

Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz"



**DESARROLLO DE UNA TECNOLOGÍA PARA LA
PRODUCCIÓN A PEQUEÑA ESCALA DE LA
BIOMASA DEL HONGO OSTRA (PLEUROTUS
OSTREATUS)**

**Julio Amilcar Pineda Insuasti (Autor); Luis B. Ramos
Sánchez (Director)**

Pineda Insuasti, Julio Amilcar (Autor)

Desarrollo de una tecnología para la producción a pequeña escala de la biomasa del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) / Julio Amilcar Pineda Insuasti (Autor); Luis B. Ramos Sánchez (Director). – La Habana : Editorial Universitaria, 2015. -- ISBN 959-16-2691-2.

1. Pineda Insuasti, Julio Amilcar (Autor)
2. Ramos Sánchez, Luis B. (Director)
3. Universidad de Camaguey "Ignacio Agramonte Loynaz"
4. Ciencias Agrícolas

Digitalización: Editorial Universitaria, torri@mes.edu.cu

(c) Todos los derechos reservados: Universidad de Camaguey "Ignacio Agramonte Loynaz", 2015.

Editorial Universitaria

Calle 23 entre F y G, No. 564.

El Vedado, Ciudad de La Habana, CP 10400,

Cuba



REPÚBLICA DE CUBA

UNIVERSIDAD DE CAMAGÜEY “IGNACIO AGRAMONTE LOYNAZ”



FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

**DESARROLLO DE UNA TECNOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN A
PEQUEÑA ESCALA DE LA BIOMASA DEL HONGO OSTRA**

(Pleurotus ostreatus)

Tesis presentada en opción al grado científico de

Doctor en Ciencias Técnicas

Julio Amilcar Pineda Insuasti

Camagüey

2014

REPÚBLICA DE CUBA

UNIVERSIDAD DE CAMAGÜEY “IGNACIO AGRAMONTE LOYNAZ”



FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

**DESARROLLO DE UNA TECNOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN A
PEQUEÑA ESCALA DE LA BIOMASA DEL HONGO OSTRA
(*Pleurotus ostreatus*)**

Tesis presentada en opción al grado científico de

Doctor en Ciencias Técnicas

Autor: Ing. Julio Amilcar Pineda Insuasti

Tutor: Dr. C. Luis B. Ramos Sánchez

Camagüey

2014

AGRADECIMIENTO

A la Revolución Ciudadana Ecuatoriana y en especial a su líder, el Economista Rafael Correa Delgado, por su obra transformadora en favor del pueblo Ecuatoriano.

A la Revolución Cubana y en especial a su líder histórico, el Comandante en Jefe Fidel Castro Ruz, por su obra solidaria en favor de la humanidad.

A todas las personas que contribuyeron de forma material y espiritual a la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A Claudia y Alejandro

Mi fuente de inspiración, bienestar y progreso

SÍNTESIS

En este trabajo se presenta el diseño tecnológico de una planta para la producción a pequeña escala de biomasa del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) donde se introduce la modelación matemática en la etapa de fermentación. Se seleccionó la cepa ceba-gliie-po-010106 de *P. ostreatus*, aislada de la Sierra Norte ecuatoriana, la que presenta una velocidad promedio de crecimiento igual a 0,584 mm/h en un medio rico. El residuo de fréjol aportó los mejores resultados, con una bioconversión promedio de 12,8 g MSH/kg MSS. La formulación adecuada del medio se logró con una humedad de 70,67 %, enriquecido con 0,13 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,036 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; y 25 % de sustrato agotado. El desarrollo de las fórmulas empíricas del residuo de fréjol y la biomasa del hongo, permitió proponer un modelo estequiométrico con el cual se calculó la eficiencia biológica teórica; 867,49 g MSH/kg MSS, el coeficiente medio de respiración; 0,77 mol CO_2 /mol O_2 , el consumo específico de aire; 1,36 m^3 /kg MSH y el calor metabólico; 16 576,47 kJ/kg MSH. Se ajustó el modelo logístico para describir la dinámica del crecimiento del hongo, a temperatura de 20 °C donde se logra una μ_{max} de 0,201 día⁻¹ y una X_{max} = 110,9 g MSH/ kg MSS. A partir de los resultados obtenidos, se propone el diseño de un nuevo tipo de biorreactor, donde la mejor distribución de las bioceldas es la cuadrada, con una densidad de empaque de 21,7 kg MSS/ m^3 . Se utilizó un modelo fenomenológico macroscópico para describir el sistema y por simulación se determinaron los parámetros de operación óptimos como: F_{ea} = 10 L/(kg MSH.día), T = 11,32 °C y t_f = 28,34 días. Una planta con cinco biorreactores de 6,88 m^3 alcanza una Pr_{max} = 516,9 kg MHH/(m^3 .año), logrando un CPU_{min} = 2,68 \$/kg MHH. Los indicadores financieros como la TIR y el VAN, muestran que esta tecnología representa una oportunidad de inversión.

TABLA DE CONTENIDOS

PAG.

INTRODUCCIÓN	1
1 ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO.....	9
1.1 La seguridad alimentaria	9
1.1.1 Factores clave de los problemas de seguridad alimentaria	9
1.1.2 Retos tecnológicos para avanzar en la seguridad alimentaria.....	10
1.1.3 La producción de proteínas de hongos comestibles	11
1.1.4 Producción de <i>Pleurotus ostreatus</i>	12
1.1.5 Compuestos bioactivos.....	14
1.2 Elementos tecnológicos de la producción del hongo <i>Pleurotus spp.</i>	15
1.2.1 Especies de <i>Pleurotus</i> más comunes.....	15
1.2.2 Sustratos lignocelulósicos.....	15
1.2.3 Pretratamientos a los materiales lignocelulósicos.....	16
1.2.4 Suplementos del medio	18
1.2.5 Parámetros de operación en la producción de <i>Pleurotus</i>	19
1.2.6 Resultados productivos del género <i>Pleurotus</i>	22
1.2.7 Biorreactores usados en la fermentación en estado sólido y en el cultivo de hongos	22
1.2.8 Optimización de medios de cultivo	24
1.2.9 Desarrollo de modelos estequiométricos	24
1.2.10 Modelación de la cinética en procesos de fermentación en estado sólido.....	26

1.2.11	Modelación matemática de los procesos de fermentación sólida	28
1.2.12	Modelos económicos empleados en el desarrollo de tecnologías	30
1.2.13	Métodos de optimización aplicados al desarrollo de tecnologías	30
1.2.14	Aspectos clave en el control del proceso de cultivo de hongos comestibles	31
1.3	Aspectos generales sobre el diseño de procesos	33
1.4	Análisis de prefactibilidad de las tecnologías en desarrollo	34
1.5	Estudio del impacto ambiental preliminar	35
1.6	Conclusiones del capítulo	38
2	ESTUDIO EXPERIMENTAL	39
2.1	Experimento 1. Selección de cepas del género <i>Pleurotus ostreatus</i>	39
2.1.1	Materiales y métodos del experimento 1	39
2.1.2	Discusión de los resultados del experimento 1	40
2.2	Experimento 2. Análisis del tipo de sustrato y tamaño de partículas	42
2.2.1	Materiales y métodos del experimento 2	42
2.2.2	Discusión de los resultados del experimento 2	44
2.2.3	Calidad del producto final	47
2.3	Experimento 3. Formulación experimental del medio de cultivo	49
2.3.1	Materiales y métodos del experimento 3	49
2.3.2	Discusión de los resultados del experimento 3	52
2.3.3	Experimentos de acercamiento al óptimo	54
2.3.4	Discusión de resultados del experimento de acercamiento al óptimo	54
2.4	Experimento 4. Propuesta de una ecuación estequiométrica	57
2.4.1	Materiales y métodos del experimento 4	57

2.4.2	Resultados y discusión del experimento 4	61
2.4.3	Cálculo de los coeficientes estequiométricos	64
2.4.4	Parámetros estimados con la ecuación estequiométrica	65
2.5	Experimento 5. Estudio cinético del crecimiento microbiano.....	66
2.5.1	Materiales y métodos del experimento 5.....	67
2.5.2	Discusión de los resultados del experimento 5	68
2.6	Experimento 6. Densidad de empaque y distribución de bioceldas	71
2.6.1	Materiales y métodos del experimento 6.....	71
2.6.2	Discusión de los resultados del experimento 6	73
2.7	Experimento 7. Ajuste del modelo matemático del biorreactor	75
2.7.1	Materiales y métodos del experimento 7	75
2.7.2	Discusión de los resultados del experimento 7	79
2.8	Conclusiones del capítulo	84
3	EVALUACIÓN DE LA PREFACTIBILIDAD	85
3.1	Materiales y métodos	85
3.1.1	Metodología para evaluar la prefactibilidad técnico-económica	85
3.1.2	Definición preliminar del tamaño de la planta.....	86
3.1.3	Propuesta de flujograma de proceso.....	86
3.1.4	Elaboración del modelo para la estimación de los costos.....	87
3.1.5	Dimensionamiento óptimo de la planta para la capacidad elegida	87
3.1.6	Aplicación de las técnicas de análisis de procesos.....	88
3.2	Discusión de los resultados.....	89
3.2.1	Definición preliminar del tamaño de la planta.....	89

3.2.2	Propuesta de flujograma de proceso.....	90
3.2.3	Dimensionamiento óptimo de la planta.....	92
3.2.4	Aplicación de las herramientas de análisis de proceso.....	96
3.3	Conclusiones del capítulo	101
CONCLUSIONES		102
RECOMENDACIONES		103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		104
ANEXOS		I
NOMENCLATURA		LII

INTRODUCCIÓN

Durante la primera mitad de este siglo, a medida que la población mundial aumente hasta alcanzar los 9 000 millones de personas aproximadamente, la demanda mundial de alimentos, piensos y fibras casi se duplicará y al mismo tiempo, cada vez más, los cultivos podrían también usarse para producir bioenergía y para otros fines industriales (FAO, 2011a).

De 2007 a 2009, la crisis de los precios de los alimentos seguida de la crisis financiera y la recesión económica mundial acarrió un incremento sin precedentes del número de personas que padecen hambre y subnutrición en el mundo, el cual superó la cifra record de 1000 millones en 2009 (FAO, 2011b).

El Ecuador al igual que el resto de los países en vías de desarrollo, no escapa de la problemática mundial de la inseguridad alimentaria y el cambio climático. Previendo minimizar su impacto negativo, en su Art. 281 de la Constitución de la República del Ecuador, establece que: “la soberanía alimentaria constituye un objetivo estratégico y una obligación del Estado para garantizar que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades alcancen la autosuficiencia de alimentos sanos y culturalmente apropiados de forma permanente. Impulsará la producción y transformación agroalimentaria de las pequeñas y medianas unidades de producción comunitarias, establecerá mecanismos preferenciales de financiamiento para los pequeños y medianos productores y productoras, facilitándoles la adquisición de medios de producción y además garantizará el desarrollo de la investigación científica, la capacitación e innovación tecnológica” (ASAMBLEA-NACIONAL, 2008). En su Artículo 5, del Código Orgánico de la Producción, Comercio e Inversiones, para la transformación de la matriz productiva, el Estado

incentivará la inversión productiva a través del fomento de: “la mejora de la productividad de los actores de la economía popular y solidaria y de las micro, pequeñas y medianas empresas, para participar en el mercado interno y, eventualmente, alcanzar economías de escala y niveles de calidad de producción que le permitan internacionalizar su oferta productiva” (ASAMBLEA-NACIONAL, 2010).

En todo el mundo las estrategias de las empresas y los gobiernos para afrontar el cambio climático, la producción energética, agrícola, tecnológica y de materiales están convergiendo cada vez más en torno a un mismo concepto: la biomasa.

La biomasa engloba más de 230 mil millones de toneladas de materia viva que la tierra produce cada año, como árboles, arbustos, pastos, algas, granos, microbios y más (ETC-group, 2010). Hasta ahora los seres humanos utilizan sólo una cuarta parte, aproximadamente 24 % de este recurso terrestre para satisfacer sus necesidades básicas y la producción industrial, lo cual deja un 76 % del total de la biomasa existente en el planeta sin aprovechar (ETC-group, 2010).

Ecuador basa su economía en la actividad agrícola y petrolera, considerado como el primer país exportador mundial de banano, entre los principales cultivos agrícolas se destacan, el cacao, el banano, el café, la palma africana, la caña de azúcar, el maíz, el arroz, la soya, la papa y el fréjol seco, entre otros (INEC, 2002). De la cosecha del cacao, los residuos representan el 80 % (Bermúdez y col., 2002).

Una de las direcciones importantes en el combate al hambre es la utilización de residuos lignocelulósicos para la producción de proteínas no convencionales como la de microorganismos unicelulares (Ali y Zulkali, 2011; Bramsiepe y col., 2012; Chacón, 2004; Freibauer y col., 2011; Hisakazu, Oaza y Hanishina-Gun, 1989; McNeil y Harvey, 2008; Mee y Valley, 1978; Silva y col., 2011; Suryanarayan y Mazundar, 2001).

El consumo de proteína de origen microbiano es muy antiguo y conocido en todos los continentes. A principios del siglo XX se convierte en una opción biotecnológica para el aprovechamiento de desechos

de origen agroindustrial (Anupama y Ravindra, 2000; Chacón, 2004; Gao, Li y Liu, 2012; Hamer, 2010; Martínez y col., 2000; Pandey y Soccol, 1998; Robles y col., 2012).

Los microorganismos más utilizados para estos fines pertenecen a las familias de las microalgas, bacterias, levaduras y hongos. El consumo de proteína de bacterias está limitado, debido a problemas de toxicidad, mientras que la proteína de levaduras presenta un alto contenido de ácido ribonucleico (ARN) que limita su consumo en humanos. La proteína de microalgas presenta cierta toxicidad en niveles cercanos a los 100 g diarios en ensayos con seres humanos (Otero, Bernal y Almazán, 1982).

El reino fúngico es una alternativa atractiva por su bajo costo de producción y ventajas nutricionales naturales con respecto a otros microorganismos (Ghorai y col., 2009): buen contenido de proteína (del 20 al 30 % BS); tienen todos los aminoácidos esenciales, alto contenido de vitamina B y bajo en grasa.

Los hongos filamentosos más utilizados para estos fines son de los géneros: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia*, *Volvariella* y *Flammulina* (Chang y Miles, 2004) y dentro de los géneros de hongos más cultivados a nivel mundial se encuentra el *Pleurotus* *sp.p.* Existen varias experiencias científicas relacionadas con la tecnología de fermentación en estado sólido del hongo *Pleurotus* *spp* sobre residuos agroindustriales lignocelulósicos. Con el objetivo de producir proteína comestible se destacan las especies de *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. sajor-caju*, *P. pulmonarius*, *P. sapidus*, *P. cornucopiae*, *P. djamor*, *P. citrinopileatus* (Giovannozzi y col., 2002).

Respecto a las materias primas más utilizadas, en la mayoría de los casos estudiados son residuos agroindustriales (Dwivedi y col., 2011; Nasreen y col., 2008; Saidu, Salim y Mohamed, 2011; Shrivastava, Thakur, Khasa, y col., 2011; Suárez, 2010; Toledo, 2008; Varnero, 2010): la paja de trigo, de arroz, de cebada, y de sorgo, el aserrín de madera, el bagazo de caña, la cascarilla de café y últimamente, pastos de corte como el pasto elefante.

El complejo lignocelulósico está constituido de una matriz de carbohidratos de celulosa y lignina entrelazada por cadenas de hemicelulosa (Abril, 2008). Esta estructura ofrece gran resistencia al ataque de los microorganismos. En la literatura se reportan diferentes pretratamientos aplicados con el objetivo de facilitar el aprovechamiento de la biomasa (Brethauer y Wyman, 2010; Vantomme, 2010).

Los pretratamientos pueden ser físicos y químicos, enzimáticos o una combinación de todos (Wang y col., 2005). El pretratamiento ideal a estos materiales consiste en lograr: fibras reactivas, separar las pentosas sin degradarlas, no generar compuestos que inhiban la fermentación y no requerir una reducción drástica del tamaño de partículas (Abril, 2008; Balat, 2011). Se ha reportado el empleo de algunas sustancias con el propósito de mejorar los rendimientos productivos en el crecimiento de los hongos. Esto es debido a que generalmente los residuos vegetales lignocelulósicos son materiales de bajo contenido de nitrógeno y algunos minerales como el magnesio (Cuipinga y col., 2004; Parikh, Channiwala y Ghosal, 2007; Shen y col., 2010; Vargas y col., 2012; Vassilev y col., 2012).

A nivel local en Ecuador, se ha estudiado la posibilidad de producir productos no tradicionales para la exportación, como el hongo ostra (*Pleurotus*) que representa una oportunidad de inversión ya que éste es un país agro-forestal (Carranza, Luzuriaga y Mejía, 2005). También se ha estudiado la fermentación en estado sólido del *Pleurotus* en los siguientes residuos: cacao, maíz, quinua, palma africana (raquis), trigo, cebada, avena, vicia, paja de páramo y residuos de flores (proteas) entre otros. La eficiencia biológica reportada es variable dependiendo del tipo de residuo estudiado y oscila entre el 19 y 96,67 % (Bermúdez y col., 2003; Ramos, 2007a; Tocagón, 2010; Toledo, 2008).

En la mayoría de los estudios se ha utilizado la cepa CP-184 de *Pleurotus ostreatus* var. *Florida*, de la colección de cultivos del Centro de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente de Cuba. También se reporta el uso de cepas importadas de México (Toledo, 2008). Por primera vez en Ecuador se realizan estudios exploratorios de fermentación en estado sólido de *Pleurotus ostreatus*, en

residuos de flores (proteas) utilizando una cepa nativa R24 de *Pleurotus* de la colección del Centro Ecuatoriano de Investigación de Setas (CEIS) que reportan 19 % de bioconversión con un contenido de proteína de 23,74 % (BS) (Pineda, 2007). Se observa que la eficiencia biológica es baja y se requiere realizar estudios de esta variable con mayor profundidad, principalmente de las cepas nativas en función del tipo de residuo seleccionado.

La producción de hongos comestibles surgió históricamente como un proceso artesanal con un alto componente de empirismo en ambientes rurales y en pequeña escala. Aún hoy, una buena parte de la producción mantiene estos rasgos, sobre todo aquella destinada al consumo local (González y Gutiérrez, 2001). De la literatura consultada por el autor sobre las tecnologías de producción de este basidiomiceto se aprecia que está fragmentada, dispersa y, en algunos aspectos, es escasa. Se han encontrado modelos matemáticos para describir el crecimiento del micelio de *P. ostreatus* (Sarykaya y Ladisch, 1997), sin embargo, en la literatura no hay reportados modelos estequiométricos ni cinéticos para describir el crecimiento del cuerpo fructífero de *P. ostreatus* por fermentación en estado sólido, los modelos macroscópicos reportados son muy simples y excluyen el término de la velocidad de la reacción, similarmente, no existen datos de la aireación, transferencia de masa y calor, etc., que se utilizan para la formulación del modelo físico (Han y col., 2009).

El diseño de estos procesos requiere del conocimiento de ciertos factores asociados a las necesidades del crecimiento del microorganismo: la cantidad y tipo de nutrientes, la influencia de la actividad del agua, de la temperatura y el pH, por citar los más reportados (Abril, 2008; Graciano y col., 2009; Julián, 2008; McNeil y Harvey, 2008; Membrillo y col., 2011; Mitchell, Krieger y Verovic, 2006; Omarini y col., 2010; Shrivastava, Thakur, Khasa, y col., 2011). Problemas como el crecimiento limitado de la biomasa, el sobrecalentamiento del medio y bajos rendimientos en base al consumo de las materias primas y a la síntesis de productos son algunas de las consecuencias que se derivan de diseños basados en un

conocimiento limitado del sistema. Estas deficiencias ponen en peligro la factibilidad económica del proceso, aun cuando se parta de materias primas baratas, como son la mayoría de los residuos agroindustriales.

Problema científico: Determinar los parámetros operacionales para la fermentación en estado sólido del hongo *Pleurotus ostreatus* hasta obtener un proceso que sea técnica, económica y ambientalmente viable, que por su sencillez, pueda implementarse a nivel de pequeñas producciones locales.

Objeto de la investigación: El proceso tecnológico de producción de la biomasa de *Pleurotus ostreatus* a partir de residuos lignocelulósicos aplicando la modelación matemática en la etapa de fermentación en estado sólido.

Campo de investigación: La fermentación en estado sólido del *Pleurotus ostreatus* a pequeña escala. Algunos estudios han reportado el uso de residuos lignocelulósicos como materia prima para la producción de biomasa de hongos, en algunos casos suplementados con fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Los trabajos hacen énfasis en la selección de la cepa más adecuada, tamaño de partícula, diseño del medio de cultivo y control de los parámetros de operación como la humedad y la temperatura. Respecto al diseño de los bioprocesos éstos se basan en la modelación matemática global, que integra tanto los modelos estequiométricos, cinéticos y físicos, obtenidos a partir de pruebas experimentales ya sea en escalas de laboratorio o industrial, lo cual permite integrarse al modelo económico que determina la factibilidad de la inversión (Stamets, 2000), (Pandey, 2003), (Ramos, 2000), (Bermúdez y col., 2002), (Julián y Ramos, 2007), (Chang, 1999), (Izquierdo y Dustet, 2004), (Mitchell y col., 2006).

Hipótesis: Utilizando un modelo matemático aplicable al proceso fermentativo que revele las necesidades fisiológicas del hongo durante su crecimiento, se puede desarrollar un proceso productivo viable desde el punto de vista técnico, económico y ambiental, útil para pequeñas producciones locales.

Objetivo General: Desarrollar una tecnología a pequeña escala para la producción de la biomasa del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) a través de la modelación matemática de la etapa de fermentación en estado sólido de residuos lignocelulósicos, de tal forma que sea técnica, económica y ambientalmente viable.

Objetivos específicos:

1. Determinar las tendencias más relevantes en el desarrollo de las tecnologías de producción del *Pleurotus sp p.*, que permita el establecimiento de una estrategia para su intensificación en pequeñas producciones locales.
2. Seleccionar la cepa y determinar la formulación adecuada del medio de cultivo para establecer los elementos básicos de la producción de *P. ostreatus*.
3. Elaborar un modelo físico del proceso de fermentación en estado sólido del *P. ostreatus*, utilizando residuos lignocelulósicos que permita la predicción de la dinámica del proceso.
4. Determinar los parámetros operacionales del proceso de fermentación en estado sólido de *P. ostreatus* utilizando residuos lignocelulósicos, para obtener un proceso productivo eficiente, rentable y amigable con el medio ambiente.
5. Evaluar la prefactibilidad técnica, económica y ambiental de la propuesta tecnológica, que permita la valoración del proceso inversionista a pequeña escala.

Novedades y aportes de la investigación:

1. Por primera vez se describe una alternativa técnica, económica y ambientalmente viable para la producción de biomasa de *P. ostreatus* a pequeña escala, utilizando fermentación en estado sólido.

2. Se diseñó y formuló un medio de cultivo adecuado para la fermentación de *P. ostreatus* en residuos locales de fréjol, utilizando el sustrato agotado como una materia prima.
3. Se propone un modelo estequiométrico y el cálculo de sus coeficientes para la fermentación en estado sólido del *P. ostreatus* en residuos de fréjol.
4. La selección de un modelo cinético y la identificación de sus parámetros para el crecimiento del cuerpo fructífero del *P. ostreatus* por fermentación en estado sólido de residuos de fréjol.
5. Se propone un modelo físico novedoso con una estructura que tiene en cuenta la captura de agua por parte del cuerpo fructífero, lo que permite describir la dinámica del crecimiento del hongo en la simulación del proceso de fermentación en estado sólido.

CAPÍTULO 1
ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO

1 ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO

1.1 La seguridad alimentaria

1.1.1 Factores clave de los problemas de seguridad alimentaria

El concepto de seguridad alimentaria es muy complejo, ya que abarca los conceptos de producción, acceso, estabilidad, salubridad, nutrición y aspectos culturales (Vivero y Porras, 2008). Para la FAO, existe inseguridad alimentaria cuando hay personas que no tienen acceso a una cantidad suficiente de alimentos, inocuos y nutritivos, para un crecimiento y desarrollo normales y una vida activa y sana (FAO, 2008).

La seguridad alimentaria mundial está en estos momentos seriamente comprometida y en peligro de una crisis irreversible. El incremento de la producción mundial de alimentos, en términos absolutos y per cápita, no ha contribuido a resolver este problema, ni mucho menos en la eliminación del hambre (Rabbinge y Bindraban, 2012). En las décadas venideras la población mundial acelerará su crecimiento llegando a más de 9 mil millones de habitantes para el 2050 (Rabbinge y Bindraban, 2012; Yu y col., 2012), la alimentación cambiará hacia un mayor consumo per cápita (Rask y Rask, 2011) por lo que es necesario duplicar la producción de alimentos en todo el mundo para ese año (Mueller, Anderson y Wallington, 2011; Rabbinge y Bindraban, 2012).

En las condiciones actuales, la seguridad alimentaria parece ser una meta imposible de alcanzar de no haber cambios en el modo de producción imperante en el mundo. Reportes recientes de la FAO reconocen la existencia de una crisis crónica en la seguridad alimentaria mundial (Bedford y col., 2011).

Varios factores influyen en este aspecto, el cambio climático responsable de enormes pérdidas productivas por sequías e inundaciones (Amigun, Musango y Stafford, 2011; Freibauer y col., 2011; Garnett, 2011; Hanjra y Qureshi, 2010; Harvey y Pilgrim, 2011; Maxwell y col., 2010; Premalatha y col., 2011; Rask y Rask, 2011; Yu y col., 2012). Se calcula que este factor será el causante del aumento de los precios de los alimentos entre un 30 y 50 % en las próximas décadas (Harvey y Pilgrim, 2011; PNUD, 2011). La crisis financiera internacional que distorsiona el escenario de las relaciones económicas (Freibauer y col., 2011; Hanjra y Qureshi, 2010) y la crisis energética (Brethauer y Wyman, 2010; Hanjra y Qureshi, 2010) ha conducido a la producción de agro-combustibles que compiten por tierra y agua con los alimentos (Amigun y col., 2011; Kuchler y Linnér, 2012) disparando los precios de los alimentos en el año 2008 (Mueller y col., 2011) y, más recientemente, la nueva aceleración del incremento de los precios observada desde 2011 y que aún continúa (Bedford y col., 2011; Lagi y col., 2011; Mueller y col., 2011; Nonhebel, 2012). A esto se une como agravante la desigual distribución de la riqueza en las sociedades, que afecta dramáticamente a los sectores más pobres, tal como se recoge en informes del PNUD y otros (Lagi y col., 2011; PNUD, 2011). Como consecuencia principal de esta situación, en la actualidad existen en nuestro planeta un billón de personas subalimentados y se calcula que hacia el año 2050 la situación empeore (Yu y col., 2012).

1.1.2 Retos tecnológicos para avanzar en la seguridad alimentaria

En el ámbito de la ciencia, la solución a los retos actuales de la seguridad alimentaria y la producción de alimentos se centran en el incremento de la eficiencia de los sistemas productivos actuales y la búsqueda del necesario equilibrio entre la tierra y las necesidades humanas (Phalan y col., 2011).

Dentro de la innovación tecnológica se le da alta importancia a la Biotecnología para lograr un incremento en la eficiencia de la utilización de la biomasa que juega un papel fundamental en la

producción de alimentos y energía (Ali y Zulkali, 2011; Bramsiepea y col., 2012; Freibauer y col., 2011; Yu y col., 2012).

La Biotecnología permite aprovechar y reciclar residuales agroindustriales sólidos, líquidos y gaseosos de los cuales se puede obtener una alta gama de productos para la alimentación de uso directo, para el consumo como las proteínas o de uso indirecto, como alimento animal (Silva y col., 2011) o aditivos alimentarios (Ali y Zulkali, 2011). Dentro de los retos más urgentes que es necesario resolver y en los que la Biotecnología juega un importante papel, se encuentra la producción alternativa de proteínas.

Los sistemas de producción de proteína animal son extremadamente ineficientes y demandan una gran cantidad de cereales para conseguirlo (Premalatha y col., 2011; Rask y Rask, 2011). En virtud de la creciente demanda de este tipo de alimentos y la escasez de tierras para las producciones tradicionales (Ali y Zulkali, 2011; Harvey y Pilgrim, 2011) se proponen alternativas de fuentes más sanas y eficientes, como el consumo de proteína de microorganismos (Anupama y Ravindra, 2000; Nah y Chau, 2010; Queiroz y col., 2010; Rajoka y col., 2012) tales como: las micro-algas, bacterias, levaduras, hongos y hasta insectos comestibles (Premalatha y col., 2011).

1.1.3 La producción de proteínas de hongos comestibles

Entre los hongos superiores filamentosos mayormente utilizados para la producción de proteína microbiana, se encuentran los géneros: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Leptinula*, *Auricularia*, *Volvularia*, y *Flammulina* (Chang y Miles, 2004).

Los aspectos más atractivos del cultivo de hongos como fuente de proteína microbiana son la cosecha fácil y barata del cuerpo fructífero, la facilidad de producir como alimento texturizado, la buena aceptabilidad para el consumo y el uso de materiales lignocelulósicos residuales utilizados como sustratos para su cultivo (Otero y col., 1982). La producción de hongos filamentosos a partir de materiales lignocelulósicos se ha señalado que es una alternativa muy rentable (Israelidis, 2003).

Después de la Segunda Guerra Mundial, la producción de hongos inició un crecimiento constante con una producción de 350 000 toneladas en 1965, mientras que para 1991 la producción creció hasta 4,3 millones de toneladas (Chang y Miles, 2004).

1.1.4 Producción de *Pleurotus ostreatus*

Al *Pleurotus o streatus* (Jacquin ex Fries) Kummer, se le conoce comúnmente como Hongo Ostra, Hiratake y Tomogitake. Es uno de los más comunes de todos los hongos saprofitos, distribuidos por casi todos los bosques tropicales del mundo. Crecen saprofiticamente en otoño y primavera, sobre maderas duras de hoja ancha, a veces coníferas especialmente madera de algodón, roble, aliso, maple, álamo temblón, fresno, haya, abedul, olmo, sauce y álamo (Stamets, 2002). También crecen en troncos de árboles secos y restos de vegetales, generalmente pobres en nutrientes (García, 2008; García, 1998). En su estructura se encuentra la siguiente composición: proteína (Nx4,38) 10,5-30,4 %; carbohidrato total 57,6-81,8 %; grasa 1,6-2,2 %; fibra 7,5-8,7 %. Entre los aminoácidos, vitaminas y minerales se tienen: leucina, isoleucina, valina, triptófano, lisina, treonina, fenilalanina, metionina, histidina, arginina, tiamina (B1), niacina, riboflavina, ácido ascórbico, Ca, P, K, Fe, Na (Chang, 1999).

Se conoce que esta especie tiene los siguientes constituyentes activos: 3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A-reductasa, proteína ubiquitina de *Pleurotus* y Pleuran (β -glucan) (Stamets, 2002). Entre sus propiedades medicinales se destaca su efecto terapéutico como anti-bacterial, antiviral, regulador de la presión sanguínea, cardiovascular, reductor del colesterol, tónico para los nervios, anti-inflamatorio, fortalecedor del sistema inmunológico (Stamets, 2002). Recientes estudios muestran que *Pleurotus ostreatus* y otras especies producen naturalmente una forma de Lovastatin® (3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A-reductasa), una droga aprobada por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) en 1987 para el tratamiento del exceso de colesterol en la sangre (Bobek, Ozdin y Mikus, 1995; Gunde y Cimerman, 1995). Estudios con ratas implantadas con

sarcoma 180, alimentadas con el 20 % de *Pleurotus ostreatus* en su dieta diaria, mostraron que el tumor fue inhibido en un 60 % (Querino-de-Sousa, Carneiro-do-Nascimento y Correia, 2004). Wang y colaboradores (2000) han identificado una novedosa proteína ubiquitina del hongo *Pleurotus ostreatus*, que inhibe la actividad del VIH y evita que las células sean infectadas con este virus (Wang y Ng, 2000). Estudios realizados sobre cultivo del *Pleurotus* spp. en sustratos enriquecidos con cadmio, mostraron un incremento significativo en la concentración tanto de cobre como de cadmio en el cuerpo fructífero, lo cual puede tener efectos tóxicos (Favero, Costa y Paolo, 1990). Los estudios realizados indicaron que los metabolitos biológicamente activos en los extractos de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* se encuentran en concentraciones bajas por lo que presentan una baja toxicidad, lo que los hace más seguros para su uso como nutraceuticos (Nieto y col., 2008).

El *Pleurotus* spp. es una seta comestible muy valorada (Zorn, Berger y Takenberg, 2005) es el segundo género más producido a nivel mundial (Chang y Miles, 2004; Suárez y Nieto, 2012), con una producción en el año 2004 de 917,4 toneladas métricas (Chang y Miles, 2004). Su promoción comercial se ha basado en resaltar las propiedades nutricionales y medicinales con las que cuentan estas especies. Se acostumbra a destacar el alto contenido en vitaminas y minerales de estas cepas, además de su buen sabor y textura suave. También se les reconoce ampliamente la capacidad de mejorar el funcionamiento del sistema inmunológico, reducir los altos niveles de colesterol y de ser útil en el tratamiento de tumores cancerígenos (Díaz y Ortiz, 2001).

La gran variedad de especies cultivadas, de sustratos empleados, de condiciones climáticas, de escala de trabajo y nivel de desarrollo técnico disponible en que se producen los hongos, hacen que existan métodos y medios de producción muy diferentes (González y Gutiérrez, 2001).

De manera general, la producción de hongos puede incluirse en el campo conocido como fermentación en estado sólido, en el cual se incluyen procesos tales como la producción de compost, el ensilaje y los

procesos tradicionales asiáticos de fermentación del fréjol de soja y de arroz (*koji*, *tempeh* y otros). Los fundamentos teóricos que sirven de base para modelar, desde el punto de vista de la ingeniería, este tipo de fermentaciones, difieren sustancialmente de las fermentaciones en fase líquida. Lo mismo sucede con las unidades de operación involucradas en diferentes etapas del proceso (preparación de sustrato, recuperación de producto, transferencia de calor y otros) (García, 1998).

Mientras que el crecimiento micelial y la producción de determinados metabolitos han sido objeto de estudios fisiológicos y cinéticos, y se han desarrollado modelos y ecuaciones para describir su comportamiento, la fase de fructificación de los hongos superiores, que es decisiva en la producción de hongos comestibles, está mucho menos estudiada científicamente, la ingeniería de procesos de producción que permita diseñar un proceso productivo rentable y eficiente (González y Gutiérrez, 2001).

La utilización de los residuos agro-industriales es particularmente interesante debido a su disponibilidad y bajo costo (Martins y col., 2011). Hacia el futuro se vislumbra un crecimiento acelerado del aprovechamiento de estas fuentes de energía y materias primas.

1.1.5 Compuestos bioactivos

Los hongos comestibles son conocidos por su alto contenido de proteínas, vitaminas, minerales, fibra dietética y por su bajo nivel de sodio y grasas insaturadas. En su composición también se encuentran sustancias bioactivas con potencial terapéutico, como: los glucanos, las enzimas, los policétidos, los ácidos grasos, los polifenoles, los flavonoides y los terpenoides, entre otros (Suárez y Nieto, 2012). Las especies de *Pleurotus* son reconocidas por su producción de β -glucanos, constituyentes de la pared celular del cuerpo fructífero y del micelio, con importantes propiedades medicinales (Miranda, 2005). A partir de los tallos del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) se ha obtenido glucano inmuno-estimulante (Gabrizova, 2006).

Dentro de los beneficios más apreciados en la biomasa de estos hongos se encuentran diferentes tipos de actividad de algunos metabolitos presentes que tienen efecto: antioxidante, hipocolesterolémico, hipoglucémico, antibacteriano, antiviral, regulador del sistema cardiovascular, anti-cancerígeno e inmunomodulador. Estos beneficios son una causa muy reconocida sobre el incremento, a nivel mundial, del consumo de este tipo de hongos y del estudio de sus bioactivos (Suárez y Nieto, 2012).

1.2 Elementos tecnológicos de la producción del hongo *Pleurotus spp.*

1.2.1 Especies de *Pleurotus* más comunes

Existen unas 2 000 especies de hongos comestibles, 80 de éstas han sido cultivadas experimentalmente y sólo 5 ó 6 se producen a escala industrial; entre ellas se encuentran las del género *Pleurotus* (Chang y Miles, 2004). Los hongos del género *Pleurotus* tienen un lugar importante entre los basidiomicetos empleados comercialmente debido a sus propiedades gastronómicas, nutritivas y medicinales. Por otro lado, éstos se pueden cultivar fácilmente en un rango grande de sustratos (Miranda y col., 2008). En la tabla I.1 de los anexos, se presentan las especies de *Pleurotus* encontradas en la bibliografía en orden de importancia. Con el objetivo de producir biomasa se destacan las especies de *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. sajor-caju*, *P. pulmonarius*, *P. sapidus*, *P. cornucopiae*, *P. djamor*, *P. citrinopileatus* (Chang y Quimio, 1982; Giovannozzi y col., 2002; González y Gutiérrez, 2001; Hisakazu y col., 1989).

1.2.2 Sustratos lignocelulósicos

En la tabla I.1 columna 2, se presenta la variedad de materias primas lignocelulósicas utilizadas en la producción de este género. En la mayoría de los casos son residuos agroindustriales (Bermúdez y col., 2002; Chang, 1999; Pandey y Soccol, 1998; Stamets, 2000). Entre éstos se destacan: la paja de trigo, de arroz, de cebada, el aserrín de madera, el bagazo de caña y, últimamente, pastos de corte como el pasto elefante. También se han empleado otros tipos de residuos lignocelulósicos como paja de sorgo y

la cascarilla de café (Bermúdez y col., 2002). En los Estados Unidos, uno de los principales productores de este hongo, las materias primas más utilizadas para la producción de *Pleurotus spp.* son la paja de trigo y la cáscara de semillas de algodón (Royse, 2003). Una formulación frecuentemente utilizada en la preparación del sustrato para la producción de *Pleurotus* ha sido la mezcla de 75 % de cáscara de semilla de algodón, 24 % de paja de trigo y 1 % de caliza molida. Se adiciona también agua para incrementar el contenido de humedad de 67 a 69 % (Royse, 2003).

1.2.3 Pretratamientos a los materiales lignocelulósicos

El complejo lignocelulósico está constituido de una matriz de carbohidratos de celulosa y lignina entrelazada por cadenas de hemicelulosas (Abril, 2008). Se conoce que esta estructura ofrece gran resistencia al ataque de los microorganismos, lo cual afecta la productividad del proceso. El objetivo de los pretratamientos es facilitar a los microorganismos el aprovechamiento de la biomasa, que permita acelerar su degradación (Bisio y Kabel, 1985; Dunn y Michaels, 1989).

Los pretratamientos pueden ser físicos, químicos y enzimáticos o una combinación de todos (Wang y col., 2005). El pretratamiento ideal a estos materiales consiste en lograr: fibras reactivas, separar las pentosas sin degradarlas, no generar compuestos que inhiban la fermentación y no requerir una reducción drástica del tamaño de partículas (Abril, 2008; Balat, 2011). El proceso debe ser simple, operarse con bajo contenido de humedad y no generar residuales sólidos. Los reactores empleados deben ser de tamaño razonable y costo moderado.

1.2.3.1 Pretratamientos físicos

La transformación de estos materiales normalmente comienza con la reducción del tamaño de partícula mediante procesos de astillado y molienda, lo que permite lograr la apertura de la fibra del material fibroso, disminuir el grado de cristalización de la celulosa (Vivero y Porras, 2008) y facilitar la posterior penetración de los agentes químicos y enzimáticos (Perfetti, 2001). El molinado con bolas vibratorias es

mucho más efectivo en la reducción de los cristales de algunos materiales fibrosos (Vivero y Porras, 2008).

En la tabla I.2 de los anexos se presentan los principales tamaños de partículas reportados en la literatura para el cultivo de *Pleurotus*. Se observa que con mayor frecuencia oscilan entre 0,92 y 100 mm. En el caso de utilizar paja de trigo para la producción de hongos, ésta se corta a una longitud entre 20 y 60 mm (Royse, 2003).

Uno de los pretratamientos físico-químico más utilizado es el de explosión con vapor. Este proceso logra un ablandamiento de la fibra, pero, según Balat (2011), aumenta el nivel de cristalinidad de la celulosa, al tiempo que hidroliza fácilmente las hemicelulosas y promueve la remoción de la lignina. Pretratamientos de esta naturaleza han sido patentados, como por ejemplo el establecido por Ladisch (1998), que consiste en el calentamiento del material con vapor de agua hasta 220°C, manteniendo el pH del medio en el rango de auto-hidrólisis, que facilita la hidrólisis de la celulosa (Ladisch y col., 1998). Este pretratamiento es usado con éxito para cultivar hongos (Villalba y Starik, 2010).

1.2.3.2 Pretratamientos químicos

Las alternativas de pretratamientos químicos más comunes se hacen con ácidos y álcalis (Pandey y Soccol, 1998). En el caso de la aplicación de ácidos, éstos han sido utilizando concentrados a bajas temperaturas o, diluidos a altas temperaturas (Abril, 2008). Por cuestiones de costo y menor toxicidad la elección es casi siempre ácido sulfúrico (Brethauer y Wyman, 2010). Se ha reportado con buenos resultados también el uso del ácido fosfórico mezclado con acetona y otros solventes. El tratamiento con ácido concentrado opera a temperaturas bajas y cercanas a los 40 °C y consigue rendimientos en glucosa cercano al 90 % del teórico (Brethauer y Wyman, 2010). El tratamiento con ácido diluido está más difundido en la práctica (Vantomme, 2010); consume menos ácido y ocurre a mayor velocidad debido a que se efectúa a temperaturas más altas (Brethauer y Wyman, 2010). El tratamiento de la fibra

lignocelulósica con álcalis es bastante frecuente y se le atribuyen buenos resultados en el crecimiento de *Pleurotus* (Dwivedi y col., 2011; Tocagón, 2010). El pretratamiento con amoníaco ha mostrado ser más efectivo con la ventaja de poder reciclarlo debido a su volatilidad (Dwivedi y col., 2011). Recientemente un trabajo en el que se comparan los diferentes métodos, mostró que el tratamiento ácido es el más recomendable (Domínguez y col., 2012).

1.2.3.3 Pretratamientos enzimáticos

Actualmente se realizan grandes esfuerzos por desentrañar la ruta crítica a seguir para liberar y separar secuencialmente la lignina sin que exista pérdida significativa de azúcares debido a la conversión precoz de las hemicelulosas (Bermúdez y col., 2003; Carranza y col., 2005). El mecanismo de acción enzimático para degradar el complejo lignocelulósico aún no está totalmente comprendido debido a la gran variedad de estructuras en la biomasa y de enzimas que actúan de forma independiente o en sinergismo. Las tendencias que se observan en este sentido tienen tres direcciones: (i) la búsqueda de un coctel enzimático balanceado que logre un mejor sinergismo, (ii) la mejora de la eficiencia de la producción de las enzimas y por tanto menores costos de adquisición y, (iii) el perfeccionamiento de las enzimas en cuanto a su actividad y estabilidad (Torres y Hurtado, 2003) que reduzca los tiempos de tratamiento y aumente la reutilización de las enzimas. Los pretratamientos hacen más complejos los procesos y aumentan los costos por lo que, para pequeñas producciones, deben ser lo más simples posibles, buscando economía en el proceso.

1.2.4 Suplementos del medio

El empleo de algunas sustancias, con el propósito de mejorar los rendimientos productivos en el crecimiento de los hongos, ha sido una práctica bastante común según se deduce de la tabla I.1; esto es debido a que generalmente los residuos vegetales lignocelulósicos son materiales de bajo contenido de nitrógeno y algunos metales como el magnesio. En la tercera columna de la tabla I.1 se presenta una

gran variedad de suplementos reportados, tanto orgánicos como inorgánicos. En ese sentido se observa que se ha utilizado desde salvados de cereales hasta fitohormonas, en su mayoría ricos en contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio.

También son comunes los sustratos mixtos, como el patentado por Ju (2007) en Korea, basado en aserrín, salvado de arroz y extracto ginseng, con 65 % de humedad (Ju, 2007). El suministro de algunos suplementos permite la inducción de propiedades deseadas en la biomasa final, tal como se observa en la patente coreana de Choi (2008), que para aumentar el contenido de vitamina C del hongo, introducen quitosano en el medio de cultivo (Choi, 2008; Kim, 2010).

Dentro de los suplementos inorgánicos más frecuentes se encuentran aquellos que son ricos en nitrógeno, fosfatos y magnesio. Estos suplementos permiten un mejor crecimiento de las cepas y un mayor agotamiento de los residuos lignocelulósicos, todo lo cual redundará en procesos de conversión más eficientes desde el punto de vista económico.

El carbonato de calcio es otro suplemento frecuentemente utilizado en el cultivo de *Pleurotus spp.* Su empleo quizás se deba a que sirve de fuente de calcio, para el control del pH, para retener la humedad y para evitar la compactación del sustrato húmedo, aspectos estos clave para el desarrollo de las hifas y el cuerpo fructífero.

1.2.5 Parámetros de operación en la producción de *Pleurotus*

En la tabla 1.2 se presentan los principales parámetros de operación estudiados en la producción de *Pleurotus*. Se han registrado datos de pH, humedad del sustrato, humedad relativa del aire, temperatura e intensidad luminosa.

