



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE *Aspergillus niger* PARA PRODUCIR

β -GALACTOSIDASA A PARTIR DE VINAZAS Y SUERO DE LECHE

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:

JACOB GÓMEZ ROMERO

TUTOR: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

MEXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El trabajo de investigación de la presente tesis, fue realizado bajo la asesoría y supervisión del Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Experimental y contó con el apoyo técnico del Laboratorio de Biotecnología y Alimentos de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce el apoyo recibido por el PAPIME PE-205706, PAID 6190-14 (VMLP 2006-2007) para la obtención de los materiales y reactivos empleados en la fase de experimentación.

El comité tutorial, para el desarrollo y escrito de esta tesis estuvo conformado por:

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello (Tutor Principal)	Facultad de Química, UNAM
Dra. María del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

El jurado para la evaluación del examen de grado, estuvo conformado por:

PRESIDENTE	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
VOCAL	Dr. Enrique Galindo Fentanes
SECRETARIO	Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich
SUPLENTE	Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte
SUPLENTE	Dr. Edgardo Escamilla Marván

AGRADECIMIENTOS

El trabajo recabado en esta tesis de Maestría, no sólo es el fruto de dos años de investigación, ni de cientos de horas de laboratorio, ni de decenas de fines de semana sacrificados, ni siquiera de todas las horas de estudio desde que era un niño, es el fruto, también, de cientos de personas que han aportado algún grano de arena a la persona que ahora soy. Esta Tesis representa un punto y seguido en mi formación y en mi trayectoria personal.

Me es imposible expresar mi gratitud a todos aquellos que la merecen, no obstante, quisiera al menos mencionar algunos agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, del mismo modo a la Facultad de Química por haberme acogido y brindado una educación de la más alta calidad.

Mi más sincero agradecimiento a mis tutores, Dra. Maria del Carmen Wacher Rodarte, Dr. Sergio Sánchez Esquivel, pero de una forma muy especial al Dr. Victor Manuel Luna Pabello, por haber depositado en mi su confianza, por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por el gran apoyo brindado y desde luego por haber me guiado de forma inteligente a través de estos años de experimentos.

Quiero agradecer infinitamente al Jurado de examen por la revisión, comentarios y aportaciones a la tesis que fueron de gran importancia para consolidar e integrar el trabajo final.

Al Ing. Abel Blancas asesoramiento técnico en operación de biorreactores, al Prof. Q.F.B. Agustín Rey, por el apoyo técnico en análisis cromatográfico, así como las ideas que contribuyeron a consolidar ésta tesis, por su gran amistad que ojalá perdure por muchos años.

A mi gente del Laboratorio, por haber contribuido a crear un ambiente de trabajo perfecto para soportar largos y arduos días de trabajo. Los técnicos del laboratorio, M. en C. Guadalupe, M. en C. Luciano, Sr. Roberto y Sr. Lugo, por facilitarme con su tiempo mi trabajo diario.

Gracias a mi Gyna y Padre, por haberme incitado a los estudios, por haberse preocupado de mi formación y por haberme aconsejado en mis decisiones. A mis hermanos Virgilio, Darío, Casandra, Abdy y Yadira, por haberme ayudado en los momentos difíciles de mi vida. No siempre es fácil encontrar en tus hermanos la mejor amistad, es lo más grande que me ha pasado.

Quiero agradecer a mis amigos Juan, Marco, Yolanda, Vero, Lyenet, Anita, Mariee por sus consejos y su gran amistad que me han brindado. A la princesa Shalom por compartirme parte de su tiempo y hacer de este momentos muy especiales.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	12
2	MARCO TEÓRICO	13
2.1	Producción de alcohol y vinazas	13
2.1.1	<i>La industria alcoholera en México</i>	13
2.1.2	<i>Proceso de obtención de alcohol etílico por vía fermentativa y de las vinazas.</i>	14
2.1.3	<i>Composición química de las vinazas.</i>	16
2.1.4	<i>Aplicaciones de las vinazas.</i>	17
2.2	Producción de suero de leche.	18
2.2.1	<i>Composición del suero de leche.</i>	18
2.2.2	<i>Utilización del suero de leche.</i>	18
2.2.3	<i>Tipos de suero de leche.</i>	19
2.3	β-Galactosidasa.....	20
2.3.1	<i>Aplicaciones</i>	20
2.4	Diseño de Experimentos y Metodología de Superficie de Respuesta.	21
3	OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO	25
3.1	Objetivo general.....	25
3.2	Objetivos específicos.	25
3.3	Hipótesis.....	25
3.4	Justificación	25
3.5	Estrategia experimental.....	26
4	MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1	Vinazas.....	29
4.2	Suero de leche.....	29
4.3	Microorganismo y medios de cultivo.	29
4.4	Estandarización del inóculo.....	30
4.5	La MSR utilizada en el diseño de experimentos.....	32

4.6	Cultivos en matraz	32
4.7	Operación del Biorreactor.....	33
4.8	Métodos analíticos.....	34
5	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	35
5.1	Caracterización de las vinazas y suero de leche.	35
5.2	Estandarización del inóculo.....	36
5.3	Optimización del medio de cultivo mediante un diseño de superficie de respuesta.	37
5.4	Efecto de la suplementación y la supresión de elementos	48
5.5	Establecimiento de las condiciones de cultivo óptimas a nivel de matraces utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta.	52
5.6	Optimización de las condiciones de operación en la producción de β -galactosidasa en un biorreactor de 3L.....	66
5.7	Prueba de toxicidad aplicada al remanente obtenido del cultivo	87
6	ANÁLISIS INTEGRAL DE RESULTADOS.....	91
7	CONCLUSIONES	92
8	PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	94
9	BIBLIOGRAFÍA	95
10	ANEXOS	106
	Anexo A.1. Cuantificación de azúcares totales “Método Fenol-Sulfúrico” (Dubois et al., 1976).	106
	Anexo A.2. Cuantificación de azúcares reductores “Método Ácido dinitrosalicílico” (Dubois et al., 1976).....	107
	Anexo A.3. Cuantificación de sulfatos “Método Turbidimétrico” (APHA, 1998).	108

Anexo A.4. Cuantificación de amonio “Método Indol” (Adams, 1991).	109
Anexo A.5. Cuantificación de proteína “Método de Bradford (Cutler, 2004; Bradford, 1976).	110
Anexo A.6. Prueba de actividad enzimática de la β-galactosidasa (Miller, 1972). 111	111
Anexo A.7. Producción nacional de leche.	112
Anexo A.8. Análisis macro y micro morfológico de <i>Aspergillus niger</i>.	113
Anexo A.9. Prueba de toxicidad aguda con semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>). 113	113
Anexo A.10. Resultados experimentales obtenidos a diferentes tiempos de cultivo (promedio de 3 replicas).	117
Anexo A.11. Sistema de cultivo	118
Anexo A.12. Análisis estadístico de datos	123
Anexo 13. Cálculos.	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de obtención de alcohol etílico a partir de melazas de caña.....	15
Figura 2. Diagrama general de la estrategia experimental.	28
Figura 3. Desproteínización del suero aplicando tratamiento térmico.....	29
Figura 4. Esquema de cámara de Neubauer	31
Figura 5. Cinética de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> , en los medios de cultivo D y E para inóculo.	37
Figura 6. Cinéticas de crecimiento en los tratamientos factoriales en suero de leche y vinazas.	39
Figura 7. Cinéticas de consumo de azúcares en los tratamientos factoriales en vinazas, y suero de leche.	40
Figura 8. Comportamiento del pH durante el cultivo en los tratamientos factoriales en vinazas y suero de leche.	40
Figura 9. Cinéticas de degradación y producción de proteína total en los tratamientos factoriales en vinazas y suero de leche.....	41
Figura 10. Cinéticas de crecimiento y consumo de carbohidratos de los tratamientos axiales en vinazas y suero de leche.....	42
Figura 11. Comportamiento del pH durante el cultivo en los tratamientos axiales en vinazas y suero de leche.	43
Figura 12. Cinéticas de degradación y producción de proteína en los tratamientos axiales en vinazas y suero de leche.....	43
Figura 13. Cinéticas de crecimiento y consumos de carbohidratos en los tratamientos centrales en suero de leche y vinazas.	44
Figura 14. Comportamiento del pH y cinéticas de degradación y síntesis de proteínas en los tratamientos centrales en suero de leche y vinazas.	45
Figura 15. Superficie de respuesta de biomasa en función de las vinazas y suero de leche.	47
Figura 16. Superficie de respuesta de la concentración de proteína en función de las vinazas y suero de leche.	48
Figura 17. Efecto de la adición y supresión al suero de elementos en la producción de biomasa y la actividad enzimática de beta- \square galactosidasa.....	49
Figura 18. Cinética de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en suero de leche acondicionado, inoculado con una solución de esporas 1×10^6 esporas / mL.	50
Figura 19. Efecto de la edad y proporción del inóculo sobre la actividad de la \square -galactosidasa. Empleando precultivos con edades de: 24h , 41 h y 65 h a una concentración del 5 % (v/v).....	51
Figura 20. Efecto de la edad y concentración de inóculo sobre la actividad de la \square -galactosidasa. Empleando precultivos con edades de: 24h , 41 h y 65 h , a una concentración del 10 % (v/v).....	51
Figura 21. Gráfica de Pareto de las tres variables estudiadas para biomasa : temperatura, velocidad de agitación y tiempo de cultivo.	54
Figura 22. Representación gráfica de superficie y contornos para la respuesta biomasa en función de velocidad de agitación (rpm) y temperatura ($^{\circ}$ C).....	56
Figura 23. Representación gráfica de superficie y contornos para la respuesta biomasa en función de la temperatura ($^{\circ}$ C) y tiempo de cultivo (h).....	56
Figura 24. Representación gráfica de superficie y contornos para la respuesta biomasa en función de velocidad de agitación (rpm) y tiempo de cultivo (h).	57
Figura 25 Gráfica de Pareto de las tres variables estudiadas para proteína producida: temperatura, velocidad de agitación y tiempo de cultivo.	58
Figura 26. Representación gráfica de superficie y contorno para la respuesta proteína en función de velocidad de agitación (rpm) y temperatura ($^{\circ}$ C).....	59

Figura 27. Representación gráfica de superficie y contorno para la respuesta proteína en función de temperatura (°C) y tiempo de cultivo (h).	60
Figura 28. Representación gráfica de superficie y contorno para la respuesta proteína en función de velocidad de agitación (rpm) y tiempo de cultivo (h).	60
Figura 29. Gráfica de Pareto de las tres variables estudiadas para la actividad enzimática: temperatura, velocidad de agitación y tiempo de cultivo..	61
Figura 30. Representación gráfica de superficie y contorno para la respuesta actividad enzimática específica en función de velocidad de agitación (rpm) y temperatura (°C). ..	62
Figura 31. Representación gráfica de superficie y contorno para la respuesta actividad enzimática específica en función de temperatura (°C) y tiempo de cultivo (h).	63
Figura 32. Representación gráfica de superficie y contorno para la respuesta actividad enzimática específica en función de velocidad de agitación (rpm) y tiempo de cultivo (h).	63
Figura 33. Efecto de la potencia volumétrica específica (P/V) sobre la concentración de biomasa (símbolos llenos) y actividades enzimáticas (símbolos vacíos) finales en los cultivos con <i>Aspergillus niger</i> . 28 °C por 95 horas ; 25 °C por 80 h y 31 °C por 110 h	65
Figura 34. Taponamiento biorreactor con biomasa ocasionado por la generación de espuma cuando se utilizó el antiespumante tipo B.	68
Figura 35. Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares de los tratamientos factoriales.	70
Figura 36. Degradación de proteínas de los tratamientos factoriales.	71
Figura 37. Generación y consumo de azúcares reductores en los tratamientos factoriales	72
Figura 38. Actividad enzimática de los tratamientos factoriales..	72
Figura 39. Productividad volumétrica de los tratamientos factoriales.	73
Figura 40. Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares de los tratamientos axiales.	75
Figura 41. Degradación de proteína en los tratamientos axiales.	76
Figura 42. Generación y consumo de azúcares reductores en los tratamientos axiales. .	76
Figura 43. Actividad enzimática de los tratamientos axiales.	77
Figura 44. Productividad volumétrica de los tratamientos axiales.	77
Figura 45. Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares en los tratamientos centrales	78
Figura 46. Degradación de proteínas en los tratamientos centrales.	79
Figura 47. Consumo y generación de azúcares reductores y actividad enzimática en los tratamientos centrales.	79
Figura 48. Productividad volumétrica promedio de los tratamientos centrales	80
Figura 50. Representación gráfica de las respuestas biomasa y actividad enzimática específica en función de la velocidad de agitación (rpm) y flujo de aireación (mL/min) a las 27 h de cultivo.	84
Figura 51. Representación gráfica de las respuestas biomasa y actividad enzimática específica en función de la velocidad de agitación (rpm) y flujo de aireación (mL/min) a las 30 h de cultivo.	85
Figura 52. Representación gráfica de las respuestas biomasa y actividad enzimática específica en función de la velocidad de agitación (rpm) y flujo de aireación (mL/min) a las 72 h de cultivo.	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de melazas, alcohol etílico y vinazas	14
Tabla 2. Composición química promedio de vinazas de <i>Agave cucui</i>	17
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de las vinazas y suero de leche. ND = No detectado, NA = No analizado.....	35
Tabla 4. Resultados obtenidos de la evaluación de los medios de cultivo para esporulación del hongo <i>Aspergillus niger</i> , a 28 °C por 7 días de incubación.....	36
Tabla 5. Resultados obtenidos de la evaluación de los medios de cultivo para inóculo. ..	37
Tabla 6. Niveles de vinazas y suero de leche	38
Tabla 7. Matriz del Diseño Compuesto Central Ortogonal a utilizar en la formulación del medio de cultivo y respuestas obtenidas de biomasa y proteína a las 165 h de cultivo....	38
Tabla 8. Parámetros cinéticos del cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , empleando diferentes volúmenes de vinazas y suero de leche.....	46
Tabla 9. Resultados del análisis canónico (vectores propios y valores propios) para las respuestas de biomasa y proteína	47
Tabla 10. Parámetros cinéticos de <i>Aspergillus niger</i> de los cultivos para inóculo.	52
Tabla 11. Niveles de temperatura, velocidad de agitación y tiempo de cultivo para establecer las condiciones óptimas a nivel de matraces.	52
Tabla 12. Valores de biomasa, proteína y actividad enzimática de los diferentes tratamientos.....	53
Tabla 13. Resultados del análisis canónico (valores y vectores propios) para las respuestas de biomasa, proteína y actividad enzimática.	64
Tabla 14. Estimación de la potencia volumétrica inicial determinada de acuerdo a los datos experimentales reportados por Büchs <i>et al.</i> , 2000.....	65
Tabla 15. Parámetros cinéticos de rendimientos y productividades globales obtenidos de los diferentes cultivos realizados en matraz.....	66
Tabla 16. Resultados obtenidos de la evaluación de los antiespumantes	68
Tabla 17. Diseño experimental para evaluar el efecto de la agitación y aireación en la producción de α -galactosidasa en un biorreactor de 3L manteniendo constante una temperatura 28 °C, pH 4.2 y un tiempo de cultivo de 72h.	69
Tabla 18. Estimación de la potencia volumétrica entregada al medio de cultivo sin aerar (densidad 1160 kg/m ³ , Np 6, diámetro del impulsor 45 mm y volumen de operación 2 L). 81	
Tabla 19. Resultados del análisis canónico (vectores propios y valores propios) para las respuestas de biomasa y proteína a diferentes etapas de cultivo (27, 30 y 72 h).....	82
Tabla 20. Parámetros cinéticos de rendimientos y productividades globales obtenidos de los diferentes cultivos realizados en el biorreactor	83
Tabla 21. Elongación del hipocótilo y radícula (mm), promedio de cada replicado y porcentaje de inhibición de elongación del hipocótilo y radícula, con respecto al promedio del control negativo.....	88
Tabla 22. Resultados del porcentaje de mortalidad de semillas de lechuga utilizando diferentes concentraciones del remanente de cultivo y cálculo de Probit empírico.	89
Tabla 23. Evolución de los parámetros cinéticos en la optimización de la producción de β -galactosidasa a nivel matraz y biorreactor.	91

ABREVIATURAS

ACT	Actividad
ATP	Adenosintrifosfato
ANOVA	Análisis de varianza
CV	Coefficiente de variación
ρ	Densidad (kg/m^3)
DCC	Diseño compuesto central
DOT	Disolved Oxygen Tension
DQO	Demanda química de oxígeno
IC ₅₀	Concentración de inhibición media
K _{La}	Coefficiente de transferencia de oxígeno
L	Litro
LOEC	Low observable effect concentration
MIN	Minuto
MSR	Metodología de superficie de respuesta
NA	No analizado
ND	No detectado
NOEC	No observable effect concentration
NOM	Norma Oficial Mexicana
μ	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
Φ	Diámetro del impulsor (m)
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
Qp	Productividad volumétrica de producto
P/V	Potencia Volumétrica (kw/m^3)
Qx	Productividad volumétrica de biomasa
N	Revoluciones por minuto (rpm)
Np	Número de potencia
S.A.	Sociedad Anónima
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
SD	Desviación estándar
SEMARNAT	Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales
ST	Sólidos tales
T	Temperatura
TON	Tonelada
TC	Tiempo de cultivo
TRAT	Tratamiento
U	Unidades de actividad enzimática
VA	Velocidad de agitación
VTO	Velocidad de transferencia de oxígeno
Yx/s	Rendimiento de biomasa en base al sustrato

RESUMEN

La industrialización del alcohol etílico en México, así como del queso dan pie a la generación de residuos industriales con serios problemas para su eliminación. Las vinazas y el suero de leche presentan una producción anual de 840,000 m³ y 1.219 millones de m³ por año, respectivamente. Sin embargo, debido a la gran disponibilidad y composición química de ambos, surgió la posibilidad de utilizarlos como sustratos para cultivar *Aspergillus niger* para producir la enzima β -galactosidasa. De esta manera en el presente trabajo se estableció un diseño experimental para evaluar las vinazas y el suero de leche como medio de producción de *Aspergillus niger* para producir esta enzima. La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) y Diseños Compuestos Centrales ortogonales (DCC) se emplearon en diseño de experimentos en los tres casos de estudio: optimización del medio de cultivo, establecimiento de condiciones ambientales y operativas a nivel de matraz y biorreactor. El trabajo experimental se dividió en dos etapas.

La primera etapa consistió en caracterizar fisicoquímicamente las vinazas y el suero de leche. Ambos sustratos presentaron propiedades físicas similares (pH, densidad y sólidos); en cuanto a su composición química presentaron diferencias. La concentración de proteína fue de 308.35 mg/mL (cientos de veces más que las vinazas) y 9 % (v/p) azúcares (siete veces más que las vinazas) en el suero de leche. La proporción inicial de los sustratos en el medio fueron 10 partes de vinazas por 90 de suero de leche, explorando ± 5 unidades de los factores (vinazas y suero de leche) en un volumen total de 200 ml, teniendo como respuestas el crecimiento celular y la concentración de proteína. Los rendimientos ($Y_{x/s}$) y productividades volumétricas obtenidas del crecimiento de *Aspergillus niger* estuvieron comprendidos en un intervalo de 0.09 a 0.46 g células/gsustrato y 0.012 a 0.018 g/L*h, respectivamente. Las bajas productividades obtenidas fueron determinantes para que el proceso no sea factible. Aunado a esto se obtuvieron respuestas mínimas del crecimiento celular y concentración de proteína. Tal resultado se atribuye al alto contenido de sulfatos y metales (Mn, Cu) presentes en las vinazas. Por lo tanto, en los experimentos subsecuentes únicamente se utilizó el suero de leche como medio de cultivo. A nivel de matraces se utilizó un DCC. El intervalo para las variables de estudio estuvo comprendido entre 25 a 31 °C, de 100 a 200 rpm y de 80 a 110 horas de cultivo. Se estableció como condiciones óptimas de temperatura, velocidad de agitación y tiempo de cultivo de 25°C, 200 rpm y 80 horas, respectivamente, cuando la biomasa fue 3.8 g/L, y la concentración de proteína fue 148.9 mg/L, con rendimiento de 0.64 g células/gsustrato y productividades de 0.038 g células/L*h y 48 U/L*h. Mientras que para la actividad enzimática (1523 U/mg) se estableció a 28°C, 226 rpm y 95 horas de cultivo, con un rendimiento de 0.47 g células/gsustrato, y productividades de 0.038 g células/L*h y 58.51 U/L*h.

En la segunda etapa se establecieron las condiciones de operación en un biorreactor de 3 L, (Applikon). Se evaluaron dos antiespumantes (Pure-Process) grado biofarmaceutico (A) y otro grado industrial (B); a concentraciones de 5 % y 10 % (v/v), respectivamente. El antiespumante tipo A, mostró una mejor capacidad

de abatimiento de la espuma a una concentración 10 % (v/v), sin afectar el volumen de operación, la concentración celular, ni la actividad enzimática. Un DCC ortogonal se empleó para optimizar las variables independientes, velocidad de agitación y flujo de aireación, tomando como puntos centrales del DCC, 200 rpm y 100 mL/min. Manteniendo constantes la temperatura de 25°C, pH de 4.2 y el tiempo de cultivo de 72 h. Las variables dependientes o respuestas fueron biomasa (g/L) y actividad enzimática (U/g_{células}). Las variables independientes estuvieron comprendidas en un intervalo de 39 a 361 rpm y 46 a 154 mL/min. Las corridas fueron realizadas en un biorreactor, inoculando 1.8 L de medio fresco con 200 mL de inóculo de 41 h de edad, con un volumen total de operación de 2 L. A una velocidad de agitación de 200 rpm, flujo de aireación de 50 mL/min y tiempo de cultivo de 27 h, se registró la actividad enzimática y productividad máximas, siendo de 3485 U/g_{células} y 503 U/L*h, respectivamente, con un rendimiento global de 0.24 g_{células}/g_{sustrato} a las 72 horas, por lo tanto se establecieron como condiciones óptimas a nivel biorreactor. Estadísticamente los resultados a 27 y 72 h, se encontró que antes de las 27 h, el flujo de aireación fue el que más afectó a la producción de biomasa, mientras que la velocidad de agitación tuvo mayor efecto en la actividad enzimática. Mientras que a las 72 h la velocidad de agitación fue la variable que influyó sobre ambas respuestas. Comparando los resultados óptimos de biorreactor con los hallados a nivel de matraz; la actividad enzimática fue 2.3 veces más, mientras que la productividad fue 8.5 veces más que en matraz, además el tiempo de cultivo se redujo de 95 a 27 h. Por último, el remanente del cultivo resultó tóxico para las semillas de lechuga, cuando se emplearon concentraciones superiores al 50 % (v/v). Por lo tanto, verter este remanente sin algún tratamiento previo a cuerpos de agua o suelo, puede tener efectos adversos acumulativos sobre el medio ambiente.

1 INTRODUCCIÓN

La preocupación pública por el control de la contaminación ambiental ha incitado a la búsqueda de la forma más conveniente, económica y eficiente de aprovechar los subproductos de las industrias alcohólica y láctea, antes de ser desechados (Peterson *et al.*, 1979; Sánchez *et al.*, 1993; Schultz *et al.*, 2006).

En la fermentación alcohólica se producen grandes cantidades de aguas residuales. Entre las principales, debido a su volumen y concentración de contaminantes se encuentran las vinazas. Este tipo de aguas residuales se generan a razón de 12 a 16 litros por cada litro de alcohol destilado, las cuales son descargadas al ambiente sin un tratamiento previo, ocasionando con ello su deterioro (Honig, 1969; Moreno *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 1993). Si bien el tratamiento de las vinazas ha sido objeto de múltiples estudios, a la fecha siguen constituyendo un problema sin resolver.

Por otra parte, el suero de leche, es el subproducto más abundante que genera la industria láctea, es un líquido residual procedente de la manufactura del queso. Este subproducto es de difícil aceptación en el mercado, ya que sus características no lo hacen apto para su comercialización directa (Marwaha *et al.*, 1988; Ghaly *et al.*, 2004). Debido a esto, el suero de leche se trata mediante técnicas que permiten la extracción de sus componentes, tales como la lactosa (3,3 - 6,0%) y proteínas (0,32 - 0,7%), que constituyen un aporte limitado de alimento para los seres humanos, ya que sólo una parte del suero se utiliza para estos fines (Kononovich, 1979; Moo-Young, 1985; Schultz *et al.*, 2006). La mayor parte del suero de leche se convierte en un efluente altamente contaminante cuando se vierte a los cuerpos de agua aledaños, debido a su gran demanda biológica y química de oxígeno (Jelen, 1979, 2003; Peterson *et al.* 1979; Marwaha *et al.*, 1988; Ben-Hassan *et al.*, 1994).

El peligro del vertimiento indiscriminado de estos desechos no radica solamente en su efecto económico directo por el costo que representan las aguas de suministro, sino en su efecto indirecto, ya que cuando se contaminan las aguas superficiales y subterráneas, surge una amenaza de alcance impredecible para la salud de la población, así como trastornos de la producción en la agricultura y la propia economía del agua.

Tomando esto en consideración y el hecho de que la utilización de materias primas de bajo costo o desechos industriales es un campo de estudio de intensa investigación, el presente trabajo se ha enfocado en evaluar las vinazas y el suero de leche como sustratos para el hongo *Aspergillus niger* para la producción de la enzima β -galactosidasa de interés comercial. Al mismo tiempo, se plantea el desarrollo de un proceso fermentativo, dado que en la mayoría de los estudios realizados se han enfocado al desarrollo de métodos para el tratamiento de estos desechos, con el objetivo de combatir el efecto contaminante que producen estos residuos industriales, por lo que representa un costo económico adicional para este tipo de industrias, las cuales están en crisis económica permanente y su

cierre implicaría un problema de carácter social. En este contexto, la posibilidad de obtener un producto útil, a partir de subproductos problema, constituye una vía que permitirá dos puntos principales: 1) tener un ingreso extra de los tradicionalmente obtenidos y 2) una reducción de las erogaciones o multas que por concepto de vertimiento de aguas residuales se deban de hacer.

Es importante destacar que entre los microorganismos empleados para la producción de enzimas como amilasas, glucosa oxidasa, catalasa, invertasa y β -galactosidasa (Crueger, 1989) se encuentra el hongo *Aspergillus niger*, el cual consume los nutrientes presentes en las melazas, principalmente la sacarosa, produciendo además de enzimas, ácidos orgánicos como cítrico, oxálico, itacónico y glucónico, dependiendo las condiciones de cultivo (Bennett *et al.*, 1992; Santero *et al.*, 1999; El-Holi *et al.*, 2003; Hamid *et al.*, 2003; Ikram-ut-Haq *et al.*, 2003; Mehyar *et al.*, 2005).

Por lo anterior, para el presente proyecto de investigación y tomando en cuenta el problema de contaminación ambiental que enfrentan actualmente las industrias alcohólica y de lácteos, se definió, proponer una alternativa de uso que le reditúe ingresos económicos adicionales mediante la generación de productos con valor agregado, como es el caso de enzimas.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Producción de alcohol y vinazas

2.1.1 La industria alcoholera en México

En México la producción promedio anual de alcohol es de alrededor de 70,000 m³. El residuo principal de esta actividad son compuestos que presentan cantidades considerables de materia orgánica llamados comúnmente como: vinazas (Noyola *et al.*, 1988). Las vinazas son sustratos complejos que incluyen desde azúcares, fenoles, polifenoles, sulfatos, fosfatos hasta materia orgánica como levaduras inactivas, las cuales se emplean en el proceso fermentativo para la producción de alcohol. La producción promedio de vinazas es de 840,000 m³/año (Noyola *et al.*, 1988). Este remanente generado presenta una demanda química de oxígeno (DQO) aproximadamente de 120,000 mg/L, la que la convierte en un contaminante potencial para el medio ambiente si se vierte al drenaje, sin algún tratamiento previo, ya sea físico, químico o biológico. En la Tabla 1 se muestran los valores de la producción de alcohol etílico y vinazas a partir de melazas con un promedio anual de 67,535 m³ y 816,423 m³, respectivamente; entre 1988 a 1995 (James, 1991; Rodríguez, 1993; Azúcar S.A., 1995).

Tabla 1. Producción de melazas, alcohol etílico y vinazas en México (Azúcar S.A., 1995)

AÑO	MELAZA (ton)	ETANOL (m ³)	VINAZAS (m ³)
1988	1,381,411	69,671	836,052
1989	1,319,119	68,271	819,252
1990	1,322,814	62,325	747,900
1991	1,497,668	66,312	795,744
1992	1,273,314	70,967	851,604
1993	1,429,854	68,333	819,996
1994	1,384,023	69,214	830,568
1995	1,424,127	69,189	830,268

2.1.2 Proceso de obtención de alcohol etílico por vía fermentativa y de las vinazas.

La producción de alcohol etílico por fermentación se basa en la bioconversión de las hexosas en etanol según la siguiente reacción:



El proceso de elaboración de etanol (Figura 1) a partir de melazas, comienza con la dilución de estas mieles con agua caliente en un tanque mezclador, hasta alcanzar una densidad entre 20 y 22 °Brix. Después se adiciona ácido sulfúrico para ajustar el pH en un intervalo de 4 a 4.5 y obtener así lo que se llama mosto fresco.

El mosto fresco se bombea a un tanque donde se esteriliza o pasteuriza a 121 °C con vapor saturado, una vez terminada esta operación es necesario agregar sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y fosfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, los cuales son los micronutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de la levadura.

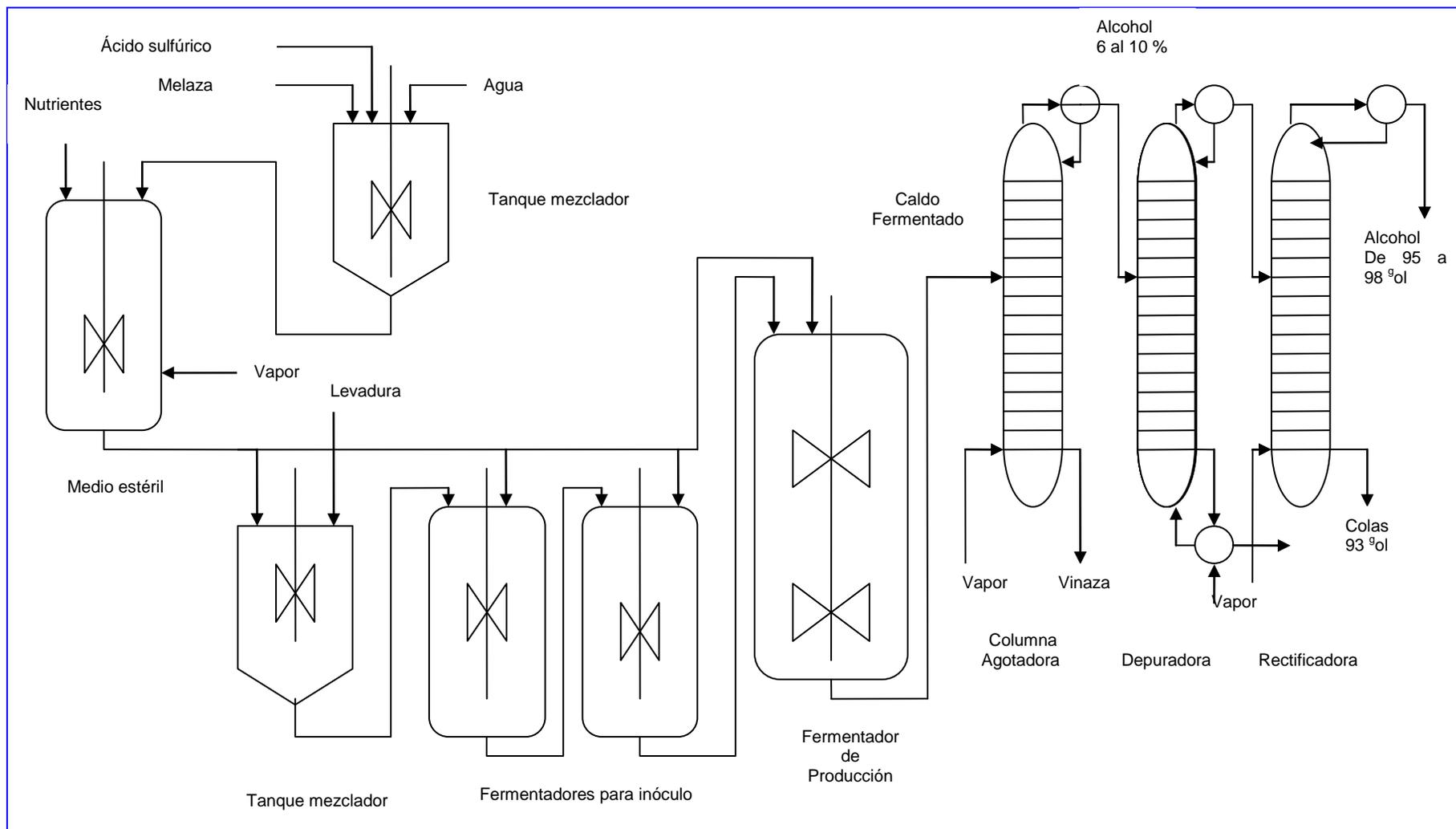


Figura 1. Proceso de obtención de alcohol etílico a partir de melazas de caña.

La mezcla del esterilizador se bombea a los fermentadores para inóculo, con la finalidad de que la levadura se adapte al medio y alcance la madurez necesaria, de ahí se envía a un mezclador con mosto fresco, para después enviarlo a los fermentadores de producción.

En los birreactores se realizan las reacciones bioquímicas para la producción del etanol, a una temperatura de entre 20 y 30 °C. De estas reacciones se genera calor metabólico, motivo por el cual los biorreactores deben contar con un sistema de enfriamiento.

Para detener la fermentación, se incrementa la temperatura hasta 38 °C, con lo que se inactiva la levadura y se obtiene un mosto muerto, el cual contiene una mezcla de alcoholes, restos de levadura y materia en suspensión.

El mosto muerto es enviado a las torres de destilación para la recuperación y purificación de alcohol etílico. A la primera torre donde comienza la destilación se le llama columna de agotamiento o destrozadora. La destilación se lleva a cabo por arrastre de vapor, que es alimentado por el fondo de la columna. Aquí es donde los componentes de más bajo punto de ebullición salen por el domo de la columna como una mezcla de vapores que contienen agua, alcohol y compuestos volátiles como aldehídos, los cuales son alimentados a la columna depuradora. En el fondo de la columna agotadora se obtienen los residuos llamados vinazas. Las vinazas se generan a razón de 12 a 16 litros por litro de alcohol destilado (Moreno *et al.*, 1990).

En la columna depuradora se purifica el alcohol diluido. Por la parte superior se destilan metanol, etanol, aldehídos y otras impurezas. Por el fondo de la columna se obtiene una mezcla de alcohol sin aldehídos, los cuales son separados por diferencia de densidades. En la columna de rectificación se obtiene el etanol de 95-96°Gl, mientras que en la parte inferior se obtienen las colas, constituidas por alcoholes amílicos y residuos de aceite fósil.

2.1.3 Composición química de las vinazas.

Existen diferencias significativas entre las vinazas provenientes de miel final de caña y los de remolacha. Casi siempre, los mostos de mieles finales de caña presentan un menor contenido de nitrógeno y un mayor contenido de minerales, que los de cereales o remolacha. En la Tabla 2, se ilustra la composición promedio de las vinazas de destilería de *Agave cucui*. Hay diferencias que se deben a la composición de la materia prima y la tecnología empleada en el proceso fermentativo, así como en el proceso de destilación. A pesar de esto las vinazas no dejan (Sánchez *et al.*, 1993) de ser un residuo con una concentración de materia disuelta elevada.

Tabla 2. Composición química promedio de vinazas de *Agave cucui*.
(Leal *et al.*, 2006)

Parámetro	Vinazas de primera	Vinazas de segunda
pH	4.13±0.15	4.05±0.11
DQO(mg/L)	19065±2780	17502±3758
Densidad(g/mL)	0.96±0.04	1.00±0.04
Sólidos totales (%)	8.3±2.0	7.9±1.3
Fósforo total(mg/Kg)	<0.02	<0.02
Nitrógeno (%)	0.55±0.11	0.57±0.08
Carbono orgánico total (%)	28.8±2.4	29.8±2.9
Calcio (%)	3.1±0.03	3.9±0.4
Magnesio (mg/Kg)	0.52±0.02	0.82±0.04
Hierro (%)	1.19±0.04	1.39±0.03
Manganeso(mg/Kg)	24±1	32±2
Zinc(mg/Kg)	75±5	77±4
Cobre(mg/Kg)	8±5	11±5
Azúcares totales (%)	1.2±0.9	5.7±1.7

2.1.4 Aplicaciones de las vinazas.

Las vinazas se han empleado como fertilizante de suelo (Gómez, 1985; Gómez, 1996; Rodella, 1977) y como materia prima en la elaboración de alimentos para animales (Gallo *et al.*, 1986; Waliszewsky, 1989), y en la producción de biomasa (Araujo, 1976). Al principio de la Segunda Guerra Mundial, se suscitó el uso de las vinazas como sustrato para la producción de la levadura torula, la cual se empleó como material para alimentación de animales (Noyola *et al.*, 1988)

La levadura torula (*Candida utilis*) es un forraje muy nutritivo por su alto contenido proteico, ya que su relación proteína/carbohidrato es mayor que en forrajes vegetales. El contenido de proteína en peso seco es de un 55 %. Se ha confirmado que se pueden obtener de 10 a 15 Kg de levadura seca por cada 1000 L de vinazas diluida, lo que corresponde de 5 a 7 Kg de proteína cruda (Almazán *et al.*, 1982; Noyola *et al.*, 1988; Estévez, 1999; Saura *et al.* 2002).

También las vinazas se han utilizado en la producción de setas (*Agaricus campestris*, *Boletus indecisis*, y *Tricholoma nudun*) en cultivo sumergido y se ha mostrado la posibilidad de la manufactura de productos alimenticios a partir de setas para consumo humano por su alto contenido en proteínas y grasas (Humfeld, 1948; Falanche, 1962).

Un posible uso de las vinazas es la obtención de un residuo químico con valor comercial a partir de las vinazas concentradas. La composición del residuo está en función del origen de las melazas o de las vinazas (Bravo *et al.*, 1996). Las vinazas concentradas mediante evaporación de agua son sometidas a una combustión donde se descomponen las sustancias orgánicas presentes en estos residuos. Las cenizas obtenidas se trituran y después son lavadas con agua, se filtran y por último se concentran en una solución. El contenido de sulfato de

potasio en esta solución, depende si se usó ácido sulfúrico o clorhídrico en la acidificación de la melaza.

2.2 Producción de suero de leche.

Se denomina suero de leche al remanente después de la precipitación y separación de la caseína de la leche durante la elaboración de queso. Representa aproximadamente el 85 a 90 % del volumen de la leche y retiene el 55 % de sus nutrientes. Este subproducto es de difícil aceptación en el mercado, ya que sus características no lo hacen apto para su comercialización directa (Marwaha *et al.*, 1988; Peterson *et al.*, 1979). A pesar de las numerosas investigaciones realizadas, en la actualidad, no se ha desarrollado ningún proceso capaz de rentabilizar el tratamiento de las cantidades de suero que se producen y se vierten cada año, representando un importante problema medioambiental debido a su elevada carga orgánica (Cristiani-Urbina *et al.*, 2000).

En México, la producción de leche de acuerdo a las estadísticas de la SAGARPA, fue de millones de litros durante el periodo 2002-2006. Según Villegas, aproximadamente el 14 % de la producción de leche se destina para la fabricación de queso, de ahí que la manufactura de queso genera gran cantidad de suero de leche (1,219 millones de m³ de suero por año). Este subproducto aún no es aprovechado al 100 %, sobre todo en la micro y pequeña agroindustria quesera. El suero de leche se vierte al medio ambiente, causando serios problemas de contaminación no cuantificados. Se tiene estimado que a partir de 10 litros de leche se produce 1 Kg de queso y, aproximadamente, 9 Kg de suero.

2.2.1 Composición del suero de leche.

Entre los componentes, se encuentran la lactosa, ácido láctico (3,3 - 6,0%), ácidos grasos, proteínas (0,32 - 0,7 %), factores de crecimiento y vitaminas, cuya proporción puede variar dependiendo del tipo de queso elaborado (Moo-Young, 1985). Debido a la gama de constituyentes son fuentes potenciales para la alimentación humana y animal. Sin embargo, sólo una fracción de suero se utiliza para estos fines y la mayor parte del suero de leche se convierte en un efluente altamente contaminante, cuando se vierte a los cuerpos de agua, debido a su gran contenido de materia orgánica.

2.2.2 Utilización del suero de leche.

Tradicionalmente el suero producido ha sido empleado para la alimentación de cerdos, así como para la alimentación de ganado. Asimismo, por su elevado valor nutritivo llega a ser empleado para consumo humano.

Entre los usos potenciales del suero de leche se encuentra la alimentación de piensos para aves y alimento dietético. De la misma manera, se ha utilizado en fabricación de bebidas fermentadas (cerveza), los precipitados de albúmina se han utilizado como suplemento en algunos alimentos con bajo valor nutritivo; en la producción de productos cosméticos y farmacéuticos. También se han empleado

en la producción jarabes de galactita, utilizados en la industria de repostería, glucosa, lactosa, queso ricotta, requesón, vitaminas (riboflavina). Producción de ácido láctico para utilizarlo como materia prima en la industria farmacéutica o alimentaria; también ha sido utilizado como sustrato en fermentaciones para la producción de antibióticos (penicilina), combustibles (metano, metanol y etanol) y para biomasa utilizada en la elaboración de alimentos para animales (Kononovich, 1979; Moo-Young, 1985, Gonzales, 1996; Domínguez *et al.*, 2001; Grba *et al.*, 2002).

