



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR PARA LA
OBTENCIÓN DE MICELIO INFINITO DEL HONGO
PORTOBELLO (*Agaricus brunnescens*) y *Pleurotus ostreatus*
MEDIANTE LA TÉCNICA HONEY TEK**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto Técnico

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORES: KEVIN JAVIER ALTAMIRANO CABAY

ANGELA SOFÍA ORTIZ BASTIDAS

DIRECTOR: Ing. ALFONSO LEONEL SUÁREZ TAPIA, PhD.

Riobamba – Ecuador

2022

©2022, Kevin Javier Altamirano Cabay & Angela Sofía Ortiz Bastidas

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Nosotros, KEVIN JAVIER ALTAMIRANO CABAY y ANGELA SOFÍA ORTIZ BASTIDAS, declaramos que el presente Trabajo de Integración Curricular es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autores, asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 01 de junio de 2022



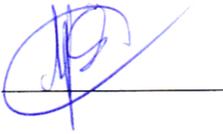
Kevin Javier Altamirano Cabay
C.I. 060460939-6



Angela Sofía Ortiz Bastidas
C.I. 172677038-9

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto Técnico, **CONSTRUCCIÓN DE UN BIOREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE MICELIO INFINITO DEL HONGO PORTOBELLO** (*Agaricus brunnescens*) Y *Pleurotus ostreatus* **MEDIANTE LA TÉCNICA HONEY TEK**, realizado por los señores: **KEVIN JAVIER ALTAMIRANO CABAY** y **ANGELA SOFÍA ORTIZ BASTIDAS**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Andrés Agustín Beltrán Dávalos MSc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022-06-01
Ing. Alfonso Leonel Suárez Tapia, PhD. DIRECTOR TRABAJO DE TITULACIÓN		2022-06-01
Ing. Paúl Gustavo Palmay Paredes MSc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2022-06-01

DEDICATORIA

Dedicado a mi persona, a mis padres Luis y Maritza, a mis hermanos, a mis tías, a mis abuelitas, a mis queridos sobrinos y a mis amigos/as que me han dado su apoyo condicional durante este periodo académico.

Kevin

“Hay una temporada para todo, un tiempo para cada actividad bajo el cielo”

Eclesiastes 3:1

A mi Dios, por su fidelidad durante todo este transcurso.

A mi madre, Flor Bastidas por apoyarme cada momento con ternura y paciencia.

A mi hermana, Shakira por ser mi cómplice.

A mi querida Maritza Yáñez por su amor, hospitalidad y cariño.

A mi querido Dr. Alfonso Suárez por su amistad, paciencia, cariño y confianza.

A mis amigos, maestros y personas que de alguna manera han hecho que mi vida sea más especial y llena de mucho amor.

¡A cada uno de ustedes, gracias por creer en mí!

Angela

AGREDICIMIENTO

Agradecemos principalmente a Dios por darnos la sabiduría e inteligencia para culminar este trabajo de titulación con éxito. A nuestras familias por ser nuestro apoyo incondicional, por amarnos y por confiar en nosotros.

De la misma manera, agradecemos a nuestros queridos Director y Asesor de tesis por guiarnos y corregirnos constantemente con paciencia.

A nuestros queridos amigos, quienes han hecho que cada día sea mejor.

Kevin & Angela

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE ECUACIONES	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
ÍNDICES DE ABREVIATURA	xv
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	2
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Justificación del proyecto	2
1.3. Objetivos de la investigación.....	3

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes.....	4
2.2. Bases teóricas	4
2.2.1. <i>Importancia ecológica de los hongos</i>	4
2.2.2. <i>Importancia del Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens</i>	5
2.2.3. <i>Importancia socioeconómica del Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens en el Ecuador</i>	5
2.2.3.1. <i>Importancia social del Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens</i>	5
2.2.3.2. <i>Importancia económica del Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens</i>	5
2.2.4. <i>Valor nutricional de Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens</i>	5
2.2.5. <i>Variabilidad de sustratos en la producción de hongos comestibles</i>	6
2.3. Bases conceptuales	6
2.3.1. <i>Hongos</i>	9
2.3.2. <i>Basidiomicetos</i>	10

2.3.1.1.	<i>Ciclo sexual de los basidiomicetos</i>	10
2.3.3.	<i>Agaricus brunnescens (Portobello)</i>	10
2.3.3.1.	<i>Taxonomía Agaricus brunnescens</i>	11
2.3.3.2.	<i>Características del hongo Portobello</i>	11
2.3.3.3.	<i>Composición química</i>	12
2.3.3.4.	<i>Condiciones ambientales para el desarrollo del Portobello</i>	12
2.3.4.	<i>Pleurotus ostreatus</i>	12
2.3.4.1.	<i>Taxonomía Pleurotus ostreatus</i>	13
2.3.5.	<i>Micelio</i>	15
2.3.6.	<i>Compuestos bioactivos</i>	15
2.3.7.	<i>Honey tek</i>	17
2.3.8.1.	<i>Pulpa de café</i>	18
2.3.8.2.	<i>Bagazo de caña de azúcar</i>	18
2.3.8.3.	<i>Cascarilla de arroz</i>	18
2.3.9.	<i>Biorreactor</i>	18
2.3.9.1.	<i>Dimensionamiento</i>	19
2.3.9.2.	<i>Tipos de cultivo</i>	19
2.3.9.3.	<i>Variables de Operación</i>	20
2.3.9.4.	<i>Tipos de sistemas biológicos</i>	21
2.3.9.5.	<i>Factores considerados para el diseño del Bioreactor batch</i>	21
2.3.9.6.	<i>Propiedades físicas del medio y producto</i>	24
2.3.9.7.	<i>Balance de masa</i>	24
2.3.9.8.	<i>Dimensionamiento del Biorreactor</i>	25