El pH encontrado en las diferentes referencias, va de ligeramente ácido a neutro. No se registran valores de pH por encima de 7. Aunque los microorganismos crecen bien en un rango de pH relativamente grande (Barreto, 2008), su mejor desempeño está más restringido a un rango más

pequeño de valores, de manera que el control de esta variable resulta importante. Por la naturaleza de los procesos de fermentación en estado sólido, el control de este factor resultaría muy difícil hacerlo de forma eficaz por los métodos tradicionales. En la práctica, para estos fines, se acude al empleo en el medio de cultivo de sustancias con efecto tampón como la urea (Ramos, 2000) y el carbonato de calcio, tal como se reporta en la tabla I.1. El control del pH por esta vía demanda de la optimización de estas sustancias en el medio de cultivo (Ramos, 2000) y puede ser un elemento que incremente significativamente el costo de producción.

La humedad del sustrato está directamente relacionada con la disponibilidad de agua en el medio, factor muy importante para la actividad del hongo. Sin embargo, altas humedades pueden conducir a la compactación del medio, dificultando la transferencia de oxígeno, de otros gases y del calor metabólico. Al mismo tiempo puede ser la base para la contaminación con bacterias u otros microorganismos. En el sustrato la humedad oscila entre 60 y 80 %. Estos niveles se consideran normales para los procesos de fermentación en estado sólido (Mitchell y col., 2006) no obstante, bajas humedades del medio hacen vulnerable el sistema al secado e influyen para que se establezca una menor productividad del hongo. La humedad del sustrato influye en el mayor o menor uso de agua en el proceso.

Desde el punto de vista ambiental, debería tenerse en cuenta que el agua es un recurso escaso por lo que a mayores volúmenes que se empleen, aumenta el impacto negativo del proceso. Por otro lado, una mayor utilización de agua implica mayores costos productivos, no sólo por el gasto de este recurso sino por la liberación al medio del sustrato agotado por el hongo, que puede exigir un tratamiento de secado anterior a la salida de este residuo sólido.

En general se reconoce que la humedad relativa del aire es un factor muy importante para el desarrollo del hongo (Espinosa, Hernández y Ferrer, 2001) y que especialmente influye en la transición de su forma vegetativa a la reproductiva (Han y col., 2009). Bajos valores de humedad relativa producen el

secado gradual del sustrato y de la masa del cuerpo fructífero, algo que de ningún modo puede ser positivo. Los valores de humedad relativa investigados oscilan entre 31 y 100 %, aunque los mejores resultados se reportan entre 85 y 95 %. Conseguir altas humedades relativas en el aire puede implicar un costo de inversión y operación del proceso que no se puede admitir. Por otro lado, un aire saturado puede conducir a la presencia de gotas de agua en el medio, que den lugar a su contaminación. Éste es un factor de diseño que resulta de gran interés optimizar para las producciones industriales.

La temperatura del cultivo es un factor muy importante para el desarrollo de los organismos vivos y como se observa en la tabla I.2, ha sido estudiado en rangos entre 7 y 37 °C. Depende de la cepa y de la región geográfica de donde procede. Los límites óptimos de esta variable son más reducidos, en general, que los del pH, por eso se le ha dedicado esfuerzos para su control automático preciso en casas de cultivo especialmente diseñadas para conseguirlo (Han y col., 2009).

El control de la intensidad de la luz, como parámetro de operación, está reconocido como importante para la eficiencia del cultivo y coloración final del cuerpo fructífero. Este factor interactúa con la temperatura por lo que su nivel óptimo depende de ésta (Kibar y Peksen, 2008). Por otro lado, se reporta que en el cultivo *in vitro* y en paja de arroz de *P. sajur-caju*, la luz inhibe el crecimiento vegetativo pero es necesaria para el crecimiento del cuerpo fructífero, aunque no influye en el tiempo de aparición del primordio en los primeros cinco días. Combinaciones de etapas oscuras cada 12 horas y de cierta iluminación (5 lux) podrían ayudar al mejor desarrollo del cuerpo fructífero (Kibar y Peksen, 2008). En la literatura analizada este factor no es usado para optimizar el ambiente del cultivo, sólo se halló el trabajo de Kibar (2008) que apenas refiere tres más. Según se observa en la tabla I.2 los niveles de intensidad de luz utilizados son muy variables lo que no refleja claramente si ésta podría ser una variable de peso en el desarrollo de procesos para la producción de biomasa del género *Pleurotus*.

Otros factores muy importantes son la composición del aire, en cuanto a oxígeno y a dióxido de carbono, que afectan el desarrollo de la hifa y el cuerpo fructífero (Han y col., 2009). Se reconoce que altas concentraciones de CO₂ estimulan la colonización del sustrato por las hifas pero en la etapa de fructificación su influencia es negativa y que, el *Pleurotus* es muy sensible en este sentido (Stamets, 2000). Se ha recomendado que la concentración de este factor esté por debajo de los 1 000 ppm (Han y col., 2009).

1.2.6 Resultados productivos del género *Pleurotus*

Como se observa en la tabla I.3 de los anexos, el principal resultado productivo estudiado para el género *Pleurotus*, es la eficiencia biológica expresada en kg de hongos frescos por 100 kg de sustrato seco. En la literatura consultada, esta respuesta es muy variable y oscila entre 2,97 y 104,3 %. El resultado es una función de la especie de *Pleurotus*, el tipo de materia prima, el pretratamiento, los suplementos utilizados y los parámetros de operación del biorreactor.

1.2.7 Biorreactores usados en la fermentación en estado sólido y en el cultivo de hongos

En la literatura se han reportado diferentes tipos de fermentadores para el proceso de FES. En general estos equipos son de fermentación estática o dinámica (Mitchell y col., 2006). Dentro de los fermentadores estáticos se encuentran: el fermentador de bandeja y el fermentador de cama estática. Los fermentadores agitados son, entre otros: el fermentador de túnel, el fermentador de disco rotatorio, el fermentador de tambor rotatorio, el fermentador de tanque con agitación y el fermentador continuo tipo tornillo (Mitchell y col., 2006).

La producción de biomasa del hongo *Pleurotus* a partir de su cuerpo fructífero se basa en el proceso de fermentación en estado sólido. Considerando que el crecimiento de la biomasa del cuerpo fructífero se realiza fuera de la biocelda de crecimiento del micelio, o sea, de forma aérea, los fermentadores más

recomendables serán los estáticos. La operación de este fermentador es simple, sin partes móviles, no requiere de agitación mecánica y se lleva a cabo por lotes.

En la literatura se reportan cinco tipos de fermentadores para la producción de *Pleurotus* por FES: camas fijas tipo caballón, camas en estantería o bandejas, en botellas, en bolsas plásticas y en columnas perforadas (Chang, 1999; Martínez y col., 2000; Stamets, 2002). El proceso en caballón es el más antiguo y menos costoso. Consiste en amontonar el sustrato en el piso como para compost. Este proceso es el menos eficiente ya que ocupa grandes áreas de espacio para la producción con riesgos de contaminación del producto final.

El fermentador tipo cama en estantería es mucho más eficiente en cuanto al área disponible pues aprovecha mejor la posición vertical. Por su ubicación hay un mejor control de la asepsia, sin embargo, incrementa los costos de inversión. La fermentación en botellas es muy eficiente en cuanto a la automatización y el control de la asepsia pero sus costos de inversión son altos al igual que sus costos de operación (Stamets, 2000). En la figura I.1 de los anexos, se muestran fotos del cultivo de *Pleurotus* en bolsas y en columnas rellenas perforadas. El cultivo en estos sistemas ha emergido como tecnología económica, con buenos resultados en la producción, ocupando menos espacio por unidad de volumen en la cámara del biorreactor.

El cultivo de hongos en diferentes recipientes con facilidades específicas se encuentra con frecuencia protegido por patentes. Así, por ejemplo, en México se ha patentado el cultivo de *Pleurotus ostreatus* en tubos perforados de cloruro de polivinilo (PVC) donde se reporta una productividad entre 66 y 79 kg/(m².año) para un periodo de 25 - 30 días (Galicía, 1995). La fermentación en botella recientemente ha conseguido nuevos avances patentados que permite acelerar el proceso empleando un material plástico capaz de resistir la esterilización y cambios bruscos de temperatura (Kim, 2010). También se ha

patentado una instalación para el cultivo de champiñón con ahorro de espacio acudiendo a una geometría circular en forma de iglú (Suárez, 2011).

1.2.8 Optimización de medios de cultivo

Pueden ocurrir situaciones en las cuales sea imperativa la optimización de los medios de cultivo. Entre ellas podemos mencionar las siguientes: 1) No existencia de información respecto a coeficientes de rendimiento de macro y micro elementos para el cultivo del microorganismo determinado. 2) Existencia de limitaciones nutricionales ocultas, especialmente de microelementos y factores de crecimiento. 3) Uso de medios de cultivo conteniendo elementos en exceso respecto de los requerimientos nutricionales del microorganismo en cuestión, que pueden causar inhibición del crecimiento. 4) Ensayo de sustancias estimulantes, activadoras e inhibidoras del crecimiento y formación del producto. 5) Empleo de fuentes nutricionales no convencionales (Ertola, Yntorno y Mignore, 1994).

Se han caracterizado los óptimos de crecimiento miceliares de dos cepas silvestres de seta de cardo (*Pleurotus eryngii*). Los medios sólidos utilizados son extracto de malta y PDA. Las cepas silvestres codificadas como plerper y plerse muestran versatilidad en su cultivo en medio sólido al presentar óptimos de velocidad de crecimiento micelar a 21 °C, y mayor producción en biomasa a 25 °C (Andrino, Morte y Honrubia, 2011).

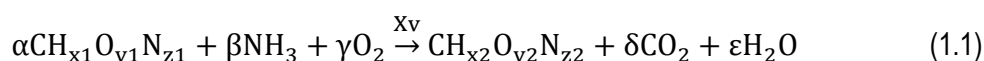
1.2.9 Desarrollo de modelos estequiométricos

El proceso de crecimiento microbiano implica que se lleven a cabo reacciones de generación de energía y de biosíntesis. La estequiometría del crecimiento microbiano establece las relaciones de transformación de los reaccionantes en productos. Se asume que el microorganismo crece usando una fuente de carbón y una fuente de nitrógeno, y produce biomasa. Además, durante el crecimiento se intercambian con el medio ambiente, dióxido de carbono (CO₂), agua (H₂O) y oxígeno.

El aspecto estequiométrico requiere conocer los rendimientos, es decir, la relación entre el producto producido y el sustrato consumido (Aguilar, 2007). Por el conocimiento de la estequiometría de crecimiento y de formación del producto, es posible formular adecuadamente un medio.

Una de las contribuciones primarias al desarrollo de los modelos de los bioprocesos, proviene de la identificación de un modelo estequiométrico que sirva para establecer relaciones másicas entre las principales materias primas involucradas (Ertola y col., 1994). De estos modelos se derivan análisis simplificados donde se emplea una sola ecuación estequiométrica global, con enfoque no estructurado o, más complejos con varias ecuaciones basadas en el metabolismo celular y la interacción célula-medio de cultivo (Ertola y col., 1994; Sinclair, 2001). Tras un análisis exhaustivo de la literatura sobre el tema, no se encontró referencia a una ecuación estequiométrica para describir el crecimiento del basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* en residuos agroindustriales.

El primer paso en la formulación de un medio de cultivo es considerar la ecuación básica de estequiometría de crecimiento y formación de producto. Para el cultivo aeróbico se tiene el siguiente modelo general (Ertola y col., 1994; Stanbury, Whitaker y Hall, 2003):



Se sostiene que la composición elemental de los microorganismos es el punto de partida para realizar los cálculos estequiométricos y que dicha composición promedio es (% p/p): C = 46,5; H = 6,49; O = 31,0; N = 10,85, sales 5 % (Ertola y col., 1994). De esta manera es posible escribir la "fórmula mínima" de un microorganismo promedio como: C_{H_{1,79}O_{0,5}N_{0,2}} (en la que está representado el 95 % p/p de la biomasa) y con fines netamente prácticos definir "un C-mol de biomasa" como la cantidad de biomasa que contiene un átomo gramo de carbono. Según Crow (2000), para la determinación de las fórmulas empíricas, la técnica más utilizada es el análisis elemental, que permite obtener el contenido de C, H, N y S; las cenizas se determinan por análisis bromatológico y el Oxígeno es calculado por diferencia. Las

proporciones relativas se calculan por la relación entre el contenido porcentual de cada elemento y su masa atómica, y los resultados se dividen para la proporción relativa del carbono, de tal forma que la fórmula empírica quede expresada en función de 1 C-mol de carbono. Según Ertola (1994), los coeficientes estequiométricos de la ecuación se calculan por un balance elemental y un balance de electrones.

1.2.10 Modelación de la cinética en procesos de fermentación en estado sólido

Teóricamente, en un modelo que describe la cinética de crecimiento microbiano, la velocidad de crecimiento se describe en función de los factores ambientales más importantes que pueden incidir en este proceso. En la FES surge un serio problema al incluir las concentraciones de nutrientes como uno de los factores determinantes del crecimiento de las células (Mitchell y col., 2006).

La transferencia de masa dentro de la partícula del sustrato se limita por la difusión y como resultado del consumo de nutrientes por el microorganismo, surgen gradientes de concentración dentro del sustrato. Es necesario utilizar las ecuaciones que describen la difusión del nutriente dentro de la partícula del sustrato, las ecuaciones de difusión se escriben en términos de los cambios en el tiempo y el espacio, son ecuaciones en derivadas parciales más difíciles de resolver que las ecuaciones diferenciales ordinarias.

Cualquier intento de describir la distribución espacial de la biomasa en el biorreactor FES aumentará en gran medida la complejidad del modelo. Muchos hongos se producen por procesos FES, no es un asunto sencillo describir su crecimiento en tres dimensiones.

Como consecuencia de estas dificultades, la concentración de biomasa es simplemente tratada en modelos de biorreactor, como el promedio global sobre la partícula, que se expresan en gramos de biomasa seca/gramos de sólidos secos (Mitchel, Von y Kriegerc, 2003).

Los modelos cinéticos para procesos con FES a menudo son ecuaciones empíricas sencillas y no describen la distribución espacial de la biomasa. Además, debido a las dificultades de medir biomasa y los estados metabólicos dentro de los sistemas de la FES, muchos modelos cinéticos son "no estructurados" y "no segregados" (Mitchell y col., 2006){Ramos, 2007 #659}.

No es posible la estimación directa del crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* por FES en material lignocelulósico insoluble, por la dificultad de separación del micelio del hongo del sustrato sólido. Para medir el crecimiento del hongo, se han utilizado métodos indirectos, como el balance de masa con la composición de los gases de la fermentación, el contenido de Chitin y Ergosterol (Sarykaya y Ladisch, 1997).

Sarikaya y col. (1997), proponen un modelo matemático para el crecimiento del micelio de *Pleurotus ostreatus* por FES, donde miden el crecimiento micelial del hongo en una capa de material lignocelulósico de 1,5 cm de espesor y 9 cm de diámetro (Sarykaya y Ladisch, 1997).

El modelo logístico permite describir la dinámica del crecimiento del cuerpo fructífero de la cepa estudiada a las diferentes temperaturas y sus parámetros μ_{\max} y X_{\max} dependen de la temperatura y han sido modelados con un modelo empírico de tipo polinómico (Pineda, Ramos y Soto, 2013).

Díaz (2009), realiza estudios de producción de *Pleurotus o streatus* por fermentación sumergida, reportando los parámetros cinéticos de desarrollo del hongo como $\mu = 0,034 \text{ h}^{-1}$, $X_{\max} = 8,3 \text{ g/L}$, $Y_{X/S} = 0,69 \text{ g X/g S}$ (Díaz, 2009).

Los estudios cinéticos encontrados sobre *Pleurotus spp.* están dedicados casi exclusivamente al cultivo sumergido (Benkortbi, Hanini y Bentahar, 2007; Pastorini y col., 2009). En el único artículo consultado dedicado expresamente a modelar la cinética del crecimiento en fase sólida se usa como variable el crecimiento radial del hongo (Ruhul y col., 2008), algo que limita su aplicación al cálculo del proceso.

En sentido general, la velocidad de crecimiento microbiano es una función multifactorial, sin embargo, si el medio de cultivo se diseña de manera que solo haya un sustrato limitante y se controlan bien otros factores como el pH y la temperatura, entre otros, entonces la velocidad de crecimiento queda definida en función del sustrato limitante y su concentración. En el caso de la fermentación de sustratos sólidos insolubles, el microorganismo va disolviendo la cantidad que necesita y la concentración del sustrato permanece constante aproximadamente (Ramos, 2007b). Este tipo de cinética microbiana lo representa el modelo logístico (Mitchell y col., 2006).

1.2.11 Modelación matemática de los procesos de fermentación sólida

Existen dos posibilidades extremas de aproximación a la modelación de biorreactores FES: un modelo simple con solución rápida y un modelo mecanístico completo. Los pasos para el desarrollo del primer modelo son: concentrarse en un proceso lo más simplificado posible, desarrollar la ecuación estequiométrica que no involucre la concentración de nutrientes, la determinación experimental de la cinética de crecimiento global y el rendimiento, y tratar el biorreactor con un modelo pseudo-homogéneo de fase simple con propiedades promedio del sólido y la fase gaseosa en equilibrio. Considerar al biorreactor como un sistema donde el modelo describa la transferencia de masa y energía desde la cama con los alrededores, asumiendo mezcla perfecta y la fase sólida estática (Mitchell y col., 2006).

Un modelo de predicción del medio ambiente circundante a la fase sólida fue desarrollado para una ventilación óptima, en una casa de setas utilizando un balance de calor sensible y un modelo en tres dimensiones (3-D) de la dinámica de fluidos computacional (CFD) (Han y col., 2009). Se consideraron la respiración de los hongos y el uso de un radiador de baja capacidad. Una ecuación de ventilación específica para la casa de setas fue desarrollada para calcular la velocidad de ventilación para una condición ambiental dada. Las tasas de ventilación calculadas se compararon con los datos medidos experimentalmente para la temperatura interior ajustada a la óptima para el cultivo de setas (16,2 °C)

con diferentes temperaturas exteriores. Simulaciones en 3-D de CFD se realizaron utilizando la misma condición ambiental para establecer la distribución de calor local en una casa de hongos. El modelo de CFD también se utilizó para mejorar la distribución del calor de una casa de setas. El modelo presenta limitaciones en cuanto a la cinética, sin embargo podría ser usado para predecir las condiciones ambientales en diferentes ubicaciones en una casa de setas sin la necesidad de determinar experimentalmente la velocidad de ventilación (Han y col., 2009).

En la literatura consultada son escasos los estudios que, con un enfoque fenomenológico, pretenden resolver problemas relacionados con el diseño de los procesos de cultivo de *P. ostreatus*. Se ha propuesto un modelo simplificado basado en balances de masa y energía macroscópicos, considerando mezcla perfecta en la casa de cultivo, para mejorar el control de la temperatura durante el crecimiento del hongo *Lentinus edodes* (Han y col., 2009). En este trabajo se desprecia el calor liberado debido al metabolismo celular, algo que simplifica demasiado el modelo y no puede generalizarse. De esa manera no fue necesario estimar la dinámica del crecimiento y la liberación de calor metabólico. Por lo tanto, se hizo innecesario modelar la cinética del crecimiento. En un trabajo más elaborado, se aplica un modelo en tres dimensiones basado en el cálculo de la dinámica de fluidos (CDF) (Giovannozzi y col., 2002; Han y col., 2009; Sarykaya y Ladisch, 1997). Este trabajo tampoco hace uso directo de la cinética del crecimiento del hongo y considera que el calor liberado por la biomasa está relacionado directamente con la temperatura en el recinto de cultivo.

Las simplificaciones descritas pueden ser debidas a la dificultad de modelar un sistema en el que existe crecimiento del micelio en fase sólida y del cuerpo fructífero de forma aérea. Son bien conocidas las dificultades para la elaboración de modelos para los procesos de fermentación en estado sólido (Nasreen y col., 2008; Yu, Yu y Buswell, 1997).

1.2.12 Modelos económicos empleados en el desarrollo de tecnologías

La optimización en la solución de un problema surge por la necesidad de minimizar recursos y esfuerzos. Los objetivos típicos para el diseño de procesos incluyen el costo de inversión, el costo de operación, el rendimiento de los productos y la ganancia total (Julián, 2008). Para cuantificar la mejor solución se necesita una función objetivo que sirva como un indicador cuantitativo para una solución particular.

Un diseño óptimo se basa en las mejores o más favorables condiciones del proceso. Generalmente las condiciones óptimas se reducen a consideraciones de costo-beneficio. De esta manera, un diseño económico óptimo puede estar basado en las condiciones para obtener un mínimo costo por unidad de tiempo o un máximo beneficio por unidad de producción (Peters y Timmerhaus, 1991).

Algunos estudios indican que los modelos básicos de ingeniería económica más utilizados son el Flujo de Caja, Valor Actual Neto y Tasa Interna de Retorno (Izquierdo y col., 2003; Oquendo, 2002).

1.2.13 Métodos de optimización aplicados al desarrollo de tecnologías

Para realizar el trabajo de investigación se hace necesario utilizar los métodos de la experimentación, el análisis y síntesis, estadísticos, de modelación matemática, de optimización, de simulación y económicos. La necesidad y sobre todo la posibilidad de optimizar se hace patente cuando se procede a diseñar tecnológicamente un proceso (Brizuela, 1987).

La estrategia general de optimización por programación lineal establece una derivada parcial de la variable dependiente de la que se determina las condiciones óptimas absolutas. Este procedimiento supone que un máximo absoluto o mínimo, se encuentra dentro de los límites de funcionamiento alcanzables y es restringido a las condiciones relativamente simples en el que las restricciones no son limitantes.

Los problemas industriales implican el establecimiento del mejor programa posible para satisfacer las condiciones existentes en circunstancias óptimas que pueden estar en una condición de límite o en lugar de un cierto punto máximo o mínimo (Peters y Timmerhaus, 1991).

El enfoque computacional se basa en el principio de optimización, que señala que una política óptima tiene la propiedad de que, no importa el estado inicial y la decisión inicial, las restantes decisiones deben constituir una política óptima con que cuenta el estado resultante de la primera decisión (Peters y Timmerhaus, 1991).

1.2.14 Aspectos clave en el control del proceso de cultivo de hongos comestibles

En la producción de hongos por FES, la ingeniería ambiental desarrolla una importante función: el control de la temperatura apropiada, la humedad, aireación y luz. En las fases de su crecimiento estas variables deben ser controladas bien manualmente o de forma automática (Stamets, 2007).

De todos los factores físicos, la temperatura ha sido la más ampliamente estudiada en cuanto a su efecto sobre el crecimiento de los hongos. La sobrevivencia de una especie en la etapa micelial puede ser establecida por valores máximos y mínimos de temperaturas de las especies, lo cual indica que existe una temperatura óptima para el crecimiento del hongo, para el caso del *P. ostreatus* esta se ubica en los 18 °C. El papel de la temperatura está relacionado con la actividad enzimática la cual generalmente aumenta a medida que lo hace la temperatura, altas y bajas temperaturas pueden causar la incapacidad de una especie para sintetizar una vitamina necesaria, lo cual provocará interrupción del crecimiento del hongo (Chang, 1999). El calor generado por las actividades metabólicas de los hongos en el proceso FES aumenta la temperatura de la cámara de producción, lo que hace necesario la evacuación de dicho calor. De allí la importancia del estudio de la transferencia de calor de la fase sólida a la fase gaseosa.

La mayoría de los hongos requieren altos niveles de humedad. Se ha demostrado que en el cultivo del hongo *Lentinula spp.* por el proceso FES, se forma agua metabólica. Al considerar los elementos de humedad para el cultivo de hongos hay dos consideraciones importantes: el contenido de humedad del sustrato que se ubica en el 70 % y la humedad relativa de la atmósfera en la cual crecen las setas entre 80 y 90 %. Los valores óptimos de humedad relativa para el *Pleurotus spp.* es de 95 a 100 %, permite un crecimiento máximo con poca pérdida del contenido de humedad del sustrato debido a evaporación (Chang, 1999; García, 1998).

Los componentes gaseosos de la atmósfera de mayor importancia en el cultivo de hongos son el oxígeno y el dióxido de carbono, el *P. ostreatus* es un hongo aeróbico y se debe tener en cuenta la transferencia de masa de la fase gaseosa a la fase sólida y es importante tener un nivel de oxígeno adecuado para el crecimiento de los micelios. El crecimiento vegetativo puede aumentar cuando el nivel de CO₂ aumenta ligeramente, en la respiración aeróbica el hongo descompone los carbohidratos del sustrato hasta convertirlos en CO₂ y H₂O, mientras un incremento de la concentración de CO₂ por encima del adecuado inhibe completamente el crecimiento (Stamets, 2007).

El control de la asepsia es otro parámetro de gran importancia en la producción de *P. ostreatus*, para prevenir contaminación del cultivo, ya sea por plagas o enfermedades, la difusión debe prevenirse con medidas enérgicas de desinfección de los locales de cultivo, la desinfección de equipos, desinfección del calzado, el cambio de ropa del cultivador, la recogida en bolsa cerrada de los cultivos enfermos, la colocación de filtros de aire junto a los ventiladores, la destrucción de los residuos y el tratamiento de los sustratos gastados con calor (García, 1998).

Los recipientes para el cultivo de hongos son diversos, encontramos bolsas de papel, de plástico, cajones de madera, botellas de plástico, troncos de madera, entre otros (Steineck, 1987).

Stamets (2007) reporta estudios de producción de *Pleurotus spp.* en columnas de polietileno de 15,24 cm de diámetro, con orificios de 0,95 cm de diámetro y una densidad de 200 orificios/m². En este trabajo el autor presenta una nueva biocelda para la producción de *P. ostreatus* por FES, basada en una columna de tubo de policloruro de vinilo de 60 cm de altura y 10,16 cm de diámetro, con perforaciones de 1,27 cm de diámetro y una densidad de perforaciones igual a 400 orificios/m². La densidad de perforación es el doble de la reportada en la literatura, debido a que se necesita garantizar que la biocelda no experimente gradientes de temperatura en el proceso de FES.

1.3 Aspectos generales sobre el diseño de procesos

La transformación de procedimientos exploratorios o de investigación a pequeña escala, en procesos comerciales a gran escala, es una responsabilidad importante y de reto para el ingeniero químico. En el diseño de procesos no existe absolutamente una solución perfecta, lo que existe generalmente es una solución óptima (Ulrich, 1984).

La tarea de diseño de procesos constituye un campo actual de investigación de la ingeniería química, que debe tener en cuenta el análisis complejo de procesos, el contexto, la viabilidad técnica, la factibilidad económica y la compatibilidad ambiental (Pérez y col., 2012).

Los procedimientos para el diseño de procesos han comprendido principalmente las etapas de síntesis, integración, análisis y evaluación. Inicialmente los desarrollos se centraban en la síntesis, la realización de balances de masa y energía, el análisis y la evaluación (Peters y Timmerhaus, 1991; Rudd, 1968). En los años 80 se presentan varios autores, entre los que se destacan Cross, Douglas, Ulrich, Scenna, quienes consideran como etapas la síntesis, el análisis y la evaluación, empleando diferentes enfoques para la síntesis. A partir de 1990 y con el surgimiento del diseño integrado, se proponen las etapas de síntesis e integración (Pérez y col., 2012).

El análisis de procesos se refiere a la investigación de las características de cada alternativa generada mediante la evaluación de las variables de salida, conociendo las características del sistema y las variables de entrada (Scenna, 1999).

La evaluación de procesos se refiere al examen del grado de adecuación entre un conjunto de informaciones y de criterios apropiados al objetivo fijado con el fin de tomar una decisión (De Ketele, 1980). Los bioprocesos son una parte esencial de muchas industrias de alimentos, farmacéutica y química.

Los bioprocesos hacen uso de células de plantas, animales, microorganismos y sus componentes celulares como las enzimas, para fabricar nuevos productos o destruir residuos (Doran, 1995; McNeil y Harvey, 2008). El uso de microorganismos para la producción de alimentos fermentados tiene sus orígenes en la antigüedad. Subsecuentemente entonces, se han desarrollado los bioprocesos para un alto rango de productos comerciales a partir de materiales relativamente baratos como el alcohol industrial y los solventes orgánicos y los químicos especialmente costosos como los antibióticos, proteínas terapéuticas y vacunas. Las enzimas de células vivas, de utilidad en la industria de panificación y cerveza también son productos comerciales de los bioprocesos (Stanbury y col., 2003).

El desarrollo de tecnologías eficientes para el cultivo de basidiomicetos está necesitando de la existencia de información científica pertinente para la aplicación de los métodos modernos de la Ingeniería de Procesos. En la actualidad los procesos eficientes necesitan de procedimientos de diseño basados principalmente en la modelación matemática de procesos y de la optimización por simulación computacional (Garnett, 2011; Mitchell y col., 2006).

1.4 Análisis de prefactibilidad de las tecnologías en desarrollo

La viabilidad de los proyectos de inversión se establece en tres tipos de estudios: diseño preliminar, diseño de detalle estimado y diseño de detalle final. Un estudio preliminar da una indicación de éxito

probable del proyecto y también muestra que es necesario hacer una evaluación completa de información adicional. A continuación se presenta una lista de elementos que deben ser considerados en la elaboración de un estudio de viabilidad: materias primas (disponibilidad, cantidad, calidad, costo), termodinámica y cinética de las reacciones químicas (equilibrio, rendimiento, velocidad, condiciones óptimas) disponibilidad de equipamiento y facilidades, estimación de los costos de producción e inversión (rentabilidad, rentabilidad probable, rentabilidad óptima, rentabilidad por kilogramo de producto, retorno de la inversión) materiales de construcción, consideraciones de seguridad, mercados, ventas y servicios de ventas, métodos de venta y distribución, localización de la planta, restricciones legales y situación de patentes (Peters y Timmerhaus, 1991). El estudio de prefactibilidad también aborda la valoración del impacto ambiental del proyecto, ya que el tratamiento de los residuos, puede generar costos tanto de inversión como de producción e influir sobre el costo de producción unitario del producto principal.

1.5 Estudio del impacto ambiental preliminar

La Legislación Ambiental Ecuatoriana está regida por la Ley de Gestión Ambiental y su reglamento recogido en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA). El artículo 19 de la Ley de Gestión Ambiental del Ecuador establece que “las obras públicas, privadas o mixtas, y los proyectos de inversión públicos o privados que puedan causar impactos ambientales, serán calificados previamente a su ejecución, por los organismos descentralizados de control, conforme al Sistema Único de Manejo Ambiental (SUMA), cuyo principio rector será el precautelatorio”. El Artículo 36 del TULSMA, establece cuatro categorías ambientales para los proyectos de inversión (Tapia, 2014b):

Categoría ambiental I (certificado de registro ambiental): dentro de esta categoría se encuentran catalogados los proyectos, obras o actividades cuyos impactos y riesgos ambientales que son considerados no significativos. Aplica Guía de Buenas Prácticas Ambientales.

Categoría II (licencia ambiental categoría II): dentro de esta categoría se encuentran catalogados los proyectos, obras o actividades cuyos impactos ambientales y/o riesgos son considerados de bajo impacto. Aplica Ficha Ambiental y Plan de Manejo.

Categoría III (licencia ambiental categoría III): dentro de esta categoría se encuentran catalogados los proyectos, obras o actividades cuyos impactos ambientales y/o riesgos son considerados de mediano impacto. Aplica Estudios de Impacto Ambiental.

Categoría IV (licencia ambiental categoría IV): dentro de esta categoría se encuentran catalogados los proyectos, obras o actividades cuyos impactos ambientales y/o riesgos son considerados de alto impacto. Aplica Estudios de Impacto Ambiental.

A continuación se enumeran cuatro metodologías de evaluación de impacto ambiental, utilizadas por varias instancias reguladoras del medio ambiente en América Latina (Izquierdo y col., 2003).

Matriz de Importancia de Impacto Ambiental (MIIA): se colocan en las filas de un cuadro matriz todos los factores ambientales que pueden verse afectados por el proyecto y en las columnas de dicho cuadro matriz, las diferentes acciones o actividades que ejercerían impactos sobre los factores. Se juzgan cuáles acciones afectan a cuáles factores. No es necesario que todas las acciones influyan sobre todos los factores, pero si puede haber acciones que afecten a varios factores a la vez o factores que son impactados por varias actividades diferentes. Se evalúa el impacto correspondiente en cada caso para cinco elementos de evaluación que son: intensidad del impacto, extensión del impacto, momento de influencia del impacto, persistencia del impacto a través del tiempo y reversibilidad del impacto.

Matriz de Criterios Relevantes Integrados (MCRI): este método para realizar la identificación de impactos de un producto determinado, también utiliza una matriz de trabajo y en cierta medida es similar al método anterior, con la diferencia de que la calificación de los elementos de importancia de cada impacto solo puede tomar tres valores: 10, 5 o 2 y se trabaja exclusivamente con los impactos de tipo negativo o perjudicial para el ambiente. Se califica cada impacto en términos de cinco elementos de calificación: intensidad, extensión, duración, reversibilidad y riesgo.

Matriz de Leopold: la Matriz de Leopold fue el primer método que se utilizó para medir el impacto ambiental de los proyectos. Consiste en una matriz en la cual se colocan las acciones o cambios que el proyecto puede generar y que se considera que pueden afectar el medio ambiente en las columnas y las características del medio (factores ambientales, humanos, biológicos y culturales) que pueden ser alterados en las filas, estableciendo así relaciones entre acciones del proyecto y los factores del medio. Dentro de la celda que une cada acción con cada factor del medio se colocan dos números en un rango de 1 a 10. El primer número, colocado en la parte superior izquierda, indica la magnitud de cada acción, en la que 10 corresponde a una alteración máxima de un factor y 1 a una alteración mínima.

Ficha de Evaluación Ambiental (FEA): la Ficha de Evaluación Ambiental (FEA) es un proceso directo y simplificado para la valoración del impacto ambiental de proyectos de inversión.

En este trabajo el autor ha seleccionado la FEA como la metodología adecuada para realizar la valoración del impacto ambiental del estudio de prefactibilidad. Para proyectos de categoría I y II, la legislación ecuatoriana no requiere de estudios de impacto ambiental y solo requiere de la aplicación de la ficha ambiental para emitir el respectivo permiso ambiental (MAE, 2003).

1.6 Conclusiones del capítulo

1. El crecimiento cada vez más acelerado de la población mundial, en un contexto poco favorable al crecimiento de la producción de alimentos tradicionales, demanda de un mayor aprovechamiento de los recursos de la biomasa acumulada en los residuos agroindustriales.
2. La producción de proteínas de hongos comestibles resulta una línea de trabajo con grandes perspectivas presentes y futuras para los pequeños productores; para aumentar la probabilidad de éxito en este empeño se necesita intensificar las tecnologías de FES existentes y dotarlas de la capacidad productiva que se demanda para competir con otras fuentes de alimento para consumo humano.
3. El cultivo del basidiomiceto *Pleurotus spp.* cuenta con la posibilidad de usar una gran variedad de residuos lignocelulósicos, los que apropiadamente complementados con algunas fuentes de nitrógeno, fósforo y otros minerales, permitan lograr producciones de biomasa de alta calidad para la alimentación humana.
4. Parámetros de operación como el pretratamiento a la materia prima, la humedad del sustrato, la humedad del aire, su temperatura y contenido de CO₂, son muy importantes para la productividad del proceso, mientras que otros como la intensidad de la luz, no hay consenso sobre su acción.
5. En sentido general, la producción de *Pleurotus* se realiza en procesos de fermentación en estado sólido con un alto nivel de empirismo, ya que no se han encontrado referencias de modelos estequiométricos y cinéticos del crecimiento del cuerpo fructífero, mientras que los modelos de balances de masa y energía poseen simplificaciones que limitan su aplicación.

CAPÍTULO 2

ESTUDIO EXPERIMENTAL

2 ESTUDIO EXPERIMENTAL

2.1 Experimento 1. Selección de cepas del género *Pleurotus ostreatus*

El objetivo de este experimento es seleccionar la mejor cepa de *Pleurotus ostreatus*, a través de la comparación de sus velocidades específicas de crecimiento lineal, de tal manera que permita realizar el proceso de fermentación en el menor tiempo posible.

2.1.1 Materiales y métodos del experimento 1

Cepas: se utilizaron las cepas, ceba-gliie-po-010105 y ceba-gliie-po-010106 de *P. ostreatus*, aisladas previamente de la sierra ecuatoriana en la provincia de Imbabura. Estas cepas fueron identificadas en la Universidad Central de Ecuador (UCE) y depositadas en la colección de cultivos del Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente (CEBA).

Medio de cultivo: para la selección de la mejor cepa de *P. ostreatus*, se utilizó un medio rico basado en agar de extracto de malta (*FUNGI PERFECTI*[®]). Su preparación se hizo siguiendo la técnica descrita por Stamets (2000, 2007).

Unidad experimental: se usó como unidad experimental una placa Petri de 100 mm de diámetro y 15 mm de altura, con un volumen útil de 10 ml.

Factores estudiados: se estudió el factor variedad de cepa de *P. ostreatus*, con dos niveles: ceba-gliie-po-010105 (Cepa 1) y ceba-gliie-po-010106 (Cepa 2).

Variables respuesta: se seleccionó la velocidad de crecimiento lineal promedio (r_x). La medición del crecimiento del micelio se realizó con una cinta métrica directamente sobre la placa Petri previamente marcada en círculos concéntricos.

Parámetros de operación: se estableció la temperatura de incubación en 20 °C.

Diseño experimental y tratamiento estadístico: se seleccionó un diseño completamente al azar, con 5 réplicas por tratamiento para un total de 10 corridas. El experimento fue realizado en un solo bloque. Se plantearon las siguientes hipótesis: Nula (H_0): $\mu_{\text{cepa1}} = \mu_{\text{cepa2}}$ y alternativa (H_A): $\mu_{\text{cepa1}} \neq \mu_{\text{cepa2}}$. Se realizó un análisis de varianza y la prueba de diferencia mínima significativa (*LSD*) con el paquete estadístico *STATGRAPHIS®*, *Centurion XV*, versión 15.2.05.

Procedimiento experimental: se preparó el medio de cultivo diluyendo 50 g de agar extracto de malta en 1 000 ml de agua destilada. Se esterilizó a 121 °C y 103 421,40 Pa por un tiempo de 15 minutos. El medio esterilizado se sirvió en las placas Petri. Luego se inoculó con la cepa en el centro de la placa, tal como se muestra en la figura II.1 de los anexos. Las placas sembradas se colocaron en la incubadora y se ajustó la temperatura a 20 °C. Pasados siete días (168 h) se realizó la medición de crecimiento lineal del micelio.

2.1.2 Discusión de los resultados del experimento 1

Comparación de las medias de r_x para las dos cepas: en la tabla 2.1 se muestran los resultados de la medición de la velocidad de crecimiento de ambas cepas, según el orden de ejecución de cada corrida experimental.

Estos resultados son elevados pues, si se comparan con los reportados por varios autores en diferentes años y partes del mundo (Bhatti y col., 2007; Chukwurah y col., 2012; Donini, Bernardi y do-Nascimento, 2006; Donini y col., 2005; Frimpong y col., 2011; Gibriel y col., 1996; Gregori y col., 2008; Hasan y col., 2010; Marino y col., 2008; Soto y col., 1999), en cepas semejantes, resultan estar por encima de todos. Estas altas velocidades son debidas, seguramente a que el medio empleado en esos reportes no es tan rico para el crecimiento como el empleado aquí. No obstante, este experimento revela que estas dos cepas tienen un buen potencial para su explotación comercial en cuanto a este indicador.

Tabla 2.1 Resultados del crecimiento de las cepas en medio rico

Orden de ejecución	Cepa	Crecimiento radial (mm)	r_x (mm/h)
1	2	100	0,595
2	2	97	0,577
3	1	86	0,512
4	1	87	0,518
5	2	98	0,583
6	2	97	0,577
7	1	85	0,506
8	1	86	0,512
9	1	87	0,518
10	2	98	0,583

Análisis de varianza: en la tabla II.1 de los anexos, se presenta el análisis de varianza realizado a la variable velocidad de crecimiento celular.

Como el *valor-p* de la prueba-F es menor que 0,01, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de r_x de una cepa y de la otra, con un nivel superior al 99,0 % de confianza.

En la tabla II.2 de los anexos, se ofrecen los resultados de la aplicación del procedimiento de la Diferencia Mínima Significativa (LSD por sus siglas en inglés). Según esta tabla se puede afirmar con un 95 % de confianza que la velocidad de crecimiento de la cepa 2 es estadísticamente superior a la cepa1. De esta manera quedó definido que los futuros experimentos fueran realizados utilizando la Cepa 2 como candidato para la futura producción de biomasa proteica.

2.2 Experimento 2. Análisis del tipo de sustrato y tamaño de partículas

El objetivo de este experimento es seleccionar el mejor sustrato lignocelulósico y el tamaño de partículas para la producción de *Pleurotus ostreatus*, a través del estudio de la eficiencia biológica y la productividad de la biomasa, que permita el máximo aprovechamiento de las materias primas.

2.2.1 Materiales y métodos del experimento 2

Cepa y preparación del inóculo: se empleó la cepa ceba-gliie-po-010106, que resultó ser la de mayor velocidad de crecimiento en medio rico, según resultados del experimento 1. La preparación del inóculo se hizo de igual forma a como se hizo en el experimento anterior.

Medio de cultivo: se usaron tres tipos de residuos lignocelulósicos sin otros suplementos nutritivos. Los residuos de fréjol del género *Phaseolus vulgaris*, cosechados en Ecuador procedentes de la comunidad afro-ecuatoriana “La Concepción”, provincia del Carchi. Los residuos de banano del género *Musa paradisiaca*, cosechados en Ecuador procedentes de la comunidad de “Getsemaní”, provincia de Imbabura. Los residuos de la caña de azúcar (bagazo) del género *Saccharum officinarum*, procedentes de la empresa Ingenio Azucarero del Norte (IANCEM) de la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura. Los residuos se trocearon utilizando la máquina picadora PENAGOS PE800 de fabricación colombiana. Luego de picados se procedió a secarlos al sol. A las muestras de los residuos secos se les practicó un análisis de humedad residual, con el fin posterior de ajustarla en el medio.

Unidad experimental: se usaron bolsas plásticas de polipropileno de 500 g de capacidad.

Factores e estudiados: los factores estudiados fueron, el tipo de sustrato con tres niveles cada uno, correspondientes a los sustratos antes descritos y el tamaño de partícula con dos niveles 6 y 9 mm.

Variables respuesta: la bioconversión de la materia seca (BC), la productividad de la biomasa (PEB) y el costo unitario parcial de la biomasa (CUB). Este costo se calcula sólo para las materias primas, normalmente este costo representa una alta porción del costo total de un producto en la industria

biotecnológica y, teniendo en cuenta lo fácil de su determinación en la fase inicial del desarrollo de la tecnología, se decidió emplearlo como indicador de eficiencia económica de los tratamientos. Estas variables se calculan con las siguientes ecuaciones:

$$BC = \frac{MSH_f}{MSS_o} \quad (2.1)$$

$$PEB = \frac{BC}{t_f} \quad (2.2)$$

$$CUB = \frac{CMP}{MSH_f} \quad (2.3)$$

Los precios de adquisición de los residuos estudiados fueron: bagazo de caña; 150 \$/t; residuos de fréjol; 100 \$/t y residuos de banano; 50 \$/t. En el caso del bagazo, el precio utilizado es el de venta que usa el central azucarero IANCEN de la ciudad de Ibarra que lo vende para diversos usos. Los residuos de banano y de fréjol no tienen precio de venta oficial por lo que se decidió asignarles como precio los gastos de transportación promedios.

Parámetros de operación: se estableció 20 °C como temperatura de incubación y 90 % de humedad relativa. Adicionalmente se controló el tiempo de aparición del primordio y el tiempo en el que se debía hacer la primera cosecha, definido éste por el tamaño que debe alcanzar el cuerpo fructífero para su comercialización que debe ser 6 cm como promedio.

Caracterización b romatológica: luego de realizar la selección del mejor tratamiento se hizo una caracterización de la composición química del residuo empleado como sustrato y de la biomasa producida. Dentro de los componentes medidos se encuentran: materia seca, cenizas, fibra cruda, grasa (EE), proteína bruta, calor total, carbono orgánico total, nitrógeno total, relación (C/N), potasio, hierro total, cobre, manganeso, calcio, cinc, magnesio, sodio, cloro total, fosfatos (PO₄), sulfatos (SO₄). Los análisis se realizaron en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI).

Todas estas técnicas fueron practicadas según los procedimientos de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, por sus siglas en inglés) (Helrich, 1990).

Diseño experimental y tratamiento estadístico: se eligió un diseño en bloques completos al azar 3x2, con tres réplicas por tratamiento, para un total de 18 experimentos. Se aplicó análisis de varianza para dos variables de clasificación, así como la prueba de *LSD* de Fisher, empleando el paquete estadístico antes mencionado.

Procedimiento experimental: los sustratos colocados en las bolsas se pasteurizaron en un esterilizador de presión (ALL AMERICAN®), a 103,4 kPa, por un tiempo de 30 min. La inoculación del sustrato se realizó con 50 g de inóculo, cuando éste alcanzó la temperatura ambiente. El inóculo del hongo fue mezclado homogéneamente con la masa del residuo estéril, ajustándose su materia seca a 30 %. Las bolsas se colocaron en la cámara de colonización y se ajustaron los parámetros de operación a una temperatura del aire de 20 °C y humedad relativa de 90 %. Se siguió el desarrollo del crecimiento, anotando en cada caso el día en que apareció el primer brote del cuerpo fructífero (primordio) y el tiempo en el que se realizó la primera cosecha. La biomasa se pesó inmediatamente de cosechada y luego se le determinó su materia seca.

