con la cepa E_6 en medio MAC, sometido a distintos grados de compactación, pero manteniendo constante la cantidad de sólidos iniciales.

Debido a que los incrementos en la densidad aparente del medio de cultivo podían dar lugar a limitaciones en la transferencia de gases, los procesos se llevaron a cabo con aireación forzada, utilizando columnas de vidrio de 2.2 cm de diámetro. No obstante, considerando que en fermentaciones sólidas con aireación forzada, gran parte de del calor generado por metabolismo puede ser transferido al aire como calor latente de vaporización de agua (Sato *et al.* 1982), el aire suministrado a cada columna era sometido a humectación previa, para evitar posibles reducciones en el contenido de humedad de la materia fermentada, causadas por evaporación.

El sistema empleado (Apéndice) permitía la inyección continua de aire estéril, saturado en humedad a la temperatura de proceso. Así, bajo condiciones de operación con caudales de 0.33 y 1.66 L/h x g de sólidos iniciales, y en ausencia de crecimiento (medio no inoculado), no se

observaron variaciones significativas en el contenido de humedad del medio de cultivo, al término de 72 horas de suministro continuo de aire (Tabla 2.5).

Tabla 2.5 Contenido de humedad del medio MAC, durante el suministro continuo de aire ^a

Tiempo (h)	Contenido de humedad (% en base húmeda)	
	C = 0.33	C = 1.66
0	46.34	47.43
24	46.82	47.18
48	46.30	47.70
72	46.60	47.21

^a Se utilizó el sistema de columnas (A) descrito en el apéndice. Cada columna contenía 17 g de medio de cultivo, preparado a una actividad acuosa inicial de 0.998

C = Caudal de aire suministrado al sistema, expresado en L/h x g de sólidos iniciales.

Con los distintos valores de densidad aparente ensayados (0.496, 0.357 y 0.270 g/mL, siendo este último el correspondiente al medio no compactado), el crecimiento vegetativo tuvo lugar durante aproximadamente 90 horas, luego de una fase de retardo de alrededor de 48 horas (Fig. 2.10 A). A partir de 140 horas de proceso comenzó la fase de esporulación, la que se prolongó hasta las 300 horas aproximadamente (Fig. 2.10 B).

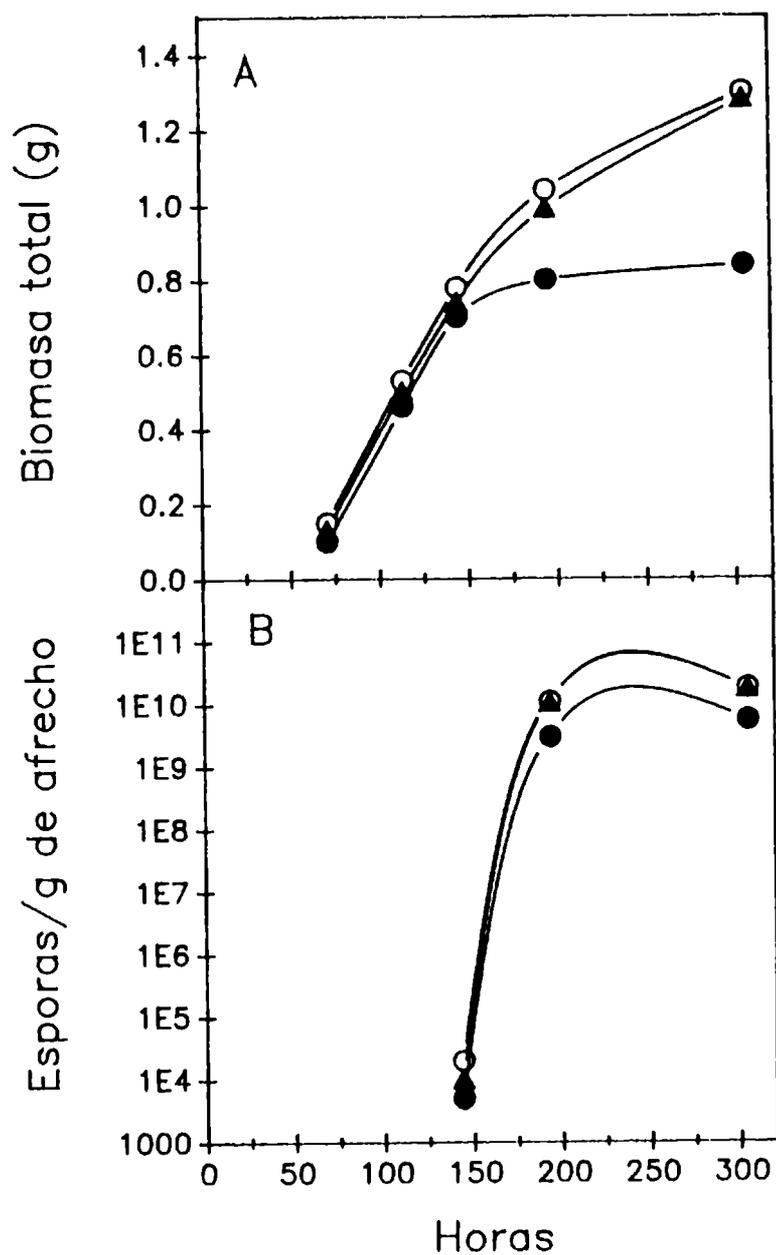


Fig. 2.10 Crecimiento y esporulación de la cepa E_6 en medio MAC, a distintos valores de densidad aparente, manteniendo constante la cantidad de sólidos iniciales (9 g). Los procesos se llevaron a cabo con aireación forzada, utilizando el sistema de columnas (A) descrito en el apéndice, a un caudal de 0.33 L/h x g de sólidos iniciales.

○—○ 0.270 g/mL; ▲—▲ 0.357 g/mL; ●—● 0.496 g/mL

La biomasa total acumulada (micelio + esporas), así como también los rendimientos en esporas, referidos al peso de afrecho inicial, fueron similares en condiciones de operación con densidades aparentes de 0.270 y 0.357 g/mL. Estos resultados indican que una reducción del 25% en el

volumen aparente del medio de cultivo, o lo que es lo mismo, en el volumen de los espacios disponibles, no introdujo limitaciones al crecimiento y esporulación. Consecuentemente, los rendimientos volumétricos en biomasa total y en esporas se incrementaron en un 25%, en relación al medio no compactado, representando las esporas el 85% de la biomasa total acumulada (Tabla 2.6).

Tabla 2.6 Rendimientos volumétricos en biomasa y en esporas, durante el crecimiento de la cepa E_6 en medio MAC, sometido a distintos grados de compactación.

Densidad aparente	Biomasa total acumulada (g/L)		esporas/L ($\times 10^{12}$)	f_e
	al final de la fase vegetativa	al final de la fase esporulativa	al final del proceso	
	0.270	11.95	20.72	
0.357	15.78	27.35	1.85	0.85
0.496	21.92	25.13	0.73	0.36

f_e = g de esporas/g de biomasa total

El peso de las esporas producidas fue calculado a partir del recuento correspondiente, tomando en cuenta que 10^{12} esporas de la cepa E_6 pesan 12.57 g (Tabla 2.3)

Cuando se incrementó la densidad aparente hasta 0.496 g/mL (equivalente a una reducción del 46% en el volumen aparente del medio no compactado), la biomasa total acumulada se redujo en un 34% (Fig. 2.10 A), poniendo en evidencia la limitación del crecimiento debido a una reducida disponibilidad de espacios. Bajo estas condiciones se observó una reducción del 50% en el rendimiento volumétrico en

esporas (con relación al medio no compactado), las cuales representaron sólo el 36% de la biomasa total acumulada (Tabla 2.6).

Es evidente que bajo condiciones de limitación por espacios se lograron los más altos rendimientos volumétricos en biomasa vegetativa (21.9 g/L, frente a 15.8 g/L en condiciones de no limitación). Sin embargo, la disminución observada en la eficiencia esporulativa pone de manifiesto la importancia que tiene el adecuado ajuste del grado de porosidad del medio de cultivo para la posterior etapa de diferenciación.

Formulación de balances de materia y energía.

Balances de materia y energía aplicados a las fermentaciones sólidas sin aireación forzada en el medio MAC.

Estudios cinéticos.

Determinación de la velocidad específica de crecimiento.

Variación en el volumen de los espacios libres interpartículas durante el crecimiento.

Cambios térmicos durante el crecimiento y generación de gradientes hídricos. Efecto sobre la respuesta esporulativa.

Formulación de balances de materia y energía.

En procesos fermentativos en general, el grado de bioconversión de sustratos (transformación de sustratos en biomasa y productos) puede ser cuantificado y expresado en términos de rendimientos obtenidos. Estos rendimientos, calculados sobre la base de medidas experimentales de variables tales como: consumo de sustrato, producción de biomasa, consumo de oxígeno, producción de dióxido de carbono, producción de calor etc., juegan un papel fundamental en los estudios de factibilidad de procesos, ya que permiten evaluar la incidencia que sobre los costos de operación tienen la demanda de sustrato y oxígeno, la disipación del calor generado etc. Sin embargo dichos

estudios se ven frecuentemente limitados, puesto que no todas las variables antes mencionadas pueden ser fácilmente medidas durante el desarrollo de un proceso. En estos casos, los balances de materia y energía constituyen una alternativa, ya que permiten predecir valores de coeficientes de rendimiento que den cuenta de las transformaciones llevadas a cabo dentro del biorreactor.

Los balances elementales aplicados a procesos fermentativos, propuestos sobre la base de las leyes fundamentales de la conservación de la materia (Cooney et al. 1977) y de la energía (Erickson et al. 1978a; Erickson et al. 1978b; Erickson 1979; Patel y Erickson 1981; Solomon y Erickson 1981), han sido utilizados con éxito en la estimación de parámetros no medidos, constituyéndose en una herramienta de gran utilidad en aspectos tales como: el control y optimización de procesos (Cooney et al. 1977; Wang et al. 1977; Wang et al. 1979; Bravard et al. 1979; Madorn 1979; Ho 1979; Stephanopoulos y San 1984; San y Stephanopoulos 1984; Grosz et al. 1984), la predicción de coeficientes de rendimientos máximos (Roels 1980a; Roels 1980b; Eroshin y Minkevick 1982) y el análisis de consistencia de datos experimentales (Ferrer y Erickson 1979; Wang y Stephanopoulos 1983).

De acuerdo con esas estrategias, el crecimiento microbiano es considerado como una reacción química en la que el sustrato carbonado, en presencia de oxígeno y una fuente de nitrógeno, es convertido en biomasa, dióxido de carbono,

agua y otros productos metabólicos extracelulares, con la concomitante generación de calor. No obstante se requiere conocer las fórmulas empíricas de las especies intervinientes, las cuales se asume permanecen constantes durante la fermentación.

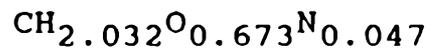
En la aplicación de balances elementales al crecimiento y esporulación de *Metarhizium anisopliae* en el medio MAC desarrollado en el presente estudio, se consideró, tal como fue discutido anteriormente, que el afrecho de arroz suministra los requerimientos nutricionales necesarios.

Tabla 3.1 Composición centesimal y elemental del afrecho de arroz y de las fracciones que surgirían de suprimir alguno de sus constituyentes.

Constituyente suprimido	Composición centesimal (%)						Composición elemental (%)				
	Almidón	Azúcares solubles	Fibras	Proteínas	Lípidos	Cenizas	C	H	O	N	Cenizas
Ninguno	31.000	26.720	8.000	14.444	8.930	10.910	41.985	7.110	37.685	2.310	10.910
Fibras	33.696	29.043	-	15.696	9.706	11.858	41.771	7.191	36.668	2.511	11.858
Fibras + azúcares solubles	47.487	-	-	22.126	13.679	16.712	42.496	7.406	29.846	3.538	16.712
Fibras + azúcares solubles + almidón	-	-	-	42.135	26.050	31.826	40.734	8.522	12.179	6.738	31.826

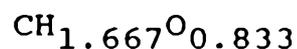
El análisis elemental del afrecho (Tabla 3.1) permitió, usando el concepto de carbono-mol (Roels 1983), derivar su fórmula empírica. Así, un C-mol de afrecho

(cantidad de afrecho que contiene un átomo gramo de carbono) estaría representado por:

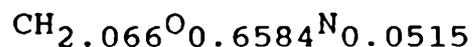


con un peso molecular de 28.575 g (el 10.91% de este peso corresponde a cenizas).

Asumiendo que las fibras (principalmente celulosa y lignina) no son asimilables, y si éstas están representadas por un polímero de glucosa de fórmula:



constituyendo el 8% en peso del afrecho (Tabla 3.1), entonces la fórmula de un C-mol de la fracción de afrecho asimilable, deducida a partir de la nueva composición elemental que surge como resultado de suprimir las fibras (Tabla 3.1), quedaría reducida a:



con un peso molecular de 28.728 g (el 11.86 % de este peso corresponde a cenizas).

La fracción de afrecho asimilable puede ser separada en: un primer término de la forma CH_2O (fórmula de un C-mol de glucosa), representando la fracción de azúcares solubles y un segundo término de la forma $\text{CH}_{2.0914}\text{O}_{0.5268}\text{N}_{0.0714}$ (deducido a partir de la composición elemental calculada en ausencia de fibras y azúcares solubles - Tabla 3.1) que representa la fracción restante, constituida por almidón, proteínas y lípidos. Así:

$$\text{CH}_{2.066}^{\text{O}0.6584}\text{N}_{0.0515} = 0.2787 \text{CH}_2\text{O} + 0.72129 \text{CH}_{2.0914}^{\text{O}0.5268}\text{N}_{0.0714} \quad (3.1)$$

De manera similar, la fracción constituida por almidón, proteínas y lípidos ($\text{CH}_{2.0914}^{\text{O}0.5268}\text{N}_{0.0714}$) puede ser desdoblada en: $\text{CH}_{1.6667}^{\text{O}0.8333}$ representando un C-mol de almidón y una fracción lipídico-proteica restante de la forma $\text{CH}_{2.5105}^{\text{O}0.2242}\text{N}_{0.1418}$. Así:

$$0.7213 \text{CH}_{2.0914}^{\text{O}0.5268}\text{N}_{0.0714} = 0.3581 \text{CH}_{1.6667}^{\text{O}0.8333} + 0.3632 \text{CH}_{2.5105}^{\text{O}0.2242}\text{N}_{0.1418} \quad (3.2)$$

Combinando las ecuaciones (3.1) y (3.2) se obtiene:

$$\text{CH}_{2.066}^{\text{O}0.6584}\text{N}_{0.0515} = 0.27871 \text{CH}_2\text{O} + 0.3581 \text{CH}_{1.6667}^{\text{O}0.8333} + 0.3632 \text{CH}_{2.5105}^{\text{O}0.2242}\text{N}_{0.1418} \quad (3.3)$$

Dado que el almidón, antes de ser asimilado debe ser hidrolizado, y considerando que por cada C-mol de almidón que se hidroliza se genera un C-mol de glucosa con el concomitante consumo de 0.1666 moles de agua, la ecuación (3.3) puede ser reescrita de la siguiente manera:

$$\text{CH}_{2.066}^{\text{O}0.6584}\text{N}_{0.0515} + 0.0597 \text{H}_2\text{O} = 0.6368 \text{CH}_2\text{O} + 0.3632 \text{CH}_{2.5105}^{\text{O}0.2242}\text{N}_{0.1418} \quad (3.4)$$

Esta ecuación indica que por cada C-mol de afrecho asimilable habría, potencialmente disponibles para el crecimiento, 0.6368 C-moles de azúcares (equivalentes a glucosa) y 0.3632 C-moles de una fracción restante que actuaría como fuente de nitrógeno.

A partir de la composición elemental del micelio y las esporas de la cepa E₆ de *M. anisopliae* (Tabla 3.2) se derivaron las respectivas fórmulas mínimas. Así un C-mol de cada uno de estos componentes de la biomasa fúngica estaría representado por:

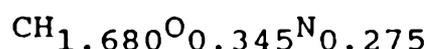
$\text{CH}_{2.026}\text{O}_{0.691}\text{N}_{0.0968}$ para el micelio, con un peso molecular de 27.8286 g
 y $\text{CH}_{2.1638}\text{O}_{0.6211}\text{N}_{0.1317}$ para las esporas, con un peso molecular de 26.8445 g

Tabla 3.2 Composición elemental del micelio y las esporas de la cepa E₆ de *M. anisopliae*

Elemento	Composición (%)	
	Micelio	Esporas
C	43.12	44.70
H	7.28	8.06
O	39.73	37.02
N	4.87	6.87
Cenizas	5.00	3.35

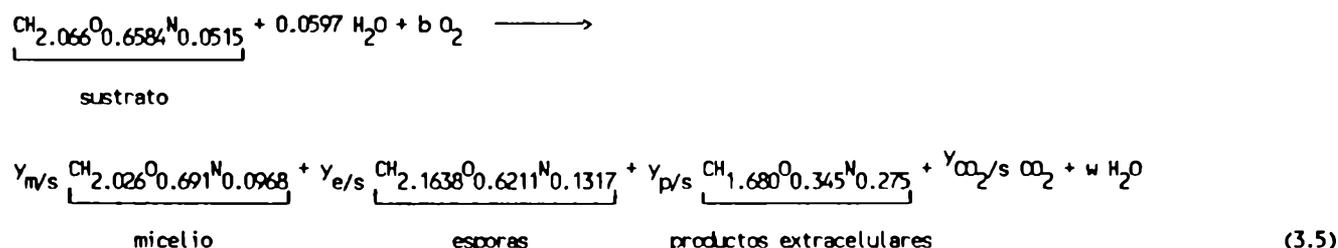
Es evidente que durante el crecimiento y esporulación de *M. anisopliae* a expensas de afrecho de arroz, se forman enzimas extracelulares (amilasas, proteasas, lipasas, probablemente otras), pues de lo contrario, algunos de los constituyentes más abundantes de dicho sustrato (almidón, proteínas, lípidos) no podrían ser asimilados. La formación de otros productos extracelulares, como es el caso de las destruxinas (Fargues y Robert 1986; Kaijiang y Roberts 1986; Gupta et al. 1989) no se descarta. Si bien estos productos son evaluados generalmente en función de sus actividades específicas (Kucera 1981; Rosato et al. 1981; Da Silva y Azevedo 1983; Persson et al. 1984; Leger et al. 1986a; Leger et al. 1986b; Leger et al. 1986c), su cuantificación en términos de masa no siempre es factible, debido a las complicaciones experimentales que ello trae aparejado.