En la actualidad, el suero de leche fresco no tiene costo económico, ya que es preferible regalarlo que tirarlo. El problema de desechar o utilizar el suero de leche, implica la evaluación de varios factores como la transportación. Este material presenta de 93.5 % a 94 % de agua, lo que lo hace extremadamente caro para su traslado. El suero de leche es perecedero, por su rápida descomposición debido al alto valor nutritivo que presenta, ocasionando que su vida de anaquel sea corta.

Por otro lado, se han empleado diversas tecnologías para la evaporación y secado del suero. Para lograrlo se requiere la inversión de un gran capital, el mercado para el suero deshidratado es muy reducido, de tal manera que el costo de producción es apenas recuperado. Asimismo, el suero de leche del tipo ácido, es extremadamente difícil de deshidratar en su totalidad y esto solo se puede lograr con equipo especializado. Una de las pocas industrias capaces de utilizar los grandes volúmenes del suero, es la industria de alimentos para animales (Crawshaw, 2001). Desafortunadamente, el precio que debe ser pagado por el suero de leche deshidratado es bajo, frecuentemente es igual al costo de producción. La razón es que el mayor constituyente del suero deshidratado es lactosa y ésta sólo puede ser utilizada en cantidades limitadas en estos alimentos. Por otro lado, la lactosa proveniente del suero debe ser competitiva en precio con otros carbohidratos económicos como melazas y licor de maíz (Elliot *et al.*, 2001).

2.2.3 Tipos de suero de leche.

Hay dos clases de suero, el dulce y el ácido, los cuales dependen de los métodos empleados para la coagulación de la leche. El suero dulce es el obtenido por una coagulación enzimática, utilizando para ello un cuajo de procedencia animal, como la quimosina de rumiantes, o bien un cuajo microbiano, obtenido de tecnología genética o vegetal (Yang *et al.*, 1995). El suero ácido es obtenido por acidificación natural de la leche, o por la adición de ácidos orgánicos o minerales. La coagulación natural se produce por fermentación de la leche, debido a la flora bacteriana existente en ella, o los fermentos lácticos adicionados, y la obtenida por adición de ácidos. Esta se presenta cuando se agrega sobre la leche líquida una solución de ácidos tales como: acético, cítrico, láctico (orgánicos) o ácido clorhídrico o sulfúrico (minerales) (Moo-Young, 1985).

2.3 β -Galactosidasa

La enzima β -galactosidasa (β -D-galactosido galacto-hidrolasa); E.C. 3.2.1.23) también conocida como lactasa, cataliza la hidrólisis de la lactosa rompiendo el enlace β -galactósido entre la D-galactosa y un alcohol, dando lugar a los monosacáridos glucosa y galactosa (Godfrey *et al.*, 2004). Esta enzima está ampliamente distribuida en la naturaleza, y se encuentra en numerosas plantas, animales y microorganismos (Resszy-Szabo *et al.*, 2002). La compañía Yakult en el 2004, estimó una producción mundial de esta enzima de 7,000 ton/año (Buchholz *et al.*, 2004). Las industrias más importantes, que actualmente cubren la demanda mundial de esta enzima, son Central del Latte, Snow Brand Milk Production, Sumimoto Chemical, Valeo, Alko y Novozymes (Chettan, 2000; Liese *et al.*, 2002; Penesar, *et al.*, 2006). Esta última es una de las que tiene un mayor porcentaje en la producción de esta enzima.

2.3.1 Aplicaciones

Las fuentes comerciales importantes a nivel industrial de la β -galactosidasa, por un lado se encuentran las levaduras *K. fragilis* y *K. lactis*; hongos como *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*.

Las propiedades de la β -galactosidasa varían de acuerdo al microorganismo. Asimismo, la enzima de interés, debe ser seleccionada en función de su aplicación. Una de las características primordiales que determina la aplicación de una enzima es su intervalo de pH en el que se encuentran más activas. Las enzimas se dividen en dos grupos: 1) las enzimas que trabajan a un pH ácido, provenientes de hongos. Estas son deseables para procesar suero de leche ácido y permeado; 2) las enzimas que trabajan a pH neutro. Estas provienen de levaduras y bacterias, las cuales son deseables para el procesamiento de leche y suero de leche dulce (Mahoney, 1985).

La β -galactosidasa resulta de importancia comercial por diversas razones, de las cuales destacan:

- a) Utilización en los sectores alimenticio y de salud.

Se utiliza en la industria láctea con el objeto de producir leche libre de lactosa para personas con intolerancia a la lactosa. Se estima que aproximadamente el 47 % de la población mestiza mexicana presenta mala absorción de lactosa, mientras que en la población indígena, la incidencia llega al 75 % (Houts, 1988). Además, se ha demostrado la bondad de la leche con lactosa hidrolizada para la alimentación de pacientes por vía enteral, haciendo de éste un producto con características superiores y más económico que las fórmulas tradicionales completas que suelen utilizarse en estos casos (García-Garibay, 1992). También es un alimento adecuado para niños con diarrea, para los cuales está contraindicado el consumo de lactosa por la incapacidad de hidrolizar este disacárido a consecuencia del estado subnormal de las células del intestino

delgado (Novelli *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2005). Una ventaja adicional del uso de esta enzima, estriba en que se incrementa la capacidad edulcorante de los productos con lactosa hidrolizada sin que aumente el contenido calórico.

En productos lácteos fermentados, se ha reportado un ahorro considerable en el tiempo de la fermentación, con mayor producción del ácido láctico, al utilizar leche con lactosa hidrolizada como materia prima. Lo anterior es debido a que ambos monosacáridos son más fácilmente asimilables por microorganismos. Asimismo, en productos lácteos endulzados, el disacárido tiende a precipitar debido a su baja solubilidad, cosa que no ocurre al hidrolizarla, pues los productos de hidrólisis son de 3 a 4 veces más solubles (Nijpels, 1982).

b) Sector ambiental.

La hidrólisis de la lactosa presente en el suero de leche puede convertir este desecho en un producto reutilizable lo cual, concomitantemente, implica reducción en los costos que genera el tratamiento de aguas residuales.

Es importante señalar que las enzimas provenientes de hongos presentan un pH en un intervalo de 3 a 5, tienen temperatura óptima relativamente alta (por arriba 60 °C) (Rand *et al.*, 1973). La combinación de temperatura alta y pH bajo inhibe eficazmente el crecimiento microbiano. La enzima de *A. niger* ha sido usada preferencialmente debido a su termoestabilidad y pH bajo óptimo (Rand *et al.*, 1973).

2.4 Diseño de Experimentos y Metodología de Superficie de Respuesta.

El diseño estadístico de experimentos se refiere al proceso de planificar un experimento, de tal forma que los datos obtenidos puedan analizarse con métodos estadísticos con el fin de llegar a conclusiones válidas y objetivas. El enfoque estadístico es necesario si se quieren lograr conclusiones significativas de los resultados, ya que cuando el problema incluye datos que están sujetos a errores experimentales, la metodología estadística es la única forma objetiva de análisis. Esta metodología, tiene la particularidad de determinar la influencia e importancia de los parámetros estudiados y las interacciones entre éstos con un mínimo de ensayos. Esto último contrasta con la metodología clásica, que consiste en hacer variar cada factor manteniendo los demás constantes, lo cual conduce por una parte, a un número considerable de experimentos y, por otra, a ignorar la interacción que pueda existir entre los factores considerados (Box *et al.*, 1987; Mandenius *et al.*, 2008).

Directrices para el diseño de experimentos

Cualquier problema experimental incluye dos aspectos: el diseño del experimento y el análisis estadístico de los datos. Estos dos aspectos se encuentran íntimamente relacionados, porque el método de análisis depende directamente del diseño empleado. Por lo tanto, para poder cumplir con el

enfoque estadístico al diseñar y analizar un experimento es necesario cumplir con los siguientes lineamientos (Montgomery, 2005):

- Comprensión y planteamiento del problema. Se requiere la integración de conocimiento multidisciplinario para lograr entender todos los factores que pueden afectar la respuesta. Las fuentes de conocimientos por lo regular son las referencias bibliográficas, experiencias adquiridas, la comprensión teórica del fenómeno, estudios preliminares, entre otros.
- Elección de los factores y niveles. El experimentador debe elegir los factores en el experimento por su importancia, interés en la investigación, facilidad de ser modificados. Los niveles para cada factor deben ser mínimos, que permitan cubrir la región de interés y aporten suficiente información para su análisis e interpretación. También, se debe analizar que variables deben mantenerse constantes a lo largo del experimento y su nivel correspondiente.
- Selección de la variable de respuesta. Se debe estar realmente seguro de cual es la respuesta adecuada que arrojará la información útil sobre el estudio y garantizar que los métodos para cuantificarla sean eficientes.
- Selección del diseño experimental. Se deben integrar los datos anteriores y los recursos (material, métodos, tiempo y personal) con los que se cuenta, para poder determinar cuantas observaciones y repeticiones son factibles para su ejecución.
- Realización del experimento. Se lleva a cabo el diseño planteado, teniendo precaución de cumplir con todos los requisitos de aleatorización que permitan su posterior análisis. Si no se lleva a cabo tal y como se planteó, o si se registran errores en su procedimiento, se puede poner en juego la validez y reproducibilidad experimental. Por lo que se recomienda no subestimar los aspectos logísticos y de planeación en la realización del diseño.
- Análisis. Para que los resultados y conclusiones sean más objetivos que apreciativos se deben emplear métodos estadísticos adecuados. Pueden basarse en paquetes de Software ampliamente validados que permiten realizar los cálculos de manera automática, visualizar los datos gráficamente y que eviten el error craso de su cálculo. Esto toma particular relevancia para el análisis de los diseños estadísticos avanzados. En esta etapa se debe verificar la idoneidad del modelo comúnmente utilizando el análisis de residuos
- Conclusiones y recomendaciones. Una vez que se han analizado los datos, el experimentador debe extraer conclusiones prácticas de los resultados y recomendar un curso a seguir. También deben realizarse corridas de seguimiento o pruebas de confirmación para validar las conclusiones del experimento.

Una vez definidos los factores, sus niveles y la variable de respuesta, la elección del tipo de diseño experimental se puede realizar con ayuda de paquetes interactivos de software (Ejemplo: JMP v. 6.0), con los cuales una vez introducidos todos los valores, presentan, a la consideración del experimentador, una selección de posibles diseños. Además, una vez obtenidos los resultados, el mismo software permite realizar el análisis estadístico del diseño y determinar el ajuste de los datos al modelo experimental, así como la influencia de cada factor y de las interacciones entre ellos sobre la respuesta.

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) se basa en un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en los que la respuesta de interés está influenciada por varias variables de procesos complejos y donde el objetivo es optimizar dicha respuesta (Montgomery, 2005). Fue desarrollada y descrita por primera vez en 1951 por Box y Wilson, con la publicación de un artículo en el cual intentaban encontrar el menor número posible de observaciones o tratamientos y hallar la relación entre la respuesta y los diferentes factores estudiados con la finalidad de obtener uno óptimo (Box *et al.*, 1955).

En su primera década la MSR fue una herramienta empleada en la industria química (Box, 1954). A partir de 1970 se ha utilizado la MSR en trabajos enfocados a bioprocesos (Mead *et al.*, 1975; Xie *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Mandenius *et al.*, 2008), pero fue hasta 1980, que se observó con mayor frecuencia en publicaciones que se optimizaba la actividad microbiana, a través de modificar las condiciones microambientales para el cultivo de microorganismos, optimización de medios de cultivo especialmente aplicados a fermentaciones líquidas a nivel de matraces (Galindo *et al.*, 1989; Myers *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2004; Soliman *et al.*, 2005, Pablo *et al.*, 2005), crecimiento celular, activación y producción de enzimas (Mazutti *et al.*, 2006; Negi *et al.*, 2006), bioconversiones (Cladera-Olivera *et al.*, 2004), y optimización de condiciones de cultivo (Torres-Bacete *et al.*, 2005). La MSR es actualmente la técnica de optimización más empleada en los procesos fermentativos, debido quizás, a que es altamente eficiente, ya que se requieren relativamente pocas observaciones para obtener buenos resultados y porque elimina la necesidad de realizar varias repeticiones de todas las observaciones, lo que ahorra mucho tiempo, costos de experimentación y el manejo de gran cantidad de muestras simultáneamente.

La MSR presenta varias ventajas con respecto al método clásico, es una herramienta sencilla, rápida y accesible para determinar las condiciones óptimas que maximizan o minimizan una respuesta. También tiene la ventaja de permitir visualizar a través de imágenes tridimensionales el fenómeno que se está estudiando, lo cual es de gran ayuda para la comprensión del problema.

En la MSR se establece que la respuesta a ensayar (y) está en función de:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon$$

Donde x_1, x_2, \dots, x_k son los k factores que se desean evaluar a distintos niveles y ε representa el ruido o error observado en la respuesta. Si la respuesta esperada se denota por $E(y) = f(x_1, x_2, \dots, x_k) = \eta$, entonces la superficie representada por:

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k)$$

Se denomina superficie de respuesta.

La MSR es una técnica secuencial, a partir de un punto de interés que se determina con base en condiciones de operación habituales o por fuentes bibliográficas se determinan los niveles de cada factor.

Uno de los modelos más eficientes para ajustar el modelo de segundo orden son los diseños centrales compuestos (DCC). Los DCC están formados por un diseño factorial 2^k , 2^k axiales y n puntos centrales. Hay dos parámetros que deben especificarse: la distancia α de los experimentos axiales al centro del diseño y el número de puntos centrales. La finalidad de la MSR es la optimización y localización del punto óptimo que se desconoce antes de realizar el experimento, por lo que debe utilizarse un diseño que proporcione una precisión de la estimación en todas las direcciones.

Un DCC se hace rotatable mediante la elección de α . El valor de α para la rotabilidad, depende del número de experimentos en la porción factorial del diseño. En cuanto al número de puntos centrales, es normal incluir entre 3 y 5 puntos con el fin de proporcionar una varianza rotablemente estable de la respuesta (Montgomery, 2005; Mandenius *et al.*, 2008).

$$\alpha := \left(\frac{\sqrt{F \cdot T} - F}{2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Donde:

F= Núm. tratamientos factoriales

T= Núm. total de tratamientos

3 OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

Los objetivos que se plantearon para cumplir con el presente trabajo son los siguientes.

3.1 *Objetivo general.*

- Evaluar la capacidad de *Aspergillus niger* para producir β -galactosidasa a partir de vinazas y suero de leche.

3.2 *Objetivos específicos.*

- Caracterizar fisicoquímicamente las vinazas y el suero de leche.
- Diseñar y formular un medio cultivo, a partir de vinazas y suero de leche, que permita producir la enzima β -galactosidasa, utilizando la metodología de superficie de respuesta.
- Establecer las condiciones ambientales óptimas a nivel de matraz para producir la enzima β -galactosidasa por medio de estudios de superficie de respuesta.
- Definir las condiciones de operación óptimas para obtener la máxima producción de la enzima en un fermentador de 3 litros, empleándose estudios de superficie de respuesta.
- Evaluar la toxicidad aguda del líquido remanente obtenido del cultivo utilizando semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

3.3 *Hipótesis*

Es posible cultivar al hongo *Aspergillus niger* bajo condiciones controladas para producir la enzima β -galactosidasa, empleando como sustratos vinazas y suero de leche.

3.4 *Justificación*

En la actualidad en México los desechos de las industrias alcohola-azucarera y de lácteos son dispuestos en cuerpos receptores de agua o a cielo abierto, teniendo un efecto negativo no cuantificable sobre el medio ambiente. Esta actividad no permitida a estas industrias las hace acreedoras a sanciones por parte de las autoridades gubernamentales.

Haciendo un estimado del monto que deben sufragar estas industrias, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 y la ley Federal de Derechos (Capítulo XIV), en las que se establecen los límites máximos de contaminantes y las cuotas que deben pagarse si se rebasan dichos límites. Tomando como ejemplo el parámetro DQO; la industria alcohola sería acreedora a una sanción trimestral por la cantidad \$ 84, 940,800.00; por otro lado, la industria quesera sería sancionada con la cantidad de \$ 168, 546,973.00

anualmente, costos que afectan de manera negativa la economía de estas industrias.

El poder contar con un proceso que utilice este tipo de residuos líquidos para obtener algún producto de valor comercial, permitiría que las industrias contaran con mayores elementos que satisfagan las expectativas económicas y ambientales de la sociedad.

Por lo tanto, los procesos de bioconversión surgen como una alternativa para el aprovechamiento de estos desechos, empleándolos como sustratos para el crecimiento de microorganismos capaces de producir sustancias con alto valor agregado. En consecuencia, la relevancia de este trabajo radica en determinar la posibilidad de reducir el efecto contaminante que provocan dichos residuos líquidos, aprovechándolos como sustrato para producir la enzima β -galactosidasa; la cual es ampliamente utilizada en la industria alimenticia.

3.5 Estrategia experimental

Para cumplir con los objetivos antes planteados se estableció la estrategia que se muestra en la Figura 2. En primera instancia, se seleccionó la cepa de *Apergillus niger* (donada por el cepario de la Facultad de Química), por su capacidad de producir diferentes enzimas con un amplio uso comercial; la resiembra de la cepa se hizo cada dos meses, utilizando tubos con medio PDA inclinado. La fase experimental se dividió en dos etapas.

La primera etapa consistió en la caracterización de las vinazas y el suero de leche, determinando composición química y propiedades fisicoquímicas como: demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno amoniacal, sulfatos, azúcares reductores, azúcares totales, proteína total, metales, densidad, pH, sólidos totales y metales. De acuerdo al análisis de carbohidratos (contenido de carbono) de los dos sustratos, el sustrato con mayor fuente de carbono se decidió ponerlo en mayor proporción para la formulación inicial del medio cultivo, por lo que se fijaron 10 partes de las vinazas por 90 partes de suero. Para la estandarización del inóculo, se realizó la selección de los medios (WA, PDA, PCA) de esporulación; los criterios de selección fueron obtener una concentración de esporas de 1×10^6 esporas/mL en el menor número de placas inoculadas y un tiempo corto de esporulación. Selección de los medios D, E y suero de leche acondicionado (ver materiales y métodos) para inóculo. A estos medios de cultivo se les evaluó los siguientes parámetros: tiempo de crecimiento del hongo (h), concentración celular (g/L) y morfología celular. Seleccionado el medio de cultivo para inóculo, el siguiente paso fue establecer cual fase del crecimiento celular (edad del inóculo) es la más apropiada para llevar a cabo la inoculación del medio de producción. Para esto se evaluó al inicio, mitad y término de la fase exponencial; así como, la cantidad de inóculo necesaria, ensayándose 5 y 10 % (p/V). Como último paso de la etapa se optimizó la formulación del medio de producción, para maximizar las respuestas de biomasa y proteína. Se empleó un Diseño Compuesto Central ortogonal y la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR),

teniendo como puntos centrales las proporciones iniciales de las vinazas y suero de leche de 10 y 90 partes.

La segunda etapa consistió en una serie de cultivos llevados a cabo a nivel de matraz (250 mL) y en un biorreactor de 3 L de capacidad nominal, empleando suero de leche acondicionado, en ambos se valió nuevamente de MRS y de DCC ortogonales para el diseño de los experimentos. Los cultivos en matraz se evaluaron los efectos que determinan las condiciones de cultivo, estableciéndose como factores a estudiar la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), velocidad de agitación (rpm) y tiempo de cultivo (h) y como respuestas, la concentración de biomasa, proteína y actividad enzimática específica. La siguiente fase del experimento consistió en realizar fermentaciones en un biorreactor de 3 L, con la finalidad de definir las condiciones de operación óptimas, estudiando el efecto de la velocidad de agitación (rpm) y el flujo de aire (mL/min), sobre las respuestas de biomasa, actividad enzimática, proteína total y generación de azúcares reductores. Por último, al remanente obtenido del cultivo, se le realizó una prueba de toxicidad aguda empleando semillas de plantas vasculares para determinar el grado de toxicidad (OECD, 1984).

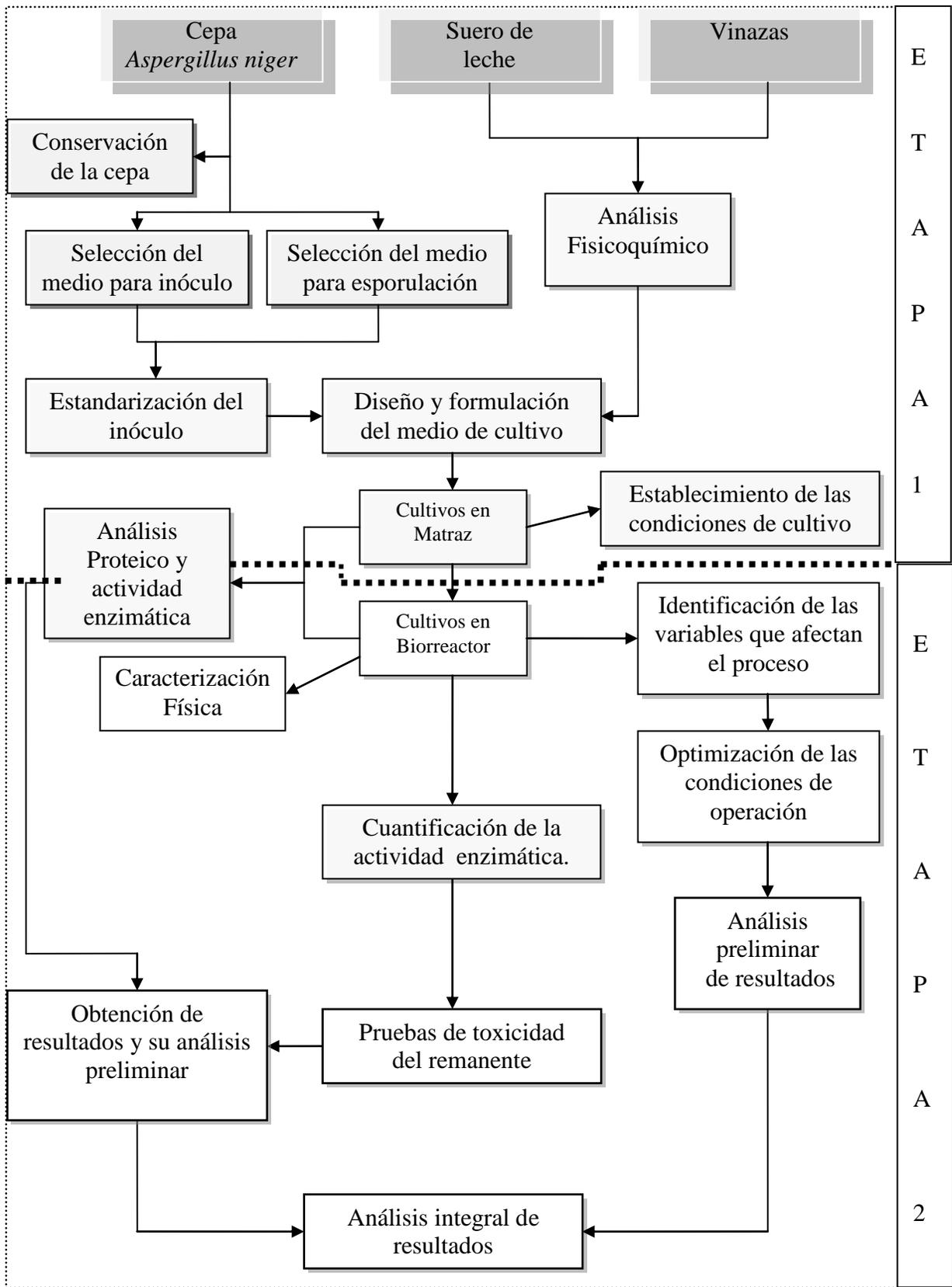


Figura 1. Diagrama general de la estrategia experimental.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Vinazas

Las muestras de vinazas fueron recolectadas del ingenio azucarero “El Potrero”, que se encuentra ubicado en el municipio Martínez de la Torre perteneciente al Estado de Veracruz, México, directamente de la planta productora de alcohol etílico, en el mes de junio 2006. Las muestras fueron guardadas en un recipiente de polietileno, refrigeradas e inmediatamente transportadas al laboratorio. El líquido fue guardado en el refrigerador a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis y utilización en la etapa experimental.

4.2 Suero de leche

El suero de leche fue recolectado del laboratorio de Alimentos y Biotecnología, de la Facultad de Química, UNAM. La muestra fue almacenada en un recipiente de polietileno y refrigerada a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El suero de leche fue acondicionado para poder llevar a cabo las fermentaciones tanto a nivel de matraz como a nivel fermentador (Figura 3). El tratamiento consistió en una desproteinización, aplicando tratamiento térmico en una autoclave (Felisa, México D.F.) a $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 1.5 Kg/cm^2 durante 15 minutos. Después se dejó enfriar durante 24 horas a temperatura ambiente, se decantó para remover las proteínas precipitadas y se filtró con papel filtro Whatman N° 40. Posteriormente el pH se ajustó a 4.2 con HCl 6N y se esterilizó, en los matraces o en el fermentador, utilizando nuevamente el autoclave a $115\text{ }^{\circ}\text{C}$, a una presión 1.5 Kg/cm^2 durante 15 minutos.

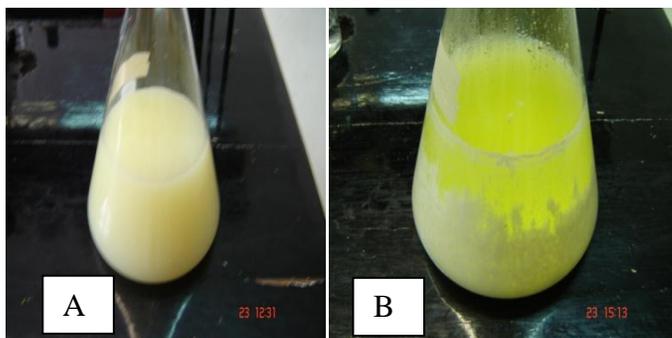


Figura 1. Desproteinización del suero aplicando tratamiento térmico
A) Antes, B) Después.

4.3 Microorganismo y medios de cultivo.

Cepa.

La cepa utilizada para esta investigación fue *Aspergillus niger*, donada por el cepario de la Facultad de Química, UNAM.

Conservación de la Cepa

La cepa se conservó en forma esporulada, la resiembra se hizo cada 2 meses por picadura, utilizando tubos inclinados con medio agar papa dextrosa (PDA) y refrigerando a una temperatura de -4 °C. La composición del medio es la siguiente:

Medio A. PDA	g/L
Infusión de papa	4
D-glucosa	20
Agar-agar	15

Esporulación de la cepa

Con la finalidad de contar con un medio de cultivo sólido que al ser inoculado con *Aspergillus niger* nos proporcionara una concentración de esporas arriba de 1×10^6 esporas/ml, se evaluaron los medios A, B y C, inoculados con una solución de esporas con concentración 1×10^3 esporas/mL, utilizando la técnica de extensión con varilla dentro de una zona de esterilidad, después incubados por 5 días a una temperatura de 28 °C.

Medio B. Agar papa- zanahoria	g/L
Infusión de papa	20
Infusión de zanahoria	20
Agar-agar	20
Agua destilada 1L	
Medio C. Agar agua (WA)	g/L
Agar-agar.	20
Agua destilada 1 L.	

4.4 Estandarización del inóculo

La preparación del stock de esporas se realizó a partir del cultivo de *Aspergillus niger* en medio mínimo sólido. Partiendo del cultivo en placa de agar, se lavó la superficie del cultivo con 10 mL de disolución al 2 % de Tween® 20 para forzar así el desprendimiento de las esporas. La disolución de lavado se centrifugó a 2800 g por 3 minutos en una centrifuga; se decantó y se resuspendieron las esporas en 2 mL de disolución crioprotectora de glicerina (5% v/v) y lactosa (10% p/v). Se repitió el paso anterior, centrifugar 2800 g por 2 minutos y se decantar. Finalmente se resuspendieron las esporas en 5 mL de disolución crioprotectora. Después se midió la concentración y se realizó la dilución oportuna para obtener la concentración de 10×10^6 esporas/mL. Por último se realizaron alícuotas de 2 mL y se almacenaron debidamente etiquetadas a -4 °C.

Determinación de concentración de esporas

Para determinación del número de esporas en la suspensión se realizó el siguiente tratamiento, se prepararon distintas diluciones y se procedió a la estimación de sus concentraciones realizando recuentos en cámara de Neubauer directamente en el microscopio. Los recuentos se realizaron en los cuatro cuadrados de las esquinas que, a su vez, están divididos en 16 cuadrados cada uno (Figura 4)

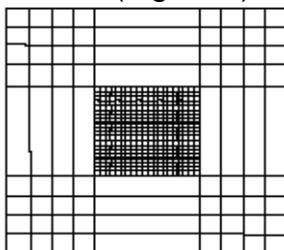


Figura 2. Esquema de cámara de Neubauer

El área de cada cuadrado grande es de 1 mm^2 y la profundidad de $0,1 \text{ mm}$, de forma que el volumen total de recuento es:

$$\text{Volumen total} = 4 \text{ cuadros} \cdot 1 \text{ mm}^2 \cdot 0,1 \text{ mm} = 0,4 \text{ mm}^3 = 0,4 \mu\text{L}$$

y la concentración de esporas: $\text{esporas mL}^{-1} = \text{número de esporas} / (0,4 \cdot 10^3)$

Germinación de esporas

Para la germinación de las esporas se evaluaron dos medios de cultivo (D y E) con 200 mL de medio, en matraces de 250 mL. Se incubó a 28°C , 150 rpm durante 150 horas en una incubadora (New Brunswick Scientific, Co). La composición de los medios es la siguiente:

Medio D	g/L
Sacarosa	140
NH_4NO_3	2.25
KH_2PO_4	1.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{FeNH}_2(\text{SO}_4)(2\text{H}_2\text{O})$	0.1 mg/L
pH	4.2 con HCl

Medio E	g/L
Lactosa	140
NH_4NO_3	2.25
KH_2PO_4	1.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{FeNH}_2(\text{SO}_4)(2\text{H}_2\text{O})$	0.1 mg/L
pH	4.2 con HCl

Las esporas germinadas se utilizaron para la inoculación de los matraces conteniendo ya el medio de cultivo diseñado a partir de vinazas y suero de leche.

4.5 La MSR utilizada en el diseño de experimentos.

En el diseño de experimentos de la optimización del medio cultivo de producción (proporciones de vinazas y suero de leche), así como los cultivos realizados en matraz y biorreactor, se utilizó un Diseño Compuesto Central ortogonal empleando cinco niveles de cada factor $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$, para cada una de las variables independientes y así evaluar la respuestas establecidas. El diseño de los experimentos se realizó con el paquete de **Software JMP** (v. 6.0), asimismo, éste se empleó para realizar el análisis de varianza (ANOVA), análisis de regresión, análisis canónico y la representación gráfica de los datos.

$$\alpha := \left(\frac{\sqrt{F \cdot T} - F}{2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Donde:

F= Núm. tratamientos factoriales

T= Núm. total de tratamientos

En los tres casos de estudio se establecieron Diseños Centrales Compuestos ortogonales (DCC). Estos diseños comprenden una parte factorial, la cual no permite por sí misma la estimación del error experimental. De ahí la importancia de incluir en los ensayos los puntos centrales, los cuales permiten la determinación del error. Por otro lado, los puntos axiales o estrellas, al igual que los puntos centrales son importantes en la elaboración del diseño, ya que proporcionan estimaciones precisas en todas las direcciones, facilitando la ubicación del óptimo, así como la estimación de los parámetros de segundo orden.

4.6 Cultivos en matraz

Los cultivos en matraz se llevaron a cabo a una temperatura de 28 °C, con agitación de los cultivos a 150 rpm en una incubadora (New Brunswick Scientific, Co). Todas las manipulaciones necesarias para la puesta en marcha de los cultivos se realizaron en una campana de flujo laminar, de tal forma se tuvieran condiciones estériles. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 y 500 mL de volumen nominal.

Esterilización

La esterilización de todo el material necesario para los cultivos llevados en matraces Erlenmeyer se realizó en una autoclave a 126 °C y 1.5 Kg/ cm², durante 15 minutos.

Inoculación

Para la preparación del inóculo, este se inoculó con una disolución de esporas con una concentración de 10×10^6 esporas/mL. (descrita en el apartado estandarización de inóculo). Para ello se empleó la siguiente proporción: 0,5 mL de esta disolución por cada 50 mL de medio, todas las manipulaciones se realizaron en condiciones de asépticas.

En la optimización de la formulación del medio de cultivo (vinazas + suero de leche), se inoculó a este, con un cultivo de 109 h de edad utilizando el medio de cultivo E. Mientras que para los cultivos que emplearon solamente suero de leche, ya sea en matraces o biorreactor, se empleó, como inóculo un cultivo de 41 h. Tanto en los cultivos de 109 h, como los de 41 h, se utilizó una cantidad del 10 % (v/v).

4.7 Operación del Biorreactor

Los cultivos llevados a cabo en el biorreactor tipo tanque agitado se realizaron en modo lote a partir de precultivos con 41 horas de edad. Se calibró la sonda de pH y se ajusta a 4.2, la temperatura también se ajusta a 25 °C, por otro lado, la velocidad de agitación, el flujo de aireación se ajustan de acuerdo al diseño experimental o condiciones de trabajo, una vez estables se calibra la sonda de oxígeno al 100 % de saturación y se procede a inocular. Para todos los experimentos se realizaron cultivos control con el mismo inóculo y medio en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio.

Esterilización

El biorreactor en conjunto, incluido el medio de cultivo y las sondas de pH y oxígeno disuelto se esterilizaron mediante autoclave a 115 °C y 1 Kg/ cm² durante 15 minutos. También se esterilizaron las gomas de silicona, tubos de adición, filtro de aire, etc. Una vez esterilizados, todas las manipulaciones se realizaron en la campana de flujo laminar.

Inoculación

Una vez enfriado el medio de cultivo y establecidas las condiciones de cultivo se procedió a inocular. Para ello se colocó la jarra en la campana de flujo laminar y se vertió el precultivo en el interior a través del orificio de inoculación. A continuación se volvió a colocar la jarra en el Sistema Applikon y se pone en funcionamiento.

Toma de muestra

El biorreactor está equipado con un sistema especial de toma de muestras que evita la contaminación consistente en un tubo en U, provisto de válvula de cierre y alojamiento de rosca en el que encaja el frasco receptor y pera de goma para succionar.

4.8 Métodos analíticos.

Determinación de biomasa por peso seco.

Un volumen de 5 mL de muestra se centrifugó a 3500 g por 10 minutos, el sobrenadante obtenido se almacenó para su posterior análisis, al sedimento (biomasa) se filtró utilizando papel Wattman No. 4 previamente pesado. Posteriormente se secó en una estufa a 100°C por 8 horas; por diferencia de pesos se obtuvo el peso del micelio. Al sobrenadante obtenido se le determinaron azúcares totales, azúcares reductores, proteína soluble total y actividad enzimática (Anexos A1, 2, 5 y 6) realizando una dilución apropiada para cada uno.

Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) en el biorreactor de 3 L.

Utilizando el método de sulfito de sodio se determinó el coeficiente de transferencia de oxígeno (Quintero, 1983). El oxígeno presente en el agua es abatido o eliminado por el sulfito. Se utilizaron diferentes condiciones de agitación y aeración y las determinaciones, se hicieron a una temperatura a 24 °C. El porcentaje de saturación del oxígeno disuelto se midió utilizando un electrodo galvánico. El porcentaje de saturación fue convertido a unidades de concentración considerando que en la Ciudad de México la máxima saturación de oxígeno en el agua a 28°C es de 6.76 ppm de acuerdo a Bailey y Ollis (1977). Los valores del coeficiente de transferencia de oxígeno se calcularon de manera tradicional a través de las pendientes obtenidas al graficar la concentración de oxígeno (C_L) en función del tiempo (t). Los valores referidos en el texto deberán entenderse como $(K_{La})_{\text{agua}}$ a las condiciones de agitación y aeración indicadas.

Las velocidades de transferencia de oxígeno (VTO) se calcularon a partir de los valores de K_{La} obtenidos, utilizando la ecuación:

$$VTO = (K_{La})_{\text{agua}} * (C^* - C_L)$$

Asumiendo que $C_L = 0$ y $C^* = 6.76 \text{ mg O}_2/\text{L}$

Donde: VTO = Velocidad de transferencia de oxígeno
 K_{La} = Coeficiente global de transferencia de oxígeno
 C_L = Concentración de oxígeno en el líquido

5 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Caracterización de las vinazas y suero de leche.

Se ha reportado que *Aspergillus niger* requiere de una buena fuente de carbono, nitrógeno y micro-minerales para su crecimiento y funcionamiento (Archer 2000; Ikram-UL *et al.*, 2004), por lo tanto, las vinazas, así como el suero fueron analizados para determinar su composición química y propiedades fisicoquímicas (Tabla 3). Se encontró que las vinazas y el suero de leche presentan características físicas similares. Por ejemplo, las vinazas tienen un pH ligeramente más ácido que el suero. Con respecto a la densidad y sólidos totales, el suero de leche presenta valores más elevados que las vinazas. Estos datos encontrados concuerdan con los datos reportados en la literatura (Kumar *et al.*, 1998; ICIDCA. 2000; Jelen 2003).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las vinazas y suero de leche. ND = No detectado, NA = No analizado.

Parámetro	Vinazas	Suero de leche	Método	Sensibilidad
	Cantidad	Cantidad		
Densidad (g/ml)	1.068±0.003	1.16±0.02	Picnómetro	-----
pH	4.48±0.06	4.5±0.02	Potenciómetro	-----
Sólidos totales (%)	8.49± 0.14	10.10± 0.04	Refractómetro	-----
DQO total (mg/L)	76,800	100,012	Reflujo cerrado	40 a 40 mg/L
Sulfatos (g/L)	5.25±0.22	ND	Turbidimétrico	5 a 25 ppm
Fosfatos (mg/L)	0.02±0.05	0.34±0.03	Ácido vanadomolibdo-fosfórico	1 a 5 mg/L
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	63.4±1.7	0.804±0.060	Indol-Fenol	10 a 400 □mg/L
Proteína total (mg/ml)	0.302±0.01	508.4±7.5	Bradford	0.1 a 1.4 mg/mL
Carbohidratos totales (%)	1.3±0.21	9.05±0.01	Fenol-Sulfúrico	10 a 100 µg/mL
Sacarosa	ND	NA	HPLC	---
Glucosa	ND	NA	HPLC	---
Hierro (mg/L)	1.20±0.04	NA	Espectrofotometría de masas	0.12 mg/L
Manganeso (mg/L)	20±1	NA	Espectrofotometría de masas	0.05 mg/L
Magnesio (mg/L)	0.520±.2	NA	Espectrofotometría de masas	0.007 mg/L

Por otro lado, en la composición química de ambos se nota una gran diferencia. Las vinazas presentan un alto contenido de sulfatos y amonio. Este alto contenido en sulfatos se atribuye al tratamiento de acidificación de la melaza con ácido sulfúrico cuando se lleva a cabo la fermentación alcohólica. El contenido de proteína total y azúcares totales en el suero fue de 508.4 mg/mL y 9.08 %, respectivamente, estos resultados son elevados en relación a las vinazas y concuerdan con lo reportado (Haroun *et al.*, 2003). Con los resultados de ambos sustratos se llegó a la conclusión que la fuente de carbono del medio de cultivo

sería suministrada por el suero de leche; la fuente de nitrógeno sería aportada por ambos mientras que, metales como magnesio y hierro, por las vinazas.

5.2 Estandarización del inóculo.

De acuerdo a lo sugerido (Papagianni *et al.*, 2006; Keith *et al.*, 1992), la concentración de esporas es un factor determinante para garantizar que el hongo *Aspergillus niger* presente una morfología micelial cuando se cultiva en un cultivo sumergido, independientemente de la composición del medio, así como de las condiciones ambientales y de operación. Por lo tanto se realizó la evaluación de medios de cultivo sólidos: agar agua (AW), agar papa-dextrosa (PDA) y agar papa-zanahoria (APC) (Bennett *et al.*, 1992), los cuales proporcionarán una concentración de 1×10^6 esporas/mL utilizando el menor número de placas. Para esto, fueron inoculadas con una suspensión de esporas, e incubadas a 28 °C, durante 120 h. El medio de cultivo PDA cumplió con la concentración de 1×10^6 esporas/mL, obteniéndose una concentración 536,250 esporas/mL por placa; es decir que con dos placas inoculadas se obtuvo la concentración deseada; por otro lado los medios de cultivo APC y AW, no cumplieron con tal criterio. Los resultados se muestran en la Tabla 4. De esta manera, el medio de cultivo PDA se utilizó para cultivar las esporas de *Aspergillus niger*, mas tarde se emplearon las esporas para la siguiente etapa del experimento, donde se evaluaron los medios de cultivo para el inóculo

Tabla 2. Resultados obtenidos de la evaluación de los medios de cultivo para esporulación del hongo *Aspergillus niger*, a 28 °C por 7 días de incubación.

Medio de cultivo	Esporas de dos placas (núm. esporas/ mL)
Agar dextrosa-papa (PDA)	536,250
Agar papa-zanahoria (APC)	400,300
Agar agua (AW)	1080

Se consideró conveniente establecer una edad de inóculo, debido a que se ha demostrado en diferentes especies que la edad del inóculo influye significativamente en el crecimiento, la productividad y la reproducibilidad de los procesos de cultivo (Hornbæk *et al.*, 2004). De esta manera, la prolongación de fase de adaptación está en función del tamaño de inóculo y de la edad; así como de los cambios en la composición y concentración de los nutrientes que experimenten las células. Por lo anterior la prolongación del tiempo de fase de adaptación tiene un efecto directo en el rendimiento y productividad, afectando directamente la economía del proceso. Se evaluaron dos medios de cultivo (D y E) que permitieran obtener una cantidad de inóculo (concentración de biomasa) arriba de 1 g/L en el menor tiempo posible. Estos resultados se muestran en la Figura 5.