2.2.2 Discusión de los resultados del experimento 2

En la figura 2.1 se representan los tiempos de aparición del primordio y de la primera cosecha para cada uno de los tratamientos. Estas dos variables, mientras más pequeñas sean, mejor es el tratamiento, debido a que están en relación directa con la productividad del proceso.

En estas mediciones el tamaño de partículas no produjo diferencias significativas, por lo que se decidió representar sólo las medias para la variable tipo de sustrato. Se observa que los mejores resultados se alcanzan para el bagazo de caña y el fréjol.

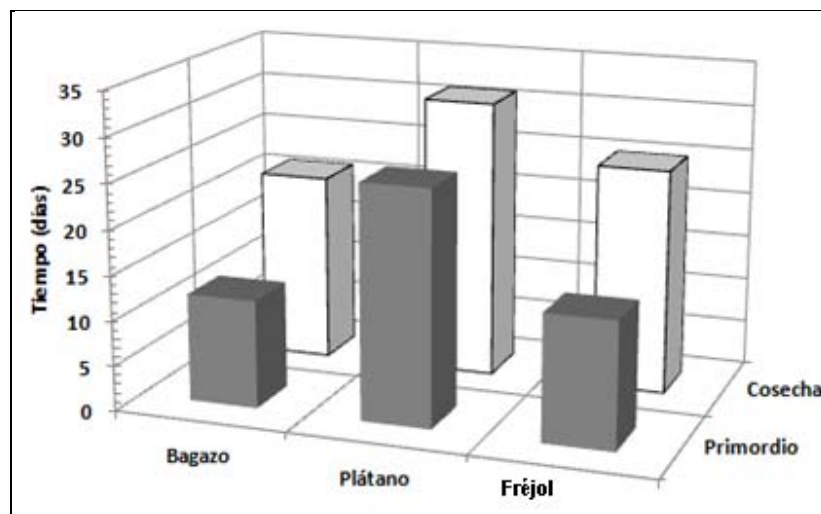


Figura 2.1 Tiempo de formación del primordio y de cosecha para cada sustrato

En la tabla 2.2 se muestran los resultados calculados para las variables BC, PEB y CUB en cada uno de los tratamientos aplicados y en la tabla II.3 de los anexos, se muestra el análisis de varianza realizado a las tres variables respuestas: BC, PEB y CUB. Según ésta, el tamaño de partícula no ejerce ningún efecto significativo en ninguna de las tres variables en el rango investigado para este factor. En cambio, la influencia del tipo de sustrato es altamente significativa en todos los casos, con un nivel de significación inferior al 5 %.

Los resultados de la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher se muestran en la tabla II.4 de los anexos, en la que se muestran los grupos homogéneos que hacen notar la diferenciación del fréjol en todos los casos.

Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en la tabla II.5 de los anexos. En cuanto a la bioconversión, término que se puede interpretar como indicador de eficacia, se observa en todos los casos que para el fréjol se logran los mejores resultados, mientras que entre el bagazo y la banana no son significativas las diferencias.

Tabla 2.2 Resultados experimentales del estudio de sustratos y tamaños de partícula

Nº	Tipo de residuo	Tamaño de corte (mm)	BC g MSH/kg MSS	PEB g MSH/(kg MSS.día)	CUB \$/kg MSH
1	Bagazo	6	10	0,48	7,50
2	Bagazo	6	4	0,19	18,75
3	Bagazo	6	6	0,29	12,50
4	Bagazo	9	13	0,62	5,77
5	Bagazo	9	12	0,57	6,25
6	Bagazo	9	9	0,43	8,33
7	Fréjol	6	16	0,64	3,13
8	Fréjol	6	14	0,56	3,57
9	Fréjol	6	11	0,44	4,55
10	Fréjol	9	11	0,44	4,55
11	Fréjol	9	13	0,52	3,85
12	Fréjol	9	12	0,48	4,17
13	Banana	6	11	0,37	2,27
14	Banana	6	10	0,33	2,50
15	Banana	6	11	0,37	2,27
16	Banana	9	7	0,23	3,57
17	Banana	9	8	0,27	3,13
18	Banana	9	6	0,2	4,17

En cuanto a la productividad de la biomasa, indicador de eficiencia del aprovechamiento del tiempo y el espacio, la banana es la que peores resultados muestra, aunque la ligera ventaja del bagazo sobre ésta

no es significativa. Es el fréjol el sustrato que exhibe los mejores resultados de forma significativa respecto a la banana, aunque no llega a conseguir igual ventaja sobre el bagazo.

En cuanto al costo de materias primas para la biomasa producida, indicador de eficiencia económica, el resultado es algo diferente pues el bagazo resulta en el último lugar, principalmente debido a su precio de adquisición que se diferencia notablemente de los demás sustratos. En cuanto a la banana y al fréjol las diferencias no son significativas, aunque la banana resultó ligeramente inferior en este indicador. Discriminando entre las medias de estas tres variables por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, es evidente que los residuos del fréjol han dado los mejores resultados y se eligieron como sustrato a emplear en la tecnología que se desarrolla para la producción de biomasa proteica de la cepa local del basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*. En relación a los otros dos residuos, los resultados de su empleo en otro contexto dependerán del precio de ambos pues técnicamente no muestran grandes diferencias.

2.2.3 Calidad del producto final

En la tabla 2.3 se presentan los resultados del análisis químico realizado a los residuos de fréjol, la biomasa fúngica obtenida y al sustrato agotado.

Como se observa, se parte de un residuo de fréjol que contiene 1,51 % de proteína, se extrae un producto “biomasa fúngica”, con un contenido proteico de 17,64 % y se genera un subproducto rico en proteína (sustrato agotado) de 1,77 % de proteína.

El producto final se puede comparar con la calidad proteica del huevo, pescado, pollo, entre otros (OMS/FAO, 2003). La presencia de β -glucanos en esta especie, como ha sido reportado, lo hacen aún más atractivo para la alimentación humana (Stamets, 2002).

Tabla 2.3 Composición del residuo de fréjol, la biomasa de *Pleurotus* y el sustrato agotado

Parámetro	Unidades	Residuo fréjol	Biomasa <i>Pleurotus</i>	Sustrato agotado
Materia seca	% BS	84,87	12,26	51,49
Cenizas	%	8,37	10,35	3,31
Fibra cruda	%	45,35	34,66	47,27
Grasa (EE)	%	0,56	2,4	1,16
Proteína bruta	%	1,51	17,64	1,77
Calor total	cal/g	2393,02	4298,53	4152,39
Carbón orgánico total	%	29,08	23,21	31,36
Nitrógeno total	%	0,2416	2,8224	0,2832
Carbono/Nitrógeno (C/N)	-	120,36	8,22	110,73
Potasio	ppm	268,8	88,5	5,6
Hierro total	ppm	0,03	0,22	0,04
Cobre	ppm	1,77	0,37	0,14
Manganeso	ppm	0,25	0,17	0,12
Calcio	ppm	147	25	32
Cinc	ppm	30	30	15
Magnesio	ppm	> 5	9,1	5,8
Sodio	ppm	0,29	0,032	0,05
Cloro total	ppm	0,02	0,05	0,08
Fosfatos (PO ₄)	ppm	51,58	41,45	7,68
Sulfatos (SO ₄)	ppm	43	72	16

El sustrato agotado está digerido por la actividad enzimática del hongo que necesariamente debe haberle aumentado su digestibilidad con lo cual lo hace muy atractivo para la alimentación animal. La presencia de residuos del hongo como sus hifas y algunas partes menores del cuerpo fructífero, ricas en proteínas y aminoácidos, hacen que este residuo sirva de probiótico en el rumen de los animales rumiantes (Suárez, 2010) todo lo cual debe ser un factor catalizador de la productividad de este tipo de animales.

2.3 Experimento 3. Formulación experimental del medio de cultivo

El objetivo de este experimento es formular un medio de cultivo adecuado para la producción del hongo *Pleurotus ostreatus*, a través del enriquecimiento del mismo con sales de sulfato de amonio, sulfato de magnesio y sustrato agotado, que permita lograr la mejor productividad del proceso.

2.3.1 Materiales y métodos del experimento 3

Cepa y preparación del inóculo: como inóculo se utilizó micelio de la cepa *P. ostreatus*, ceba-gliie-po-010106, de la colección de cultivos del CEBA. En la figura II.2 de los anexos, se presenta el micelio utilizado.

Medio de cultivo: la materia prima que se utilizó fueron los residuos de fréjol del género *Phaseolus vulgaris*, cosechados en Ecuador procedentes de la comunidad afro-ecuatoriana “La Concepción”, provincia del Carchi, el residuo fue enriquecido con nitrógeno, magnesio y sustrato agotado de la producción del hongo.

Unidad experimental: se estableció como unidad experimental una bolsa de polipropileno de 300 g de capacidad.

Factores estudiados : normalmente los factores que pueden tener una influencia importante en el proceso de fermentación en estado sólido son la humedad, las fuentes de nitrógeno, magnesio, fósforo, entre otras, pues la fisiología de la cepa responde mejor a unas que a otras condiciones (Pandey,

2003). Sin embargo, no se ha reportado el empleo de sustrato agotado en el mismo proceso en plantas anteriores, a manera de reciclaje. Este es un factor interesante pues podría mejorar la calidad del medio en cuanto a su contenido de fibra parcialmente degradada, así como por su contenido de vitaminas y aminoácidos provenientes de los restos de biomasa del hongo presente luego de realizarse la colecta final del cuerpo fructífero. En estas condiciones el desarrollo de las hifas y el cuerpo fructífero será más productivo. En resumen, en este experimento se parte de la hipótesis que el enriquecimiento del residuo de fréjol con una sal de nitrógeno y otra de magnesio, ayudará a un mejor agotamiento del residuo de fréjol, al tiempo que este proceso se verá catalizado por la presencia de una cierta cantidad de residuo parcialmente degradado que facilita el desarrollo de las hifas y por la presencia de probióticos residuales de la cosecha anterior que no pudieron separarse.

Así pues, se seleccionaron como factores en estudio: la humedad del medio (H_M), la fuente de nitrógeno (N), la fuente de magnesio (Mg) y el sustrato agotado. En la tabla 2.4 se exponen estos factores y sus niveles en estudio.

Tabla 2.4 Factores y niveles estudiados en la formulación del medio

Nº	Factores en estudio	Símbolo	Unidad	Nivel inferior	Nivel superior
1	Humedad del medio	H_M	%	60	75
2	$(NH_4)_2SO_4$	N	% BS	0	0,5
3	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Mg	% BS	0	0,1
4	Sustrato agotado	SA	% BS	0	20

La humedad es factor clave para el desarrollo microbiano debido a su conexión directa con la actividad acuosa o agua libre en el medio sólido (Mitchell y col., 2006). Es conocido que microorganismos como las bacterias son extremadamente sensibles a este factor debido a su incapacidad para crecer con baja

disponibilidad de agua (Pandey, 2003). Según el análisis realizado en la bibliografía este factor normalmente se encuentra reportado en los niveles que aparecen en la tabla 2.4.

Variables respuesta: se seleccionó la bioconversión, la productividad de la biomasa y el costo unitario de la biomasa. Estas variables fueron definidas detalladamente en el experimento 2.

Parámetros de operación: como parámetros del proceso se consideró el tipo de residuo, tamaño de partícula, la temperatura y la humedad relativa. En la tabla 2.5 se presentan los valores de los parámetros utilizados para la investigación experimental.

Diseño experimental y tratamiento estadístico: atendiendo al objetivo del experimento, se seleccionó un diseño experimental factorial 2^4 con 3 réplicas, que consiste en 48 corridas realizadas en orden completamente aleatorio. Se realizó un análisis de regresión múltiple en el cual se comprobó la significación de cada término y el ajuste global del modelo. Con el modelo ajustado se realizó un acercamiento al óptimo por el método de búsqueda directa de ascenso y/o descenso acelerado. Para este trabajo se utilizó el paquete estadístico *STATGRAPHIS®*, *Centurion XV*, versión 15.2.05.

Tabla 2.5 Parámetros de operación del proceso de fermentación en estado sólido

N°	Parámetros del proceso	Símbolo	Unidad	Valor
1	Tipo de residuo	TR	-	Fréjol
2	Tamaño de partícula	TP	mm	9
3	Temperatura	T	°C	18 - 20
4	Humedad relativa	H _R	%	80-90

Instalación experimental: la instalación experimental es una planta piloto de producción de biomasa proteica de *Pleurotus ostreatus*, estructurada en tres secciones:

Sección de preparación: provista de la maquinaria y equipo adecuada para el almacenaje, clasificación y trituración de la materia prima, así como la hidratación, esterilizado y enfriado.

Sección de transformación: provista de un sistema automatizado que permite controlar las variables de flujo de aire, temperatura y humedad.

Sección de separación: provista de equipos para el pesado, empacado, embalaje y almacenado a 4°C.

Procedimiento experimental: los residuos de fréjol con 15,4 % de humedad fueron picados a un tamaño de partícula de 9 mm y secados hasta peso constante. El sustrato agotado con 35 % de humedad también fue secado hasta peso constante.

El medio de cultivo se suplementó con sales de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y sustrato agotado, el mismo que se llenó en bolsa de polietileno de 300 g de capacidad y se ajustó su humedad con agua sin cloro. Las muestras se pasteurizaron en un equipo de esterilización de vapor a 103,4 kPa, durante 30 minutos; la inoculación del sustrato se realizó mediante un mezclado homogéneo con el 4 % del micelio del hongo con el sustrato, este proceso fue efectuado en un ambiente limpio provisto de cámara de flujo laminar con filtro HEPA 99,99 % de eficiencia. Las bolsas se colocaron en una cámara de fermentación para su colonización. A los residuos de fréjol, biomasa y sustrato agotado se les realizaron los análisis bromatológicos y de macro y micro elementos, con la finalidad de analizar su calidad.

2.3.2 Discusión de los resultados del experimento 3

En la tabla 2.6 se presenta la matriz de resultados sobre la formulación del medio.

Tabla 2.6 Matriz de resultados sobre la formulación del medio

Nº	HM	N	Mg	SA	BC	PEB	CUB	BC	PEB	CUB	BC	PEB	CUB
1	60	0	0	20	78,333	3,41	3,52	80,833	3,52	3,41	75,000	3,27	3,68
2	60	0,5	0,1	20	29,167	1,27	9,53	25,833	1,13	10,76	25,000	1,09	11,11
3	75	0,5	0,1	20	81,333	3,54	3,28	74,667	3,25	3,58	81,333	3,54	3,28
4	75	0	0	0	40,000	1,74	7,40	45,333	1,97	6,53	40,000	1,74	7,40
5	60	0,5	0,1	0	50,000	2,18	5,96	48,333	2,11	6,16	58,333	2,54	5,11
6	60	0	0,1	0	58,333	2,54	5,08	50,000	2,18	5,93	53,333	2,32	5,55
7	60	0	0	0	50,000	2,18	5,92	58,333	2,54	5,07	50,000	2,18	5,92
8	60	0	0,1	20	85,833	3,74	3,22	77,500	3,38	3,56	79,167	3,45	3,49
9	75	0	0,1	20	120,000	5,23	2,20	116,000	5,05	2,28	122,667	5,34	2,16
10	75	0	0	20	116,000	5,05	2,28	122,667	5,34	2,15	128,000	5,58	2,06
11	75	0,5	0	0	42,667	1,86	7,00	40,000	1,74	7,46	38,667	1,68	7,72
12	60	0,5	0	20	79,167	3,45	3,51	77,500	3,38	3,58	81,667	3,56	3,40
13	75	0	0,1	0	30,667	1,34	9,67	26,667	1,16	11,11	36,000	1,57	8,23
14	75	0,5	0	20	86,667	3,78	3,08	80,000	3,48	3,33	90,667	3,95	2,94
15	60	0,5	0	0	30,000	1,31	9,92	20,833	0,91	14,29	25,000	1,09	11,90
16	75	0,5	0,1	0	40,000	1,74	7,47	33,333	1,45	8,97	38,667	1,68	7,73

Nota. Las unidades de las variables: HM (%), N (% BS), Mg (% BS), SA (% BS), BC (g MSH/kg MSS), PEB (g MSH/(kg MSS.día)), CUB (\$ /kg MSH).

En la tabla II.6 de los anexos, se presenta el análisis de varianza, se observa que el sustrato agotado (D), la fuente de nitrógeno (B), la relación humedad/nitrógeno (AB), la relación humedad/sustrato agotado (AD) y la relación magnesio/sustrato agotado (CD), tienen influencia significativa sobre la

variable respuesta CUB. Respecto a la complementación con macronutrientes como nitrógeno y magnesio, se corrobora lo especificado en la literatura en cuanto a un incremento en la eficiencia biológica (Ertola y col., 1994; Ju, 2007; Ramos, 2000). Respecto al uso del sustrato agotado, no existen reportes en la literatura.

Modelo empírico:

$$CUB = -1,85 + 0,14H_M + 31,73N - 41,76Mg + 0,48SA - 0,43H_MN + 0,52H_MMg - 0,01H_MSA - 3,88NMg + 0,09NSA + 1,29MgSA$$

En el modelo estadístico empírico, el término SA representa al residuo de fréjol, debido a que el costo del sustrato agotado (SA) es cero y al disminuir el SA en la formulación del medio, incrementa la utilización del residuo de fréjol, lo cual incrementa el CUB. En la figura II.3 de los anexos, se presenta un diagrama de Pareto para el CUB, el cual corrobora los resultados discutidos anteriormente basados en el análisis de varianza y el modelo empírico, como se observa, el sustrato agotado tiene la mayor influencia positiva sobre el menor CUB, debido a que representa un 20 % de materia prima reciclada, que permite disminuir los costos de producción.

2.3.3 Experimentos de acercamiento al óptimo

Partiendo del modelo ajustado, el software *STATGRAPHICS* ha identificado la ruta de descenso acelerado que permitirá identificar si en ese intervalo hay un punto que se acerca al óptimo. Se ha utilizado la variable de costo unitario para calcular esta ruta. En la tabla 2.7 se presenta la matriz de resultados experimentales.

2.3.4 Discusión de resultados del experimento de acercamiento al óptimo

Para el análisis del costo unitario parcial de la biomasa, se utilizaron los siguientes precios de venta: 0,420 \$/kg para el sulfato de amonio; 0,350 \$/kg para el sulfato de magnesio; 0,10 \$/kg para el residuo de fréjol y 5,0 \$/kg para el inóculo (Sales y col., 2009).

Tabla 2.7 Matriz de resultados experimentales de acercamiento al óptimo

Nº	H _M (%)	N (% BS)	Mg (% BS)	SA (% BS)	BC g MSH/kg MSS	PEB g MSH/(kg MSS.día)	CUB \$/kg MSH
1	67,5	0,250	0,050	10,0	100,9	5,0	2,7
2	68,2	0,202	0,048	15,0	107,1	5,4	2,5
3	69,3	0,161	0,043	20,0	117,3	5,9	2,3
4	70,7	0,130	0,036	25,0	132,3	6,6	2,1
5	72,3	0,109	0,026	30,0	121,3	6,1	2,3
6	74,2	0,097	0,015	35,0	111,5	5,6	2,6
1	67,5	0,250	0,050	10,0	102,2	5,1	2,7
2	68,2	0,202	0,048	15,0	105,8	5,3	2,6
3	69,3	0,161	0,043	20,0	119,4	6,0	2,3
4	70,7	0,130	0,036	25,0	134,4	6,7	2,1
5	72,3	0,109	0,026	30,0	121,3	6,1	2,3
6	74,2	0,097	0,015	35,0	113,1	5,7	2,6
1	67,5	0,250	0,050	10,0	102,8	5,1	2,6
2	68,2	0,202	0,048	15,0	105,8	5,3	2,6
3	69,3	0,161	0,043	20,0	119,4	6,0	2,3
4	70,7	0,130	0,036	25,0	135,0	6,8	2,0
5	72,3	0,109	0,026	30,0	120,5	6,0	2,3
6	74,2	0,097	0,015	35,0	108,4	5,4	2,7

En la figura 2.2 se presenta la relación de las variables respuestas versus la corrida experimental de acercamiento al óptimo. La corrida experimental 4 se acerca al mínimo costo unitario de producción y la máxima bioconversión y productividad de la biomasa, de esta manera se encuentra un punto en la región cercana al óptimo cuando el medio se formula de la siguiente manera: 70,7 % de humedad; 0,13 % BS de sulfato de amonio; 0,036 % BS de sulfato de magnesio y 25 % BS de sustrato agotado, bajo estas condiciones se logra $BC = 133,9 \text{ g MSH/ kg MSS}$, $PEB = 6,69 \text{ g MSH/(kg MSS.día)}$ y $CUB = 2,061 \text{ \$/kg MSH}$. Este resultado permite deducir que el crecimiento del hongo es favorecido por el magnesio y el nitrógeno libres, y también por el sustrato agotado, fuente de proteína y aminoácido que el hongo puede extraer con mayor facilidad debido a su pre degradación. Aunque no se ha ubicado una superficie para señalar el óptimo, se ha logrado encontrar un punto en la región del óptimo para el CUB, estos resultados obtenidos se acercan a valores reportados en la literatura (Amin y col., 2008; Bermúdez y col., 2002; Hasan y col., 2010).

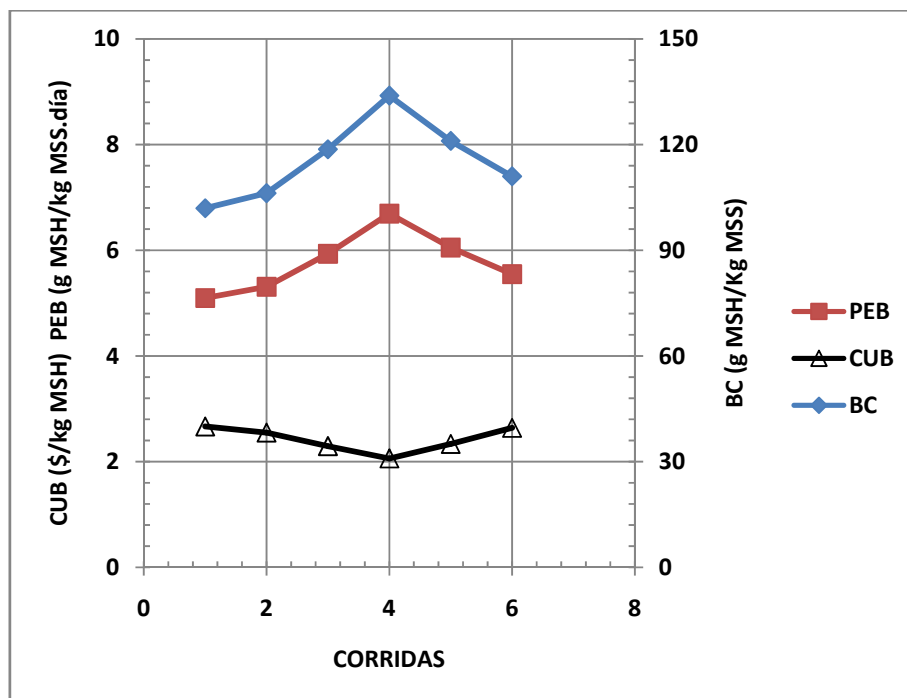


Figura 2.2 Representación de la BC, CUB, PEB en función de la corrida experimental

En las tablas II.7 y II.8 de los anexos, se presenta la ficha técnica de las sales de nitrógeno y magnesio utilizadas en la investigación.

2.4 Experimento 4. Propuesta de una ecuación estequiométrica

El objetivo de este experimento es desarrollar una ecuación estequiométrica no estructurada que describa la actividad celular del *Pleurotus ostreatus*, a través del desarrollo de las fórmulas empíricas del residuo de fréjol y de la biomasa del hongo, que permita el estudio de los parámetros termodinámicos.

2.4.1 Materiales y métodos del experimento 4

Cepa: fue usada la cepa de *Pleurotus ostreatus* ceba-gliie-po-010606, pertenecientes a la colección de cultivos del CEBA, la cual se conservó en agar-extracto de malta a 4 °C.

Materias primas: para el desarrollo de las fórmulas empíricas se estudiaron dos materias primas: residuos de la cosecha de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), y la biomasa de *Pleurotus o streatus*. Las muestras del residuo de fréjol, materia prima original, se tomaron en las comunidades productoras de fréjol de las provincias de Imbabura y Carchi: La Concepción, Salinas y Ambuquí. En la figura II.4 de los anexos, se exhiben muestras de dos de las materias primas enviadas para los análisis.

Procedimiento para el muestreo del residuo de fréjol fresco: para el muestreo del residuo de fréjol y la biomasa del hongo se siguieron los principios de muestreo expuestos por Oakland (Jiménez, 2013). En el caso del fréjol, en un período total de tres meses se tomaron cada mes tres muestras de 14 kg de residuos secos de fréjol, previamente secados al sol durante el proceso de cosecha, para un total de nueve muestras. Cada mes se realizó el siguiente tratamiento: cada muestra fue triturada por separado hasta un tamaño de 9 mm en un molino de martillo. Luego fueron mezcladas íntimamente. Esta mezcla fue luego extendida sobre el piso en un marco cuadrado de 4 m². El cuadrado fue dividido luego en cuatro cuadrantes iguales de 1 m². De cada cuadrante se procedió a tomar un kilogramo de muestra

para un total de cuatro kilogramos. Posteriormente esta porción de la muestra fue molida en un molino manual hasta un tamaño de 1 mm. En estas condiciones se extendió en el piso, en un marco de 1 m² y se dividió en cuatro cuadrantes iguales y se tomaron muestras de 25 g de cada cuadrante, las que se mezclaron y empacaron en una bolsa de polietileno para ser almacenadas a 4 °C durante el período de muestreo. Este procedimiento se repitió en los tres meses lo que generó tres muestras de 100 g para cada mes.

Procedimiento para el muestreo de biomasa de *Pleurotus ostreatus*: el residuo de fréjol recogido cada mes fue utilizado en la planta de producción de hongos *Pleurotus ostreatus* del CEBA. La producción de esta biomasa fue la colectada durante tres brotes del cuerpo fructífero hasta completar 51 días, tiempo a partir del cual no se observaba crecimiento significativo. Esta producción no contó con la adición de nutriente alguno al medio de crecimiento. Se tomaron tres muestras de biomasa de 1 kg, una de cada cámara de producción, por cada mes, durante tres meses, para un total de 9 kg. La biomasa fúngica producida cada mes fue secada en una estufa a 70 °C hasta lograr un peso constante. Luego esta biomasa fue molida en un molino manual y extendida en una mesa en un marco de 1 m². Dicho cuadrado fue subdividido en cuatro cuadrantes iguales de donde se tomaron muestras de 25 g. Estos 100 g fueron mezclados y almacenados a 4 °C durante el período de muestreo. De esta manera, en este período fueron generadas tres muestras de 100 g cada una.

Procedimiento de cultivo de la biomasa por fermentación en estado sólido: los residuos de fréjol se trituraron hasta un tamaño de 9 mm y se ajustó su humedad hasta un 70 %. Se llenaron bolsas de polipropileno con 300 g de sustrato y posteriormente se pasteurizaron en un esterilizador a la presión de 103,4 kPa por un tiempo de 30 min. Cuando el sustrato alcanzó la temperatura ambiente, se realizó la inoculación con 4 % de inóculo. Las muestras se incubaron a temperatura constante, a 20 °C durante 51 días. Durante el crecimiento de las hifas se mantuvo una humedad relativa promedio de 85 % para

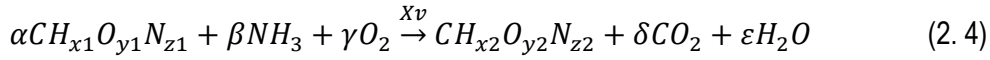
evitar contaminaciones y luego de aparecer el primordio se subió hasta 90 %. Después de aparecer el primordio a los 15 días, la recolección de la seta se realizaba cuando alcanzaba una talla promedio de 8 cm. El experimento se realizó con tres bolsas como réplicas.

Técnica analítica para la composición elemental: las muestras fueron analizadas en el Centro de Investigación de Servicios y Análisis Químicos (CISAQ) de la Universidad Nacional de Loja, Ecuador. En el análisis elemental se utilizó un equipo Perkin Elmer, modelo 2400, serie II (Vassilev y col., 2012). Esta técnica proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presentes en un amplio abanico de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica, tanto sólidas como líquidas, usando el método clásico de Pregl-Dumas (Julián, 2008; Vassilev y col., 2012).

Cálculos para la fórmula empírica de las materias primas: mediante la técnica antes descrita se obtienen datos de los elementos: C, H, N y S, presentes en el residuo fresco de fréjol y en la biomasa del cuerpo fructífero. El oxígeno se calcula por diferencia, lo que significa desprestigiar la presencia no significativa de otros elementos. Las concentraciones de los elementos en la fase sólida se calculan para la parte orgánica, luego de haber restado las cenizas presentes en la muestra. Con estos datos se calculan las proporciones atómicas relativas de cada elemento dividiendo su fracción masa por la masa atómica de cada uno. A partir de estas proporciones atómicas relativas pueden deducirse las relaciones atómicas dividiendo cada uno de los valores entre el de carbono, expresando todo por átomo-gramo de carbono. En este trabajo no se ha incluido al azufre en la fórmula empírica de las materias primas, por estar en proporciones muy pequeñas y no ser de interés para los balances estequiométricos.

Propuesta de un modelo estequiométrico simplificado: se parte de considerar el crecimiento aerobio de las células en un mecanismo simplificado que se resume en una ecuación estequiométrica. En esta ecuación, el residuo fresco del fréjol más nitrógeno en forma de amoníaco y el oxígeno como

reactantes se transforman en productos debido a la presencia del hongo como biocatalizador. Dentro de los productos considerados se encuentran: la biomasa de *P. ostreatus*, el CO₂ y el agua.



La determinación de los coeficientes estequiométricos parte de un balance por elementos en la ecuación 2.4 (Ertola y col., 1994):

$$C: \alpha = 1 + \delta \quad (2.5)$$

$$H: x_1\alpha + 3\beta = x_2 + 2\varepsilon \quad (2.6)$$

$$O: y_1\alpha + 2\gamma = y_2 + 2\delta + \varepsilon \quad (2.7)$$

$$N: z_1\alpha + \beta = z_2 \quad (2.8)$$

Como es notable, sólo se dispone de cuatro ecuaciones para cinco incógnitas, por lo que se necesita buscar una ecuación adicional. Una alternativa a la que se recomienda acudir es al balance de electrones (Ertola y col., 1994). Para ello se hace necesario calcular el grado de reducción de las especies involucradas (λ). Este factor se define como el número de moles de electrones disponibles por átomo gramo de carbono a transferir al O₂ en la combustión completa de un compuesto hasta CO₂, H₂O y N₂. Para el carbono el número de electrones disponibles es 4, para el hidrógeno es 1, -2 para el oxígeno y -3 para el nitrógeno (Ertola y col., 1994). El signo se asocia a si se entrega o aceptan los electrones. Según esto, el grado de reducción para el CO₂, el H₂O y el NH₃ es cero. Un balance de electrones en la ecuación 2.4 conduce a:

$$\lambda: \lambda_{FF}\alpha - 4\gamma = \lambda_{XV} \quad (2.9)$$

De esta manera, las ecuaciones 2.5 a la 2.9 conforman un sistema de ecuaciones algebraicas lineales con solución única para sus incógnitas.

Parámetros derivados de la ecuación estequiométrica: teniendo en cuenta la estequiometría de la ecuación 2.4, se pueden definir importantes factores asociados a la producción de la biomasa del hongo

tales como: la eficiencia biológica (EB), el coeficiente de respiración (CR), el consumo específico volumétrico de aire (q_{Aire}) y el calor metabólico ($-\Delta H_m$):

$$EB = \frac{MM_{XV} (1 - A_{FF})}{\alpha MM_{FF} (1 - A_{XV})} 1 \times 10^3 \quad (2.10)$$

$$q_{Aire} = \frac{MM_{O_2}}{MM_{XV}} \frac{\gamma}{Y_{O_2} \rho_{Air}} \quad (2.11)$$

$$CR = \frac{\delta}{\gamma} \quad (2.12)$$

El calor liberado en el proceso metabólico es proporcional a la cantidad de electrones a transferir al oxígeno en la reacción. El valor medio deducido de una gran cantidad de reacciones analizadas es $Q_o = 115,137$ kJ/electrones. El calor metabólico expresado en kJ/kg MSH, se calculó con la ecuación que sigue:

$$(-\Delta H_M) = Q_o \lambda_{FF} \frac{\alpha}{MM_{XV}} (1 - A_{XV}) 1 \times 10^3 \quad (2.13)$$

Los resultados que se computen en las ecuaciones 2.10 a la 2.13 dependen de parámetros que serán determinados cuando se hayan calculado los elementos que permanecen incógnitos en la ecuación 2.4 como son las fórmulas empíricas del sustrato y la biomasa, así como los coeficientes estequiométricos.

2.4.2 Resultados y discusión del experimento 4

En la tabla 2.8 se muestra el resultado de la composición elemental y el cálculo de las relaciones atómicas relativas de la biomasa del hongo, partiendo de las mediciones realizadas a las muestras colectadas.

Los niveles de nitrógeno de *P. ostreatus* se sitúan entre los más altos reportados para una biomasa (Parikh y col., 2007), tal como habría de esperarse de una biomasa fúngica. Los niveles de carbono, sin embargo, se revelan bajos si se comparan con una lista de composiciones elementales de cuarenta materias agrícolas reportadas (Cuipinga y col., 2004). Este hecho pudiera explicar la relativamente elevada relación atómica calculada para el oxígeno, que es casi el doble de la reportada para muchos

microorganismos. El contenido de cenizas se sitúa dentro de los niveles más bajos de los reportados para once especies de hongos comestibles, situándose muy cercano al del *P. sajou-caju* (5,84 %) (Sánchez y Royse, 2002).

Tabla 2.8 Composición elemental base seca de la biomasa de *Pleurotus ostreatus*

Elemento	masa (% BS)	Masas atómicas (g/mol)	PAR* (mol/g)	Relaciones atómicas (mol/mol-C)
C	36,132	12,011	3,080	1,000
H	5,552	1,008	5,508	1,831
N	11,066	14,007	0,790	0,263
S	0,355	32,065	0,011	0,004
O	40,356	15,999	2,522	0,838
Cenizas	6,540	---	---	---
Total	100,000			

*proporciones atómicas relativas

En la tabla 2.9 se muestra el resultado de la composición elemental y el cálculo de las relaciones atómicas relativas del residuo fresco del fréjol, partiendo de las mediciones realizadas en la muestra colectada.

La composición química del residuo fresco del fréjol en cuanto a carbono, se sitúa en niveles bajos si se compara con una lista de Parikh (2007). Según estos autores, el contenido de carbono es únicamente superior a los valores reportados para la cáscara de arroz (40,6 %) y del tallo de algodón (41,3 %). El contenido de hidrógeno, en cambio, se sitúa en la media de los valores reportados por los autores citados anteriormente, al igual que el contenido de oxígeno.

Tabla 2.9 Composición elemental molar del residuo de fréjol fresco

Elemento	masa (% BS)	Masas atómicas (g/mol)	PAR (mol/g)	Relaciones atómicas (mol/mol-C)
C	39,875	12,011	3,464	1,000
H	6,047	1,008	6,261	1,807
N	6,727	14,007	0,501	0,145
S	0,201	32,065	0,007	0,002
O	42,980	15,999	2,543	0,809
Cenizas	4,170	---	---	---
Total	100,000			

En la tabla 2.10 se recogen los datos de las fórmulas empíricas de los dos componentes evaluados y que serán utilizados para la deducción de la estequiometría del proceso.

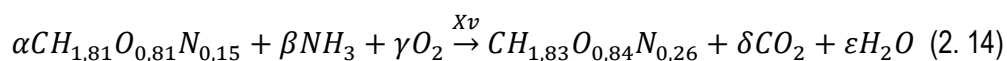
La composición elemental de *P. ostreatus*, si se compara con la reportada para el *Aspergillus niger*, difiere de la reportada en la literatura ($\text{CH}_{1.72}\text{O}_{0.55}\text{N}_{0.17}$) (Asaff y col., 2006; Shen y col., 2010; Stephanopoulos, Aristidou y Nielsen, 1998). La levadura *Kluyveromyces marxianus*, en cambio, tiene una composición reportada mucho más parecida a esta cepa ($\text{CH}_{1.94}\text{O}_{0.76}\text{N}_{0.17}$). Se conoce en general que la composición elemental no varía mucho para las biomasas más disímiles (Ertola y col., 1994; Sinclair, 2001) pero las condiciones de crecimiento, tanto nutricionales como ambientales influyen también en la existencia de pequeñas variaciones (Parikh y col., 2007). Esta composición sitúa a la cepa de *Pleurotus ostreatus* ceba-gliie-po-010606 con una masa molecular algo por encima de la media de los microorganismos que se encuentran alrededor de 25 g/mol (Ertola y col., 1994) .

Tabla 2.10 Fórmulas empíricas y masa molecular estimadas

Producto	Composición (% BS)					Fórmula	Masa Molecular (g/mol)
	C	H	N	O	S		
R. fréjol	39,875	6,047	6,727	42,980	0,210	CH _{1,81} O _{0,81} N _{0,15}	28,804
<i>P. ostreatus</i>	36,132	5,552	11,066	40,356	0,355	CH _{1,83} O _{0,84} N _{0,26}	30,949

2.4.3 Cálculo de los coeficientes estequiométricos

Con la información expuesta en la tabla 2.10 la ecuación estequiométrica y los balances quedan:



$$C: \alpha = 1 + \delta \quad (2.15)$$

$$H: 1,81\alpha + 3\beta = 1,83 + 2\varepsilon \quad (2.16)$$

$$O: 0,81\alpha + 2\gamma = 0,84 + 2\delta + \varepsilon \quad (2.17)$$

$$N: 0,15\alpha + \beta = 0,26 \quad (2.18)$$

En la tabla 2.11 se presentan los valores del grado de reducción calculados para el residuo de fréjol y para la biomasa del cuerpo fructífero del *P. ostreatus* utilizando los datos de la tabla 2.10. Con esta información se plantea el balance de electrones en la ecuación (2.19).

$$\lambda: 3,74\alpha - 4\gamma = 3,39 \quad (2.19)$$

Tabla 2.11 Grado de reducción calculado para el residuo de fréjol y el *P. ostreatus*

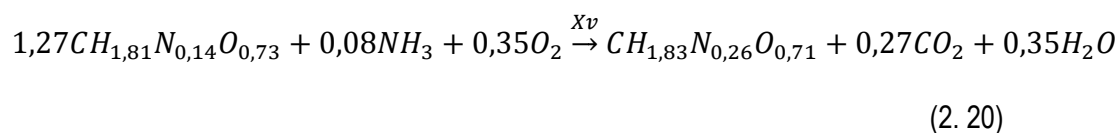
Componente	Fórmula Empírica	λ (Electrones/mol de C)
Residuo de fréjol	CH _{1,81} O _{0,81} N _{0,15}	3,7540
<i>P. ostreatus</i>	CH _{1,83} O _{0,84} N _{0,26}	3,3660

La solución del sistema de ecuaciones (2.5-2.9) proporciona los coeficientes estequiométricos los que aparecen en la tabla 2.12.

Tabla 2.12 Coeficientes estequiométricos de la ecuación empírica

Coeficiente	α	β	γ	δ	ε
Valor	1,2689	0,0790	0,3494	0,2689	0,3495

Con esta información estimada, por primera vez se llega a formular una ecuación estequiométrica para la fermentación en estado sólido del *P. ostreatus* en residuos de fréjol. Por simplicidad sólo se reportan dos cifras para los coeficientes estequiométricos:



2.4.4 Parámetros estimados con la ecuación estequiométrica

Eficiencia biológica teórica: teniendo en cuenta el contenido de cenizas y de agua del residuo del fréjol, así como para la biomasa de *P. ostreatus*, se estima que la eficiencia biológica que ha de esperarse de este sistema es de 867,49 g MSH/kg MSS. Este resultado es interesante pues sirve como paradigma de eficiencia a lograr para unas condiciones de sustrato y cepa específicos. Varios autores han optimizado el medio de crecimiento de distintas especies de *P. ostreatus* (McNeil y Harvey, 2008; Panjabrao y col., 2007; Pávlov, Romankov y Noskov, 1981; Peters y Timmerhaus, 1991; Pineda, 2013; Sinclair, 2001). La eficiencia máxima reportada es de 357,9 g MSH/kg MSS. Siendo así, se nota que estos niveles aún podrían mejorarse pues apenas representan un 42 % del teórico estimado en este trabajo. La eficiencia biológica depende del balance nutricional conseguido y algunos aspectos ambientales como la capacidad de retención de agua del sustrato, la aireación y la humedad relativa en diferentes etapas del cultivo (Panjabrao y col., 2007).

Coeficiente de respiración: según la definición de este parámetro, el coeficiente alcanza un nivel de 0,77 moles CO₂/mol O₂ que es relativamente bajo respecto al reportado para hongos en crecimiento aeróbico. Coeficientes de respiración bajos han sido asociados a una mayor necesidad de energía para sintetizar el complejo enzimático necesario para generar azúcares más simples en el crecimiento del *Aspergillus niger* sobre residuos de cítricos (Dimian y Sorin, 2008a). Otra explicación puede estar dada en la retención de CO₂ que ocurre dentro de las bolsas de crecimiento y que pueden hacer modificar ligeramente el metabolismo del crecimiento del hongo.

Consumo e específico de aire: el consumo de aire estequiométrico calculado para condiciones de temperatura y presión normales se estimó en 1,36 m³/kg MSH. Este indicador demuestra que el crecimiento del hongo demanda de una cantidad no muy significativa de aire estequiométrico para producir una tonelada del producto.

Calor metabólico: según la ecuación 2.13 y la 2.20 se estima una liberación de calor correspondiente a 16 576,47 kJ/kg MSH. En los procesos de fermentación en estado sólido se libera una cantidad considerable de energía proveniente de la actividad metabólica (Mitchell y col., 2006). Se reporta que este parámetro rara vez es calculado experimentalmente y que más se conocen los datos deducidos de relaciones estequiométricas (Álvarez, Limonta y Díaz, 2003; Dustet y Izquierdo, 2004). En ese trabajo se reporta para el crecimiento de *Aspergillus niger* un calor metabólico muy semejante a éste e igual a 16 000 kJ/kg MSH de donde se deduce que la ecuación estequiométrica ajustada genera valores que están en correspondencia con lo reportado para hongos.

2.5 Experimento 5. Estudio cinético del crecimiento microbiano

El objetivo de este experimento es proponer un modelo cinético para el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus*, a través de la determinación de su velocidad de crecimiento celular en función de la temperatura, que permita establecer con que velocidad se lleva a cabo el proceso de fermentación.

2.5.1 Materiales y métodos del experimento 5

Cepa e in óculo: como inóculo se utilizó micelio de la cepa ceba-gliie-po-010106 de hongo *Pleurotus ostreatus* de origen ecuatoriano, anteriormente seleccionada.

Medio de cultivo: se empleó el medio de cultivo formulado en el experimento tres.

Unidad experimental: se estableció como unidad experimental una bolsa de 300 g.

Los factores estudiados: se seleccionaron el tiempo y la temperatura como factores independientes.

Los factores y niveles de estudio seleccionados se presentan en la tabla 2.13.

Tabla 2.13 Factores de estudio del experimento de cinética

N°	Factores	Símb	olo	Unidad	Nive	les
1	Temperatura	T		°C	10	15 20 25 30
2	Tiempo	t _f		días	0	19 27 35 43 51

Variables respuesta: se seleccionó la bioconversión, como la variable respuesta para representar la dinámica de la producción de biomasa del hongo.

Parámetros de operación: se consideró el medio de cultivo anteriormente diseñado.

Diseño experimental y tratamiento estadístico: se utilizó el programa *STATGRAPHICS Centurium ver. 15.2.06* (2007). Se aplicó un análisis de varianza multifactorial para comprobar la significación de los factores analizados. El ajuste de los parámetros del modelo cinético a las diferentes temperaturas se realizó con el programa *SB Model Maker versión 2.0 c*.

Procedimiento experimental: los residuos de fréjol se trituraron hasta un tamaño de 9 mm. Las sales nutrientes se diluyeron en agua destilada y se mezclaron con los sólidos hasta un 70 % de humedad. Se llenaron bolsas de polipropileno con 300 g de sustrato y posteriormente se pasteurizaron en un

esterilizador a la presión de 103,4 kPa por un tiempo de 30 min. Cuando el sustrato alcanzó la temperatura ambiente, se realizó la inoculación con 4 % BS de inóculo.

Las muestras se incubaron a temperatura constante en una incubadora y se realizó la extracción de bolsas con la biomasa a intervalos de tiempo 0, 19, 27, 35, 43, 51 días. En estas muestras extraídas se controlaba la masa del cuerpo fructífero formada. Se investigaron cinco niveles de temperaturas entre 10 y 30 °C, a intervalos de cinco grados. El experimento se realizó con tres réplicas, por tratamiento.

Crecimiento de la biomasa del cuerpo fructífero: el aumento de la concentración de biomasa del cuerpo fructífero fue considerado por unidad de masa seca inicial de sustrato (g MSH/kg MSS). Cada vez que se colectaba biomasa, ésta se sumaba a la colectada antes, o sea, de forma acumulativa. Para conseguir esto se situaron bolsas triples para ser colectadas en cada uno de los tiempos antes indicados, por lo que el resultado es la media de la pesada de las réplicas.