Si se asume que los distintos productos extracelulares formados durante el crecimiento y esporulación de *M. anisopliae* a expensas de afrecho de arroz, son de naturaleza proteica, y considerando que la composición elemental promedio de una proteína simple es: 50% de carbono, 7% de hidrógeno, 23% de oxígeno, 16% de nitrógeno y 4% de azufre (Lehninger 1986), entonces la fórmula de un C-mol de estos productos extracelulares sería:

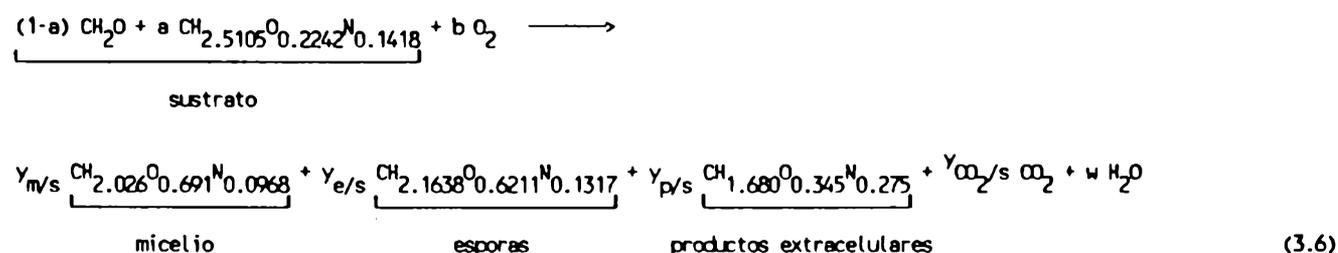


con un peso molecular de 23.995 g (el 4% de este peso corresponde al azufre).

Tomando en cuenta las fórmulas mínimas de las distintas especies intervinientes, el proceso fermentativo global podría ser representado por:



o alternativamente:



donde el sustrato (fracción de afrecho asimilable) es desdoblado en sus dos componentes potencialmente disponibles de acuerdo con la ecuación (3.4), siendo "a" la fracción de

carbono del sustrato suministrada por la fuente de nitrógeno.

Los cuatro balances elementales correspondientes estarían dados por:

Carbono:

$$1 = Y_{m/s} + Y_{e/s} + Y_{p/s} + Y_{CO_2/s} \quad (3.7)$$

Hidrógeno:

$$2.066 = 2.026 Y_{m/s} + 2.1638 Y_{e/s} + 1.680 Y_{p/s} + 2(w - 0.0597) \quad (3.8)$$

Oxígeno:

$$0.718 + 2b = 0.691 Y_{m/s} + 0.621 Y_{e/s} + 0.345 Y_{p/s} + 2 Y_{CO_2/s} + w \quad (3.9)$$

Nitrógeno:

$$0.0515 = 0.0968 Y_{m/s} + 0.1317 Y_{e/s} + 0.274 Y_{p/s} \quad (3.10)$$

donde b , $Y_{m/s}$, $Y_{e/s}$, $Y_{CO_2/s}$, $Y_{p/s}$ y w son coeficientes estequiométricos, expresados como:

$$b = \frac{\text{moles de oxígeno consumido}}{\text{C-mol de sustrato consumido}}$$

$$Y_{m/s} = \frac{\text{C-moles de micelio producido}}{\text{C-mol de sustrato consumido}}$$

$$Y_{e/s} = \frac{\text{C-moles de esporas producidas}}{\text{C-mol de sustrato consumido}}$$

$$Y_{p/s} = \frac{\text{C-moles de productos extracelulares formados}}{\text{C-mol de sustrato consumido}}$$

$$Y_{CO_2/s} = \frac{\text{moles de dióxido de carbono producido}}{\text{C-mol de sustrato consumido}}$$

$$w = \frac{\text{moles de agua producida}}{\text{C-mol de sustrato consumido}}$$

Estos coeficientes estequiométricos pueden ser calculados a partir de los respectivos rendimientos globales, obtenidos mediante medidas experimentales. No obstante, conociendo sólo uno de ellos es posible estimar los restantes, utilizando los balances elementales descritos.

El cálculo de $Y_{m/s}$, $Y_{e/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{CO_2/s}$, a partir de los respectivos rendimientos globales puede hacerse usando las siguientes expresiones:

$$Y_{m/s} = Y_{m/s} \frac{\sigma_m}{\sigma_s} \quad (3.11)$$

$$Y_{e/s} = Y_{e/s} \frac{\sigma_e}{\sigma_s} \quad (3.12)$$

$$Y_{p/s} = Y_{p/s} \frac{\sigma_p}{\sigma_s} \quad (3.13)$$

$$Y_{CO_2/s} = Y_{CO_2/s} \frac{\sigma_{CO_2}}{\sigma_s} \quad (3.14)$$

donde: $Y_{m/s}$, $Y_{e/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{CO_2/s}$ son los rendimientos globales de micelio, esporas, productos extracelulares y CO_2 producidos, expresados en g/g de sustrato consumido, y σ_m , σ_e , σ_p y σ_{CO_2} son los respectivos contenidos fraccionales de carbono, expresados como:

$$\sigma_m = \frac{\text{g de carbono/C-mol de micelio}}{\text{g de micelio/C-mol de micelio}}$$

$$\sigma_e = \frac{\text{g de carbono/C-mol de esporas}}{\text{g de esporas/C-mol de esporas}}$$

$$\sigma_s = \frac{\text{g de carbono/C-mol de afrecho asimilable}}{\text{g de afrecho asimilable/C-mol de afrecho asimilable}}$$

$$\sigma_p = \frac{\text{g de carbono/C-mol de productos extracelulares}}{\text{g de prod. extracel./C-mol de prod. extracel.}}$$

$$\sigma_{\text{CO}_2} = \frac{\text{g de carbono/C-mol de CO}_2}{\text{g de CO}_2\text{/C-mol de CO}_2}$$

Para el proceso fermentativo global se puede establecer un balance de energía introduciendo el concepto de grado de reducción (γ), o número de equivalentes de electrones disponibles que pueden ser transferidos al oxígeno, cuando el sustrato orgánico o la biomasa o los productos extracelulares son oxidados a un estado de referencia, en este caso dado por CO_2 , H_2O y NH_3 .

Tomando como referencia los grados de reducción: 4 para el carbono, 1 para el hidrógeno, -2 para el oxígeno y -3 para el nitrógeno (Minkecich y Eroshin 1973), los correspondientes grados de reducción para las especies intervinientes en el proceso serían:

Sustrato:	$\gamma_s = 4.5947$	$\frac{\text{equivalentes de e}^- \text{ disponibles}}{\text{C-mol de afrecho asimilable}}$
Micelio:	$\gamma_m = 4.3536$	$\frac{\text{equivalentes de e}^- \text{ disponibles}}{\text{C-mol de micelio}}$
Esporas:	$\gamma_e = 4.5265$	$\frac{\text{equivalentes de e}^- \text{ disponibles}}{\text{C-mol de esporas}}$

Productos extracelulares: $\gamma_p = 4.1650 \frac{\text{equivalentes de } e^- \text{ disponibles}}{\text{C-mol de productos extracelulares}}$

Para los valores de grados de reducción: C=4, H=1, O=-2, N=-3, no hay electrones disponibles en CO₂ y H₂O.

El balance de grados de reducción para el proceso que está siendo considerado sería:

$$4.5947 + b(-4) = 4.3536 y_{m/s} + 4.5265 y_{e/s} + 4.165 y_{p/s} \quad (3.15)$$

Dividiendo por γ_s se obtiene:

$$1 = 0.8705 b + 0.9475 y_{m/s} + 0.9851 y_{e/s} + 0.9064 y_{p/s} \quad (3.16)$$

o lo que es lo mismo:

$$1 = \epsilon + \eta_m + \eta_e + \xi \quad (3.17)$$

donde:

- $\epsilon = 0.8705 b =$ fracción de electrones disponibles del sustrato, transferidos al oxígeno
- $\eta_m = 0.9475 y_{m/s} =$ fracción de electrones disponibles del sustrato, transferidos al micelio
- $\eta_e = 0.9851 y_{e/s} =$ fracción de electrones disponibles del sustrato, transferidos a las esporas
- $\xi = 0.9064 y_{p/s} =$ fracción de electrones disponibles del sustrato, transferidos a los productos extracelulares

Dado que el calor de reacción por electrón transferido al oxígeno es relativamente constante (27 Kcal/mol de e⁻) para la oxidación de biomasa y de una amplia gama de moléculas orgánicas (Minkevich y Eroshin 1973; Erickson **et al.** 1978a; Erikson **et al.** 1978b), se deduce que ϵ equivale a la fracción de energía del sustrato transferida al oxígeno, o lo que es lo

mismo convertida en calor. Así, el calor generado durante el proceso vendría dado por:

$$Q = 27 \times 4b \text{ Kcal/C-mol de sustrato consumido} \quad (3.18)$$

Similarmente, η_m , η_e y ξ equivalen a la fracción de energía del sustrato transferida al micelio, las esporas y los productos extracelulares respectivamente.

En procesos fermentativos en general, resulta de interés estimar los máximos valores de rendimiento que se pueden alcanzar para cada uno de los productos involucrados (biomasa, productos extracelulares etc.), ya que ello permite tener una referencia para los respectivos cálculos de eficiencia.

Si el sustrato utilizado es a su vez fuente de carbono y energía, habría que considerar dos alternativas (Roels 1983) en el cálculo de los rendimientos máximos:

- a) Que el grado de reducción del sustrato sea menor que el del producto considerado, en cuyo caso la formación de éste sería un proceso limitado en energía. En estas circunstancias se parte de la premisa de que la energía del sustrato es transferida en su totalidad a dicho producto.
- b) Que el grado de reducción del sustrato sea mayor que el del producto considerado, en cuyo caso su formación estaría limitada por carbono, siempre que la fuente de nitrógeno esté en exceso. En estas circunstancias se considera que el carbono del sustrato consumido es transferido totalmente al producto.

En el caso particular del presente estudio, las esporas constituyen el principal producto de interés, y dado que el grado de reducción de estas (4.5265) es ligeramente menor que el del afrecho asimilable (4.5947), su formación no estaría limitada por energía.

Dado que la relación carbono/nitrógeno en el afrecho asimilable es más alta que en el micelio, las esporas y los productos metabólicos extracelulares (lo que se deduce a partir de las respectivas fórmulas mínimas), es evidente que la bioconversión del afrecho, en este caso, es un proceso limitado por nitrógeno. Así, en el cálculo del rendimiento máximo de esporas se considera que el nitrógeno del afrecho asimilable es transferido en su totalidad a las mismas, en cuyo caso, de acuerdo con la ecuación (3.10):

$$Y_{e/s} = 0.391 \quad (3.19)$$

en consecuencia, de la ecuación (3.12) se deduce que:

$$(Y_{e/s})^{\max} = Y_{e/s} \frac{\sigma_s}{\sigma_e} = 0.365 \frac{\text{g de esporas}}{\text{g de afrecho asimilable}} \quad (3.20)$$

Balances de materia y energía aplicados a las fermentaciones sólidas sin aireación forzada en medio MAC

En este tipo de fermentaciones, la ausencia de una corriente continua de aire fluyendo a través del sistema, impidió el uso de analizadores convencionales (polarográficos, paramagnéticos, IR) para medir el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono. Otros instrumentos de

medición como los respirómetros de Warburg y de Gilson no pudieron ser adaptados, debido a la dificultad de operar con muestras representativas, dada la naturaleza sólida de la materia fermentada. Es por ello que se recurrió al uso de balances elementales para estimar los coeficientes estequiométricos correspondientes, a partir de medidas experimentales de producción de biomasa y consumo de sustrato.

En base a los resultados presentados en la Fig. 2.8, correspondientes al desarrollo de la cepa E₆ en medio MAC, a distintos valores de sólidos iniciales, se calcularon los rendimientos en biomasa de micelio ($Y_{m/s}$) y de esporas ($Y_{e/s}$), referidos a sólidos consumidos, de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$Y_{m/s} = \frac{\Delta M}{-(\Delta G_s - \Delta X)}$$

$$Y_{e/s} = \frac{\Delta E}{-(\Delta G_s - \Delta X)}$$

donde ΔM y ΔE son las biomazas acumuladas de micelio y esporas respectivamente, y $(\Delta G_s - \Delta X)$ es el peso de sólidos consumidos, de acuerdo con la ecuación (2.8) descrita previamente.

Bajo condiciones de operación en que el crecimiento estuvo limitado por sustrato ($S_0 \leq 27g$, tal como fue discutido en la unidad 2), los rendimientos globales en micelio y esporas ($Y_{m/s}$ e $Y_{e/s}$ respectivamente) fueron

relativamente constantes, con valores promedio de 0.034 g de micelio producido/g de sustrato consumido y 0.296 g de esporas producidas/g de sustrato consumido (Tabla 3.3). Este último valor puede considerarse satisfactorio, ya que representa el 81% del rendimiento máximo permisible de 0.365 g/g, calculado a partir de los balances elementales, sobre la base de la limitación por nitrógeno. Es evidente que el valor máximo no podría ser alcanzado, si se toma en cuenta que una fracción del nitrógeno del afrecho fue transferida al micelio remanente y a los productos extracelulares formados. Además no se descarta la posibilidad de que algunos compuestos nitrogenados del sustrato no sean asimilables.

Tabla 3.3 Producción de biomasa y consumo de sustrato, en fermentaciones sin aireación forzada con la cepa E_6 en medio MAC, a distintos valores de sólidos iniciales.

S_0^a (g)	Afrecho inicial (g)	ΔE^b (g)	ΔM^b (g)	$-\Delta S^{bc}$ (g)	$Y_{e/s}^d$	$Y_{m/s}^e$
5.4	2.7	0.451	0.048	1.598	0.283	0.030
10.8	5.4	1.048	0.111	3.667	0.285	0.030
16.2	8.1	1.485	0.240	4.535	0.327	0.053
21.6	10.8	1.864	0.182	6.116	0.304	0.029
27.0	13.5	2.432	0.252	8.660	0.281	0.029
32.4	16.2	2.036	1.042	9.878	0.206	0.105
37.8	18.9	1.738	1.835	12.718	0.136	0.144
45.0	22.5	1.309	2.526	13.860	0.094	0.182
54.0	27.0	0.303	3.733	14.896	0.020	0.250

^a Sólidos totales iniciales

^b Los valores de ΔE (esporas producidas), ΔM (micelio producido) y ΔS (sólidos consumidos), promedios de tres repeticiones, fueron obtenidos a partir de los resultados presentados en la Fig. 2.8

^c Calculado mediante la ecuación (2.8)

^d g de esporas/g de sólidos consumidos

^e g de micelio/g de sólidos consumidos

A partir de los rendimientos obtenidos (tabla 3.3) y de los contenidos fraccionales de carbono en el micelio, las esporas y el sustrato asimilable (σ_m , σ_e y σ_s respectivamente - Tablas 3.1 y 3.2), se calcularon los coeficientes estequiométricos correspondientes a la formación de micelio y esporas (Tabla 3.4), utilizando las ecuaciones (3.11) y (3.12).

Tabla 3.4 Coeficientes estequiométricos para el crecimiento de la cepa E₆ en fermentaciones sólidas sin aireación forzada, utilizando el medio MAC a distintos valores de sólidos iniciales.

s_0^a (g)	Afrecho inicial (g)	$Y_{e/s}$	$Y_{m/s}$
5.4	2.7	0.3028	0.0309
10.8	5.4	0.3049	0.0309
16.2	8.1	0.3499	0.0547
21.6	10.8	0.3253	0.0299
27.0	13.5	0.3007	0.0299
32.4	16.2	0.2204	0.1084
37.8	18.9	0.1455	0.1486
45.0	22.5	0.1006	0.1878
54.0	27.0	0.0214	0.2580

^a Sólidos totales iniciales

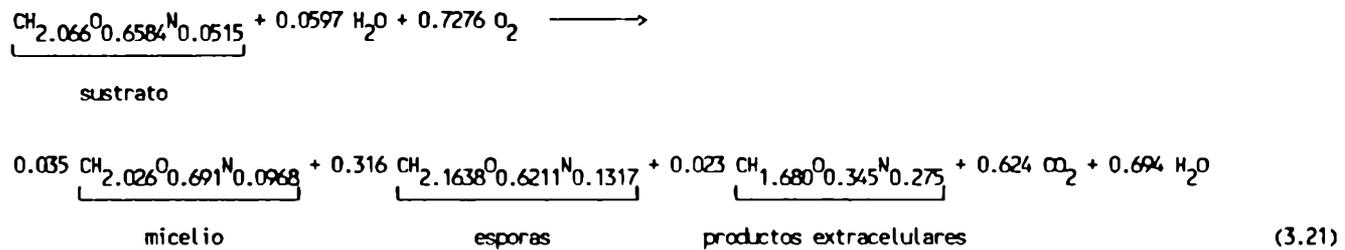
Bajo condiciones de operación en que los sólidos iniciales fueron inferiores a 27 g (condiciones de limitación por sustrato), se calcularon valores promedio para $Y_{m/s}$ e $Y_{e/s}$ de 0.0353 C-moles de micelio producido/C-mol de sustrato consumido y 0.3167 C-moles de esporas producidas/C-mol de sustrato consumido. Estos valores fueron incluidos en las ecuaciones de balances elementales descritas anteriormente (3.7, 3.8, 3.9 y 3.10), lo que permitió el cálculo de $Y_{p/s}$,

$Y_{CO_2/s}$, b y w (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Coeficientes estequiométricos para el crecimiento de la cepa E_6 , en fermentaciones sólidas sin aireación forzada utilizando el medio MAC.