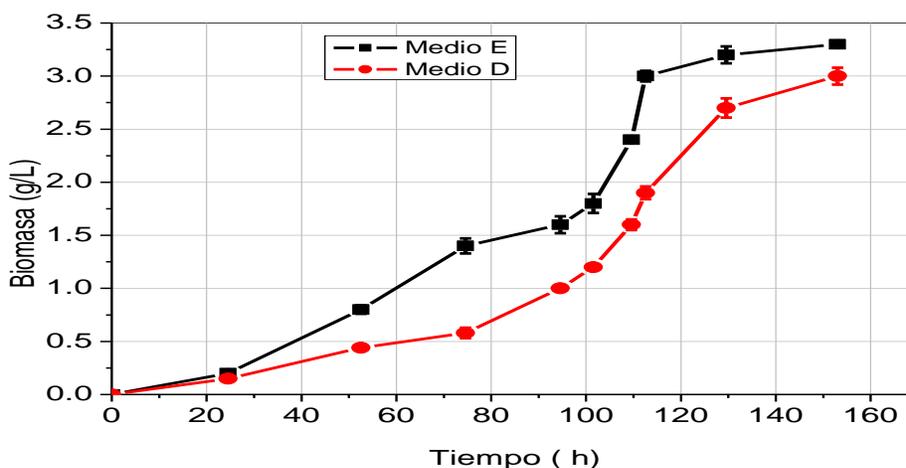


Figura 3. Cinética de crecimiento de *Aspergillus niger*, en los medios de cultivo D (●) y E (■) para inóculo.

En esta gráfica se muestra la evolución del crecimiento de *Aspergillus niger* en ambos medios de cultivo. En el medio D se prolonga mucho más tiempo la fase de adaptación en relación a la del medio E, en este último se pudo visualizar que es mucho más corta esta fase, por lo tanto se obtiene una tasa de crecimiento lineal de 0.07 h^{-1} . Dado que la edad del inóculo va a influir en el tiempo de adaptación del microorganismo (fase Lag) en el medio fresco, entonces la edad que se tomó para inocular los medios de cultivo, para la optimización de los diferentes volúmenes (mL) de vinazas y suero del medio de cultivo fue de 109 h, utilizando una cantidad del 10 % v/v. Por otro lado, la morfología del hongo desarrollada en estos medios (D y E), fue otro parámetro importante para discernir entre cual medio utilizar. En el medio E *Aspergillus niger* presentó la característica miceliar o crecimiento filamentoso, por lo que este medio de cultivo se utilizó para la siguiente etapa experimental. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 3. Resultados obtenidos de la evaluación de los medios de cultivo para inóculo.

Medio de cultivo	Morfología del hongo	Edad de inóculo (h)	Tasa de crecimiento lineal (h^{-1})
D	Pellets	121	0.05
E	Micelio	109	0.07

5.3 Optimización del medio de cultivo mediante un diseño de superficie de respuesta.

Para la optimización de la formulación del medio de cultivo se utilizó un diseño compuesto central ortogonal empleando cinco niveles de cada factor ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$) (Tabla 6), teniendo como variables independientes las vinazas y suero de leche y como variables dependientes la concentración de biomasa y proteína soluble total. Este diseño contempló 12 tratamientos, de los cuales 4 (2^2) corresponden a la parte factorial, 4 tratamientos son centrales y 4 tratamientos son axiales.

Tabla 4. Niveles de vinazas y suero de leche

Nivel	Vinazas		Suero de Leche	
	Proporción	mL	Proporción	mL
$-\alpha$	1.21	8	1.21	170
-1	5	10	85	171
0	10	20	90	180
+1	15	11	95	190
$+\alpha$	1.21	30	1.12	192

Tabla 5. Matriz del Diseño Compuesto Central Ortogonal a utilizar en la formulación del medio de cultivo y respuestas obtenidas de biomasa y proteína a las 165 h de cultivo.

Tratamiento	Suero de leche (mL)	Vinazas (mL)	Biomasa (g/L)	Proteína soluble (mg/L)
1	189	11	3.0	159.3
2	190	10	2.2	111.2
3	170	30	2.8	97.2
4	173	27	2.4	94.0
5	179	21	2.2	111.2
6	181	19	2.0	107.0
7	192	8	2.2	97.0
8	171	29	2.4	96.2
9	180	20	2.4	102.6
10	180	20	2.2	57.2
11	180	20	2.2	77.0
12	180	20	2.0	94.0

A partir del diseño de la Tabla 7, la siguiente fase fue realizar los cultivos utilizando matraces de 500 mL con 200 mL de medio de cultivo (volumen total); estos fueron inoculados con el 10 % (v/v) de inóculo con una edad de 109 h (Medio E), e incubados a 28 °C por 165 horas, con agitación constante a 150 rpm. Cabe señalar que en todos los cultivos, el crecimiento de *Aspergillus niger* fue elongación apical en forma filamentosa obteniéndose cultivos altamente viscosos.

En la Tabla A.10 (Anexo A.10) se presentan los promedios de 3 muestras de las cinéticas de biomasa, consumo de carbohidratos, degradación y producción de proteína y valores de pH de las muestras, procesadas a diferentes tiempos de cultivo. A continuación se discuten los resultados de las diferentes cinéticas y se muestran los datos en forma gráfica.

En los 4 tratamientos factoriales, la fase de adaptación se prolonga para todos los tratamientos hasta las 50 h, pero en el tratamiento 1, se presenta primero una fase de crecimiento lineal, obteniéndose la concentración más alta de biomasa al final de 3.0 g/L, esto no sucede con los demás tratamientos. En el tratamiento 3 también se obtuvo una concentración de biomasa de 2.8 g/L, esto se presenta en la Figura 6. Otros autores (Oshoma *et al.*, 2005) empleando como medio de cultivo fibra de arroz, reportan una máxima concentración de biomasa de 2 g/L entre el día 6 y 7, y concluyen que este medio de cultivo es viable para producir proteína unicelular, por lo tanto la combinación de vinazas y suero de leche podría ser un sustrato para producir proteína unicelular como alimento para animales.

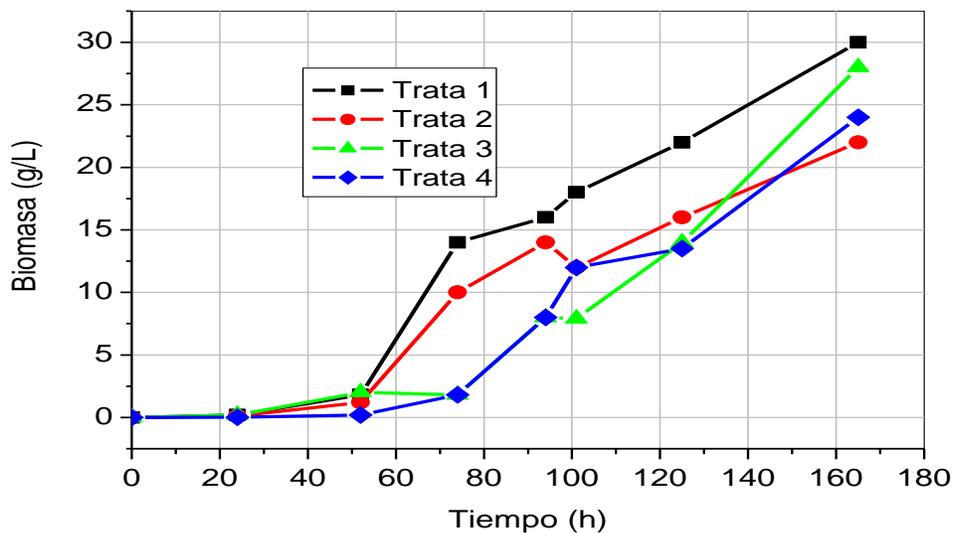


Figura 4. Cinéticas de crecimiento en los tratamientos factoriales. ■ (189mL V, 11mL S.L.), ● (190mL V, 10mL S.L.), ▲ (170mL V, 30mLS.L.), ◆ (173mL V, 27mL S.L.). V = vinazas, S.L. = Suero de leche.

El consumo de carbohidratos en los tratamientos 3 y 4 fue de 12.58 y 12.8 g/L, respectivamente. Este consumo mayor de la fuente de carbono, se justifica con la mayor concentración de biomasa obtenida en el tratamiento 3; mientras que en el tratamiento 4 pudo deberse a que en la fase Lag, la fuente de carbono fue consumida para producción de CO₂ o ácidos orgánicos. Por otro lado en el tratamiento 1, el consumo de fuente de carbono fue mucho menor (Figura 7). Este comportamiento se debe a que la fase de crecimiento lineal se alcanza mucho más rápido, dado a que en esta etapa, la división celular es mucho más activa,

entonces se obtiene mayor número de células. Por lo tanto, el resultado al término del cultivo es una mayor concentración de masa celular (Figura 6).

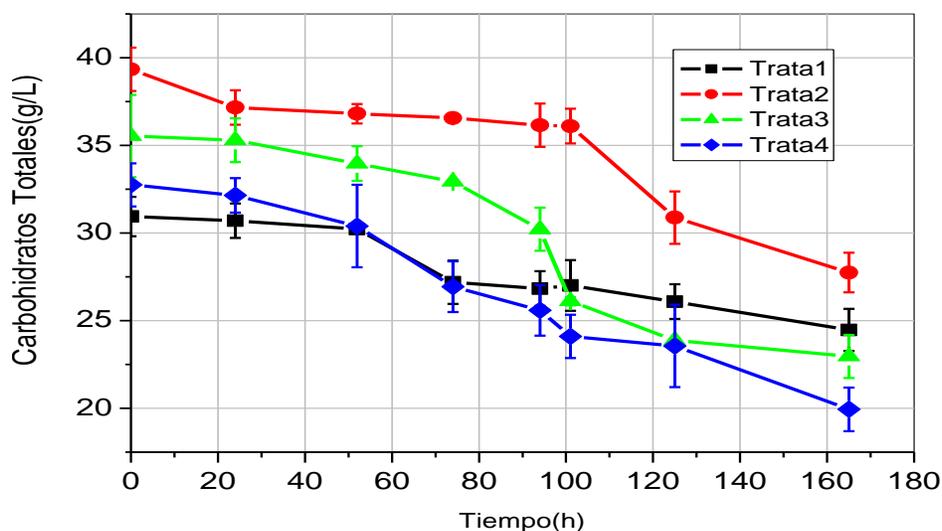


Figura 5. Cinéticas de consumo de azúcares en los tratamientos factoriales. ■ (189mL V, 11mL S.L.), ● (190mL V, 10mL S.L.), ▲ (170mL V, 30mLS.L.), ◆ (173mL V, 27mL S.L.). V = vinazas, S.L. = Suero de leche.

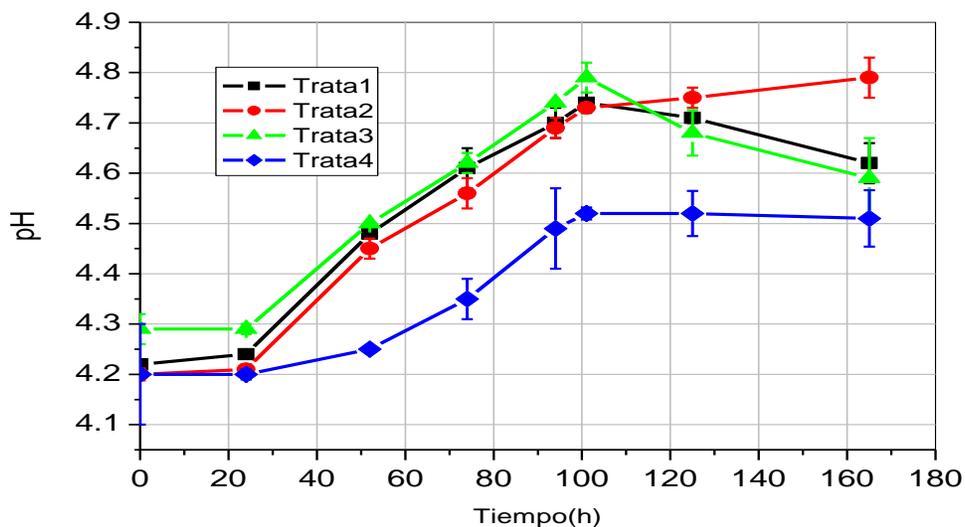


Figura 6. Comportamiento del pH durante el cultivo en los tratamientos factoriales. ■ (189mL V, 11mL S.L.), ● (190mL V, 10mL S.L.), ▲ (170mL V, 30mLS.L.), ◆ (173mL V, 27mL S.L.). V = vinazas, S.L. = Suero de leche.

Por otra parte, el pH después de las 25 horas de haberse iniciado el cultivo, tiende a incrementarse linealmente en los tratamientos 1, 3 y 4, obteniéndose un máximo valor de pH de 4.75, en todos los tratamientos, a las 100 h

aproximadamente, mientras que en el tratamiento 2 siguió incrementándose hasta terminado el cultivo. Por otro lado, el tratamiento 4 después de las 100 h se tuvo un valor constante de 4.7 unidades hasta el término del cultivo, esto no sucede en los tratamientos 1 y 3 donde el pH tiende a disminuir hasta 4.6. Esta caída del pH se le atribuye a la excreción al medio de ácidos orgánicos (Santoro *et al.*, 1999; Murad *et al.*, 2003; Mukhopadhyay *et al.*, 2005) (Figura 8).

Con respecto a los perfiles de proteína en la parte factorial se observan dos comportamientos. Primero se presenta una etapa de degradación al inicio del cultivo, esta degradación se debe a que las células no tienen la suficiente fuente de nitrógeno o no está biodisponible en el medio, por lo que *Aspergillus niger* excreta proteasas (Carlile *et al.*, 1994) para proteólisis de las proteínas presentes en el suero de leche y de esta manera obtiene el nitrógeno para su metabolismo. De ahí que la fase de adaptación de 50 h en las cinéticas de crecimiento tan prolongada. Se alcanzaron concentraciones mínimas en el tratamiento 2 a las 72 h, mientras que para el tratamiento 1, 3 y 4 la concentración mínima se da en el intervalo de 90 a 100 h de cultivo. Segundo, se presenta una etapa de síntesis proteica; el tratamiento 1 fue el que registró el valor máximo de 159.8 mg/L (Figura 9).

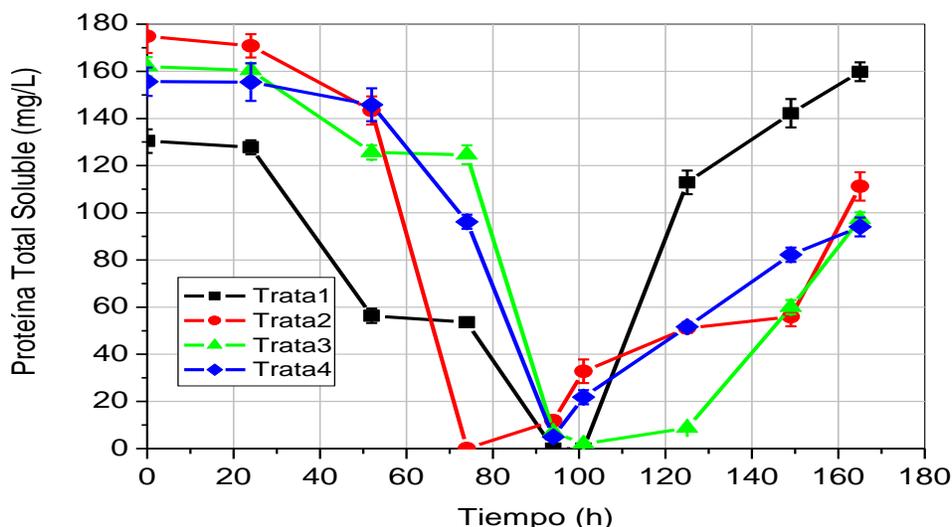


Figura 7. Cinéticas de degradación y producción de proteína total en los tratamientos factoriales. ■ (189mL V, 11mL S.L.), ● (190mL V, 10mL S.L.), ▲ (170mL V, 30mLS.L.), ◆ (173mL V, 27mL S.L.). V = vinazas, S.L. = Suero de leche.

En los tratamientos axiales, la fase de adaptación de las cinéticas de biomasa, fue similar para los 4 tratamientos hasta las 50 h. Después de este periodo, el aumento de la biomasa siguió un comportamiento lineal en todos los casos, alcanzándose una concentración máxima en el tratamiento 8 de 2.4 g/L. La variabilidad de la biomasa obtenida en los 4 tratamientos, es menor comparada con la de los tratamientos factoriales. Por otro lado, el mayor consumo de carbohidratos se presentó en los tratamientos 6 y 8, consumiéndose un total de 23.25 y 25.75 g/L, respectivamente. Comparando estos resultados con los obtenidos en todos los tratamientos factoriales (consumo mayor 12.8 g/L); hubo un consumo de carbohidratos del doble en estos tratamientos axiales con respecto al tratamiento factorial 4 (Figura 10).

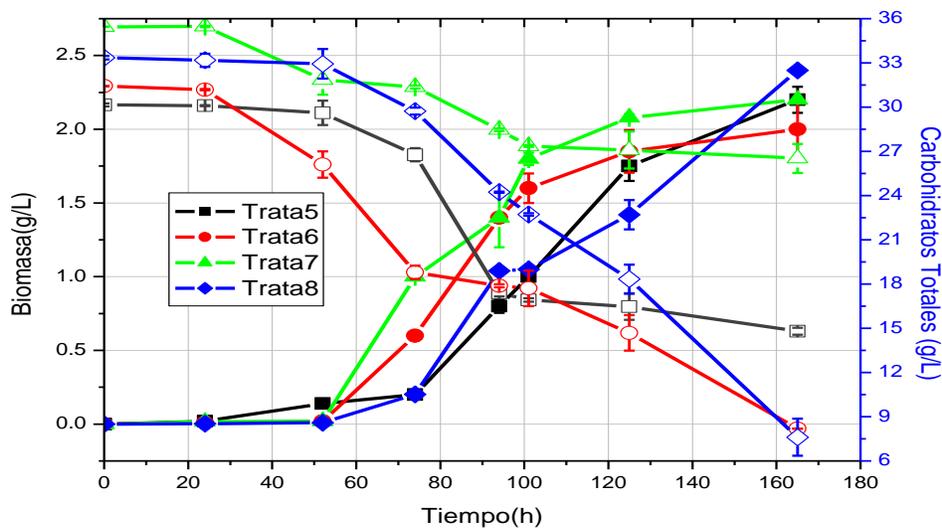


Figura 8. Cinéticas de crecimiento (símbolos sólidos) y consumo de carbohidratos (símbolos vacíos) de los tratamientos axiales. ■ (179mL V, 21mL S.L.) ● (181mL V, 19mL S.L.), ▲ (192mL V, 8mLS.L.), ◆ (171mL V, 29mL S.L.). V = vinazas, S.L. = Suero de leche.

El pH en los tratamientos axiales 5, 6 y 7 antes de las 25 h permanecieron constantes, después se presentó un incremento hasta alcanzar un valor máximo de 4.6 en 5 y 6, mientras que en 8 fue de 4.81, aproximadamente a las 100 h de cultivo, después en todos se presentó un ligero descenso hasta el término del cultivo; por otro lado en el tratamiento 8, el comportamiento es similar a los tres tratamientos anteriores hasta las 25 h, pero después el pH se incrementa gradualmente hasta el término del cultivo con un valor de aproximadamente 4.89. Esta variabilidad, pudo deberse a que en estos puntos se presenta la mayor incertidumbre, en cuanto a las proporciones o volúmenes utilizados de ambos sustratos (Figura 11).

Con respecto a la producción de proteína, el comportamiento es bastante similar a los tratamientos factoriales degradación y síntesis. Se alcanzaron valores mínimos en el intervalo de 70 a 110 h. Las fluctuaciones que se presentan pueden deberse a que se da simultáneamente la síntesis y degradación de proteínas (Figura 12).

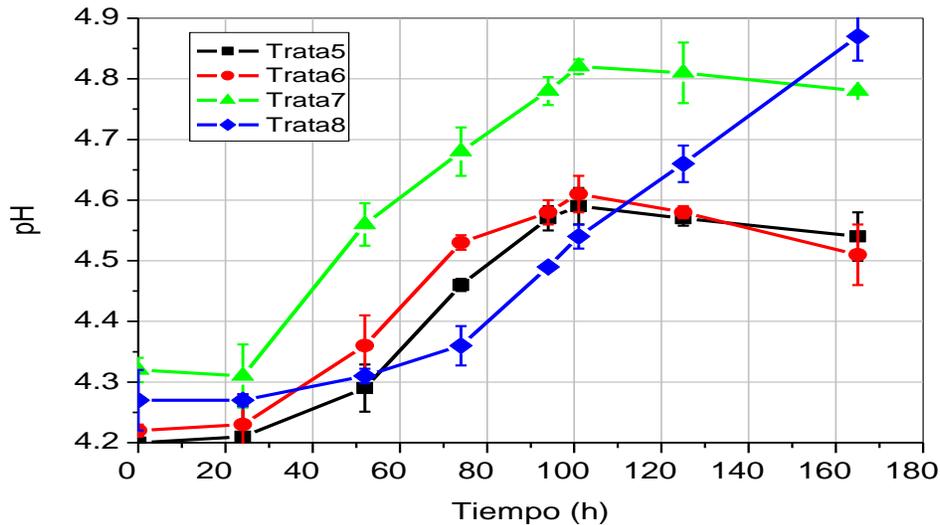


Figura 9. Comportamiento del pH durante el cultivo en los tratamientos axiales. ■ (179mL V, 21mL S.L. ● (181mL V, 19mL S.L.), ▲ (192mL V, 8mLS.L.), ◆ (171mL V, 29mL S.L.). V = vinazas, S.L. = Suero de leche.

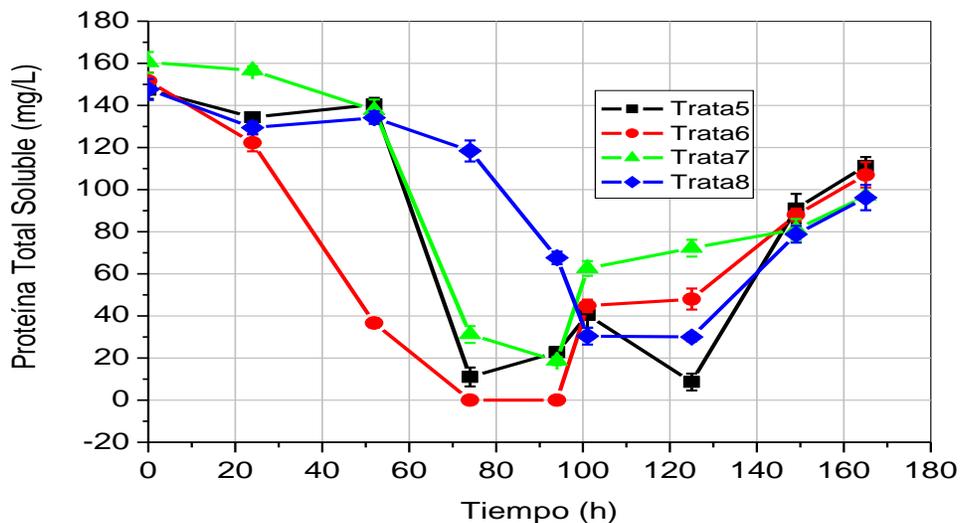


Figura 10. Cinéticas de degradación y producción de proteína en los tratamientos axiales. ■ (179mL V, 21mL S.L. ● (181mL V, 19mL S.L.), ▲ (192mL V, 8mLS.L.), ◆ (171mL V, 29mL S.L.). V = vinazas, S.L. = Suero de leche.

Por último, en los cuatro tratamientos centrales dado que en estos tratamientos el volumen de las vinazas (20mL) y suero de leche (180mL) es el mismo en los 4 tratamientos, los comportamientos de producción de biomasa y consumo de carbohidratos siguen un patrón similar, teniendo una producción y un consumo en promedio de 2.3g/L y 20g/L, respectivamente (Figura 13); lo mismo sucede con el pH (Figura 14).

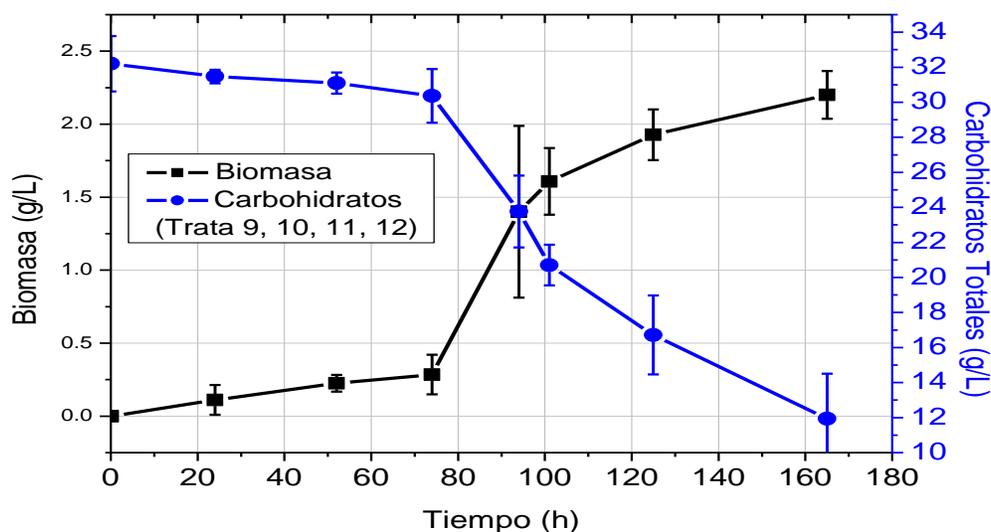


Figura 11. Cinéticas de crecimiento (■) y consumos de carbohidratos (●) en los tratamientos centrales (180mL suero de leche, 20mL vinazas).

La degradación y síntesis proteica en estos tratamientos es bastante parecida a la observada en los tratamientos factoriales y axiales, presentándose valores mínimos en el intervalo de tiempo de 70 a 100 horas; cabe mencionar que en los 12 tratamientos la concentración de proteína final nunca rebasa la concentración inicial en 4.52 (Figura 14). Con respecto al pH, en los 12 tratamientos se mantuvo en un intervalo de 4.5 a 4.9 unidades. El pH extracelular o del medio ha sido reportado que influye en la producción de ácidos como: la inducción de ácido cítrico a pH bajos, ácido oxálico y glucónico entre pH 5 a 6 (Ruijter *et al.*, 2002). Estos antecedentes sustentan las caídas de pH a las 100 h en todos los tratamientos (excepto 2 y 8).

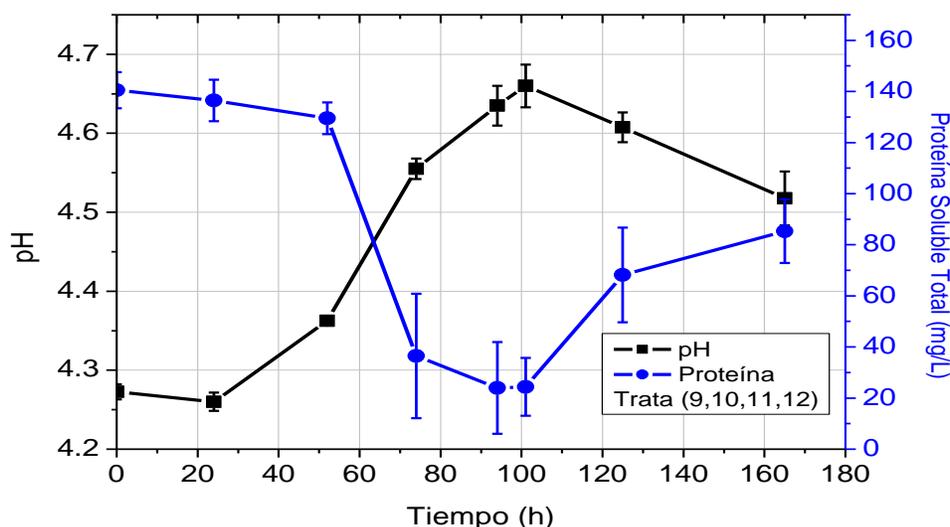


Figura 12. Comportamiento del pH (■) y cinéticas de degradación y síntesis de proteínas (●) en los tratamientos centrales (180mL suero de leche, 20mL vinazas).

En general, en todos los tratamientos se tiene una fase de adaptación del inóculo en promedio de 60 horas, esto se debe a factores como la disponibilidad de la fuente de nitrógeno, composición del medio, transferencia de oxígeno, los cuales al final del cultivo se vieron reflejados en rendimientos (Y_x/s), productividades volumétricas y velocidades específicas de crecimiento (μ) globales. Obteniéndose valores el orden de 0.095 a 0.46 $g_{células}/g_{sustrato}$, 0.013 a 0.018 $g_{células}/L \cdot h$ y 0.012 a 0.032 h^{-1} , respectivamente (Tabla 8). La presencia de metales en el medio de cultivo como Mn, Cu, Fe Zn, Mo y Zn, estudios realizados por diversos autores (Ali *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2005; Antonucci *et al.*, 2001; Bortles, 1986), la concentración de estos micronutrientes juega un papel importante cuando se cultiva *Aspergillus niger* en presencia de estos. Por lo tanto, eliminar las vinazas medio de cultivo, es una manera de poder mejorar los rendimientos y productividades del proceso, para que este sea técnicamente viable.

Tabla 6. Parámetros cinéticos del cultivo de *Aspergillus niger*, empleando diferentes volúmenes de vinazas y suero de leche.

Tratamiento	$\mu(h^{-1})$	Y(g células/sustrato)	Qx (gcélulas/L*h)
1	0.018	0.46	0.018
2	0.012	0.19	0.013
3	0.028	0.22	0.016
4	0.022	0.18	0.014
5	0.022	0.12	0.013
6	0.026	0.11	0.012
7	0.028	0.22	0.013
8	0.021	0.09	0.014
9	Valor promedio	0.032	0.11
10			
11			
12			

Con los resultados presentados en la Tabla 7, se planteó la posibilidad de que se hubiese alcanzado o se estuviese muy próximo a un punto estacionario de pendiente cero. Por este motivo, se hizo necesario caracterizar la superficie de respuesta en la vecindad inmediata de este punto estacionario utilizando la ecuación canónica. Esta última es una ecuación de segundo orden que describe el modelo matemático trasladado a un nuevo sistema de coordenadas, con el origen en el punto estacionario rotando los ejes del sistema hasta que fuesen paralelos a los ejes principales de la superficie de respuesta ajustada. Este análisis, permitió determinar si el punto estacionario era un punto de respuesta máxima, mínima o punto silla de montar. La naturaleza de la superficie de respuesta puede determinarse a partir del punto estacionario, del signo y de la magnitud de los coeficientes en la ecuación. Los valores propios obtenidos para ambas respuestas fueron positivos, indicando que se trataba de una respuesta mínima (Tabla 9). Además, esto se puede visualizar de forma gráfica en las Figuras 15 y 16. En ambas respuestas, tanto los puntos experimentales (puntos), como el modelo matemático (sabana), la tendencia indica que se trata de una respuesta mínima para ambas respuestas. Asimismo los valores propios (0.242 y 22.86) de biomasa como de proteína, están asociados con vectores propios (0.951 y 0.896) del factor suero de leche. El signo positivo de estos dos vectores, indica que el factor estuvo en cascada ascendente en relación a las respuestas estudiadas (Tabla 9). Es decir, que cuando se aumentaba el volumen del suero ambas respuestas se maximizaban.

Tabla 7. Resultados del análisis canónico (vectores propios y valores propios) para las respuestas de biomasa y proteína

Respuesta	Valores propios	Vectores propios	
		Suero de leche	Vinazas
Biomasa	0.242	0.951	-0.311
	0.073	0.311	0.951
Proteína	22.86	0.896	0.444
	8.76	-0.444	0.896

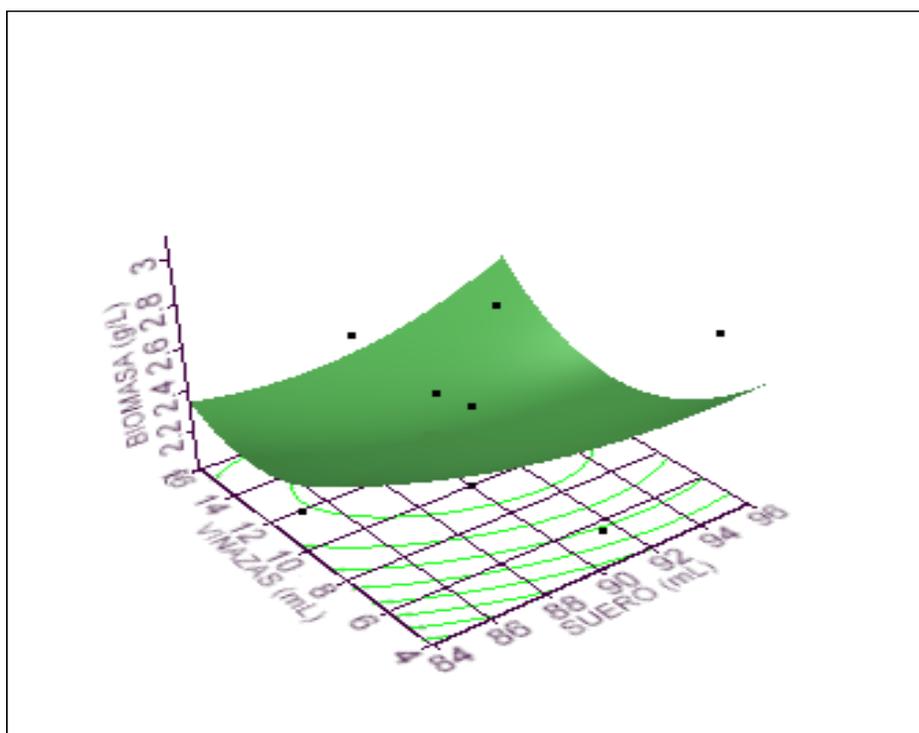


Figura 13. Superficie de respuesta de biomasa en función de las vinazas y suero de leche.

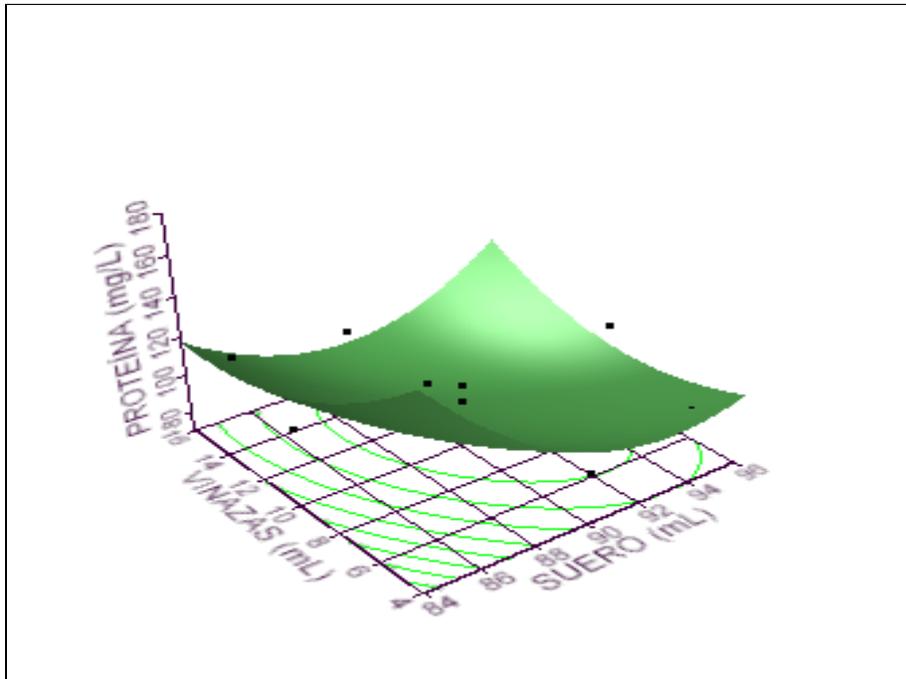


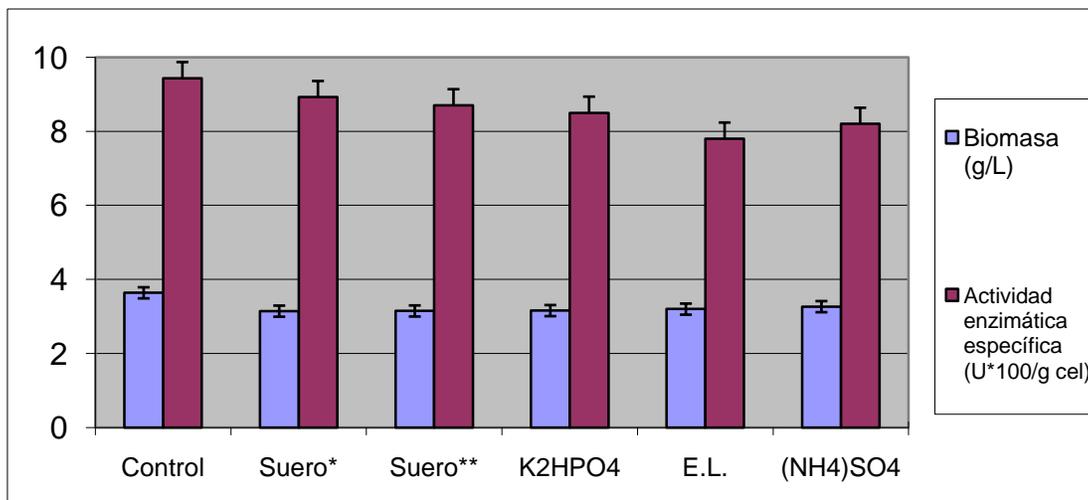
Figura 14. Superficie de respuesta de la concentración de proteína en función de las vinazas y suero de leche.

5.4 Efecto de la suplementación y la supresión de elementos

De acuerdo a la literatura, esta reporta en el suero de leche la presencia de vitaminas, tales como: tiamina, ácido pantotéico, riboflavina, entre otros; también la presencia de factores de crecimiento como: fosfatidil colina y etanolamina; microelementos (Mg, Ca, P, Na y K); así como carbohidratos (lactosa y ácido láctico) y proteínas (Kononovich, 1979; Schultz *et al.*, 2006). Con la finalidad de probar si el suero de leche provee los elementos mencionados, o bien, si estos son eliminados o desnaturalizados después del tratamiento térmico al que es sometido el suero de leche. Se preparó un medio de cultivo a partir de suero de leche suplementado con extracto de levadura, NH_4SO_4 , y KH_2PO_4 . Estos ensayos fueron realizados por duplicado, transcurrido el tiempo de cultivo de 96 h se tomaron muestras del cultivo con el objetivo de evaluar la biomasa generada y la actividad del enzima β -galactosidasa. Como control se utilizó el medio E descrito en materiales y métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17 e indican que en relación a los parámetros evaluados biomasa producida y la actividad enzimática de la β -galactosidasa, no hay diferencias significativas, entre el suero sin complementar (biomasa 3.15 g/L y 870 U/gcélulas) y suero complementado (biomasa 3.14 g/L y actividad enzimática 892 U/gcélulas). La adición de los tres componentes al suero de leche provee a este una cantidad no limitante, es decir que no hay necesidad de complementación, por lo que estos pueden ser suprimidos. Saad, 2004 mostró en sus experimentos el mismo fenómeno e

incluso se registraron actividades menores de la β -galactosidasa empleando otras especies de *Aspergillus*. Por lo tanto, el suero de leche puede ser utilizado por si solo para realizar los cultivos subsecuentes.



Suero* = con todos los elementos, Suero**= sin ningún elemento, E. L. = Extracto de levadura

Figura 15. Efecto de la adición y supresión al suero de elementos en la producción de biomasa y la actividad enzimática de β -galactosidasa.

Evaluación del suero de leche como medio de cultivo para inóculo.

En el presente estudio se decidió evaluar el suero de leche como medio de cultivo para inóculo, esperando minimizar la fase de adaptación en los cultivos de producción a nivel de matraz y biorreactor, y del mismo modo tratar de reducir tiempo y costos al momento de utilizar el medio E antes evaluado.

Con base en lo establecido, se consideró conveniente estudiar el efecto de la edad y la cantidad del inóculo micelial sobre la actividad de la β -galactosidasa en matraces. De acuerdo con el perfil de crecimiento observado en experimentos anteriores (Figura 18), se decidió probar cultivos con tres diferentes edades: 24 h (inicio de la fase lineal), 41 h (fase intermedia lineal) y 65 h (término de la fase lineal). En cada una de estas edades se probaron 2 proporciones 5 y 10 %, inoculando matraces de 500 mL, con 180 mL y 190 mL de suero acondicionado, e incubados a 28 °C, con agitación constante de 150 rpm, por un periodo de cultivo de 72 h.