Modelo cinético: se ajustó el modelo logístico, típico de la fermentación con sustrato insoluble (Yu y col., 1997), para describir la dinámica de la población:

$$rX_v = \mu_{max} \left(1 - \frac{X_v}{X_{max}}\right) \quad (2. 21)$$

La dependencia de las constantes cinéticas con la temperatura se hizo con un polinomio de orden dos.

2.5.2 Discusión de los resultados del experimento 5

En la tabla 2.14 se muestran los resultados de la dinámica del crecimiento del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* a las diferentes temperaturas investigadas experimentalmente.

Como es de notar, en el intervalo de temperaturas analizado, este factor ofrece poca influencia sobre el crecimiento celular. Sólo a 10 y 30 °C se notan algunas diferencias. Para comparar si existen diferencias significativas entre los efectos provocados por los dos factores tiempo y temperatura, se realizó un análisis de varianza cuyos resultados se muestran en la tabla II.9 de los anexos.

Tabla 2.14 Crecimiento de *P. ostreatus* Xv (g MSH/kg MSS) a diferentes temperaturas

Tiempo día	Temperatura (°C)				
	10 1	5	20	25	30
0	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73
19	46,99	47,96	52,77	43,62	37,36
27	78,53	76,84	83,10	71,07	63,84
35	94,42	91,77	99,96	84,55	75,40
43	105,97	102,36	110,07	94,18	84,07
51	112,23	110,07	116,81	100,44	88,88

Este resultado indica que ambos factores producen un efecto significativo sobre la variable respuesta. De acuerdo al valor calculado del estadígrafo F, todo indica que el tiempo influye más que la temperatura. El análisis de diferencias mínimas significativas realizado para el tiempo, mostró que todos los niveles tienen diferencias entre sí, o sea, no hay grupos homogéneos compuestos.

En el caso de la temperatura los resultados indicaron dos grupos homogéneos, tal como se muestra en la tabla II.10 de los anexos. Para el nivel 30 °C se observa que los resultados son significativamente inferiores.

Este comportamiento de poca sensibilidad a la temperatura no es típico entre entidades vivas como los microorganismos que presentan una sensibilidad significativa (Suárez y Nieto, 2012). Este comportamiento en el cuerpo fructífero de esta cepa local puede estar dado por una adaptación al medio natural ecuatoriano de la Sierra del norte en el que es normal que las temperaturas oscilen en ese rango con una media anual de 18,15 °C.

Los parámetros ajustados al modelo cinético logístico aparecen tabulados en la tabla 2.15 con su tratamiento estadístico correspondiente. Esta tabla muestra los resultados para cada una de las temperaturas investigadas. Según se aprecia el ajuste conseguido es bueno y la diferencia observada para la temperatura de 30 °C se nota en sus parámetros que son inferiores a los del resto de las temperaturas.

Tabla 2.15 Crecimiento a diferentes temperaturas usando Model Maker

T (°C)	μ_{\max} (día ⁻¹)	Error en μ_{\max} (día ⁻¹)	X_{\max} g MSH/kg MSS	Error en X_{\max} g MSH/kg MSS		R ² F	p
10	0,1933	3,386E-03	107,1268	1,4880	0,9800	387,88	<0.001
15	0,1953	3,720E-03	103,9730	1,5340	0,9861	284,355	<0.001
20	0,2018	2,760E-03	110,9700	1,1554	0,9877	320,95	<0.001
25	0,1915	3,720E-03	95,6475	1,4283	0,9894	373,198	<0.001
30	0,1846	3,870E-03	85,6200	1,3850	0,9934	601,23	<0.001

Los valores reportados para el modelo logístico usando el diámetro de la colonia como variable que mide el crecimiento de las hifas son superiores a los obtenidos en este trabajo (Ruhul y col., 2008; Sarykaya y Ladisch, 1997). Estos valores oscilan entre 0,27 día⁻¹ y 0,86 día⁻¹, en dependencia del tamaño de partícula, datos estos que aunque, indirectamente relacionados, ofrecen un marco inicial de referencia.

La dependencia de los parámetros cinéticos con la temperatura se recoge en la figura 2.3. El ajuste polinomial consigue una buena correspondencia entre datos estimados y determinados experimentalmente.

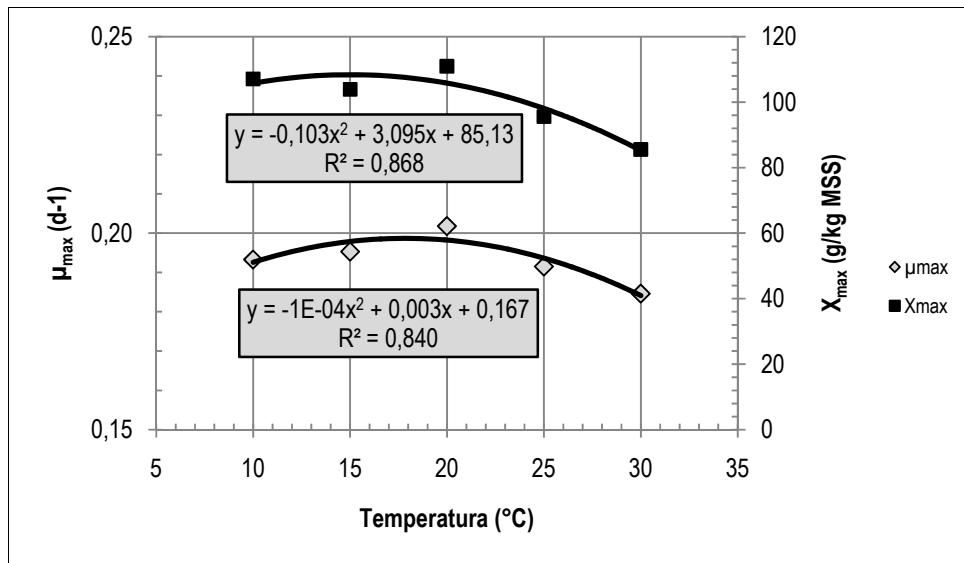


Figura 2.3 Dependencia de los parámetros cinéticos con la temperatura

2.6 Experimento 6. Densidad de empaque y distribución de bioceldas

El objetivo de este experimento es determinar la mejor distribución geométrica de las bioceldas y la densidad de empaque dentro del biorreactor, a través del estudio de la productividad de la biomasa, que permita el máximo aprovechamiento del espacio físico del biorreactor.

2.6.1 Materiales y métodos del experimento 6

Para realizar este experimento se procedió con el diseño y construcción del biorreactor experimental, el cual se detalla en el anexo II.1.

Cepa e inóculo: como inóculo se utilizó micelio de la cepa ceba-gliie-po-010106 del hongo *Pleurotus ostreatus* de origen ecuatoriano, anteriormente descrita, y preparado de igual forma que en el experimento anterior.

Medio de cultivo: se empleó el medio de cultivo formulado en el experimento tres.

Unidad experimental: se estableció como unidad experimental una biocelda cilíndrica de 10,16 cm de diámetro, construida en PVC, con una capacidad de 4 kg de sustrato húmedo.

Factores estudiados: se seleccionaron la densidad de empaque (De) y la distribución de bioceldas dentro del biorreactor (Dbc). Se decidió ubicar las bioceldas de tal forma que cada una ocupara entre 0,06 y 0,09 m², garantizando un espacio vital para el desarrollo del cuerpo fructífero del hongo. Los factores y niveles de estudio seleccionados se presentan en la tabla 2.16 y en la figura II.5 de los anexos, se muestra la distribución de las bioceldas dentro del biorreactor.

Tabla 2.16 Factores y niveles de estudio experimento densidad y distribución

Nº F	actores Símb	olo	Unidad Niv	eles
1	Densidad de empaque	De	kg MSS/ m ³	21,7
2	Distribución	Dbc	-	cuadrado triangular tresbolillo

Variables respuesta: se estableció como variables respuesta la bioconversión (BC) y la productividad de la biomasa (PEB).

Parámetros de operación: se definió como parámetros de operación la humedad del medio que fue seleccionada en el experimento tres en 70,68 %, la humedad relativa en 85 %, la temperatura ambiente fue seleccionada a partir del estudio cinético en 20 °C y el tiempo de fermentación de 20 días.

Diseño experimental y tratamiento estadístico: el diseño y análisis del experimento se realizó con el software estadístico *STATGRAPHICS Century XV*, versión 15.2.05. Aunque existe un factor cuantitativo, se seleccionó un diseño multi-factor categórico. El experimento se realizó con tres réplicas, con un total de 18 corridas experimentales. El diseño experimental estimará los efectos del factor numérico densidad de empaque y el factor categórico distribución de la biocelda dentro del biorreactor.

Procedimiento experimental: los residuos de fréjol se trituraron hasta un tamaño de 9 mm. Las sales nutrientes se diluyeron en agua destilada y se mezclaron con los sólidos hasta un 70,68 % de humedad. El sustrato se pasteurizó en un tanque de hierro de 200 litros de capacidad, que opera a 100 °C y 101,3

kPa, por un tiempo de dos horas. El sustrato frío se mezcló manualmente con el inóculo en una proporción de 10 %.

Se llenaron las bioceldas con cuatro kilos de sustrato inoculado y se cargó el biorreactor con las bioceldas, el biorreactor se operó durante 20 días y se procedió a la separación de la biomasa fúngica, utilizando una cuchilla de acero inoxidable para su corte.

2.6.2 Discusión de los resultados del experimento 6

En la tabla 2.17, se presenta la matriz de resultados obtenidos para las variables BC y PEB para cada tratamiento realizado.

Análisis de la varianza para la bioconversión

En la tabla II.11 de los anexos, se presenta el análisis de varianza realizado a la variable bioconversión, se observa que tanto la densidad de empaque como la distribución de las bioceldas dentro de la cámara de producción, ejercen un efecto significativo en el rango estudiado para estos factores con un 95,0 % de nivel de confianza.

En la tabla II.12 de los anexos, se presenta la prueba de rangos múltiples para la bioconversión respecto a la densidad de empaque, se observa que existe diferencia significativa, siendo la mejor con mayor media la densidad de 21,7 kg MSS/m³. Este resultado tiene lógica desde el punto de vista de que el *Pleurotus* podría tener un espacio vital, como en el caso de las plantas (Stamets, 2007).

En la tabla II.13 de los anexos, se presenta la prueba de rangos múltiples para la bioconversión respecto a la distribución de las bioceldas, se observa diferencia significativa entre los tres tipos de distribución, siendo la mejor, con mayor media, la distribución del tipo cuadrado, seguida de la distribución tipo triangular. Con la información disponible no se puede explicar este resultado y se debe investigar en el futuro.

Tabla 2.17 Matriz de resultados: densidad de empaque y distribución de bioceldas

Nº	De kg MSS/m³	Dbc	BC g MSH/kg MSS	PEB g MSH/(kgMSS.día)
1	32,6	Triangular	55,71	2,79
2	21,7	Triangular	89,53	4,48
3	21,7	Triangular	90,72	4,54
4	32,6	Tresbolillo	50,93	2,55
5	21,7	Cuadrado	99,32	4,97
6	21,7	Cuadrado	100,27	5,01
7	21,7	Tresbolillo	83,56	4,18
8	32,6	Triangular	54,12	2,71
9	32,6	Triangular	53,32	2,67
10	21,7	Cuadrado	101,47	5,07
11	21,7	Triangular	95,5	4,77
12	32,6	Cuadrado	60,48	3,02
13	32,6	Tresbolillo	51,73	2,59
14	32,6	Tresbolillo	47,75	2,39
15	21,7	Tresbolillo	71,62	3,58
16	21,7	Tresbolillo	79,98	4,0
17	32,6	Cuadrado	55,71	2,79
18	32,6	Cuadrado	57,3	2,86

Análisis de varianza para la productividad de la biomasa (PEB)

En las tablas II.14, II.15 y II.16 de los anexos, se presenta el análisis estadístico para la variable PEB.

Los resultados son coincidentes con el análisis de la variable bioconversión.

2.7 Experimento 7. Ajuste del modelo matemático del biorreactor

El objetivo de este acápite es realizar el ajuste del modelo físico del biorreactor de producción de *P. ostreatus*, a través de la practica experimental, que permita comprobar la calidad del ajuste del modelo y garantizar su aplicación en el rango estudiado.

2.7.1 Materiales y métodos del experimento 7

Modelo matemático del biorreactor: El modelo del biorreactor es del tipo macroscópico, heterogéneo en estado no estacionario. La formulación del modelo físico del biorreactor se presenta en el anexo II.2. A continuación se exponen las ecuaciones del modelo. La enumeración que aparece a la derecha se corresponde con el que posee en el anexo.II.2, para facilitar su análisis.

Balance de masa en la fase gaseosa:

Balance para el dióxido de carbono

$$\frac{d(\phi_B V_B C_{CO_2})}{dt} = (f_A C_{CO_2}^e) - (f_A C_{CO_2}) + k_{CO_2}(C_{CO_2}^* - C_{CO_2})V_B \phi_B \quad (II. 1)$$

Balance de oxígeno

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = \frac{f_A(C_{O_2}^e - C_{O_2})}{\phi_B V_B} - \frac{\gamma r_X m_S(1 - Y_S)}{\phi_B V_B M_X} \quad (II. 2)$$

Balance de agua

$$\frac{d(Y_A \rho_A \phi_B V_B)}{dt} = f_A(Y_A^e - Y_A)\rho_A + k_A(Y_A^* - Y_A)V_B \phi_B \rho_A - 1 \times 10^{-3} k_{CF}(1 - Y_S)m_S r_X \quad (II. 3)$$

Balance de masa en la fase sólida:

Balance de masa del consumo del residuo de fréjol

$$(-r_s) = \alpha r_X \quad (II. 4)$$

Balance para la biomasa del hongo producida

$$r_x = \mu_{(t)}X \quad (\text{II. 5})$$

Balance de agua

$$\frac{d(Y_S m_S)}{dt} = \frac{\varepsilon r_x m_S (1 - Y_S) M_A}{M_X} 1 \times 10^{-3} - k_A (Y_A^* - Y_A) V_B \phi_B \rho_A + 1 \times 10^{-3} k_{CF} (1 - Y_S) m_S r_x \quad (\text{II. 6})$$

Balance de energía:

Balance de energía en la fase gaseosa

$$\frac{d(m_A c_{pA} T_A)}{dt} = \rho_A f_A c_{pA} T_A^e - \rho_A f_A c_{pA} T_A + h_{GS} a_S (T_S - T_A) m_S + \lambda_V k_A (Y_A^* - Y_A) V_B \phi_B \rho_A - 1 \times 10^{-3} C_{pA} T_A k_{CF} m_S (1 - Y_S) r_x \quad (\text{II. 7})$$

Balance de energía en la fase sólida

$$\frac{d(m_S c_{pS} T_S)}{dt} = \frac{(-\Delta H_r)}{M_X} m_S (1 - Y_S) r_x - h_{GS} a_S m_S (T_S - T_A) - k_A \lambda_V (Y_A^* - Y_A) V_B \phi_B \rho_A + 1 \times 10^{-3} k_{CF} (1 - Y_S) m_S C_{pW} T_A r_x \quad (\text{II. 8})$$

Inóculo: se empleó el inóculo utilizado en los experimentos anteriores.

Medio de cultivo: se utilizó el medio de cultivo formulado en el experimento tres.

Unidad experimental: la unidad experimental corresponde a un biorreactor de fermentación en estado sólido de flujo semicontinuo, en el cual la fase gaseosa es continua y la fase sólida discontinua (Julián, 2008; Mitchell y col., 2006; Pandey, 2003). Los detalles de la instalación se muestran en la figura II.6 de los anexos.

Factores estudiados: se establecieron como factores de estudio, el flujo específico de aire (FEA) en sus niveles de 2 y 8 L/(min.kg MSS) y la temperatura de alimentación en niveles de 15 y 20 °C.

Variables respuesta: las variables respuesta fueron la bioconversión, la productividad de la biomasa (PEB), la dinámica de las temperaturas del aire y del sólido en el reactor y de la humedad relativa del aire.

Parámetros de operación: se establecieron como parámetros de operación la densidad de empaque (DE) en 21,7 Kg MSS/m³, la distribución de las bioceldas (DBC) en forma de cuadrado, la humedad del medio (HM) en 70,68 %, tal como se recomienda de los experimentos anteriores. El tiempo de fermentación fue fijado en 20 días, fecha de la primera cosecha con vistas a disminuir los costos experimentales.

Diseño experimental y tratamiento estadístico: se seleccionó un diseño factorial completo tipo 2² con tres réplicas por tratamiento, para un total de 12 corridas experimentales, con el fin de realizar estudios exploratorios. El orden de los experimentos ha sido completamente aleatorio. El diseño y análisis se realizó con el software estadístico *STATGRAPHICS Centurión XV*, versión 15.2.05.

Con este diseño se desea comprobar si en el rango investigado, el desempeño del reactor se ve modificado significativamente. De esta manera se comprobará que el estudio del modelo a ajustar ha sido realizado en condiciones que afectan significativamente los resultados.

Modelo estequiométrico y cinético: la solución completa del modelo anteriormente elaborado requiere del uso del modelo estequiométrico del sistema reaccionante y de la cinética que lo caracteriza. Para relacionar las variaciones de las concentraciones molares de los diferentes componentes que intervienen en el crecimiento del hongo, se utiliza el modelo estequiométrico desarrollado en el experimento 4. En la cinética del crecimiento de la biomasa se usa el modelo logístico, cuyas constantes y su relación con la temperatura fueron determinadas experimentalmente en el experimento 5.

Procedimiento experimental: los residuos de fréjol se trituraron hasta un tamaño de 9 mm, luego se mezclaron con las sales minerales y se ajustó la mezcla, con agua destilada hasta 70,7 % de humedad. El sustrato se pasteurizó a 100 °C por un tiempo de una hora y luego se enfrió de forma natural por un tiempo de 24 horas. Luego, el sustrato frío se mezcló con el inóculo en una proporción másica de inóculo/sustrato igual a 0,1. Las bioceldas se llenaron con sustrato inoculado y se procedió a cargar el biorreactor de acuerdo a la distribución establecida. Se ajustaron los parámetros de operación del biorreactor y diariamente se medía la temperatura del aire, su humedad relativa y la temperatura en el interior de las bioceldas. Luego de 20 días de fermentación se procedió a la separación de la biomasa de *P. ostreatus* de las bioceldas. El producto final se secó, se empacó en bolsas de polietileno, fue sellado y almacenado a una temperatura de 4 °C.

Procedimiento para el ajuste del modelo a los datos experimentales: esencialmente se realiza el ajuste del modelo del proceso formado por un sistema de ecuaciones diferenciales y algebraicas. Para ello se utilizan los datos experimentales dinámicos que se generan en el experimento.

Debido a que el modelo del proceso es un sistema de ecuaciones en el que intervienen múltiples parámetros, convertidos ahora en factores independientes para este problema de ajuste y, además a que tiene varias variables dependientes, el ajuste debe ser considerado sobre la base de minimizar la suma de cuadrados de los residuos de cada una de estas variables dependientes. Así pues, éste es un problema de optimización multi-objetivo. Si se considera que los errores de ajuste de cada variable dependiente tienen igual importancia, entonces, el ajuste se realiza minimizando la suma de la suma de cuadrados de los residuos (SCR) de las tres variables experimentales dinámicas: la temperatura del aire, la temperatura del sólido y la humedad relativa del aire. Siguiendo la explicación del manual de referencia del programa Model Maker (Saucedo, 1990), la función objetivo será en este caso:

$$SCR = \sum_3 \sum_n (\hat{y}_i - y_i)^2$$

2.7.2 Discusión de los resultados del experimento 7

En la Tabla 2.18 se muestran los resultados del cálculo de la bioconversión y la productividad del *P. ostreatus* en el biorreactor experimental. Estos resultados respecto a la productividad son elevados al compararse con los reportados en la literatura para cepas semejantes (Stamets, 2000).

Este experimento revela que el control del flujo específico de aire y la temperatura influyen positivamente en la productividad del biorreactor experimental.

Tabla 2.18 Resultados de la producción de *P. ostreatus* en el biorreactor experimental

Nº	F _{EA}	T _{ae}	BC	PEB
	L /(min.kg MSS)	(°C)	g MSH/ kg MSS	g MSH/(kg MSS.día)
1	8	20	175,48	8,77
2	2	20	131,31	6,57
3	2	15	114,60	5,73
4	8	15	152,80	7,64
5	2	15	113,40	5,67
6	8	20	167,12	8,36
7	2	20	128,92	6,45
8	8	15	149,22	7,46
9	8	20	173,09	8,65
10	2	15	112,21	5,61
11	2	20	130,12	6,51
12	8	15	146,83	7,34

Comparación de medias

En la tabla II.17 de los anexos, se muestra la dinámica de temperatura de la fase sólida tanto la experimental como la calculada por el modelo. Un análisis estadístico de comparación de medias, asumiendo varianza constante, calcula un valor-p igual a 0,468197, lo que permite asegurar con 95 % de confianza que no existe diferencia significativa entre los valores experimentales y los valores estimados por el modelo.

En la tabla II.18 de los anexos, se presenta la dinámica de la temperatura de la fase gaseosa dentro del reactor. Un análisis de comparación de medias con $\alpha = 0,05$, genera un valor-p igual a 0,329698, lo que permite asegurar con un 95 % de confianza, que no existe diferencia entre las muestras.

En la tabla II.19 de los anexos, se presenta la dinámica de la humedad dentro del biorreactor. Un análisis de comparación de medias con $\alpha = 0,05$, genera un valor-p igual a 0,636815, lo que se puede afirmar con un 95 % de confianza, que no existe diferencia significativa entre las muestras.

El modelo físico desarrollado para el biorreactor se ajusta perfectamente a los datos experimentales obtenidos y se corresponde con sus parámetros de operación. En la figura 2.4, se presenta una gráfica sobre el ajuste del modelo de temperatura de la fase sólida y la fase gaseosa contra el tiempo.

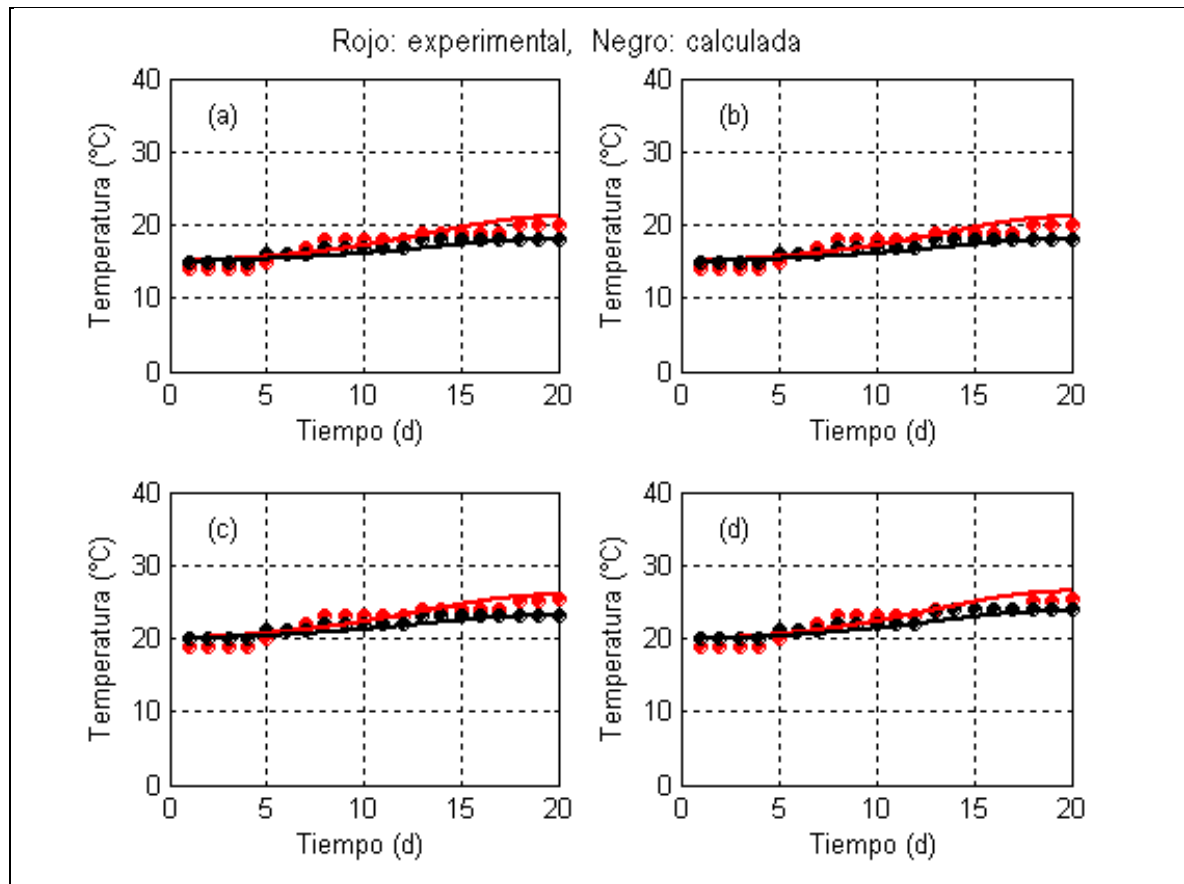


Figura 2. 4 Ajuste del modelo del biorreactor a la dinámica de la temperatura. Condiciones experimentales: a) $T=15^{\circ}\text{C}$, $\text{Fea}=2 \text{ L}/(\text{kg MSS}\cdot\text{min})$; b) $T=15^{\circ}\text{C}$, $\text{Fea}=8 \text{ L}/(\text{kg MSS}\cdot\text{min})$; c) $T=20^{\circ}\text{C}$, $\text{Fea}=2 \text{ L}/(\text{kg MSS}\cdot\text{min})$; d) $T=20^{\circ}\text{C}$, $\text{Fea}=8 \text{ L}/(\text{kg MSS}\cdot\text{min})$

En la figura 2.5 se presenta el ajuste del modelo a la dinámica de la humedad relativa en las diferentes condiciones experimentales. Como se puede observar el modelo se ajusta a los datos experimentales obtenidos.

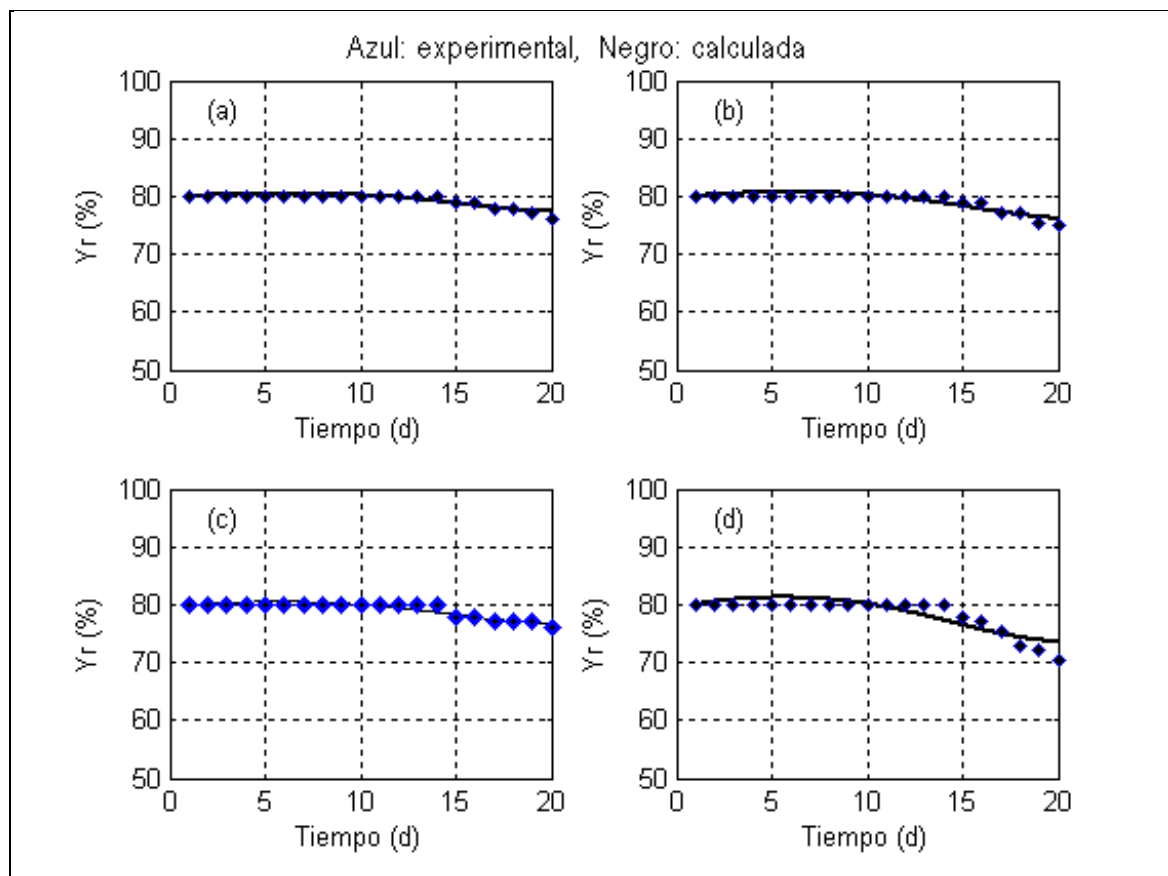


Figura 2. 5 Ajuste del modelo a la dinámica de la humedad relativa en las cuatro condiciones experimentales: a) $T=15\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Fea=2\text{ L/(kg MSS.min)}$; b) $T=15\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Fea=8\text{ L/(kg MSS.min)}$; c) $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Fea=2\text{ L/(kg MSS.min)}$; d) $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Fea=8\text{ L/(kg MSS.min)}$

Constantes del modelo físico

En la tabla 2.19 se presentan las constantes del modelo físico del biorreactor. Su coeficiente de variabilidad es pequeño lo que significa que los valores expuestos se pueden aceptar con confianza como constantes en el intervalo de estudio.

Tabla 2.19 Constantes del modelo físico del biorreactor

	kcf	hgsas	ka	Cps
No.	kg agua/kg MSH	kJ/(h.m².°C)	h⁻¹	kJ/(kg.°C)
1	4	0,25	0,0019	2,9608
2	4	0,25	0,0019	2,9608
3	4	0,25	0,0019	2,9608
4	4	0,25	0,0024	2,9608
MEDIA	4,00	0,25	0,00	2,9608
DESV EST	0,00	0,00	0,00	0,00
CV	0,00	0,00	0,12	0,00

La poca variabilidad de estos parámetros puede asociarse a varios factores. Aquellos de naturaleza termodinámica como kcf y Cps no dependen de las condiciones hidrodinámicas imperantes como resultado de la geometría del biorreactor y del flujo de aire imperante. Otros factores asociados a los procesos de transferencia de calor y masa que sí son dependientes de la hidrodinámica como hgsas y ka muestran poca variabilidad también, pero esto puede estar asociado a que no fueron sensibles los cambios en las variables independientes en el rango estudiado. De esta manera, como no se puede explicar la dependencia observada, entonces el empleo del modelo del proceso estará limitado a las condiciones experimentales ensayadas.

2.8 Conclusiones del capítulo

1. Se identificó que la cepa *ceba-gliie-po-010106* tiene mayor velocidad de crecimiento con respecto a la cepa *ceba-gliie-po-010105*, lo cual permite considerarla como una especie potencial para el desarrollo de esta tecnología.
2. De los residuos agroindustriales estudiados, el de fréjol mostró los mejores resultados para la fermentación de la cepa de *Pleurotus* *ceba-gliie-po-010106*, y se determinó que el tamaño de partícula no tiene diferencia significativa en el rango de 6 a 9 mm.
3. Se establece una formulación adecuada del medio de cultivo para la cepa de *P. ostreatus* estudiada, basada en el residuo de fréjol, enriquecido con sustrato agotado de la producción, sales de nitrógeno y magnesio, que permite incrementar la bioconversión.
4. El modelo estequiométrico desarrollado para la reacción de fermentación en estado sólido de la cepa de *P. ostreatus* sobre residuos lignocelulósicos, permitió calcular importantes parámetros de operación como la eficiencia biológica teórica, el consumo específico de oxígeno, el coeficiente de respiración y el calor metabólico.
5. El modelo cinético desarrollado para la reacción de fermentación del *P. ostreatus*, permite establecer con precisión razonable la dependencia de la velocidad específica de crecimiento en función de la temperatura.
6. Se diseñó, construyó y se puso en operación un biorreactor heterogéneo para la fermentación en estado sólido *P. ostreatus* y se propone un modelo físico del biorreactor, con nivel de descripción macroscópico que supera los reportados en la literatura para el cultivo de hongos comestibles.
7. Se determinó que la mejor bioconversión y productividad de la biomasa se logra con la menor densidad de empaque igual a 21,7 kg MSS/m³ y la distribución de las bioceldas en forma cuadrada.

CAPÍTULO 3

EVALUACIÓN DE LA PREFACTIBILIDAD

3 EVALUACIÓN DE LA PREFACTIBILIDAD

El objetivo de este capítulo es evaluar la prefactibilidad de la tecnología para la producción de *Pleurotus ostreatus*, a través de la optimización del proceso de producción y el análisis de los indicadores financieros, que permitan el establecimiento de las condiciones óptimas del proceso inversionista.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Metodología para evaluar la prefactibilidad técnico-económica

Para evaluar la prefactibilidad se utilizó la metodología para el diseño de plantas químicas, basada en el concepto de mínimo costo de producción unitario y máxima productividad (Peters y Timmerhaus, 1991), a continuación se presentan los pasos a seguir:

1. Definición preliminar del tamaño de la planta
 - 1.1. Definición preliminar de la producción anual de hongo fresco
 - 1.2. Materias primas: cantidad, calidad y costo
2. Propuesta de flujograma de proceso
3. Elaboración del modelo para la estimación de los costos
 - 3.1. Modelo para la estimación del costo del equipamiento tecnológico
 - 3.2. Modelo para la estimación de la inversión
 - 3.3. Modelo para la estimación del costo de producción anual y del costo unitario
4. Dimensionamiento óptimo de la planta para la capacidad elegida
 - 4.1. Procedimiento para la estimación inicial de operación óptima del biorreactor
 - 4.2. Determinación de las condiciones de diseño para costo mínimo

5. Aplicación de las técnicas de análisis de procesos
 - 5.1. Análisis de sensibilidad en el entorno del óptimo
 - 5.2. Interpretación física de los resultados de la optimización
 - 5.3. Análisis de la rentabilidad de la tecnología
 - 5.4. Análisis de la estructura del costo de producción
 - 5.5. Análisis del costo de inversión sobre la base del costo del equipamiento
 - 5.6. Análisis de los indicadores de eficiencia de la inversión
 - 5.7. Análisis ambiental preliminar

A continuación se explican en detalle las características de cada paso.

3.1.2 Definición preliminar del tamaño de la planta

La definición preliminar de la producción anual de hongo fresco, se realiza teniendo en cuenta las políticas y estrategias concebidas dentro del Plan Nacional de Desarrollo del Ecuador. Entre las estrategias se establece el fomento a la producción para consumo interno mediante el apoyo financiero y técnico a pequeños y medianos productores, y a las comunidades campesinas (Senplades, 2009). De esta manera el análisis se realizará para una capacidad productiva relativamente pequeña.

Respecto a la disponibilidad de la materia prima principal, la metodología se fundamenta en realizar un análisis sobre las estadísticas de producción de fréjol seco a nivel nacional reportadas en el Censo Nacional Agropecuario (INEC, 2002). Se consideraron datos experimentales del porcentaje que representa el residuo sobre la cosecha y la cantidad que se requiere en la formulación del medio.

3.1.3 Propuesta de flujograma de proceso

La propuesta de flujograma del proceso se realiza sobre la base de la tecnología de producción de *P. ostreatus* desarrollada en el CEBA. Para el diseño de la planta se consideran las etapas de preparación, transformación y separación del producto final (Pineda, Reyes y Ponce, 2006; Stamets, 2000). También

se tuvieron en cuenta las recomendaciones para la producción de hongos dados por autores como Chang y Stamets (1999, 2000).

3.1.4 Elaboración del modelo para la estimación de los costos

En el anexo II.3 se presenta la deducción del modelo para la estimación de los costos del equipamiento tecnológico, los costos de producción y los costos de inversión.

3.1.5 Dimensionamiento óptimo de la planta para la capacidad elegida

3.1.5.1 Procedimiento para la estimación inicial de operación óptima del biorreactor

La metodología de optimización en base al mínimo costo de producción, exige tener claridad sobre los niveles óptimos cercanos. Debido a que no se tiene una idea clara sobre este óptimo, se decidió realizar un acercamiento al óptimo con la variable productividad utilizando el modelo físico del proceso. La productividad se define como la producción de materia húmeda de hongos obtenida en un año por unidad de volumen de biorreactor, la cual se calcula por la ecuación (3.1).

$$P_r = \frac{MHH}{tV_{br}} \quad (3.1)$$

Se utilizó el procedimiento PATTERN SEARCH de MATLAB para resolver la tarea de optimización. Este procedimiento contiene un algoritmo de búsqueda directa con la posibilidad de introducir restricciones a las variables procesadas (Beveridge y Schechter, 1970). Este procedimiento identifica extremos locales por lo que el proceso de optimización se realizó desde diferentes condiciones iniciales de las variables optimizadas en el intervalo de validez del modelo.

3.1.5.2 Determinación de las condiciones de diseño para costo mínimo

Se estima el número de biorreactores necesarios por año, el cual se calcula por la ecuación (3.2) dividiendo la producción anual entre el producto de la productividad y el volumen del biorreactor.

$$N_{br} = \frac{PA}{P_r V_{br}} \quad (3.2)$$

El tiempo de producción disponible anual considerando la necesidad de paradas por mantenimiento y posibles roturas, se ha tomado como 330 días/año.

Las características de la producción de esta tecnología están definidas por su naturaleza discontinua. La producción anual estará en función del número de ciclos productivos por año. Esta cantidad de ciclos depende del tiempo disponible por año y del tiempo que demore un ciclo de producción.

$$N_c = \frac{t_{da}}{t_c} \quad (3.3)$$

El tiempo de un ciclo incluye las operaciones previstas en su etapa de preparación, transformación y acondicionamiento del producto final. Como el tiempo que demora la operación de fermentación es tan prolongado, pudiendo llegar hasta 30 días, entonces los tiempos de las otras operaciones pueden considerarse despreciables debido a que luego del primer ciclo las operaciones anteriores y posteriores se pueden realizar en paralelo con ésta. Así pues se toma como tiempo de un ciclo al tiempo que demore la fermentación.

Según lo planteado hasta aquí el costo anual quedaría:

$$CP = CP_c \times N_c \quad (3.4)$$

En la figura III.1 de los anexos, se presenta el diagrama heurístico utilizado para la optimización del proceso en base del costo de producción mínimo.

3.1.6 Aplicación de las técnicas de análisis de procesos

Análisis de sensibilidad en el entorno de lo óptimo: se realizó la simulación del proceso para visualizar la influencia de desviaciones de las variables en estudio de su nivel óptimo.

Interpretación física de los resultados de la optimización: se explica la lógica física de los resultados exponiendo argumentos que la sustenten. Con este paso se busca hallar posibles vías para perfeccionar la tecnología en el futuro.

Análisis de la rentabilidad de la tecnología: la metodología para el estudio de la rentabilidad de la tecnología se realiza sobre la base del análisis de las variables económicas como son la ganancia, el costo unitario y el punto de equilibrio (Oquendo, 2002; Pérez, 2012).

Análisis de la estructura del costo de producción: para este análisis se utiliza la metodología de Pareto, que permite identificar los componentes del costo de producción que tienen influencia significativa sobre el costo total de producción (Julián, 2008; Oquendo, 2002).

Análisis del costo de inversión sobre la base del costo del equipamiento: al igual que los costos de producción se utiliza la metodología de Pareto, que permite identificar los equipos que tienen influencia significativa sobre el costo total de inversión (Julián, 2008).

Análisis de los indicadores de eficiencia de la inversión: la metodología se basa en el análisis de la influencia del precio del producto y la tasa de interés sobre la tasa interna de retorno (TIR) y el valor actual neto (VAN) (Izquierdo y col., 2003; Oquendo, 2002).

Análisis ambiental preliminar: el análisis preliminar del impacto ambiental del proyecto se realiza con la metodología desarrollada para proyectos potencialmente financiables por la Corporación Financiera Nacional del Ecuador (CFN) (Izquierdo y col., 2003). Esta metodología se basa en la aplicación de la ficha de evaluación ambiental (FEA) que permite categorizar el proyecto de acuerdo a su valor del impacto ambiental (VIA) en las siguientes categorías: positivo, neutro, negativo reversible y negativo irreversible.

3.2 Discusión de los resultados

3.2.1 Definición preliminar del tamaño de la planta

Se establece una capacidad de producción de *P. o streatus* de 12 t/año. Esta producción es relativamente baja, ya que significa ingresar a un mercado con 36,36 kg/día, cantidad extremadamente pequeña para una ciudad como Ibarra, con más de 150 000 habitantes. Con un precio de venta de 5

\$/kg, se generan ingresos por 60 000 \$/año, que permitiría generar empleo para un promedio de 12 familias con un ingreso promedio de 5 195,5 \$/año, basado en el salario mínimo de 368 \$/mes establecido por la legislación ecuatoriana.

Respecto a la disponibilidad de la materia prima, la FAO sustenta, según lo citado por Cifuentes (2010), que el fréjol (*Phaseolus Vulgaris L.*) es la leguminosa de grano de consumo humano más importante del planeta (Cifuentes, 2010). La producción mundial del año 2005 fue de 18 991 954 t, ocupando el octavo lugar entre las leguminosas sembradas en el mundo. El Ecuador ocupa el lugar 46, con una producción de 39 725 t de fréjol. Considerando que aproximadamente el 80 % de la cosecha del fréjol representa los residuos, significa que se generaron 198 617 t de residuos. Estudios realizados por Cifuentes (2010), reportan que la producción de fréjol en la Sierra Norte del Ecuador, es liderada por las provincias de Imbabura y Carchi, lugar donde se podría construir esta planta. La producción de fréjol de estas dos provincias para el año 2008 fue de 5 710 t, lo que significa que se generaron 22 840 t de residuos, los cuales estarían disponibles para el proyecto (Cifuentes, 2010).

Considerando que el medio optimizado para la producción de *P. ostreatus*, tan solo requiere del 21,92 % (BH) de residuos de fréjol, con los residuos disponibles se podría preparar 104 166 t de medio, suficiente para producir mucho más de lo planeado.

3.2.2 Propuesta de flujograma de proceso

En la figura 3.1 se presenta el diagrama de bloques de la planta de producción, el proceso se realiza de forma discontinua y de modo general en tres etapas.

Etapas de preparación: las sales minerales, sulfato de amonio y sulfato de magnesio en forma sólida, y de grado técnico, son almacenadas en bodega (1). Las sales son transportadas manualmente hasta el tanque de rehidratación (5) donde se disuelven con agua potable.

La materia prima, residuos de fréjol en forma sólida, con una humedad entre 10 y 12 %, es almacenada en una bodega (2) para garantizar su disponibilidad temporal. El residuo sólido es transportado hasta el área de reducción de tamaño (4), con el objetivo de triturar el residuo hasta un tamaño de partícula entre 6 y 9 mm. La materia prima triturada es llevada al tanque de rehidratación (5), donde se pone en contacto con la solución de sales minerales hasta lograr un 70 % de humedad.

La materia prima rehidratada se lleva al tanque de pasteurización (6) el cual opera con vapor directo a presión atmosférica, con el objetivo de desinfectar el sustrato, se pasteuriza a 100 °C por un tiempo de 60 min. Luego de la pasteurización el sustrato es enfriado hasta temperatura ambiente en el mismo tanque de pasteurización.

Etapas de transformación: en esta sección el equipo principal es el biorreactor aeróbico semicontinuo, la fase sólida es discontinua y su fase gaseosa es continua y de mezcla perfecta (9), donde tiene lugar la biorreacción metabólica del hongo filamentoso *P. ostreatus* a una temperatura de 20 °C. El biorreactor está aislado y provisto de elementos constructivos para el suministro de aire húmedo a través de un sistema de nebulización (8) y control de la temperatura.