$Y_{m/s}$	$Y_{e/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{CO_2/s}$	b	w
0.0353	0.3167	0.0232	0.6248	0.7276	0.6948

Así, el proceso fermentativo global puede ser representado mediante la siguiente ecuación:



A partir del valor de b se estimó el calor generado durante el proceso, utilizando la ecuación (3.18). Así, por cada C-mol de sustrato consumido debió generarse 78.58 Kcal, o lo que es lo mismo, 2.73 Kcal/g de afrecho asimilado.

En general, la generación de calor en un proceso aerobio es directamente proporcional a la cantidad de oxígeno consumido. Cuanto mayor es la cantidad de oxígeno que debe ser suministrado al sistema, mayor es la cantidad de calor que debe ser removido, para mantener la temperatura de proceso dentro de valores compatibles con la actividad microbiana.

En fermentaciones sólidas en particular, cuando se utilizan subproductos agroindustriales baratos, el suministro

de oxígeno y la remoción del calor generado tienen la mayor incidencia sobre los costos de operación (Luong y Volesky 1983). De allí la importancia de la evaluación de esos parámetros, pues en definitiva son una referencia clave en el diseño de reactores apropiados, especialmente cuando se intenta el escalado de los procesos. En ese sentido los balances de materia y energía constituyen una herramienta de gran utilidad, cuando los parámetros mencionados son difíciles de determinar experimentalmente.

Si bien los balances de materia y energía permiten predecir las relaciones estequiométricas que existen entre los distintos componentes de un proceso microbiológico (sustrato, biomasa, productos), no brindan información acerca de las velocidades a las que dichos componentes varían. Además, en aquellos procesos que involucran crecimiento y diferenciación celular, como ocurre con la mayoría de las fermentaciones con hongos filamentosos, sólo son aplicables a estados de desarrollo bien delimitados, ya que durante la diferenciación las relaciones estequiométricas cambian permanentemente. Es por ello que generalmente los estudios estequiométricos deben ser complementados con la determinación de parámetros cinéticos, que son en definitiva los que caracterizan la dinámica de los procesos.

Estudios cinéticos

Los estudios cinéticos fueron realizados con la cepa E₆ en el medio MAC, utilizando los sistemas de columnas esquematizados en el apéndice. Los cultivos se llevaron a

cabo bajo condiciones de aireación forzada, tal como se especifica en materiales y métodos.

En una curva de crecimiento característica, obtenida bajo las condiciones mencionadas (Fig. 3.1), pueden evidenciarse tres fases: una primera fase de latencia, con una duración de aproximadamente 48 horas, durante la cual ocurre la germinación de las esporas; una segunda fase de crecimiento vegetativo, que se prolonga hasta las 150 horas de cultivo y una fase de esporulación que comienza alrededor de las 150 horas de cultivo y se completa hacia las 240-250 horas de haberse iniciado el proceso.

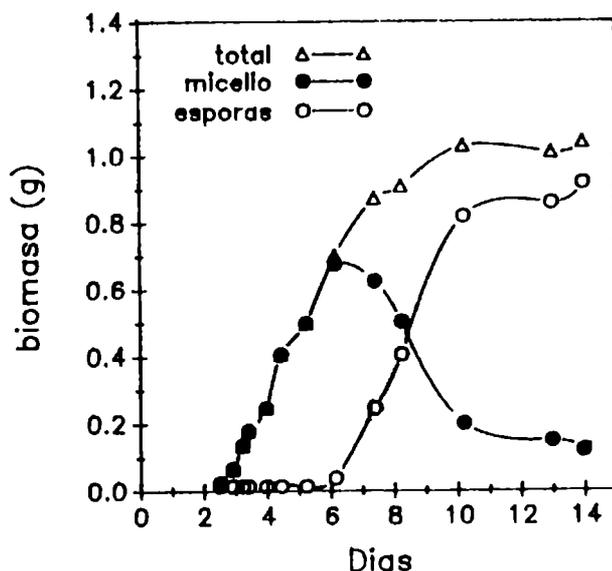


Fig. 3.1 Crecimiento y esporulación de la cepa E_6 en el medio MAC, bajo condiciones de aireación forzada. Los cultivos fueron realizados en el sistema de columnas (A) esquematizado en el apéndice, conteniendo cada columna 8.5 g de sólidos iniciales.

La biomasa vegetativa decae durante la fase de esporulación. No obstante, la biomasa total (micelio + esporas) sigue incrementando, lo cual es compatible con la

forma de desarrollo blástico que caracteriza a la conidiación en *M. anisopliae* (Cole 1986), donde ocurre síntesis de novo de material celular.

Durante las primeras 48 horas de crecimiento vegetativo tiene lugar un rápido incremento en las velocidades de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono (rO_2) y (rCO_2) respectivamente (Fig. 3.2). En esta etapa, las

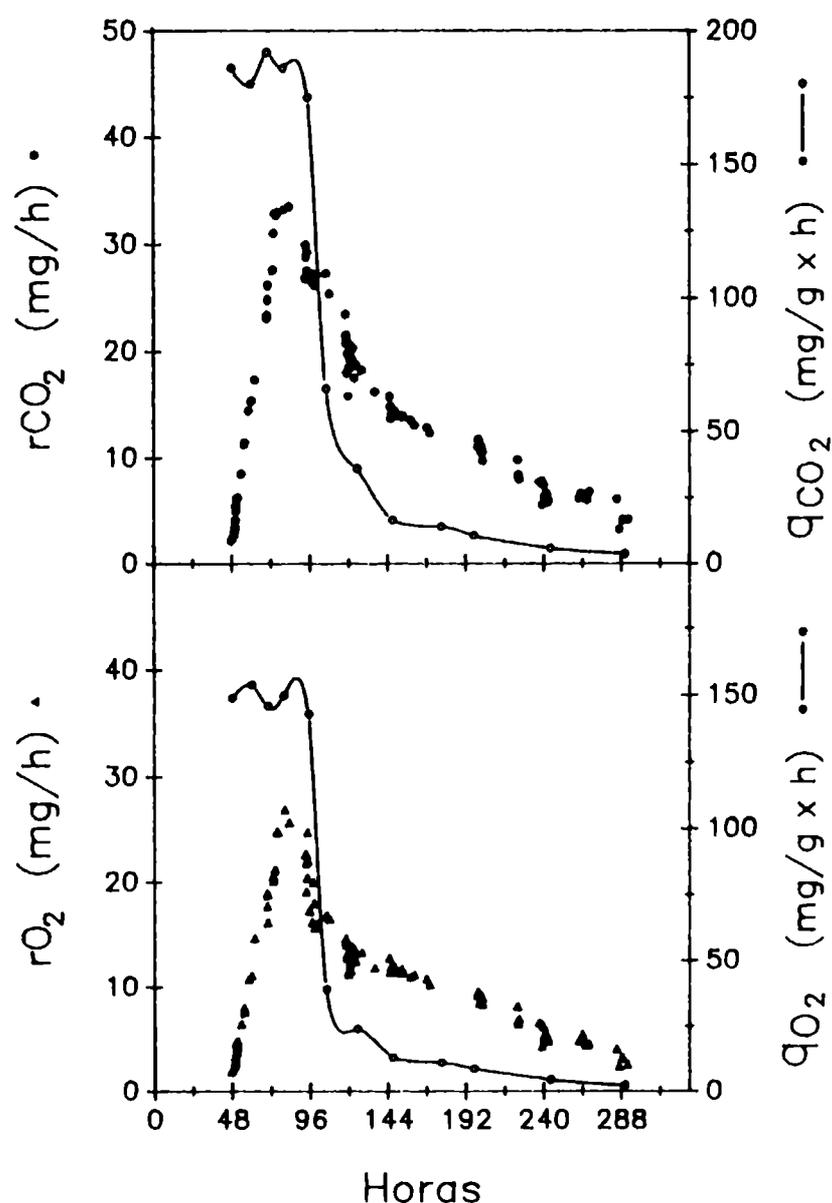


Fig. 3.2 Consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono, durante el crecimiento de la cepa E_6 bajo las condiciones especificadas en la Figura 3.1

las respectivas velocidades específicas permanecen aproximadamente constantes ($q_{O_2} \approx 185$ y $q_{CO_2} \approx 150$), para luego decaer rápidamente, al igual que r_{O_2} y r_{CO_2} , hasta que se inicia la fase de esporulación (Fig. 3.2). A lo largo de esta fase, la caída en dichas velocidades es más lenta. Similarmente, es durante la fase de crecimiento vegetativo cuando se producen los cambios más pronunciados en el peso seco de la materia fermentada y la cantidad de sólidos consumidos (Fig. 3.3), este último parámetro, calculado mediante la ecuación (2.8) descrita previamente.

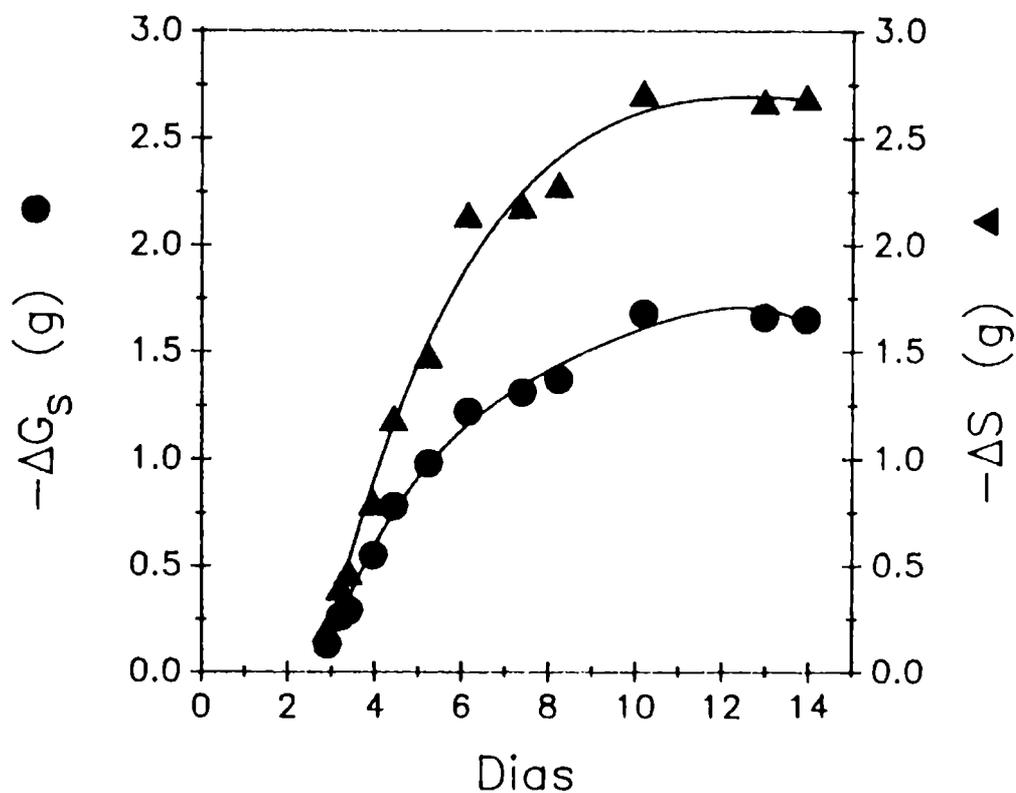


Fig. 3.3 Pérdida de peso ceco de la materia fermentada (ΔG_s) y consumo de sólidos (ΔS), durante el crecimiento de la cepa E_6 bajo las condiciones especificadas en la Figura 3.1.

Determinación de la velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento máximo (μ_m) fue evaluada durante las primeras etapas del desarrollo vegetativo, donde los requerimientos nutricionales estarían en concentraciones saturantes. Se usaron dos procedimientos alternativos: uno basado en los incrementos en la biomasa de micelio, determinada indirectamente por medidas de N-acetilglucosamina; el otro en base a los incrementos en la velocidad de producción de dióxido de carbono, considerando que éste es un producto asociado al crecimiento (Carrizalez et al. 1981). En ambos casos se asumió que, en sus primeras etapas, el desarrollo miceliar sigue una ley exponencial (Trinci 1971).

La velocidad de crecimiento (rX) vendría dada por:

$$rX = \frac{dX}{dt} = \mu_m X$$
$$X = X_0 e^{\mu_m t}$$

Tomando logaritmos:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m t \quad (3.19)$$

donde X_0 y X representan la biomasa inicial y al tiempo t respectivamente.

La velocidad de producción de dióxido de carbono (rCO_2) estaría dada por:

$$rCO_2 = \frac{dCO_2}{dt} = q_{CO_2} X = q_{CO_2} X_0 e^{\mu_m t}$$

Tomando logaritmos:

$$\ln (rCO_2) = \ln (q_{CO_2} X_0) + \mu_m t \quad (3.20)$$

Al aplicar las ecuaciones (3.19) y (3.20) a los correspondientes datos experimentales, obtenidos a partir del crecimiento de la cepa E_6 en medio MAC, se estimó un valor de μ_m de 0.08 h^{-1} (Fig. 3.4), lo que equivale a un tiempo de duplicación de 8.6 horas.

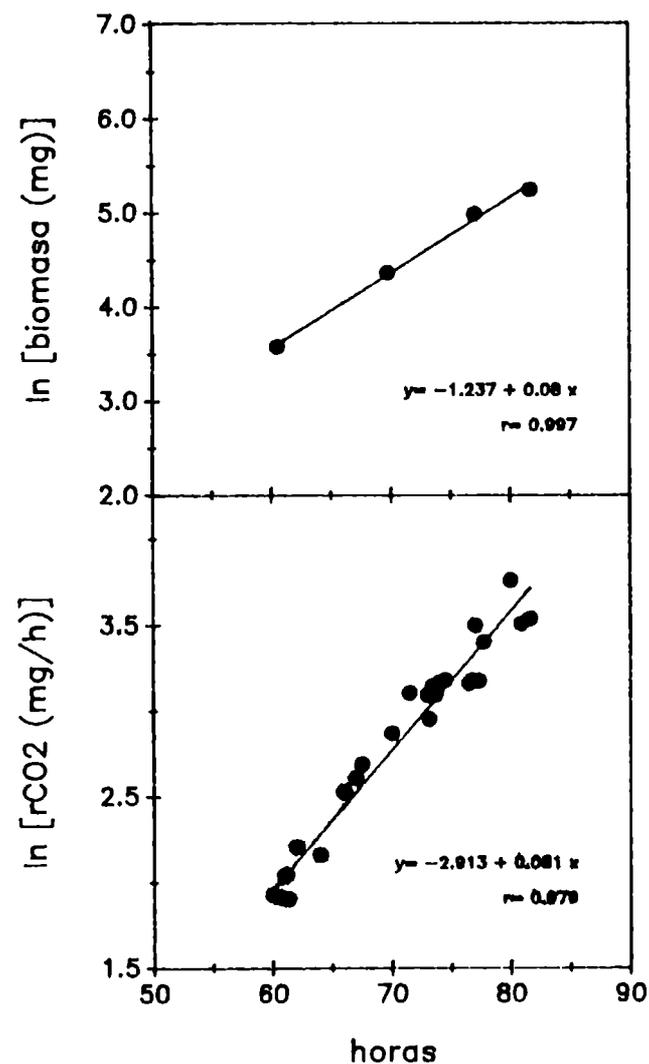


Fig. 3.4 Aplicación de las ecuaciones (3.19) y (3.20) en la determinación de la velocidad específica de crecimiento máximo (μ_m), durante el desarrollo de la cepa E_6 bajo las condiciones especificadas en la Figura 3.1

Se han reportado tiempos de duplicación más cortos (alrededor de 2 horas) durante el crecimiento de hongos filamentosos en sustratos amiláceos sólidos (Raimbault 1980;

Carrizalez **et al.** 1981), sin embargo, lo más frecuente es que en fermentaciones sólidas estos tiempos sean más largos. Ello depende del tipo de microorganismo y de la naturaleza del sustrato a ser fermentado (Moo-Young **et al.** 1983).

Variación en el volumen de los espacios libres interpartículas durante el crecimiento.

En la unidad 2 fue discutido el papel de la disponibilidad de espacios en la limitación del crecimiento de la cepa E₆ en el medio MAC. Estos espacios interpartículas (porosidad del medio de cultivo) eran fijados al inicio de la fermentación, mediante el ajuste de la densidad aparente de la matriz sólida. No obstante, partiendo de un valor fijo, el volumen de dichos espacios se va modificando durante el curso de la fermentación como consecuencia de: la disminución en el tamaño de las partículas sólidas debido a su consumo, el incremento en el volumen ocupado por el micelio en crecimiento y las variaciones en el volumen de agua libre.