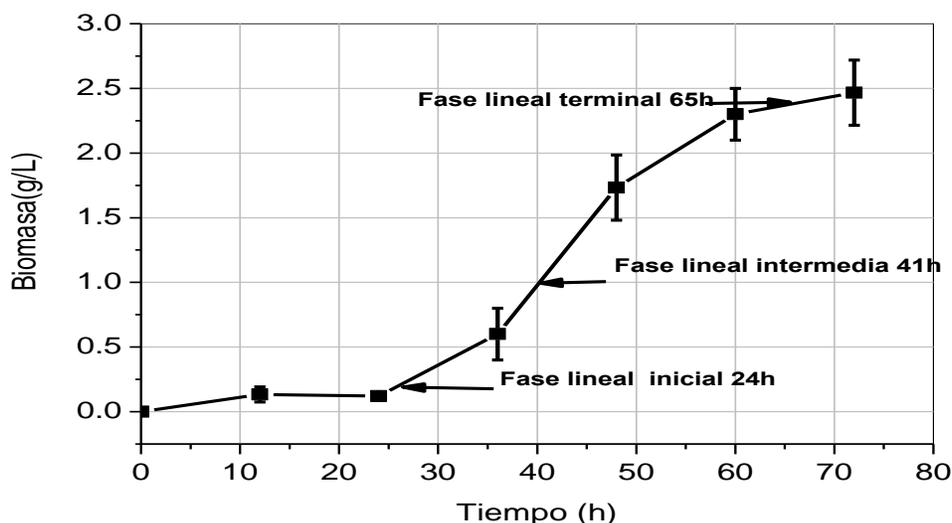


Figura 16. Cinética de crecimiento de *Aspergillus niger* en suero de leche acondicionado, inoculado con una solución de esporas 1×10^6 esporas / mL.

Los inóculos de 24 y 65 h, con una concentración de 5% v/v mostraron una fase de adaptación mucho más prolongada, comparada con la concentración de 10 % v/v. Con un 10 % se alcanzó una actividad de 200 U/g_{células} antes de las 40 h, mientras que con 5 % v/v sucedió a las 50 h de cultivo. Ambos inóculos presentan un retraso en la aparición de la actividad; la máxima actividad enzimática registrada fue de 800 U/g_{células} y esta se presentó al término del cultivo, en ambas concentraciones (5 y 10 % v/v). Este hecho se atribuye, por un lado, a que el inóculo de 24 h no se encuentra en la etapa más activa de división celular y por el otro lado, a que el inóculo de 72 h ya que estaba cerca de la fase estacionaria donde la mayoría de las células no se encuentran en un estado viable. En ambos casos se presenta un efecto de retraso en la producción de biomasa. Lo anterior conlleva a tener un efecto directo en la producción de la β -galactosidasa y su actividad enzimática. Con respecto al inóculo de 41 h, utilizando la cantidad de 10 % v/v aproximadamente, a las 25 h se registra una actividad de 200 U/g_{células}, después se muestra un incremento gradual de la actividad, hasta el término del cultivo, obteniéndose una actividad de 1100 U/g_{células}. Por otro lado, empleando un 5 % v/v de inóculo se registró una actividad de 200 U/g_{células} a las 27 h, aunque la actividad sigue aumentando hasta las 60 h, registrándose un valor máximo de 1000 U/g_{células}. Sin embargo, con el 10 % de inóculo, según la tendencia del gráfico la actividad, sigue incrementándose después de las 72 h de cultivo. (Figuras 19 y 20). Por otro lado, las velocidades específicas de crecimiento (μ) de los diferentes cultivos muestran (Tabla 10) que el valor máximo obtenido fue de 0.054 h^{-1} con un tiempo de duplicación de 12.83 h, cuando se utilizó la cantidad del 10 % y una edad del 41 h. Por lo tanto, para llevar a cabo todas las corridas, tanto a nivel matraz, como biorreactor, se utilizó una cantidad de inóculo del 10 % (v/v), con una edad del 41 h.

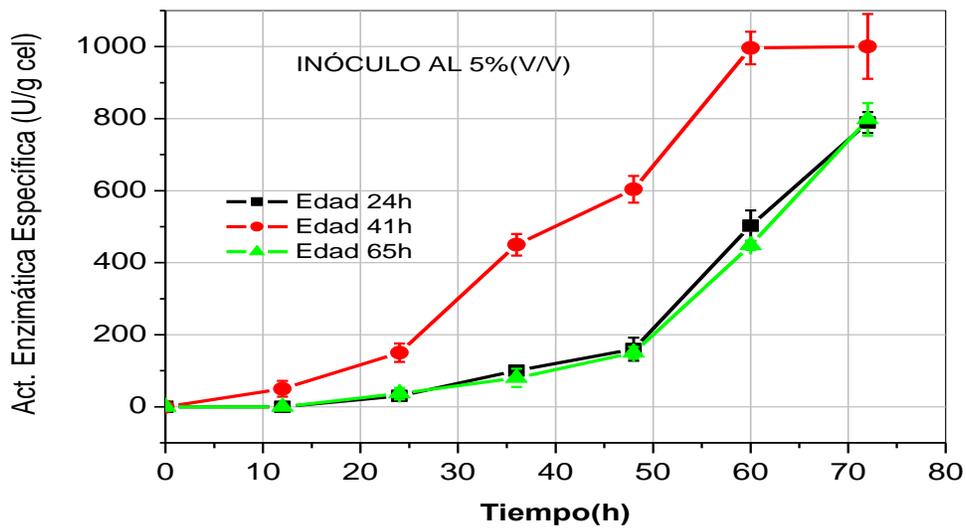


Figura 17. Efecto de la edad y proporción del inóculo sobre la actividad de la β -galactosidasa. Empleando precultivos con edades de: 24h (■), 41 h (●) y 65 h (▲), a una concentración del 5 % (v/v).

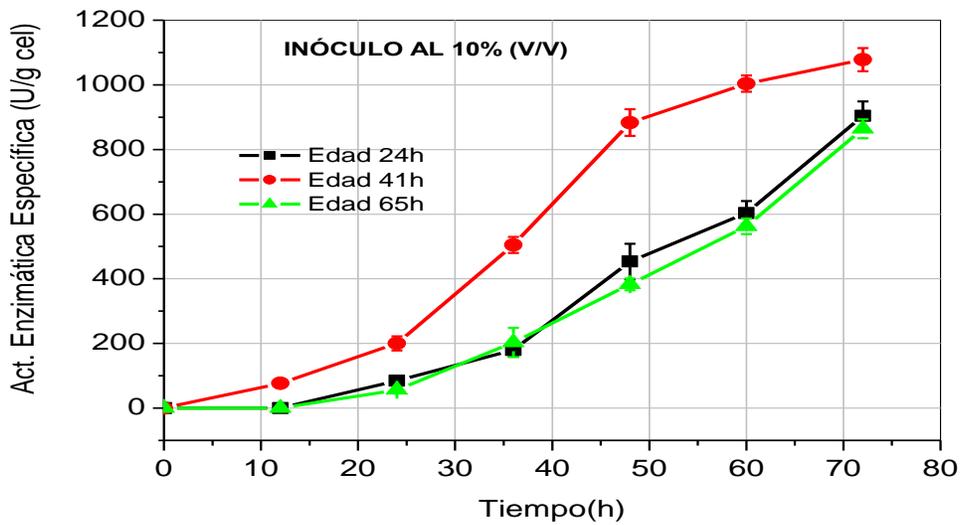


Figura 18. Efecto de la edad y concentración de inóculo sobre la actividad de la β -galactosidasa. Empleando precultivos con edades de: 24h (■), 41 h (●) y 65 h (▲), a una concentración del 10 % (v/v).

Tabla 8. Parámetros cinéticos de *Aspergillus niger* de los cultivos para inóculo.

% Inóculo	Edad (h)	μ (h ⁻¹)	t _d (h)
5	24	0.042±0.002	16.55±1.0
5	41	0.039±0.001	17.77±0.8
5	65	0.021±0.001	33.00±0.9
10	24	0.045±0.002	15.40±1.2
10	41	0.054±0.003	12.83±0.7
10	65	0.034±0.004	20.38±1.4

5.5 Establecimiento de las condiciones de cultivo óptimas a nivel de matraces utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta.

Muchos autores han establecido la importancia de los factores como pH, temperatura, velocidad de agitación y tiempo de fermentación en la producción de la enzima β -galactosidasa (Furlan *et al.*, 2002, 2001; Fekete *et al.*, 2002; Rajoka *et al.*, 2003; Hus *et al.*, 2005; Konsoula *et al.*, 2007; Dagbagli *et al.*, 2008). De esta manera el diseño consistió en 20 experimentos que contenían 6 réplicas del punto central, 6 puntos axiales y 8 puntos factoriales. Los factores en estudio fueron temperatura, velocidad de agitación y tiempo de cultivo. Los niveles y resultados experimentales se presentan en la Tabla 11 y 12.

Tabla 9. Niveles de temperatura, velocidad de agitación y tiempo de cultivo para establecer las condiciones óptimas a nivel de matraces.

Nivel	Temperatura (°C)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de cultivo (h)
- α	23	74	72
-1	25	100	80
0	28	150	95
+1	31	200	110
+ α	33	226	117

Los 20 experimentos fueron realizados en un solo bloque con el fin de permitir el análisis de la influencia de tres factores sobre las tres respuestas: concentración de biomasa, concentración de proteína soluble y la actividad enzimática específica. Matraces de 250 mL con 45 mL de suero de leche acondicionado fueron inoculados con 5 mL de inóculo con una edad de 41 h. El intervalo de biomasa generada estuvo entre 2.01 y 3.81 g/L, la concentración de proteína se encontró entre 5.56 y 14.89 mg/L y la actividad enzimática específica se registró de entre 655 y 1523 U/g_{células}. *Aspergillus niger* mostró la más alta actividad específica (1523 U/g_{células}) en el tratamiento 12, cuando las condiciones fueron 28°C, 226 rpm y 96 horas. Con un rendimiento y productividades volumétricas de biomasa y producto de 0.47 g_{células}/g_{sustrato}, 58.51U/L*h, 0.038g_{células}/L*h, respectivamente (Tabla 15). La temperatura óptima de 28°C hallada en este

estudio concuerda con estudios realizados (Revender *et al.*, 2006) con *Aspergillus oryzae* cultivado en grano de arroz.

Tabla 10. Valores de biomasa, proteína y actividad enzimática de los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Factores			Respuestas		
	Temperatura (°C)	Vel. de agitación (rpm)	Tiempo de cultivo (h)	Biomasa (g/L)	Proteína (mg/L)	Actividad Enzimática (U/g _{células} ·)
1	25	100	80	2.1	12.04	1250.0
2	25	200	110	3.6	7.29	754.0
3	31	100	110	2.2	5.56	655.0
4	31	200	80	3.3	12.52	1260.0
5	25	100	110	3.6	6.64	698.0
6	25	200	80	3.8	14.89	1010.0
7	31	100	80	2.2	8.64	1250.0
8	31	200	110	3.3	7.12	714.0
9	23	150	95	2.8	10.97	1018.1
10	33	150	95	2.1	8.42	908.1
11	28	74	95	2.0	5.68	987.2
12	28	226	95	3.6	13.88	1523.0
13	28	150	72	2.7	14.51	1200.2
14	28	150	117	3.4	6.12	600.0
15	28	150	95	3.5	11.45	1110.2
16	28	150	95	3.0	11.35	1115.0
17	28	150	95	2.9	11.52	1112.0
18	28	150	95	3.0	11.29	1110.8
19	28	150	95	3.3	11.49	1111.9
20	28	150	95	3.1	11.40	1114.8

En la Figura 21 se representa el gráfico de Pareto. Este tipo de gráfico permite estudiar la influencia de las variables sobre la respuesta (concentración de biomasa, proteína y actividad enzimática) y las interacciones entre ellas. Es importante aclarar que el signo que presentan los coeficientes determinan la forma como la variable influye en el sistema y da una idea de la dirección a seguir en los experimentos siguientes para ubicar el óptimo. Un signo positivo para una variable determinada, indica que debe incrementarse esta variable para que la respuesta pueda maximizarse, del mismo modo un signo negativo indica que la variable debe disminuirse para maximizar la respuesta. El valor absoluto da una idea de la magnitud del cambio que hay que hacer en el valor de la variable (temperatura, velocidad de agitación o tiempo de cultivo) y de su efecto sobre la respuesta.

En este contexto, el gráfico de Pareto sugiere que la temperatura debe ser disminuida en 3.27 unidades para aumentar la concentración de biomasa, por otro lado la velocidad de agitación debe ser incrementada en 6.66 unidades para obtener una mayor concentración de biomasa. Este último parámetro, está relacionado con potencia volumétrica específica (P/V) la cual afecta de manera directa la velocidad de transferencia de oxígeno, conforme se aumenta la velocidad de agitación se transfiere mayor energía al medio de cultivo y se incrementa la transferencia de oxígeno, siempre y cuando no se rebase la viscosidad crítica. Se estimó la potencia entregada al sistema de acuerdo a lo reportado por Büchs *et al.*, 2000 (tabla 14), en la figura 33 se muestra el efecto de la potencia específica sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*, en ella se aprecia que conforme se incrementa la potencia se incrementa la masa celular. Estudios realizados en *Azotobacter vinelandii* por Peña, *et al.*, 2007 muestran que la velocidad de transferencia de oxígeno está íntimamente ligada con potencia específica entregada al medio hasta cierta viscosidad crítica. Desde el punto de vista morfológico y fisiológico autores como Wongwicharn *et al.*, 1999, Rahardjo *et al.*, 2005, han mostrado que la disminución de la tensión de la disolución de oxígeno (DOT) por debajo de 0 % reduce la intensidad de ramificación y la longitud activa de la hifa, este fenómeno impide que el hongo pueda llegar a áreas ricas en nutrientes, por otro lado, el oxígeno juega un papel importante en la cadena respiratoria como aceptor final para la generación de energía (ATP); nutriente en síntesis de ácidos grasos y esteroides para la pared celular. De ahí la importancia de suministrar este elemento al medio de cultivo ya que se afecta severamente con efectos irreversibles sobre el crecimiento celular o generación del producto.

Por otra parte, los tres términos que se encuentran por debajo de la línea de significancia estadística serán cancelados en el modelo final, debido a que estos factores no tienen una influencia representativa a la hora de estimar la respuesta.

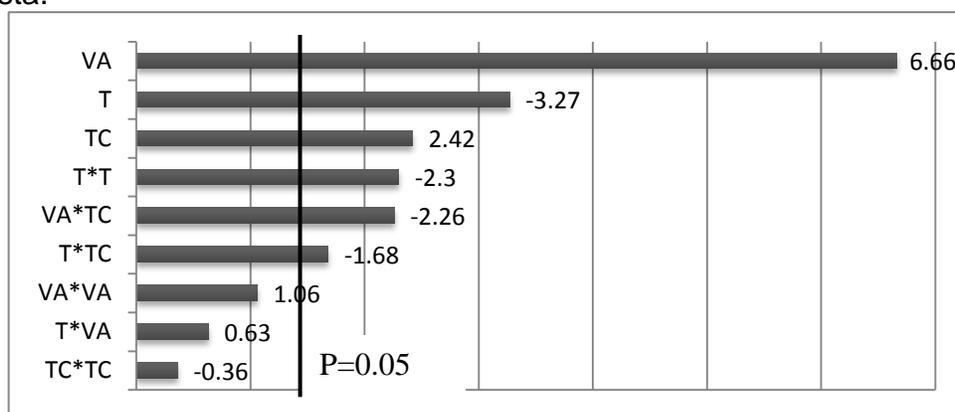


Figura 19. Gráfica de Pareto de las tres variables estudiadas para biomasa (T: temperatura, VA: velocidad de agitación, TC: tiempo de cultivo). Los valores al lado de la barra indican el coeficiente de contraste y el orden de importancia de las diferentes variables en que puede afectar a la variable de respuesta. La línea indica el valor crítico de significancia.

La Tabla A.12.2 (Anexo A.12) se muestra el análisis de varianza (ANOVA) con la significación estadística para los efectos sobre la concentración de biomasa. Respecto a la generación de biomasa, cinco efectos presentan valores de P inferiores a 0.05, indicando que son estadísticamente significativos en un intervalo de confianza del 95 %. Estos efectos fueron la temperatura (T), velocidad de agitación (VA), tiempo de cultivo (TC) y el efecto cuadrático de la temperatura y la interacción entre la velocidad de agitación y tiempo de cultivo.

Considerando los valores del estadístico F de la Tabla A.12.2 (Anexo A.12), y los parámetros ingenieriles, morfológicos y fisiológicos se llega a la conclusión que el cambio en la velocidad de agitación en el sistema es el efecto que causa una mayor variación en la concentración de biomasa. Este hecho es debido a que el oxígeno es un sustrato limitante en un sistema aerobio y una forma de aumentar la oferta de este sustrato es mediante la agitación, ya que esta variable tiene un efecto directo en el área de transferencia de oxígeno, la cual se ve favorecida cuando se aumenta la velocidad de agitación ocasionando una mayor oxigenación del medio de cultivo, teniendo como resultado un incremento en la biomasa. El valor del estadístico R² (Tabla A.12.2) indica que el modelo explica el 90.93 % de la variabilidad en la concentración de biomasa. El resultado no significativo de la falta de ajuste indica no hay necesidad de probar otros modelos.

Del análisis de regresión de los datos de la Tabla 12 por el método de mínimos cuadrados se obtiene el siguiente modelo ajustado de segundo orden:

$$\text{Biomasa(g/L)} = 3.16695 - 0.24721T + 0.502796VA + 0.183065TC - 0.16T^2 - 0.215VA^2 - 0.18822 T^2$$

Siendo T, VA y TC, la temperatura, velocidad de agitación y tiempo de cultivo, respectivamente. Los valores de las variables de la ecuación corresponden a sus unidades originales, (Tabla 12).

En las Figuras 21, 22 y 23 se presentan las gráficas de superficie de respuesta y contornos. Con esto se explica la interacción de los factores estudiados y es posible encontrar la condición óptima de cada factor requerido y como afectaron el crecimiento del hongo. Se observó que al aumentar la velocidad de agitación hasta 200 rpm, aumenta en forma lineal la concentración de biomasa hasta alcanzar un valor de 3.8 g/L. Para una agitación mayor a 200 rpm, la concentración de biomasa disminuye. Por lo que, la velocidad de agitación de 200 rpm fue considerada la óptima. Por otro lado, la producción de biomasa se comportó con respecto al tiempo de cultivo de manera lineal, alcanzándose una concentración máxima 3.81 g/L a las 80 horas. Un tiempo de cultivo arriba de 80 horas, la concentración de biomasa empieza a disminuir. Una explicación del comportamiento, se debe a que los nutrientes empiezan a ser limitantes para el microorganismo, así como, el microorganismo estando en la fase estacionaria su actividad metabólica es menor así como la pérdida de viabilidad. La temperatura fue una de los factores que tuvo un efecto más drástico en la producción de la biomasa, ya que temperaturas por abajo o arriba de 25 °C, tienen un efecto

adverso sobre la generación de la biomasa. Se obtuvo un valor máximo de 3.81 g/L a 25 °C. Las condiciones óptimas para esta respuesta fueron 25°C, 200 rpm y 80 horas para obtener la concentración de biomasa máxima

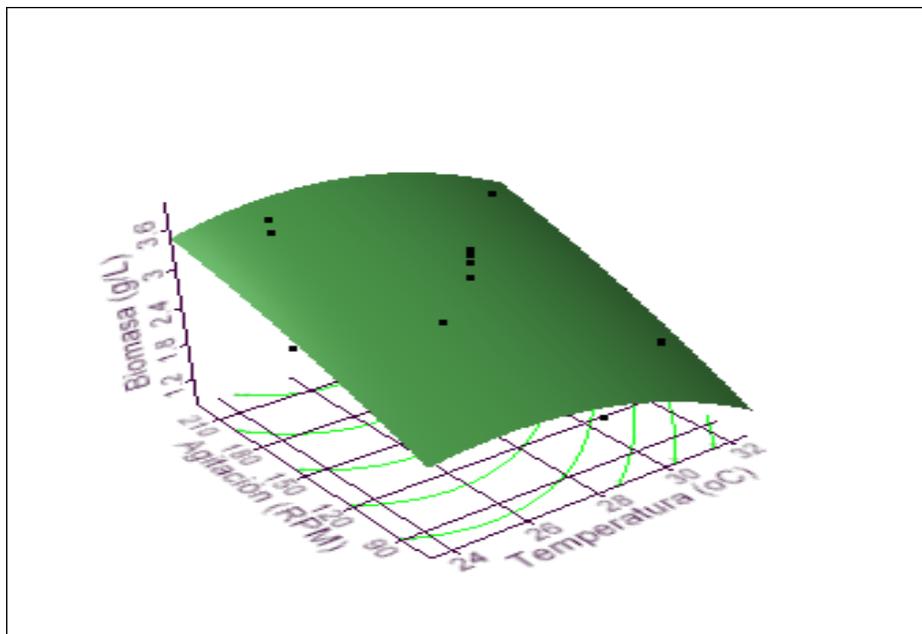


Figura 20. Representación gráfica de superficie y contornos para la respuesta biomasa en función de velocidad de agitación (rpm) y temperatura (°C).

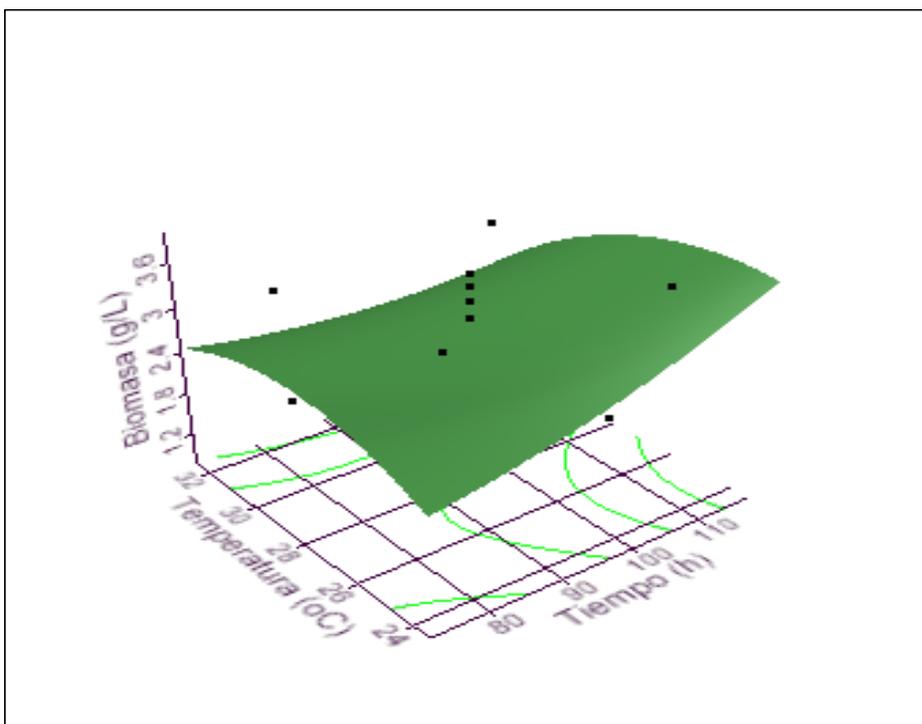


Figura 21. Representación gráfica de superficie y contornos para la respuesta biomasa en función de la temperatura (°C) y tiempo de cultivo (h).

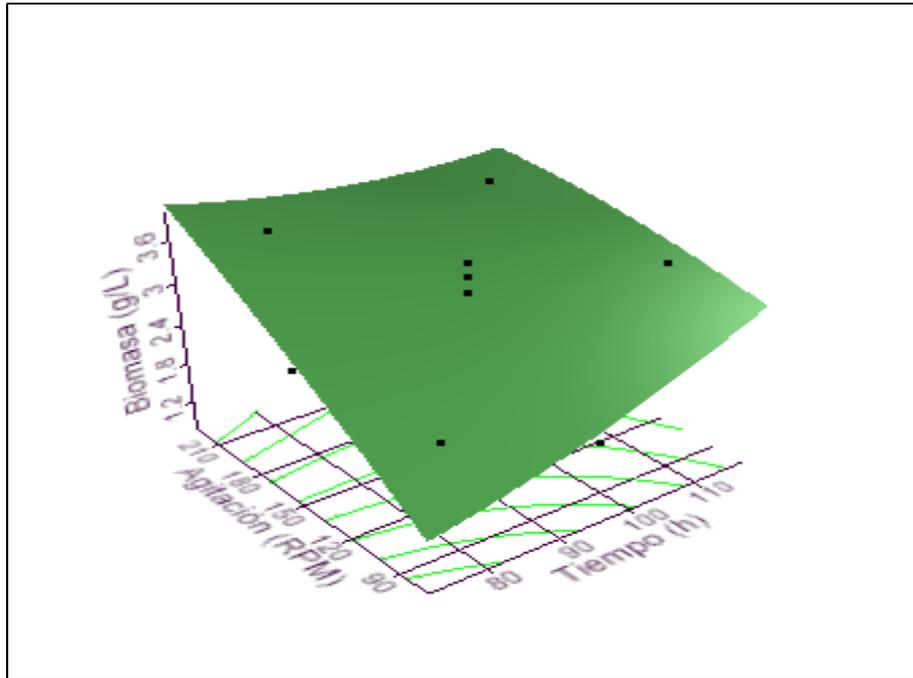


Figura 22. Representación gráfica de superficie y contornos para la respuesta biomasa en función de velocidad de agitación (rpm) y tiempo de cultivo (h).

El análisis canónico mostró que se obtuvo un punto estacionario de tipo silla (Figuras 22, 23 y 24). Lo antes expuesto se sustenta con los tres valores propios obtenidos, dado a que se obtuvo una combinación de números negativos y positivos; por otro lado, el valor propio más alto (0.156) está asociado con el factor tiempo de cultivo (0.843), el signo positivo del vector propio más alto indica que la respuesta de la biomasa estuvo en cascada ascendente hasta las 80 horas de cultivo con este factor. El próximo valor propio más alto (-0.105), está relacionado con la velocidad de agitación (0.873), mientras que el valor propio más pequeño (-0.224), está asociado con factor temperatura (0.966). El signo de ambos vectores asociados son positivos, indicando que la respuesta estuvo en dirección de cascada ascendente para maximizar la respuesta, aunque de una forma mínima en relación al tiempo de cultivo (Tabla 13).

La Figura 25 representa el gráfico de Pareto en orden decreciente de la importancia de los factores y de las interacciones sobre la concentración de proteína, en ella se puede observar que los tres efectos cruzados y un efecto cuadrático puro, están por abajo del nivel de significancia ($P=0.05$), lo que indica que estos efectos no tienen relevancia en el modelo. Por otro lado, el tiempo de cultivo de acuerdo al gráfico debe ser disminuido 11 unidades para maximizar la concentración proteína, estos resultados dan un indicio de que las proteínas pueden estar siendo degradadas con una mayor frecuencia, una vez que se sobrepasa el tiempo de cultivo óptimo, o que el microorganismo una vez alcanzada la fase estacionaria excrete en menor cantidad proteínas o que estas

estén siendo degradadas por proteasas. Un efecto contrario sucede con la velocidad de agitación, donde se requiere que se aumente 7 unidades, para maximizar la respuesta.

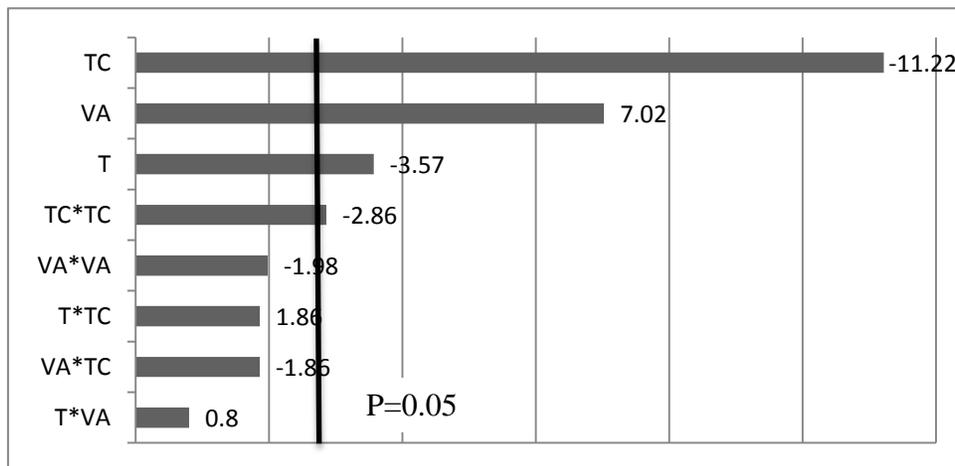


Figura 23 Gráfica de Pareto de las tres variables estudiadas para proteína producida T: temperatura, VA: velocidad de agitación, TC: tiempo de cultivo) los valores al lado de la barra indican el coeficiente de contraste y el orden de importancia de las diferentes variable en que puede afectar a la variable de respuesta. La línea indica el valor crítico de significancia.

La Tabla A.12.3 (Anexo A.12) corresponde al análisis de la varianza (ANOVA) con la significación estadística para los factores y sus interacciones sobre las concentraciones de proteína. En este caso, cinco efectos tuvieron valores de P inferiores a 0,05. La velocidad de agitación y el tiempo de cultivo fueron los factores que generaron mayor variación en la biosíntesis de proteína. También la temperatura tuvo un efecto significativo; así como los efectos cuadráticos de la de la temperatura y tiempo de cultivo. El valor del estadístico R^2 (Tabla A.12.3) indica que el modelo explica el 95.58 % de la variabilidad en la concentración de proteína. La prueba de falta de ajuste fue altamente significativa indicando que existe la posibilidad de probar otros modelos que representen el sistema.

Los datos contenidos en la Tabla 11, han sido utilizados para ajustar un polinomio de segundo orden con el fin que permita estudiar el efecto de los factores sobre la producción de proteína:

$$\text{Proteína (mg/L)} = 11.435602 - 0.8622666T + 1.6950894VA - 2.709199TC + 0.2425T*VA + 0.565T*TC - 0.565VA*TC - 0.78466 T*T - 0.74811TC*TC - 0.51635VA*VA$$

Siendo T, VA y TC la temperatura, velocidad de agitación y tiempo de cultivo, respectivamente. Los valores de las variables de la ecuación corresponden a sus unidades originales (Tabla 12).

El las Figuras 26, 27 y 28 se presentan las gráficas de superficie de respuesta y contornos para la concentración de proteína, en ellas se puede visualizar claramente que conforme la velocidad de agitación aumenta, el nivel de proteína en el medio también se incrementa, mientras que cuando la temperatura aumenta de 22 a 25 °C la concentración de la proteína también se incrementa, caso contrario sucede cuando la temperatura disminuye de 31 a 25 °C, por lo tanto un punto máximo de concentración de proteína a 25 °C es de 148.9 mg/L. Este mismo comportamiento se presenta en Figura 27 y 28, donde el tiempo de cultivo óptimo se da a las 80 h, por arriba o debajo de este valor la concentración de proteína se ve disminuida. El análisis canónico para la respuesta de proteína se observa que todos los valores propios son negativos, indicativo de que el punto estacionario es un máximo (Tabla 13). El valor propio más alto (-0.264) está asociado con el tiempo de cultivo, mientras que el próximo más alto (-0.639) y el valor propio más pequeño (-0.639), ambos valores propios están asociados a la velocidad agitación, indicando que la superficie de respuesta fue poco sensible a este factor, pero con mayor efecto que el factor temperatura. Sin embargo, podría decirse que el factor que más influyó en los cambios de concentración de proteína fue el tiempo de cultivo.

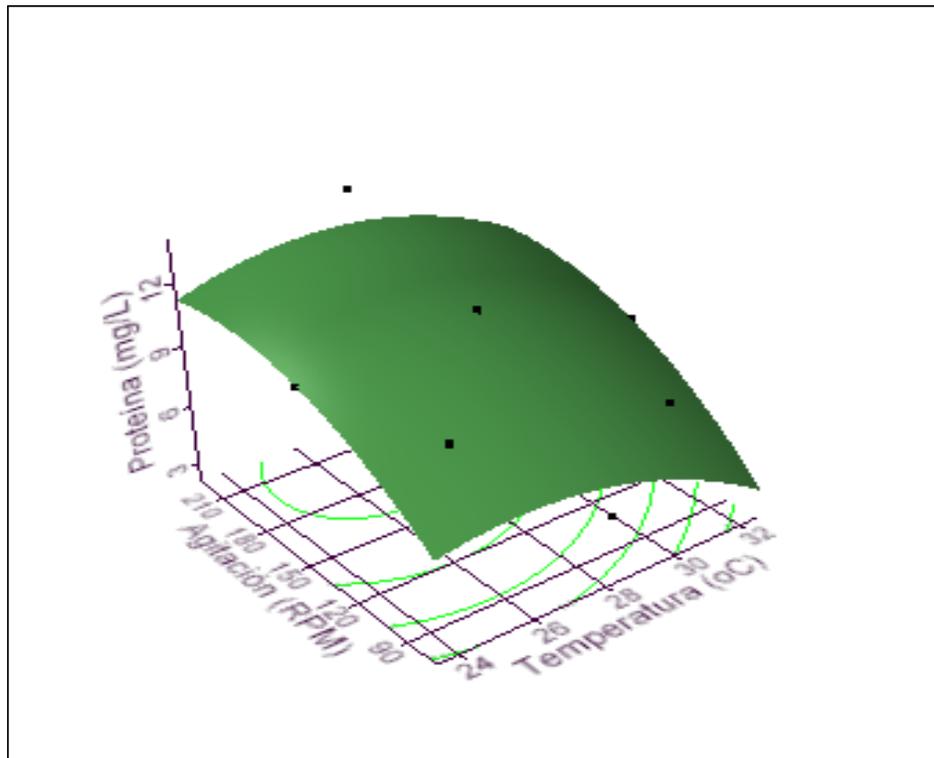


Figura 24. Representación gráfica de superficie y contorno para la respuesta proteína en función de velocidad de agitación (rpm) y temperatura (°C).

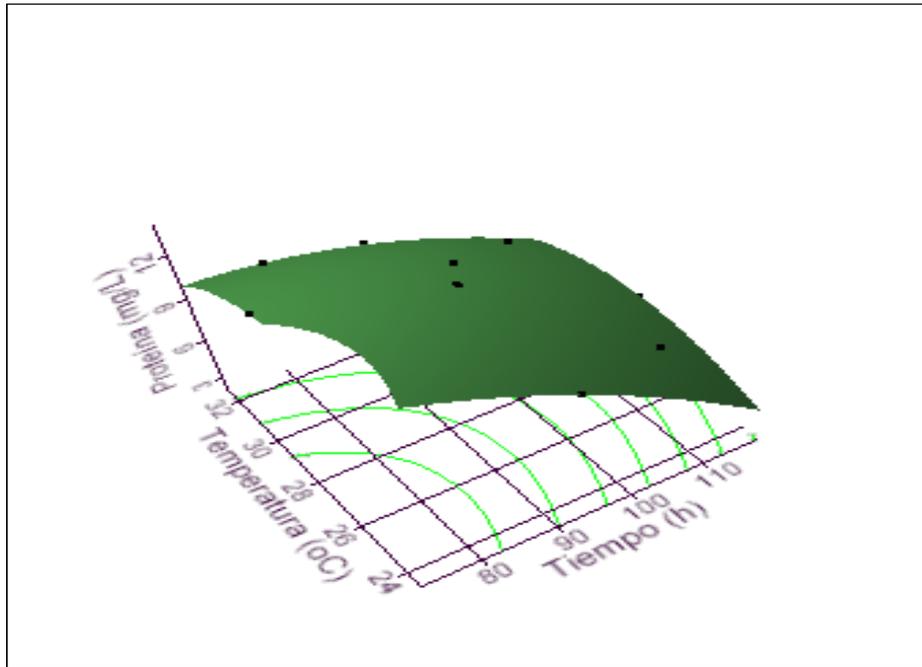


Figura 25. Representación gráfica de superficie y contorno para la respuesta proteína en función de temperatura (°C) y tiempo de cultivo (h).

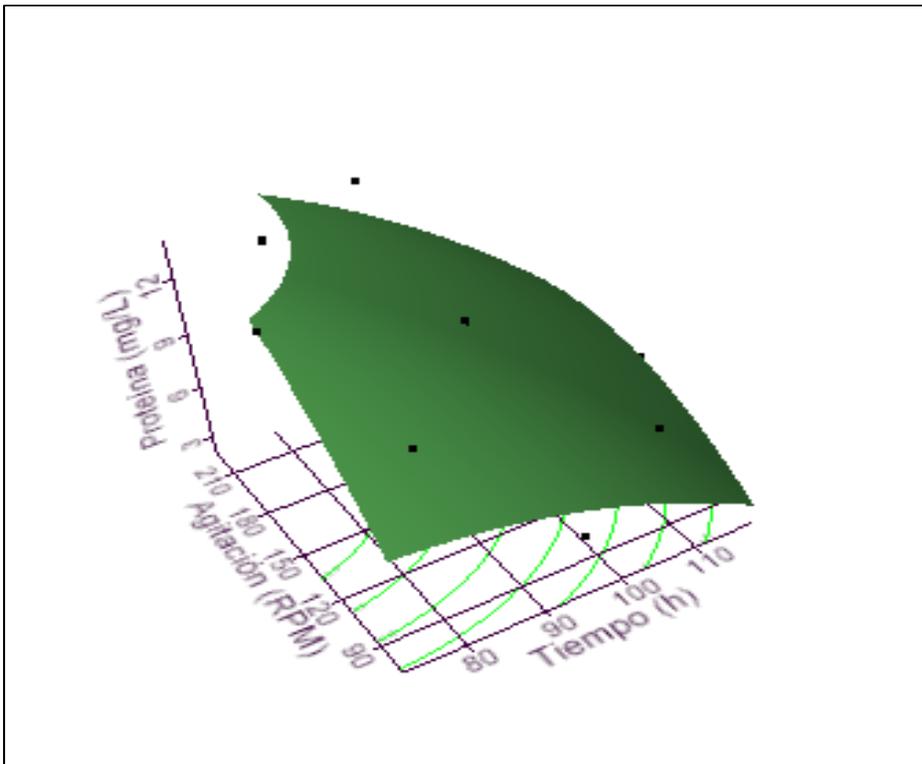


Figura 26. Representación gráfica de superficie y contorno para la respuesta proteína en función de velocidad de agitación (rpm) y tiempo de cultivo (h).

De acuerdo al análisis de varianza de la Tabla A.12.4 (Anexo A.12), se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos, es decir los cambios observados en la actividad enzimática se deben a los tratamientos, por lo cual se justifica la optimización de las condiciones de cultivo a través de esta variable de respuesta. Por otro lado, los valores de la respuesta de actividad enzimática presentaron una mayor variabilidad, con respecto a las dos anteriores respuestas con un coeficiente de variación de 11.6 %, este valor mayor se debe a que en este tipo de ensayo, son mucho más factores a controlar o algunos no fueron considerados al momento de determinar la actividad enzimática.

El coeficiente de regresión R^2 fue de 0.8703 lo cual indica confiabilidad en la respuesta, debido a que el 87.03% de los valores se ajustan al modelo de regresión planteado. La falta de ajuste, resultó altamente significativa, indicativo que hay un sesgo en la respuesta estimada. Es decir que, algunos efectos importantes pudieron no haber sido considerados en el modelo cuadrático o que otras variables independientes necesitan ser incluidas en el modelo.

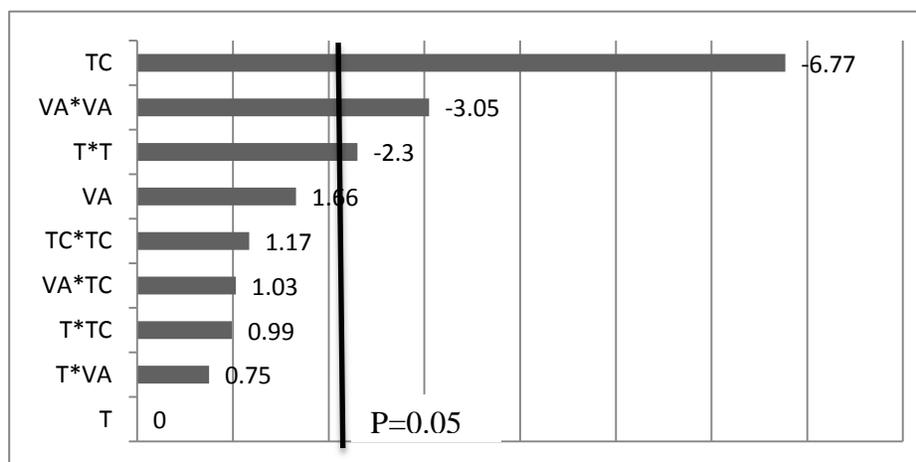


Figura 27. Gráfica de Pareto de las tres variables estudiadas para la actividad enzimática T: temperatura, VA: velocidad de agitación, TC: tiempo de cultivo. Los valores al lado de la barra indican el coeficiente de contraste y el orden de importancia de las diferentes variables en que puede afectar a la variable de respuesta. La línea indica el valor crítico de significancia.

En la Figura 29 se muestra el gráfico de Pareto en el que se puede observar la importancia de los factores y de las interacciones sobre la actividad enzimática, la temperatura, la velocidad de agitación, tres efectos cruzados, un efecto cuadrático puro; se encuentran por abajo del nivel de significancia ($P=0.05$), lo que indica que estos efectos no tienen relevancia en el modelo.

Los datos contenidos en la Tabla 12 fueron ajustados a un polinomio de segundo orden, mediante el método de regresión múltiple con la finalidad de permitir predecir el efecto de los factores sobre la actividad enzimática.

$$\text{Act. Enzimática (U/g)} = 1120.5041 - 0.05928T + 55.4961VA - 226.405TC + 31.63T*VA - 41.63T*TC + 43.13VA*TC - 83.0886 T*T - 42.4689TC*TC - 110.1782VA*VA$$

Donde T, VA y TC son la temperatura, velocidad de agitación y tiempo de cultivo, respectivamente. Los valores de las variables de la ecuación corresponden a sus unidades originales (Tabla 12).