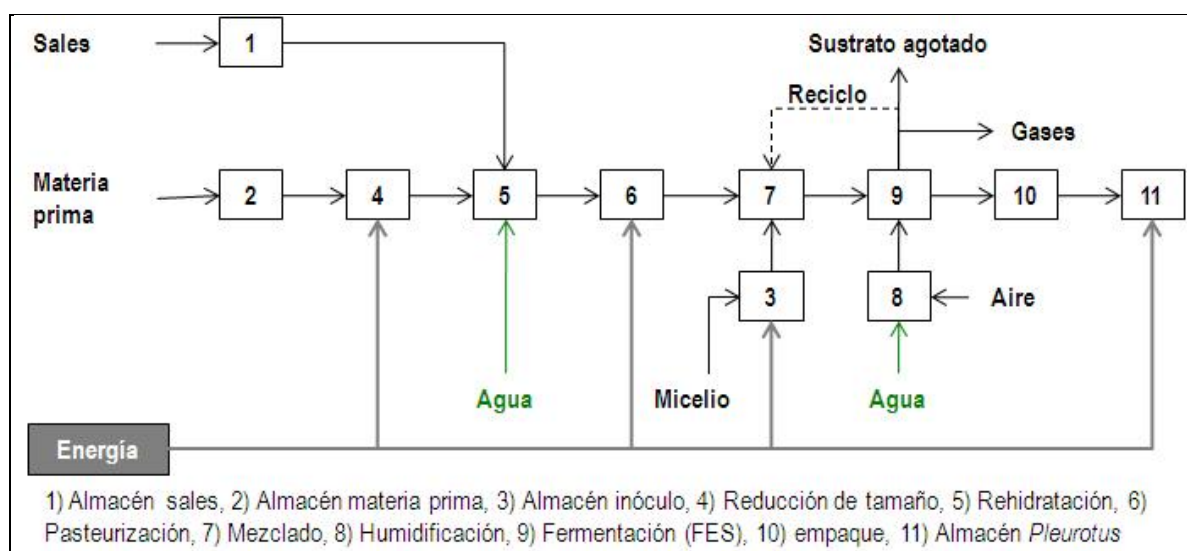


Figura 3.1 Diagrama de bloques de la planta de producción de *Pleurotus ostreatus*

Etapas de separación y empaque: el producto generado en el biorreactor (9) se separa manualmente utilizando una cuchilla de acero inoxidable y es transportado hasta la mesa de empaque (10) el producto es pesado y empacado en bandejas de poliestireno con un contenido neto de 100 g, de esta forma el producto empacado es transportado hasta el almacén de producto final (11) que opera a 4 °C. Cuando el sustrato se ha agotado se procede a la descarga del biorreactor y a las labores de limpieza y desinfección del equipo.

El sustrato agotado es un subproducto del bioproceso propuesto, el 25 % es reincorporado al proceso de producción y el resto es utilizado en la alimentación animal, principalmente de ganado bovino. La corriente de aire que sale del biorreactor antes de enviarla a la atmósfera es filtrada a través de un filtro de aire tipo *HEPA*.

Con vistas a exponer más claramente los equipos involucrados y su disposición, en la figura III.2 de los anexos, se muestra el diagrama de flujo de producción elaborado con el simulador profesional de procesos SuperPro Design (Intelligen-Inc, 1991).

3.2.3 Dimensionamiento óptimo de la planta

3.2.3.1 Estimación inicial del óptimo maximizando la productividad del biorreactor

La optimización del sistema se realiza para un módulo del biorreactor, en la figura 3.2 se presenta la variación de la productividad con las variables del proceso (T_{ae} y t_f), para dos niveles de flujo específico de aire (10 y 20 L/(min.kg MSS). El flujo específico de aire tiene poca influencia sobre la productividad. Nótese en la figura 3.2 como las dos superficies (A-B) están bastante próximas, a pesar de que un flujo es el doble del otro. Si se compara el efecto de esta variable con el de las otras dos se nota que su efecto es menos notable.

La operación óptima de un módulo de biorreactor logra una $Pr = 520 \text{ kg MHH}/(\text{m}^3.\text{año})$, cuando se opera en las siguientes condiciones: $Fea = 24,844 \text{ L}/(\text{min.kg MSS})$; $T = 12,75 \text{ °C}$ y $t_f = 27,12 \text{ días}$. Estos

datos servirán de base para iniciar el proceso de optimización con el criterio de costo mínimo, tarea mucho más compleja pues involucra el diseño de la planta, la estimación de la inversión y del costo de producción.

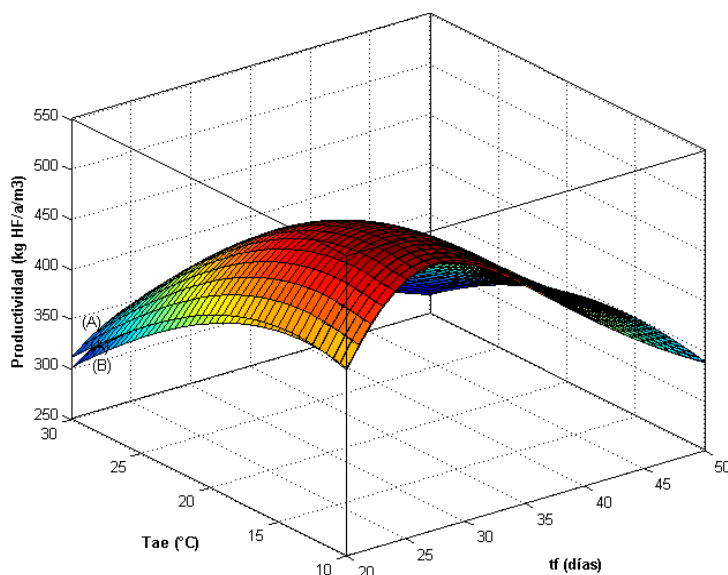


Figura 3.2 Variación de la productividad en función de Tae y tf: (A) $F_{ea} = 10 \text{ L}/(\text{min} \cdot \text{kg MSS})$, (B) $F_{ea} = 20 \text{ L}/(\text{min} \cdot \text{kg MSS})$.

3.2.3.2 Cálculo del número de biorreactores en el punto de máxima productividad

Un biorreactor de $6,88 \text{ m}^3$ de capacidad, está constituido de 16 módulos de biorreactores de $0,430 \text{ m}^3$. La máxima productividad por biorreactor es $3\,577,6 \text{ kg MHH}/(\text{m}^3 \cdot \text{año})$, entonces para producir $12\,000 \text{ kg MHH/año}$, se requieren 3,35 biorreactores.

3.2.3.3 Optimización del proceso sobre la base del costo mínimo

En la optimización se plantea como función objetivo el costo de producción unitario, es decir, por kilogramo de *P. ostreatus* producido. Este criterio está en relación directa con la eficiencia técnico-económica del proceso y revela los aspectos contradictorios de las variables a optimizar que dan lugar a la existencia de una solución de compromiso (Beveridge y Schechter, 1970).

La ecuación que define a este costo es la ecuación (3.5).

$$CPU = \frac{CP}{PA} \quad (3.5)$$

Las variables de mayor interés en la operación del biorreactor son: la temperatura del aire a la entrada, el tiempo de fermentación y el flujo específico de aire. Temperaturas de aire altas incrementan la temperatura del biorreactor y, por lo tanto, disminuye la velocidad de reacción. Esto provoca una caída en la productividad, logrando incrementar el costo de producción al disminuir la producción de hongo fresco.

Por otro lado, temperaturas de alimentación del aire muy bajas disminuyen la temperatura del biorreactor, lo cual logra disminuir la velocidad de la reacción. Al igual que en el caso anterior incrementa el costo de producción unitario debido al consumo de energía por concepto de enfriamiento y la caída en la productividad del hongo. El biorreactor no puede trabajar en condiciones isotérmicas, es imposible aun en un módulo pequeño como el investigado. No obstante la temperatura de alimentación del aire sí influirá en la dinámica de las temperaturas dentro del biorreactor.

En el caso del tiempo de fermentación, a medida que este tiempo se incrementa, al principio aumenta la productividad, pero luego la disminuye e incrementa el costo unitario debido al mayor gasto de facilidades auxiliares y poca producción de biomasa del hongo.

Respecto al flujo específico de aire, este parámetro no tiene mucha influencia sobre la productividad, sin embargo, a mayor cantidad de flujo de aire, mayor será el gasto de energía por concepto de uso del soplador y mejor control de la dinámica de la temperatura en el biorreactor.

Entonces, existe un cierto valor intermedio de estas variables que minimiza el costo unitario.

Las restricciones que se identifican en estas variables son de orden físico y están relacionadas con la validez del modelo del biorreactor:

Para el flujo de aire: $10 \leq f_{ea} \leq 25$

Para la temperatura ($^{\circ}\text{C}$): $10 \leq T_{ae} \leq 30$, y

Para el tiempo de fermentación (día): $15 \leq t_f \leq 55$.

En la figura 3.3 se presenta la relación del costo unitario de producción en función de la temperatura de entrada del aire y su tiempo de fermentación. Nótese que, en efecto, existe una región de costo mínimo en el rango de las variables de interés.

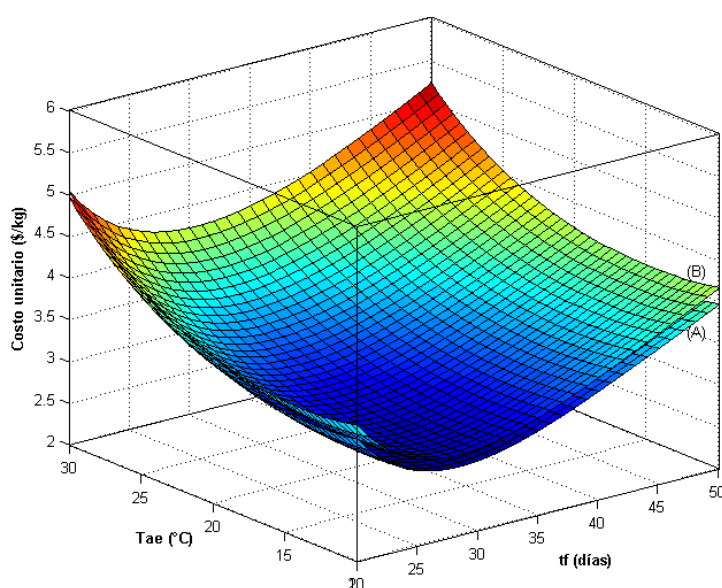


Figura 3.3 Variación del costo unitario con T_{ae} y t_f para dos valores de f_{ae} : (A) $f_{ae}=20 \text{ L}/(\text{min.kg MSS})$. (B) $f_{ae}=10 \text{ L}/(\text{min.kg MSS})$

Es notable también que, a pesar de presentarse dos superficies para dos flujos específicos de aire, la diferencia en los costos es pequeña, indicando que esta variable no ofrece gran influencia relativamente cuando se compara con las otras dos.

En la figura III.3 de los anexos, se puede observar con mayor precisión la zona donde se sitúa el óptimo. El mismo se logra bajo las siguientes condiciones: $F_{ea} = 10 \text{ L}/(\text{kg MSS.min})$; $T = 11,325 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $t_f = 28,34 \text{ días}$. Bajo estos parámetros de operación se logra una máxima productividad igual a 516,92

kg/(m³año) y un costo de producción mínimo igual a 3,30 \$/kg. Si se instala una planta con cinco biorreactores se logra una producción de 17 782 kg/año, y un costo de producción unitario igual a 2,68 \$/kg.

3.2.4 Aplicación de las herramientas de análisis de proceso

3.2.4.1 Análisis de sensibilidad en el entorno del óptimo

En la figura 3.4 se observa claramente que la variable que tiene mayor influencia sobre la función objetivo es el tiempo de fermentación.

Aunque en la figura 3.4 se observa que el costo disminuye a la izquierda del óptimo para el flujo de aire, este dato no será considerado debido a que se encuentra fuera del rango de validez del modelo.

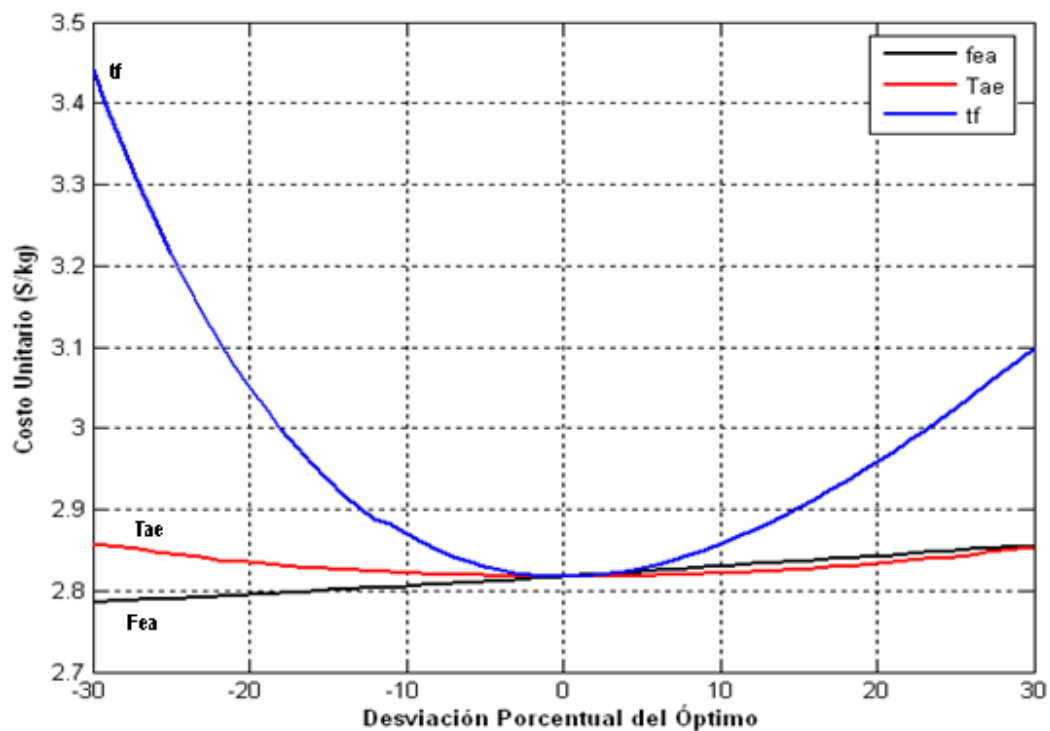


Figura 3.4 Análisis de sensibilidad en la cercanía del óptimo

3.2.4.2 Análisis fenomenológico de la solución óptima

En la figura 3.5 se representa una simulación de las dinámicas de las temperaturas dentro del biorreactor con la cual se puede explicar por qué la temperatura de alimentación del aire es tan baja para conseguir las condiciones óptimas.

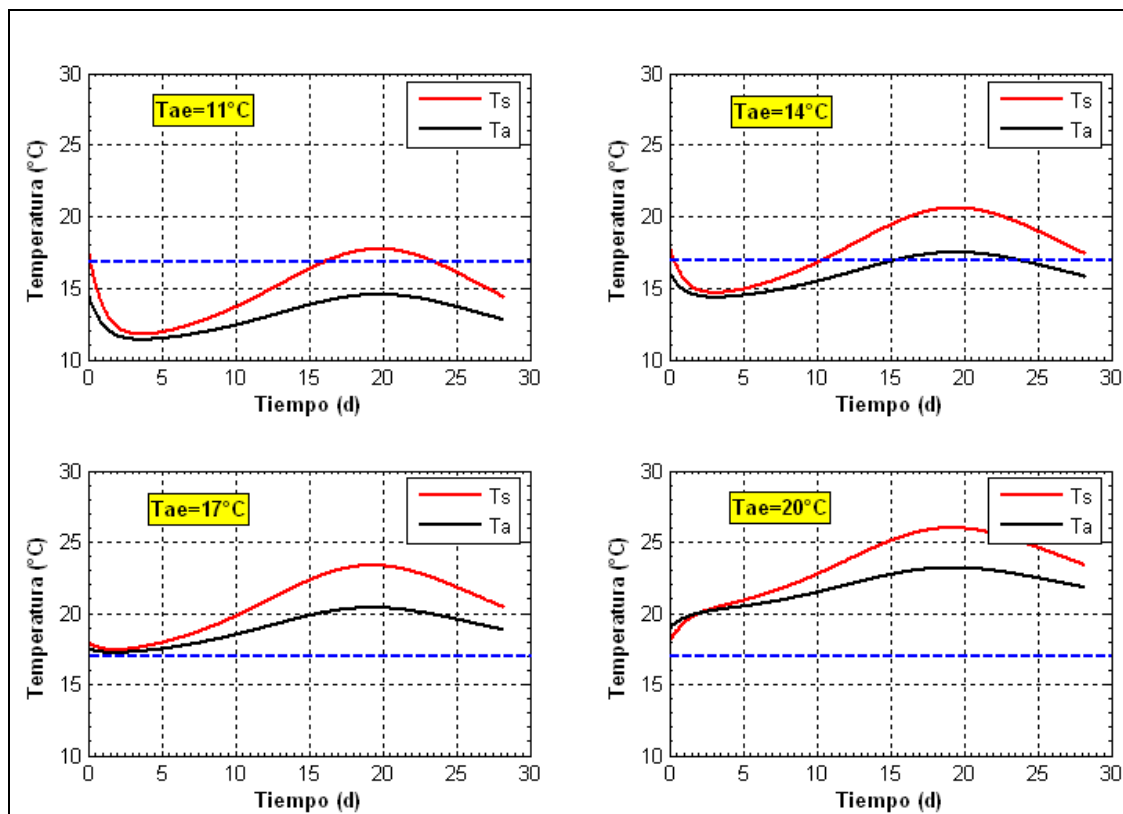


Figura 3.5 Dinámicas de las temperaturas en el biorreactor en función de la T_{ae}

La línea horizontal azul discontinua representa las condiciones óptimas para el crecimiento de *P. ostreatus* según su cinética, es decir, según demanda la fisiología del hongo. Nótese que a medida que la temperatura del aire en la alimentación se aleja del valor óptimo, la temperatura promedio en el biorreactor se aleja considerablemente del óptimo cinético. De esta manera, la velocidad específica de crecimiento del hongo es cada vez menor y como consecuencia el costo unitario se incrementa.

3.2.4.3 Análisis de la rentabilidad de la tecnología

En la figura 3.6 se presenta la influencia del tamaño de la planta sobre los indicadores técnico-económicos en las condiciones de operación optimizadas del biorreactor. Se observa que la producción incrementa a medida que incrementa el número de biorreactores, con cinco biorreactores se obtiene una producción de 17 782 kg/año. De igual forma se puede apreciar que la ganancia varía en función del número de biorreactores, por debajo de dos biorreactores se obtienen pérdidas y a partir de los tres biorreactores se observa ganancias.

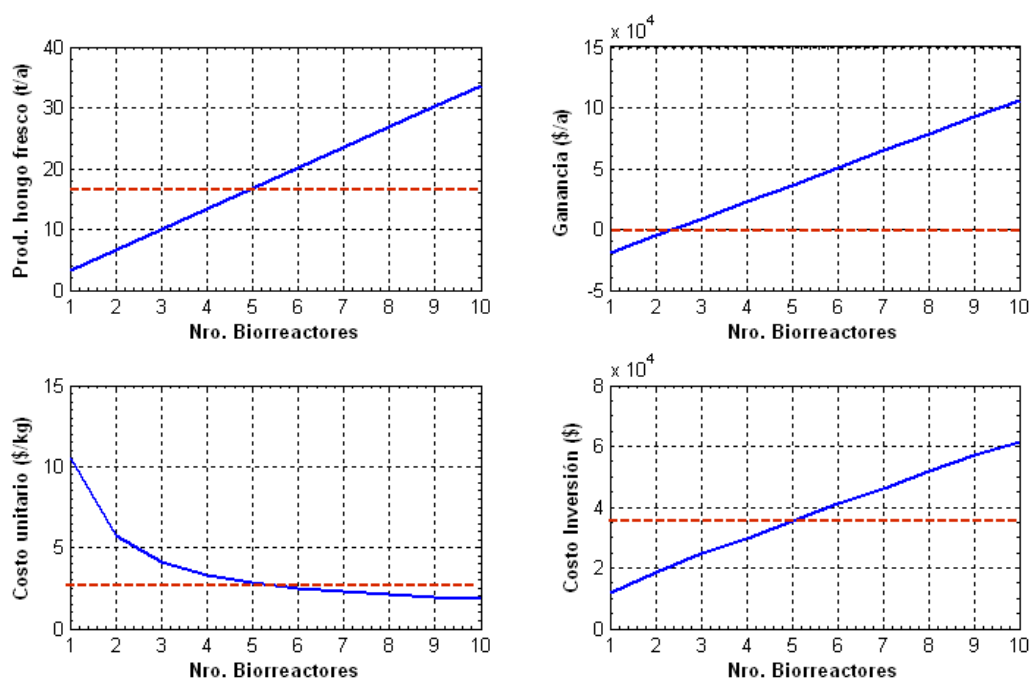


Figura 3.6 Influencia del tamaño de la planta sobre los indicadores técnico-económicos en las condiciones de operación optimizadas del biorreactor

Respecto al costo unitario, este indicador es más sensible, se observa que con cinco biorreactores se logra un costo de producción unitario igual a 2,68 \$/kg. Los costos de inversión incrementan con el número de biorreactores. En base a este análisis se decide diseñar la planta con una capacidad de cinco biorreactores, alejada del punto de equilibrio y con una inversión fija razonable de 35 524,5

dólares. Esta inversión es típica de pequeños productores, es decir que la propuesta tecnológica que se ha elaborado no sólo ofrece ganancias sino que, además, no requiere de una inversión inicial tan elevada y, por lo tanto, estará disponible para su introducción en la práctica productiva del Ecuador.

3.2.4.4 Análisis de la estructura del costo de producción

En la tabla III.1 de los anexos, se presenta el costo de producción anual y sus componentes. Como se observa, el costo total de producción asciende a 47 602,1 \$/año.

Del análisis de Pareto presentado en la figura III.4 de los anexos, se observa que los componentes del costo de producción de mayor influencia sobre el costo total son la fuerza de trabajo directa, la materia prima, las facilidades auxiliares y los costos generales. Sobre la fuerza de trabajo no se puede incidir ya que su salario está sujeto a la legislación ecuatoriana. Existe la posibilidad de buscar materias primas de más bajo costo. Respecto a las facilidades auxiliares se debe tratar de minimizar el consumo de energía y aplicar la integración másica y energética.

3.2.4.5 Análisis del costo de inversión sobre la base del costo del equipamiento

Del análisis de la figura III.5 y la tabla III.2 de los anexos, se observa que los equipos de mayor influencia en el costo de inversión son el biorreactor, la cámara de refrigeración y la mesa de empaque. Respecto al biorreactor se puede construir este equipo con materiales de menor calidad como el plástico o acero galvanizado. La cámara de refrigeración puede disminuir su tamaño si la política comercial fuera vender el producto a granel. Las mesas de empaque se podrían construir de un tipo de acero de menor costo.

3.2.4.6 Resumen del costo de inversión

En la tabla III.3 de los anexos, se presenta un resumen del costo de inversión por componente, el cual asciende a 43 458,19 dólares considerando un capital de trabajo para dos ciclos.

3.2.4.7 Análisis de los indicadores de eficiencia de la inversión

En la figura 3.7 se presenta el análisis de sensibilidad del VAN y el TIR en función del precio del producto y el costo de capital. En ambos casos, los indicadores financieros se ven favorecidos a la menor tasa de interés y al mayor precio de venta. A un precio de venta menor a 2 \$/kg se observa alta sensibilidad del proyecto al obtener un VAN negativo. A un precio de venta menor a 3,5 \$/kg se observa una TIR inferior al 25 %, lo que permite identificar que existe alta sensibilidad para esas condiciones.

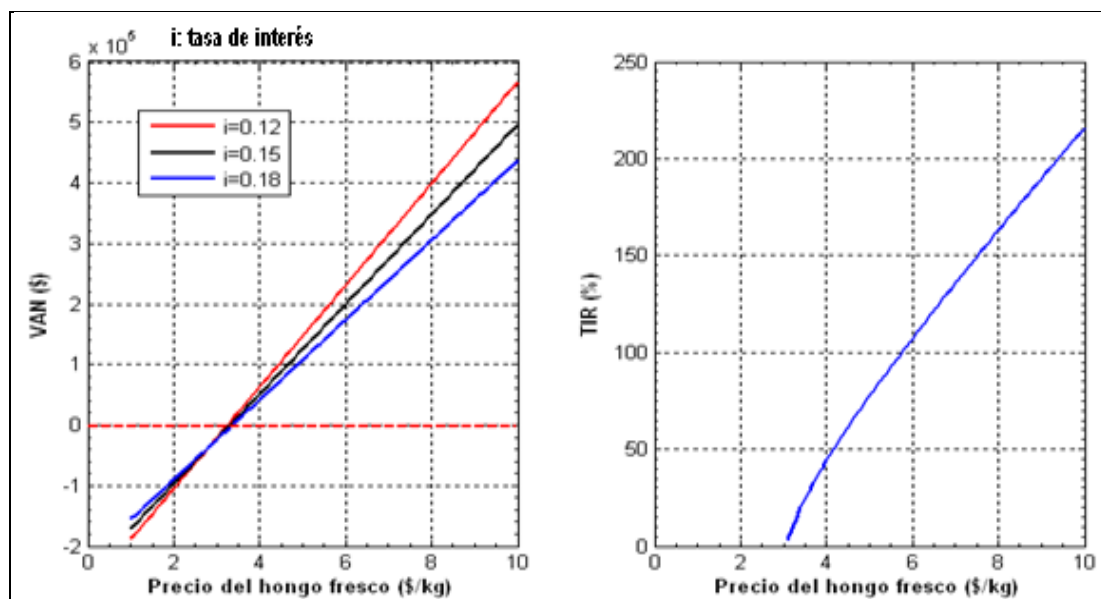


Figura 3.7 Sensibilidad del VAN y la TIR al precio de venta y a la tasa de interés

Una planta de producción con cinco biorreactores, produce 17 782 kg/año, a un precio de venta de 5 \$/kg (Burden, 2012), se generan ingresos por 88 910,24 \$/año y sus costos de producción anual son de 47 602 \$/año, generando ganancias por un valor de 41 308,13 \$/año, lo cual significa que la inversión total se recuperaría en 1,05 años.

3.2.4.8 Análisis ambiental preliminar

El análisis ambiental preliminar se realizó considerando la normativa ambiental ecuatoriana vigente, establecida en la Ley de Gestión ambiental y el Texto Unificado de Legislación Secundaria del

Ministerio del Ambiente; en la tabla III.4 de los anexos, se presenta la ficha de evaluación ambiental del proyecto. El proyecto obtiene un puntaje de 35 y el valor del impacto ambiental (VIA) se calcula en 38,9 %, esto ubica al proyecto en la categoría ambiental II, dentro de esta categoría se encuentran catalogados los proyectos o actividades cuyos impactos ambientales negativos, los riesgos, y niveles de contaminación generados al medio ambiente, son considerados de bajo impacto (Tapia, 2014a).

3.3 Conclusiones del capítulo

1. El modelo técnico-económico desarrollado sugiere la instalación de una planta con cinco biorreactores y una capacidad de producción de 17 782 kg/año. La misma que logra un $CPU_{min} = 2,68$ \$/kg y $Pr_{max} = 516,9$ kg/(m³.año), cuando ésta se opera a $T_{ae} = 11,32$ °C, $F_{ea} = 10$ L/(kg MSS.min) y $t_f = 28,34$ días.
2. Los elementos del costo de producción que mayor influencia tienen sobre el costo de producción total, son la fuerza de trabajo directa, la materia prima, las facilidades auxiliares y gastos generales.
3. El equipamiento tecnológico que mayor influencia tiene sobre los costos de inversión es el biorreactor, el equipo de refrigeración del producto terminado y la mesa de mezclado.
4. El proyecto se clasifica en la categoría ambiental II, lo que significa que es de bajo impacto.
5. El análisis de los indicadores financieros como la tasa interna de retorno y el valor actual neto, muestran al proyecto como una oportunidad de inversión.

CONCLUSIONES

1. La evaluación de la prefactibilidad indica que una planta de producción de *Pleurotus ostreatus*, con cinco biorreactores y una capacidad de 17 781,4 kg/año, genera una ganancia de 41 308 \$/año, el plazo de recuperación de la inversión es de 1,05 años. La propuesta muestra factibilidad técnica, económica y ambiental, lo que representa una oportunidad de inversión en el contexto de desarrollo socio económico del Ecuador, con fines de fortalecer la soberanía alimentaria del país.
2. Las tendencias más relevantes en el desarrollo de tecnologías para la producción de biomasa del hongo *Pleurotus spp.*, se centran en la búsqueda de procesos eficientes de fermentación en estado sólido de los residuos lignocelulósicos, que implican el uso de cepas genéticamente estables, pretratamientos y enriquecimiento de las materias prima y la identificación de parámetros de operación óptimos del proceso.
3. Se establece que la cepa del hongo *Pleurotus ostreatus* cebsa-gliie-po-010106 aislada de la biodiversidad de la Sierra Norte ecuatoriana, constituye un importante recurso para la producción industrial de este género, utilizando residuos lignocelulósicos de la cosecha del fréjol, previamente enriquecidos con sales de amonio, de magnesio y sustrato agotado del proceso de producción.
4. El modelo general del proceso de fermentación en estado sólido de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos lignocelulósicos, fundamentado en sus modelos estequiométrico, cinético y macroscópico, representan adecuadamente en el intervalo estudiado, los fenómenos que ocurren en el biorreactor heterogéneo semicontinuo.
5. El modelo técnico-económico desarrollado permite identificar que a medida que se incrementa el número de biorreactores, el costo de producción unitario del *Pleurotus* disminuye. Cuando la planta se opera con cinco biorreactores, $T_{ae} = 11,32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_f = 28,3\text{ días}$ y $F_{ea} = 10\text{ L}/(\text{kg MSS}\cdot\text{min})$, se logra un costo de producción es de 2,68 \$/kg.

RECOMENDACIONES

1. Identificar los pretratamientos físicos, químicos y enzimáticos que se deben realizar a los residuos lignocelulósicos, de tal manera que se logre mejorar la bioconversión del residuo en biomasa de *Pleurotus*.
2. Realizar el escalado de la tecnología por modelación matemática basado en los resultados experimentales expuestos en este trabajo, que permita el diseño a escala industrial.
3. Aplicar los resultados de esta investigación para mejorar la eficiencia de plantas de producción de macromicetos de otros géneros.
4. Dotar a los pequeños productores ecuatorianos de las condiciones necesarias para la transferencia de la tecnología, que permita diversificar la producción y fortalecer la soberanía alimentaria del país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abril, A. (2008, 31 de enero). *Etanol a partir de biomasa lignocelulósica*. Documento presentado en 1er. Taller nacional de etanol celulósico, La Habana.
2. Aguilar, L. (2007). *Producción de inóculo líquido para la producción de Pleurotus spp.* Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, México.
3. Akyuz, M. y Kirbag, S. (2009). Antimicrobial Activity of *Pleurotus eryngii* v *ar. ferulae* Grown on Various Agro-wastes. *EurAsian Journal of BioSciences*. 3, 58-63.
4. Ali, H. y Zulkali, M. (2011). Utilization of agro-residual ligno-cellulosic substances by using solid state fermentation: a review. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 6(1-2) 5-12.
5. Álvarez, D., Limonta, M. y Díaz, R. (2003, 10-13 junio). *Estimación del calor metabólico generado en un fermentador de 3000 L por la levadura pichia Pastoris -rec hbsag*. Documento presentado en V Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana.
6. Álvaro, H. (2000). España Patente No. 2 166 337. Oficina Española de Patentes y Marcas: S. L. GARRIGUES FONGS.
7. Amigun, B., Musango, J. K. y Stafford, W. (2011). Biofuels and sustainability in Africa. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15, 1360-1372.
8. Amin, R., Alam, N., Chandra, N., Hossain, K. y Uddin, N. (2008). Influence of Different Amount of Rice Straw Per Packet and Rate of Inocula on the Growth and Yield of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Bangladesh J. Mushroom*. 2(1) 15-20.

9. Andrino, A., Morte, A. y Honrubia, M. (2011). Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios. *Anales de Biología*. 33, 53-66.
10. Anupama y Ravindra, P. (2000). Value added food: single cell protein. *Biotechnology Advances*. 18, 459-479.
11. Asaff, A., Cerda, G., Viniegra, G. y Torre, M. (2006). Carbon distribution and redirection of metabolism in *Paecilomyces fumosoroseus* during solid-state and liquid fermentations. *Process Biochemistry*. 41, 1303–1310.
12. ASAMBLEA-NACIONAL. (2008). Constitución de la República del Ecuador. Recuperado 24 de noviembre, 2013, de <http://www.asambleanacional.gov.ec>
13. ASAMBLEA-NACIONAL. (2010). Código Orgánico de la Producción, Comercio e Inversiones. Recuperado 20 de enero, 2014, de <http://www.produccion.gob.ec>
14. Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. 52(2) 858-875.
15. Barreto, G. (2008). *Microbiología para estudiantes de Ingeniería Química: Tomo I (Morfología y Fisiología Microbiana)*. Camagüey: Universidad de Camagüey.
16. Bedford, D., Cerquiglini, C., Claro, J., y col. . (2011). *Food Outlook- Global Market Analysis: Trade and market Division* (FAO).
17. Benkortbi, O., Hanini, S. y Bentahar, F. (2007). Batch kinetics and modelling of Pleuromutilin production by *Pleurotus mutilis*. *Biochemical Engineering Journal*. 36(1) 14-18.
18. Bermúdez, C., Morris, H. J., Carlos Donoso Fernández, Martínez, C. E. y Ramos, E. I. (2003). Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 22(4) 226-231.

19. Bermúdez, C., Ramos, I., Donoso, C., García, N. y Martínez, C. (2002). Fermentación sólida de la cáscara de cacao por *Pleurotus sp.* *Tecnología Química*. 22(3) 53-58.
20. Beveridge, G. y Schechter, R. (1970). *Optimization: Theory and practice*. México: McGraw-Hill Book Company.
21. Bhatti, M. I., Jiskani, M. M., Wagan, K. H., Pathan, M. A. y Magsi, M. R. (2007). Growth, Development and Yield of Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex. Fr.) Kummer as Affected by Different Spawn Rates. *Pak. J. Bot.* 39(7) 2685-2692.
22. Bisio, A. y Kabel, R. L. (1985). *Scaleup of Chemical Processes: Conversion from Laboratory Scale Tests to Successful Commercial Size Design*. New York: John Wiley y Sons, Inc.
23. Bobek, P., Ozdin, O. y Mikus, M. (1995). Dietary oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) accelerates plasma cholesterol turnover in hypercholesterolaemic rat. *Nutrition* Mar. 14(3) 282-286.
24. Bramsiepe, C., Sieversa, S., Seifert, T., y col. . (2012). Low-cost small scale processing technologies for production applications in various environments mass produced factories. *Chemical Engineering and Processing*. 51, 32-52.
25. Brethauer, S. y Wyman, C. E. (2010). Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*. 101, 4862-4874.
26. Brizuela, E. (1987). *Aspectos fundamentales del diseño de plantas industriales*. La Habana: CUJAE.
27. Burden, D. (2012, mayo). Mushrooms profile. Recuperado 15 de noviembre, 2013, de http://www.agmrc.org/commodities_products/specialty_crops/mushrooms-profile/
28. Carranza, M., Luzuriaga, G. y Mejía, M. T. (2005). *Proyecto de producción y exportación de hongos ostra orgánicos a l mercado e uropeo*. Tesis de Especialización, Escuela Politécnica del Litoral, Guayaquil.

29. Cayetano, M. y Bernabé, T. (2008). Cultivo de *Pleurotus* sobre residuos de cosechas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y plátano (*Musa paradisiaca*). *Revista Mexicana de Micología*. 26, 57-60.
30. Cifuentes, W. (2010). *Estudio de la cadena de valor y potencialidades de mercado del fréjol en la Sierra Norte del Ecuador*. Ibarra: FEEP-CESA.
31. Cuipinga, L., Chuangzhia, W., Yanyongjie y Haitaoa, H. (2004). Chemical Elemental Characteristics of Biomass Fuels in China. *Biomass and Bioenergy*. 27, 119-130.
32. Curvetto, N., Figlas, D., Devalis, R. y Delmastro, S. (2002). Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH. *Bioresource Technology*. 84, 171–176.
33. Chacón, A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular en la agricultura y la industria. *Agronomía Mesoamérica*. 15(1) 93-106.
34. Chang, S. T. (1999). *Biología de las setas: fundamentos básicos y acontecimientos actuales*. Bogotá, D.C.: ZERI.
35. Chang, S. T. y Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact* (2da. ed.). New York: CRC.
36. Chang, S. T. y Quimio, T. H. (1982). *Tropical mushrooms: biological nature and cultivation methods*. Hong Kong: Chinese University Press.
37. Cho, K., Kwon, E. J., Kim, S. K., y col. . (2009). Fungal Diversity in Composting Process of Pig Manure and Mushroom Cultural Waste Based on Partial Sequence of Large Subunit rRNA. *Journal Microbiology and Biotechnology*. 19(8) 743–748.
38. Choi, K. H. (2008). Korea Patente No. KR 100808942. INP: KIPO.

39. Chukwurah, N. F., Eze, S. C., Chiejina, N. V., y col. . (2012). Performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in different local agricultural waste materials. *African Journal of Biotechnology*. 11(8) 8979-8985.
40. Das, N. y Mukherjee, M. (2007). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on weed plants. *Bioresource Technology* 98 2723–2726.
41. De Ketele, J. M. (1980). *Observer pour éduque*. Berna.
42. Díaz, J. A. y Ortiz, F. (2001). *Mercado internacional de hongos exóticos*. Bogotá D.C.: Humboldt Colombia.
43. Díaz, R. (2009). *Efecto d el pH inicia l de d esarrollo de Pleurotus ostr eatus en f ermentación sumergida sobre su a ctividad de l acasas*. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, Tlaxcala.
44. Dimian, A. C. y Sorin, C. (2008a). *Computer-Aided case study*. Weinheim: Wiley VCH.
45. Dimian, A. C. y Sorin, C. (2008b). *Chemical Proc ess Desig n. Com puter-Aided cas e s tudy*. Weinheim, Germany: Wiley VCH.
46. Domínguez, M. M., Álvarez, A., Granados, M. y Hernández, F. (2012). Estudio de la cinética del pretratamiento e hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 13(4) 200-211.
47. Donini, L. P., Bernardi, E. y do-Nascimento, J. S. (2006). Colonização do substrato capim-elefante suplementado com farelos por *Pleurotus ostereatus*. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 6(2) 185-193.
48. Donini, L. P., Bernardi, E., Minotto, E. y do-Nascimento, J. S. (2005). Desenvolvimento *in Vitro* de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. *Arq. Inst. Biol.* 72(3) 331-338.

49. Doran, P. M. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. Sydney: Elsevier Science & Technology Books.
50. Dunn, N. S. y Michaels, T. J. (1989). EEUU Patente No. 4,848,026. U. S. P. Office.
51. Dunn, R. F. y El-Halwagi, M. M. (2003). Review Process integration technology review: background and applications in the chemical process industry. *J Chem Technol Biotechnol* 78 1011-1021.
52. Dustet, J. C. y Izquierdo, E. (2004). Aplicación de balances de masa y energía al proceso de fermentación en estado sólido de bagazo de caña de azúcar con *Aspergillus niger*. *Biotecnología Aplicada*. 21, 85-91.
53. Dwivedi, P., Vivekanand, V., Pareek, N., Sharma, A. y Singh, R. P. (2011). Co-cultivation of mutant *Penicillium Oxalicum* SAUE-3.510 and *Pleurotus ostreatus* for simultaneous biosynthesis of xylanase and laccase under solid-state fermentation. *New Biotechnology*. 28(6) 616-626.
54. Ertola, R., Yntorno, O. y Mignone, C. (1994). *Microbiología Industrial*. Washignton: OEA.
55. Espinosa, R., Hernández, J. y Ferrer, A. (2001). *La tecnología Pinch en el marco de la Industria Química*. Santa Clara: UCLV.
56. ETC-group. (2010). *Los nuevos amos de la biomasa. Biología sintética y el próximo asalto a la biodiversidad*. Canadá: ETC-group.
57. FAO. (2008). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades*. Roma: División de Comunicación.
58. FAO. (2011a). *Cómo alimentar al mundo en el 2050*. Recuperado 21 de abril, 2014, de <http://www.fao.org/>
59. FAO. (2011b, febrero de 2012). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación: las mujeres en la agricultura*. Recuperado 18 de febrero, 2012, de www.fao.org/

60. Favero, N., Costa, P. y Paolo, G. (1990). Role of copper in cadmium metabolism in the basidiomycetes *Pleurotus ostr eatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 97(2) 297–303.
61. Feng, Z., Bai, Y., Lu, F., y col. . (2010). Effect of Asafoetida Extract on Growth and Quality of *Pleurotus ferulic*. *Int. J. Mol. Sci.* (11) 41-51.
62. Freibauer, A., Mathijs, E., Brunori, G., y col. . (2011). *Sustainable food consumption and production in a resource-constrained world* (Informativo No. 3). Bruselas: European Commission-Standing Committee on Agricultural Research (SCAR).
63. Frimpong, J., Obodai, M., Dzomeku, M. y Apertorgbor, M. M. (2011). Influence of rice husk on biological efficiency and nutrient content of *Pleurotus ostr eatus* (Jacq. ex. Fr.) Kummer. *International Food Research Journal*. 18, 249-254.
64. Gabrizova, L. (2006). España Patente No. 2247104. INP: S. R. O. Pleuran.
65. Galicia, E. (1995). México Patente No. MX 001601. IPN.
66. Gao, Y., Li, D. y Liu, Y. (2012). Production of Single Cell Protein from Soy Molasses Using *Candida tropicalis*. *Ann Microbiol.* 62, 1165-1172.
67. García, J. (2008). El impacto de la crisis de los alimentos en América Latina y el Caribe *ARI*. 152, 1-11.
68. García, M. (1998). *Cultivo de setas y trufas* (3ra. ed.). Madrid: Ediciones Mundi Prensa.
69. Garnett, T. (2011). Where are the best opportunities for reducing greenhouse gas emissions in the food system (including the food chain)? *Food Policy*. 36, 523-532.
70. Garzón, J. y Cuervo, J. (2008). Producción de *Pleurotus ost reatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 6(10) 101-236.

71. Gernaey, K. V. y Gani, R. (2010). A model-based systems approach to pharmaceutical product-process design and analysis. *Chemical Engineering Science* 65 5757-5769.
72. Ghorai, S., Banik, S. P., Verma, D., y col. . (2009). Fungal Biotechnology in Food and Feed Processing. *Food Research International*. 42, 577-587.
73. Gibriel, A. Y., Ahmed, M., Rasmy, N., Rizk, I. y Abdel, N. S. (1996). Cultivation of Oyster Mushrooms (*Pleurotus spp.*): Evaluations of Different Media and Organic Substrates. In Royse (Ed.), *Mushroom Biology and Mushroom Products* (pp. 415-421). Cairo: Penn State Univ.
74. Giovannozzi, G., Luigi, P., Baldo, R., y col. . (2002). EE:UU Patente No. US 6,379,495 B1. United States Patent: C. N. D. Ricerche.
75. González, A. L. y Gutiérrez, I. (2001). *Producción co mercial y u sos de hongos comestibles Pleurotus cultivados en residuos lignocelulósicos*. Ciudad de La Habana: ICIDCA.
76. Graciano, G., Avila, E., Fossati, L., Antunes, A. y Vieira, J. (2009). Protein Enrichment and Digestibility of Soft Rush (*Juncus effusus*) and Rice Residues Using Edible Mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *World J Microbiol Biotechnol.*(25) 449-456.
77. Gregori, A., Švagelj, M., Pahor, B., Berovič, M. y Pohleven, F. (2008). The use of spent brewery grains for *Pleurotu s o streatus* cultivation and enzyme production. *New Bio technology*. doi:10.1016/j.nbt.2008.08.003.
78. Gunde, N. y Cimerman, A. (1995). *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase-lovastatin *Experimental Mycology*. 19(1) 1-6.
79. Hamer, G. (2010). Methanotrophy: From the Environment to Industry and Back. *Chemical Engineering Journal*. 160, 391–397.

80. Han, J., Kwon, H., Yoon, J. Y., y col. . (2009). Analysis of the Thermal Environment in a Mushroom House Using Sensible Heat Balance and 3-D Computational Fluid Dynamics. *Biosystems Engineering*. 104, 417-424.
81. Hanjra, M. A. y Qureshi, M. E. (2010). Global water crisis and future food security in an era of climate change. *Food Policy*. 35, 365-377.
82. Harvey, M. y Pilgrim, S. (2011). The new competition for land: Food, energy, and climate change. *Food Policy*. 36, 540-551.
83. Hasan, M. N., Rahman, M. S., Nigar, S., Bhuiyan, M. Z. A. y Ara, N. (2010). Performance of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on Different Pretreated Substrates. *Int. J. Sustain. Crop Prod*. 5(4) 16-24.
84. Helrich, K. (Ed.). (1990). *Official methods of analysis. a association of official agricultural chemists (AOAC)* (15 th ed.). Virginia: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
85. Hisakazu, I., Oaza, S. y Hanishina-Gun, N. (1989). Inglaterra Patente No. 0 357 320 A2. European Patent Application: I. Hisakazu, S. Oaza y N. Hanishina-Gun.
86. Imtiaj, A., Lee, T. y Ohga, S. (2011). Sequence Variation of *Pleurotus spp.* Collected from Eastern Asia. *Micologia Aplicada International*. 23(1) 1-10.
87. INEC. (2002). *III Censo Nacional Agropecuario* (Informativo No. 1). Quito: Instituto Nacional Ecuatoriano de Censos.
88. Intelligen-Inc. (1991). SuperPro Designer (Version 5.1) [Academic]. Nueva Jersey
89. Isachenko, V. P. y Osipova, V. A. (1977). *Heat Transfer* (3era. ed.). Moscú: Editorial Mir.
90. Israelidis, C. (2003). Single cell protein nutrition, twenty years later. Recuperado 08 de febrero, 2013, de <http://business.hol.gr/~bio/HTML/PUBS/VOL1/isreali.htm>.