Durante el crecimiento de la cepa E₆ en el medio MAC, bajo condiciones de aireación forzada, se evaluaron los cambios de volumen de los espacios libres, en base a las variaciones en los tiempos de retención de pulsos de dióxido de carbono aplicados a la corriente de gases, tal como se especifica en materiales y métodos. Es evidente que mediante este procedimiento no pueden darse medidas absolutas del volumen intersticial, debido a que el dióxido de carbono, al no ser un gas inerte puede interactuar con la matriz sólida,

conduciendo a una sobreestimación del mismo. No obstante, las variaciones en el volumen de los espacios interpartículas pueden expresarse en términos relativos, ya que dichas variaciones dan lugar a cambios proporcionales en los tiempos de retención (Fig. 3.5).

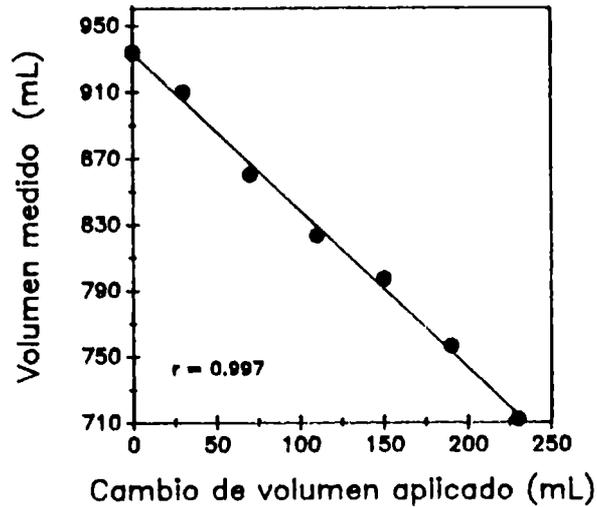


Fig. 3.5 Variación en el volumen intersticial, calculado en base a los tiempos de retención de pulsos de dióxido de carbono, aplicados a una columna de 8 cm de diámetro y 26.8 cm de largo, empacada con medio MAC, en respuesta a cambios de volumen producidos experimentalmente mediante el agregado de agua.

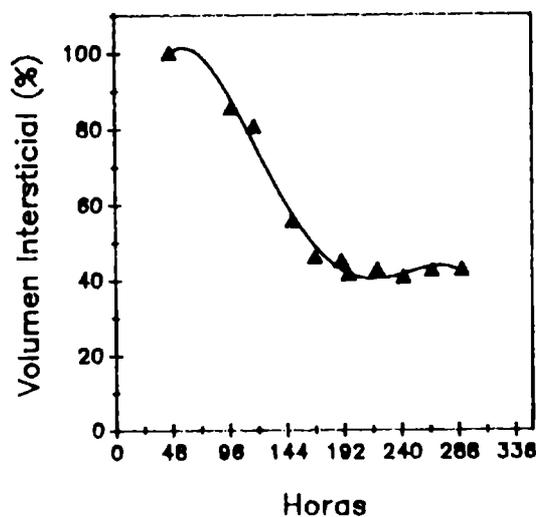


Fig. 3.6 Variación en el volumen intersticial, durante el crecimiento de la cepa E_6 en el medio MAC, bajo condiciones de aireación forzada. Los cultivos fueron realizados en el sistema de columnas (B) esquematizado en el apéndice.

100

Durante la fase de crecimiento vegetativo (desde las 48 hasta las 150 horas de proceso), los incrementos en la biomasa de micelio estuvieron acompañados de la disminución en el volumen intersticial, el cual permaneció aproximadamente constante durante la fase de esporulación (Fig. 3.6).

La magnitud del cambio observado indica que un 42% de los espacios que estaban disponibles al inicio de la fermentación no fueron utilizados. En consecuencia, habría un margen del 42% en que el volumen aparente inicial de la matriz sólida podría ser reducido, sin que la disponibilidad de espacios llegue a ser un factor limitante del crecimiento. Estos resultados corroboran los presentados en la Unidad 2, en que una disminución del 46% en el volumen intersticial, aplicada al inicio de la fermentación condujo a la limitación del crecimiento debido a una reducida disponibilidad de espacios.

Cambios térmicos durante el crecimiento y generación de gradientes hídricos. Efecto sobre la respuesta esporulativa.

Durante el crecimiento de la cepa E_6 en el medio MAC, utilizando los sistemas de columnas B y C (apéndice), se registraron las variaciones de temperatura en el seno de la materia fermentada, para lo cual, los pares térmicos utilizados fueron colocados tal como se indica en la Figura 3.7.

El empleo de columnas con distinta relación altura diámetro puso en evidencia la aparición de gradientes térmicos, tanto en la dirección radial como axial (Fig. 3.8).



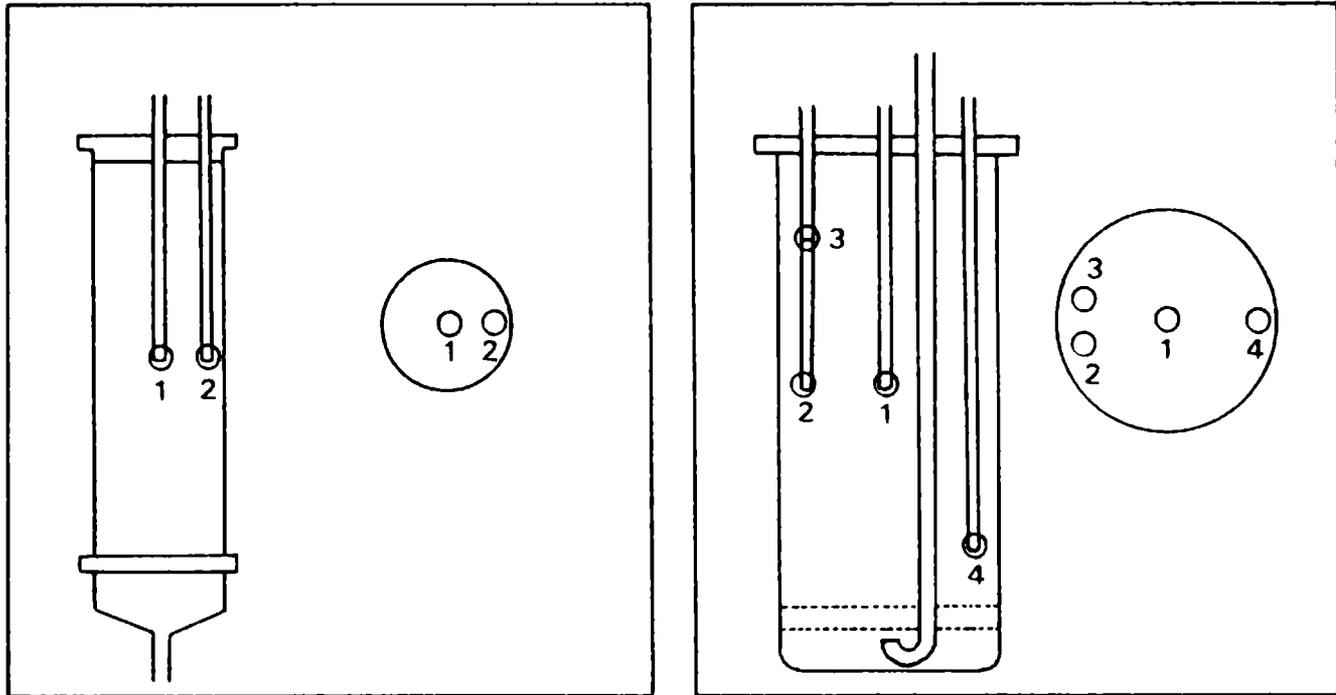


Fig. 3.7 Esquema indicativo de la ubicación de los pares térmicos en el seno de la materia fermentada, durante el crecimiento de la cepa E_6 en los sistemas de columnas B y C descritos en el apéndice.

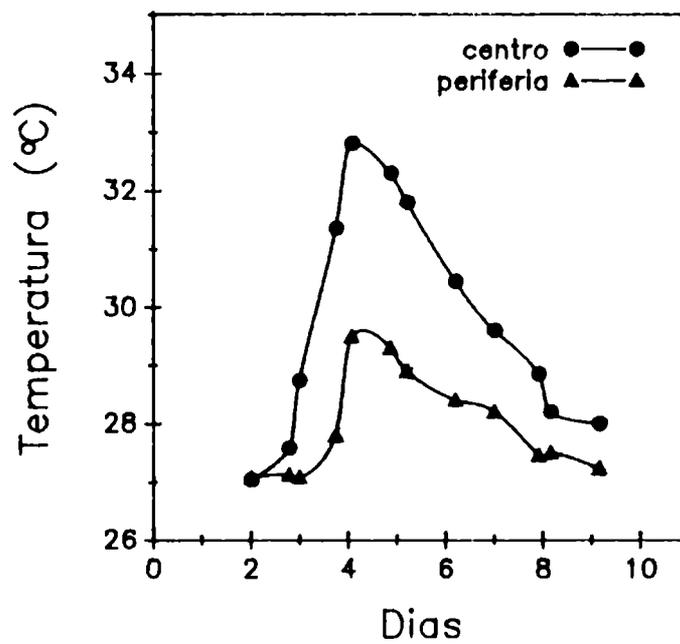


Fig. 3.8 Variaciones de temperatura en el seno de la materia fermentada, durante el crecimiento de la cepa E_6 en el sistema de columnas B (apéndice). Los registros fueron hechos en los puntos indicados en la Figura 3.7

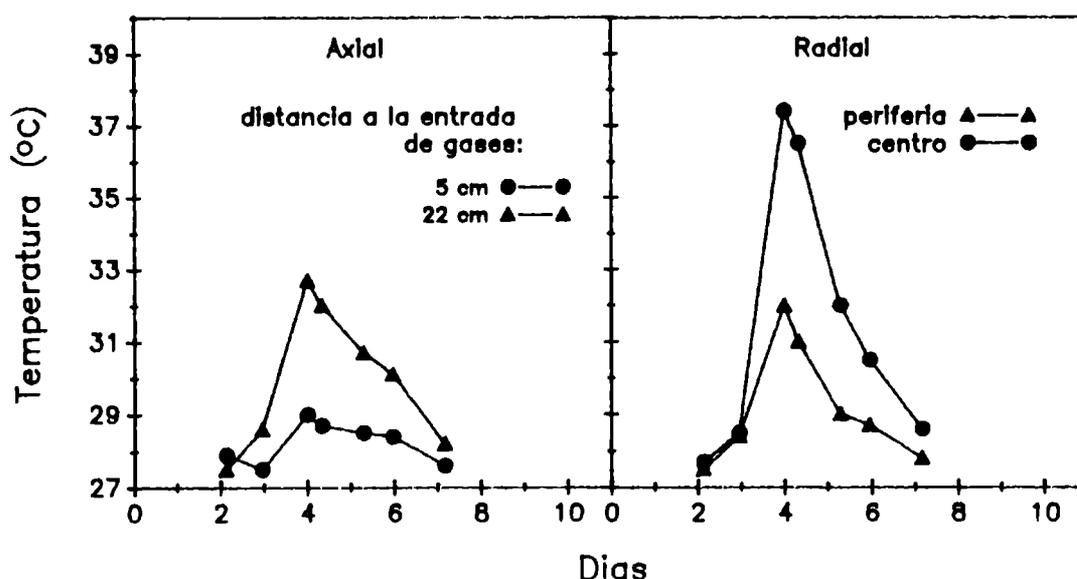


Fig. 3.9 Variaciones de temperatura en el seno de la materia fermentada, durante el crecimiento de la cepa E_6 en el sistema de columnas C (apéndice). Los registros fueron hechos en los puntos indicados en la Figura 3.7

En todos los casos, las máximas temperaturas fueron alcanzadas durante la fase de crecimiento vegetativo, coincidiendo con los picos de máximo consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono. En esta etapa del crecimiento, las diferencias de temperatura en la dirección radial dependieron de las dimensiones de la columna, siendo de 5°C y 10°C para radios de 4 y 7.5 cm respectivamente, tomando como referencia la temperatura ambiente, la cual se mantuvo constante en 27°C durante el desarrollo de los procesos. En la dirección axial, la máxima diferencia fue de 4°C , registrándose la temperatura más alta en la zona más alejada de la entrada de aire.

Los gradientes térmicos generados trajeron aparejado la formación de gradientes de humedad en el seno de la materia fermentada (Fig. 3.10).

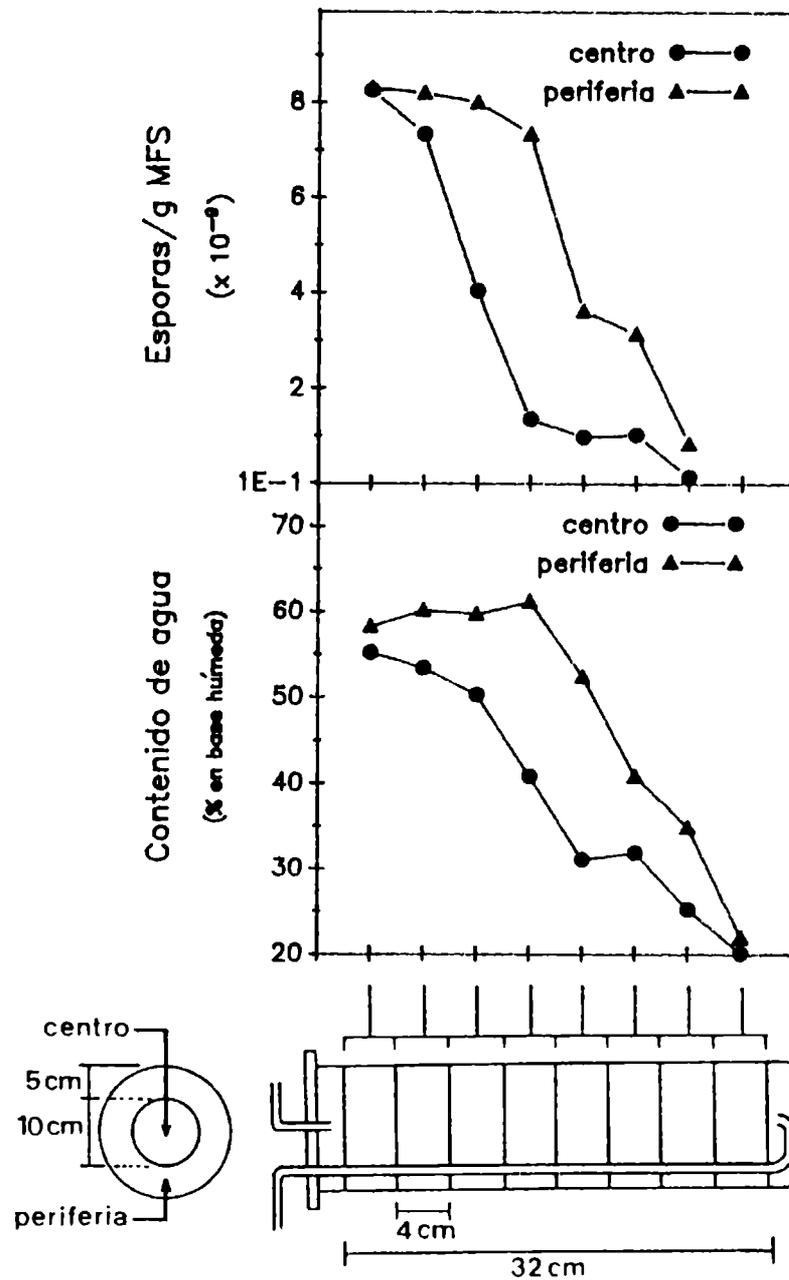


Fig. 3.10 Contenido de humedad de la materia fermentada y respuesta esporulativa de la cepa E_6 desarrollada en el sistema de columnas C (apéndice). Al final del proceso, la materia fermentada fue fraccionada de acuerdo con el esquema mostrado, para hacer los análisis correspondientes. La respuesta esporulativa en cada fracción fue determinada tomando como referencia el correspondiente peso de materia fermentada seca (MFS).

En la dirección axial, los más bajos contenidos de humedad fueron registrados en la zona de la columna más próxima a la entrada de aire (20% en base húmeda). Es

evidente que el contenido de humedad del aire inyectado incrementa a su paso a través de la matriz sólida, dando lugar a un menor grado de evaporación en las zonas más alejadas de su entrada a la columna, donde el contenido de agua de la materia fermentada fue de 60% en base húmeda. En la dirección radial se registraron diferencias de hasta un 25%, encontrándose los valores más altos de humedad en la región periférica.

El efecto de la generación de los gradientes térmicos e hídricos se vio reflejado en la respuesta esporulativa (Fig. 3.10), hallándose diferencias en los recuentos de hasta 1.5 órdenes de magnitud en la dirección axial. En la dirección radial, el grado de esporulación fue más alto en la región periférica.

En base al recuento total (1.67×10^{12} esporas) y el volumen aparente de la matriz sólida (5.85 L) se calculó un rendimiento volumétrico de 2.8×10^{11} esporas/L. Este valor, alrededor de 5 veces más bajo que el alcanzado en columnas de 1.1 cm de radio (Unidad 2), pone en evidencia la aparición de condiciones desfavorables para el crecimiento y la esporulación, como consecuencia de la generación de gradientes térmicos e hídricos al aumentar la escala de trabajo. Así, el uso de fermentadores en columna como los descritos, para la producción de esporas de *M. anisopliae* en gran escala, estaría condicionado fundamentalmente por la adaptación de sistemas eficientes de disipación del calor metabólico, sin que se altere significativamente el contenido de humedad de la materia fermentada.