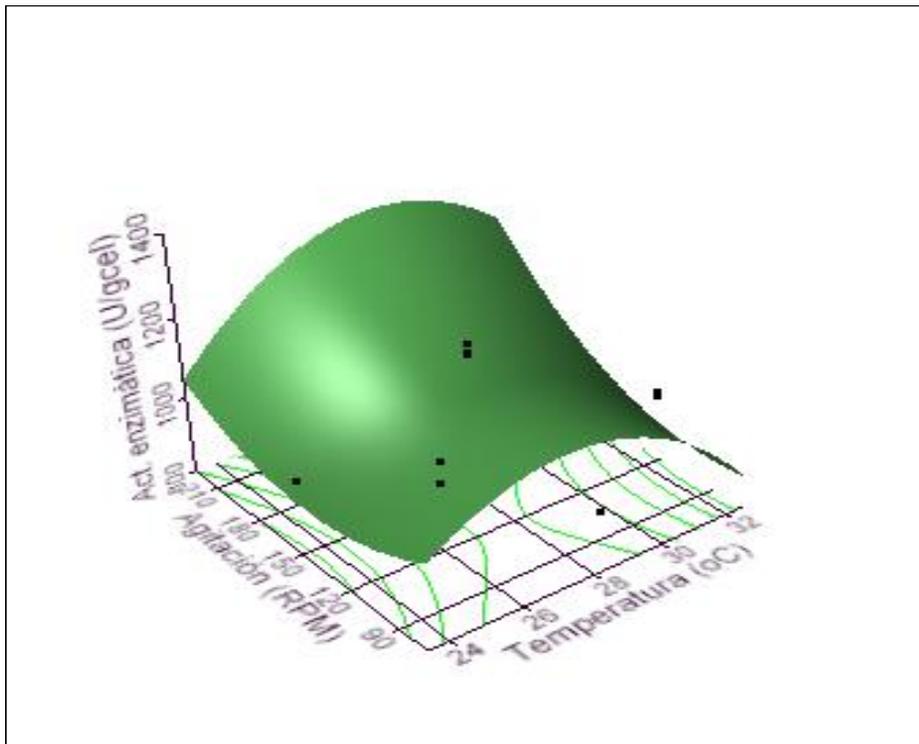


Figura 28. Representación gráfica de superficie y contorno para la respuesta actividad enzimática específica en función de velocidad de agitación (rpm) y temperatura (°C).

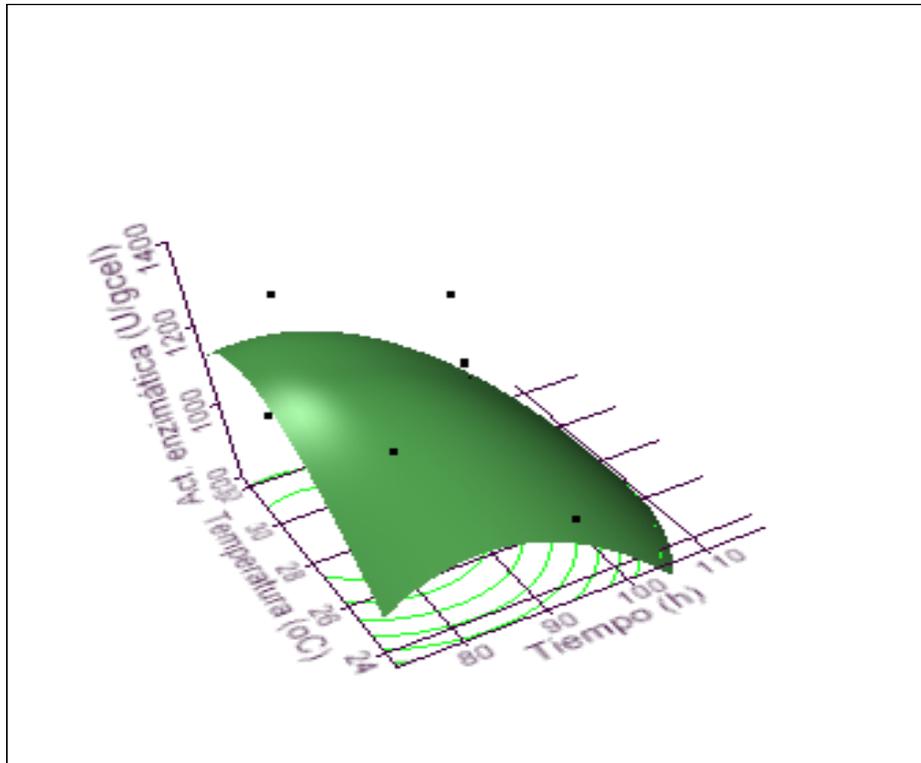


Figura 29. Representación gráfica de superficie y contorno para la respuesta actividad enzimática específica en función de temperatura (°C) y tiempo de cultivo (h).

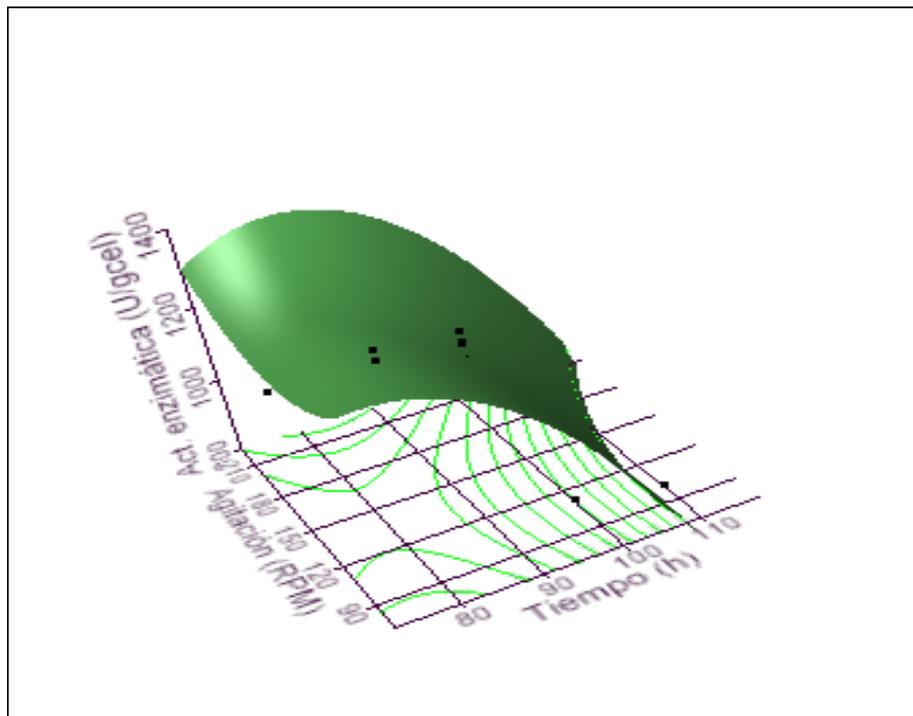


Figura 30. Representación gráfica de superficie y contorno para la respuesta actividad enzimática específica en función de velocidad de agitación (rpm) y tiempo de cultivo (h).

El análisis canónico para la respuesta de la actividad enzimática muestra que el punto estacionario es un punto de silla, dado a que se obtuvieron valores propios tanto positivos como negativos (Figuras 30, 31 y 32). El valor propio más alto (48.34) está asociado con la velocidad de agitación, el signo positivo de este vector más grande (0.987) indica que el vector propio asociado estuvo en dirección de cascada ascendente desde el punto estacionario, es decir que la respuesta de la actividad enzimática se ve favorecida con el aumento de la velocidad de agitación, esto puede atribuirse a que al aumentar esta variable se provoca una mayor fragmentación del micelio quedando expuesta mayor cantidad de la enzima para ser cuantificada. Purwanto *et al.*, 2009, cultivando *Aspergillus niger* para producir la enzima tanasa, el incremento de la velocidad de agitación conlleva a mayor producción de la enzima debido a una excesiva permeabilidad de la célula relacionada por los esfuerzos de corte y por la limitación de oxígeno. Por otro lado, el próximo valor más alto (-70.32), está asociado con la temperatura (0.871), mientras que el valor propio más pequeño (-124.06) está asociado con el tiempo de cultivo(0.863), los signos positivos de ambos vectores propios, indican que el vector asociado estuvo en dirección de cascada ascendente desde el punto estacionario (Tabla 13).

Tabla 11. Resultados del análisis canónico (valores y vectores propios) para las respuestas de biomasa, proteína y actividad enzimática.

Respuesta	Valores propios	Vectores propios		
		Temperatura	Velocidad Agitación	Tiempo de cultivo
Biomasa	0.156	-0.229	-0.487	0.843
	-0.106	-0.119	0.873	0.472
	-0.224	0.966	-0.007	0.257
Proteína	-0.265	0.360	-0.397	0.844
	-0.639	0.698	0.715	0.038
	-1.139	-0.619	0.575	0.535
Actividad enzimática específica	48.34	0.101	0.987	0.122
	-70.32	0.871	-0.028	-0.489
	-124.06	0.480	-0.156	0.863

Tabla 12. Estimación de la potencia volumétrica inicial determinada de acuerdo a los datos experimentales reportados por Büchs *et al.*, 2000.

Vel. de agitación (rpm)	P/V (kw/m ³)
74	0.08
100	0.10
150	0.20
200	0.35
226	0.45

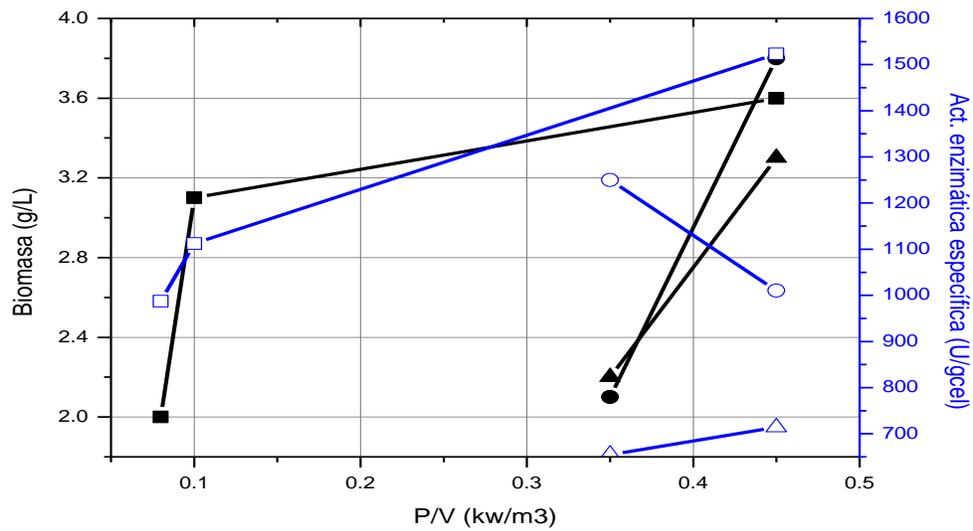


Figura 31. Efecto de la potencia volumétrica específica (P/V) sobre la concentración de biomasa (símbolos llenos) y actividades enzimáticas (símbolos vacíos) finales en los cultivos con *Aspergillus niger*. 28 °C, 95 horas (■), 25 °C, 80 h (●), 31 °C, 110 h (▲).

Tabla 13. Parámetros cinéticos de rendimientos y productividades globales obtenidos de los diferentes cultivos realizados en matraz

Tratamiento	Factores			Parámetros cinéticos		
	Temperatura (°C)	Vel. de agitación (rpm)	Tiempo de cultivo (h)	Y(g células/ g sustrato)	Qp (U/L*h)	Qx (g células/L*h)
1	25	100	80	0.37	33.12	0.026
2	25	200	110	0.28	24.81	0.033
3	31	100	110	0.16	13.39	0.020
4	31	200	80	0.42	32.59	0.032
5	25	100	110	0.28	22.97	0.033
6	25	200	80	0.64	48.10	0.038
7	31	100	80	0.27	34.68	0.028
8	31	200	110	0.30	21.54	0.030
9	23	150	95	0.31	30.11	0.029
10	33	150	95	0.17	20.16	0.022
11	28	74	95	0.19	20.88	0.021
12	28	226	95	0.47	58.51	0.038
13	28	150	72	0.59	46.34	0.038
14	28	150	117	0.38	17.53	0.029
15	28	150	95	0.42	36.65	0.033
16	28	150	95			
17	28	150	95			
18	28	150	95			
19	28	150	95			
20	28	150	95			

5.6 Optimización de las condiciones de operación en la producción de β -galactosidasa en un biorreactor de 3L.

Para que en un proceso biotecnológico a nivel de reactor se logró tener altas productividades y rendimientos, se deben considerar varios factores, entre los que destacan: la cantidad y edad óptima de inóculo (Hornbæk *et al.*, 2004), tener control sobre la generación de espuma, para ello se debe realizar una selección adecuada de antiespumante (Berovic, 1979). Además contar un sistema con alto grado de homogeneidad, con ello se puede garantizar un buen suministro de los diferentes sustratos a las células o microorganismos. Entre los más importantes en un sistema aerobio es el oxígeno, cuya transferencia está íntimamente relacionada con el flujo de aireación (mL/min) y la velocidad de agitación (rpm).

1. Selección de antiespumante para el proceso de cultivo.

En muchos procesos de biotransformación un factor crítico es la generación de espuma. Como en este caso en particular (suero de leche) cuando el medio de cultivo presenta un alto contenido en proteínas la presencia de espuma va ser inevitable, de ahí que, sea un factor determinante a controlar. Por lo tanto entre las consecuencias que se pueden tener si no se tiene un buen control de este parámetro es una baja transferencia de oxígeno, taponamiento del reactor, entre otros efectos.

En este estudio se evaluaron dos antiespumantes de la marca Pure-Process, uno de grado farmacéutico (Tipo A) y el otro de grado industrial (Tipo B) a las concentraciones de 10 % y 5 % (v/v); utilizando las condiciones de operación de 200 rpm y 100 mL/min (tratamiento centrales) y un tiempo de cultivo de 72 h. La etapa crítica donde se genera espuma se presentó en las 12 primeras h después de realizar la inoculación. Después de esta etapa, la generación de espuma es mínima, por lo que ya no se requiere un control estricto de este parámetro. En la Tabla 16, se muestran los datos de los dos antiespumantes evaluados. El volumen gastado para el tipo A fue mucho menor en ambas concentraciones probadas, en relación al tipo B. El antiespumante tipo B presentó un mayor gasto de volumen 70 mL al 10 % (v/v) y 100 mL al 5 % (v/v), aunado a esto se tuvieron efectos secundarios sobre el volumen total del medio de cultivo y esto a su vez, disminuyó la concentración de los elementos presentes (lactosa, proteínas, etc.). Al final del cultivo, se cuantificó la biomasa y la actividad enzimática. En la Tabla 16, se muestran los resultados obtenidos. Se puede verificar que no existe diferencia si en cuanto a la concentración de biomasa, pero donde se produjo una mayor diferencia fue en la actividad enzimática, obteniéndose una mayor actividad cuando se utilizó el antiespumante tipo A, a una concentración de 10 % (v/v).

En la Figura 34 se visualiza el efecto de taponamiento del biorreactor con la biomasa cuando se utilizó el tipo B al 5 % (v/v), gastándose 100 mL en 12 h. Por todo lo antes expuesto, se decidió elegir el antiespumante tipo A a una concentración del 10 % (v/v) para realizar todas las corridas en el biorreactor.



Figura 32. Taponamiento biorreactor con biomasa ocasionado por la generación de espuma cuando se utilizó el antiespumante tipo B.

Tabla 14. Resultados obtenidos de la evaluación de los antiespumantes

Tipo de antiespumante	Concentración % (v/v)	Volumen gastado (mL)	Biomasa (g/L)	Act. enzimática específica (U/g cel)
A	5	85	3.7	390
	10	50	4.2	420
B	5	100	3.8	350
	10	70	3.9	370

2. Establecimiento de las condiciones de cultivo en un biorreactor de 3 L utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta.

Uno de los retos en un proceso de biotransformación es encontrar las condiciones óptimas de operación. Entre las variables más importantes, que afectan de manera considerable un proceso biológico aerobio cuando se utilizan biorreactores tipo tanque agitado, se encuentran el flujo de aireación y velocidad de agitación. Sin embargo, el control de la agitación es de suma importancia, ya que crea esfuerzos cortantes que puede tener una variedad de efectos en microorganismos filamentosos (Smith *et al.*, 1990; Papagianni, 2004).

En este estudio en particular, se planteó evaluar el efecto del flujo de aireación y la velocidad de agitación, sobre el desarrollo de *Aspergillus niger*, así como la producción de la enzima β -galactosidasa en el sistema. Para ello se tomó la temperatura óptima a nivel de matraz de 28 °C, tiempo de cultivo 72 h, pH de 4.2 manteniéndose constantes durante el cultivo y de esta manera se planteó un DCC ortogonal. Los niveles de las variables se presentan en la Tabla A.11.2 (Anexo A.11). Teniendo un nivel mínimo de agitación de 39 rpm y un máximo de 361 rpm, los intervalos fueron establecidos de acuerdo a los estudios

previos en el Laboratorio de Microbiología Experimental, la literatura (Ujcova *et al.*, 1980; Gómez *et al.*, 1988; Papagianni *et al.*, 1998, 2001), y a la determinación previa del coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) en agua, así como las velocidades de transferencia de oxígeno estimadas (745 a 1995 mg $O_2/L \cdot h$), teniendo presente que las propiedades reológicas del medio del cultivo son muy diferentes a las del agua. Por otro lado, los flujos de aireación fueron establecidos de acuerdo al equipo disponible y los reportados en la literatura (Ujcova *et al.*, 1980), estos estuvieron comprendidos entre 46 y 153 mL/min. En la Tabla 17, se muestra la matriz de diseño experimental, así como los datos obtenidos de biomasa y actividad enzimática después de 72 horas de cultivo. Cabe mencionar, que durante este estudio *Aspergillus niger* creció en forma filamentosa, después de las 40 h el cultivo presento alta viscosidad, se tomaron medidas en cuanto a obtener lecturas mas representativa, por tal razón las sondas de pH y oxígeno fueron colocadas cerca al impulsor.

Tabla 15. Diseño experimental para evaluar el efecto de la agitación y aireación en la producción de β -galactosidasa en un biorreactor de 3L manteniendo constante una temperatura 28 °C, pH 4.2 y un tiempo de cultivo de 72h.

Tratamiento	Factor		Respuesta	
	Vel. Agitación (rpm)	Flujo de Aireación (mL/min.)	Biomasa (g/L)	Act. Enzimática Específica (U/g cel.)
1	50	50	4.3	846.0
2	50	150	4.3	828.7
3	350	50	2.6	3052.0
4	350	150	2.9	3179.0
5	39	100	1.9	3020.0
6	361	100	3.2	2400.0
7	200	46	1.9	2727.0
8	200	154	3.1	1324.7
9	200	100	3.7	372.3
10	200	100	3.8	380.0
11	200	100	3.8	375.0
12	200	100	3.8	377.0

Se puede observar que en los tratamientos factoriales 1 y 2 se alcanza una concentración máxima de biomasa (4.37 y 5.18 g/L, respectivamente). En el tratamiento 2 después de las 20 h de cultivo, la concentración de la biomasa siempre estuvo por encima de los demás tratamientos 3 y 4, debido a una mayor oxigenación del medio y al menor estrés provocado por la agitación. Mientras que en los tratamientos 3 y 4 se alcanzo una concentración de 2.6 y 2.9 g/L, respectivamente, esto se atribuye a que se tiene una mayor entrada de energía al sistema (0.242 Kw/m³, Tabla 18), incrementándose la viscosidad aparente del

medio, debido a la alta fragmentación del micelio presentándose problemas de transferencia de masa e insuficiencia de oxígeno (Marten *et al.*, 1997; Bhargava *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2000). Estudios realizados por Pey-Jin *et al.*, 2010, muestran el mismo comportamiento que los observados en los tratamientos 1 y 2, cuando combinaron menor agitación con mayor aireación obteniendo un valor máximo de 7g /L de biomasa. El consumo de azúcares en el tratamiento 1 fue de 9.1 g/L y para el 2 fue de 2.96. En tanto que los tratamientos 3 y 4, la concentración de biomasa máxima fue de 2.67 y 2.96 g/L, con un consumo total de fuente de carbono de 10.9 g/L y 9.6 g/L, respectivamente. En estos últimos tratamientos, se aprecia que siguen comportamientos similares, esto se atribuye al mayor esfuerzo de corte o estrés producido por la agitación, de ahí que se presente una alta fragmentación del micelio, teniendo como consecuencia un menor crecimiento del hongo (El-Enshasy *et al.*, 2006) (Figura 35). Grimm *et al.*, 2005, muestran que las altas velocidades de agitación inducidas por la entrada de potencia específica al medio, reducen la velocidad de crecimiento hifal después de la inoculación, estos resultados concuerdan con los datos encontrados en los tratamientos 3 y 4.

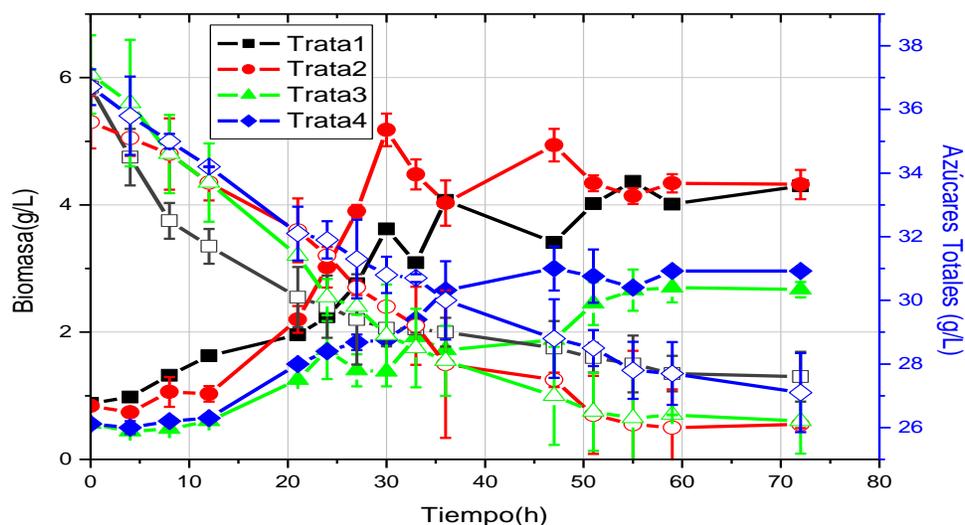


Figura 33. Cinéticas de crecimiento (símbolos llenos) y consumo de azúcares (símbolos vacíos) de los tratamientos factoriales. 50 rpm, 50 mL/min (■), 50 rpm, 150 mL/min (●), 350 rpm, 50 mL/min (▲), 350 rpm, 150 mL/min (◆)

Con respecto a la degradación o consumo protéico “fuente de nitrógeno” (Figura 36); el comportamiento en estos tratamientos sustenta lo antes mencionado sobre las cinéticas de crecimiento. En los tratamientos 1 y 2, el abatimiento del contenido proteico es mucho más rápido, con respecto a los tratamientos 3 y 4. Lo anterior, se debe a la creciente demanda de la fuente de nitrógeno, ya que este no se encuentra disponible, por lo que *Aspergillus niger* debe excretar proteasas (Carlile *et al.*, 1994) al medio para la degradación de las

proteínas contenidas en el suero de leche y de esta forma obtener la fuente de nitrógeno. Los porcentajes de degradación en estos tratamientos fueron de 61 % y 52 %; mientras que para el tratamiento 3 y 4 fueron de 56.1% y 56.2%. Cabe señalar, que a la mitad del cultivo en los tratamientos 1 y 2 se presenta una ligera síntesis de proteína, pero al final del experimento se obtienen concentraciones en promedio de 61 mg/mL.

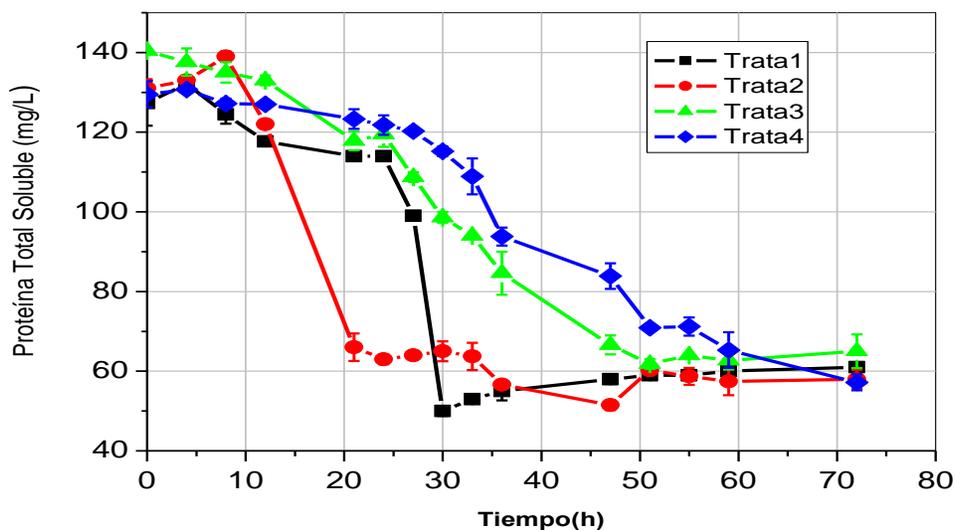


Figura 34. Degradación de proteínas de los tratamientos factoriales. 50 rpm, 50 mL/min (■), 50 rpm, 150 mL/min (●), 350 rpm, 50 mL/min(▲), 350 rpm, 150 mL/min (◆).

El comportamiento oscilatorio de la generación de azúcares reductores en los tratamientos factoriales (Figura 37) fue similar para todos los experimentos. Lo anterior se atribuye a la producción de glucosa y galactosa originada por la hidrólisis de la lactosa por la enzima β -galactosidasa (Landeró *et al.*, 2000) y por otro lado, el consumo de la glucosa debido al metabolismo del hongo *Aspergillus niger*.

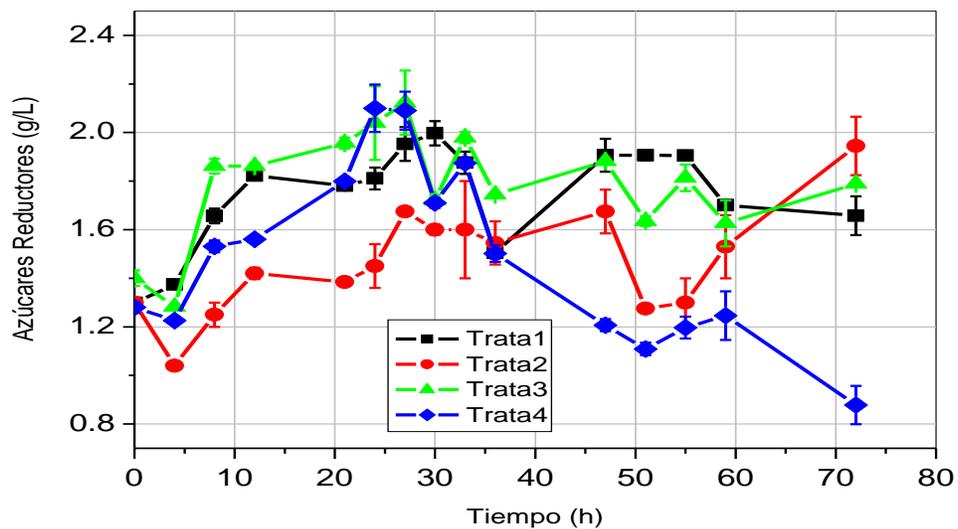


Figura 35. Generación y consumo de azúcares reductores en los tratamientos factoriales. 50 rpm, 50 mL/min (■), 50 rpm, 150 mL/min (●), 350 rpm, 50 mL/min (▲), 350 rpm, 150 mL/min (◆).

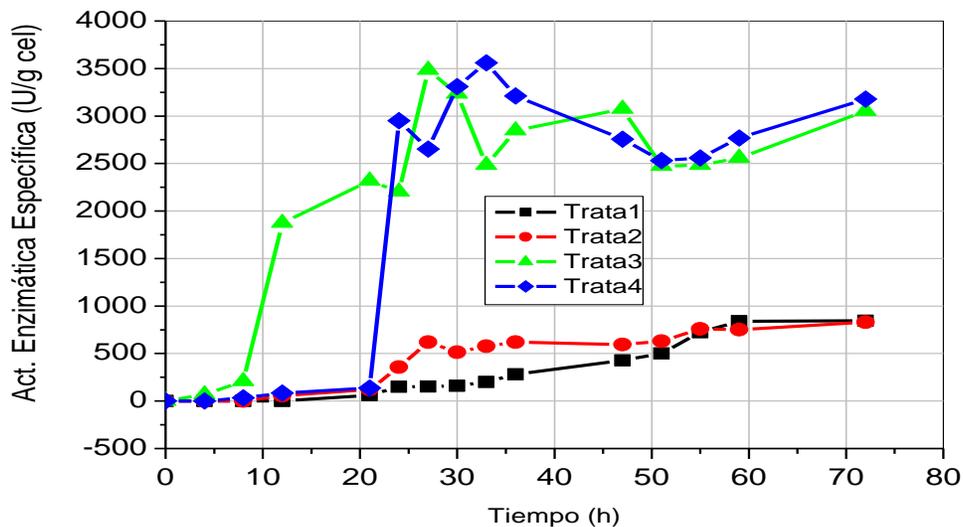


Figura 36. Actividad enzimática de los tratamientos factoriales. 50 rpm, 50 mL/min (■), 50 rpm, 150 mL/min (●), 350 rpm, 50 mL/min (▲), 350 rpm, 150 mL/min (◆).

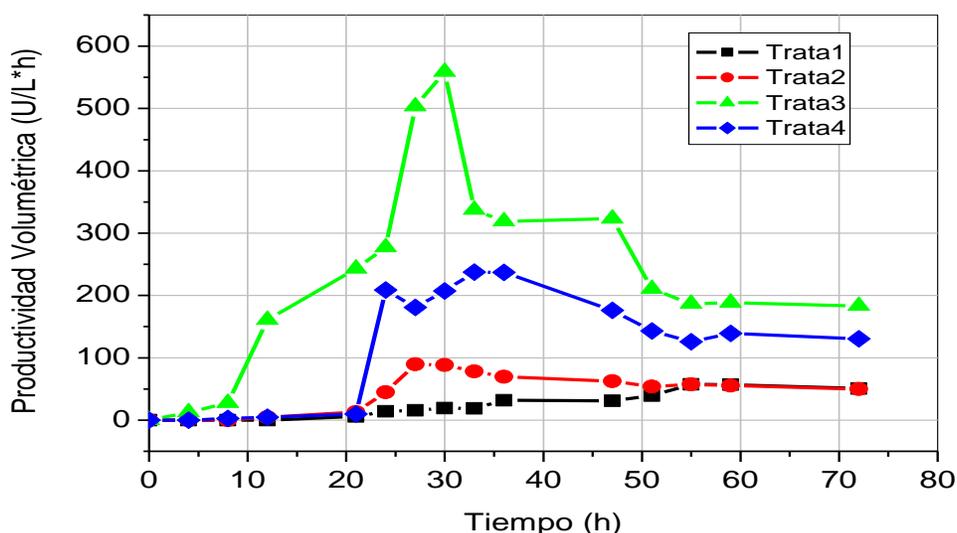


Figura 37. Productividad volumétrica de los tratamientos factoriales. 50 rpm, 50 mL/min (■), 50 rpm, 150 mL/min (●), 350 rpm, 50 mL/min (▲), 350 rpm, 150 mL/min(◆).

La actividad enzimática de la β -galactosidasa en los tratamientos factoriales 3 y 4 fue de 3485 U/g células a las 27 h y 3561 U/g células a las 33 h, con una productividad volumétrica de 503 U/L*h y 237.4 U/L*h, respectivamente. Comparando resultados con los obtenidos con *Kluyveromyces marxianus* en suero de leche suplementado con extracto de levadura (Rech *et al.*, 2007), la actividad específica fue de 650 U/g células y la productividad fue de 291 U/L*h; la actividad enzimática y productividad fue 5 y 1.7 veces más, con *Aspergillus niger* (tratamiento 3). Al término del cultivo en los tratamientos 3 y 4 se presentó un declive (Figura 38 y 39). Este declive se atribuye a la presencia de reacciones de proteólisis ocasionadas por la excreción de proteasas. Las mayores actividades de la β -galactosidasa en los tratamientos 3 y 4, se debe a la mayor exposición de la enzima en el medio de cultivo por la alta energía entregada al sistema (0.242 Kw/m³). Este mismo comportamiento lo reporta Pey-Jin *et al.*, 2010 con la actividad de glucoamilasa cuando la velocidad de agitación se incrementa. En los tratamientos 1 y 2 la actividad enzimática máxima fue de 846 y 828 U/g células al final del cultivo; el comportamiento en estos últimos tratamientos muestra que a estas condiciones la enzima β -galactosidasa es inducida de manera mínima por la presencia de la lactosa (Baumgartner *et al.*, 2000; Domingues *et al.*, 2000). Por otro lado, este fenómeno es diferente en los tratamientos 3 y 4, en estos se registra una mayor actividad de la enzima, esto puede ser causado a que se tiene mayor cantidad de enzima soluble expuesta por la fragmentación del micelio (Figura 38). Sin embargo, en estudios realizados sobre la producción de fitasa y glucoamilasa con *Aspergillus niger* (Papagianni *et al.*, 2001, 2002) la actividad enzimática se ve seriamente reducida por la presencia de proteasas, cuando el cultivo presenta una alta viscosidad y fragmentación de micelio. También, otros autores (Cruz-Hernández *et al.*, 2005) han reportado la disminución de la actividad

de la tanasa después de 20 h de cultivo debido a las proteasa. Esta puede ser la causa por la que la actividad de la beta-galatosidasa se ve mermada en los tratamientos 3 y 4. Estudios realizados con *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 (Dagbagli *et al.*, 2008), empleando un medio sintético obtuvieron actividades específicas de 3717 U/g células a las 48 h de cultivo. Comparando en términos económicos el bioproceso con *Aspergillus niger* es mas rentable que con *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279. Primero, la enzima es extracelular, esto evita la extracción en el proceso de recuperación; segundo, el medio de cultivo suero de leche no tiene algún costo, sin duda alguna estos dos factores hacen más atractivo en cuestiones económicas a un bioproceso.

En los tratamientos axiales, la cinética de crecimiento para los experimentos 5 y 6 siguen un comportamiento bastante similar. Presentan una fase de adaptación de 12 horas, esta desaceleración del crecimiento de *Aspergillus niger* es atribuida a que el inóculo presenta estrés oxidativo cuando cambia de condiciones donde el ambiente tiene una alta concentración de oxígeno (Cortes *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2007), mientras que el tratamiento 7, el esfuerzo de corte provocado por la agitación, a las puntas de las hifas (zonas activas de crecimiento y producción) sumado a esto un deficiente suministro de oxígeno provocan un decaimiento del crecimiento irreversible, que al final del cultivo se traduce en bajos rendimientos y actividades enzimáticas (Daniel *et al.*, 1994; Grimm *et al.*, 2005). Pasadas las 12 horas el crecimiento es gradual, hasta alcanzar las concentraciones máximas de biomasa de 2 g/L a las 55 h, 3.2 g/L a las 72 h y 2.32 g/L a las 55 h, consumiendo un total de azúcares 10.71, 12.11 y 10.38 g/L, en los tratamientos 5, 6 y 7. Este perfil no se observa en el tratamiento 8, en el que se visualiza un crecimiento lineal desde el momento de la inoculación, alcanzándose una máxima concentración de biomasa de 4.7 g/L aproximadamente a las 33 h, con un consumo total de azúcares de 10.31 g/L. Tal comportamiento se debe a la presencia mínima de gradientes de temperatura, oxígeno y sustratos, es decir que el sistema es altamente homogéneo, debido al mayor flujo de aireación y velocidad de agitación (Figura 40). Por tanto, de acuerdo a estos resultados una entrada de energía mayor al sistema (tratamiento 6) tendría efectos adversos sobre la actividad y producción de biomasa, es decir que por arriba de velocidades de agitación de 361 rpm el crecimiento de *Aspergillus niger* se ve afectado negativamente

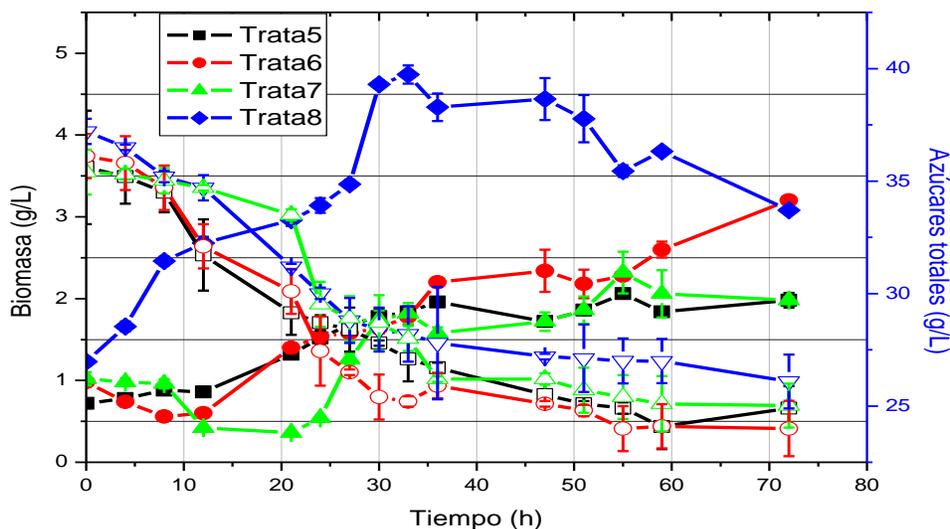


Figura 38. Cinéticas de crecimiento (símbolos llenos) y consumo de azúcares (símbolos vacíos) de los tratamientos axiales. 39 rpm, 100 mL/min (■), 361 rpm, 100 mL/min (●), 200 rpm, 46 mL/min (▲), 200 rpm, 154 mL/min (◆).

En las cinéticas de degradación proteica, en el tratamiento 8 se nota un abrupto descenso de la concentración de proteína en las primeras 20 h. Esto se correlaciona con el rápido crecimiento del hongo. Por otro lado, el comportamiento en los tratamientos 5 y 7 al inicio del cultivo los niveles de proteína se mantienen casi constantes hasta las 30 h aproximadamente, pero para el tratamiento 6 se presenta un decaimiento de la concentración en las 10 primeras h, después una fase estacionaria hasta 20 h. Después de las 30 y 20 h se presenta un abrupto descenso del material protéico en 5, 6 y 7. En general todos los tratamientos axiales muestran reacciones de proteólisis (Carlile *et al.*, 1994) para la obtención de la fuente de nitrógeno. Los porcentajes de degradación total de proteólisis en el tratamiento 5 fue de 58 %, en el 6 de 70 %, en el 7 de 39 % y en el 8 de 77 %. Cabe resaltar que en el tratamiento 6 y 8, fue donde se presentó mayor porcentaje de degradación, pero con una síntesis de proteína después 52 h y 33 h respectivamente (Figura 41).

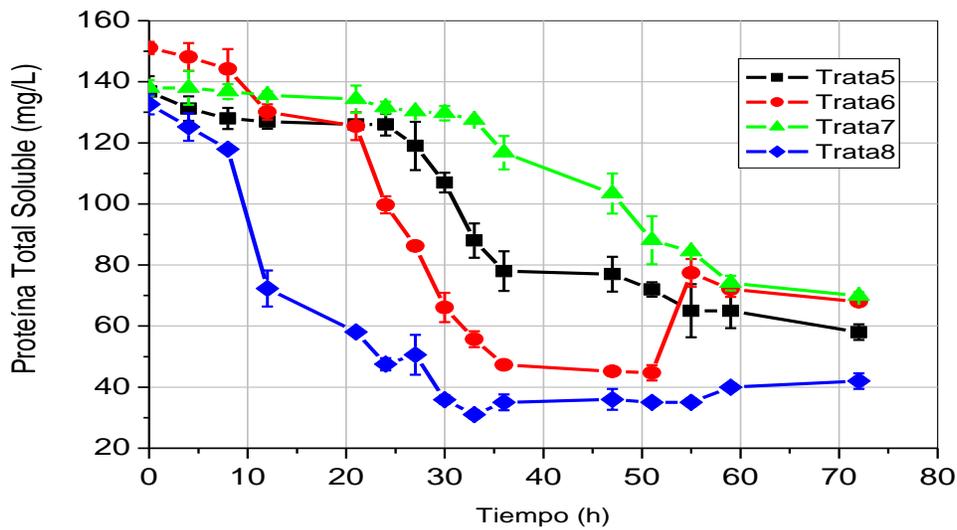


Figura 39. Degradación de proteína en los tratamientos axiales. 339 rpm, 100 mL/min (■), 361 rpm, 100 mL/min (●), 200 rpm, 46 mL/min (▲), 200 rpm, 154 mL/min (◆).

La generación de azúcares reductores en estos tratamientos axiales sigue un comportamiento bastante irregular. Esto se justifica de la misma razón que en los tratamientos factoriales, por el consumo por parte del hongo y la producción de glucosa y galactosa ocasionada por la reacción enzimática Figura 42.