CAPÍTULO III

3.	METODOLOGÍA	29
3.1.	Tipo de Investigación	29
3.2.	Diseño de la Investigación	29
3.2.1.	<i>Localización del proyecto</i>	29
3.2.1.1.	<i>Ubicación geográfica del proyecto</i>	30
3.2.2.	<i>Población de estudio</i>	30
3.2.3.	<i>Tamaño muestra</i>	30
3.2.4.	<i>Método de muestreo</i>	30
3.2.5.	<i>Técnicas de recolección de datos</i>	31
3.2.6.	<i>Análisis Estadístico</i>	31

3.2.6.1.	<i>Estudio observacional del rendimiento</i>	31
3.2.7.	<i>Etapas del proyecto</i>	31
3.2.7.1.	<i>Etapa 1. Caracterización de forma microscópica y morfológica de Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens.</i>	31
3.2.7.2.	<i>Etapa 2. Determinación de los parámetros para la obtención de micelio de los hongos Pleorutos ostreatus y Agaricus brunnescens.</i>	36
3.2.7.3.	<i>Etapa 3. Características fisicoquímicas de los hongos Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens.</i>	40
3.2.7.4.	<i>Etapa 4. Observación del tiempo de colonización de micelio de los hongos Pleorutos ostreatus y Agaricus brunnescens en sustratos</i>	44
3.2.8.	<i>Cálculos</i>	48
3.2.8.1.	<i>Propiedades físicas del medio y producto</i>	48
3.2.8.2.	<i>Balances de masa</i>	48
3.2.8.3.	<i>Cálculos para el diseño del Bioreactor</i>	50
3.2.8.4.	<i>Cálculo del contenido de humedad de los sustratos</i>	52
3.2.8.5.	<i>Dimensionamiento del Bioreactor</i>	52

CAPÍTULO IV

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
4.1.	Resultados pruebas preexperimentales.	55
4.2.	Resultados a escala laboratorio	57
4.3.	Resultados biorreactores prototipo	59
4.4.	Obtención de micelio Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens en medio PDA	63
4.5.	Resultados caracterización microscópica y morfológica del prototipo Pleurotus ostreatus en cultivo sumergido Honey Tek.	63
4.6.	Resultados caracterización microscópica y morfológica del prototipo Agaricus brunnescens en cultivo sumergido Honey Tek	64
4.7.	Verificación de contaminación	65
4.8.	Resultados obtención de la biomasa por peso seco de los Biorreactores prototipos	65
4.9.	Resultados medición pH.	67
4.10.	Resultados metabolitos bioactivos (proteínas)	68
4.11.	Resultados tiempo de colonización en los sustratos	69
4.12.	Análisis estadístico	70