Consideraciones teóricas.

Evaluación de la transferencia de agua desde el interior al exterior del fermentador (W_{lib}).

Balance hidrico en las fermentaciones con la cepa E₆ en el medio MAC.

Efecto de la actividad acuosa sobre el balance hidrico.

La importancia del contenido de agua (w_c) y la actividad acuosa (a_w) en las fermentaciones en sustrato sólido es ampliamente reconocida (Lindenfelser y Ciegler 1975; Zadrazil y Brunnert 1981; Sato et al. 1982; Narahara et al. 1982; Gervais et al. 1988), sin embargo su control durante los procesos es difícil y ha sido objeto de escasas investigaciones (Narahara et al. 1984; Gervais 1989).

El valor óptimo de a_w para el crecimiento es ajustado generalmente al inicio de la fermentación, de acuerdo con las isotermas de adsorción de agua del sustrato sólido a ser fermentado (Oriol et al. 1988; Grajek y Gervais 1987). No obstante, la disponibilidad de agua puede cambiar durante el desarrollo de los procesos, como consecuencia de variaciones en el contenido de humedad y en las propiedades de adsorción-desorción de agua de la materia fermentada (Gervais et al. 1988; Oriol et al. 1988).

En un balance hídrico, hecho durante el crecimiento, se pueden considerar tres principales fuentes de variación en el contenido de humedad: evaporación, causada por la disipación de calor metabólico, consumo de agua para la hidrólisis de polisacáridos y producción de agua como resultado del metabolismo de carbohidratos. De estas tres variables, la que más ha sido estudiada para propósitos de optimización de procesos es la evaporación, debido a su conexión con la transferencia de calor (Narahara *et al.* 1982; Sato *et al.* 1982; Narahara *et al.* 1984).

En las fermentaciones en sustrato sólido con aireación forzada, las pérdidas de agua debidas a evaporación pueden ser evitadas si el aire circulante está saturado en humedad y si su temperatura es cuidadosamente controlada (Narahara *et al.* 1984; Gervais y Bazelin 1986). Bajo esas condiciones la transferencia neta de agua entre el interior y el exterior del fermentador sería nula, lo que permitiría adscribir a actividades metabólicas cualquier variación en el contenido de humedad de la materia fermentada, ocurrida durante el proceso (Oriol *et al.* 1988). Sin embargo, es difícil evitar la salida de agua desde el fermentador, en procesos fermentativos en sustrato sólido sin aireación forzada, ya que por lo general los mismos son llevados a cabo en cuartos termostatzados, donde no siempre es posible asegurar un ambiente con humedad relativa alta y controlada. En estas circunstancias, la evaluación de dichas pérdidas de agua es de vital importancia si se desea determinar el balance hídrico durante la fermentación, para propósitos de

optimización de procesos.

Consideraciones teóricas.

Durante el desarrollo de procesos fermentativos en sustrato sólido ocurren pérdidas de peso de los cultivos, las cuales, tal como se dedujo en la unidad 2, pueden ser descritas mediante las siguientes ecuaciones:

$$\Delta G_s = \Delta O_2 - \Delta CO_2 - \Delta P' - W_{met} + W_{hid} \quad (4.1)$$

$$\Delta G_h = \Delta O_2 - \Delta CO_2 - \Delta P' - W_{lib} \quad (4.2)$$

donde ΔG_s y ΔG_h son respectivamente las pérdidas de peso seco y húmedo de la materia fermentada, ΔO_2 es el peso del oxígeno consumido, ΔCO_2 es el peso del dióxido de carbono producido, $\Delta P'$ es el peso de los productos volátiles formados, W_{met} es el agua producida por metabolismo, W_{hid} es el agua consumida para la hidrólisis de polisacáridos y W_{lib} es el agua que se intercambia entre el interior y el exterior del fermentador. Generalmente el balance de este intercambio consiste en la salida neta de agua desde el fermentador; es por ello que en la ecuación (4.2) W_{lib} aparece con signo negativo.

Tal como fue discutido anteriormente (unidad 2), bajo condiciones de limitación por sustrato sólo una fracción constante ($\beta = - \Delta s/s_0$) de los sólidos iniciales (s_0) es asimilada. En consecuencia, dados b , $Y_{CO_2/s}$ e $Y_{P'/s}$ como los coeficientes estequiométricos para el consumo de oxígeno, producción de dióxido de carbono y formación de productos

metabólicos volátiles respectivamente, se deduce que:

$$\Delta O_2 = 32 b \beta S_0 / M_S \quad (4.3)$$

$$\Delta CO_2 = 44 Y_{CO_2/s} \beta S_0 / M_S \quad (4.4)$$

$$\Delta P' = M_p Y_{P'/s} \beta S_0 / M_S \quad (4.5)$$

donde M_S es el peso de un C-mol de sustrato sólido asimilable y M_p es el peso promedio de un C-mol del conjunto de productos metabólicos volátiles.

La sustitución de las ecuaciones (4.3) y (4.4) y (4.5) en la ecuación (4.2) conduce a la siguiente expresión:

$$-\Delta G_h = [\beta / M_S (44 Y_{CO_2/s} + M_p Y_{P'/s} - 32b)] S_0 + W_{lib} \quad (4.6)$$

Si se asume la constancia de β bajo condiciones de limitación por sustrato, entonces, durante el curso de procesos llevados a cabo a diferentes valores de S_0 deben esperarse cambios similares en la composición de la materia fermentada, lo que conduce a cambios similares en sus propiedades de adsorción-desorción de agua. Por consiguiente, siempre que la actividad acuosa inicial sea la misma para los diferentes valores de S_0 , la humedad relativa ($a_w \times 100$) en el interior de los distintos fermentadores debe presentar el mismo patrón de cambios durante la fermentación.

Si la humedad relativa dentro de los fermentadores es mayor que la del ambiente, y si se asume la inexistencia de barreras difusionales, entonces ocurrirá una transferencia neta de agua hacia el exterior, cuya velocidad dependerá de la magnitud del gradiente de humedad relativa. En consecuencia, si los distintos fermentadores son incubados en

el mismo ambiente (la misma humedad relativa externa), el valor de W_{lib} será el mismo para los distintos valores de S_0 .

Bajo condiciones de limitación por sustrato puede estimarse W_{lib} , haciendo uso de la ecuación (4.6). Al graficar $-\Delta G_h$ contra S_0 se debe obtener una línea recta de pendiente $[\beta/M_S(44 Y_{CO_2}/s + M_p Y_{p'}/s - 32b)]$, cuya ordenada al origen proporciona el valor de W_{lib} .

La combinación de las ecuaciones (4.1) y (4.2) conduce a:

$$\Delta G_S - \Delta G_h = W_{hid} + W_{lib} - W_{met} \quad (4.7)$$

donde la diferencia $(\Delta G_S - \Delta G_h)$ representa la variación en el contenido de agua del sistema, ocurrida durante el proceso.

Evaluación de la transferencia de agua desde el interior al exterior del fermentador (W_{lib}).

Se realizaron fermentaciones sólidas sin aireación forzada con las cepas E₆ y BJ-1110 en los medios MA y MAC a distintos valores de sólidos iniciales (S_0).

La actividad acuosa inicial en los diferentes medios de cultivo fue ajustada en 0.998, y las incubaciones se llevaron a cabo en un cuarto termostatzado donde la humedad relativa, aunque cercana al 90% no fue mantenida constante durante el desarrollo de los procesos. Bajo esas condiciones debieron producirse gradientes de humedad relativa entre el interior y el exterior de los fermentadores, impulsando la salida de agua desde los mismos. Estas pérdidas de agua fueron parcialmente responsables de las disminuciones en el peso

húmedo de la materia fermentada (ΔG_h), registradas al final del crecimiento.

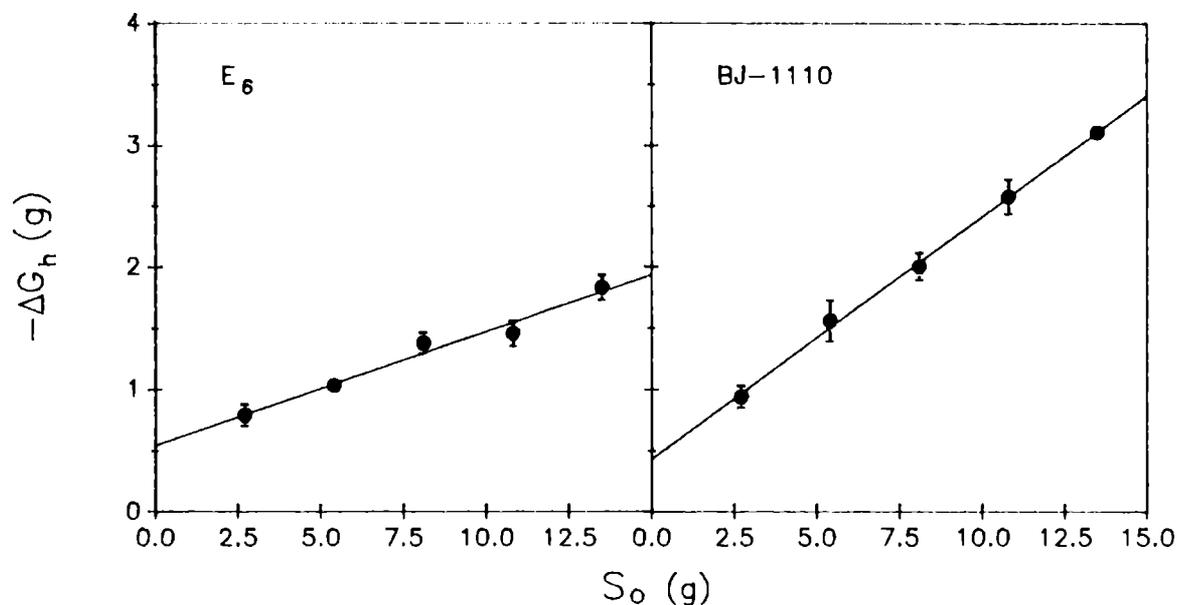


Fig. 4.1 Pérdidas de peso húmedo (ΔG_h) en fermentaciones sólidas sin aireación forzada con las cepas E₆ y BJ-1110, en el medio MA a distintos valores de sólidos iniciales. La actividad acuosa inicial fue ajustada en 0.998. La humedad relativa ambiente (cercana a 90%) no fue mantenida constante durante el desarrollo de los procesos.

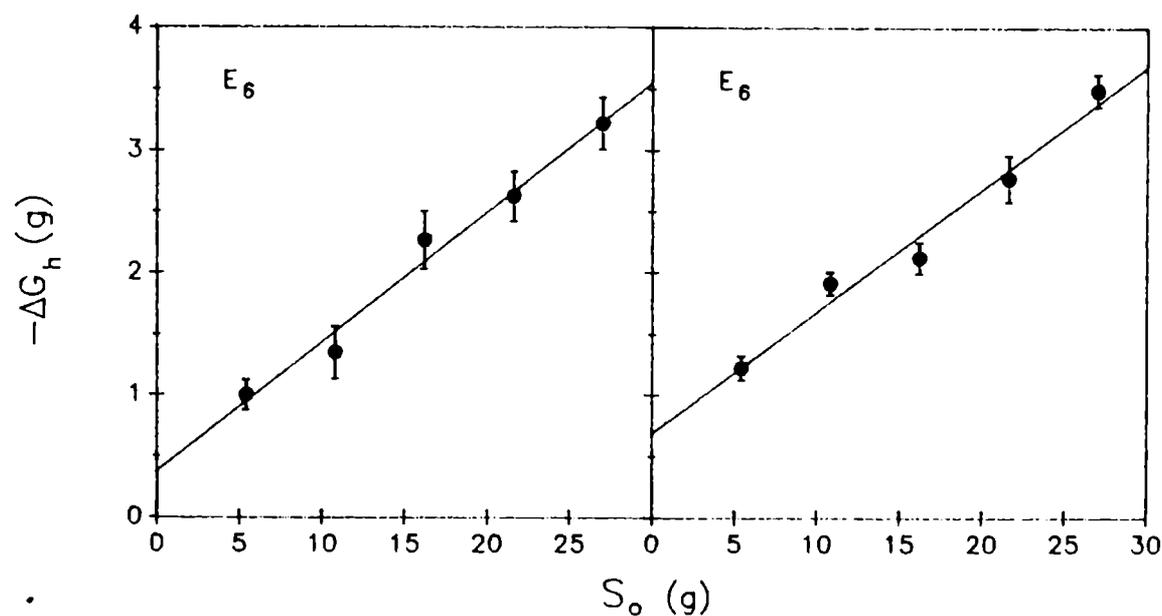


Fig. 4.2 Pérdidas de peso húmedo (ΔG_h), registradas en dos procesos fermentativos con la cepa E₆, realizados en oportunidades diferentes. Se utilizó el medio MAC a distintos valores de sólidos iniciales (S_0). La actividad acuosa inicial fue ajustada en 0.998, y las incubaciones se realizaron sin aireación forzada en un cuarto termostaticado, donde la humedad relativa (cercana a 90%) no fue mantenida constante durante el desarrollo de los procesos.

El análisis de regresión de $-\Delta G_h$ sobre S_0 , para los distintos procesos llevados a cabo (Figs. 4.1 y 4.2) demostró

el comportamiento lineal predicho por la ecuación (4.6). Los coeficientes de correlación fueron superiores a 0.987.

La ordenada al origen para cada regresión proporcionó el correspondiente valor de W_{lib} (Tabla 4.1). Es importante señalar que una condición necesaria para el cálculo de W_{lib} utilizando la ecuación (4.6), es que el conjunto de todos los fermentadores conteniendo el mismo medio de cultivo inoculado con la misma cepa, pero a diferentes valores de S_0 , sean incubados simultáneamente en el mismo ambiente, es decir, estén sometidos al mismo patrón de cambios en la humedad relativa externa durante el crecimiento. Así, si un determinado proceso, es desarrollado en oportunidades diferentes, pueden obtenerse distintos valores de W_{lib} , si las condiciones de incubación no son las mismas. Es por ello que en la formulación de balances hídricos para un proceso fermentativo en particular, haciendo uso de la ecuación (4.7), el valor de W_{lib} a utilizar debe ser calculado específicamente para ese proceso.

Tabla 4.1 Valores de W_{lib} determinados para procesos fermentativos sin aireación forzada con las cepas E_6 y BJ-1110 en los medios de cultivo MA y MAC.

Cepa	Medio de cultivo	W_{lib} (g)
BJ-1110	MA	0.430
E_6	MA	0.545
E_6	MAC	0.375
E_6	MAC	0.683

Los valores de W_{lib} fueron obtenidos a partir de los datos presentados en las Figs. 4.1 y 4.2

El efecto de la magnitud de W_{lib} (Tabla 4.1) sobre la disminución del contenido de humedad inicial de los medios de cultivo, se hizo notable a valores de S_0 inferiores a 1 g (Fig. 4.2). En esas circunstancias la deshidratación del sustrato y en consecuencia la ausencia de crecimiento fueron evidentes (datos no mostrados).

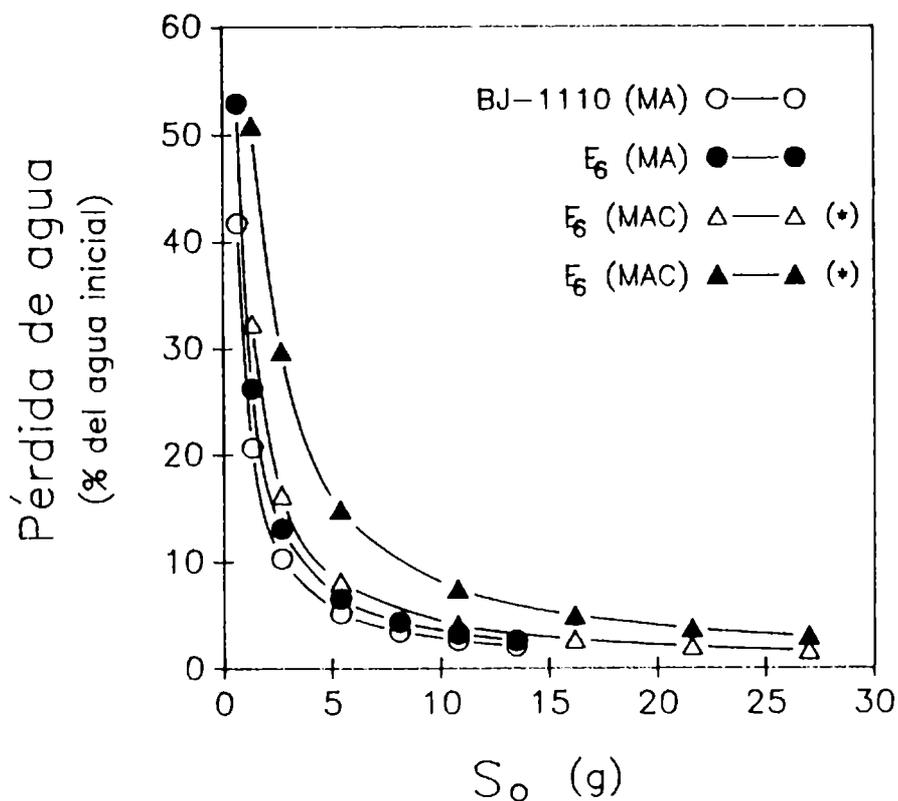


Fig. 4.3 Pérdida de agua de los fermentadores, expresada como porcentaje del contenido inicial, en cultivos de las cepas E_6 y BJ-1110, en los medios MA y MAC a distintos valores de sólidos iniciales. Los valores de W_{lib} fueron tomados de la tabla 4.1

* Procesos independientes.