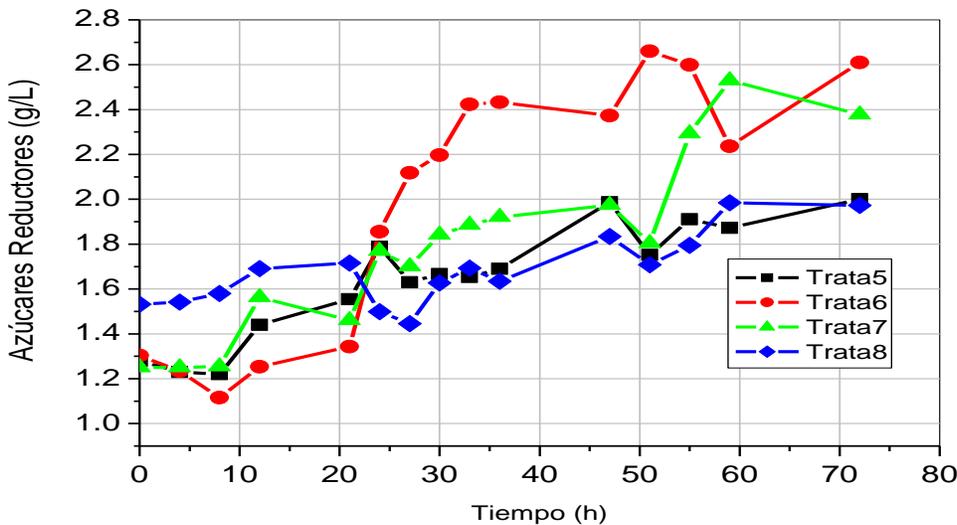


Figura 40. Generación y consumo de azúcares reductores en los tratamientos axiales. 39 rpm, 100 mL/min (■), 361 rpm, 100 mL/min (●), 200 rpm, 46 mL/min (▲), 200 rpm, 154 mL/min (◆).

Con respecto a la actividad enzimática de la β -galactosidasa, en el tratamiento 5 se registró una mayor actividad de 3043 U/g células a las 59 h y en el 6 de 3159

U/g células a las 37 h, con productividades volumétricas de 118 y 126 U/L*h; con respecto al 7 y 8 se obtuvieron 2727 U/g células, a las 72 h y 1898 U/g células a las 62 h con productividades de 75 y 50 U/L*h respectivamente (Figura 43 y 44).

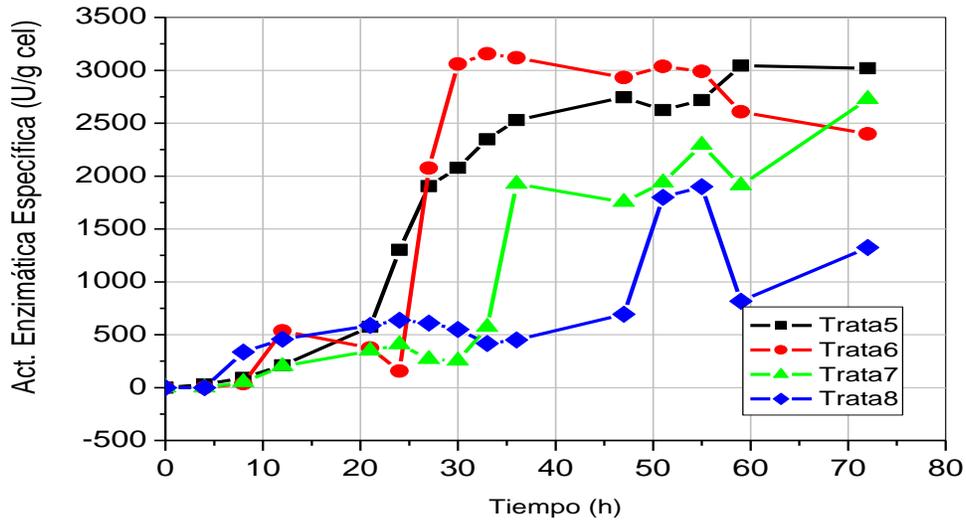


Figura 41. Actividad enzimática de los tratamientos axiales. 39 rpm, 100 mL/min (■), 361 rpm, 100 mL/min (●), 200 rpm, 46 mL/min (▲), 200 rpm, 154 mL/min (◆).

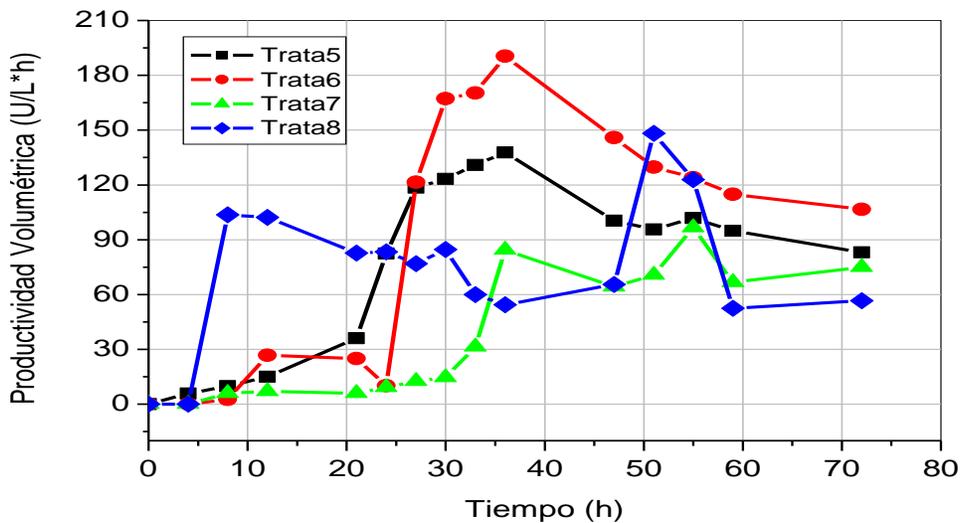


Figura 42. Productividad volumétrica de los tratamientos axiales. 39 rpm, 100 mL/min (■), 361 rpm, 100 mL/min (●), 200 rpm, 46 mL/min (▲), 200 rpm, 154 mL/min (◆).

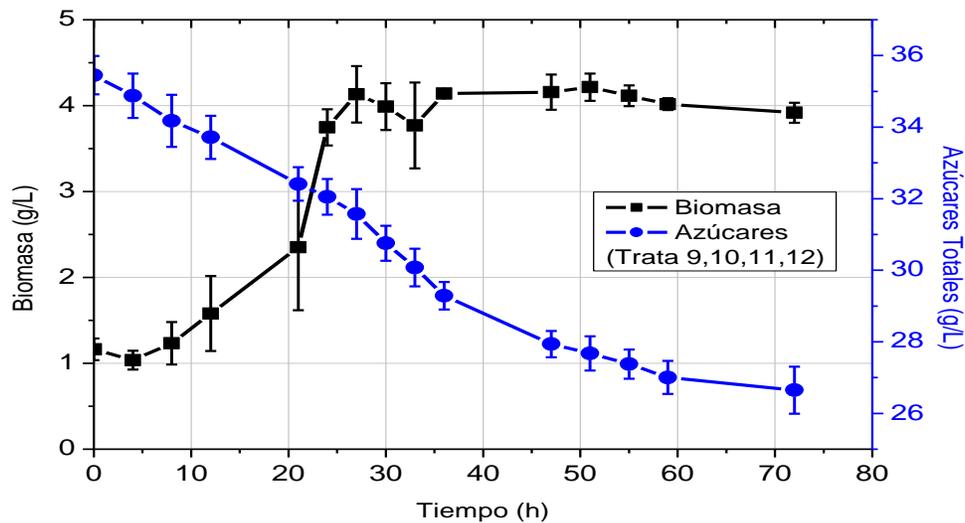


Figura 43. Cinéticas de crecimiento (■) y consumo de azúcares (●) en los tratamientos centrales (200 rpm, 100 mL/min).

Las cinéticas de crecimiento en los tratamientos centrales fueron muy similares en todos, obteniéndose concentraciones de biomasa de 3.8 g/L en promedio para los cuatro tratamientos. Un perfil similar se presenta en el consumo de azúcares totales metabolizándose 8.8 g/L, con un porcentaje de degradación de proteínas del 68 % (Figuras 45). Por otro lado, los perfiles de generación y consumo de azúcares reductores en estos tratamientos, se pueden correlacionar con la presencia de la actividad enzimática de la β -galactosidasa. A las 35 h se observa una un pico de actividad enzimática y también se presenta una mayor concentración de azúcares reductores, del mismo modo a las 53 h se vuelve a observar un pico de actividad enzimática y se presenta una elevación de los azúcares reductores, pero un poco desfasado (Figura 47).

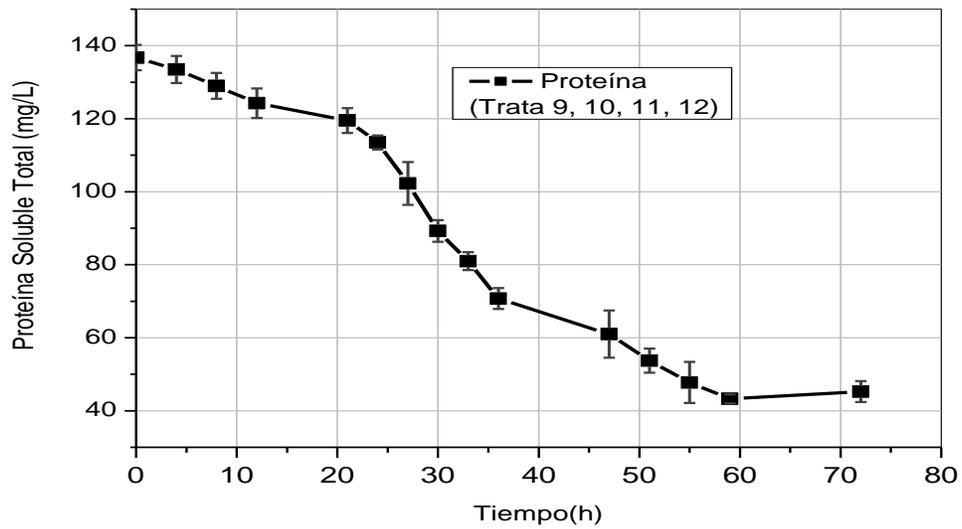


Figura 44. Degradación de proteínas en los tratamientos centrales (200 rpm, 100 mL/min).

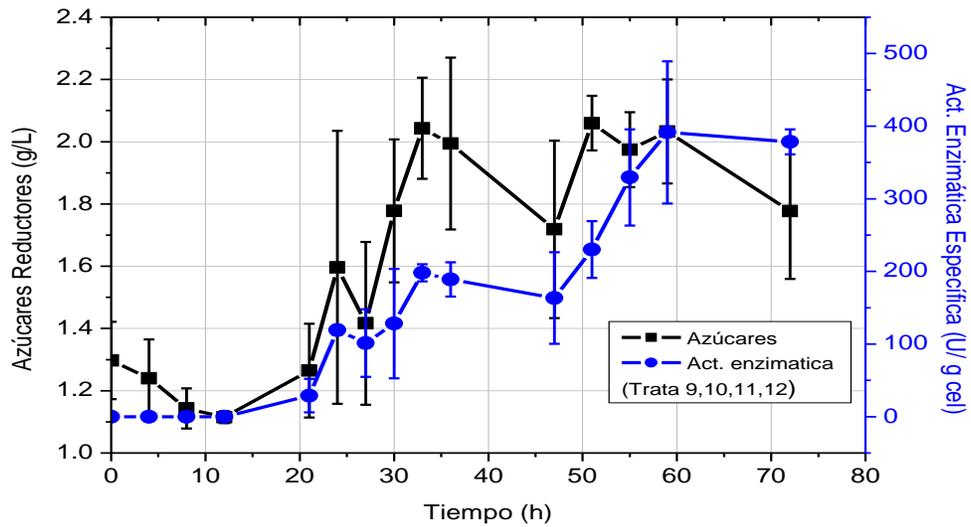


Figura 45. Consumo y generación de azúcares reductores (■); y actividad enzimática (●) en los tratamientos centrales (200 rpm, 100 mL/min).

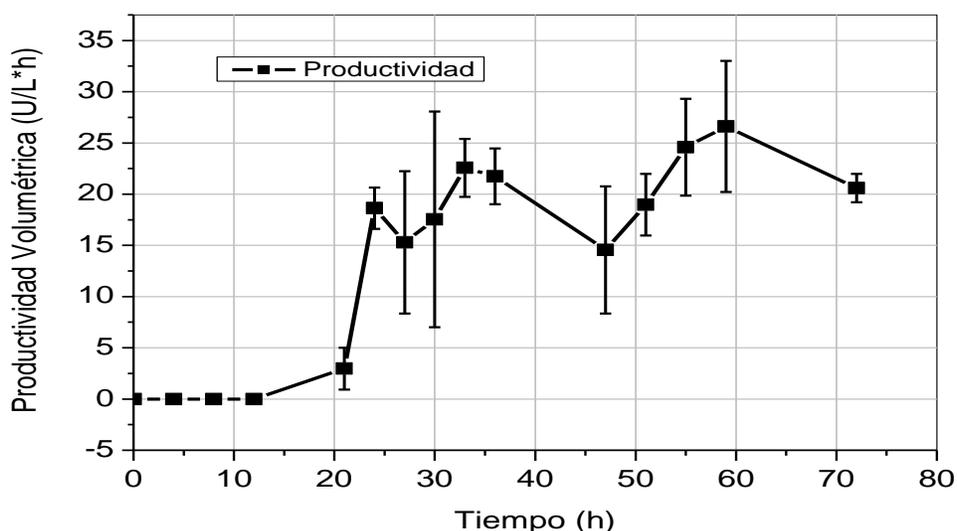


Figura 46. Productividad volumétrica promedio de los tratamientos centrales (200 rpm, 100 mL/min).

Las productividades en los tratamientos 3, 4, 5 y 6 fueron las más altas en el intervalo de 25 a 37 h de cultivo (Figuras 39 y 44) en comparación al final del cultivo (Tabla 20). En estos tratamientos la velocidad de agitación estuvo por arriba de las 250 rpm. Este resultado concuerda con los estudios realizados con la enzima glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (El-Enshansy *et al.*, 2006) donde correlacionaron la intensidad de agitación con el aumento de la producción de enzima, disminución del crecimiento (Figura 38 y 40), aumento de la respiración y formación de ácidos. Por lo tanto el tiempo óptimo de cultivo que se estableció a nivel de biorreactor fue de 27 h, operándolo a 350 rpm y 50 mL/min.

Acorde a los resultados discutidos anteriormente mantener un sistema más homogéneo, aunado a un incremento en la transferencia de oxígeno acelera el crecimiento celular, pero con una producción enzimática menor. La posible razón que explica este comportamiento, fue que cuando el biorreactor fue operado a ciertas velocidades de aireación y velocidades de agitación se tuvo un sistema más homogéneo o más aireado, por lo tanto la concentración celular máxima llegó más rápido a la fase estacionaria (tratamiento 1, 2, 8, 9, 10, 11 y 12) esto provocó un incremento en viscosidad del medio y aumento en la demanda de oxígeno. Si el suministro de oxígeno es insuficiente, la autólisis celular se presenta y esto conlleva a la disminución de la actividad de la β -galactosidasa. Por otro lado, es de notar que altas velocidades de agitación el estrés mecánico disminuye la densidad celular, por lo que mantiene un equilibrio de suministro-consumo de oxígeno, evitando a la autólisis celular, de esta manera la actividad enzimática de la β -galactosidasa se ve favorecida (tratamientos 3, 4, 5, 6 y 7). Estudios realizados por Yang *et al.*, 1998, produciendo ácido proteasa con *Aspergillus niger*, atribuyen la autólisis celular a la falta de oxígeno debido a las altas viscosidades que se presentaron en el sistema. Por lo tanto, estresar al

microorganismo mediante la entrada de energía al sistema (0.242 y 0.265 kw/m³) sin obtener densidades celulares altas, esto provocó mayor actividad de la β -galactosidasa Tabla 18.

Tabla 16. Estimación de la potencia volumétrica sin airear de acuerdo a la correlación de Rushton *et al.*, 1950. (densidad 1160 kg/m³, Np 6, diámetro del impulsor 45 mm y volumen de operación 2 L).

Tratamiento	Vel. de Agitación (rpm)	Flujo de aireación (mL/min)	P/V (kw/m ³)	Biomasa (g/L)		Act. enzimática específica (U/g células)	
				Tiempo de cultivo (h)			
				27	72	27	72
5	39	100	3.35x10 ⁻⁴	1.6	1.9	1984	3020.0
2	50	150	7.06x10 ⁻⁴	3.9	4.3	620	828.7
9-10	200	100	4.52x10 ⁻²	4.1	3.8	101	376.0
3	350	50	2.42x10 ⁻¹	1.4	2.6	3485	3052.0
6	361	100	2.65x10 ⁻¹	1.5	3.2	2075	2400.0

Uno de los aspectos que se suscitaron en el transcurso de los cultivos, fue la presencia de actividades enzimáticas mucho más elevadas a las 27 y 33 h, con respecto a las registradas al término del cultivo (72 h). Por lo tanto, se decidió realizar un análisis estadístico, canónico, regresión y una prueba de falta de ajuste a esos tiempos. En la Tabla A.12.5 (Anexo A.12), se muestra el análisis de varianza para la respuestas biomasa y actividad enzimática de 27 h de cultivo, para el modelo propuesto de biomasa, se obtuvo R² de 66.92, este valor es muy bajo indicando que solo el 66.92 % de la variabilidad de la respuesta, es explicada por el modelo; de la misma manera para la actividad enzimática se encontró un valor de R² 84.02 indicando que el 16% de la variabilidad de la respuesta no es explicada por el modelo. El análisis de varianza muestra que la velocidad de agitación, flujo de aireación, así como los efectos cruzados y cuadráticos puros no influyeron significativamente (todos mostraron un valor estadístico de probabilidad (p > 0.05) sobre la respuesta de biomasa. Por otro lado, la velocidad de agitación y su efecto cuadrático puro influyeron significativamente sobre la respuesta de actividad enzimática, mientras que el efecto cruzado y cuadrático puro del flujo de aireación no fue significativo para la respuesta. Para corroborar que los modelos no se ajustaron a los datos experimentales, la prueba de falta de ajuste fue significativamente para la respuesta de biomasa y altamente significativa para la actividad enzimática, indicativo que se deberían probar otros modelos. Por último, el análisis canónico mostró que la respuesta para la biomasa fue máxima, dado a que ambos valores propios son negativos (Tabla 19), indicando que se trata de un punto estacionario máximo (Figura 48 A). El valor propio más alto (-0.090) está asociado con el flujo de aireación y con su respectivo vector propio (0.964), el signo positivo de este vector indica que estuvo en cascada ascendente, es decir que este factor siempre estuvo maximizando la respuesta. Además es un indicativo que este factor es el que más influye sobre la respuesta de biomasa. n cuanto a, los valores propios

de la actividad enzimática. Estos son positivos, indicativo de que se trata de un punto estacionario mínimo (Tabla 19 y Figura 50 B). El valor propio más alto (169.81), está asociado con la velocidad de agitación y el vector (0.989). Su signo positivo, indica que la respuesta estuvo en cascada ascendente con este factor por lo que, la respuesta actividad enzimática es más sensible a cambios de esta variable. El análisis de varianza del DCC, para los datos de 30 h de cultivo se muestra en la Tabla A.12.6 (Anexo A.12) Tanto los efectos principales y cuadráticos puros, como su interacción mostraron un valor de p mayor a 0.05 lo que indicaba que no influyeron significativamente sobre la respuesta (biomasa); de la misma manera para la respuesta de la actividad enzimática, solo el efecto lineal y cuadrático de la velocidad de agitación presentaron valores de $p < 0.05$, indicativo de que este factor afecta significativamente a esta respuesta. La falta de ajuste indica que los datos experimentales no se ajustaron de manera adecuada al modelo, debido a que se obtuvieron valores de p muy pequeños con respecto a 0.05. Los modelos propuestos explican 69.02% y 90.40 % de la variabilidad de las respuestas biomasa y actividad enzimática, respectivamente. El análisis canónico muestra que ambas respuestas son puntos estacionarios del tipo silla, por la combinación de valores propios tanto positivos, como negativos (Tabla 17 y Figura 51 A y B); para el caso de la biomasa el valor propio más alto (0.018), está asociado con el factor velocidad de agitación indicando que esta respuesta es más susceptible a cambios por este factor, del mismo modo, en la actividad enzimática el valor propio más alto (201.95), está asociado a la velocidad de agitación. Estos dos comportamientos son similares a los observados con los datos obtenidos a las 27 h..

Tabla 17. Resultados del análisis canónico (vectores propios y valores propios) para las respuestas de biomasa y proteína a diferentes etapas de cultivo (27, 30 y 72 h).

Respuesta		Valores propios	Vectores propios	
			Velocidad de agitación (rpm)	Flujo de aireación (L/min)
27 horas de cultivo	Biomasa	-0.090	-0.265	0.964
		-0.136	0.964	0.265
	Act. enzimática específica	169.81	0.989	-0.146
		20.017	0.146	0.989
30 horas de cultivo	Biomasa	0.018	-0.118	0.993
		-0.133	0.993	0.118
	Act. enzimática específica	201.95	0.999	-0.022
		-11.68	0.022	0.999
72 horas de cultivo	Biomasa	-0.242	0.874	0.487
		-0.321	-0.487	0.874
	Act. enzimática específica	1155.79	0.999	0.037
		680.47	-0.038	0.999

En la Tabla A.12.7 (Anexo A.12) se muestra el análisis de varianza de los datos de 72 h de cultivo. En ninguno de los efectos el valor de p fue significativo

para el modelo propuesto de la respuesta biomasa; por otro lado, el único efecto cuadrático puro que fue significativo para la respuesta de la actividad enzimática correspondió a la velocidad de agitación. Los coeficientes de correlación fueron 19.8%(biomasa) y 64.54%(actividad enzimática), indicando que solo cierto porcentaje de variabilidad de la respuesta es explicado por el modelo en el primer caso, en el segundo caso existe un mayor porcentaje en explicar la respuesta

La prueba de falta de ajuste fue altamente significativa en ambos casos indicativo de que los datos experimentales no se ajustaron de manera adecuada a los modelos propuestos, o bien que se deberían probar otros modelos.

A partir del modelo propuesto, el análisis canónico mostró que la respuesta biomasa fue máxima (Figura 52 A), debido a que los valores propios obtenidos son negativos, el valor propio más alto (-0.242), está asociado al factor velocidad de agitación, lo cual quiere decir que este factor provoca mucho mayor cambio en esta respuesta durante esa etapa del proceso.

Por último, el punto estacionario es mínimo con respecto a la actividad (Figura 50B). El mismo fenómeno se presenta en la actividad enzimática, el valor propio más alto (1155.78) esta asociado a la velocidad de agitación indicando que esta respuesta es más sensible a cambios de este factor. Ambos vectores propios, asociados a lo valores propios más altos presentaron signos positivos, por lo cual quiere decir que las respuestas estuvieron cascada ascendente con la velocidad de agitación.

Tabla 18. Parámetros cinéticos de rendimientos y productividades globales obtenidos de los diferentes cultivos realizados en el biorreactor

Tratamientos	Parámetros cinéticos		
	Y(x/s) (g células/g sustrato)	Qx (g/L*h)	Qp (U/L*h)
1	0.47	0.059	50.52
2	0.45	0.060	49.72
3	0.24	0.037	113.17
4	0.31	0.041	130.69
5	0.18	0.027	83.05
6	0.26	0.044	106.66
7	0.19	0.027	74.99
8	0.29	0.042	56.67
9	Promedio (9,10,11 y 12)	0.44	0.054
10			
11			
12			
			20.72

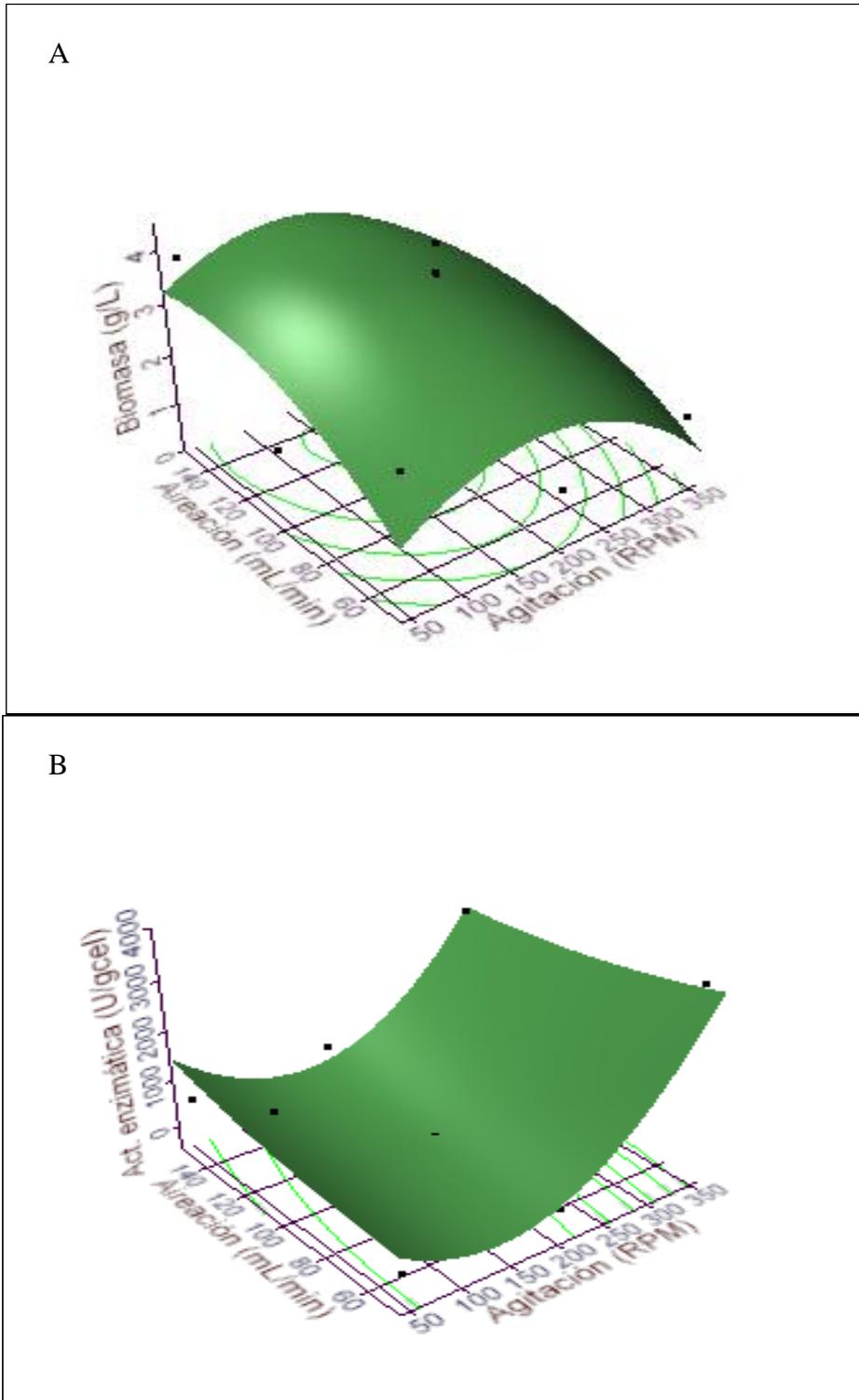


Figura 47. Representación gráfica de las respuestas biomasa y actividad enzimática específica en función de la velocidad de agitación (rpm) y flujo de aireación (mL/min) a las 27 h de cultivo. A) Biomasa, B) Act. Enzimática. Datos experimentales (puntos) y modelo (sabana).

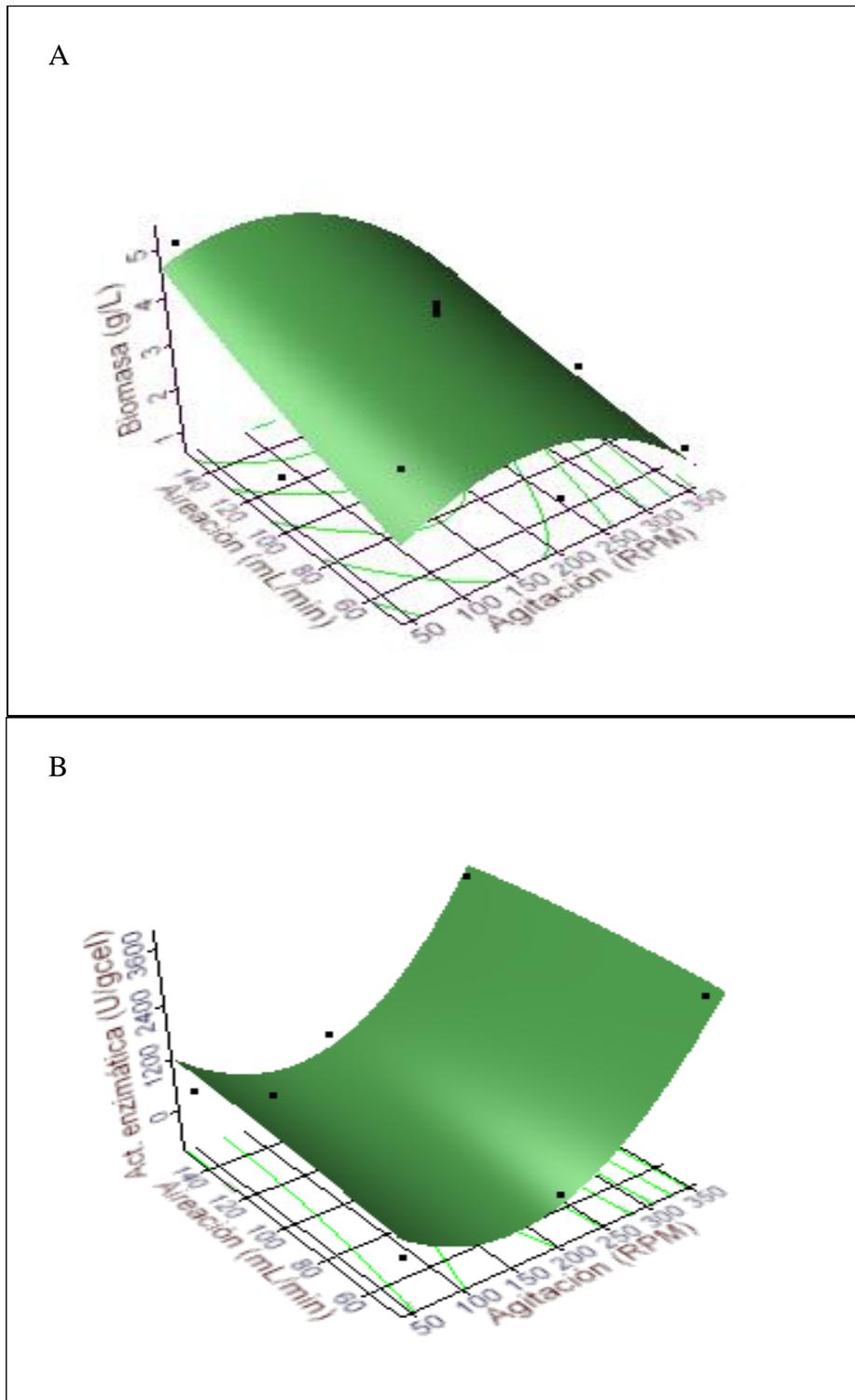


Figura 48. Representación gráfica de las respuestas biomasa y actividad enzimática específica en función de la velocidad de agitación (rpm) y flujo de aireación (mL/min) a las 30 h de cultivo. A) Biomasa, B) Act. Enzimática. Datos experimentales (puntos) y modelo (sabana).

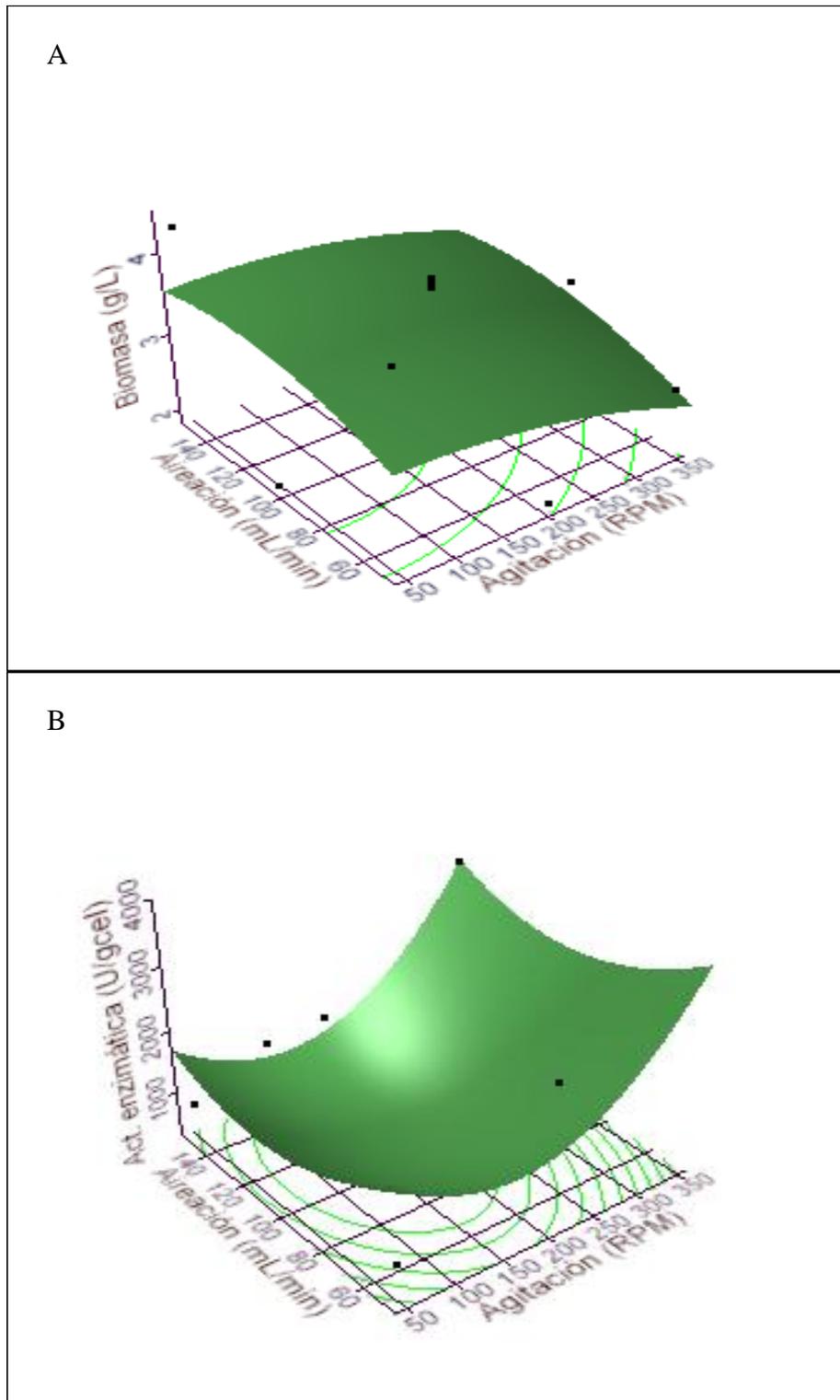


Figura 49. Representación gráfica de las respuestas biomasa y actividad enzimática específica en función de la velocidad de agitación (rpm) y flujo de aireación (mL/min) a las 72 h de cultivo. A) Biomasa, B) Act. Enzimática. Datos experimentales (puntos) y modelo (sabana).

5.7 Prueba de toxicidad aplicada al remanente obtenido del cultivo

Para que un proceso biotecnológico pueda considerarse como sustentable, debe cubrir lineamientos de protección ambiental, entre los que destacan el impacto ambiental que puedan causar las aguas residuales generadas a partir de sus bioprocesos, al ser dispuestas en cuerpos de agua sin algún tratamiento previo. Tomando en consideración lo anterior se procedió a realizar un bioensayo o prueba de toxicidad aguda utilizando semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), con la finalidad de evaluar el efecto de tóxico de compuestos o la mezcla de estos presentes en el remanente obtenido del cultivo. Como puntos finales de evaluación de los efectos fitotóxicos, se determinó la inhibición de germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo. Estos dos últimos criterios, permiten ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación de semillas de otras plantas. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación.

Tabla 19. Elongación del hipocótilo y radícula (mm), promedio de cada replicado y porcentaje de inhibición de elongación del hipocótilo y radícula, con respecto al promedio del control negativo.

Réplica	Dilución de la muestra																	
	Control				1.5%		3%		6%		12%		25%		50%		100%	
	Positivo		Negativo		Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)												
1	9.51	2.67	26.82	30.01	24.5	30.33	24	29.5	26.88	18.7	22.27	7.05	21.93	5.66	-	-	-	-
2	9.45	2.81	27.01	32.09	24.11	30.22	23.94	29.35	26.82	18.5	22.72	6.88	21.81	5.37	-	-	-	-
3	9.87	2.68	27.32	31.32	24.66	30.27	24.12	29.43	26.82	18.58	22.16	7.22	21.5	5.93	-	-	-	-
Promedio	9.611	2.72	27.05	31.14	24.42	30.27	24.02	29.42	26.84	18.54	22.38	7.05	21.74	5.65	-	-	-	-
D.S.	0.228	0.076	0.252	1.051	0.282	0.055	0.092	0.075	0.034	0.177	0.296	0.17	0.221	0.280	-	-	-	-
C.V.	2.381	2.815	0.933	3.377	1.158	0.182	0.381	0.255	0.129	0.959	1.325	2.411	1.020	4.95	-	-	-	-
% inhibición con respecto al control negativo					9.71	2.67	11.21	5.40	0.784	40.3	17.24	77.3	19.6	81.8	-	-	-	-

Con la concentración del tóxico de referencia establecida (Anexo A.9), se procedió a evaluar el remanente empleando 5 concentraciones (100, 50, 25, 12.5, 6.25 %) por triplicado incubando por un periodo de 5 días a oscuridad total y una temperatura de 22°C. Concluido el tiempo de incubación se procedió a cuantificar el número de semillas germinadas, medir la elongación del hipocótilo y radícula. En la Tabla 21, se muestra los resultados de la elongación del hipocótilo y radícula. Cabe mencionar que el valor reportado es el promedio total de las semillas germinadas de cada réplica en la correspondiente concentración. Asimismo, se muestra el promedio de elongación de hipocótilo y radícula de cada concentración, con su respectiva desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV.). Los CV obtenidos en todas las corridas estuvieron dentro del intervalo especificado (CV<30). Como se puede observar conforme se aumenta la concentración, la elongación del hipocótilo se ve disminuida en mayor proporción que la radícula hasta 6 %, pero después de esta concentración, el efecto se presenta en la radícula, teniendo un efecto más marcado sobre esta. Esto se corrobora con el porcentaje de inhibición en relación al control negativo. A partir de una concentración de 50 %, la germinación de las semillas fue nula (Tabla 22).

Las causas posibles de este efecto tóxico sobre las semillas de lechuga es la presencia y la concentración de ácidos orgánicos (glucónico, itacónico, cítrico, oxálico) en el remanente. Autores han reportado altas concentraciones de estos ácidos orgánicos empleando al suero de leche como medio de cultivo para su producción (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Murad *et al.*, 2003; Santoro *et al.*, 1999).

Dado a que la concentración por arriba de 50 % (v/v) es tóxica para las semillas de lechuga, no es posible establecer la concentración letal media (Cl₅₀), entonces se decidió realizar un análisis para determinar los parámetros NOEC y LOEC (por sus siglas en inglés No Observable Effect Concentration y Low Observable Effect Concentration). El método clásico para este tipo de análisis es el ANOVA, seguido por la prueba *a posteriori* de Dunnet.

Tabla 20. Resultados del porcentaje de mortalidad de semillas de lechuga utilizando diferentes concentraciones del remanente de cultivo y cálculo de Probit empírico.

Concentración del remanente de cultivo (%)	Log ₁₀ de la concentración (X)	Núm. de organismos (N)	Núm. de organismos muertos (r)	% de Mortalidad	Probit empírico (PE)
100	2	20	0	100	9.09
50	1.7	20	0	100	9.09
25	1.4	20	4.6	23	4.26
12	1.07	20	3.6	18	4.08
6	0.77	20	3	15	3.96
3	0.47	20	2	10	3.72
1.5	0.18	20	2	10	3.72

Se procedió a realizar el ANOVA correspondiente, obteniéndose los siguientes resultados Tabla A.12.8 (Anexo A.12). Dado a que el valor *F* calculado

no supera el valor F tabulado (No mostrado), con un nivel de significancia del 5 % se rechaza la hipótesis nula (H_0) en ambos casos, se concluye que al menos una par de medias difiere entre sí; esto se sustenta con el valor p altamente significativo.

Dado que el ANOVA indica diferencias significativas en, al menos, un par de medias, entonces se procedió a realizar una comparación múltiple medias (Prueba de Dunnet). Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla A.12.9 (AnexoA.12). A una concentración del 6 % (v/v) y 1.5 % (v/v), la elongación del y del hipocótilo y radícula no muestran diferencia significativa (valor p 0.1303 y 0.0024) con respecto al control negativo. Por lo tanto, considerando que en la radícula se presenta un efecto mayor y es más sensible al cambio de concentraciones, se establece como criterio para la toxicidad, y se establece un valor de LOEC en 1.5 % (v/v), mientras que el valor de NOEC en 3 % (v/v).

6 ANÁLISIS INTEGRAL DE RESULTADOS

El análisis integral de resultados presentados en este apartado, fueron obtenidos a partir de diseños experimentales de superficie de respuesta consecutivos. En el diseño del medio de cultivo (combinación de vinazas y suero de leche), optimización de parámetros a nivel matraz y corridas en biorreactor.