91. Izquierdo, E. y Dustet, J. (2004). Aplicación de balances de masa y energía al proceso de fermentación en estado sólido del bagazo de caña de azúcar con *Aspergillus niger*. *Biotecnología Aplicada*.(21) 85-91.
92. Izquierdo, E., Hernández, C., Vásquez, W. y Koss, M. (2003). *Formulación y evaluación de proyectos agroindustriales*. San José de Costa Rica: IFAIN.
93. Jeong, G. J. y Jeong, Y. P. (2010). Korea Patente No. KR 1020100090945. INP: KIPO.
94. Jiménez, M. M. (2013, 09 de abril). Una fórmula para envejecer sanos. *Juventud Revelde*, p. 4. Obtenido de www.juventudrevelde.cu
95. Ju, K. T. (2007). Korea Patente No. KR 1020070004155. INP: Kipo.
96. Julián, M. C. (2008). *Diseño tecnológico de una planta para el enriquecimiento proteico del bagazo de caña de azúcar*. Tesis de Doctorado en Ciencias Técnicas, Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loináz", Camagüey.
97. Julián, M. C. y Ramos, L. (2007, 4-9 de junio). *Cinética del crecimiento de la Candida utilis en residuos de la industria azucarera*. Documento presentado en II Conferencia Internacional Ciencia y Tecnología por un Desarrollo Sostenible (CYTDES), Universidad de Camagüey, Cuba.
98. Kalmis, E. y Sargn, S. (2004). Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat straw substrates containing olive mill waste water. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 53, 43-47.
99. Kibar, B. y Peksen, A. (2008). Modelling the effects of temperature and light intensity on the development and yield of Different *Pleurotus* species. *Agricultura tropica et subtropica*. 41(2) 68-73.
100. Kim, D. T. (2010). Korea Patente No. KR 1020100081797. INP: KIPO.
101. Kok, T. (1987). Inglaterra Patente No. 0 248 636 A3. European Patent Application: E. B. P. Ltd.
102. Kuchler, M. y Linnér, B. (2012). Challenging the food vs. fuel dilemma: Genealogical analysis of the biofuel discourse pursued by international organizations. *Food Policy*. (37) 581-588.

103. Ladisch, M., Kohlman, K., Westgate, P., Weil, J. y Yang, Y. (1998). EE.UU Patente No. US 5,846,787. United States Patent: P. R. F. O. o. T. Transfer.
104. Lagi, M., Bar-Yam, Y., Bertrand, K. Z. y Bar-Yam, Y. (2011). *The Food Crises: A quantitative model of food prices including speculators and ethanol conversion* (Statistical Finance No. NECSI 2011-09-01). New York: Cornell University.
105. Linnhoff, B., Townsend, D., Boland, D., y col. . (1982). *A user guide on process integration for the efficient use of energy, Rugby, England: Institute of Chemical Engineers*. England: Institute of Chemical Engineers.
106. MAE. (2003). *Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente-Decreto Ejecutivo 3516* (Vol. I). Quito: Registro Oficial
107. Marino, R. H., de-Abreu, L. D., Mesquita, J. B. y Ribeiro, G. T. (2008). Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em Serragem da Casca de Coco. *Arq. Inst. Biol.* 75(1) 29-36.
108. Martínez, D., Aguilar, A., Martínez, W., y col. . (2000). *Commercial Production and Marketing of Edible Mushrooms Cultivated on Coffee Pulp in Mexico*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
109. Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., y col. . (2011). Bioactive Phenolic Compounds: Production and Extraction by Solid-State Fermentation. A Review. *Biotechnology Advances.* 29(3) 365-373.
110. Maxwell, D., Webb, P., Coates, J. y Wirth, J. (2010). Fit for purpose? Rethinking food security responses in protracted humanitarian crises. *Food Policy.* 35, 91-97.
111. McNeil, B. y Harvey, L. M. (2008). *Practical Fermentation Technology*. England: John Wiley & Sons, Ltd.
112. Mee, H. y Valley, C. (1978). EE.UU Patente No. 4,127,965. United States Patent: T. K. Company.

113. Mejía, S. J. y Albertó, E. (2013). Heat treatment of wheat straw by immersion in hot water decreases mushroom yield in *Pleurotus ostreatus*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 30(2) 125–129.
114. Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E. y Loera, O. (2011). Particle Geometry Affects Differentially Substrate Composition and Enzyme Profiles by *Pleurotus ostreatus* Growing on Sugar Cane Bagasse. *Bioresource Technology*. 102(2) 1581-1586.
115. Miranda, O. (2005). *Filosofía, Ciencia y Sociedad en FIDEL CASTRO*. La Habana: Editorial Academia.
116. Miranda, R., Wisbeck, E., Rampinelli, J. R., Ninow, J. L. y Furlan, S. A. (2008). Alternative Medium for Production of *Pleurotus ostreatus* Biomass and Potential Antitumor Polysaccharides. *Bioresource Technology*. 99, 76–82.
117. Mitchel, D. A., Von, O. y Krieger, N. (2003). Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*. 13(2-3) 137–147.
118. Mitchell, D., Krieger, N. y Verovic, M. (2006). *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals Design and Operation*. New York: Springer.
119. Motator, K., Mejía, A. y León, A. (2006). Evaluación de los residuos agroindustriales de plátano (*Musa paradisíaca*) y aserrín de abarco (*Cariniana piriformes*) como sustratos para el cultivo del hongo *Pleurotus djamor*. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 13(1) 24-29.
120. Mueller, S. A., Anderson, J. E. y Wallington, T. J. (2011). Impact of biofuel production and other supply and demand factors on food price increases in 2008. *Biomass and Bioenergy*. 35, 1623-1632.

121. Nah, S.-L. y Chau, C.-F. (2010). Issues and challenges in defeating world hunger. *Trends in Food Science & Technology*. 21, 544-557.
122. Nasreen, Z., Bajwa, R., Kausar, T., y col. . (2008). Productivity of *Pleurotus ostreatus* Under Solid State Fermentation on Lignocellulosic Substrates. *Mycopath*. 6(1-2) 51-56.
123. Nieto, I. J., Salama, A. M., Cataño, J. E. y Chegwin, C. (2008). Determinación de la toxicidad de *Pleurotus o streatus*, *P leurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia* salina. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25(3) 186–187.
124. Nonhebel, S. (2012). Global food supply and the impacts of increased use of biofuels. *Energy*. 37, 115-121.
125. Odaira, K. (1987). EE.UU. Patente No. US 4,711,787. EE.UU.: Y. A. Corporation.
126. Omarini, A., Nepote, V., Grosso, N., Zygadlo, J. y Albertó, E. (2011). Sensory analysis and fruiting bodies characterisation of the edible mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Polyporus tenuiculus* obtained on leaf waste from the essential oil production industry. *International Jo urnal of Food Science and Technology* 45 466–474.
127. Omarini, A., Nepote, V., Grosso, N. R., Zygadlo, J. A. y Alberto, E. (2010). Sensory Analysis and Fruiting Bodies Characterisation of the Edible Mushrooms *Pleurotus ostreatu s* and *Polyporus tenuiculus* Obtained on Leaf Waste from the Essential Oil Production Industry. *International Journal of Food Science & Technology*. 45, 466-474.
128. OMS/FAO. (2003). *Dietas, nutrición y pr evención de e nfermedades crónicas* (No. Reporte 916). Ginebra: OMS.
129. Oquendo, H. (2002). *Alternativas del desarrollo prospectivo de los derivados de la caña de azúcar*. Tesis de Doctorado en Ciencias Técnicas, Universidad de Camagüey, Camagüey.

130. Otero, M., Bernal, G. y Almazán, O. (1982). *Fuentes de materias primas y micr oorganismos utilizados para la pro ducción de proteí na unicelular*. Ciudad de La Habana: Editorial Científico-Técnica.
131. Pandey, A. (2003). Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. (13) 81–84.
132. Pandey, A. y Soccol, C. R. (1998). Bioconversion of Biomass: A Case Study of Ligno-cellulosics Bioconversions in Solid State Fermentation. *Braz. arch. biol. technol.* 41(4) 379-390.
133. Panjabrao, M. V., Sopanrao, P. S., Ahmed, S. A. y Vaseem, B. M. (2007). Bioconversion of low quality lignocellulosic agricultural waste into edible protein by *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 10(8) 745-751.
134. Parikh, J., Channiwala, S. A. y Ghosal, G. K. (2007). A Correlation for Calculating Elemental Composition from Proximate Analysis of Biomass Materials. *Fuel* 86 (12-13) 1710 - 1719.
135. Pastorini, L., Bernardi, E., Minotto, E. y Soares, J. (2009). Cultivation of Shimejii on elephant grass Substrate supplemented with different kinds of bran. *Scientia Agraria*. 10(1) 67-74.
136. Pávlov, K. F., Romankov, P. G. y Noskov, A. A. (1981). *Problemas y ejemplos para el curso de operaciones básicas y apartos en tecnología química*. Moscú: Editorial Mir.
137. Peláez, A., Meneses, M., Miranda, L., y col. . (2008). Ventajas de la fermentación sólida con *Pleurotus sapidus* en ensilaje de caña de azúcar. *Archivos de Zootecnia*. 57(217) 25-33.
138. Pérez, A. (2012). *Procedimiento metodológico para el dis eño d e proc esos sostenible s d e la agroindustria cu bana*. Tesis de Doctorado en Ciencias Técnicas, Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz" Camagüey.
139. Pérez, A., Cervantes, E., Julian, M. C., y col. . (2012). Procedimiento para enfrentar tareas de diseño de procesos de la industria azucarera y sus derivados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11(2) 333-349.

140. Perfetti, J. (2001). *Setas y hongos* (No. 21). Bogotá D.C.: Corporación Colombiana Internacional.
141. Peters, M. S. y Timmerhaus, K. D. (1991). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers* (4ta ed.). New York: McGraw-Hill.
142. Phalan, B., Balmford, A., Green, R. E. y Scharlemann, J. P. W. (2011). Minimising the harm to biodiversity of producing more food globally. *Food Policy*. 36 S62–S71.
143. Pineda, J. A. (2007, 4-9, junio). *Conversión de residuos de flores Proteas spp. en proteína para alimentación humana*. Documento presentado en II Conferencia internacional ciencia y tecnología por un desarrollo sostenible (CYTDES). Universidad Ignacio Agramonte Loynaz, Camagüey, Cuba.
144. Pineda, J. A. (2013, 3-5 de Junio). *Propuesta de una ecuación estequiométrica para describir el crecimiento de una cepa del género Pleurotus spp.* Documento presentado en V Conferencia internacional ciencia y tecnología por un desarrollo sostenible (CYTDES), Universidad Ignacio Agramonte Loynaz, Camagüey, Cuba.
145. Pineda, J. A., Ramos, L. y Soto, C. (2013). Cinética del crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en la etapa de producción del cuerpo fructífero. *ICIDCA*. 47(3) 56 - 61.
146. Pineda, J. A., Reyes, G. y Ponce, C. (2006). *Transformación de residuos de proteas en proteína* (Boletín Informativo No. 003). Quito: HOLDING DINE S.A.
147. PNUD. (2011). *Informe sobre Desarrollo Humano- Sostenibilidad y equidad: Un mejor futuro para todos*. Nueva York: Ediciones Mundi-Prensa.
148. Premalatha, M., Abbasi, T., Abbasi, T. y Abbasi, S. A. (2011). Energy-Efficient Food Production to Reduce Global Warming and Ecodegradation: The Use of Edible Insects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15, 4357– 4360.

149. Queiroz, L., Jacob, E., Goldbeck, R., Souza, L. A. y Queiroz, M. I. (2010). Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Bioresource Technology*. 101, 7107-7111.
150. Querino-de-Sousa, M., Carneiro-do-Nascimento, S. y Correia, M. (2004). Evaluación de la actividad antitumoral de una fracción de componentes extraíbles en agua del hongo comestible *Pleurotus ostreatus-roseus*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 23(2) 165-168.
151. Rabbinge, R. y Bindraban, P. S. (2012). Making More Food Available: Promoting Sustainable Agricultural Production. *Journal of Integrative Agriculture*. 11(1) 1-8.
152. Rajoka, M. I., Ahmed, S., Hashmi, A. S. y Athar, M. (2012). Production of microbial biomass protein from mixed substrates by sequential culture fermentation of *Candida utilis* and *Brevibacterium lactofermentum*. *Ann Microbiol*. 62, 1173-1179.
153. Ramos, G. (2007a). *Pleurotus ostreatus* cultivado en residuos de palma aceitera como importante fuente proteica para la dieta humana. Tesis de Maestría, Escuela Politécnica del Chimborazo, Riobamba.
154. Ramos, L. (2000). *Aplicación de la modelación matemática para el desarrollo de la tecnología de fermentación del BAGARIP*. Tesis de Doctorado en Ciencias Técnicas, Universidad de Camagüey, Camagüey.
155. Ramos, L. (2007b). *Biorreactores*. Camagüey: Universidad de Camagüey.
156. Rask, K. J. y Rask, N. (2011). Economic development and food production–consumption balance: A growing global challenge. *Food Policy*. 36, 186-196.
157. Ro, H., Kim, S., Ryu, J., y col. . (2007). Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting, and physiological characteristics. *Mycological Research*. 111(6) 710-715.

158. Robles, V., Galíndez, J., Rinderknecht, N. y Poggi, H. M. (2012). Treatment of Mezcal Vinasses: A Review. *Journal of Biotechnology*. 157 524-546.
159. Rosabal, J. y Valle, M. (2006). *Hidrodinámica y separaciones mecánicas: tomo II* (3era ed.). La Habana: Félix Varela.
160. Royse, D. J. (2003). *Cultivation of Oyster Mushrooms* (No. CAT UL207). Pennsylvania: Pennsylvania State University.
161. Rudd, D. (1968). The Synthesis of System Design: I. Elementary Decomposition Theory. *AIChE J.* 14, 343.
162. Ruhul, S., Alam, N., Chandra, N., Hossain, K. y Nazim, M. (2008). Influence of Different Amount of Rice Straw Per Packet and Rate of Inocula on the Growth and Yield of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Bangladesh J. Mushroom*. 2(1) 15-20.
163. Saidu, M., Salim, M. R. y Mohamed, M. A. (2011). Cultivation of Oyster Mushroom (*Pleurotus spp.*) on Palm Oil Mesocarp Fibre *African Journal of Biotechnology*. 10(71) 15973-15976.
164. Sales, C., Ferreira, A., Teixeira, M. y Nogueira, M. (2009). Mineral composition of raw material, substrate and fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in culture. *Interciencia*. 34(6).
165. Sánchez, J. y Royse, D. (2002). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* (1 ed.). México, D.F.: Grupo Noriega.
166. Sarykaya, A. y Ladisch, M. (1997). An unstructured mathematical model for growth of *Pleurotus ostreatus* on lignocellulosic material in solid-state fermentation systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 62, 71-85.
167. Saucedo, G. (1990). Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 35, 802-808.
168. Scenna, N. J. (1999). *Modelado, simulación y optimización de procesos químicos* (2da Edición ed.).

169. Senplades. (2009). *Plan Nacional de Desarrollo para el Buen Vivir 2009-2013: Construyendo un Estado Plurinacional e Intercultural*.
170. Serrat, M. y Bermúdez, R. (2009). Cuba Patente No. 23340A1. INP: CEBI-UC.
171. Shames, I. (1995). *Mecánica de fluidos* (3era ed.). Santafé de Bogotá: McGraw-Hill.
172. Shekhar, S., Kumar, V. y Banerjee, R. (2011). Optimization of Laccase Production Using Response Surface Methodology Coupled with Differential Evolution. *New Biotechnology*. 28(1) 31-39.
173. Shen, J., Zhu, S., Liu, X., Zhang, H. y Tan, J. (2010). The Prediction of Elemental Composition of Biomass Based on Proximate Analysis. *Energy Conversion and Management*. 51, 983–987.
174. Shrivastava, B., Thakur, S., Khalsa, Y. P., y col. . (2011). White-Rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed. *Biodegradation*. 22(4) 823-831 DOI 10.1007/s10532-10010-19408-10532.
175. Shrivastava, B., Thakur, S., Pal, Y., y col. . (2011). White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed. *Biodegradation*.(22) 823–831.
176. Silva, C. F., Arcuri, S. L., Campos, C. R., y col. . (2011). Using the residue of spirit production and bio-ethanol for protein production by yeasts. *Waste Management*. 31, 108-114.
177. Sinclair, C. G. (2001). Cinética de los procesos microbianos *Biotecnología Básica* (pp. 75-133.). Zaragoza: Editorial Acribia S.A.
178. Soto, O., Saucedo, G., Pablos, J. L., Gutiérrez, M. y Favela, E. (1999). Effect of substrate composition on the mycelial growth of *Pleurotus ostreatus*. an analysis by mixture and response surface methodologies. *Process Biochemistry*. 35, 127-133.
179. Stamets, P. (2000). *Growing gourmet and medicinal mushrooms* (3rd ed.). Berkeley & Toronto: Ten Speed Press.

180. Stamets, P. (2002). *Mycomedicinals: an informational treatise on mushrooms* (3 ra ed.). Olympia, W.A.: MycoMedia.
181. Stamets, P. (2007). Growing gourmet and medicinal mushrooms. Recuperado Julio de 2011, de www.fungi.com
182. Stanbury, P. F., Whitaker, A. y Hall, S. J. (2003). *Principles of fermentation technology* (2da ed.): Elsevier Science Ltd.
183. Steineck, H. (1987). *Cultivo comercial del champiñón*. Zaragoza: Acribia, S.A.
184. Stephanopoulos, G., Aristidou, A. y Nielsen, J. (1998). *Metabolic pathway synthesis Metabolic engineering. Principles and methodologies*. San Diego, CA: Academic Press.
185. Suárez, C. (2010). *Obtención in vitro de micelio de hongos comestibles, shiitake (Lentinula edodes) y orellanas (Pleurotus ostreatus y Pleurotus pulmonarius) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos para la producción de semilla*. Tesis de Especialización, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.
186. Suárez, C. y Nieto, I. (2012). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Rev Iberoam Micol.* 30(20) 1-8.
187. Suárez, J. E. (2011). Colombia Patente No. 2011051748. PCT: P. S.A.
188. Suryanarayan, S. y Mazundar, K. (2001). U.S Patente No. 6,197,573 B1. United States Patent: B. I. L. (IN).
189. Tacuri, J. C. (2013, 24/07). Mesas de acero inoxidable. Recuperado 24/07, 2013, de <http://www.acerosinoxidablesecuador.com/trabajos-macons-fabricantes-acero-inoxidable-hoteles-restaurantes-ecuador.php?d=mesas>
190. Tapia, L. (2014a). *Acuerdo Ministerio del Ambiente del Ecuador*.

191. Tapia, L. (2014b). *Acuerdo N° 068 Ministerio del Ambiente del Ecuador*. Obtenido de <http://www.ambiente.gob.ec/biblioteca/>. 01 de enero de 2014.
192. Tocagón, G. (2010). *Evaluación de la producción del hongo Pleurotus ostreatus sobre cinco tipos de sustratos (tamo de trigo, tamo de cebada, tamo de avena, tamo de vicia y paja de páramo; enriquecidos con harina molida, a frecho de cebada y carbonato de calcio*. Tesis de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ibarra.
193. Toledo, M. (2008). *Residuos de maíz y quinua como potenciales sustratos para el cultivo de hongos comestibles Pleurotus ostreatus*. Tesis de Ingeniería, Escuela Politécnica de Chimborazo, Riobamba.
194. Torres, M. G. y Hurtado, A. R. (2003). Micobiota nativa con potencialidades medicinal en el Municipio de Quibdó. *Revista Institucional. Universidad Tecnológica del Chocó D. L. C.* (18) 3-9.
195. Toth, E., Toth, L. y Heltay, I. (1976). EE.UU Patente No. US 3,996,038. United State Patent: L. T. Ertekesito.
196. Ulrich, G. D. (1984). *Procesos de Ingeniería Química*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
197. Vantomme, P. (2010). Los insectos comestibles, una fuente de proteínas que se suele pasar por alto. *Unasylva*. 61(236) 19-21.
198. Vargas, J. M., Callejón, A. J., Pérez, J. y Velázquez, B. (2012). A Review of the Mathematical Models for Predicting the Heating Value of Biomass Materials. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16, 3065– 3083.
199. Varnero, M. (2010). Utilización de residuos forestales lignocelulósicos para producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*). *Información Tecnológica*. 21(2) 13-20.
200. Vassilev, S. V., Baxter, D., Andersen, L. K. y Vassileva, C. G. (2012). An Overview of the Composition and Application of Biomass Ash Part 2. Potential Utilisation, Technological and

- Ecological Advantages and Challenges. *Fuel* Recuperado 20 de octubre, 2013, de <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2012.10.001>
201. Vega, A., Caballero, R., García, J. y Mori, N. (2005). Bioconversión of agroindustrial residues by *Pleurotus ostreatus* cultivation. *Revista Mexicana de Micología*.(20) 33-38.
 202. Villalba, L. y Starik, C. (2010). Argentina Patente No. AR 072903. INP: C. Pyme-Adeneu.
 203. Vivero, J. L. y Porras, C. (2008). *¿Es posible una América sin hambre en 2025?* (Reporte No. 01). Santiago de Chile: FAO.
 204. Wang, D., Zhu, H.-T., Zhang, Y.-J. y Yang, C.-R. (2005). A carbon–carbon-coupled dimeric bergenin derivative biotransformed by *Pleurotus ostrea tus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 15(18) 4073-4075.
 205. Wang, H. X. y Ng, T. B. (2000). Isolation of a Novel Ubiquitin-like Protein from *Pleurotus ostreatus* Mushroom with Anti-Human Immunodeficiency Virus, Translation-Inhibitory, and Ribonuclease Activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276(2) 587–593.
 206. Westerberg, A. W. (2004). A retrospective on design and process synthesis. *Computers and Chemical Engineering*. 28 447-458.
 207. Wu, X., Zheng, S., Wang, H. y Bun, T. (2010). Isolation and Characterization of a Novel Ribonuclease from the Pink Oyster Mushroom *Pleurotus djamor*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*(56) 231-239.
 208. Yu, Q., Wu, W., Yang, P., y col. . (2012). Proposing an interdisciplinary and cross-scale framework for global change and food security researches. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. (156) 57- 71.

209. Yu, S., Yu, H. y Buswell, J. (1997). Effect of Nutrient Nitrogen and Manganese on Manganese Peroxidase and Laccase Production by *Pleurotus sajor-caju*. *FEMS Microbiology Letters* (147) 133-137.
210. Zeng, L., Chiu, W., Zheng, S. y Shou, C. (2009). Utilization of Grass Plants for Cultivation of *Pleurotus citrinopileatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 509–514.
211. Zorn, H., Berger, R. y Takenberg, M. (2005). México Patente No. 002495. IPN: T. P. G. Company.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA

Publicaciones

1. Pineda, J. A., Ramos, L. B., y Soto, C. P. (2013). Cinética del crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en la etapa de producción del cuerpo fructífero. *Revista ICIDCA*, 47(3), 56 - 61.
2. Pineda, J. A., Ramos, L. B., y Soto, C. P. (2013). Producción de proteínas comestibles con fuentes alternativas de materias primas. *Axioma*, 1(10), 5-9.
3. Pineda, J. A., Ramos, L. B., y Soto, C. P. (2013). Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido: una revisión. *Revista ICIDCA*, 48(2).
4. Pineda, J. A., Ramos, L. B., y Soto, C. P. (2014). Desarrollo de una ecuación estequiométrica para describir el crecimiento de la cepa ceba-gliie-po-010606 del género *Pleurotus spp.* *Biotechnología Aplicada*, 31 (1), 43-47.
5. Pineda, J., Ramos, L., Soto, C., Freitas, A., y Pereira, L. (2013). Crecimiento de Cepas Ecuatorianas de *Pleurotus ostreatus* en residuos agroindustriales no suplementados. *Revista Técnica Universidad de Zulia* (enviado).

Presentación en eventos científicos

1. Pineda, J. A. (2007, 4-9, junio). *Conversión de residuos de flores Proteas spp. en proteína para alimentación humana*. Trabajo presentado en la II Conferencia internacional ciencia y tecnología por un desarrollo sostenible (CYTDES). Camagüey, Cuba: Universidad Ignacio Agramonte Loynaz.
2. Pineda, J. A. (2009, 26-29, mayo). *Desarrollo de cepas fúngicas específicas*. Trabajo presentado en la III Conferencia internacional ciencia y tecnología por un desarrollo sostenible (CYTDES), Camagüey, Cuba: Universidad Ignacio Agramonte Loynaz.
3. Pineda, J. A. (2009, 20-22, octubre). *Estudio a escala de laboratorio sobre la bio conversión de residuos de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) en proteína para alimentación humana*. Trabajo presentado en el Séptimo simposio latinoamericano de biodegradación y biodeterioro (7 LAB), Universidad Internacional SEK, Quito, Ecuador.
4. Pineda, J. A. (2011, 9-11, junio). *Fermentación sólida de residuos agroindustriales por el hongo ostra (*Pleurotus spp.*)*. Trabajo presentado en la IV Conferencia internacional ciencia y tecnología por un desarrollo sostenible (CYTDES). Camagüey, Cuba: Universidad Ignacio Agramonte Loynaz.
5. Pineda, J. A. (2013, 3-5 de Junio). *Propuesta de una ecuación estequiométrica para describir el crecimiento de una cepa del género *Pleurotus* spp.* Trabajo presentado en la V Conferencia internacional ciencia y tecnología por un desarrollo sostenible (CYTDES). Camagüey, Cuba: Universidad Ignacio Agramonte Loynaz.

ANEXOS

ANEXOS CAPÍTULO 1

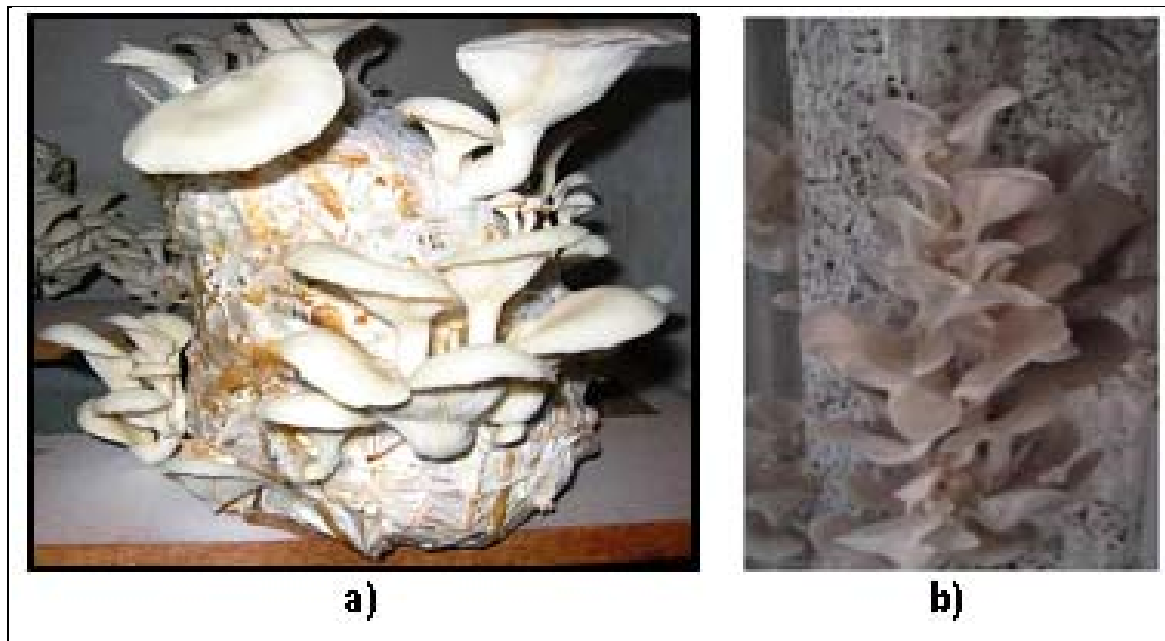


Figura I.1 Cultivo de *Pleurotus ostreatus*: (a) en bolsas y, (b) en columnas rellenas¹

¹ Foto: cortesía de Alejandro Pineda Soto, 2012

Tabla I.1 Sustratos y suplementos nutricionales para crecimiento de *Pleurotus spp.*

Especies Sustr	atos lignocelulósicos Su	plementos	Referencias
<i>P. ostreatus</i>	Paja de páramo, paja de trigo, paja de cebada,	Heno de alfalfa, granos de cervecería,	(González y Gutiérrez, 2001), (Vega y col.,
	paja de arroz, pulpa de café, hojas de banano,	harina de trigo, harina de plumas,	2005), (23), (Garzón y Cuervo, 2008),
	tallo de plátano, bagazo de caña de azúcar,	urea, sulfato de amonio, extracto de	(Pastorini y col., 2009), (Toledo, 2008), (Ruhul
	tallo de maíz, aserrín, residuos de café de	levadura, fitohormonas obtenidas de	y col., 2008), (Nasreen y col., 2008),(Royse,
	consumo humano, pasto elefante, residuos de	<i>Rhizobium sp</i> ., salvado de soya,	2003),
	maíz, residuos de quinua, <i>Cedrus de odara</i> ,	salvado de trigo, salvado de arroz ,	(Bermúdez y col., 2002), (Saidu y col., 2011),
	<i>Populous ciliata</i> , cáscara de semillas de	semilla de mijo, cal, caliza molida,	(Varnero, 2010), (Suárez, 2010), (Sales y col.,
	algodón, cascarilla de café, fibra del	KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ ·7H ₂ O, Ca(NO ₃) ₂ -	2009), (Graciano y col., 2009), (Pastorini y col.,
	mesocarpio de palma de aceite, aserrín, astillas	4H ₂ O, CaCO ₃ (2 %)	2009), (Toledo, 2008), (16), (17), (Nasreen y
	de eucalipto, astillas de álamo, aserrín de		col., 2008), (Cayetano y Bernabé, 2008),
	<i>Simarouba amara Aubl</i> y <i>Ochroma pyramidale</i>		(Shrivastava, Thakur, Pal, y col., 2011),
	<i>Cav. ex. Lam., Bactris gasipaes Kunth</i> triturada,		(Membrillo y col., 2011; Shekhar, Kumar y
	caña de azúcar <i>triturada</i> , junco blando (<i>Juncus</i>		Banerjee, 2011), (Omarini y col., 2011), (Das y
	<i>effusus</i>), paja de sorgo, aserrín de <i>Cedrus</i>		Mukherjee, 2007), (Wu y col., 2010), (Odaira,
	<i>deodara</i> , <i>Populus ciliata</i> , residuos de la		1987), (Giovannozzi y col., 2002), (Kok, 1987),

	industria de aceites esenciales (<i>Laurus nobilis</i> y <i>Eucalyptus cin nerea</i>), la hierba <i>Leonotis sp</i> , <i>Sida acuta</i> , <i>Parthenium argentatum</i> , <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Cassia s ophera</i> , <i>Tephrosia purpurea</i> y <i>Lantana cá mara</i> , tuzas de maíz, rastrojo de quinua y mijo, residuos de la fabricación de leche de soya (okara), kenaf, cáñamo, lino, madera descompuesta, paja de arveja, residuos de pulpa de fruta deshidratada, residuales de extractos de hierbas como ginsen,	(Toth, Toth y Heltay, 1976), (Álvaro, 2000), (Jeong y Jeong, 2010), (Serrat y Bermúdez, 2009), (Dwivedi y col., 2011; Imtiaj, Lee y Ohga, 2011).
<i>P. eryngii</i>	Paja de cebada, paja de trigo, tallos de algodón, estiércol de cerdo.	Nitrato de amonio, salvado de arroz, extracto de asafoetida (González y Gutiérrez, 2001), (Akyuz y Kirbag, 2009), (Feng y col., 2010), (Cho y col., 2009), (Akyuz y Kirbag, 2009)
<i>P. sajor-caju</i> ,	Junco blando (<i>Juncus effusus</i>), paja de trigo	NH ₄ NO ₃ y L-aspargina, agua residual del molido de la oliva, CaCO ₃ (Yu y col., 1997), (Graciano y col., 2009), (Kalmis y Sargn, 2004)
<i>P. pulmonarius</i>	Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.), Plátano (Musa paradisíaca L.), arroz (<i>Oryza sativa</i> L.), bagazo	(Suárez, 2010), (Gernaey y Gani, 2010), (Cavetano y Bernabé, 2008)

	de agave, pulpa y cáscara de frutas, tuza de maíz		
<i>P. sapidus</i>	Ensilajes de caña de azúcar		(Peláez y col., 2008)
<i>P. cornucopiae</i>	Paja de trigo,	agua residual del molido de la oliva,	(Suárez y Nieto, 2012), (Kalmis y Sargn, 2004)
		CaCO ₃	
<i>P. djamor</i>	plátano (<i>Musa paradisiaca</i>) aserrín de abarco,		(Motator, Mejía y León, 2006)
	(<i>Cariniana piriformes</i>)		
<i>P. citrinopileatus</i>	<i>Panicum re pens</i> , <i>Pennisetum p urpureum</i> , <i>Zeamays</i> ,		(Zeng y col., 2009)

Tabla I.2 Parámetros de operación en la producción de *Pleurotus spp.*

Especie	Partícula (mm)	pH	Humedad			Luz (lux)	Referencias
			sustrato (%)	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)		
<i>P. ostreatus</i>	20 , (14,1-47,6);	5,5	70; (70-80);	25; (20-28); (18-25); (7-34); 30;	70; (75-90); 80; (31-100);	(15-135) (20-50)	(Curvetto y col., 2002; Das y Mukherjee, 2007; Doran, 1995; Graciano y col., 2009; Han y col.,

	(1,5-2,0); (0,92- 1,68); (30- 50)	70)	(25-30)	(86-90); (80- 92)	(80-100); (100-200); 900 (400-800) (1500- 2000)	2009; McNeil y Harvey, 2008; Membrillo y col., 2011; Nasreen y col., 2008; Omarini y col., 2011; Pastorini y col., 2009; Ro y col., 2007; Shrivastava, Thakur, Pal, y col., 2011; Stanbury y col., 2003; Toledo, 2008; Varnero, 2010)
<i>P. eryngii</i>			25		(80-100)	(Akyuz y Kirbag, 2009; Ro y col., 2007; Ulrich, 1984)
<i>P. sajor-caju</i>	(47,6- 14,1); (50-100)	5,5; (6,5-7) (70-80); (70-72),	(20-25)	85	(15-135) 600	(Graciano y col., 2009; Kalmis y Sargn, 2004; Stanbury y col., 2003)
<i>P. pulmonarius</i>						
<i>P. sapidus</i>					(15-135)	(Stanbury y col., 2003)
<i>P. cornucopiae</i>	(50-100)	(6,5-7) (70-72)	(20-25)	85		(Kalmis y Sargn, 2004)

Tabla I.3 Resultados productivos de algunas especies de *Pleurotus*.

Especie	Tiempo	Eficiencia biológica (%)	Referencias
	de cosecha (días)		
<i>P. ostreatus</i>	30; 25	(2,97-32,94); 62,61; (8-94,39); 104,3; (18-55); (22,9-139); (14,09-52,97); (28,09-96,67), 128	(Amin y col., 2008; Das y Mukherjee, 2007; Garzón y Cuervo, 2008; Graciano y col., 2009; Martínez y col., 2000; Pastorini y col., 2009; Ramos, 2007b; Shrivastava, Thakur, Pal, y col., 2011; Toledo, 2008; Varnero, 2010)
<i>P. sajor-caju</i>	25; 32	61, (32,2-70,2) (25,8-79,6)	(Graciano y col., 2009; Kalmis y Sargn, 2004; Ramos, 2007b)
<i>P. pulmonarius</i>		(96,4-99,8)	(Cayetano y Bernabé, 2008)
<i>P. cornucopiae</i>	32	(14,30-33,50)	(Kalmis y Sargn, 2004)
<i>P. citrinopileatus</i>		65,40	(Zeng y col., 2009)

ANEXOS CAPÍTULO 2

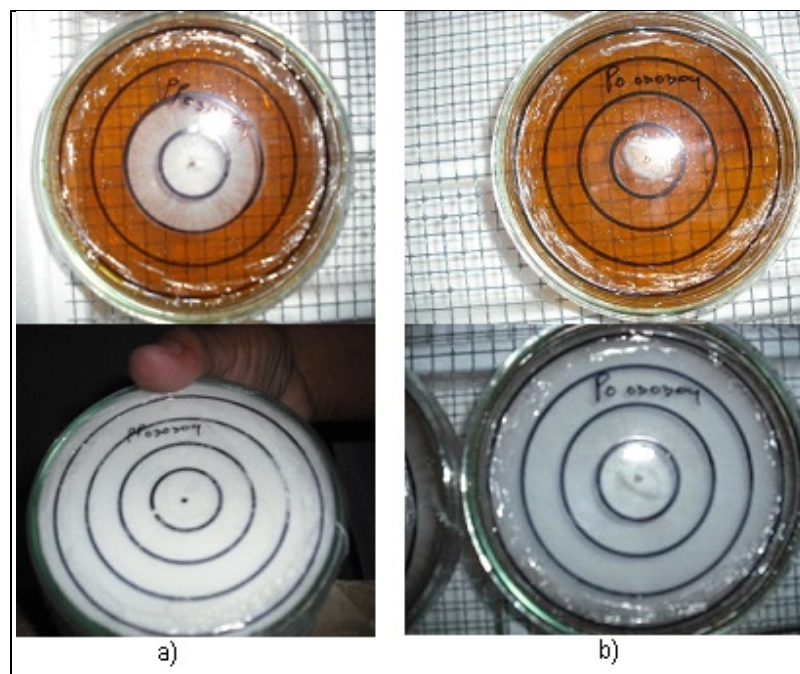


Figura II.1 Cepas: a) ceba-gliie-po-010106, b) ceba-gliie-po-010105²



Figura II.2 Micelio de la cepa de *Pleurotus ostreatus* ceba-gliie-po-010106³

² Foto: cortesía de Alejandro Pineda Soto, 2009

³ Foto: cortesía de Alejandro Pineda Soto, 2009

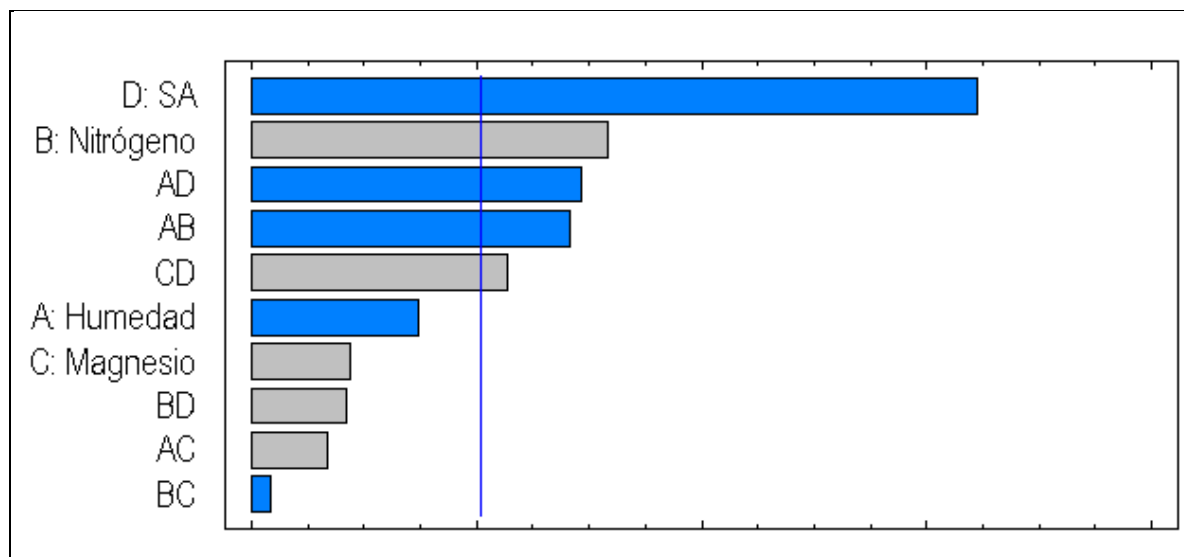


Figura II.3 Diagrama de Pareto: influencia de los factores sobre CUB en la formulación



Figura II.4 a) Residuo de fréjol, (b) *P. ostreatus* (c) Muestras para análisis elemental⁴.

⁴ Fotos: cortesía de Alejandro Pineda Soto, 2010

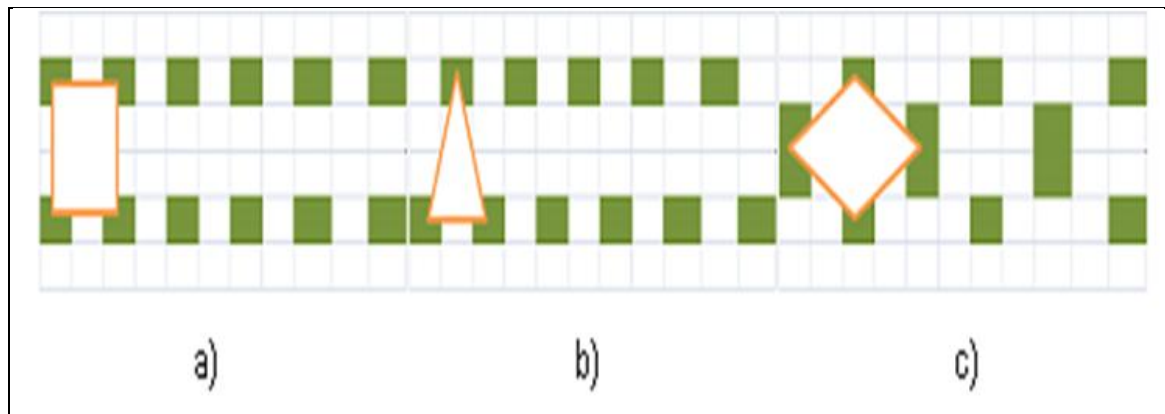


Figura II.5 Distribución de las bioceldas: a) cuadrado, b) triangular, c) tresbolillo

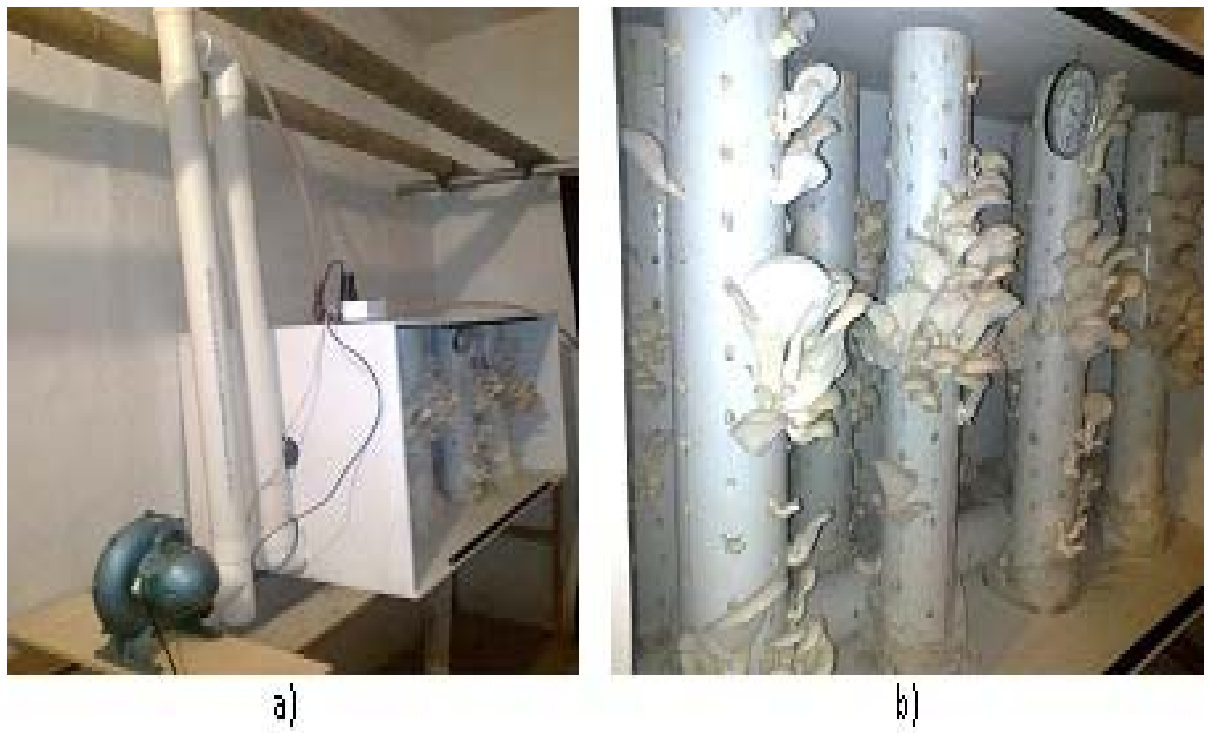


Figura II.6 a) Biorreactor experimental, b) Biorreactor con sus ocho bioceldas⁵.

⁵ Foto: cortesía de Alejandro Pineda Soto

Tabla II.1 Análisis de varianza realizado a la velocidad de crecimiento celular

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	0,0121801	1	0,0121801	307,58	0,0000
Intra grupos	0,0003168	8	0,0000396		
Total (Corr.)	0,0124969	9			

Tabla II.2 Pruebas diferencia mínima significativa para r_x por cepa

Cepa Rép	licas	Media	Grupos Homogéneos
1	5	0,514	X
2	5	0,584	X
<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
1 - 2	*	-0,07	0,0108161

* indica una diferencia significativa.