A valores de S_0 superiores a 8g, W_{lib} representó menos del 10% del contenido de agua inicial en cada fermentador. Sin embargo, esas pequeñas pérdidas de agua no pueden considerarse como una medida del grado de evaporación

causada por la disipación de calor metabólico (Sato et al. 1982; Narahara et al. 1984), ya que la condensación de agua sobre las paredes internas de los fermentadores fue abundante.

Balance hídrico en las fermentaciones con la cepa E₆ en el medio MAC.

A partir de cultivos de la cepa E₆ en el medio MAC a distintos valores de sólidos iniciales (S₀) se obtuvo, al final del crecimiento y esporulación, información relacionada con la producción de biomasa total (micelio + esporas), grado de hidrólisis de almidón y pérdidas de peso seco y húmedo de la materia fermentada (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Parámetros del crecimiento de la cepa E₆ en medio MAC a distintos valores de sólidos iniciales (S₀).

S ₀ (g)	Afrecho inicial (g)	ΔX ^a (g)	(-ΔG _s) (g)	(-ΔG _h) (g)	(-ΔS) ^b (g)	Glucosa liberada por hidrólisis de almidón (g)	Y _{x/s} ^c
5.4	2.7	0.499	1.099	1.223	1.589	0.930	0.314
10.8	5.4	1.159	2.508	1.914	3.663	1.849	0.316
16.2	8.1	1.482	2.810	2.123	4.292	2.755	0.345
21.6	10.8	2.046	4.070	2.772	6.116	3.684	0.334
27.0	13.5	2.684	5.976	3.500	8.660	4.607	0.309

Los valores de los parámetros medidos corresponden al promedio de tres repeticiones.

^a Biomasa total acumulada (micelio + esporas).

^b Sólidos consumidos, calculados por medio de la ecuación 2.11 ($\Delta S = \Delta G_s - \Delta X$)

^c Rendimiento en biomasa total (micelio + esporas) referido a sólidos consumidos (g/g).

Los valores de Y_{x/s} no son significativamente diferentes, de acuerdo con el procedimiento de Tukey (P<0.05).

Bajo condiciones de limitación por sustrato ($S_0 < 27$ g, tal como fue discutido en la unidad 2), se determinaron los valores correspondientes a W_{lib} y W_{hid} .

Tabla 4.3 Balance hídrico en fermentaciones sólidas sin aireación forzada con la cepa E_6 en medio MAC a distintos valores de sólidos iniciales (S_0).

S_0 (g)	$(\Delta G_s - \Delta G_h)$ (g)	W_{hid}^a (g)	W_{met}^b (g)	w^c
5.4	0.124	0.093	0.652	0.654
10.8	-0.594	0.185	1.462	0.637
16.2	-0.687	0.280	1.650	0.580
21.6	-1.289	0.370	2.342	0.611
27.0	-2.476	0.460	3.619	0.666

La actividad acuosa inicial fue ajustada en 0.998, y las incubaciones se realizaron en un cuarto termostático, donde la humedad relativa (cerca a 90%) no fue mantenida constante durante el desarrollo de los procesos.

^a Calculado como: glucosa liberada por hidrólisis de almidón (g) x 0.1 (datos tomados de la Tabla 4.2).

^b Calculado mediante la ecuación (4.6), para un valor de W_{lib} de 0.683. W_{lib} se obtuvo a su vez por regresión lineal de $(-\Delta G_h)$ sobre S_0 (datos tomados de la Tabla 4.2). El coeficiente de correlación fue 0.987.

^c Moles de agua producida/C-mol de sustrato consumido
(C-moles de sustrato consumido = $-\Delta S/28.728$)

La regresión lineal de $-\Delta G_h$ sobre S_0 permitió estimar un valor de W_{lib} de 0.683 g de acuerdo con la ecuación (4.6), siendo el coeficiente de correlación de 0.987.

Dado que el afrecho contiene un 31% de almidón, frente a un 8% de fibras (Tabla 3.1), y teniendo en cuenta la baja

digestibilidad que en general presenta la fibra en fermentaciones sólidas, el consumo de agua para la hidrólisis de polisacáridos (W_{hid}) se calculó en base a la hidrólisis de almidón. Para ello se consideró que por cada mol de grupos reductores que se generan a partir de almidón se consume un mol de agua. Los valores de W_{hid} y W_{lib} calculados fueron incluidos en la ecuación de balance hídrico (4.7), lo que permitió la estimación de los correspondientes valores de W_{met} (Tabla 4.3).

Para los diferentes valores de S_0 ensayados, donde no se observaron diferencias significativas en los rendimientos en biomasa total, referidos a sólidos consumidos, se estimó una producción promedio de 0.630 moles de agua por cada C-mol de sustrato sólido asimilado, valor que está en concordancia con el estimado en base a balances elementales (Tabla 3.5), descritos en la unidad 3.

Efecto de la actividad acuosa sobre el balance hídrico.

A partir del balance hídrico dado por la ecuación (4.7) se deduce que $(\Delta G_s - \Delta G_h)$ es una medida de las variaciones en el contenido de agua de los cultivos durante el crecimiento. Así, si los valores de $(\Delta G_s - \Delta G_h)$ son positivos significa que el contenido de agua de los fermentadores, al final del proceso, es inferior al contenido inicial. En este caso el agua que se libera al ambiente (W_{lib}), conjuntamente con la que se consume para la hidrólisis de almidón (W_{hid}), supera a la que se produce por metabolismo (W_{met}). Por el contrario,

$(\Delta G_s - \Delta G_h)$ es negativo cuando el valor de W_{met} es superior a la suma de W_{lib} y W_{hid} .

La ganancia o pérdida de agua durante la fermentación, medida por $(\Delta G_s - \Delta G_h)$, fue evaluada a distintos valores de actividad acuosa inicial, en cultivos de la cepa E_6 en los medios MA y MAC, desarrollados en un cuarto termostatzado a una humedad relativa ambiente de alrededor de 90%.

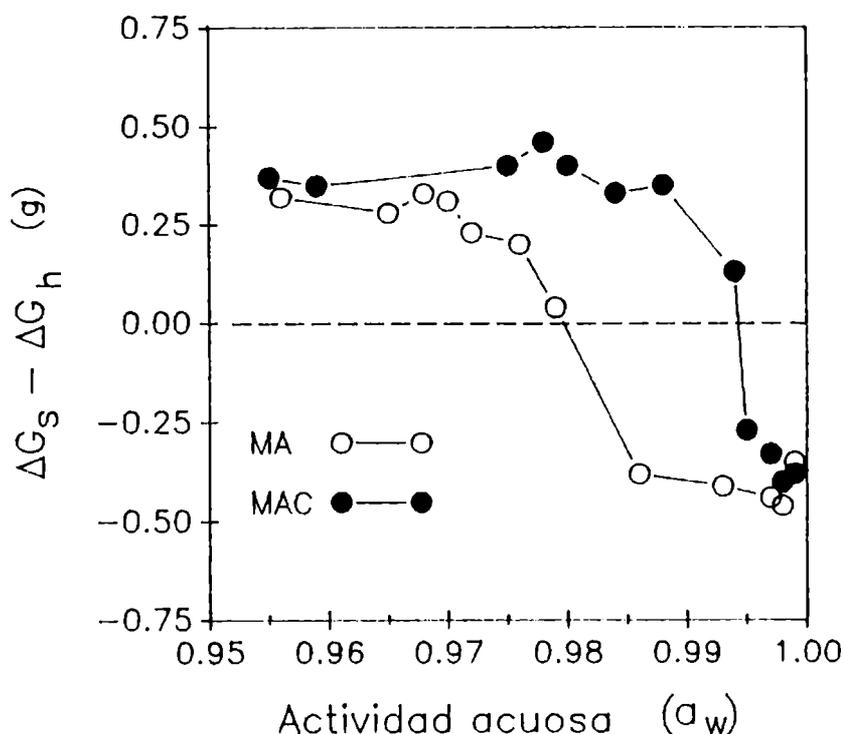


Fig. 4.4 Cambios en el contenido de agua durante el crecimiento y esporulación de la cepa E_6 en los medios MA y MAC a distintos valores de actividad acuosa inicial.

La transición entre la ganancia y la pérdida de agua ($\Delta G_s - \Delta G_h = 0$) se observó a valores de actividad acuosa inicial de 0.980 y 0.994 para los medios MA y MAC respectivamente (Fig. 4.4). Estos valores coinciden con los límites inferiores de los intervalos de actividad acuosa inicial óptimos, determinados previamente (unidad 1) en base a la respuesta esporulativa de la cepa E_6 en los mismos

medios y en similares condiciones de incubación (Fig. 1.2).

Es evidente que bajo condiciones en que la humedad relativa ambiente es inferior a la humedad relativa de equilibrio dentro de los fermentadores (circunstancias en que se favorece la salida de agua desde los mismos), el adecuado ajuste de la actividad acuosa inicial de los medios de cultivo puede asegurar una ganancia neta de agua durante la fermentación. A su vez, este incremento en el contenido de agua del sistema contribuiría a mantener los altos niveles de disponibilidad acuosa fijados desde el inicio.

CONCLUSIONES GENERALES

La fermentación en estado sólido de afrecho de arroz constituye una excelente alternativa para la producción de esporas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.

La suplementación del afrecho con 50% de cáscara de arroz (en base seca), y el adecuado ajuste de la disponibilidad acuosa ($a_w \geq 0.997$) hacen posible la obtención de niveles de esporulación que superan de 5 a 15 veces (dependiendo de la cepa usada) a los que generalmente se obtienen sobre la base de la fermentación de granos de arroz.

El agregado de cáscara, además de proporcionar altos niveles de disponibilidad acuosa, a contenidos de agua del medio de cultivo inferiores a la máxima capacidad de retención del afrecho, da lugar a una matriz porosa, la cual, a densidades aparentes inferiores a 0.357 g/ml evita la limitación del crecimiento debido a una reducida disponibilidad de espacios, pero a expensas de una disminución en los rendimientos volumétricos en esporas.

Se derivó una expresión matemática que correlaciona linealmente la disminución en el peso seco de la materia fermentada y el contenido de sólidos iniciales, como índice de limitación por sustrato. Dicha linealidad, demostrada experimentalmente en fermentaciones sumergidas, utilizando un extracto de afrecho como medio de cultivo, permitió evidenciar en fermentaciones sólidas sin aireación forzada, la existencia de un espesor de lecho crítico (alrededor de 4 cm, para densidades aparentes de 0.25 g/ml), por debajo del cual

la acumulación de biomasa sólo depende de la disponibilidad y/o accesibilidad de sustrato. Dicho espesor de lecho crítico es propuesto como referencia para un posible escalado del proceso, utilizando los sistemas convencionales en bandejas, en los que la aireación forzada no es requerida.

En base a las composiciones elementales del afrecho y la biomasa (micelio y esporas por separado), se formularon ecuaciones de balances de materia y energía, que permiten predecir coeficientes de rendimiento para variables difíciles de medir experimentalmente, como una respuesta global del sistema, en ausencia de aireación forzada (consumo de oxígeno, producción de dióxido de carbono). Esta estrategia permitió estimar el calor generado durante el proceso (2.73 Kcal/g de afrecho asimilado), el cual, dada la baja conductividad térmica que caracteriza a los materiales que generalmente se emplean en fermentaciones sólidas, fue responsable de la generación de gradientes térmicos y en consecuencia hídricos, cuando el espesor de la matriz sólida fue marcadamente superior al crítico de 4 cm. Dichos gradientes afectan significativamente la respuesta esporulativa del sistema por lo que cualquier intento de escalado del proceso a espesores de lecho superiores al crítico, tendría que contemplar el acoplamiento de dispositivos que aseguren la adecuada transferencia de gases en el seno de la matriz sólida, así como también la disipación del calor generado por metabolismo, sin alterar significativamente el contenido de humedad de la materia

fermentada.

Los balances de materia y energía descritos permiten predecir un límite en la acumulación de biomasa, determinado por la relación C/N en el afrecho asimilable, estimándose un rendimiento máximo en esporas de 0.365 g/g de afrecho, frente a 0.296 g/g de afrecho, obtenido experimentalmente.

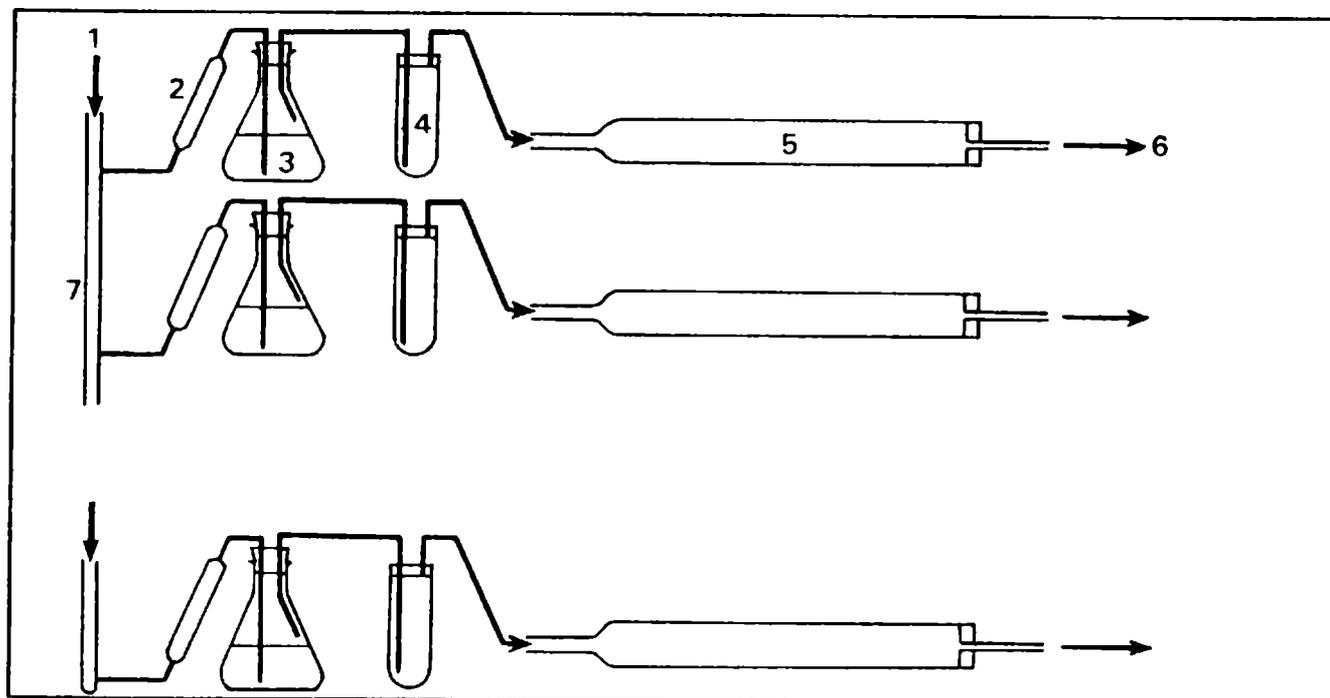
Los estudios cinéticos realizados permitieron calcular una velocidad específica de crecimiento máximo de 0.08 h^{-1} , comparable a la que por lo general muestran los hongos filamentosos cuando crecen sobre sustratos sólidos. No obstante, dada la importancia de la disponibilidad de espacios para el crecimiento, determinada fundamentalmente por el grado de porosidad del medio de cultivo, se propone como novedoso un procedimiento que permite evaluar la cinética de utilización de dichos espacios, sin alterar la estructura de la matriz sólida. Dicho procedimiento podría servir de referencia en el futuro, para la formulación de modelos cinéticos que permitan la evaluación del crecimiento en base a variaciones en el volumen celular total, en sustitución de las clásicas medidas de masa, las cuales implican la interrupción de los procesos o la toma de muestras representativas del seno de la materia fermentada.

Se derivó una expresión matemática que correlaciona linealmente las pérdidas de peso húmedo de la materia fermentada y el peso de sólidos iniciales, bajo condiciones de limitación por sustrato. Esta linealidad, demostrada experimentalmente en fermentaciones sólidas sin aireación forzada, constituye un aporte importante en el estudio de las

mismas, ya que permite estimar la cantidad de agua que se pierde por evaporación durante el desarrollo de un proceso. Estas pérdidas de agua deben ser consideradas en la formulación de balances hídricos, los que a su vez posibilitan el cálculo de la cantidad de agua que se genera por metabolismo, aspecto que debe ser tomado muy en cuenta para propósitos de optimización de procesos fermentativos en sustratos sólidos.