Aspergillus niger puede ser cultivado en un amplio espectro de sustratos. Sin embargo, su crecimiento en presencia de metales y sulfatos contenidos en las vinazas, resultan tóxicos para este microorganismo. Estos efectos, se ven reflejados en los rendimientos y productividades del bioproceso. Los valores máximos alcanzados fueron de $0.46 \text{ g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$ y $0.018 \text{ g}_{\text{células}}/\text{L}^*\text{h}$ con un tiempo de cultivo 165 h, cuando se combinaron vinazas y suero de leche. Cuando únicamente se empleo suero de leche como sustrato el rendimiento fue de $0.47 \text{ g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$ y una productividad celular de $0.038 \text{ g}_{\text{células}}/\text{L}^*\text{h}$ a las 95 h de cultivo; presentándose una actividad enzimática máxima de $1523 \text{ U}/\text{g}_{\text{células}}$ y una productividad de $58.51 \text{ U}/\text{L}^*\text{h}$. Comparando estos valores, cuando se combinaron vinazas y suero de leche, con respecto al rendimiento obtenido, no se observa una diferencia significativa. Sin embargo, con respecto a productividad celular, ésta aumentó dos veces más su valor cuando el sustrato fue solo suero de leche. Además, se redujo el tiempo de cultivo de 165 a 95 h, siendo 1.7 veces menor. Estos resultados muestran que es importante considerar la fuente del sustrato, así como su composición y su calidad cuando se quiere optimizar un bioproceso, independientemente de las condiciones de operación. A nivel de biorreactor, a 350 rpm, con un flujo de aireación de $50 \text{ mL}/\text{min}$ y 27 horas de cultivo, se obtuvieron los mejores resultados en términos de actividad enzimática específica, y productividad volumétrica, siendo de $3485 \text{ U}/\text{g}_{\text{células}}$ y $503 \text{ U}/\text{L}^*\text{h}$, respectivamente. Comparando estos resultados con los obtenidos a nivel de matraz; resulta que la actividad enzimática es 2.3 veces mayor y la productividad de 8.5 veces más, alta, requiriendo de un tiempo de cultivo de 27 h en lugar de 95 h. Lo anterior, también puede interpretarse como que en el biorreactor se está obteniendo con casi una $\frac{1}{4}$ parte del tiempo, pocos más del doble de actividad enzimática y una productividad 8.5 veces superior (Tabla 23).

Tabla 21. Evolución de los parámetros cinéticos en la optimización de la producción de galactosidasa a nivel matraz y biorreactor.

Nivel	Medio de cultivo	Y(x/s) (g _{células} /g sustrato)	Qx (g/L*h)	Qp (U/L*h)	Tiempo de cultivo (h)
Matraz	Vinazas + suero de leche	0.46	0.018	---	165
	Suero	0.47	0.038	58.51	95
Biorreactor	Suero	0.12	0.052	503	27

7 CONCLUSIONES

- ✧ El análisis fisicoquímico de las vinazas y suero de leche mostró similitudes en sus propiedades físicas (pH, densidad y sólidos). En cuanto a su composición química, existen diferencias importantes, por ejemplo, el contenido de carbohidratos del suero de leche, presentó una concentración del 9 % (p/V) (siete veces más que las vinazas). De la misma manera, el contenido de proteínas fue de 308.35 mg/mL en el suero de leche (cientos de veces más que las vinazas). Por ese motivo, la proporción inicial para ambos sustratos se estableció, en 10 partes de vinazas por 90 partes de suero de leche en la formulación del medio de producción.

- ✧ La concentración de biomasa y proteína total soluble donde se obtuvo un valor máximo (3.0 g_{células}/L y 159.3 mg_{proteína}/L) se registró en el tratamiento número 1 (85 partes de suero por 5 de vinazas). Con un rendimiento de 0.46 g_{células}/g_{sustrato}, y una productividad volumétrica de 0.018 g_{células}/L*h. Por otro lado, el tiempo de cultivo de 168 h no favorece la productividad del proceso cuando las vinazas están presentes en la formulación del medio de cultivo. Sin embargo, cuando se utiliza únicamente suero de leche, el tiempo de cultivo es reducido significativamente. Aunado a esto, el análisis canónico realizado muestra un efecto positivo del suero de leche sobre la biomasa y proteína. Por lo tanto, para poder maximizar ambas respuestas (concentración de biomasa y proteína), así como, mejorar los rendimientos y productividades se decidió suprimir la adición de las vinazas al medio de cultivo.

- ✧ Las condiciones ambientales óptimas a nivel de matraz, fueron temperatura 25°C, agitación 200 rpm y 80 horas de cultivo, encontrándose una concentración máxima de 3.81 g/L de biomasa y 148.9mg/L de proteína. Con un rendimiento de 0.64g_{células}/g_{sustrato}, productividades volumétricas de producto y biomasa de 48.10 U/L*h; y 0.038g_{células}/L*h, respectivamente. Mientras que la máxima actividad enzimática (1523 U/g_{células}), se registró a 28°C, 226 rpm y 95 horas de cultivo. El rendimiento y las productividades en esta condición, fueron de 0.47g_{células}/g_{sustrato}, 58.51 U/L*h, 0.038g_{células}/L*h, respectivamente. Prácticamente, la entrada de energía (Kw/m³) al medio de cultivo mediante la velocidad de agitación influyo determinante en el crecimiento del hongo y la actividad de la β-galactosidasa a 0.45 Kw/m³ fue donde se obtuvo la máxima actividad.

-
- ⌘ Las condiciones de proceso establecidas a nivel de biorreactor fueron: 1) Uso de un antiespumante tipo A grado biofarmacéutico a una concentración del 10%(v/v), con un gasto total en promedio de 50 mL en todas las corridas. 2). La operación del biorreactor a 350 rpm, flujo de aireación de 50 mL/min, 27 h de cultivo y con una entrada de energía al sistema de 0.242kw/m³ (tratamiento 3), fue donde se obtuvo una actividad enzimática máxima de 3485 U/g_{células}, con una productividad de 503 U/L*h). De acuerdo análisis canónico, antes de las 27 h el flujo de aireación fue el factor que mas influyo en la producción de biomasa, mientras que la actividad enzimática fue afectada por la velocidad de agitación. Al término del cultivo (72 h) la velocidad de agitación fue la que mas afecto ambas respuestas.
- ⌘ La productividad celular se incremento 2 veces más cuando *Aspergillus niger* fue cultivado únicamente en suero de leche (0.038g_{células}/L*h), que cuando lo fue con vinazas y suero de leche (0.018 g_{células}/L*h). Asimismo, el tiempo de cultivo se acorto 1.7 veces menos, pasando de 165 h a 95 h. Por otro lado, la actividad enzimática y la productividad volumétrica, a nivel de reactor, fueron 2.3 y 8.5 veces más (3485 U/g_{células} y 503U/ g_{células}*L), que los obtenidos a nivel de matraz (1523 U/g_{células} y 58.51 U/g_{células}*L). Aunado a esto, el tiempo de cultivo fue reducido de 95 h a 27 h (3.5 veces menos). En términos energéticos, se pasó de 0.450 kw/m³ (matraz) a 0.242 kw/m³ (biorreactor), es decir 1.8 veces menos energía. Por lo tanto, cultivar *Aspergillus niger* en un sustrato que le provee los nutrimentos necesarios para su metabolismo, bajo condiciones ambientales idóneas y transferencia de masa y de energía eficiente, se traduce en altos rendimientos y productividades del bioproceso.
- ⌘ El remanente líquido del cultivo resultó toxico para las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*). Observándose que cuando la concentración adicionada es superior al 50%, se presenta una taza de mortalidad del 100%. Los porcentajes determinados para la concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC) y la concentración de efecto no observable (NOEC) fueron de 3% y 1.5% (v/v), respectivamente. Por lo tanto, la descarga del líquido remanente a cuerpos de agua, sin algún tratamiento previo, tendría efectos tóxicos a corto, a mediano y largo sobre ese ambiente.

8 PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

Las recomendaciones para una futura investigación, las cuales surgen después de los análisis de resultados del presente trabajo de investigación están dentro de los siguientes rubros:

- ⌘ Realizar un estudio reológico para observar el esfuerzo de corte sobre el micelio y de esta manera correlacionar el efecto que se tiene sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*.
- ⌘ Utilizar los criterios de operación expuestos a nivel de biorreactor para abordar el problema de reproducibilidad a otros niveles.
- ⌘ La entrada de potencia específica de 0.242 kw/m³ al sistema, muestra una oportunidad amplia de investigación para escalar el bioproceso a nivel planta piloto, empleando como medio de cultivo suero de leche y *Aspergillus niger*.
- ⌘ Realizar estudios de cambios fisiológicos y morfológicos de *Aspergillus niger* en cultivos a nivel biorreactor.
- ⌘ Realizar estudios sobre el perfil de oxígeno para elevar la productividad modificando la velocidad de agitación y flujo de aireación.
- ⌘ Efectuar ensayos de recuperación y purificación de la enzima β-galactosidasa, para determinar si el bioproceso es técnicamente y económicamente factible.
- ⌘ Es importante ampliar nuestra visión de trabajo en cuanto a los bioprocesos de producción a nivel planta piloto, los cuales seguramente conducirán a nuevas perspectivas de escalamiento

9 BIBLIOGRAFÍA

Adams, V. D. (1991). *Water & Wastewater Examination Manual*. Lewis Publishers, Chelsea, MI. 111-12.

Ali, S. y Haq, I. (2001). Submerged fermentation of citric acid: Counter-act effect of Cu^{2+} on the deleterious effect of Fe^{2+} in black strap molasses. *Online J. Biology Sci.* 1:852-853.

Ali, S. y Haq, I. (2005). Role of different additives and metallic micro minerals on the enhanced citric acid production by *Aspergillus niger* MNNG-115 using different carbohydrates materials. *J. Basic Microbiol.* 1:3-11.

Almazán, O., Klibansky, M. y Otero, M. (1982). Producción de proteína unicelular a partir de subproductos de la industria azucarera. Editorial Científico Técnica, La Habana, pp. 77.

American Public Health (APHA) (1998). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. Water Pollution Control Federation (WPCF), American Water Works Association (AWWA).

Antonucci, S., Bruvi, M., Bubbico, R., Dimichili, A. y Verdone, N. (2001). Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme and Microbial Technology*. 28:189-195.

Araujo, N. (1976). Producao de biomassa fungica do vinh ito. *Inf. Int.* 10 (14):12-19.
Archer, D. B. (2002). Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. *Current Opinions in Biotechnol.* 11:478-483.

Azúcar S.A. (1996). Desarrollo operativo. Comité de la agroindustria azucarera. Resultados Zafra. 1993-94. Informe preliminar.

Bailey, J. y Ollis, D. (1977). *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York, Mc Graw Hill Book Company.

Baumgartner, C. y Hinrichs, J. (2000). Sweet products without sugar additives. *DMZ, Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*. 121(15): 635-639.

Ben-Hassan, R.M. y Ghaly, A.E. (1994). Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 47:89-105.

Bhargava S., Wenger, K. y Marten, M. (2003). Pulsed addition of limiting-carbon during *Aspergillus oryzae* fermentation leads to improved productivity of recombinant enzyme. *Biotechnol. Bioeng.* 85(1): 111-117.

Bennett, J. W. y Klich, M.A. (1992). *Aspergillus*. Biology and Industrial Applications. Butterworth-Heinemann, U.S.A. 155-195.

Berovic, M. y Cimerman, A. (1979). Foaming in submerged citric acid fermentation on beet molasses. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 7:313-319.

Bortles, H. (1986). Amino acid and nucleic acid metabolism. *Century in Bakhtan Abstracts*.11:95.

Box, G. y Wilson, K. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Royal Statistic. Soc.* (Series B) 13:1-45.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Bravo, I. y Giraldo, E. (1996). Vinazas: transformación de un residuo contaminante en un residuo útil. *Unicauca Ciencia*.1:55-65.

Buchholz, K. y Kasche, V. (2004). Biocatalysts and enzyme technology, VCH, Weinheim.

Büchs, J., Maler, U., Milbradt, C. y Zoels, B. (2000). Power consumption in Shaking Flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnol.and Bioeng.* 68(6): 589-593.

Caballero, R., Olguín, P., Cruz-Guerrero, A., Gallardo, F., García-Garibay, M. y Gómez-Ruiz, C. (1995). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. *Food Research International.* 28 (1):37-41.

Campbell, A.K, Waud, J.P. y Matthews, J.P. (2005).The molecular basis of lactose intolerance. *Sci. Progress.* 88:157-202.

Carlile, M.J. y Watkinson, S.C. (1994). The fungi. *Academic Press Inc*.1-482.

Cladera-Olivera, F., Caron, G.R, y Brandelli A. (2004). Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 21:53-58.

Cheethan, P. (1987). Case studies in the applicants of immobilized biocatalysts in pharmaceutical and chemical industries, in : Rehm, H. J. , Reed G. (Eds.) *Biotechnology*, 7a, 653-684. Verlas Chemic, Weinheim.

Cortés, G., Mauricio, A., Trujillo-Roldan, Ramírez, O. T. y Galindo, E. (2004). Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. *Process Biochem.* 40:773-778.

Crawshaw, R. (2001). Milk Processing, in Co-product Feeds: Animal feeds from the food and drinks industries. *Nottingham University Press*.147-159.

Cristiani-Urvina, E., Netzahuatl-Muños, A.R., Manriquez-Rojas, F.J., Juárez-Ramírez, C., Ruiz-Ordaz, N. y Galindez-Mayer, J. (2000). Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed yeast cultures. *Process Biochem.* 35(7):649-657.

Cruz-Hernández, M., Augur, C., Rodríguez, R., Contreras-Esquivel, J.C., y Aguilar C. N. (2006). Evaluation of Culture Conditions for Tannase Production. *Food Technol. Biotechnol.* 44:541-544.

Crueger, W. y Crueger, A. (1989). Biotechnology A. Textbook of industrial microbiology. 2nd. Ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Ma.

Cutler, P. (2004). Protein Purification Protocols: Methods in Molecular Biology, Vol. 244, 2nd Ed. Humana Press. Totowa, N. J.

Dagbagli, S. y Goksungur, Y. (2008). Optimization of b-galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *J. of Biotechnol.* 11(4):1-12.

Daniel, S. y Brauer, H. (1994). Continuous production of citric acid in the reciprocating-jet-bioreactor. *Bioprocess Eng.* 11:123-127.

Domingues, L., Onnela, M.L., Teixeira, J. A., Lima, N., Penttila, M. (2000). Construction of a flocculent brewer's yeast strain secreting *Aspergillus niger* b-galactosidase. *App. Microbiol. Biotechnol.* 54(1): 97-103.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamiltom, J.K. y Rebers, P. A. (1966). Colorimetrics methods for determination of sugar and related substances. *Biochem.* 28:350-356.

El-Enshasy, H., Kleine, J. y Rinas, U. (2006). Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. *Process Biochem.* 41:2103-2112.

El-Holi, M. y Al-Delaimy, K.S. (2003). Citric Acid Production from Whey with Sugars and Additives by *Aspergillus niger*. *African J. Biotechnol.* 2:356-359.

Elliott, D.C., Wend, C.F. y Alnajjar, M.S. (2001). Lactose processing technology-creating new utilization opportunities. Proceedings of the 38th *Annual Marschall Cheese Seminar*, "Tools of theTrade". California Dairy Research Foundation.

Estévez, R. E. (1999). Manual de Operaciones de las plantas de levadura de Vinazas, La Habana, Cuba.

Falanche, H. (1962). Production of Mushroom Mycelium as a Protein and Fat Source in Submerged Culture in Medium of Vinasse. *Boiphys*.10:572-576.

Fekete, E., Karaffa, L., Sándor, E., Seiboth, B., Biro, S., Szentirmai, A. y Kvbicek, C.P. (2002). Regulation of formation of the intercellular β -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. *Archives Microbiol.* 179(1):7-14.

Furlan, S.A., Schneider, A.L.S., Merkle, R., Carvalho-Jonas, M.F. y Jonas, R. (2000). Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of β -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Letters.* 22(7):589-593.

Furlan, S.A., Schneider, A.L.S., Merkle, R., Carvalho-Jonas, M.F. y Jonas, R. (2001). Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of β -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose free medium. *Acta Biotecnológica.* 21(1): 57-64.

Gallo, B., Ospina, P. y Santos, V. (1986). Evaluación preliminar de la vinaza, un desecho de la destilería, como posible fuente de nutrientes en la alimentación de aves. *Acta Agronómica.* 36:207-220.

Galindo, E., Bolivar, F. y Quintero, R. (1990). Maximizing the expression of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* by manipulation of culture conditions. *J. of Fermentation and Bioengineering.*69(3):159-165.

García-Garibay, M. (1996). Usos de beta-galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos. *Rev. Invest. Clin.* 48:51-61.

Ghaly, A.E. y Kamal, M.A. (2004). Submerged Yeast Fermentation of Acid Cheese Whey for Protein Production and Pollution Potential Reduction. *Water Research.* 38(3):631-644.

Godfrey, F. y West, S. (2004). Introduction to industrial enzymology in: Godfrey T., West, S. (Ed) *Industrial Enzymology.* 1-8.

Gómez, R., Schnabel, I. y Garrido, J. (1988). Pellet growth and citric acid yield of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 10:188-91.

Gómez Toro, J.M. (1985). Efecto de la vinaza sobre la producción de caña de azúcar bajo tres regímenes de fertilización mineral. *Bioagro.* 7(1):22-28.

Gómez Toro, J.M. (1996). Efecto de la aplicación de la vinaza en la producción y la calidad de la caña de azúcar. *Caña de Azúcar.* 14(1):15-24.

Gonzales-Siso, M.L. (1996). Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed yeast cultures. *Process Biochem.* 57:1:11.

Grimm, L.H., Kelly, S., Völkerding, I.I., Krull, R. y Hempl, D.C. (2005). Influence of mechanical stress and surface interaction on aggregation of *Aspergillus niger* conidia. *Biotechnol. Bioeng.* 92:879-888.

Grda, S., Stehlik-Tomás, V., Stanzer, D., Vaheie, N. y Škrln, A. (2002). Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for Alcohol and Biomass production on Whey. *Chem. and Biochem. Engineering Quarterly.* 16(1):13-16.

Hamid, H.M., Khalit-ur-Rehman, Zia, A.M. y Asgher, M. (2003). Optimization of Various Parameters for the Production of Glucose Oxidase from Rice Polishing Using *Aspergillus niger*. *Biotechnol.* 2(1):1-7.

Haround, S.A. y Ibrahim, A.H. (2003). Whey Induced-Modifications in Growth, Photosynthetic Characteristics, Proteins patterns and Water Relations of Wheat Seedlings. *Biotechnol.* 2(2):141-143.

Honig, P. (1969). Principios de tecnología azucarera. CECSA, México.

Hornbæk, T., Nielsen, A.K., Dynesen, J. y Jakobsen, M. (2004). The effect of inoculum age and solid versus liquid propagation on inoculum quality of an industrial *Bacillus licheniformis* strain, *FEMS Microbiol. Letters.* 236:145-151.

Houts, S.S. (1988). Lactose intolerance. *Food Technol.* 3:110:113.

Hus, C.A., Yu, R.C. y Chou, C.C. (2005). Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. *International J. of Food Microbiol.* 104(2):197-206.

Humfeld, H. (1948). The production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture. *Sci.* 1(4):107-373.

Ikran-UI, H., Ali, S., Qadeer, M. A. y Iqbal, J. (2004). Citric acid production by mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. *Bioresource Technol.* 93:125-130.

Ikram-ut-Haq, Javed, S. y Ashraf, H. (2003). Production of Amyloglucosidase by UV Irradiated Strain of *Aspergillus niger*. *Biotechnol.* 1(1):34-39.

ICIDCA. 2000. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Manual de los Derivados de la Industria Azucarera. Editorial Científico Técnica, La Habana, Cuba. p 409.

James, C. P. (1991). Manual del azúcar de caña. Ed. Limusa-noriga, México.

Jelen, P. (1979). Industrial whey processing technology: an overview. *J. Agriculture Food Chemistry.* 27(4):658-661.

Jelen, P. (2003). Whey processing. In H. Roginski, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.). *Encyclopedia of dairy sciences*. 4:2739-2751. London: Academic Press.

Kononovich, N. (1979). Whey utilization and whey products. *J. Dairy Sci.* 62(7):1149-1160.

Konsoula, Z. y Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007). Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technol.* 98(1):150-157.

Keith, G. T. y Colin, R. T. (1992). Mycelial Morphology: The effect of spore inoculum level. *Biotechnol. Letters.* 14(11):1071-1074.

Kumar, V. J., Shahbazi, A. y Mathew, R. (1998). Bioconversion of solid food wastes to ethanol. *Analyts.* 123:497-502.

Landero, M. (2000). Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology.* 27: 583-592.

Leal, G.I., Chirinos, E., Leal, M. Moran, H. y Barrera, W. (2006). Caracterización fisicoquímica de la vinaza del *Agave cocui* y su posible uso agroindustrial. Centro de Investigación de Ciencias Aplicadas y Departamento de Química. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda.

Li, Z.J., Shukla, V., Fordyce, A.P., Pedersen, A.G., Wenger, K.S. y Marten, M.R. (2000). Fungal morphology and fragmentation behavior in a fed-batch *Aspergillus oryzae* fermentation at the production scale. *Biotechnol. Bioeng.* 70(3):300–312.

Liese, A., Scelbach, K. y Wandrey, C. (2000). *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim.

Liu C-H., Lu W.-B. y Chang J.-S. (2006). Optimizing lipase production of *Burkholderia sp.* by response surface methodology. *Process Biochem.* 41:1940-1944.

Mahoney, R. R. (1985). Modification of lactose and lactose-containing dairy products with β -galactosidase. In: *Developments in Dairy Chemistry*, Vol. 3. (P.F. Fox, ed.). *Elsevier Appl. Sci. Publish.*, New York, NY, pp. 69-110.

Mandenius C.F. y Brundin A. (2008). Bioprocess Optimization Using Design of Experiments Methodology. *Biotechnol.* 24:1191-1203.

Marten, M. R., Wenger, K. S. y Khan, S. A. (1997). Rheology, mixing time, and regime analysis for a production-scale *Aspergillus oryzae* fermentation. In *Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics*; Nienow, A. W., Ed.; BHR Group, Cranfield, U.K.

Marwaha, S. S. y Kennedy, J.F. (1988). Review: "Whey pollution problem and potential utilization". *Int. J. Food Scis. Technol.* 23:323-336.

Mazutti M., Bender J.P., Treichel H. y Di Luccio M.(2006). Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme Microbiol. Technol.* 39:56-59.

Mead, R. y Pike, D. (1975). A review of response surface methodology from a biometric viewpoint. *Biometric.* 31:803-851.

Mehyar, G.F., Delaimy, K.S. y Ibrahim, S.A. (2005). Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Using Date-Based Medium Fortified with Whey and Additives. *Food Biotechnol.*19:137-144.

Montgomery DC. (2005). Diseño y Análisis de Experimentos, 6th ed. New York: Wiley.

Miller, J. (1972). Experiments Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 352-355.

Moo-Young, M. (1985). Comprehensive Biotechnology. The Principles, Applications & Regulations of Biotechnology in Industry, *Agriculture and Medecine*. Vol. 4 Pergamon Press, Ontario. 501, 666, 827, y 833-868.

Moreno, R.G., Rodríguez. R.F. de J., Jiménez, T.C. y Noyola, R.A.(1990). Tratamiento anaerobio de vinazas de alcohol de caña con reactores UASB: arranque del proceso y reducción de su inhibición. *En memorias del VII Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. Oaxaca, Oxa. México. C172-C178.

Mukhopadhyay, R., Chatterje, S., Chatterje, B.P., Banerje, P.C. y Guha, A.K. (2005). Production of glucónic acid from whey by free and immobilized. *International Dairy J.* 15:299-303.

Murad, A. y El-Holi Al-Delaimy, S.K. (2003). Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. *African J. of Biotechnol.* 2(10):356-359.

Myers, R.; Khuri, A. y Carter, W. (1989) Response surface methodology: 1966-1988. *Technometric.* 31:137-157.

Negi S. y Banerjee R. (2006). Optimization of amylase and protease production from *Aspergillus awamori* in single bioreactor through EVOP factorial design technique. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 257-261.

Nijpels, H.H. (1998). Lactases and their applications. En enzymes and food processing. G.G. Birch, B. Blakebrach y K.J. Parker (Ed.). *Applied Science Publishers*. 89-104.

Novelli, G. y Reichardt, J.K. (2000). Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present, and future. *Molecular Genetics and Metabolism*. 71:62–65.

Noyola, R. A. y Briones, M.R. (1988). Tratamiento anaerobio de vinazas a escala piloto: inoculación y arranque de reactores tipo lecho de lodos y filtro anaerobio. Memorias del IV congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Querétaro, Qro.

Organization for Economic Cooperation and Development (1984). *Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals* N °208, OECD Publications Service, Paris.

O'Donnel, A., Bai, Y., Bai, Z., McNeil, B. y Harvey, L.M. (2007). Introduction a biorreactor of Shake-flask inocula leads to development of oxidative stress in *Aspergillus niger*. *Biotech*. 11:12-15.

Ohoma, C.E. y Ikenebomeh, M.J. (2005). Production of *Aspergillus niger* Biomass from Rice Bran. *Pakistan J. Nutrition*. 4(1):32-35.

Pablo L., Nikel M., Pettinari J., Beatriz S. y Miguel A. (2005). Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly(3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial byproducts. *International Microbiol*. 8:243-250.

Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. *Biotechnol. Adv*. 22: 189-259.

Papagianni, M. y Matthey, M. (2006). Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. *Microbial Cell Factories*. 5-3.

Papagianni, M., Matthey, M. y Kristiansen, B. (1998). Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor. *Biochem*. 2:197-205.

Papagianni, M. y Moo-Young, M. (2002). Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Process Biochem*. 37:1271-1278.

Papagianni, M., Nokes, S.E. y Filer, K. (2001). Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger* effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. *Food Technol. Biotechnol*. 39:319-326.

Panesar, P.S., Panesar, R., Sing, R.S., Kennedy, J.F. y Kumar H. (2006). Microbial production, immobilization and application of β -D-galactosidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81:530-543.

Peña, C., Peter, P.C., Büchs, J. y Galindo E. (2007). Evolution of specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks. *J. Biochem. Engineering.* 36: 73-80.

Peterson, A.E., Walker, W. G. y Watson, K.S. (1979). Effect of whey applications on chemical properties of soils and crops. *J. Agriculture Food Chemistry.* 24(4):654-658

Pey-Jin, L., Sholz, A. y Krull, R. (2010). Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. *Biochem Engin. J.* 49: 213-220.

Purwanto, A.L., Ibrahim, D. y Sudrajat, H. (2009). Effect of agitation speed on morphological changes in *Aspergillus niger* hyphae during production of tannasa. *World J. Chemistry.* 4(1):34-38.

Quintero, R.R. (1981). Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones. Alhambra Mexicana. México.

Rahardjo, Y.S., Sie, S., Weber, F.J., Tramper, J. y Rinzema, A. (2005). Effect of low oxygen concentrations on growth and alpha-amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. *Biomol. Eng.* 21:163-172.

Rajoka, M.I., Khan, S. y Shahid, R. (2003). Kinetics and regulation studies of the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. *Food Technol. and Biotechnol.* 41(4):315-320.

Rand, A.G. y Linklater, P.M. (1973). The use of enzymes for the reduction of lactose levels in milk products. *Aust. J. Dairy Technol.* 6: 63-67.

Ravinder, R., Anju, K.C., Venketeshwer, R. L. y Ravindra, P. (2006). Optimization of Protein Enrichment of Deoiled Rice Bran by Solid state Fermentation Using *Aspergillus oryzae* MTCC1846. *Int. J. Food Eng.* 2(4):1.

Rech, R. y Záchia, A. M.A. (2007). Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. *Process Biochem.* 42:873-877.

Rezessy-Szabo, J.M., Bujna, E. y Hoschke, A. (2002). Effect of different carbon and nitrogen sources on α -galactosidase activity originated from *Thermomyces lanuginosus* CBS 395. 62/B. *Acta Alimentaria.* 31(1):73-82.

Rodella, A., Ferrari, S. (1977). A composicao da vinhanca e efeitos de sua aplicacao como fertilizante na cana de azúcar. *Brasil Acucareiro*. 90(1):6-13.

Rodríguez, R. F. de J. (1993). Tratamiento de vinaza empleando reactores anaerobios avanzados (UASB y FA) con alimentación de H₂S. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química, UNAM. México D.F

Ruijter, G.J., Kubicek, C.P. y Visser J. (2002). Production of organic acids by fungi. *Livre*. 213-227.

Rushton, J.H., Costich, E.W. y Everett, H.J. (1950). Power characteristics of mixing impellers: part I. *Chem. Eng. Prog.* 46:395-404.

Saad, R. R. (2004). Purification and some properties of β -galactosidase from *Aspergillus japonicus*. *Annals of Microbiol.* 54(3):299-306.

Sánchez, S. E., Montalvo, S. y Travieso, L. (1993). Caracterización y tratamiento de residuales de destilería de alcohol. En Memorias del IX Congreso de la Sociedad Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, México D. F., III-142 a III-151.

Santoro, R., Cameselle, C., Rodríguez-Couto, S. y Sanromán, Á. (1999). Influence of Milk Whey, Nitrogen and Phosphorus Concentration on Oxalic Acid Production by *Aspergillus niger*. *Bioprocess Engineering*. 20:1-4.

Saura, G., Valdez, L. Martínez, A., Reyes, E., Pascual, A. y Otero, A. (2002). Tecnología de producción de levadura utilizando las vinazas de destilería como fuente mayoritaria de carbono y energía. Instituto Cubano de Investigaciones del los Derivados de la caña de azúcar (ICIDCA). 36(2):20.

Schultz, N., Chang, L., Hauk, A., Reuss, M. y Syldatk, C. (2006). Microbial Production of Single-Cell Protein from Desproteinized Whey Concentrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:515-520.

Smith, J.J., Lilly, M. D. y Fox, R.L. (1990). The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 35:1011-1023.

Soliman, N.A., Berekaa, M.M. y Abdel-Fattah, Y.R. (2005). Polyglutamic acid (PGA) production by *Bacillus* sp. SAB-26: application of Plackett-Burman experimental design to evaluate culture requirements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:259-267.

Torres-Bacete, J., Arroyo, M., Torres-Guzman, R., De La Mata, I., Acebal, C. y Castillon, M.P. (2005). Optimization of culture medium and conditions for penicillin acylase production by *Streptomyces lavendulae* ATCC 13664. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 126:119-131.

Ujcova, E., Fencel, Z., Musilcova, M. y Seichert, L. (1980). Dependence of release of nucleotides from fungi on fermentor turbine speed. *Biotechnol. Bioeng.* 22:237-41.

Villegas de Gante, A. (2000). Tecnología quesera. *Trillas*, pp. 13-53, 76-87, 316-324.

Waliszewski, K. (1989). Valor nutritivo de las vinazas concentradas. *Tecnología Avipecuaria.* 2(19):19-25.

Wang, L., Ridgeway, D., Gu, T. y Moo-Young M. (2003). Effect of process parameters on heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78: 1259-1266.

Wongwicharn, A., Harvey, L.M. y McNeil, B. (1999a). Secretion of heterologous and native proteins, growth and morphology in batch cultures of *Aspergillus niger* B1-D at varying agitation rates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74:821-828.

Wongwicharn, A., McNeil, B. y Harvey, L.M. (1999). Effect of oxygen enrichment on morphology, growth, and heterologous protein production in chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1-D. *Biotechnol Bioeng.* 65(4):416-424.

Xie, L., Hall, D., Eiteman, M.A. y Altman E. (2003). Optimization of recombinant aminolevulinic acid synthase production in *Escherichia coli* using factorial design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:267-273.

Yang, F-C. y Lin, L-H. (1998). Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* 23(1):397-402

Yang, S.T. y Silva, E.M. (1995). Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *J. Dairy. Sci.* 78:2541-2562.

Páginas de internet

SAGARPA (2007). Anuario pecuario. leche de vaca. (en línea). www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdetpec.html

SWISS-PROT (2005). Libro electrónico. Market of Beta-galactosidase. (en línea). www.kr.expasy.org/enzyme/

10 ANEXOS

Anexo A.1. Cuantificación de azúcares totales “Método Fenol-Sulfúrico” (Dubois et al., 1976).

Fundamento

Los ácidos concentrados al reaccionar con los carbohidratos producen un furfural, o derivados de él, que se condensan con un compuesto fenólico produciendo compuestos coloridos característicos.

Reactivos

Fenol al 5%.

H₂SO₄ concentrado.

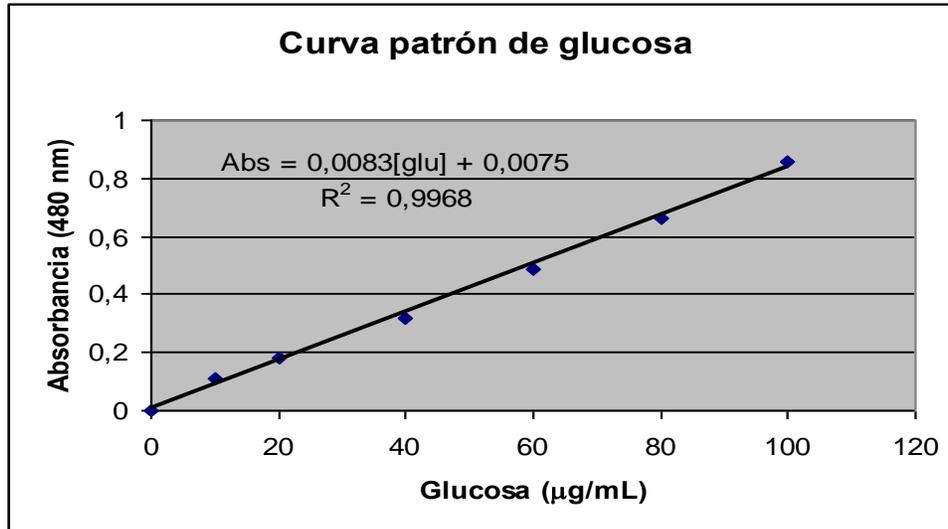
Procedimiento

1. Construir una curva patrón de glucosa que contenga al menos 5 soluciones con concentraciones de glucosa diferentes en un intervalo de entre 100 a 10 mg/mL.
2. Mezclar en tubos de ensaye 1 mL de la solución stock, con 1 mL de una solución de fenol al 5% y con 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
3. Agitar cuidadosamente y con uniformidad.
4. Dejar reposar por 10 min. a temperatura ambiente.
5. leer la absorbancia en un espectro a una longitud de onda de 480 nm.

Tabla A.1. Curva patrón de glucosa

Tubo	Sol. Stock 1mg/mL (mL)	H ₂ O (mL)	Concentración final [μg/mL]	Fenol 5% (mL)	Absorbancia (480 nm)
1	10	0	100	1	0.859
2	8	2	80	1	0.661
3	6	4	60	1	0.489
4	4	6	40	1	0.320
5	2	8	20	1	0.184
6	1	9	10	1	0.112

Más 5 mL de ácido sulfúrico



Gráfica A.1. Concentración de glucosa vs absorbancia

Anexo A.2. Cuantificación de azúcares reductores “Método Ácido dinitrosalicílico” (Dubois et al., 1976).

Pasos para preparar el reactivo DNS.

1. Disolver 1.6g de NaOH en agua destilada.
2. Adicionar 30g de tartrato de Na y K.
3. Adicionar 1g de DNS.
4. Aforar a 100 mL con agua destilada.
5. Almacenar en frasco ámbar a 4 °C.

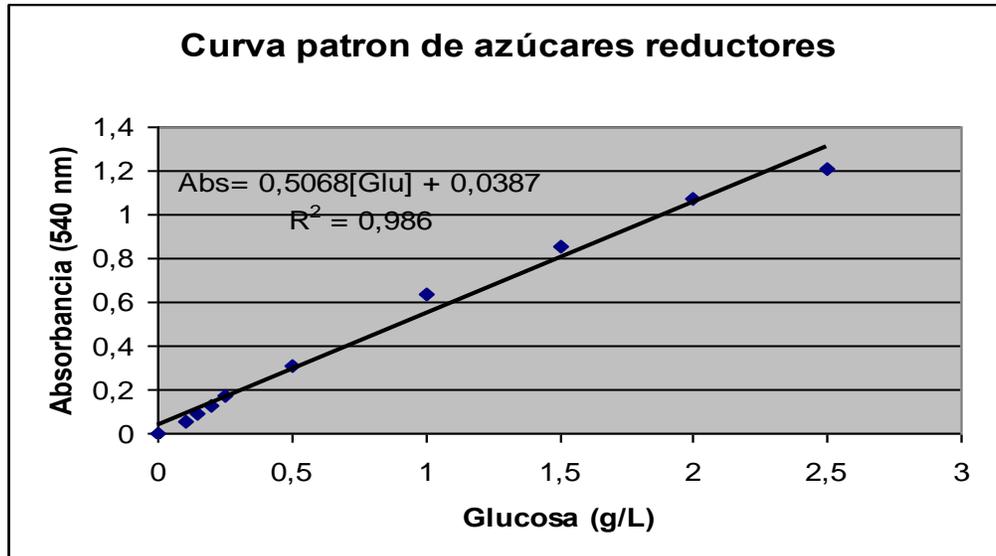
Preparar una solución stock de glucosa 4 mg/mL y almacenarla a 4°C.

A partir de la solución de glucosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones (g/L):

0:0.2:0.15:0.1:0.25:0.5:1:1.5:2:2.5

Procedimiento

- Tomar 0.5 mL de cada dilución y agregar 0.5 mL de reactivo DNS.
- Preparar una muestra blanco por dilución de 0.5 mL de agua destilada a 0.5 mL del reactivo de DNS.
- Agitar todas las muestras.
- Colocar a ebullición las muestras en baño maría por 5 minutos.
- Enfriar con hielo.
- Adicionar 5 mL de agua destilada.
- Agitar y dejar reposar 15 minutos.
- leer a 540 nm.
- Graficar absorbancia versus concentración.



Gráfica A.2. Concentración de glucosa vs absorbancia.

Anexo A.3. Cuantificación de sulfatos “Método Turbidimétrico” (APHA, 1998).

Reactivos

- Solución ácida-acondicionadora.
- Solución patrón de sulfatos (100 ppm).
- Cloruro de bario dihidratado (BaCl₂: 2H₂O).

Procedimiento

- Tomar 10 mL de las diferentes diluciones de la solución stock y de la muestra (realizar dilución si se requiere) Tabla A.3
- Adicionar 1 mL de la solución ácida.
- Mezclar
- Agregar 0.5 g de BaCl₂: 2H₂O
- Agitar vigorosamente durante 1 minuto.
- leer la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm dentro de los 2 minutos siguientes.
- Realizar la curva de calibración absorbancia contra concentración.

Tabla A.3 Curva patrón de sulfatos

Tubo	H ₂ O (mL)	Sol. Stock (mL)	Sol. Ácida (mL)	BaCl ₂ (g)	Concentración final (SO ₄ ppm)	Absorbancia (420 nm)
1	9.5	0.5	1	0.5	5	0.025
2	9.0	1.0	1	0.5	10	0.063
3	8.5	1.5	1	0.5	15	0.113
4	8.0	2.0	1	0.5	20	0.166
5	7.5	2.5	1	0.5	25	0.235
Blanco	10	0	1	0.5	0	0

Anexo A.4. Cuantificación de amonio “Método Indol” (Adams, 1991).

Reactivos

- Solución fenol-alcohol al 10 %.
- Solución de nitroprusiato de sodio.
- Solución alcalina
- Solución oxidante
- Solución de ácido clorhídrico 6N.
- Solución stock de cloruro de amonio (10 mg/L).

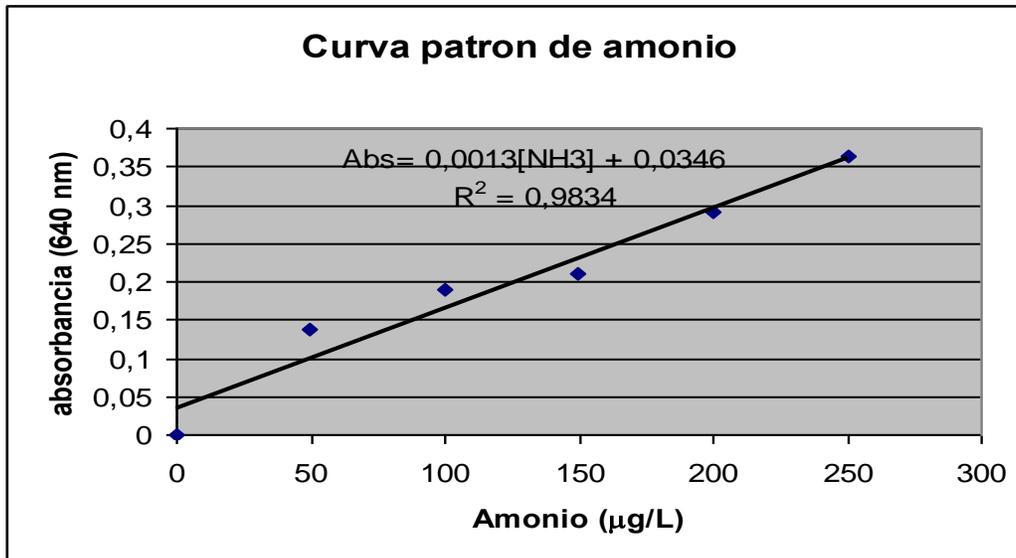
A partir de esta solución stock de cloruro de amonio, realizar diferentes diluciones para construir la curva de calibración.

Procedimiento.

- Tomar 25 mL de las diferentes diluciones y la de muestra (diluir si es necesario) y colocarlos en tubos de ensayo.
- Adicionar 1 mL de la solución fenol-alcohol, 1 mL de la solución nitroprusiato, 5 mL de la solución oxidante.
- Mezclar perfectamente.
- Colocar los tubos en un recipiente cerrando herméticamente asegurándose que no haya entrada de luz, y el color puede desarrollarse por dos horas en total oscuridad.
- Después de las 2 horas leer la absorbancia a 640 nm, y construir la curva graficando Absorbancia versus concentración.