Tabla II.3 Análisis de varianza para sustrato y tamaño de partícula sobre la BC, PEB y CUB

Variable	Fuente de variabilidad	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F Valo	r-P
BC	A:Tipo de sustrato	61,4444	2	30,7222	4,24	0,0363
	B:Tamaño de partícula	0,222222	1	0,222222	0,03	0,8635
	Residuos	101,444	14	7,24603		
	Total (Corregido)	163,111	17			
PEB	A:Tipo de residuo	0,145678	2	0,0728389	5,33	0,0190
	B:Tamaño de partícula	0,00045	1	0,00045	0,03	0,8586
	Residuos	0,191433	14	0,0136738		
	Total (Corregido)	0,337561	17			
CUB	A:Tipo de residuos	165,346	2	82,6728	9,76	0,0022
	B:Tamaño de partícula	9,75347	1	9,75347	1,15	0,3013
	Residuos	118,536	14	8,46688		
	Total (Corregido)	293,635	17			

Nota: todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla II.4 Aplicación de la prueba de diferencias mínimas significativas a tipo de sustrato

Variable	Tipo de sustrato	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
BC	Banana	6	8,833	1,0989	X
	Bagazo	6	9,000	1,0989	X
	Fréjol	6	12,833	1,0989	XX
PEB	Banana	6	0,295	0,0477	X
	Bagazo	6	0,430	0,0477	XX
	Fréjol	6	0,513	0,0477	XX
CUB	Banana	6	2,985	1,1879	X
	Fréjol	6	3,970	1,1879	X
	Bagazo	6	9,850	1,1879	XX

Tabla II.5 Significación de las diferencias para un 95 % de confianza.

Variables C	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
BC	Bagazo - Banana		0,1667	3,3333
	Bagazo - Fréjol	*	-3,8333	3,3333
	Banana - Fréjol	*	-4,0000	3,3333
PEB	Bagazo - Banana		0,1350	0,1448
	Bagazo - Fréjol		-0,0833	0,1448
	Banana - Fréjol	*	-0,2183	0,1448
CUB	Bagazo - Banana	*	6,8650	3,6032
	Bagazo - Fréjol	*	5,8800	3,6032
	Banana - Fréjol		-0,9850	3,6032

*Nota: * indica una diferencia significativa.*

Tabla II.6 Análisis de varianza para el CUB formulación del medio

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Humedad	0,556852	1	0,556852	1,38	0,2472
B:Nitrógeno	4,05422	1	4,05422	10,08	0,0031
C:Magnesio	0,204102	1	0,204102	0,51	0,4809
D:Sustrato	24,0975	1	24,0975	59,93	0,0000
agotado					
AB	3,2085	1	3,2085	7,98	0,0078
AD	2,847	1	2,847	7,08	0,0117
CD	1,924	1	1,924	4,79	0,0355
bloques	0,309217	2	0,154608	0,38	0,6836
Error total	14,073	35	0,402086		
Total (corr.)	51,8197	47			

Tabla II.7 Ficha técnica del sulfato de amonio utilizado en el experimento

Presentación	Sólido cristalino
Fórmula	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$
Color	Blanco
Densidad aparente (g/L)	825-1080
Nitratos (% en peso como NO_3)	1,5 máximo
Nitrógeno (% en peso)	21,0 mínimo
Acidez libre como H_2SO_4 (% en peso)	0,03 máximo
Agua (% en peso)	0,5 máximo
Contenido de azufre (% en peso)	23,4 mínimo
Retenido en malla N° 10 (% en peso)	3,0 máximo
Pasa la malla N° 50 (% en peso)	25,0 máximo

Fuente: <http://www.elcamporadio.com/source/src/prods/sulfatodeamonio.htm>

Tabla II.8 Ficha técnica del sulfato de magnesio agrícola utilizado

Presentación	Polvo
Fórmula	$(\text{MgSO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Granulometría	Malla 80 - 60 %
Solubilidad en agua	100 %
Color	Habano gris
Composición química	MgO (21,0 %), Azufre (24,0 %), Calcio (0,005)
Familia química	Fertilizante
Presentaciones	Bolsa De Polietileno X 50 kg

Fuente: <http://www.elcamporadio.com/source/src/prods/sulfatodeamonio.htm>

Tabla II.9 Análisis de varianza cinética para la biomasa del hongo.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo	272291,00	5	54458,1	1530,49	0,0000
B:Temperatura	1035,46	4	258,866	7,28	0,0009
Residuos	711,64	20	35,5823		
Total (Corregido)	274038,00	29			

Tabla II.10 Grupos homogéneos para la variable temperatura en la cinética

Temperatura	Calos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
30	6	125,35	2,43	X
10	6	135,87	2,43	X
15	6	138,28	2,43	X
25	6	140,93	2,43	X
20	6	141,52	2,43	X

Tabla II.11 Análisis de varianza para la bioconversión (BC) respecto a la De y Dbc

Fuente S	uma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A:De	5902,41	1	5902,41	584,86	0,0000
B:Dbc	668,924	2	334,462	33,14	0,0000
Interacciones					
AB	157,94	2	78,97	7,83	0,0067
Residuos	121,104	12	10,092		
Total (corregido)	6850,38	17			

Tabla II.12 Pruebas de rangos múltiples para BC por densidad de empaque (95,0 %)

Densidad de empaque	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
32,6	9	54,0789	1,05893	X
21,7	9	90,2956	1,05893	X
Contraste	Sig.	Diferencia +/- Límites		
21,7 - 32,6	*	36,2167	3,2629	

* indica una diferencia significativa

Tabla II.13 Pruebas de rangos múltiple para BC por distribución (95,0 %)

Distribución	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
Tresbolillo	6	64,2783	1,29692	X
Triangular	6	73,17	1,29692	X
Cuadrado	6	79,1133	1,29692	X
Contraste	Sig.	Diferencia +/- Límites		
Cuadrado - Tresbolillo	*	14,835	3,99622	
Cuadrado - Triangular	*	5,94333	3,99622	
Tresbolillo - Triangular	*	-8,89167	3,99622	

* indica una diferencia significativa

Tabla II.14 Análisis de varianza para PEB (95 %) De y Dbc

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A:DE	14,7968	1	14,7968	585,11	0,0000
B:Distribución	1,67914	2	0,839572	33,20	0,0000
AB	0,4009	2	0,20045	7,93	0,0064
Residuos	0,303467	12	0,0252889		
Total (corregido)	17,1803	17			

Tabla II.15 Pruebas de rangos múltiples para PEB por densidad de empaque (95 %)

DE	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
32,6	9	2,70111	0,0530083	X
21,7	9	4,51444	0,0530083	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites	
21,7 - 32,6	*	1,81333	0,163335	

* indica una diferencia significativa

Tabla II.16 Pruebas de rangos múltiples para PEB por distribución (95 %)

Distribución	Ca	sos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Tresbolillo	6	3,21167	0,0649216	X	
Triangular	6	3,65667	0,0649216	X	
Cuadrado	6	3,955	0,0649216	X	
Contraste Sig.		Diferencia +/- Límites			
Cuadrado - Tresbolillo	*	0,743333	0,200044		
Cuadrado - Triangular	*	0,298333	0,200044		
Tresbolillo - Triangular	*	-0,445	0,200044		

* indica una diferencia significativa.

Tabla II.17 Dinámica de la temperatura (°C) de la fase sólida

Corrida 1		Corrida 2		Corrida 3		Corrida 4	
Experimental	Calculada	Experimental	Calculada	Experimental	Calculada	Experimental	Calculada
14,00	15,00	14,00	15,00	19,00	20,00	19,00	20,00
14,00	15,12	14,00	15,12	19,00	20,13	19,00	20,13
14,00	15,27	14,00	15,27	19,00	20,28	19,00	20,28
14,00	15,43	14,00	15,43	19,00	20,45	19,00	20,48
15,00	15,63	15,00	15,63	20,00	20,66	20,00	20,70
16,00	15,86	16,00	15,86	21,00	20,90	21,00	20,97
17,00	16,13	17,00	16,13	22,00	21,17	22,00	21,28
18,00	16,44	18,00	16,44	23,00	21,49	23,00	21,64
18,00	16,79	18,00	16,79	23,00	21,85	23,00	22,04
18,00	17,19	18,00	17,19	23,00	22,26	23,00	22,49
18,00	17,63	18,00	17,63	23,00	22,70	23,00	22,98
18,00	18,10	18,00	18,10	23,00	23,16	23,00	23,50
19,00	18,60	19,00	18,60	24,00	23,65	24,00	24,05
19,00	19,11	19,00	19,11	24,00	24,14	24,00	24,59
19,00	19,62	19,00	19,62	24,00	24,61	24,00	25,11
19,00	20,08	19,00	20,08	24,00	25,04	24,00	25,58
19,00	20,49	19,00	20,49	24,00	25,40	24,00	25,98
20,00	20,82	20,00	20,82	25,00	25,67	25,00	26,29
20,00	21,03	20,00	21,03	25,00	25,84	25,00	26,49
20,00	21,13	20,00	21,13	25,33	25,91	25,33	26,56
17,45	17,77	17,45	17,77	22,47	22,77	22,47	23,06

Tabla II.18 Dinámica de la temperatura (°C) de la fase gaseosa

Corrida 1		Corrida 2		Corrida 3		Corrida 4	
Experimental	Calculada	Experimental	Calculada	Experimental	Calculada	Experimental	Calculada
15,00	15,00	15,00	15,00	20,00	20,00	20,00	20,00
15,00	15,06	15,00	15,06	20,00	20,07	20,00	20,07
15,00	15,13	15,00	15,13	20,00	20,14	20,00	20,17
15,00	15,21	15,00	15,21	20,00	20,24	20,00	20,28
16,00	15,31	16,00	15,31	21,00	20,34	21,00	20,41
16,00	15,42	16,00	15,42	21,00	20,47	21,00	20,57
16,00	15,56	16,00	15,56	21,00	20,62	21,00	20,75
17,00	15,71	17,00	15,71	22,00	20,79	22,00	20,95
17,00	15,88	17,00	15,88	22,00	20,98	22,00	21,19
17,00	16,08	17,00	16,08	22,00	21,19	22,00	21,45
17,00	16,30	17,00	16,30	22,00	21,42	22,00	21,74
17,00	16,53	17,00	16,53	22,00	21,67	22,00	22,05
18,00	16,78	18,00	16,78	23,00	21,92	23,67	22,36
18,00	17,04	18,00	17,04	23,00	22,18	24,00	22,68
18,00	17,29	18,00	17,29	23,00	22,43	24,00	22,99
18,00	17,52	18,00	17,52	23,00	22,66	24,00	23,27
18,00	17,72	18,00	17,72	23,00	22,85	24,00	23,50
18,00	17,88	18,00	17,88	23,00	23,00	24,00	23,68
18,00	17,99	18,00	17,99	23,00	23,09	24,00	23,80
18,00	18,04	18,00	18,04	23,00	23,12	24,00	23,85
16,85	16,37	16,85	16,37	21,85	21,46	22,23	21,79

Tabla II.19 Dinámica de la humedad de la fase gaseosa dentro del biorreactor

Corrida 1		Corrida 2		Corrida 3		Corrida 4	
Experimental	Calculada	Experimental	Calculada	Experimental	Calculada	Experimental	Calculada
80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00
80,00	80,16	80,00	80,24	80,00	80,20	80,00	80,49
80,00	80,30	80,00	80,43	80,00	80,36	80,00	80,85
80,00	80,39	80,00	80,57	80,00	80,47	80,00	81,09
80,00	80,45	80,00	80,65	80,00	80,52	80,00	81,21
80,00	80,47	80,00	80,68	80,00	80,53	80,00	81,21
80,00	80,46	80,00	80,66	80,00	80,49	80,00	81,10
80,00	80,41	80,00	80,58	80,00	80,39	80,00	80,88
80,00	80,31	80,00	80,44	80,00	80,24	80,00	80,54
80,00	80,17	80,00	80,24	80,00	80,03	80,00	80,10
80,00	79,99	80,00	79,97	80,00	79,77	80,00	79,54
80,00	79,76	80,00	79,64	80,00	79,45	80,00	78,88
80,00	79,48	80,00	79,24	80,00	79,09	80,00	78,13
80,00	79,16	80,00	78,79	80,00	78,69	80,00	77,33
79,00	78,81	79,00	78,29	78,00	78,27	77,67	76,49
79,00	78,45	79,00	77,77	78,00	77,86	77,00	75,69
78,00	78,09	77,00	77,27	77,00	77,49	75,33	74,95
78,00	77,76	77,00	76,81	77,00	77,18	73,00	74,33
77,00	77,49	75,33	76,42	77,00	76,94	72,33	73,87
76,00	77,30	75,00	76,15	76,00	76,80	70,33	73,58

Anexo II.1 Diseño y construcción del biorreactor experimental

El objetivo de este acápite es diseñar conceptualmente el biorreactor experimental de fermentación en estado sólido para *Pleurotus ostr eatus*, con fines de ser utilizado en la investigación científica y producción a pequeña escala, que permita la rápida introducción de la tecnología en la práctica productiva.

Diseño conceptual del biorreactor

Una de las formas más tradicionales de producir proteína de macromicetos es la de colocar el sustrato inoculado dentro de un recipiente que posee perforaciones adecuadas para intercambiar oxígeno y dióxido de carbono con el aire circundante, así como, espacio para dar salida al cuerpo fructífero que crece desde el sustrato sólido retenido. Si dicho recipiente es colocado en un ambiente en el que se puedan mantener bajo control los parámetros clave para el crecimiento, como son la temperatura del aire, la temperatura del sólido, la humedad relativa, entonces el crecimiento del hongo será óptimo. Siguiendo esta idea, es que se ha concebido el biorreactor para el crecimiento del hongo como una cámara de fermentación donde se colocan diversos tubos perforados conteniendo la materia prima necesaria para la producción de la proteína.

En la figura II.7 se presenta el diagrama simplificado del biorreactor, su diseño está concebido de manera tal que permita realizar la operación de fermentación con las siguientes características: operación adiabática, aeróbico, de flujo semicontinuo.

Se concibe que el sistema de fermentación esté constituido por los siguientes componentes:

- Una cámara de fermentación del tipo hexaedro irregular, provisto de una tapa frontal hermética para carga y descarga. En dicha cámara se distribuyen las bioceldas cilíndricas perforadas que contienen el sustrato inoculado con el micelio del hongo.

- Un sistema de humidificación del aire de entrada al biorreactor, provisto de una torre de humidificación, soplador, nebulizador de agua y equipo de calentamiento.

Se define como parámetros de operación: la humedad relativa y las temperaturas de la fase sólida y la fase gaseosa. El control de los parámetros de operación se realiza con controles automáticos del tipo PID, tanto para las temperaturas como para la humedad relativa.

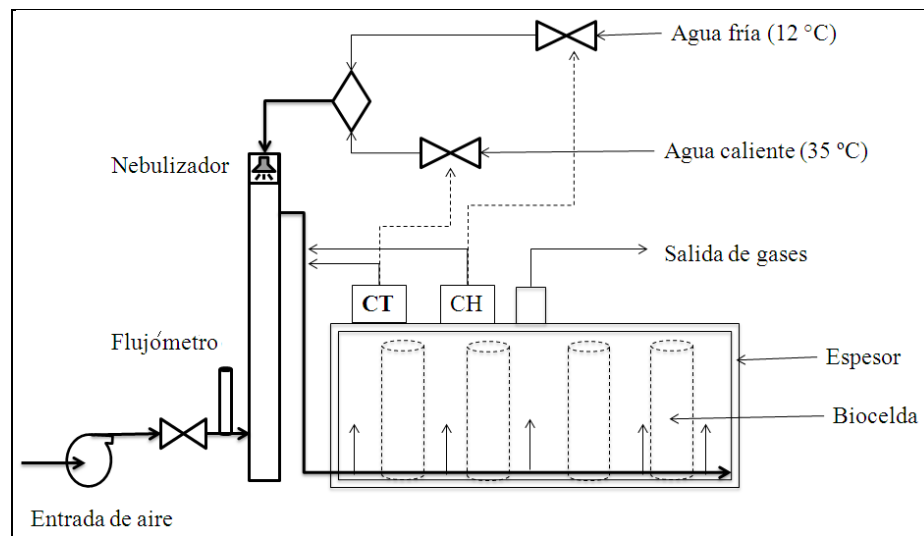


Figura II.7 Diagrama simplificado del biorreactor experimental para *P. ostreatus*

Construcción del biorreactor experimental

La forma del biorreactor experimental responde a un hexaedro irregular de 1,2x0,6x0,6 metros de largo, ancho y alto respectivamente. El biorreactor ocupa una superficie de 0,72 m² y un volumen interno de 0,430 m³. Construido en lámina melamínica impermeable de 1,5 cm de espesor, está provisto de una compuerta lateral tipo corrediza, para carga y descarga del mismo. En la figura II.8, se muestra el biorreactor experimental construido.

La biocelda de fermentación se construyó de tubo cilíndrico de carbonato de polivinilo de 0,1016 m de diámetro interno y 0,6 m de altura, a la biocelda se le realizaron 74 perforaciones de 0,0127 m de diámetro, distribuidas de forma cuadrada a una distancia de 0,0508 m.

El sistema de humidificación de aire que alimenta al biorreactor está constituido de un soplador centrífugo y una columna de humidificación provista de un micro nebulizador-homogeneizador.

En la figura II.8 se presenta el biorreactor experimental construido en el CEBA, el mismo, está provisto de un sistema de control automático de temperatura, humedad y flujo de aire, de tal manera que permita:

- El control de la temperatura, flujo de aire y humedad a la entrada del biorreactor
- El control de los parámetros de operación dentro del biorreactor
- La medición de parámetros y la toma de muestras dentro del biorreactor
- La evaluación cuantitativa y cualitativa del producto final
- El estudio del rendimiento de los diferentes insumos utilizados en el proceso
- El control continuo de la calidad de la operación de producción



Figura II.8 Biorreactor experimental construido en el CEBA para FES de *Pleurotus*⁶

⁶ Foto: cortesía de Alejandro Pineda Soto, 2010

Estrategia experimental de desarrollo

Como se ha planteado anteriormente, el objetivo de este trabajo está encaminado a desarrollar procesos para pequeñas producciones locales dirigidas al productor individual y cooperativo, en un esfuerzo por impulsar la economía popular y solidaria proveniente del sector micro empresarial, que está dentro de las prioridades de la política del gobierno ecuatoriano actual, plasmadas en su Plan Nacional de Desarrollo del Buen Vivir (Senplades, 2009).

La estrategia para lograr dicho objetivo es diseñar una tecnología de producción de *Pleurotus*, donde el biorreactor sea de bajo costo de inversión y su productividad sea la máxima. De tal forma que se puedan implementar mayores producciones por escalado aditivo modular. En la figura II.9 se presenta un biorreactor constituido por 16 módulos de biorreactores, con un volumen total de 6,88 m³, ocupa un área superficial de 2,88 m², estratégicamente alineados, de tal manera que su operación sea efectiva.

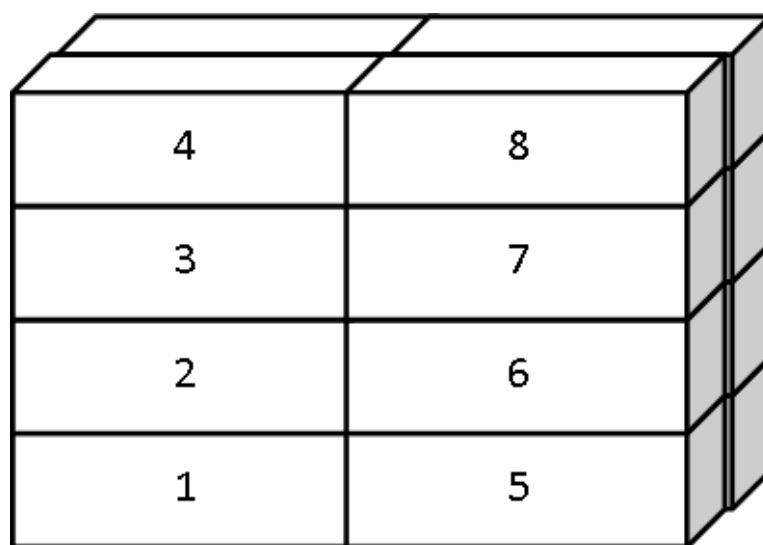


Figura II.9 Biorreactor de producción de *Pleurotus* constituido por 16 módulos

Anexo II.2 Formulación del modelo matemático del biorreactor

El objetivo de este acápite es formular un modelo físico del biorreactor de producción de *P. ostreatus*, a través de las técnicas de modelación matemática, que permita predecir su comportamiento dinámico y la productividad.

Concepción del experimento

En esta parte se discute la concepción de un modelo macroscópico heterogéneo para describir la dinámica del proceso en las fases gaseosa y sólida. Este modelo físico se supone, en primera instancia, que representa adecuadamente al sistema. En este modelo existen constantes características que no son conocidas *a priori*. En estas condiciones se realiza un experimento en el que se modifican algunas de las variables de operación más importantes del proceso. Si el modelo representa adecuadamente el comportamiento experimental del proceso en las combinaciones de esas variables, se considera que contiene los elementos físicos que realmente están presentes en el sistema. Para la representación de la dinámica se identificaron los parámetros desconocidos del modelo. El procedimiento de identificación es esencialmente un ajuste de curvas por mínimos cuadrados no tradicional, como se explica más adelante. Entonces, durante este procedimiento de validación quedan disponibles las constantes características del modelo para las condiciones experimentales.

Propuesta de un modelo macroscópico heterogéneo

Consideraciones del modelo físico y variables de interés: las variables de interés son la temperatura, el flujo específico de aire y el tiempo de fermentación, las que han demostrado ser de mayor importancia para este tipo de procesos una vez que se ha fijado el medio de cultivo y el tipo de biorreactor a emplear (Julián, 2008).

Se parte de las siguientes consideraciones y simplificaciones que son hipótesis de partida, que el modelo a desarrollar será capaz de comprobar:

1. Se establece el estudio de un biorreactor semicontinuo, representado por un modelo físico con nivel de detalle macroscópico
2. La fase gaseosa tiene flujo continuo y el modelo de flujo es de mezcla perfecta
3. La fase sólida no tiene flujo, es estática y la distribución de temperatura y las concentraciones son homogéneas en todas las bioceldas, lo que fundamenta en la fuerte aireación forzada de la fase gaseosa y que la biocelda está suficientemente perforada como para permitir la libre circulación convectiva del aire que homogeniza estos factores
4. Las bioceldas presentes en el biorreactor liberan energía calorífica que es arrastrada a la fase gaseosa por el flujo convectivo, que es directamente proporcional a la cantidad de masa presente en la cámara de cultivo
5. El proceso de bioconversión en el biorreactor es descrito por el modelo estequiométrico y el modelo cinético desarrollados en el trabajo
6. Existirán diferencias de temperaturas entre la fase sólida y gaseosa en virtud de las malas propiedades de transporte de calor de la fase sólida, de esta manera se realizan los balances macroscópicos en las dos fases, resultando un modelo de proceso tipo heterogéneo
7. El mecanismo predominante en la transferencia de calor es el convectivo debido a la existencia de aireación forzada y alta porosidad de las bioceldas y a la mala conductividad de la fase sólida
8. El aire es un gas ideal y que en ambas fases las propiedades termofísicas y termoquímicas como: C_p y $(-\Delta H_r)$ permanecen constantes debido a la poca variación que experimenta la temperatura en estos sistemas y su débil dependencia con ésta
9. Son despreciables las variaciones que pueda sufrir la masa total de sólido presente inicialmente debido a la pérdida de materia seca y agua durante la fermentación

10. Las propiedades termofísicas del sólido correspondiente al medio de cultivo o sustrato y el cuerpo fructífero son homogéneas y forman una misma fase

Balance de masa en el biorreactor

Balance de masa en la fase gaseosa

El planteamiento de los balances de masa se hará, en todos los casos, considerando los términos genéricos siguientes:

$$\left[\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{de Acumulación} \\ \text{del componente} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Entrada} \\ \text{por flujo} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Salida} \\ \text{por flujo} \end{array} \right] \mp \left[\begin{array}{c} \text{Generación} \\ \text{o consumo} \\ \text{por reacción} \end{array} \right] \mp \left[\begin{array}{c} \text{Salida o} \\ \text{entrada por} \\ \text{la interfase} \end{array} \right]$$

Balance para el dióxido de carbono: se considera la transferencia del CO₂ producido en la fase sólida: y los términos de entrada y salida por flujo, al ser esta fase continua:

$$\frac{d(\phi_B V_B C_{CO_2})}{dt} = (f_A C_{CO_2}^e) - (f_A C_{CO_2}) + k_{CO_2}(C_{CO_2}^* - C_{CO_2})V_B \phi_B \quad (\text{II. 9})$$

Todo el CO₂ que se genera en la fase sólida se transfiere a la fase gaseosa debido a la poca presencia de agua libre en el sistema, la cual se satura rápidamente de este componente durante el inicio del proceso. Adicionalmente se considera que no existe resistencia difusional significativa a la transferencia del CO₂ en la interface debido a la alta superficie específica existente en los procesos de fermentación en estado sólido y a la existencia de una fuerte aireación forzada (Isachenko y Osipova, 1977; Mejía y Albertó, 2013; Mitchell y col., 2006; Panjabrao y col., 2007). De esta manera se establece que la etapa química en la fase sólida controla el proceso global y se pueden igualar las velocidades de producción del componente con la de transferencia en la interface:

$$k_{CO_2}(C_{CO_2}^* - C_{CO_2})V_B \phi_B = \frac{\delta r_x m_S (1 - Y_S)}{M_X} \quad (\text{II. 10})$$

Si se considera que la masa de sólido (m_S) presente en el biorreactor es constante, entonces ésta se calcula en función del número de bioceldas presentes y la masa inicial de sólido que carga cada biocelda:

$$m_S = n_{BC} m_{BC} \quad (\text{II. 11})$$

El número de celdas por su parte se calcula con la variable de diseño densidad de empaque del biorreactor, investigada en el experimento anterior, y el volumen total de éste, dividido por la masa que guarda una celda simple, o sea:

$$n_{BC} = \frac{\rho_{EB} V_B}{m_{BC}(1-Y_S)} \quad (\text{II. 12})$$

Sustituyendo la ecuación (II.4) en la ecuación (II.3) se obtiene:

$$m_S = \frac{\rho_{EB}}{(1-Y_S)} V_B \quad (\text{II. 13})$$

Para no complicar la presentación de la ecuación (II.1), ésta se dejará en función de m_S , término que será calculado previamente con la ecuación (II.5). Sustituyendo ecuación (II.2) en ecuación (II.1):

$$\frac{dC_{CO_2}}{dt} = \frac{f_A(C_{CO_2}^e - C_{CO_2})}{\phi_B V_B} + \frac{\delta m_S(1-Y_S)}{\phi_B V_B M_X} r_x \quad (\text{II. 14})$$

El término de porosidad (ϕ_B) que aparece en la ecuación (II.1) está referido al biorreactor en su conjunto, o sea, que tiene en cuenta que dentro de éste hay varias columnas ahuecadas, rellenas de un material poroso en el cual crece el basidiomiceto. Toda esa parte sólida se tiene en cuenta al calcular la fracción hueca del biorreactor. A continuación se deducen las ecuaciones que permiten estimar este término de porosidad:

$$(1 - \phi_B) = \frac{(V_{SC} + V_S)}{V_B} \quad (\text{II. 15})$$

Sustituyendo los volúmenes sólidos de las celdas y del sólido en fermentación y arreglando resulta:

$$(1 - \phi_B) = n_{BC} \frac{(V_{SC} + V_{HC}(1-\phi_S))}{V_B} \quad (\text{II. 16})$$

Si definimos como volumen total de una celda (V_{TC}) el referido a la suma de su volumen interno (V_{HC}), más el volumen de la pared sólida de la columna (V_{SC}), entonces:

$$V_{TC} = V_{HC} + V_{SC} \quad (\text{II. 17})$$

De aquí resulta:

$$V_{SC} = V_{TC} - V_{HC} \quad (\text{II. 18})$$

Sustituyendo la ecuación (II.10) en la ecuación (II.8) y arreglando resulta:

$$(1 - \phi_B) = n_{BC} \frac{(V_{TC} - V_{HC} \phi_S)}{V_B} \quad (\text{II. 19})$$

Si se define como fracción sólida de cada celda a la fracción:

$$1 - \phi_{HB} = \frac{(V_{TC} - V_{HC} \phi_S)}{V_B} \quad (\text{II. 20})$$

Entonces, sustituyendo la ecuación (II.12) en la ecuación (II.11) y arreglando se llega finalmente a:

$$\phi_B = 1 - n_{BC}(1 - \phi_{HB}) \quad (\text{II. 21})$$

La ecuación (II.13) será usada también en la solución de la ecuación (II.6) una vez que se realicen las operaciones de simulación con ésta.

Balance de oxígeno: este componente es consumido en la fase sólida, a donde llega desde la fase gaseosa, por lo que se considerará que la disminución de la concentración de este componente en esta fase se puede estimar por el consumo en aquella otra. Al igual que en el caso del CO_2 no se considera que exista una resistencia difusional significativa a la transferencia del O_2 debido a la alta superficie específica de transferencia existente en la fermentación en estado sólido (Isachenko y Osipova, 1977; Mejía y Albertó, 2013; Mitchell y col., 2006; Panjabrao y col., 2007).

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = \frac{f_A(C_{O_2}^e - C_{O_2})}{\phi_B V_B} - \frac{\gamma r_X m_S (1 - Y_S)}{\phi_B V_B M_X} \quad (\text{II. 22})$$

Balance de agua: en este componente se considera que la fase gaseosa gana agua debido a la transferencia desde la fase sólida por la evaporación producida y al arrastre convectivo del aire no

saturado en contacto con la fase sólida. Se considera además la existencia de pérdida de agua en la fase debido al crecimiento del cuerpo fructífero. Se parte de la hipótesis de que no toda el agua contenida en esta parte del basidiomiceto es adquirida de la fase sólida de donde surge sino que, principalmente, la adquiere del propio aire por un mecanismo de absorción que se ve favorecido por su alta superficie específica, notable por la típica naturaleza esponjosa del cuerpo fructífero. Siendo así, éste será un término asociado al crecimiento (r_x) y será proporcional a la cantidad de agua que captura cada unidad de masa del cuerpo fructífero. En la literatura se reporta balance de agua para el proceso de fermentación en estado sólido (Mitchel y col., 2003), sin embargo la inclusión del término de absorción de agua por el cuerpo fructífero del hongo en el balance macroscópico no se conoce que haya sido reportado con anterioridad. Matemáticamente el balance queda:

$$\frac{d(Y_A \rho_A \phi_B V_B)}{dt} = f_A(Y_A^e - Y_A)\rho_A + k_A(Y_A^* - Y_A)V_B \phi_B \rho_A - 1 \times 10^{-3} k_{CF}(1 - Y_S)m_S r_x \quad (\text{II. 23})$$

El término de transferencia de masa de agua desde la fase sólida a la gaseosa puede ser estimado por la ecuación propuesta para procesos de fermentación en estado sólido (Panjabrao y col., 2007) o determinando un procedimiento de ajuste del modelo resultante a los datos dinámicos experimentales que se generan en este experimento. Igualmente, el término k_{CF} se estima por este procedimiento.

$$\frac{dY_A}{dt} = f_A \frac{(Y_A^e - Y_A)}{\phi_B V_B} + k_A(Y_A^* - Y_A) - 1 \times 10^{-3} \frac{k_{CF}(1 - Y_S)}{\rho_A \phi_B V_B} m_S r_x \quad (\text{II. 24})$$

La relación entre humedad absoluta, humedad relativa y temperatura se establece con las ecuaciones:

$$Y_A = 0,622 \left(\frac{Y_R p_v^*}{p - Y_R p_v^*} \right) \quad (\text{II. 25})$$

En esta expresión si se sustituye la humedad relativa (Y_R) igual a la unidad, se obtiene la humedad absoluta de saturación (Y_A^*). Para calcular la presión de saturación se empleará una ecuación del tipo Antoine, válida en el intervalo de 0 a 60 °C usada frecuentemente para procesos de fermentación en estado sólido (Isachenko y Osipova, 1977):

$$p_V^* = 1 \times 10^{-3} e^{\left(23,59 - \frac{4045}{(T_A + 273,15) - 37,7}\right)} \quad (\text{II. 26})$$

La densidad del aire húmedo fue calculada considerando la media ponderada de la densidad del aire seco (gas ideal) y la del vapor de agua a las mismas condiciones:

$$\rho_A = y_A \rho_W + (1 - y_A) \rho_{AS} \quad (\text{II. 27})$$

La fracción másica de agua en el aire se calcula con la humedad absoluta de éste en la forma siguiente:

$$y_A = \frac{Y_A}{(1 + Y_A)} \quad (\text{II. 28})$$

Si se considera al aire gas ideal, entonces:

$$\rho_{AS} = \frac{M_A P}{R(T_A + 273,15)} \quad (\text{II. 29})$$

Balance de masa en la fase sólida

Al ser esta fase discontinua, no estarán presentes los términos correspondientes a la entrada y salida por flujo. Los componentes considerados en esta fase serán: el contenido de fréjol, el contenido de biomasa de *P. ostreatus* y el contenido de agua. No obstante, el consumo de nitrógeno podrá ser estimado también como se hace con los demás.

Balance de masa del consumo del residuo de fréjol: el balance para el sustrato en estas condiciones se describe por una ecuación en la que el fréjol sólo se consume producto de la actividad del basidiomiceto:

$$\frac{d(Sm_S)}{dt} = -(r_S)m_S \quad (\text{II. 30})$$

$$-\frac{dS}{dt} = r_S \quad (\text{II. 31})$$

El término de velocidad de consumo del fréjol se calcula con la velocidad de crecimiento de la biomasa, teniendo en cuenta la relación estequiométrica establecida en el experimento 3:

$$(-r_S) = \alpha r_X \quad (\text{II. 32})$$

De aquí resulta que:

$$-\frac{ds}{dt} = \alpha r_x \quad (\text{II. 33})$$

Balance para la biomasa del hongo p producida: el balance de masa para la biomasa se describe mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{d(Xm_S)}{dt} = r_x m_S \quad (\text{II. 34})$$

Y así:

$$\frac{dX}{dt} = r_x \quad (\text{II. 35})$$

Siendo:

$$r_x = \mu_{(t)} X \quad (\text{II. 36})$$

El término $\mu_{(t)}$ será calculado con la ecuación cinética desarrollada en el experimento 5.

Balance de agua: en esta fase se considera la generación de agua producto de la actividad microbiana, la pérdida de agua producto de la evaporización convectiva, así como la absorción de agua por parte del cuerpo fructífero anteriormente explicada:

$$\frac{d(Y_S m_S)}{dt} = \frac{\epsilon r_x m_S (1 - Y_S) M_A}{M_X} 1 \times 10^{-3} - k_A (Y_A^* - Y_A) V_B \phi_B \rho_A + 1 \times 10^{-3} k_{CF} (1 - Y_S) m_S r_x \quad (\text{II. 37})$$

Arreglando:

$$\frac{dY_S}{dt} = 1 \times 10^{-3} \epsilon \frac{M_A}{M_X} (1 - Y_S) r_x - k_A (Y_A^* - Y_A) \frac{V_B}{m_S} \phi_B \rho_A + 1 \times 10^{-3} k_{CF} (1 - Y_S) r_x \quad (\text{II. 38})$$

Balance de energía en el biorreactor

$$\left[\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{de Acumulación} \\ \text{de energía} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Entrada} \\ \text{por flujo} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Salida} \\ \text{por flujo} \end{array} \right] \mp \left[\begin{array}{c} \text{Generación} \\ \text{o consumo} \\ \text{por reacción} \end{array} \right] \mp \left[\begin{array}{c} \text{Salida o} \\ \text{entrada por} \\ \text{la interfase} \end{array} \right]$$

Balance de energía en la fase gaseosa

En este caso se consideran los términos asociados a la entrada y salida por flujo, el calor transferido por convección desde la fase sólida debido al calentamiento de ésta por el calor metabólico liberado por el microorganismo y, adicionalmente, la energía que llega y sale de la fase con el agua transferida por vaporización en la fase sólida o transferida a ésta por la absorción en el cuerpo fructífero:

$$\frac{d(m_A C_{pA} T_A)}{dt} = \rho_A f_A C_{pA} T_A^e - \rho_A f_A C_{pA} T_A + h_{GS} a_S (T_S - T_A) m_S + \lambda_V k_A (Y_A^* - Y_A) V_B \phi_B \rho_A - 1 \times 10^{-3} C_{pA} T_A k_{CF} m_S (1 - Y_S) r_x \quad (\text{II. 39})$$

$$\frac{dT_A}{dt} = \frac{\rho_A f_A}{m_A} (T_A^e - T_A) + h_{GS} a_S (T_S - T_A) \frac{m_S}{m_A C_{pA}} + \lambda_V k_A (Y_A^* - Y_A) \frac{V_B \phi_B \rho_A}{m_A C_{pA}} - 1 \times 10^{-3} \frac{T_A}{m_A} k_{CF} m_S (1 - Y_S) r_x \quad (\text{II. 40})$$

La masa de aire presente dentro del reactor se calcula con el volumen de éste, su densidad y la porosidad del biorreactor:

$$m_A = V_B \rho_A \phi_B \quad (\text{II. 41})$$

Teniendo en cuenta la ecuación (II.32) y la ecuación (II.33)

$$\frac{dT_A}{dt} = \frac{f_A}{V_B \phi_B} (T_A^e - T_A) + h_{GS} a_S (T_S - T_A) \frac{m_S}{V_B \rho_A \phi_B C_{pA}} + \frac{\lambda_V k_A}{C_{pA}} (Y_A^* - Y_A) - 1 \times 10^{-3} \frac{T_A}{V_B \rho_A \phi_B} k_{CF} m_S (1 - Y_S) r_x \quad (\text{II. 42})$$

La capacidad calorífica del aire húmedo fue calculada considerando la media ponderada de la densidad del aire seco (gas ideal) y la del vapor de agua a las mismas condiciones:

$$C_{pA} = y_A C_{pW} + (1 - y_A) C_{pAS} \quad (\text{II. 43})$$

Balance de energía en la fase sólida

En esta fase actúan diferentes procesos que agregan o extraen energía: el calor metabólico, la pérdida convectiva de calor sensible y producto de la vaporización de la humedad del sólido, así como la

energía que es absorbida con el agua durante el crecimiento del cuerpo fructífero. De esta manera, el modelo queda así:

$$\frac{d(m_s c_{ps} T_s)}{dt} = \frac{(-\Delta H_r)}{M_X} m_s (1 - Y_s) r_x - h_{GS} a_s m_s (T_s - T_A) - k_A \lambda_V (Y_A^* - Y_A) V_B \phi_B \rho_A + 1 \times 10^{-3} k_{CF} (1 - Y_s) m_s C_{pW} T_A r_x \quad (\text{II. 44})$$

Arreglando resulta:

$$\frac{dT_s}{dt} = \frac{(-\Delta H_r)}{M_X} \frac{(1 - Y_s)}{c_{ps}} r_x - h_{GS} a_s \frac{(T_s - T_A)}{c_{ps}} - k_A \lambda_V (Y_A^* - Y_A) \frac{V_B \phi_B \rho_A}{m_s c_{ps}} + 1 \times 10^{-3} k_{CF} (1 - Y_s) \frac{C_{pW} T_A}{c_{ps}} r_x \quad (\text{II. 45})$$

La capacidad calorífica del sólido húmedo fue estimada considerando la media ponderada de la capacidad calorífica del medio seco (Isachenko y Osipova, 1977; Ramos, 2000; Saucedo, 1990) y la del agua a las mismas condiciones:

$$C_{pA} = y_A C_{pW} + (1 - y_A) C_{pAS} \quad (\text{II. 46})$$

ANEXOS CAPÍTULO 3

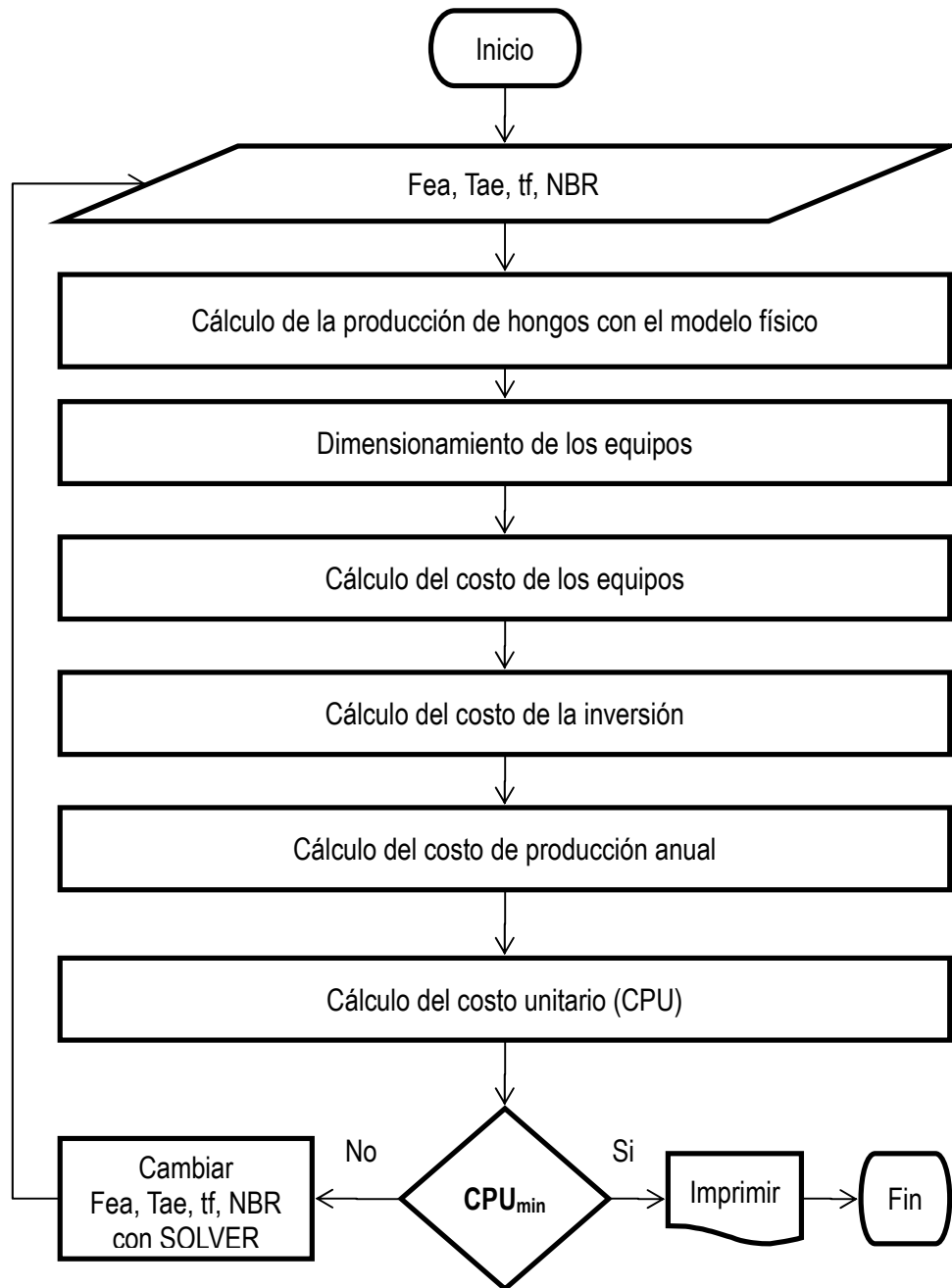


Figura III.1 Diagrama heurístico para la optimización en base CPU_{min}

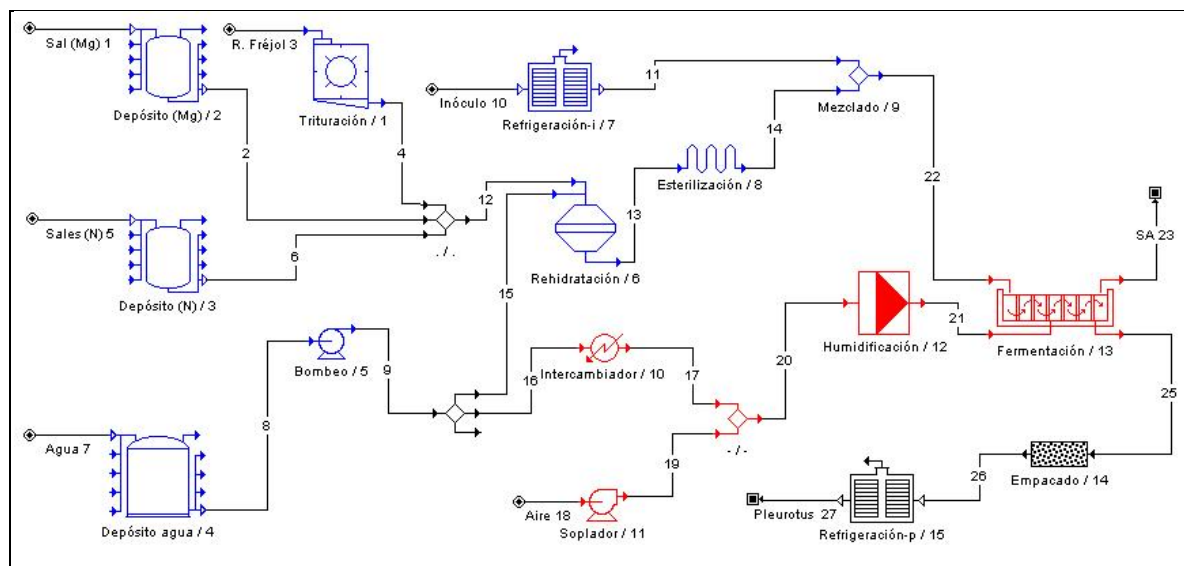


Figura III.2 Diagrama de flujo para la producción de *Pleurotus ostreatus* por FES