APENDICE

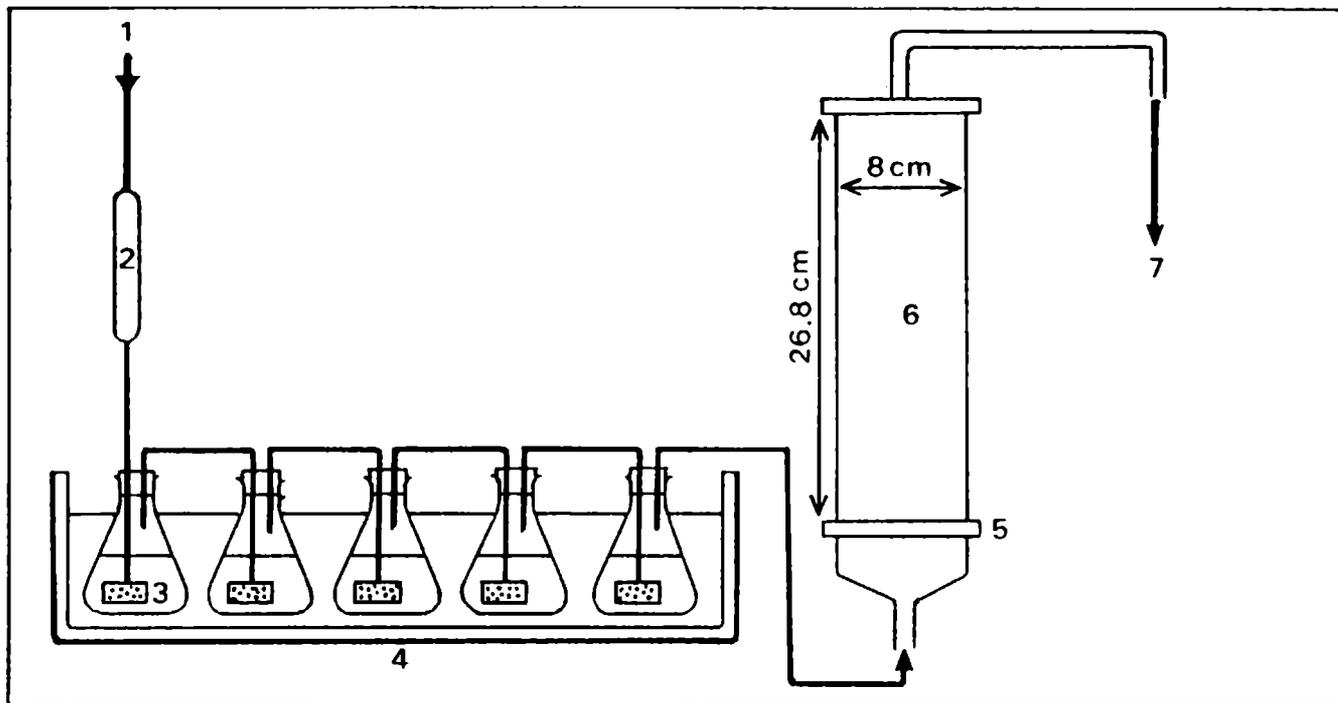
Sistema de columnas A



1. Entrada de aire.
2. Filtro
3. Reservorio de agua.
4. Tubo empacado con cáscara de arroz humedecida.
5. Columna de fermentación.
6. Salida de gases.
7. Distribuidor de aire.

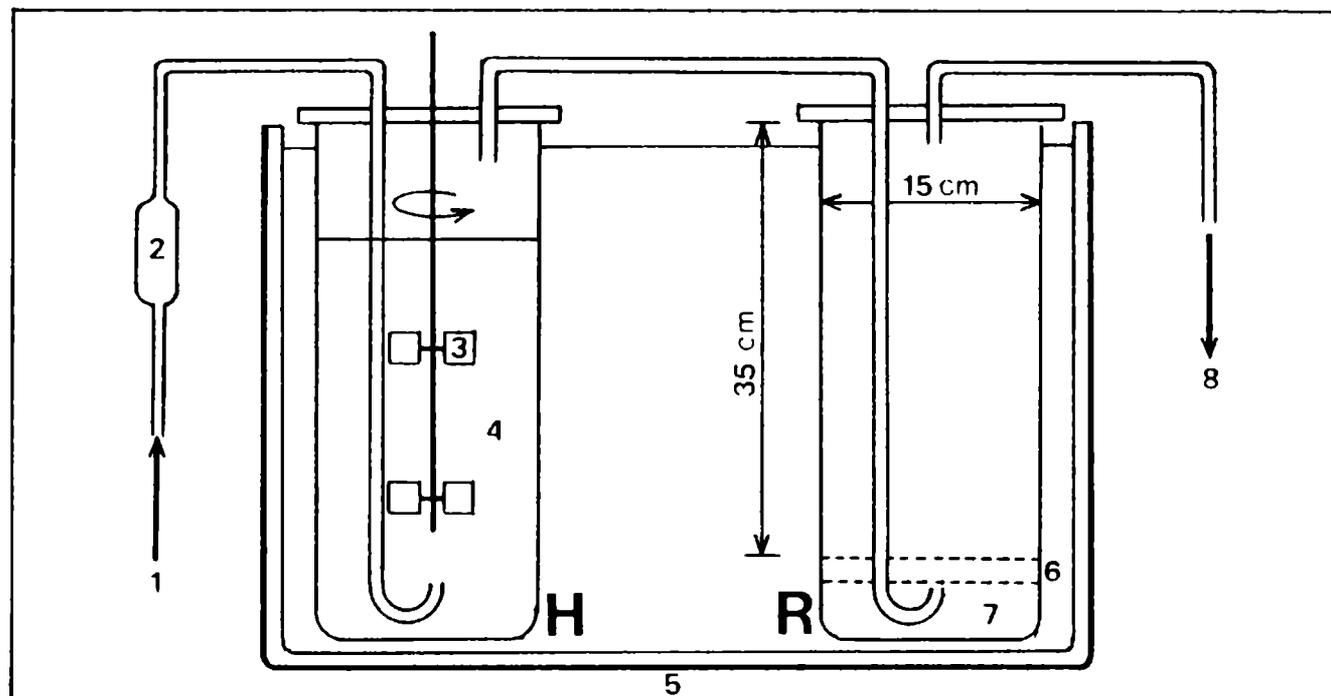
El lecho de cáscara humedecida, contenido en (4), proporciona una gran superficie de evaporación, lo que hace posible que el aire circulante se sature en humedad (a la temperatura de proceso), antes de su entrada a la columna de fermentación. Durante el funcionamiento del sistema se van transfiriendo pequeños volúmenes de agua desde (3) hasta (4) para mantener humedecido el lecho de cáscara. Esta operación se realiza mediante la inclinación de (3), de manera que el tubo de salida quede sumergido en el agua.

Sistema de columnas B



1. Entrada de aire.
2. Filtro.
3. Difusor (Piedra porosa empleada en los burbujeadores de acuarios).
4. Baño termostatzado.
5. Placa cribada.
6. Columna de fermentación.
7. Salida de gases.

Sistema de columnas C



1. Entrada de aire.
2. Filtro.
3. Turbina.
4. Tanque conteniendo agua destilada estéril.
5. Baño termostatzado.
6. Placa cribada.
7. Cámara de aire.
8. Salida de gases.

H = Sistema de humectación del aire.

R = Reactor (columna de fermentación).

REFERENCIAS

1. **Agosin E, Odier E (1985)** Solid-state fermentation, lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermented by selected white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 21: 397 - 403
2. **Aidoo KE, Hendry R, Wood BJB (1981)** Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 12: 6 - 9
3. **Alves SB, (1986)** Fungos entomopatogénicos. In: Alves SB (ed) *Controle microbiano de insetos*. Editora Manole LTDA, Sao Paulo, Brasil, pp 73 - 126
4. **AOAC, (1984)** Official Methods of Analysis, 40th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, USA.
5. **Bajracharya R, Mudgett RE (1980)** Effects of controlled gas environments in solid substrate fermentations of rice. *Biotechnol Bioeng* 22: 2219 - 2235
6. **Bartnicki-García S, Ruiz-Herrera J, Bracker CE (1979)** Chitosomes and chitin synthesis. In: Burnett JH, Trinci APJ (ed), *Fungal Walls and Hyphal Growth*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 149 -168
7. **Bradley RS (1936)** *J Chem Soc.*: 1467, citado en Iglesias HA, Chirife J (1982) Handbook of food isotherms: water sorption parameters for food and food components. In: Schweigert BS, Hawthorn J(Eds.) *Food science and technology, a series of monographs*. Academic Press, New York-London, pp 262 - 264
8. **Bravard JP, Cordonnier M, Kernevez JP, Lebeault M (1979)** On-line identification of parameters in a fermentation process. *Biotechnol Bioeng* 21: 1239 - 1249
9. **Brey PT, Latge JP, Prevost MC (1986)** Integumental penetration of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by *Conidiobolus obscurus* (Entomophthoraceae). *J Invertebr Pathol* 48: 34 - 41
10. **Brown AD (1976)** Microbial water stress. *Bacteriol Rev* 40: 803 -846
11. **Brown AD (1978)** Compatible solutes and extreme water stress in eucaryotic microorganisms. *Adv Microbiol Physiol* 17: 181 - 242

12. **Bu'Lock JD (1975)** Secondary metabolism in fungi and its relationships to growth and development. In: Smith JE, Berry DR (ed), *The Filamentous Fungi*, Vol I. Edward Arnold, London, pp 33 - 57
13. **Bull AT, Trinci APJ (1977)** The Physiology and metabolic control of fungal growth. In: Rose AH, Tempest DW (ed), *Advances in Microbial Physiology*, Vol 15. Academic Press, New York, p 1
14. **Cannel E, Moo-Young M (1980)** Solid-state fermentation systems. *Proc Biochem*, Jun/Jul 2 - 7
15. **Carrizalez V, Rodriguez H, Sardina I (1981)** Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. *Biotechnol Bioeng* 23: 321 - 333
16. **Carrizalez V, Jeffe W (1986)** Solid state fermentation: an appropriate biotechnology for developing countries. *Interciencia* 11: 9 - 15
17. **Chahal DS, Moo-Young M (1981)** Bioconversion of lignocellulosics into animal feed with *Chaetomium celluloliticum*. In: Underkofler (ed), *Development in Industrial Microbiology*, Vol 22. Society for Industrial Microbiology, pp 143 -159
18. **Claydon N, Grove JF (1982)** Insecticidal secondary products from the entomogenous fungus *Verticillium lecanii*. *J Invertebr Pathol* 40: 413 - 418
19. **Cole G (1986)** Models of cell differentiation in conidial fungi. *Microbiol Rev* 50: 95 - 132
20. **Cooney CL, Wang HY, Wang DIC (1977)** Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. *Biotechnol Bioeng* 19: 55 - 67
21. **Cooper RD, Sweeney AW (1986)** Laboratory studies on the recycling potential of the mosquito pathogenic fungus *Culicinomyces clavisporus*. *J Invertebr Pathol* 48: 152 - 158
22. **Corry JEL (1978)** Relationships of water activity to fungal growth. In: Beuchat LR (ed) *Food and beverage mycology*. Avi Publishing Company, Westport, Connecticut, U.S.A., pp 45-82
23. **Da Silva FP, Azevedo JL (1983)** Esterase pattern of a morphological mutant of the deuteromycete, *Metarhizium anisopliae*. *Trans Br Mycol Soc* 81: 161 163

24. **De Lhoneux B, Gerlache L, Clemente A, Roda-Santos ML, Menaia JAG, Fernandes TH (1988)** Ultrastructural Characterization of rice husk submitted to different pretreatmen to optimize its fermentation. *Biol Wastes* 23: 163 - 180
25. **Deschamps F, Huet MC (1985)** Xylanase production in solid-state fermentation: a study of its properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 22: 177 - 180
26. **Desfarges C, Larroche C, Gros JB (1986)** Spore production of *Penicillium roqueforti* by solid state fermentation: stoichiometry, growth and sporulation behavior. *Biotechnol Bioeng* 29: 1050 - 1058
27. **Detroy RW, Lindenfelser LA, St Julian Jr G, Orton WL (1980)** Sacharification of wheat-straw cellulose by enzymatic hydrolysis following fermentative and chemical pretreatment. *Biotechnol Bioeng Symp* No 10 135 - 148
28. **Detroy RW, Lindenfelser LA, Sommer S, Orton WL (1981)** Bioconversion of wheat straw to ethanol: chemical modification, enzymatic hydrolysis and fermentation *Biotechnol Bioeng* 23: 1527 -1535
29. **Doberski JW (1981)** Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *J Invertebr Pathol* 37: 195 - 200
30. **Doppelbauer R, Esterbauer H, Steiner W, Lafferty RM, Steinmüller H (1987)** The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol* 26: 485 - 494
31. **Duckworth RB (1974)** Water relationships of foods. *IFST (UK) Mini Symp Dehydration* pp 6 - 9
32. **Dunphy GB, Nolan RA (1982)** Mycotoxin production by the protoplast stage of *Entomophthora egressa*. *J Invertebr Pathol* 39: 261 - 263
33. **Ehresmann B, Imbault L, Weil JH (1973)** Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA and rRNA. *Anal Biochem* 54: 456 - 463
34. **Eilenberg J, Bresciani J, Latge JP (1986)** Ultrastructural studies of primary spore formation and discharge in the genus *Entomophthora*. *J Invertebr Pathol* 48: 318 - 324

35. Elliott CG (1972) Sterols and the production of oospores by *Phytophthora cactorum*. J Gen Microbiol 72: 321 - 327
36. Erickson EL (1979) Energetic efficiency of biomass and product formation. Biotechnol Bioeng 21: 725 - 743
37. Erickson LE, Minkevich IG, Eroshin VK (1978a) Application of mass and energy balance regularities in fermentation. Biotechnol Bioeng 20: 1595 - 1621
38. Erickson LE, Selga SE, Viesturs UE (1978b) Application of mass and energy balance regularities to product formation. Biotechnol Bioeng 20: 1623 - 1638
39. Eroshin VK, Minkevich IG (1982) On the upper limit of mass yield of an organic product from an organic substrate. Biotechnol Bioeng 24: 2263 - 2265
40. Farges J, Robert PH, Vey A (1985) Influence of destruxins on disease development of *Metarhizium anisopliae* in scarabeid larvae. Entomophaga 30: 353 - 364
41. Ferrer A, Erickson LE (1979) Evaluation of data consistency and estimation of yield parameters in hydrocarbon fermentations. Biotechnol Bioeng 21: 2203 - 2233
42. Fleming SE, Sosulski FW, Kilara A, Humbert ES (1974) Viscosity and water absorption characteristics of slurries of sunflower and soybean flours, concentrates and isolates. J Food Sci 39: 188 - 191
43. French D (1984) Organization of starch granules. In: Whistler RL, BeMiller JN, Paschal E (ed), Starch: Chemistry and Technology, second edition. Academic Press, INC. pp 183 - 247
44. Gervais P (1989) New sensor allowing continuous water activity measurement of submerged or solid substrate fermentations. Biotechnol Bioeng 33: 266 - 271
45. Gervais P, Bazelin C (1986) Development of a solid-substrate fermentor allowing the control of the substrate water activity. Biotechnol Letters 8: 191 - 196
46. Gervais P, Bensoussan M, Grajek W (1988) Water activity and water content: comparative effects on the growth of *Penicillium roqueforti* on solid substrate. Appl Microbiol Biotechnol 27: 389 - 392

47. **Ghosh S, Henry MP, Klass DL (1980)** Bioconversion of water hyacinth-coastal Bermuda grass-MSW-sludge blends to methane. *Biotechnol Bioeng Symp* No 10 163 -187
48. **Glare TR, Milner RJ, Chilvers GA (1986)** The effect of environmental factors on the production, discharge and germination of primary conidia of *Zoopthora phalloides* Batko. *J Invertebr Pathol* 48: 275 - 283
49. **Gonzalez EE, Vernon EJ, Moctezuma AR (1985)** Biotechnology for the processing of pineapple waste. *UNEP Ind Environ*, Oct/Nov/Dec 19 - 20
50. **Grajek W, Gervais P (1987)** Effect of the sugar-beet pulp water activity on the solid state culture of *Trichoderma viride* TS. *Appl Microbiol Biotechnol* 26: 537 - 541
51. **Griffin DM (1977)** Water potential and wood-decay fungi. *Ann Rev Phytopathol* 15: 319 - 329
52. **Grosz R, Stephanopoulos G, San KY (1984)** Studies on on-line bioreactor identification. III. Sensitivity problems with respiratory and heat evolution measurements. *Biotechnol Bioeng* 26: 1198 - 1208
53. **Grove SN, Bracker CE, Morré DJ (1970)** An ultrastructural basis for hyphal tip growth in *Pythium ultimum*. *Am J Botany* 57: 245 - 266
54. **Gupta S, Roberts DW, Renwick JAA (1989)** Preparative isolation of destruxins from *Metarhizium anisopliae* by high performance liquid chromatography. *J Liquid Chrom* 12: 383 - 395
55. **Halsey G (1948)** Physical adsorption in non-uniform surfaces. *J Chem Phys* 16: 931
56. **Hankin L, Anagnostakis SL (1975)** The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 597 - 607
57. **Harris D (1979)** Measurement of oxygen uptake by straw microflora using an oxygen electrode. In: Grossbard E (ed), *Straw Decay and its Effect on Utilization and Disposal*. J Wiley and Sons Ltd, pp 265 - 266
58. **Hawkey R (1974)** Rice husk utilization. In: Barber S, Tortosa E (eds). *Rice husk utilization: proceedings of the rice by-products utilization international conference; September, 30 October, 2. Valencia Spain . c1977: 59 - 66*