Tabla A.4. Curva patrón de amonio

Tubo	Sol. Stock (1mgNH ₃ /mL) (mL)	Sol. Fenol 10% (mL)	Sol. nitroprusiato de sodio (mL)	Sol. oxidante (mL)	Concentración final (mg/L)	Absorbancia (640 nm)
1	0.5	1	1	2.5	50	0.138
2	1.0	1	1	2.5	100	0.189
3	1.5	1	1	2.5	150	0.210
4	2.0	1	1	2.5	200	0.290
5	2.5	1	1	2.5	250	0.363
Blanco	H ₂ O	1	1	2.5	0	0



Gráfica A.4. Concentración de amonio vs. absorbancia

Anexo A.5. Cuantificación de proteína “Método de Bradford (Cutler, 2004; Bradford, 1976).

Fundamento

Este método involucra la unión del azul brillante de Coomassic G-250 a la proteína. Esta unión provoca un cambio en el máximo de absorción de 465 a 595 nm y el incremento a 595 nm se cuantifica.

Reactivos

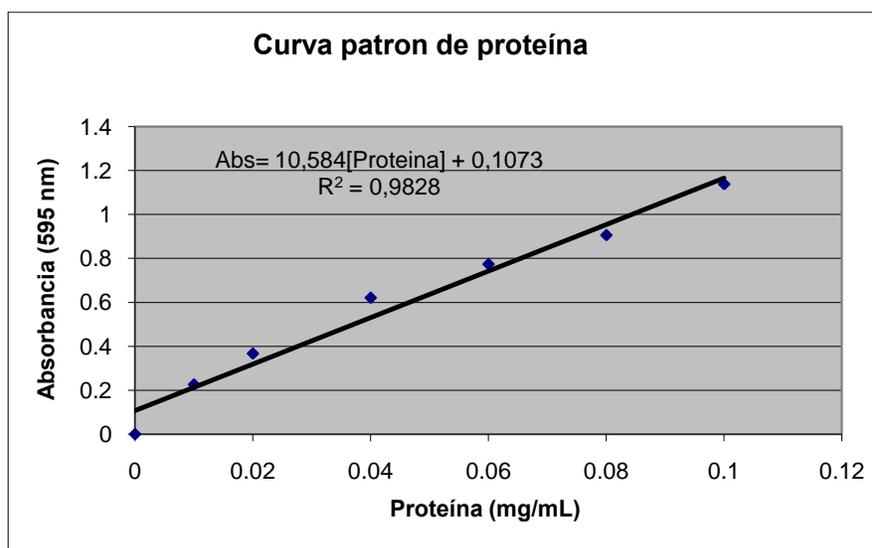
- Azul brillante de Coomassic G-250.
- Etanol al 95%
- Ácido fosfórico.
- Albúmina de suero bovino (BSA).

1. Partiendo de una solución stock de albúmina sérica bovina con concentración de 1mg/mL (BSA-SIGMA), tomar diferentes alícuotas con micropipeta y colocarlas en tubos de 13 x 100 (ver Tabla)
2. Ajustar con agua destilada hasta un volumen de 1000 µl y adicionar 1000 mL de reactivo de Bradford, mezclar en vórtex y dejar reaccionar por 15 minutos a temperatura ambiente.

3. Leer cada una de las soluciones en un espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 a una absorbancia de 595 nm en celdas de plástico de 3000 mL
4. Con los resultados de absorbancia y concentración de BSA obtenidos construir una curva estándar de proteína.

Tabla A.5. Curva patrón de proteína

Tubo	H ₂ O (μL)	Reactivo de Bradford (μL)	[Proteína] (mg/mL)	Absorbancia (595 nm)
1	1000	1000	0	0.000
2	990	1000	0.01	0.226
3	980	1000	0.02	0.367
4	960	1000	0.04	0.621
5	940	1000	0.06	0.774
6	920	1000	0.08	0.906
7	900	1000	0.10	1.138



Gráfica A.5. Concentración de proteína vs absorbancia

Anexo A.6. Prueba de actividad enzimática de la β -galactosidasa (Miller, 1972).

Fundamento

La β -galactosidasa es capaz de hidrolizar (romper) beta-D-galactosidos, como lo es el disacárido lactosa, produciendo moléculas de glucosa y galactosa. En esta prueba, el sustrato o-nitrofenil- β -D-galactopiranosil (ONP) es utilizado en

lugar de la lactosa. Cuando la β -galactosidasa rompe el ONP, O-nitrofenol es liberado. Este compuesto presenta un color amarillo y absorbe a una longitud de onda de 420 nm. La medición de la actividad enzimática de la enzima se da por el incremento de la intensidad del color amarillo con el tiempo.

Procedimiento

- Tomar 2 mL del sobrenadante del caldo de cultivo e incubar a 28° C por 10 minutos.
- Iniciar la reacción agregando 0.4 mL de la solución de ONP (4mg/mL.) y registrar el momento preciso de la adición.
- Homogenizar la mezcla.
- Incubar la mezcla a 28 °C por 25 min.
- Parar la reacción después de desarrollar suficiente color, agregando 1 mL de Na₂CO₃.
- Homogenizar la mezcla y registrar el tiempo.
- Registrar la densidad óptica a 420 y 550 nm para cada tubo.
- Calcular las unidades de actividad.

Ecuación para calcular las unidades de actividad enzimática.

$$\text{Unidades de Miller} = 1000 \times ((\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550})) / (T \times V \times \text{CB})$$

Donde:

- OD₄₂₀ y OD₅₅₀ son las lecturas de la mezcla de reacción.
- CB es la concentración de células (g/L).
- T es el tiempo de cultivo en minutos.
- V es el volumen usado en la prueba en mL.

Anexo A.7. Producción nacional de leche.

En México, según la SAGARPA, la producción total de leche fue de millones de litros durante el periodo 2002-2006. En la Tabla 11.6.1, se muestra como la producción de leche ha aumentado en el transcurso de los años, con una baja en el 2006, afectando directamente la industria quesera

Tabla A.7. Producción nacional de leche de vaca (SIAP-SAGARPA, 2006)

Año	2002	2003	2004	2005	2006
	Millones de litros				
leche	9,804.8	9,936.197	10,025.3	10,032.5	9,320.7
Bovino	9,658.3	9,784.4	9,864.3	9,868.3	9,171.1

la producción total se concentro en cinco estados principalmente, entre estos destacan el estado de Jalisco, Coahuila, Durango y Chihuahua.

Anexo A.8. Análisis macro y micro morfológico de *Aspergillus niger*.

Con la finalidad de verificar la autenticidad de la cepa, se procedió a realizar un análisis macro y micro morfológico y comparar estos resultados con los reportados en la bibliografía.

Características macroscópicas (Figura 11.8.1): Colonias en PDA de color negro o marrón muy oscuro; reverso incoloro a amarillo; colonias densas de granulares a flocosas.



Figura A.8.1 Morfología macroscópica de *Aspergillus niger* en medio PDA

Características microscópicas (Figura 11.8.2): Cabezas conidiales biseriadas y radiales; estipes de paredes gruesas, lisos, hialinos, amarillentos o de color marrón pálido, en especial cerca de la vesícula. Vesícula casi esférica; métulas ocupando toda la superficie de la vesícula. Conidios globosos de color marrón, normalmente muy rugosos con crestas irregulares y protuberancias



Figura A.8.2 Morfología microscópica de *Aspergillus niger* a 100X

Anexo A.9. Prueba de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición) en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los

efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo.

Procedimiento

- Colocar en cada cápsula de Petri un disco de papel de filtro (Watman No 1).
- Marcar correctamente cada caja con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.
- Seleccionar las semillas que presenten un tamaño uniforme
- Saturar el papel de filtro con 5 mL de la dilución (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 1.12 % muestra, agua dura (control negativo), solución de sal de Zinc (control positivo)) evitando que se formen bolsas de aire.
- Con una pinza distribuir las 20 semillas en la caja Petri, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de la raíz.
- Incubar a 22°C, por un periodo de 5 días en oscuridad total.
- Al término de la prueba contar el número de semillas germinadas y con una regla medir la elongación del hipocótilo, así como radícula.
- Calcular el % de inhibición y la concentración letal media (CI₅₀), utilizando el Método de Probit.

Análisis Probit

$$p = (r/n) \times 100$$

Donde **d** = concentración de la sustancia o dosis

n = Número de individuos

r = Número de organismos muertos o afectados

p = Porcentaje de efecto

Mediante tablas transformar **p** (porcentaje de efecto) a unidades Probit, buscando en una tabla de distribución normal el valor de **z** correspondiente a una probabilidad acumulada igual a **p** y sumándole a continuación cinco unidades, así se obtiene una distribución de puntos en un sistema bivariado de tipo lineal, los cuales se procesan según el análisis típico, obteniéndose la ecuación del tipo:

$$y = ax + b$$

Donde:

y (expresado en unidades Probit) = **z**+5

z =variable normal estándar = **z**₀ tal que la Prob (**z**<**z**₀) = **p**

a y b son los estimadores de los parámetros del modelo de regresión

Así, cuando $p = 50\%$ entonces $y=5$ por lo tanto:

$$X_5 = \log_{10} CI_{50} \text{ entonces } CI_{50} = 10^{X_5}$$

Tabla A.9.1 Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99 ^a	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	9,09

^a Valores entre 99,0 y 99,9.

A) Establecimiento de CI_{50} del tóxico de referencia

El desarrollo de la prueba consistió en colocar 20 semillas de lechuga en cajas Petri, utilizando 4 mL de las cinco diluciones de la muestra a estudiar (100, 50, 25, 12, 6, 3 y 1,5%). Asimismo, se utilizó un control negativo (agua dura) y un control positivo ($ZnSO_4$). Las semillas de lechuga fueron seleccionadas meticulosamente, buscando que fuera un tamaño de semilla uniforme para todas. Las pruebas fueron ejecutadas por triplicado e incubadas a una temperatura de 22°C por 5 días, en oscuridad total. Con el objetivo de controlar la sensibilidad de las semillas, se corrió simultáneamente un control positivo utilizando una sal de Zinc como tóxico de referencia.

En primera instancia, lo primero en establecer fue la concentración efectiva o de inhibición media (CI_{50}) del control positivo para el lote de semillas a utilizar. Para el cálculo de (CI_{50}), se empleó el Método de Probit. En la Tabla se muestran los resultados organismos muertos, porcentaje de mortalidad y probit empírico calculado a partir de la Tabla A.9.1 (Anexo A.9).

En la Figura A.9.1, se muestran los datos de Probit Empírico en función del $\log_{10}(\%)$, así como, el ajuste lineal correspondiente. Interpolando el valor de PE igual a 5 en el modelo, se encontró un valor $\log = 1.69$, obteniéndose un valor de 48.9 mg $ZnSO_4/L$ correspondiente a la CI_{50} , indicando que es la concentración en la cual se obtiene 50% de mortalidad de los organismos a los 5 días de exposición al tóxico. Esta concentración se utilizó en el control positivo para evaluar el remanente del cultivo.

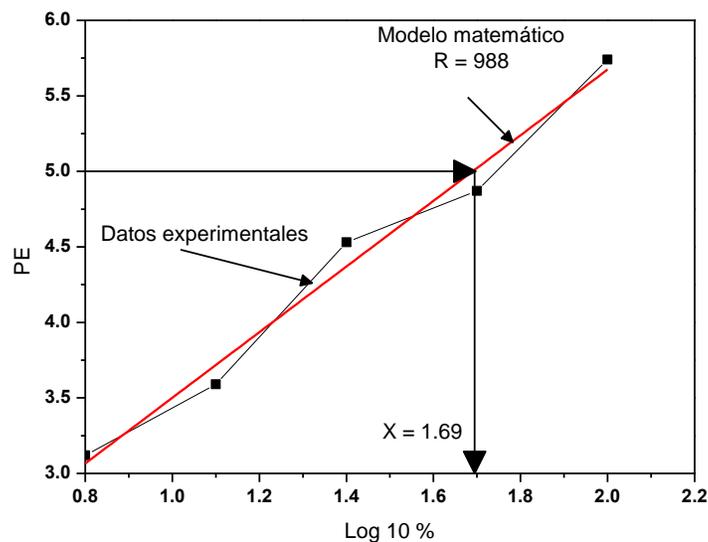


Figura A.9.1. Representación gráfica del cálculo de la CI_{50} para el tóxico de referencia ZnS

Anexo A.10. Resultados experimentales obtenidos a diferentes tiempos de cultivo (promedio de 3 replicas).

Tiempo de cultivo(h)	Número de tratamiento												
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Inoculación	pH	4.22	4.2	4.29	4.2	4.2	4.22	4.2	4.27	4.26	4.27	4.28	4.28
	Biomasa (g/L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Proteína (mg/L)	130.4	174.8	162	155.6	147.4	151.6	160.4	147.6	129.8	142.6	144	144
	Azúcares (mg/mL)	30.94	39.35	35.54	32.75	30.16	31.43	35.45	33.36	31.43	32.09	34.44	33.84
24	pH	4.24	4.21	4.29	4.20	4.21	4.23	4.31	4.27	4.27	4.25	4.27	4.25
	Biomasa(g/L)	0.2	0.12	0.2	0.02	0.2	0.1	0.16	0.02	0.2	0.2	0.2	0.25
	Proteína(mg/L)	127.8	170.8	160.4	155.4	134.4	122.2	156.6	129.4	142.6	131.6	127.6	144
	Azúcares (mg/mL)	30.70	37.17	35.29	32.15	30.1	31.18	35.47	33.18	30.94	31.73	31.43	31.79
52	pH	4.48	4.45	4.50	4.25	4.29	4.36	4.56	4.31	4.36	4.36	4.36	4.37
	Biomasa (g/L)	0.18	0.12	0.2	0.2	0.14	0.2	0.2	0.1	0.33	0.18	0.24	0.18
	Proteína (mg/L)	56.34	143.4	125.6	145.8	140.4	36.6	137.8	134.2	136.6	122.2	126.2	131
	Azúcares (mg/mL)	30.22	36.81	33.97	30.39	29.61	26.10	31.85	32.94	30.52	31.5	30.64	31.73
74	pH	4.61	4.56	4.62	4.35	4.46	4.53	4.68	4.36	4.57	4.55	4.56	4.54
	Biomasa (g/L)	1.4	1.0	0.18	0.18	0.2	0.6	1.0	0.202	0.4	0.2	0.4	0.41
	Proteína(mg/L)	53.6	---	124.6	96.2	11	----	31.2	118.4	114	9.8	4	8.2
	Azúcares (mg/mL)	27.19	36.56	32.94	26.94	26.77	18.79	31.37	29.73	30.04	31.67	28.35	31.43
94	pH	4.7	4.69	4.74	4.49	4.57	4.58	4.78	4.49	4.66	4.60	4.64	4.64
	Biomása(g/L)	1.6	1.4	8.0	8.0	8.0	1.4	1.4	1.04	1.6	0.6	2.0	1.4
	Proteína(mg/L)	---	11.8	7	5	22.8	---	18.6	67.6	39	10.4	4	35.6
	Azúcares (mg/mL)	26.83	36.14	30.22	25.59	17.39	17.88	28.46	24.23	23.75	22.59	22.05	26.65
101	pH	4.74	4.73	4.79	4.52	4.59	4.61	4.82	4.54	4.67	4.62	4.68	4.67
	Biomása(g/L)	1.8	1.2	0.79	1.2	1.0	1.6	1.8	1.05	1.81	1.4	1.8	1.42
	Proteína (mg/L)	---	32.8	2	21.8	40.4	44.8	62.6	30.4	13.8	14.2	25.2	32.8
	Azúcares (mg/mL)	27.01	36.1	26.10	24.1	16.92	17.70	27.35	22.72	21.75	21.63	20.0	19.45
125	pH	4.71	4.75	4.68	4.52	4.57	4.58	4.81	4.66	4.62	4.58	4.61	4.62
	Biomasa (g/L)	2.2	1.6	1.4	1.35	1.75	1.85	2.08	1.42	2.08	2.0	1.95	1.68
	Proteína (mg/L)	112.9	51.1	8.7	51.66	8.6	48	72.2	30	65.9	20.3	35.6	42.9
	Azúcares (mg/mL)	26.08	30.88	23.88	23.56	16.47	14.68	27.02	18.34	18.56	14.01	18.59	15.69
165	pH	4.62	4.79	4.59	4.51	4.54	4.51	4.78	4.87	4.52	4.47	4.55	4.53
	Biomasa g/L)	3.0	2.2	2.8	2.4	2.2	2.0	2.2	2.4	2.4	2.2	2.2	2.0
	Proteína (mg/L)	159.8	111.2	97.2	94	111.2	107	97	96.2	102.6	57.2	77	94
	Azúcares (mg/mL)	24.47	27.74	22.96	19.94	14.79	8.18	26.52	7.61	16.73	7.30	14.86	8.88

Anexo A.11. Sistema de cultivo

Los cultivos fueron llevados a cabo en un biorreactor tipo tanque agitado con un tamaño nominal de 3 litros de la marca **Applikon**, provisto de los elementos de control como: pH, oxígeno disuelto, agitación, temperatura, suministro de nutrientes y antiespumante. Dispone a su vez de salida de comunicación en serie que permite su supervisión, control y captura de datos mediante ordenador. En la Figura A.11.1 se ilustra la disposición de cada uno de estos elementos



Figura A.11.1. Biorreactor automatizado Applikon.

Descripción del equipo.

a) Biorreactor

Constituido por una jarra de cultivo, con volumen nominal de 3 litros, con un volumen de trabajo mínimo de 500 mL y máximo de 2000 mL. La relación altura de líquido/diámetro interno del reactor (H/D) es de 1.5 para un volumen de operación de 2000 mL. El sistema de agitación está integrado por 2 turbinas tipo Rushton de 45 mm de diámetro total con 6 paletas planas y un motor de velocidad variable (Mod. P100; rango de velocidad: 0-1250 rpm), cuenta además con 4 deflectores, dispersor de aire de orificio, sistema de enfriamiento mediante recirculación de agua a través de un intercambiador de calor, calentamiento por medio de una mantilla térmica de 110 W, sondas de pH (rango: 0-14), de oxígeno disuelto (rango: 0-500% de saturación en aire) y de temperatura (rango: 0-150 °C).

b) Biocontrolador AID 1010

Este dispositivo lleva acabo la medición y control de las variables de proceso como pH, temperatura, oxígeno disuelto, nivel de líquido o adición de antiespumante y velocidad de agitación. Esto funciona mediante un control de tipo Proporcional-Integral-Derivativo (PID). El control PID funciona por medio de actuadores. Los actuadores para cada variable son:

- Para el control del oxígeno disuelto
 - Velocidad de agitación.
 - Flujo de aire (válvula de aire).
 - Flujo de oxígeno (válvula de oxígeno).
 - Flujo de nitrógeno (válvula de nitrógeno).
- Para el control del pH
 - Adición de ácido (bomba de ácido).
 - Adición de base (bomba de base).
- Para el control de temperatura
 - Flujo de agua de enfriamiento.
 - Calefactor eléctrico.
- Para el control de nivel
 - Adición de antiespumante (bomba de antiespumante).
 - Bomba peristáltica auxiliar, dispuesta con un control de velocidad manual.

c) Bioconsola ADI 1025

La bioconsola consta esencialmente de los actuadores y recibe las señales del biocontrolador para llevar a cabo el control de las variables del proceso. La bioconsola está equipada con:

- Tres bombas de adición para ácido, base y control del nivel, son operadas de forma automática y una más operada de forma manual para el nivel.
- Cuatro rotámetros, en los cuales se controla de forma manual, mediante una válvula de aguja, el flujo de aire, oxígeno, nitrógeno y bióxido de carbono.
- Una válvula solenoide para controlar la entrada de agua de enfriamiento al sistema.
- 6. Una fuente de poder para la mantilla de calentamiento.

d) Sistema de computo

Mediante un programa de control y de adquisición de datos (Software BioXpert versión 1.20x), la computadora lleva acabo el monitoreo simultáneo y de ser necesario el control remoto del sistema de cultivo. El Software permite llevar acabo:

1. Sí se requiere, el control remoto de los parámetros del cultivo (pH, oxígeno disuelto, temperatura, nivel, control de espuma) por medio de algoritmos de control y algoritmos de tipo apagado/encendido (ON/OFF).

2. El monitoreo del cultivo mediante un registro de datos y gráfico del comportamiento de cada uno de los parámetros del cultivo.

La adquisición de los datos se lleva a cabo por periodos de tiempo determinados por el usuario, en función del tiempo de operación del sistema, los periodos de adquisición.

e) Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno en el Biorreactor.

El efecto de la agitación y la aireación son de gran importancia en muchos procesos de biotransformación de los sustratos. La combinación de estas dos variables determina la capacidad de transferencia de oxígeno de un sistema, afectando de manera directa el crecimiento de los microorganismos y su productividad. Empleando la Metodología de Superficie de Respuesta, se planteó un Diseño Compuesto Central ortogonal (DCC) para un modelo de segundo orden y así poder evaluar el coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}). La codificación de los niveles de las variables se presenta en la Tabla A.11.1 el nivel mínimo de agitación de 50 rpm se estableció de acuerdo a los antecedentes de que se mencionan en la literatura. El impulsor tipo Roushton, provoca mucho más estrés en cultivos miceliares, que cuando se utilizan otro tipo de impulsores existentes. Por otro lado, el máximo de 350 rpm fue establecido de acuerdo a los trabajos realizados previamente.

Tabla A.11.1. Niveles de la velocidad de agitación y aireación para la determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}).

Nivel	Velocidad de agitación (rpm)	Flujo de aireación (mL/min)
-1	50	50
0	200	100
+1	350	150

El procedimiento fue similar al realizado en la optimización de las condiciones de cultivo a nivel de matraz. Se consideraron dos variables: velocidad de agitación (rpm) y flujo de aireación (mL/min), las cuales fueron evaluadas a dos niveles uno bajo (-1) y otro alto (+1). Dando un total de $2^2 = 4$ combinaciones, por otro lado se incluyeron seis puntos centrales y cuatro puntos axiales resultando un total de 14 tratamientos Tabla A.11.2, en esta misma se presentan los valores obtenidos de los coeficientes de transferencia utilizando el método de sulfito ($(K_{La})_{agua}$) y las velocidades de transferencia de oxígeno (VTO) calculadas a partir de los valores de $(K_{La})_{agua}$. Los valores del coeficiente de transferencia de oxígeno obtenidos a diferentes condiciones de agitación y aeración, fueron ajustados a un modelo de regresión múltiple para dos variables de acuerdo a la expresión:

$$K_{La}h^{-1}) = 209.9023 + 84.18*VA + 11.44*FA - 4.94*VA*FA - 7.3884*(VA)^2 - .00622*(FA)^2$$

Donde: VA = velocidad de agitación (rpm)
 FA = flujo de aireación (mL/min)

Tabla A.11.2. Diseño experimental para evaluar el efecto de la agitación y aeración en la determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno $K_L a$.

Tratamiento	Factor		Respuesta	
	Vel. Agitación (rpm)	Flujo de aireación (mL/min)	Coef. Transf. de oxígeno (1/h)	Vel. Transf. de oxígeno (mg O ₂ /L*h)
1	50	50	110.23	745.15
2	50	150	140.12	947.21
3	350	50	280.12	1893.61
4	350	150	290.25	1962.09
5	38	100	98.12	663.29
6	362	100	295.12	1995.01
7	200	46	190.12	1285.21
8	200	154	220.15	1488.21
9	200	100	210.15	1420.61
10	200	100	211.12	1427.17
11	200	100	213.45	1442.92
12	200	100	211.13	1427.23
13	200	100	210.2	1420.95
14	300	100	211.23	1427.91

El ajuste se realizó utilizando un paquete de software JMP, con la finalidad de generar la superficie de respuesta que se presenta en la Figura A.11.1. Como era de esperarse, a medida que se incremento la velocidad de agitación de 50 a 350 rpm se observó un incremento en el coeficiente de transferencia de oxígeno, mientras que cuando se incrementa el flujo de aireación la respuesta se ve afectada en menor grado. Este comportamiento se debe a que cuando se aumenta la velocidad de agitación en un reactor, los impulsores rompen las burbujas haciendo a éstas más pequeñas, ocasionando un incremento en el área superficial, al mismo tiempo, hay una mejor distribución de las burbujas en el medio, aumentando el tiempo de residencia de las mismas, esto hace que la transferencia de oxígeno se vea favorecida notablemente. En cambio, un aumento en el flujo de aireación hace que haya mucho más aire en el sistema, por el aumento del número de burbujas, pero como no hay una buena distribución, estas tienden a coalescer y salir del líquido por lo que el tiempo de residencia es mucho menor, ocasionando que no haya un aumento muy notable en el coeficiente de transferencia de oxígeno (Figura A 11.2).

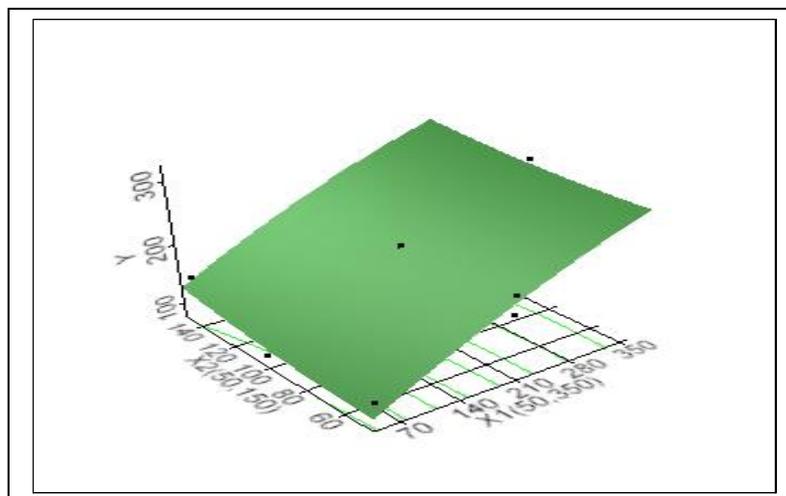


Figura A.11.2. Coeficiente de transferencia de masa (Y) en función de la velocidad de agitación (X2) y flujo de aireación (X1).

El análisis de varianza correspondiente se presenta en la Tabla A.11.3. El coeficiente de determinación obtenido al ajustar el modelo fue 99.24, esto quiere decir que 99.24 % de la variabilidad del sistema es explicada por la ecuación de segundo orden obtenida. Los valores de la respuesta (K_{La}) presentaron una moderada variabilidad con un coeficiente de variación de 3.19 % encontrándose dentro de los rangos deseados. Este comportamiento era de esperarse dado a que en un sistema como es el biorreactor se tiene un mayor control de las variables como la temperatura, la medición del oxígeno disuelto, entre las más importantes que pueden afectar el sistema. Tres efectos presentan valores P inferiores a 0.05, pero dos efectos lineales son altamente significativos sobre la respuesta, es decir que la respuesta es muy sensible a cambios de estos dos factores, por otro lado el estadístico F del factor velocidad de agitación, comparado con el del flujo de aireación es 54 veces más grande, esto implica que la velocidad de agitación es una variable la cual tiene un efecto más directo en el coeficiente de transferencia de oxígeno.

Tabla A.11.3. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para el coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}). F: Prueba de Fisher, P : prueba de significancia de 0.05

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	Valor-P
VA	44817.962	1	44817.962	1030.915	0.0001
FA	828.681	1	828.681	19.0615	0.0024
VA*FA	97.614	1	97.614	2.2454	0.1724
VA*VA	191.329	1	191.329	4.4010	0.0492
FA*FA	0.014	1	0.014	0.0003	0.9863
Error total	46302.99	13	3561.7685	211.4147	0.0001
Falta de ajuste	347.79185	8	43.474	79.1085	0.0001
$R^2(\%)$	99.24				
CV(%)	3.19				

Anexo A.12. Análisis estadístico de datos

A. Análisis estadístico de datos de la formulación del medio de cultivo.

La Tabla A.12.1, muestra la matriz de datos de los 12 tratamientos con los correspondientes resultados experimentales obtenidos de la producción de biomasa y proteína soluble, después de haber transcurridos 165 horas de cultivo. Debido a que se trataba de un diseño central compuesto ortogonal (DCC) se realizó el ajuste de la superficie respuesta a través de una función polinomial de segundo orden, así mismo, los resultados fueron analizados mediante la técnica de regresión múltiple y de análisis de varianza (ANOVA). Con ello, fue posible determinar si los modelos de segundo orden podrían ser una aproximación adecuada del sistema. Además, el análisis de regresión permitió, si era posible establecer los coeficientes de significancia y la ecuación que posiblemente podría describir los sistemas. Los modelos fueron revisados estadísticamente con una prueba de Fisher (F) y una significancia menor al 0.5%.

Tabla A.12.1. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para las respuestas de biomasa y proteína (2 factores) F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. *0.05 nivel de significancia.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	Valor-P
Respuesta Biomasa					
S. L.	0.00845299	1	0.00845299	0.0918	0.7721
V	0.13246788	1	0.13246788	1.4388	0.2755
S.L*V	0.04000000	1	0.04000000	0.4345	0.5343
S.L*S.L	0.03429065	1	0.03429065	0.3724	0.5641
V*V	0.21904290	1	0.21904290	2.3791	0.1739
Error total	0.9866666	11	0.089696	0.9433	0.5154
Falta de ajuste	0.55241209	6	0.0920686	5.9052	0.0894
R ² (%)	44.01				
CV(%)	12..98				
Respuesta Proteína					
S. L.	1027.7304	1	1027.7304	2.9939	0.1343
V	394.3223	1	394.3223	1.1487	0.3250
S.L*V	504.0025	1	504.0025	1.4682	0.2712
S.L*S.L	1728.9527	1	1728.9527	5.0367	0.0660
V*V	571.3534	1	571.3534	1.6644	0.2445
Error total	6285.982	11	571.45	2.4624	0.1516
Falta de ajuste	2059.619	6	343.26	0.7072	0.8081
R ² (%)	67.23				
CV(%)	18.52				

S.L. = Suero de leche, V = Vinazas, S.L.*V = Termino cruzado, S.L.*S.L. = Termino cuadrático, V*V = Termino cuadrático

En la Tabla **A.12.1**. Se puede observar que los efectos lineales, cuadráticos puros y cruzados para ambos modelos propuestos, ninguno fue significativo por lo que el modelo no pudo ser establecido. Los coeficientes de correlación (R²) obtenidos fueron de 44.01 y 67.23, indicando que una gran parte de la variabilidad de la respuesta no es explicada por los modelos; es decir, que sólo 44.01% de los datos para la respuesta de biomasa se pudieron ajustar al modelo y un 67.23 % de los datos de la proteína soluble son ajustados al modelo.

B. Análisis estadístico de datos de los cultivos realizados a nivel de matraz.

Tabla A.12.2. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para biomasa (3 factores) F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. *0. 05 nivel de significancia.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	Valor-P
T	0.7731454	1	0.7731454	10.6863	0.0084
VA	3.1982864	1	3.1982864	44.2064	0.0001
TC	0.4239783	1	0.4239783	5.8602	0.0358
T*VA	0.0288000	1	0.0288000	0.3981	0.5418
T*TC	0.2048000	1	0.2048000	2.8307	0.1230
VA*TC	0.3698000	1	0.3698000	5.1113	0.0471
T*T	0.4430156	1	0.4430156	6.1233	0.0440
VA*VA	0.0205211	1	0.0205211	0.2836	0.7289
TC*TC	0.0566045	1	0.0566045	0.7824	0.3120
Error total	6.3846950	19	32.60	7.2966	0.0043
Falta de ajuste	0.579791	10	7.2172986	1.0680	0.511454
R ² (%)	90.93				
CV(%)	8				

Tabla A.12.3. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para proteína (3 factores) F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. *0.05 nivel de significancia.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	Valor-P
T	9.4062	1	9.4062	10.099	0.0130
VA	36.3511	1	36.3511	39.207	0.0002
TC	92.8571	1	92.8571	100.292	0.0001
T*VA	0.4704	1	0.4704	0.536	0.4848
T*TC	2.5538	1	2.5538	2.706	0.1386
VA*TC	2.5538	1	2.5538	2.706	0.1386
T*T	6.6583	1	6.6583	7.152	0.0282
VA*VA	6.0525	1	6.0525	6.500	0.0342
TC*TC	2.8832	1	2.8832	3.099	0.1164
Error total	167.1600	19	8.7979	15.689	0.0001
Falta de ajuste	7.3806	10	0.7380	384.584	0.0001
R ² (%)	95.58				
CV(%)	9.4				

T = Temperatura; VA = Velocidad de agitación; TC = Tiempo de cultivo; T*VA, T*TC, VA*TC = Efecto cruzado ; T*T , TC*TC, VA*VA = Efecto cuadrático

Tabla A.12.4. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para actividad enzimática (3 factores) F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. *0.05 nivel de significancia.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	Valor-P
T	0.044462	1	0.044462	0.000	0.9986
VA	38963.53	1	38963.53	2.755	0.1279
TC	648492.69	1	648492.69	45.853	0.0001
T*VA	8001.12	1	8001.12	0.565	0.4693
T*TC	13861.13	1	13861.13	0.980	0.3455
VA*TC	14878.12	1	14878.12	1.052	0.3292
T*T	74659.36	1	74659.36	5.279	0.0444
TC*TC	19504.92	1	19504.92	1.379	0.2675
VA*VA	131277.92	1	131277.92	9.282	0.0123
Error total	1091062.2	19	57424.32	7.461	0.0021
Falta de ajuste	141428.42	10	1414.28	6960.773	0.0001
R ² (%)	87.03				
CV(%)	11.6				

T = Temperatura; VA = Velocidad de agitación; TC = Tiempo de cultivo; T*VA, T*TC, VA*TC = Efecto cruzado ; T*T , TC*TC, VA*VA = Efecto cuadrático

C. Análisis estadístico de los datos de cultivos realizados en Biorreactor

Tabla A.12.5. Análisis de varianza de los modelos de superficie para las respuestas de biomasa y actividad enzimática específica después de 27 h de cultivo (2 factores) F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. *0.05 nivel de significancia.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	Valor-P
Respuesta Biomasa					
VA	1.9777	1	1.9777	2.117	0.1959
FA	2.3889	1	2.3889	2.556	0.1609
VA*FA	0.1225	1	0.1225	0.131	0.7297
VA*VA	4.5458	1	4.5457	4.867	0.0695
FA*FA	1.1035	1	1.1035	1.181	0.3188
Error total	16.9472	11	1.5406	2.428	0.1552
Falta de ajuste	5.6046	6	0.9340	16.283	0.0232
R ² (%)	66.92				
CV(%)	32.60				
Respuesta Actividad Enzimática Específica					
VA	4895397.0	1	2090932.3	11.737	0.0140
FA	2.5	1	376919.2	0.000	0.9981
VA*FA	422500.0	1	5205.6	1.013	0.3530
VA*VA	7162349.4	1	5720038.7	17.172	0.0061
FA*FA	67966.4	1	2019502.1	0.163	0.7004
Error total	15664899.0	11	1424081.7	6.311	0.0221
Falta de ajuste	2502452.2	6	417075.3	176352.80	0.0002
R ² (%)	84.0				
CV(%)	63.6				

VA = Velocidad de agitación; FA = Flujo de aireación; VA*FA = Efecto cruzado; VA*VA, FA*FA = Efecto cuadrático

Tabla A.12.6. Análisis de varianza de los modelos de superficie para las respuestas de biomasa y actividad enzimática específica después de 30 h de cultivo (2 factores) F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. *0.05 nivel de significancia.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	Valor-P
Respuesta Biomasa					
VA	5.1470	1	5.1470	4.881	0.0692
FA	4.2181	1	4.2181	4.001	0.0924
VA*FA	0.2809	1	0.2809	0.266	0.6242
VA*VA	4.3853	1	4.3853	4.159	0.0875
FA*FA	0.0326	1	0.0326	0.031	0.8662
Error total	20.4219	11	1.8565	2.674	0.1315
Falta de ajuste	6.3265	6	1.0544	27.412	0.0111
R ² (%)	69.02				
CV(%)	32.58				
Respuesta Actividad Enzimática Específica					
VA	7619813	1	7619813	23.623	0.0028
FA	88647	1	88647	0.275	0.6189
VA*FA	19572	1	19572	0.061	0.8136
VA*VA	10512862	1	10512862	32.593	0.0012
FA*FA	16906	1	16906	0.052	0.8265
Error total	20473419	11	1861219.91	11.495	0.0050
Falta de ajuste	1935284.1	6	322547.35	296.744	0.0003
R ² (%)	90.54				
CV(%)	50.25				

VA = Velocidad de agitación; FA = Flujo de aireación; VA*FA = Efecto cruzado; VA*VA, FA*FA = Efecto cuadrático

Tabla A.12.7. Análisis de varianza de los modelos de superficie para las respuestas de biomasa y actividad enzimática específica a las 72 h. de cultivo (2 factores) F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. *0.05 nivel de significancia.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	Valor-P
Respuesta Biomasa					
VA	0.3307	1	0.3307	0.3458	0.5780
FA	0.3921	1	0.3921	0.4100	0.5456
VA*FA	0.0182	1	0.0182	0.0191	0.8947
VA*VA	0.2925	1	0.2925	0.3058	0.6002
FA*FA	0.3996	1	0.3996	0.4178	0.5420
Error total	7.1626	11	0.6511	0.2975	0.8978
Falta de ajuste	5.7397	6	1.1232	764.29	0.0001
R ² (%)	19.86				
CV(%)	32.60				
Respuesta Actividad Enzimática Específica					
VA	2090932.3	1	2090932.3	2.2464	0.1846
FA	376919.2	1	376919.2	0.4049	0.5480
VA*FA	5205.6	1	5205.6	0.0056	0.09428
VA*VA	5720038.7	1	5720038.7	6.1454	0.0479
FA*FA	2019502.1	1	2019502.1	2.1697	0.1219
Error total	15750842	11	1431894.0	2.1844	0.1846
Falta de ajuste	5584685.5	6	930780.91	176352.8	0.0001
R ² (%)	64.54				
CV(%)	50.25				

VA = Velocidad de agitación; FA = Flujo de aireación; VA*FA = Efecto cruzado; VA*VA, FA*FA = Efecto cuadrático

D. Análisis estadístico de datos de la prueba de toxicidad.

Tabla A.12.7. Resultados del porcentaje de mortalidad (semillas de lechuga) utilizando diferentes concentraciones del tóxico de referencia y cálculo de Probit empírico.

Concentración del tóxico de referencia (mg ZnSO ₄ /L)	Concentración del tóxico de referencia (%)	Log10 de la concentración (X)	Núm. de organismos (N)	Núm. de organismos muertos (r)	% de Mortalidad	Probit empírico (PE)
100	100	2	20	4.5	77.5	5.74
50.12	50	1.7	20	11	45	4.87
25.12	25	1.4	20	13.5	32.5	4.53
12.6	12.5	1.1	20	18.5	7.5	3.59
6.3	6.25	0.8	20	19.5	2.5	3.12

Tabla A.12.8. Análisis de varianza de las respuestas hipocótilo y radícula

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Valor <i>p</i>
Hipocótilo					
Concentraciones	5	84.44	16.88	87.08	0.0001
Error	12	2.32	0.193		
Total	17	86.77			
Radícula					
Concentraciones	5	2079.75	415.95	87.08	0.0001
Error	12	2.4641	0.205		
Total	17	2082.21			

Tabla A.12.8. Análisis de comparación múltiple de medias para la respuesta del hipocótilo y radícula.

Tratamiento	Media		Valor <i>p</i>	
	Hipocótilo	Radícula	Hipocótilo	Radícula
Control negativo	27.71	31.14	1.00	1.00
1.5%	24.42	30.27	0.00001	0.13030
3%	24.02	29.42	0.00001	0.00240
6%	26.84	18.59	0.11460	0.00001
12%	22.38	7.05	0.00001	0.00001
25%	21.74	5.65	0.00001	0.00001

Anexo 13. Cálculos.

A) Estimación de multas por la descarga de las vinazas y suero de leche.

Vinazas

Demanda química de oxígeno (DQO) = 76,800 mg/L = 76.80 Kg/m³

Carga volumétrica anual (Q)=800,000 m³/año

Cuerpo receptor = Tipo B

Índice de incumplimiento (I) = ((76,800-75)/75)=1023

Multa trimestral en pesos = (76.80

Kg/m³)*(200,000m³/trimestral)*(5.53\$/Kg)=\$84,940,800.00

Multa anual = 339,763,200.00

Suero de Leche

Demanda química de oxígeno (DQO) = 100,012mg/L = 100.012 Kg/m³

Carga volumétrica anual (Q)=1,219,000 m³/año

Cuerpo receptor = Tipo B

Índice de incumplimiento (I) = ((100.012-75)/(75))=1332

Multa trimestral en pesos

=(100.012Kg/m³)*(304,750m³/trimestral)*(5.53\$/Kg)=\$168,546,973.00

B) Estimación de la potencia volumétrica en biorreactor sin airear

Para estimar la potencia entregada al medio de cultivo se utilizó la siguiente correlación (Rushton *et al.*, 1950):

$$P = (\rho) \times (N / 60)^3 \times (\Phi)^5 \times (N_p) \times (F) / (V) = (\text{kw/m}^3)$$

Donde:

ρ , densidad del suero de leche (1160 kg/m³)

N_p , numero de potencia (6) (tipo de impulsor "Turbina Rushton"),

F, factor de potencia por dos impulsores (1.9), 90% de potencia requerida por impulsor adicional

Φ , Diámetro del impulsor (m)

N, velocidad de agitación (rpm)

Potencia volumétrica = (P/V)

Donde:

V, volumen de operación (2 L)