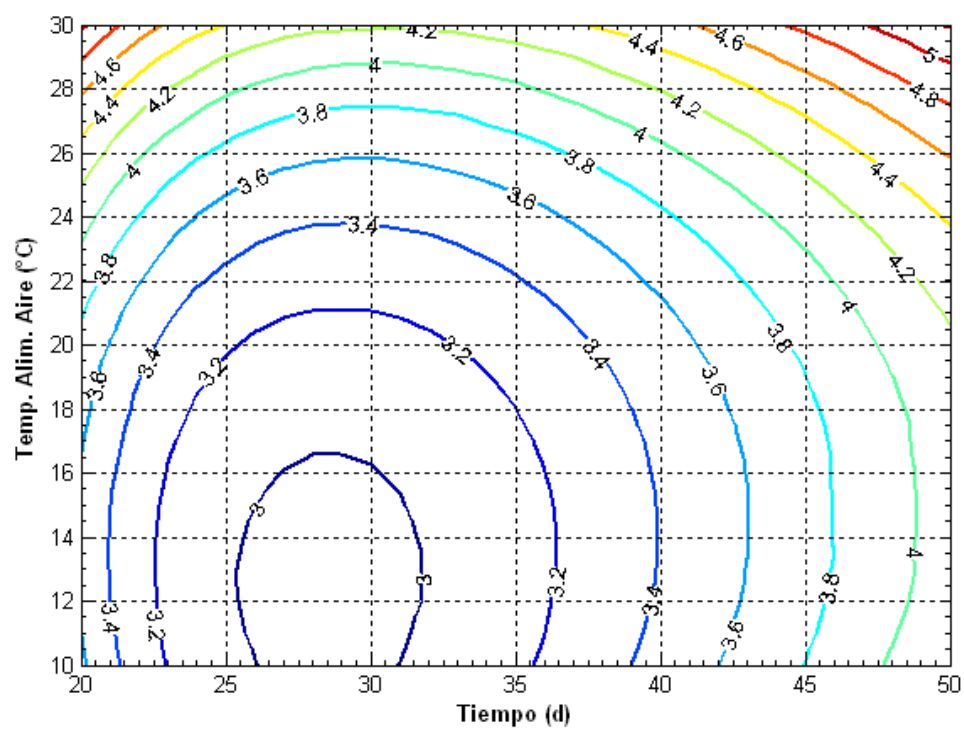


Figura III.3 Diagrama de contorno que ilustra la zona del óptimo de la productividad

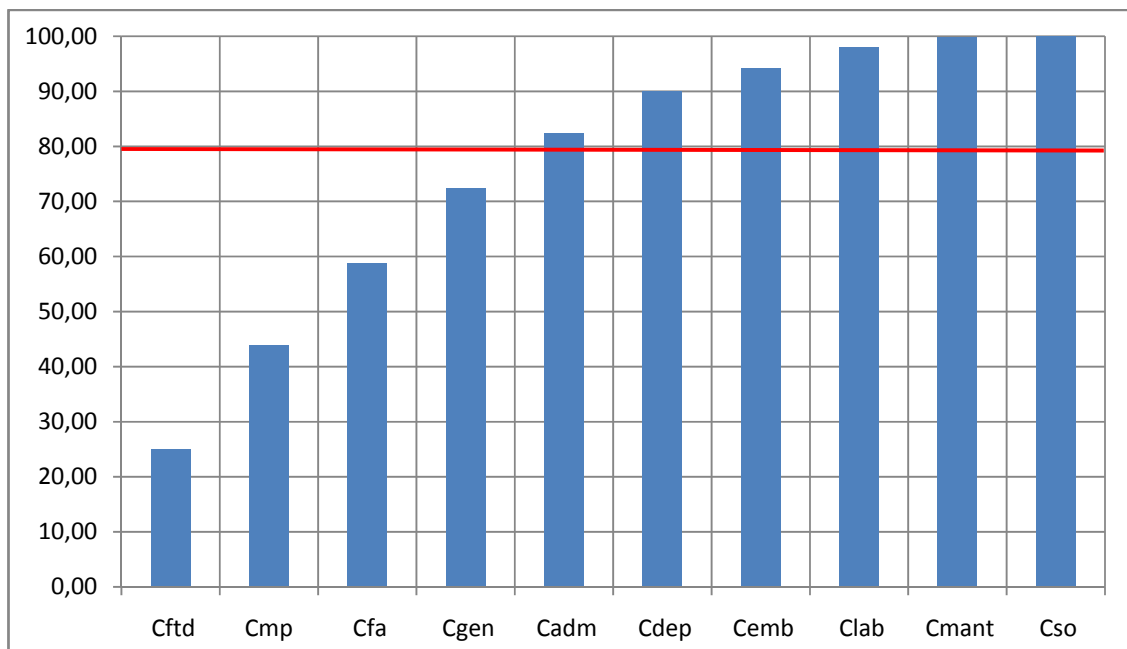


Figura III.4 Diagrama de Pareto para los elementos del costo de producción

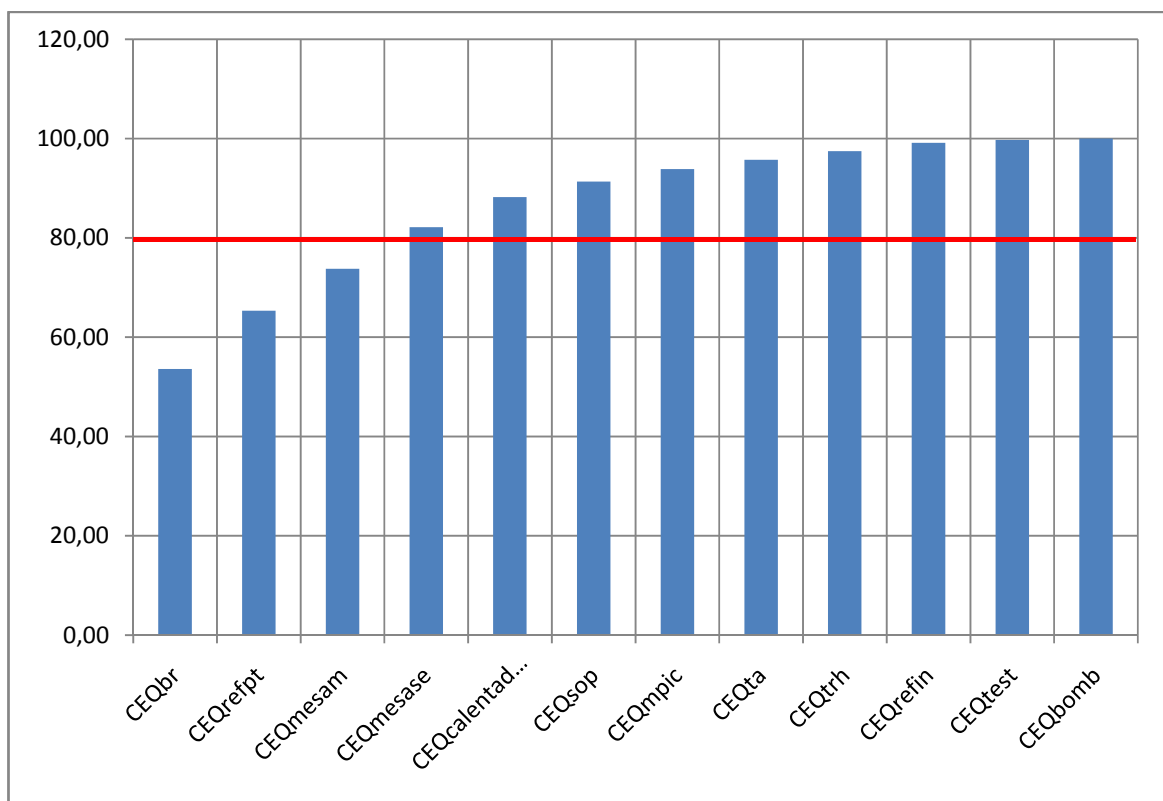


Figura III.5 Diagrama de Pareto para los costos de equipamiento

Tabla III.1 Componentes del costo de producción

Elementos del costo de producción	Valor (\$/año) %	
Costo de la materia prima (Cmp)	5845,9	12,3
Costo de facilidades auxiliares (Cfa)	4656,0	9,8
Costo de Fuerza de trabajo directa (Cfd)	15587,00	32,7
Costo de laboratorios (Clab)	2338,0	4,9
Costo de embalaje (Cemb)	1267,0	2,7
Costo de depreciación (Cdep)	2771,7	5,8
Costo de mantenimiento (Cmant)	692,9	1,5
Costo de suministros de operación (Cso)	69,3	0,1
Costos generales (Cgen)	8139,7	17,1
Costos de administración (Cadm)	6234,6	13,1
Costo de producción anual (Cpa)	47602,1	100,0

Tabla III.2 Costo de adquisición del equipamiento tecnológico actualizado al año 2012

Código	Equipos	Cantidad	Costo (\$)	%
7	Cámara de refrigeración inóculo (CEQrefin)	1	721,76	2,90
1	Máquina picadora (CEQmpic)	1	1 082,64	4,35
4	Tanque de agua (CEQta)	1	532,08	2,14
6	Tanque de rehidratación (CEQtrh)	1	479,41	1,93
8	Tanque de esterilización) CEQtest	1	163,32	0,66
9	Mesa de mezclado micelio (CEQmesam)	1	2 390,84	9,61
10	Intercambiador de calor (CEQcalentador)	1	1 707,15	6,86
11	Soplador centrífugo (CEQsop)	1	892,51	3,59
5	Bomba centrífuga (CEQbomb)	1	78,22	0,31
13	Biorreactor (CCEQbr)	5	2 309,63	46,43
14	Mesa de selección y empaque (CEQmesase)	1	2 390,84	9,61
15	Cámara de refrigeración producto terminado (CEQrefpt)	1	2 887,05	11,61
Total			24 874,00	100,00

Tabla III.3 Resumen del costo de inversión

No. Componentes		% Equipamiento tecnológico	Inversión (\$)
A I	Inversión directa	-	31 980,93
1	Equipamiento tecnológico (actualizado)	100,00	24 874,00
2	Instalación y montaje	39,00	2 842,80
4	Instrumentación y controles	13,00	1 066,00
5	Sistema de tuberías	31,00	710,69
6	Sistema eléctrico	10,00	1 421,40
7	Edificaciones	29,00	710,69
8	Obras inducidas	10,00	0,00
9	Facilidades de servicios	55,00	355,35
10	Terrenos	0,00	0,00
B I	Inversión indirecta		35 43,57
11	Ingeniería y supervisión	32,00	167,67
12	Gastos de construcción	34,00	2 842,88
13	Contratista	18,00	355,35
14	Imprevistos	6,00	177,67
C	Inversión fija (A+B)	-	35 524,50
D	Capital de trabajo (2 meses)	7 933,69	7 933,69
	Capital total de inversión (C+D)	-	43 458,19

Tabla III.4 Ficha de evaluación ambiental aplicada al proyecto de producción de *Pleurotus*

Detalles Pun	taje Normativa
Tipo de actividad (agroindustrial)	4
Contaminación al aire	
Fuente principal de energía (electricidad)	2
Ruido dentro de área del proyecto (bajo)	2
Contaminación al agua	
Aguas de desecho (detergentes + materia orgánica)	9
Destino de las aguas de desecho (alcantarillado)	4
Desechos sólidos	
Desechos sólidos generados (orgánicos)	5
Destino de los desechos sólidos (reciclados)	1
Salud y seguridad laboral	
Agroquímico (etiqueta azul)	6
Medidas de protección laboral	2
Puntaje total	35
Porcentaje (%)	38,9
Categoría II	

Anexo III.1 Modelo para la estimación de los costos

Modelo para la estimación del costo del equipamiento tecnológico: las ecuaciones del costo de adquisición de los equipos se determinaron aplicando la metodología de la relación logarítmica conocida como el factor 0,6 (Peters y Timmerhaus, 1991). La estimación del costo del equipamiento se fundamenta en la ecuación (III.1) y (III.2).

$$C_{AET} = \sum_{n=1}^{n=i} C_{AEi} \quad (III. 1)$$

$$C_{AET} = CEQ_{refin} + CEQ_{mpic} + CEQ_{ta} + CEQ_{trh} + CEQ_{test} + CEQ_{mesam} + CEQ_{enfr} + CEQ_{sop} + CEQ_{bomb} + CEQ_{mesae} + CEQ_{refpt} \quad (III. 2)$$

A continuación se desarrollan las ecuaciones de los equipos por área de trabajo:

Área de preparación

Cámara de refrigeración para el inóculo (7): la planta de producción requiere tener un suministro constante de inóculo para cada ciclo de producción. En la práctica se debe refrigerar el inóculo a 4 °C y para ello se dispone de una nevera con capacidad de 226, 53 L, la cual tiene un precio en el mercado de 400 dólares. La densidad aparente del inóculo medida directamente por el método volumétrico es de 800 kg/m³, el costo se estimó según la ecuación (III.3), (III.4) y (III.5).

$$CEQ_{refin} = N_{nev} p_{nev} \quad (III.3)$$

$$N_{nev} = \left(\frac{V_{ain}}{I_{cnev}} \right) \quad (III. 4)$$

$$V_{ain} = \frac{M_{in}}{\rho_{in}} \quad (III. 5)$$

Máquina picadora (1): la planta requiere de una máquina picadora de residuos de fréjol, una máquina de 800 kg/h, en el mercado tiene un costo de 600 dólares. El costo de adquisición de la máquina picadora está en función de su capacidad y se calcula por las ecuaciones (III.6) y (III.7).

$$CEQ_{mpic} = N_{pic} p_{pic} \quad (III. 6)$$

$$N_{pic} = \frac{M_{rf}}{t_{mol}Ic_{pic}} \quad (III. 7)$$

Tanque de depósito de agua (4): el costo del tanque de depósito de agua se calculó con el volumen de agua y el tiempo de retención de la misma para un día de producción, con un sobre diseño del 25 %. El precio de un tanque de plástico de 1000 L es de 120 dólares. Se calcula por las ecuaciones (III.8) y (III.9).

$$CEQ_{ta} = 120 \left(\frac{1,25 V_{tad}}{1000} \right)^{0,6} \quad (III. 8)$$

$$V_{tad} = Ic_a \left(\frac{MP}{N_c} \right) \quad (III. 9)$$

Tanque de rehidratación (6): para la rehidratación de la materia prima se seleccionó un tanque de plástico. El volumen de este tanque se calculó para un ciclo de producción. El precio de venta de este tanque de 1000 L de capacidad es de 120 dólares. Su costo se calculó por las ecuaciones (III.10) y (III.11).

$$CEQ_{trh} = 120 \left(\frac{1,25 V_{trh}}{1000} \right)^{0,6} \quad (III. 10)$$

$$V_{trh} = \left(\frac{MP}{N_c \rho_{mp}} \right) \quad (III. 11)$$

Tanque esterilizador (8): para la pasteurización del sustrato se seleccionó un tanque de acero al carbono. El volumen de este tanque se calculó para un ciclo de producción. El precio de venta en el mercado de un tanque de hierro de 200 L de capacidad es de 15 dólares. Su costo se calculó por la ecuación (III.12).

$$CEQ_{test} = 15 \left(\frac{1,25 V_{trh}}{0,2} \right)^{0,6} \quad (III. 12)$$

Mesa de mezclado sustrato e inóculo (9): se seleccionó una mesa de acero inoxidable AISI-304, para mezclado manual de sustrato e inóculo, su costo está en función del área, su costo de adquisición se

calculó por las ecuaciones III.13 y III.14. En la ecuación se introduce el valor conocido de 450 dólares, para una mesa de 2,64 m² (Tacuri, 2013).

$$CEQ_{mesam} = 450 \left(\frac{A_{mesa}}{2,645} \right)^{0,6} \quad (\text{III. 13})$$

$$A_{mesa} = \left(\frac{MP}{\rho_m 200 N_c} \right) \quad (\text{III. 14})$$

Área de transformación

Calentador de agua (10): se utilizó un calentador tipo calefón para calentar la corriente de agua que es nebulizada antes de humidificar el aire que entra al biorreactor. Su costo se calcula por las ecuaciones (III.15) y (III.16), conociendo que un calefón con capacidad de 18 litros/min tiene un precio de 170 dólares (Tacuri, 2013).

$$CEQ_{enfriador} = 170 \left(\frac{V_{ahar}}{18} \right)^{0,6} \quad (\text{III. 15})$$

$$V_{ahar} = \left(\frac{MP}{\rho_m 200 N_c} \right) \quad (\text{III. 16})$$

Soplador de aire (11): se hizo necesario un soplador centrífugo para impulsar el ingreso de aire al biorreactor. El costo de un soplador centrífugo de 6,35 cm de diámetro es de 180 dólares. Su costo se calculó por las ecuaciones (III.17) y (III.18).

$$CEQ_{sop} = 180 \left(\frac{f_{sdt} f_a}{96} \right)^{0,6} \quad (\text{III. 17})$$

$$f_a = \left(\frac{MP}{\rho_a 200 N_c} \right) \quad (\text{III. 18})$$

Bomba centrífuga (5): el costo de adquisición de la bomba se determinó a partir de las ecuaciones 3.19 y 3.20. El costo de una bomba de 3600 l/h tiene un precio de 40 dólares.

$$CEQ_{bomb} = 40 \left(\frac{f_{sdt} F_{bagua}}{3600} \right)^{0,6} \quad (\text{III. 19})$$

$$F_{bagua} = \left(\frac{V_{tad}}{t_{ll}} \right) \quad (\text{III. 20})$$

Biorreactor (13): el biorreactor con una capacidad total de 6,88 m³ construido en acero inoxidable AISI-304, se compone de 16 módulos de biorreactores, cada uno de una capacidad de 0,430 m³ y un costo de 800 dólares. Su costo se calculó por la ecuación III.21.

$$CEQ_{br} = N_{br} N_m CEQ_{mbr} \quad (\text{III. 21})$$

Área de separación

Mesa de empaque (14): el costo de adquisición de la mesa de selección y empaque se calculó aplicando la misma metodología de la mesa de mezclado del inóculo con el sustrato.

Cámara de refrigeración de *Pleurotus* (15): el *P. ostreatus* es un producto perecedero con un tiempo de vida útil de 8 días, la tecnología requiere de una cámara de refrigeración de producto final que opere a 4 °C, con la finalidad de mantener fresco el producto hasta su comercialización. El precio de cámara de refrigeración es de 1,76 \$/L. El costo de la cámara de refrigeración se calcula en función de la capacidad de producción del *Pleurotus*, por la ecuación III.22 y III.23.

$$CEQ_{refpt} = N_{nevpt} p_{nev} \quad (\text{III. 22})$$

$$N_{nevpt} = \left(\frac{V_{acf}}{I_{cne}} \right) \quad (\text{III. 23})$$

Modelo para la estimación de la inversión: la estimación del costo de la inversión se realizó aplicando el Método C “Porcentaje del costo del equipamiento requerido”, propuesto por Peters y Timmerhaus (1999). Se utilizaron los porcentajes propuestos para el cálculo de la inversión de una planta de Bagames (Julián, 2008). Este costo se estimó por la ecuación (III.24).

$$C_I = C_{AET} + \sum_{n=1}^{n=i} C_{Iei} \quad (\text{III. 24})$$

Modelo para la estimación del costo de producción anual y de costo unitario: el costo de producción se estimó por la metodología desarrollada por Peters (1991), la cual establece indicadores que relacionan los distintos componentes del costo. El costo de producción se calcula con la ecuación (III.25) y (III.26).

$$CP = \sum_i Ci \quad (\text{III. 25})$$

Donde:

$$\sum_i Ci = C_{mp} + C_{fa} + C_{ftd} + C_{lab} + C_{emb} + C_d + C_{mant} + C_{so} + C_{gen} + C_{adm} \quad (\text{III. 26})$$

El costo unitario se calcula por la relación entre el costo producción y la producción anual de producto final, ecuación (III.27).

$$CPU = \frac{CP}{PA} \quad (\text{III. 27})$$

A continuación se establecen las ecuaciones para el costo de producción:

Costo de las materias primas: las materias primas utilizadas en la producción de *P. ost reatus*, incluyen el residuo del fréjol, la sal de sulfato de amonio, la sal de sulfato de magnesio, el agua de rehidratación, el inóculo y el sustrato agotado. El sustrato agotado es un subproducto del proceso de producción, por lo que no se toma en cuenta en el cálculo del costo ya que su precio es cero. El costo de las materias primas se calcula por las ecuaciones de la (III.28) a la (III.33). Se tomaron en cuenta los siguientes precios de las materias primas: residuos del fréjol, 100 \$/t; sulfato de amonio, 420 \$/t; sulfato de magnesio, 320 \$/t; inóculo, 5 000 \$/t y agua, 0,2 \$/m³.

$$C_{mp} = (C_{rf} + C_n + C_{mg} + C_a + C_{sa} + C_{in}) \times N_c \quad ((\text{III. 28})$$

$$C_{rf} = (mp_t I_{c_{rf}} p_{rf}) \quad (\text{III. 29})$$

$$C_n = (mp_t I_{c_n} p_n) \quad (\text{III. 30})$$

$$C_{mg} = (mp_t I_{c_{mg}} p_{mg}) \quad (\text{III. 31})$$

$$C_a = (mp_t I_{c_a} p_a) \quad (\text{III. 32})$$

$$C_{in} = (mp_t I_{c_{in}} p_{in}) \quad (\text{III. 33})$$

Costo de facilidades auxiliares: se incluye el consumo del agua y de la energía eléctrica. El costo se estimó a través de la ecuaciones de la (III.34) a la (III.51).

$$C_{fa} = C_a + C_e \quad (\text{III. 34})$$

$$C_a = C_{aest} + C_{ahar} + C_{alimp} \quad (\text{III. 35})$$

$$C_{aest} = V_{aest} N_c p_a \quad (\text{III. 36})$$

$$V_{aest} = 0,024 \rho_{am} m p_t \quad (\text{III. 37})$$

$$C_{ahar} = V_{ahar} N_c p_a \quad (\text{III. 38})$$

$$V_{ahar} = 24 f_a \rho_a (x_{wae} - x_{waa}) t_f \quad (\text{III. 39})$$

$$C_{alimp} = V_{alimp} N_c p_a \quad (\text{III. 40})$$

$$V_{alimp} = \rho_{am} m p_t) \quad (\text{III. 41})$$

$$C_e = C_{etrit} + C_{esop} + C_{ereft} + C_{erefin} + C_{eest} \quad (\text{III. 42})$$

La potencia consumida por la trituradora es igual a 3,72 kW (kJ/s) y su capacidad de trituración es igual a 0,4166 kg/s. El consumo de potencia y la capacidad de trituración de la máquina Penagos-p800 para materiales sólidos como el fréjol, están disponibles por el fabricante y permite calcular su índice de consumo que es igual a 8,9472 kJ/kg. Con este dato y el flujo de consumo de fréjol se estima el consumo de potencia, suponiendo que éste es proporcional al flujo, tal como se sugiere para cálculos rápidos (Rosabal y Valle, 2006).

$$C_{etrit} = 8,9472 M_{rf} f_{acenerg} p_e N_c \quad (\text{III. 43})$$

La presión de salida del soplador es la típica para vencer las pérdidas de contrapresión debido a la fricción, igual a 0,121 MPa (Rosabal y Valle, 2006). Se considera una eficiencia del soplador igual a 74 % que es típica para sopladores centrífugos (Shames, 1995).

$$C_{esop} = 24 P_{cmotorsop} t_f p_e N_c \quad (\text{III. 44})$$

$$P_{cmotorsop} = \frac{f_a \rho_a m_{ws}}{3600} \quad (\text{III. 45})$$

$$m_{ws} = \frac{R(T_{ae} + 273,15) \log \left(\frac{P_2}{P_1} \right)}{E_{fsop} M_a} \quad (\text{III. 46})$$

El índice de consumo de refrigeración es igual a 1412,8 kW-h/m³

$$C_{erefpt} = P_{consrefpt} p_e \quad (\text{III. 47})$$

$$P_{consrefpt} = \frac{I_{cref} P_{hfa}}{870} \quad (\text{III. 48})$$

$$C_{erefin} = P_{conrefin} p_e N_c \quad (\text{III. 49})$$

$$P_{conrefin} = \frac{I_{cref} M_{in}}{\rho_{in}} \quad (\text{III. 50})$$

$$C_{eest} = 2500 \frac{m_s p_e}{\rho_s} \quad (\text{III. 51})$$

Costo de la fuerza de trabajo directa: se estimó a partir del salario básico de 5 195,52 \$/año, establecido por el Gobierno ecuatoriano, a través de la ecuación (III.52), que incluye salario más el seguro, décimo cuarto, décimo tercero y fondo de reserva.

$$C_{ftd} = 5195,52 N_t \quad (\text{III. 52})$$

Costo de laboratorios: incluye los gastos de los análisis de laboratorio requeridos para el control de la calidad de la producción y en general, para el control del proceso. Se determinó como el 15 % de la fuerza de trabajo directa, a través de la ecuación (III.53).

$$C_{lab} = 0,15 C_{ftd} \quad (\text{III. 53})$$

Costos de embalaje: incluyen los costos de bandejas, película plástica y etiqueta, se estimó por las ecuaciones de la (III.54) a la (III.57).

$$C_{emb} = C_{bandeja} + C_{vitafilm} + C_{etiqueta} \quad (\text{III. 54})$$

$$C_{bandeja} = \frac{p_{band} P_{hfa}}{I_{cband}} \quad (\text{III. 55})$$

$$C_{vf} = \frac{p_{vf} P_{hfa} I_{cvf}}{I_{cband}} \quad (\text{III. 56})$$

$$C_{etiq} = \frac{p_{etiq} P_{hfa} I_{ceti}}{I_{cband}} \quad (\text{III. 57})$$

Costos de depreciación: se estima a partir del valor económico inicial de la planta y del tiempo de vida útil de 10 años, ecuaciones (III.58) y (III.59)

$$C_d = \frac{V_{ei}}{t_{vu}} \quad (\text{III. 58})$$

$$V_{ei} = c_{EQ} + C_{instal} \quad (\text{III. 59})$$

Costo de mantenimiento y reparación: se estima, como planta de bajo nivel de severidad promedio, ecuación (III.60).

$$C_{mant} = 0,025V_{ei} \quad (\text{III. 60})$$

Costo de suministros de operación: se incluyen los lubricantes, grasas, etc. empleados en la operación de la planta. Se calculó como el 10 % del costo total de mantenimiento y reparación, ecuación (III.61).

$$C_{so} = 0,10C_{mant} \quad (\text{III. 61})$$

Costos generales: están constituidos por el salario del personal técnico que no trabaja directamente en la producción, los servicios médicos, los gastos de seguridad y protección, comedores, facilidades recreativas, mantenimiento de edificios, el costo de electricidad en edificios y otros gastos no asociados con la producción. Se calcularon como el 50 % de la suma de los gastos en la fuerza de trabajo directa y el mantenimiento, ecuación III.62.

$$C_{gen} = 0,5(C_{ftd} + C_{mant}) \quad (\text{III. 62})$$

Costos de administración: se incluyó el salario de los directivos y personal administrativo, gastos de control interno, costo de materiales de oficina, cuestiones jurídico-legales y las comunicaciones. Se calculó como el 40 % del costo de la fuerza de trabajo directa, ecuación III.63.

$$C_{adm} = 0,4C_{ftd} \quad (\text{III. 63})$$

NOMENCLATURA

Nomenclatura capítulo 1

r_Q	Calor metabólico	J/h
Y_{Qx}	Rendimiento del calor desde la reacción de crecimiento	J/ kg MSH
m_{QX}	Coeficiente asociado a la producción de calor	J /(kg MSH.h)
r_o	Captación del oxígeno	mol-O ₂ / h
Y_{xo}	Rendimiento de biomasa desde el O ₂	kg MSH/ mol-O ₂
r_c	Velocidad de evolución del dióxido de carbono	mol-CO ₂ /h
Y_{cx}	Rendimiento de CO ₂ desde la biomasa	mol-CO ₂ / kg MSH
m_{cX}	Coeficiente de mantenimiento para el CO ₂	mol-CO ₂ /(kg MSH.h)

Nomenclatura capítulo 1

ceba-gliie-po-010105	Cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	-
ceba-gliie-po-010106	Cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	-
H_0	Hipótesis nula	-
H_A	Hipótesis alternativa	-
μ_{cepa1}	Media cepa 1	-
μ_{cepa2}	Media cepa 2	-
LSD	Diferencia mínima significativa (siglas en inglés)	-
r_x	Velocidad de crecimiento	mm /h

Nomenclatura capítulo 2

BC	Bioconversión	g MSH _F /kg MSS _O
PEB	Productividad de la biomasa	g MSH _F / kg MSS _O .día
CUB	Costo unitario de la biomasa	\$ /gMSH _F
MSH _F	Materia seca del hongo final	g

MSS ₀	Materia seca del sustrato inicial	kg
Nomen	clatura experimento 3	
MSH	Materia seca del hongo	g
H _M	Humedad del medio	%
N	Nitrógeno	% BS
Mg	Magnesio	% BS
SA	Sustrato agotado	% BS
TR	Tipo de residuo	-
TP	Tamaño de partícula	mm
T	Temperatura	°C
H _R	Humedad Relativa	%
RF	Residuos de fréjol	-
MHH	Materia húmeda del hongo	kg
MSS	Materia seca del sustrato	kg
I	Inóculo	-

Nomen	clatura experimento 4	
α	Coeficiente estequiométrico del residuo	mol MSS/mol MSH
β	Coeficiente estequiométrico del amoníaco	mol NH ₃ /mol MSH
γ	Coeficiente estequiométrico del oxígeno	mol O ₂ /mol MSH
δ	Coeficiente estequiométrico del dióxido de carbono	mol CO ₂ /mol MSH
ε	Coeficiente estequiométrico del agua	Mol H ₂ O/mol MSH
ξ	Contenido de hidrógeno en la molécula	mol H/átomo g-C
Υ	Contenido de oxígeno en la molécula	mol O/átomo g-C
\Zeta	Contenido de nitrógeno en la molécula	mol N/átomo g-C

C	Carbono	-
H	Hidrógeno	-
O	Oxígeno	-
N	Nitrógeno	-
S	Azufre	-
λ	Grado de reducción de las especies involucradas	# electrones/mol
λ_{FF}	Grado de reducción del residuo de fréjol fresco	# electrones/mol
λ_{XV}	Grado de reducción de la biomasa del hongo	# electrones/mol
BC	Bioconversión	g MSH/ kg MSS
MM_{XV}	Masa molecular de la biomasa libre de cenizas	g /mol
A_{FF}	Ceniza del residuo del fréjol fresco	g /mol
MM_{FF}	Masa molecular del residuo de fréjol libre de cenizas	g /mol
A_{XV}	Ceniza de la biomasa	g /mol
q_{Aire}	Consumo específico volumétrico de aire	m ³ /kg MSH
MM_{O_2}	Masa molecular del oxígeno	g /mol
y_{O_2}	Fracción de oxígeno en el aire	mol O ₂ /mol total
ρ_{Air}	Densidad del aire	Kg/ m ³
CR	Coeficiente de respiración	mol CO ₂ /molO ₂
$-\Delta H_m$	Calor metabólico	kJ /kg MSH
Nomenclatura experimento 5		
t_F	Tiempo de fermentación	días
r_{Xv}	Velocidad de síntesis de biomasa del cuerpo fructífero	g MSH/kg MSS
μ_{max}	Velocidad específica de crecimiento	día
X_v	Concentración de biomasa del cuerpo fructífero	g MSH/ kg MSS

X_{\max}	Concentración máxima de biomasa del cuerpo fructífero	g MSH/ kg MSS
Nomen	clatura experimento 6	
V_b	Volumen del biorreactor	m^3
h_b	Altura del biorreactor	m
l_b	Largo del biorreactor	m
a_b	Ancho del biorreactor	m
a_b/h_b	Relación ancho del biorreactor/altura del biorreactor	-
l_b/h_b	Relación largo del biorreactor/altura del biorreactor	-
A_b	Área del biorreactor	m^2
a_{lb}	Área libre del biorreactor	m^2
a_{ub}	Área útil del biorreactor	m^2
a_{ub}/a_b	Relación área útil del biorreactor/área del biorreactor	-
a_{obc}	Área ocupada por la biocelda	m^2
N_{bc}	Número de bioceldas	-
$cb-MH$	Capacidad del biorreactor materia húmeda	kg
$cb-MS$	Capacidad del biorreactor materia seca	kg
d_{bc}	Diámetro de la biocelda	m
a_{bc}	Altura de la biocelda	m
a_{bc}/h_b	Relación altura de la biocelda/altura del biorreactor	-
A_{bc}	Área de la biocelda	m^2
V_{bc}	Volumen de la biocelda	L
c_{bc-MH}	Capacidad de la biocelda materia húmeda	kg
c_{bc-MS}	Capacidad de la biocelda materia seca	kg
D_s	Densidad del sustrato	kg/ m^3
H_M	Humedad del medio	%

MSS	Materia seca del sustrato	%
De	Densidad de empaque	kg MSS/ m ³
Dbc	Distribución de bioceldas	-
α	Nivel de significancia	%
Nomen	clatura experimento 7	
\emptyset_B	Porosidad del biorreactor	m ³ aire /m ³ biorreactor
V _B	Volumen del biorreactor	m ³
C _{CO2}	Concentración de dióxido de carbono	mol CO ₂ /m ³ aire
f _A	Flujo de aire	m ³ aire/ h
C _{CO2} ^e	Concentración de dióxido de carbono a la entrada	mol CO ₂ /m ³ aire
k _{CO2}	Constante de difusividad del dióxido de carbono	1/h
C _{CO2} [*]	Concentración de dióxido de carbono en la saturación	mol CO ₂ /m ³ aire
δ	Coefficiente estequiométrico de la generación de CO ₂	mol CO ₂ /mol MSH
r _x	Velocidad específica de crecimiento de la biomasa	g MSB /h. kg MSS
m _S	Masa de sustrato húmedo	kg MHS
Y _S	Humedad del sustrato	kg de agua/kg MSS
M _X	Masa molecular	mol MSH/ g MSH
n _{BC}	Número de bioceldas	-
m _{BC}	Masa materia seca de sustrato de la biocelda	kg MSS
ρ_{EB}	Densidad de empaque del biorreactor	kg MSS/m ³ biorreactor
V _{HC}	Volumen hueco de la biocelda	m ³
ρ_S	Densidad del sólido húmedo	kg MHS /m ³ biocelda
V _{SC}	Volumen sólido de la biocelda	m ³
V _S	Volumen sólido del biorreactor	m ³

ϕ_s	Porosidad del sólido	$\text{m}^3\text{aire} / \text{m}^3\text{biocelda}$
V_{HC}	Volumen hueco de la biocelda	m^3
V_{TC}	Volumen total de una biocelda	m^3
V_{HC}	Volumen interno de la biocelda	m^3
V_{SC}	Volumen de las paredes de la biocelda	m^3
ϕ_{HB}	Fracción hueca del biorreactor	-
C_{O_2}	Concentración de oxígeno	$\text{mol O}_2 / \text{m}^3 \text{aire}$
$C_{O_2}^e$	Concentración de oxígeno a la entrada	$\text{mol O}_2 / \text{m}^3 \text{aire}$
γ	Coefficiente estequiométrico del oxígeno	$\text{mol O}_2 / \text{mol MSH}$
Y_A	Humedad del aire	$\text{kg de agua} / \text{kg de aire seco}$
Y_A^e	Humedad del aire a la entrada	$\text{kg de agua} / \text{kg de aire seco}$
M_A	Masa molecular del aire	$\text{kg de aire} / \text{kmol de aire}$
Y_A^*	Humedad saturación del aire	$\text{kg de agua} / \text{kg de aire seco}$
ρ_A	Densidad del aire seco	$\text{kg aire seco} / \text{m}^3 \text{aire seco}$
k_A	Coefficiente de TM de agua de la fase sólida a la fase gaseosa	$1/\text{h}$
S_{mS}	Masa del sustrato sólido	g MSS
$-r_s$	Velocidad de consumo de sustrato	$\text{g MSS} / (\text{h} \cdot \text{kg MSH})$
$\frac{dS}{dt}$	Velocidad de acumulación de sustrato	g MSS/h

X	Concentración de biomasa de hongos	g MSH /kg MSS
$\frac{dX}{dt}$	Velocidad de acumulación de la biomasa del hongo	g MSH/h
$\mu_{(t)}$	Velocidad específica de crecimiento celular	1/h
Y_S	Humedad del sólido	kg de agua/ kg MSS
k_{CF}	Constante de transferencia de masa para el agua	g H ₂ O/g MSH
$\frac{dY_S}{dt}$	Velocidad de acumulación del agua	g H ₂ O/h
m_A	Masa del aire	kg de aire
C_{pA}	Capacidad calorífica del aire	J/kg/K
T_A	Temperatura del aire	°C
T_A^e	Temperatura del aire a la entrada	°C
T_S	Temperatura a la salida	°C
h_{GS}	Coefficiente de transferencia de calor	W/m ² .K
a_S	Área específica del sólido	m ²
λ_A	Calor latente de vaporización	kJ/kg
m_A	Masa del aire dentro del biorreactor	kg
C_{pS}	Capacidad calorífica del sólido	kJ /kg °C
T_S	Temperatura del sólido	°C
$-\Delta H_r$	Calor metabólico	kJ /mol
$h_{GS} a_S$	Coefficiente de transferencia de calor del gas a través de la pared por área del sólido	kJ/(m ² .h.°C)
y_A	Fracción másica del agua en el aire	g agua/g aire
Y	Humedad absoluta del aire	kg vapor de agua/ kg aire seco

Nomenclatura capítulo 3

C_{AET}	Costo de adquisición del equipamiento tecnológico	\$
CEQ_{refin}	Costo de la cámara de refrigeración para el inóculo	\$
N_{nev}	Número de neveras	-
p_{nev}	Precio de la nevera	\$/nevera
V_{ain}	Volumen de inóculo a almacenar por ciclo productivo	m ³
Ic_{nev}	Índice de capacidad por neveras	Nevera/m ³
M_{in}	Masa de inóculo a emplear en un ciclo	kg
ρ_{in}	Densidad aparente del inóculo usado	
CEQ_{mpic}	Costo máquina picadora	\$
N_{pic}	Número de picadoras	
p_{pic}	Precio de la picadora	\$/picadora
M_{rf}	Masa de residuos de fréjol	kg
t_{mol}	Tiempo de molido	h
Ic_{pic}	Capacidad de una picadora	kg/h/picadora
CEQ_{ta}	Costo tanque de agua	\$
V_{tad}	Volumen de agua a consumir por día	m ³ /día
Ic_a	Índice de consumo de agua	kg agua/kg MP
MP	Materia prima	Kg MHS/año
N_c	Número de ciclos	Ciclos/año
CEQ_{trh}	Costo tanque de rehidratación	\$
V_{trh}	Volumen tanque de rehidratación	m ³
ρ_{mp}	Densidad de la materia prima	kg/m ³
CEQ_{test}	Costo tanque de esterilización	\$

CEQ_{mesam}	Costo de la mesa de mezclado	\$
A_{mesa}	Área de la mesa	m ²
ρ_m	Densidad del medio	kg/m ³
$CEQ_{enfriador}$	Costo del enfriador de agua	\$
V_{ahar}	Volumen de agua para humidificar el aire	m ³
CEQ_{sop}	Costo del soplador de aire	\$
f_a	Flujo de aire	m ³ /h
f_{sdt}	Factor de sobre diseño del tanque de agua	
ρ_a	Densidad del aire	kg/m ³
CEQ_{bomb}	Costo de la bomba	\$
F_{bagua}	Flujo de la bomba de agua	L/h
V_{tad}	Volumen del tanque de agua	m ³
t_{ll}	Tiempo de llenado del tanque de agua	h
CEQ_{br}	Costo del biorreactor	\$
CEQ_{mbr}	Costo de un módulo de biorreactor	\$
N_m	Número de módulos por biorreactor	
N_{br}	Número de biorreactores	
CEQ_{refpt}	Costo del refrigerador producto terminado	\$
N_{nevpt}	Número de neveras para producto terminado	
p_{nev}	Precio de la nevera	\$
C_{mp}	Costo anual de la materia prima	\$/año
C_{rf}	Costo de los residuos de fréjol por ciclo productivo	\$/ciclo
C_n	Costo del sulfato de amonio por ciclo productivo	\$/ciclo
C_{mg}	Costo del sulfato de magnesio por ciclo productivo	\$/ciclo

C_a	Costo del agua por ciclo productivo	\$/ciclo
C_{sa}	Costo del sustrato agotado por ciclo productivo	\$/ciclo
C_{in}	Costo del inóculo por ciclo productivo	\$/ciclo
N_c	Número de ciclos productivos	
mp_t	Masa de materia prima total consumida por ciclo	kg/ciclo
Ic_{rf}	Índice de consumo de residuos de fréjol	kg rf/kg MHS
p_{rf}	Precio de venta del residuo de fréjol	\$/kg
Ic_n	Índice de consumo de sulfato de amonio	kg N/kg MHS
Ic_{mg}	Índice de consumo de sulfato de magnesio	kg Mg/kg MHS
Ic_a	Índice de consumo de agua	kg ag/kg MHS
Ic_{in}	Índice de consumo de inóculo	kg in/kg MHS
p_n	Precio del sulfato de amonio	\$/ kg
p_{mg}	Precio del sulfato de magnesio	\$/ kg
p_a	Precio del agua	\$/ kg
p_{in}	Precio del inóculo	\$/ kg
C_{fa}	Costo de facilidades auxiliares	\$/año
C_a	Costo del agua	\$/año
C_e	Costo de la energía	\$/año
C_{aest}	Costo de agua de esterilización	\$/año
C_{ahar}	Costo de agua para humidificar el aire	\$/año
C_{alimp}	Costo de agua de limpieza	\$/año
V_{aest}	Volumen de agua de esterilización	L
p_a	Precio del agua	\$/L
ρ_{am}	Densidad aparente del medio	kg/m ³

V_{ahar}	Volumen de agua para humidificar el aire	L
x_{wae}	Fracción de agua a la entrada	%
x_{waa}	Fracción de agua en el aire	%
V_{alimp}	Volumen de agua para limpieza	L
mp_t	Materia prima total	Kg/año
C_e	Costo de energía	\$/año
C_{etrit}	Costo de energía para trituración	\$/año
C_{esop}	Costo de energía para el soplador	\$/año
C_{erefpt}	Costo de energía para refrigeración de producto final	\$/año
C_{refin}	Costo de energía para refrigeración de inóculo	\$/año
C_{eest}	Costo de energía para esterilización	\$/año
M_{rf}	Masa de residuos de fréjol	kg/ciclo
$f_{acenerg}$		
p_e	Precio de la energía	\$/kW-h
N_c	Número de ciclos	
$P_{cmotorsop}$	Potencia consumida por el motor	kW
t_f	Tiempo de fermentación	días
f_a	Flujo de aire	L/min
R	Constante universal de los gases	J/(kmo.K)
T_{ae}	Temperatura del aire a la entrada	° C
P_2	Presión de salida del soplador	MPa
P_1	Presión de entrada al soplador	MPa
$P_{consrefpt}$	Potencia consumida por el refrigerador de producto terminado	kW
I_{cref}	Índice de consumo de refrigeración	kW/kg MHH

P_{hfa}	Producción de hongo fresco por año	kg MHH/año
$P_{conrefin}$	Potencia consumida por el refrigerador de inóculo	kW
M_{in}	Masa del inóculo	kg
ρ_{in}	Densidad del inóculo	kg/m ³
C_{ftd}	Costo de fuerza de trabajo directa	\$/año
N_t	Número de trabajadores	
C_{lab}	Costo de laboratorios	\$/año
C_{emb}	Costo de embalaje	\$/año
$C_{bandeja}$	Costo de la bandeja	\$/año
$C_{vitafilm}$	Costo del vitafilm	\$/año
$C_{etiqueta}$	Costo de la etiqueta	\$/año
Ic_{band}	Índice de consumo de bandejas	Bandejas/kg MHH
P_{hfa}	Producción de hongo fresco por año	kg/año
p_{band}	Precio de la bandeja	\$/bandeja
p_{vf}	Precio del vitafilm	\$/m
Ic_{vf}	Índice de consumo de vitafilm	m/bandeja
Ic_{etiq}	Índice de consumo de la etiqueta	Etiqueta/kg MHH
p_{etiq}	Precio de la etiqueta	\$/etiqueta
C_d	Costo de depreciación	\$/año
V_{ei}	Valor del equipamiento al inicio	\$
t_{vu}	Tiempo de vida útil	años
c_{EQ}	Costo del equipamiento	\$
C_{instal}	Costo de instalación	\$
C_{mant}	Costo de mantenimiento	\$/año

C_{so}	Costo de suministros de operación	\$/año
C_{gen}	Costos generales	\$/año
C_{adm}	Costos de administración	\$/año
P_r	Productividad	kg/(m ³ .año)
MHH	Masa húmeda de hongo	kg
V_{br}	Volumen del biorreactor	m ³
t	Tiempo	año
N_{br}	Número de biorreactores	
CUP	Costo unitario de producción	\$/kg
PA	Producción anual	kg/año
CP	Costo de producción	\$/año
N_c	Número de ciclos	
CP_c	Costo de producción por ciclo	\$/ciclo
t_{da}	Tiempo disponible por año	día
t_c	Tiempo por ciclo igual al tiempo de fermentación	día