59. **Hecht V, Schügerl K, Scheiding W (1982)** Conversion of cellulose into fungal cell mass. *Appl Microbiol Biotechnol* 16: 219 - 222
60. **Hecht V, Rosen W, Schügerl (1985)** Conversion of cellulose into fungal cell mass in solid state culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 21: 189 - 191
61. **Henderson SM (1952)** A basic concept of equilibrium moisture. *Agric Eng* 33: 29
62. **Hesseltine CW (1972)** Solid state fermentations. *Biotechnol Bioeng* 14: 517 - 532
63. **Ho L (1979)** Process analysis and optimal design of a fermentation process based upon elemental balance equations: generalized semitheoretical equations for estimating rates of oxygen demand and heat evolution. *Biotechnol Bioeng* 21: 1289 - 1300
64. **Holdom DG, Van de Klashorst G (1986)** Sporulation by hyphal bodies of *Nomuraea rileyi* and subsequent infection of *Heliothis* spp. *J Invertebr Pathol* 48: 242 - 245
65. **Hours RA, Massucco AE, Ertola RJ (1985)** Microbial biomass product from apple pomace in batch and fed batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 23: 33 - 37
66. **Hours RA, Voget CE, Ertola RJ (1988)** Apple pomace as raw material for pectinases production in solid state culture. *Biol Wastes* 23: 221 - 228
67. **Huang SY, Chou MS (1989)** Kinetic model for microbial uptake of insoluble solid-state substrate. *Biotechnol Bioeng* 35: 547 - 558
68. **Hunt DWA, Borden JH, Rahe JE, Whitney HS (1984)** Nutrient-mediated germination of *Beauveria bassiana* conidia on the integument of the bark beetle *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *J Invertebr Pathol* 44: 304 - 314
69. **Iglesias HA, Chirife J, Viollaz PE (1975)** An equation for correlating equilibrium moisture content in foods. *J Food Technol* 10: 289
70. **Iglesias HA, Chirife J (1978)** An empirical equation for fitting water sorption isotherms of fruits and related products. *Can Inst Food Sci Technol J* 11: 12
71. **Iglesias HA, Chirife J (1981)** An equation for fitting uncommon water sorption isotherms in foods. *Lebensm Wiss Technol* 14: 105

72. **Iglesias HA, Chirife J (1982)** Handbook of food isotherms: water sorption parameters for food and food components. In: Schweigert BS, Hawthorn J(Eds.) Food science and technology, a series of monographs. Academic Press, New York-London, pp 262 - 264
73. **Ikeda Y, Takahashi E, Yokogama K, Yoshimura Y (1972)** Screening for microorganisms producing gallic acid from chinese and Tara tannins. J Ferment Technol 50: 361 - 370
74. **Kaijiang L, Roberts DW (1986)** The production of destruxins by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* var major. J Invertebr Pathol 47: 120 - 122
75. **Kelsey RG, Shafizadeh F (1980)** Enhancement of cellulose accessibility and enzyme hydrolysis by simultaneous wet milling. Biotechnol Bioeng 22: 1025 - 1036
76. **Kirimura K, Nakajima I, Lee SP, Kawabe S, Usami S (1988)** Citric acid production by the diploid strain of *Aspergillus niger* obtained by protoplast fusion. Appl Microbiol Biotechnol 27: 504 - 506
77. **Koch LA (1975)** The kinetics of mycelial growth. J Gen Microbiol 89: 209 - 216
78. **Kucera M (1981)** The production of toxic protease by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture. J Invertebr Pathol 38: 33 - 38
79. **Kumar PKR, Lonsane BK (1987)** Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberelic acid. Biotechnol Letters 9: 179 - 182
80. **Labuza TP, Mizrahi S, Karel M (1972)** Mathematical models for optimization of flexible film packaging of food for storage. Trans ASAE 15: 150
81. **Larroche C, Desfarges C, Gros JB (1988)** Optimization of the spore production of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation on buckwheat seeds. Appl Microbiol Biotechnol 28: 85 - 92
82. **Laukevics JJ, Apsite AF, Viesturs UE, Tengerdy RP (1984)** Solid state fermentation of wheat straw to fungal protein. Biotechnol Bioeng 26: 1465 - 1474
83. **Laukevics JJ, Apsite AF, Viesturs US, Tengerdy RP (1985)** Steric hindrance of growth of filamentous fungi in solid substrate fermentation of wheat straw. Biotechnol Bioeng 27: 1687

84. **Leger RJS, Cooper RM, Charnley AK (1986a)** Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *J Invertebr Pathol* 47: 167 - 177
85. **Leger RJS, Charnley AK, Cooper RM (1986b)** Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J Invertebr Pathol* 47: 295 - 302
86. **Leger RJS, Charnley AK, Cooper RM (1986c)** Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J Invertebr Pathol* 48: 85 - 95
87. **Lehninger AL (1986)** *Bioquímica, segunda edición.* Ediciones Omega SA, Barcelona, 1117 pp
88. **Levonen-Munoz E, Bone DH, Daugulis AJ (1983)** Solid state fermentation and fractionation of oat straw by basidiomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* 18: 120 - 123
89. **Lindenfelser LA, Ciegler A (1974)** Solid substrate fermentor for ochratoxin A production. *Appl Microbiol* 29: 323 - 327
90. **Lindenfelser LA, Ciegler A (1975)** Solid-substrate fermentor for ochratoxin A production. *Appl Microbiol* 29: 323 - 327
91. **Lingg AJ, Donaldson MD (1981)** Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. *J Invertebr Pathol* 38: 191 - 200
92. **Luong JHT, Volesky B (1983)** Heat evolution during the microbial process estimation, measurement, and applications. In: Fiechter A (ed), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol 28.* Springer-Verlag, Berlin, pp 1 - 40
93. **Madron F (1979)** Material-balance calculation of fermentation processes. *Biotechnol Bioeng* 21: 1487 - 1490
94. **Matcham SE, Jordan BR, Wood DA (1985)** Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl Microbiol Biotechnol* 21: 108 - 112
95. **Mignone CF (1982)** Transformación del suero de queso por procesos fermentativos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Exactas.

95. **Miller GL (1959)** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31: 426 - 428
96. **Milner RJ (1981)** Patterns of primary spore discharge of *Entomophthora* spp from the blue green aphid, *Acyrtosiphon kondoi*. *J Invertebr Pathol* 38: 419 - 425
97. **Minkevich IG, Eroshin VK (1973)** Productivity and heat generation of fermentation under oxygen limitation. *Folia Microbiol* 18: 376 - 385
98. **Moo-Young M, Moreira AR, Tengerdy RP (1983)** Principles of solid-substrate fermentation. In: Smith JE, Berry DR and Kristiansen B (ed), *The filamentous fungi, vol IV (Fungal Technology)*. Edward Arnold, London, pp 117 - 144
99. **Moo-Young M, Daugulis AJ, Chahal DS, MacDonald DG (1979)** The waterloo process for SCP production from waste biomass. *Proc Biochem* 12: 38 - 40
100. **Moreira AR, Philips JA, Humphrey AE (1978)** Method for determining the concentration of adsorbed protein and cell mass in cellulose fermentations. *Biotechnol Bioeng* 21: 1501 - 1505
101. **Narahara H (1977)** Influence of water activity on the growth and the yield of conidia of *Aspergillus*. *J Ferment Technol* 55: 254 - 261
102. **Narahara H, Koyama Y, Yoshida T, Pichangkura S, Ueda R, Taguchi H (1982)** Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *J Ferment Technol* 60: 311 - 319
103. **Narahara H, Koyama Y, Yoshida T, Atthasampunna P, Taguchi H (1984)** Control of water content in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *J Ferment Technol* 62: 453 - 459
104. **Nicolini L, Honulstein C, Carilli A (1987)** Solid state fermentation of orange peel and grape stalks by *Pleurotus ostreatus*, *Agrocybe aegerita* and *Armillariella mellea*. *Appl Microbiol Biotechnol* 26: 95 - 98
105. **Nyiri L, Lengyel ZL (1968)** Studies on ventilation of culture broths. I. Behaviour of CO₂ in model systems. *Biotechnol Bioeng* 10: 133 - 150

106. Oriol E, Raimbault M, Russos S, Viniegra-Gonzalez G (1988) Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 27: 598 - 503
107. Oswin CR (1946) *J Chem Ind (London)* 65: 419, citado por: Iglesias HA, Chirife J (1982) Handbook of food isotherms: water sorption parameters for food and food components. In: Schweigert BS, Hawthorn J(Eds.) Food science and technology, a series of monographs. Academic Press, New York-London, pp 262 - 264
108. Patel SA, Erickson LE (1981) Estimation of heat of combustion of biomass from elemental analysis using available electron concepts. *Biotechnol Bioeng* 23: 2051 - 2067
109. Persson M, Hall L, Soderhall K (1984) Comparison of peptidase activities in some fungi pathogenic to arthropods. *J Invertebr Pathol* 44: 342 - 348
110. Pirt SJ (1975) Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, London
111. Pitt JI (1975) Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. In: Duckworth RB (ed), Water Relations of Foods. Academic Press, New York, p 273
112. Pomeley NJB (1959) Formation of the colony in the fungus *Chaetomium*. *Aus J Biol Sci* 12: 53 - 64
113. Qadeer MA, Anjum JI, Akhtar R (1980) Biosynthesis of enzymes by solid substrate fermentation. Part II. Production of alpha-amylase by *Bacillus subtilis*. *Pakistan J Sci Ind Res* 23: 25 - 29
114. Raimbault M (1980) Croissance de champignons filamenteux sur substrats amylacés. These de Doctorat, U.P.S. Toulouse, 291 p
115. Raimbault M, Alazard D (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 9: 199 - 209
116. Ride JP, Drysdale RB (1972) A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiol Plant Pathol* 2: 7 - 15
117. Roberts DW, Yendol WG (1971) Use of fungi for microbial control of insects. In: Burges HD, Hussey NW (eds) Microbial control of insects and mites. Academic Press, London, pp 125 - 149

118. **Rodriguez J, Bechsted W, Echevarria J, Sierra N, Delgado G, Daniel A, Martinez O (1986)** Optimization of solid state fermentation of citrus dried peel by *Aspergillus niger* in a packed bed column. *Acta Biotechnol* 6: 253 - 258
119. **Roels JA (1980a)** Simple model for growth on substrates with different degrees of reduction. *Biotechnol Bioeng* 22: 33 - 53
120. **Roels JA (1980b)** Application of macroscopic principles to microbial metabolism. *Biotechnol Bioeng* 22: 2457 - 2514
121. **Roels JA (1983)** *Energetics and Kinetics in Biotechnology* Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
122. **Rolz C, De Leon R, De Arriola MC, De Cabrera S (1987)** White-rot fungal growth on sugarcane ligno-cellulosic residue. *Appl Microbiol Biotechnol* 25: 535 - 541
123. **Rosato YB, Messias CL, Azevedo JL (1981)** Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 38: 1 - 3
124. **Roussos S, Garcia JL, Raimbault M (1983)** Valorisation de la cossette de betterave par culture de *Trichoderma harzianum* en milieu liquide et solide. *Industries Alimentaires et Agricoles* 100: 449 -452
125. **Sala FJ, Burgos J (1972)** Simple method for mass production and collection of conidia from *Hemispora stellata*. *Appl Microbiol* 24: 504 - 505
126. **San KY, Stephanopoulos G (1984)** Studies on on-line bioreactor identification. II. Numerical and experimental results. *Biotechnol Bioeng* 26: 1189 - 1197
127. **Sato K, Nagatani M, Sato S (1982)** A method of supplying moisture to the medium in a solid-state culture with forced aeration. *J Ferment Technol* 60: 607 - 610
128. **Sato K, Nagatani M, Nakamura K, Sato S (1983)** Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in a solid state culture with forced aeration. *J Ferment Technol* 61: 623 - 629
129. **Scarr MP (1968)** Studies arising from observations of osmophilic yeast by phase contrast microscopy. *J Appl Bacteriol* 31: 525 - 529

130. **Scott WJ (1953)** Water relations of **Staphylococcus aureus** at 30°C. Aust J Biol Sci 6: 549
131. **Shields MS, Lingg AJ, Heimsch RC (1981)** Identification of a **Penicillium urticae** metabolite which inhibits **Beauveria bassiana**. J Invertebr Pathol 38: 374 - 377
132. **Silman RW (1980)** Enzyme formation during solid substrate fermentation in rotating vessels. Biotechnol Bioeng 22: 411 - 420
133. **Singh K, Shegal SN, Vezina C (1968)** Large-scale transformation of steroids by fungal spores. Appl Microbiol 16: 393 - 400
134. **Smith H (1977)** Microbial surfaces in relation to pathogenicity. Bacteriol Rev 41: 475 - 500
135. **Smith SE (1947)** The sorption of water vapor by high polymers. J Am Chem Soc 69: 646
136. **Smith JE (1975)** The structure and development of filamentous fungi. In: Smith JE, Berry DR (ed), The Filamentous Fungi, Vol I. Edward Arnold, London, pp 1 - 15
137. **Smith JE, Deans SG, Anderson JG, Davis B (1977)** The nature of fungal sporulation. In: Meyrath J, Bu'Lock JD (ed), Biotechnology and Fungal Differentiation (FEMS Symposium No 4). Academic Press, London, pp 17 - 41
138. **Smith RJ, Pekrul S, Gula EA (1981)** Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (**Eliothis zea**). J Invertebr Pathol 38: 335 - 344
139. **Smith RJ, Gula EA (1981)** Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of **Beauveria bassiana**. J Invertebr Pathol 37: 222 - 230
140. **Smitley DR, Brooks WM, Kennedy GG (1986)** Environmental effects on production of primary and secondary conidia, infection and pathogenesis of **Neozygites floridana** a pathogen of the twospotted spider mite, **Tetranychus urticae**. J Invertebr Pathol 47: 325 - 332
141. **Solomon BO, Erickson LE (1981)** Biomass yields and maintenance requirements for growth on carbohydrates. Proc Biochem, Feb/March 44 - 49

142. **Stephanopoulos G, San KY (1984)** Studies on on-line bioreactor identification. I. Theory. *Biotechnol Bioeng* 26: 1177 - 1188
143. **Swift MJ (1973)** The estimation of mycelial biomass by determination of the exosamine content of wood tissue decayed by fungi. *Soil Biol Biochem* 5: 321 - 332
144. **Tassinari T, Macy C (1977)** Differential speed two roll mill treatment of cellulosic materials for enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* 19: 1321 - 1330
145. **Thompson DP, Eribo BE (1983)** Extracellular enzyme production by *Rhizopus* and *Mucor* species on solid media. *Can J Microbiol* 30: 126 - 128
146. **Toyama N (1976)** Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulase. *Biotechnol Bioeng Symp* No 6 207 - 219
147. **Trinci APJ (1971)** Influence of the width of the periferal growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. *J Gen Microbiol* 67: 325 - 344
148. **Trinci APJ (1974)** A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *J Gen Microbiol* 81: 225 - 236
149. **Troller JA (1980)** Influence of water activity on microorganisms in food. *J Food Technol* 34: 76 - 83
150. **Troller JA, Christian JHB (1978)** Water activity and food. Academic Press, New York, pp 235
151. **Turian G (1974)** Sporogenesis in fungi. *Ann Rev Phytopathol* 12: 129 - 137
152. **Turian G (1977)** Fungal differentiation. In: Meyrath J, Bu'Lock JD (ed), *Biotechnology and Fungal Differentiation* (FEMS Symposium No 4). Academic Press, London, pp 1 - 15
153. **Ulmer DC, Tengerdy RP, Murphy VG (1981)** Solid state fermentation of marure fibres. *Biotechnol Bioeng Symp* No 11 449 - 461
154. **Ulmer DC, Tengerdy RP (1981)** Solid-state fermentation of steam-treated feedlot waste fibers with *Chaetomium cellulolyticum*. *Biotechnol Bioeng Symp* No 11 449 - 461

155. **Vezina C, Singh K (1975)** Transformation of organic compounds by fungal spores. In: Smith JE, Berry DR (ed), *The Filamentous Fungi*, Vol II. Edward Arnold, London, pp 158 - 192
156. **Viesturs UE, Apsite AF, Laukevics JJ, Ose VP, Tengerdy RP (1981)** Solid-state fermentation of wheat straw with *Chaetomium cellulolyticum* and *Trichoderma lignorum*. *Biotechnol Bioeng Symp No 11* 359 - 369
157. **Wang HY, Cooney CL, Wang DIC (1977)** Computer-aided baker's yeast fermentations. *Biotechnol Bioeng* 19: 69 - 86
158. **Wang HY, Cooney CL, Wang DIC (1979)** Computer control of baker's yeast production. *Biotechnol Bioeng* 21: 975 - 995
159. **Wang NS, Stephanopoulos G (1983)** Application of macroscopic balances to the identification of gross measurement errors. *Biotechnol Bioeng* 25: 2177 - 2208
160. **Wraight SP, Roberts DW (1987)** Insect control effort with fungi. In: Pierce G (ed) *Development in industrial microbiology*, vol 28. Society for Industrial Microbiology, pp 77 - 87
161. **Yadav JS (1987)** Influence of nutritional supplementation on solid-substrate fermentation of wheat straw with an alkaliphilic white rot fungus (*Coprinus* sp.). *Appl Microbiol Biotechnol* 26: 474 - 478
162. **Zadrazil F, Brunnert H (1981)** Investigation of physical parameters important for the solid state fermentation of straw by white rot fungi. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 11: 183 - 188
163. **Zadrazil F, Brunnert H (1982)** Solid state fermentation of lignocellulose containing plant residues with *Sporotrichum pulverulentum* Nov. and *Dichomitus squalens* (Karst.) Reid. *Appl Microbiol Biotechnol* 16: 45 - 51
164. **Zetelaki-Horvath K (1984)** Cellulase production of *Phanerochete chrysosporium* on a solid substrate column. *Proc Biochem*, April 65 - 66
165. **Zimmermann G (1982)** Effect of temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 40: 36
40