4.12.1.	<i>Observación del Rendimiento Pleurotus ostreatus</i>	70
4.12.2.	<i>Observación del Rendimiento de Agaricus brunnescens</i>	71
	CONCLUSIONES	73
	RECOMENDACIONES	74
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Composición elemental promedio de un hongo.....	9
Tabla 2-1:	Composición química hongo Portobello	12
Tabla 3-1:	Compuestos bioactivos derivados de diferentes cepas de hongos de cultivo sumergido.	16
Tabla 4-3:	Obtención de esporas (<i>Agaricus brunnecens</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>)	33
Tabla 5-3:	Aislamiento de cepas (<i>Agaricus brunnecens</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>).....	34
Tabla 6-3:	Caracterización microscópica.....	35
Tabla 7-3:	Preparación del caldo Honey Tek.....	36
Tabla 8-3:	Preparación Honey tek a escala piloto.....	38
Tabla 9-3:	Determinación del número de conidios y curva de crecimiento.....	39
Tabla 10-3:	Determinación de Biomasa por peso húmedo.	42
Tabla 11-3:	Determinación de Biomasa por peso seco.	43
Tabla 12-3:	Evaluación tiempo de colonización de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Agaricus brunnescens</i> en tres tipos de sustratos a diferentes concentraciones.....	44
Tabla 13-3:	Preparación de los sustratos (pulpa de café, cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar)	45
Tabla 14-3:	Inoculación de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Agaricus brunnescens</i> en sustratos (pulpa de café, cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar).	46
Tabla 15-3:	Valores experimentales de la densidad final	48
Tabla 16-3:	Valores experimentales de la viscosidad final.....	48
Tabla 17-3:	Datos para el balance de masa.....	49
Tabla 18-3:	Dimensionamiento para los dos biorreactores.....	53
Tabla 19-3:	Materiales utilizados en la construcción de los biorreactores	53
Tabla 20-3:	Materiales utilizados en el invernadero	54
Tabla 21-4:	Valores obtenidos de la biomasa por peso seco del Biorreactor prototipo <i>Pleurotus ostreatus</i>	66
Tabla 22-4:	Valores obtenidos de la biomasa por peso seco del Biorreactor prototipo <i>Agaricus brunnescens</i>	67
Tabla 23-4:	Resultados de proteínas de los biorreactores prototipo	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Ciclo sexual de los Basidiomicetos	10
Figura 2-1:	Hongo Portobello en sustrato	11
Figura 3-1:	Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	13
Figura 4-2:	Balances de masa	25
Figura 5-2:	Número de Reynolds vs Número de potencia para diferentes tipos de agitadores, la curva 6 representa los agitadores palas inclinadas.	27
Figura 6-3:	Ubicación geográfica del proyecto.....	30
Figura 7-3:	Obtención de esporas mediante cámara seca	33
Figura 8-3:	Aislamiento de cepas <i>Agaricus b.</i> y <i>Pleurotus o.</i> en agar PDA	34
Figura 9-3:	Caracterización microscópica (a) <i>Agaricus b.</i> y (b) <i>Pleurotus o.</i>	35
Figura 10-3:	(a)Preparación caldo Honey tek. (b) Colocación de cinta micropore. (c) y (d) Crecimiento micelio <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Agaricus brunneceus</i> respectivamente.	37
Figura 11-3:	Preparación Honey tek prototipos (a) <i>Pleurotus o.</i> (b) <i>Agaricus b.</i>	38
Figura 12-3:	Determinación del número de conidios en cámara de Neubauer.	39
Figura 13-3:	Determinación de Biomasa por peso húmedo.....	42
Figura 14-3:	Determinación de Biomasa por peso seco.....	43
Figura 15-3:	Preparación de la pulpa de café, cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar, (izquierda) <i>Pleurotus o.</i> y (derecha) <i>Agaricus b.</i> respectivamente.....	45
Figura 16-3:	Inoculación de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Agaricus brunneceus</i> sobre sustratos	46
Figura 17-3:	Esquema del proceso.....	47
Figura 18-3:	Transferencias de masa de los biorreactores	49
Figura 19-4:	Obtención micelio <i>Pleurotus ostreatus</i> (a) y micelio <i>Agaricus brunneceus</i> (b) en medio PDA.....	63
Figura 20-4:	Caracterización microscópica a objeto 10X (izquierda) y caracterización morfológica (derecha) del biorreactor prototipo <i>Pleurotus ostreatus</i>	64
Figura 21-4:	Caracterización microscópica a objeto 10X (izquierda) y caracterización morfológica (derecha) del biorreactor prototipo <i>Agaricus brunneceus</i>	64
Figura 22-4:	Verificación crecimiento <i>Pleurotus ostreatus</i> (superior), <i>Agaricus brunneceus</i> (inferior) y blanco (centro) en medio PDA.....	65

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 1-2:	Variables de operación en un Bioreactor batch.....	20
Gráfica 2-4:	Indica la curva crecimiento preexperimental <i>Pleorutus ostreatus</i> a diferentes velocidades de agitación.	55
Gráfico 3-4:	Indica la curva crecimiento preexperimental <i>Agaricus brunnescens</i>	56
Gráfica 4-4:	Curva crecimiento a escala laboratorio del hongo <i>Pleorutus ostreatus</i> en Honey Tek.	57
Gráfica 5-4:	Curva crecimiento a escala laboratorio del hongo <i>Agaricus brunnescens</i> en Honey Tek.....	58
Gráfica 6-4:	Curva crecimiento prototipo del hongo <i>Pleorutus ostreatus</i> en Honey Tek.	59
Gráfica 7-4:	Fases de crecimiento prototipo del hongo <i>Pleorutus ostreatus</i> en Honey Tek. .	60
Gráfica 8-4:	Curva crecimiento prototipo del hongo <i>Agaricus brunnescens</i> en Honey Tek. .	61
Gráfica 9-4:	Fases de crecimiento prototipo del hongo <i>Agaricus brunnescens</i> en Honey Tek.	62
Gráfica 10-4:	Resultados de la biomasa por peso seco (g/L) prototipo del hongo <i>Pleorutus ostreatus</i> en Honey Tek por 15 días.....	66
Gráfica 11-4:	Resultados de la biomasa por peso seco (g/L) prototipo del hongo <i>Agaricus brunnescens</i> en Honey Tek por 15 días.	67
Gráfica 12-4:	Resultados de medición pH.....	68
Gráfica 13-4:	Resultados tiempo de colonización de <i>Pleurotus ostreatus</i>	69
Gráfica 14-4:	Resultados tiempo de colonización de <i>Agaricus brunnescens</i>	70
Gráfica 15-4:	Observación del rendimiento <i>Pleurotus ostreatus</i> con separación de medias..	71
Gráfica 16-4:	Observación del rendimiento <i>Agaricus brunnescens</i> con separación de medias	72

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1-2: Determinación del número de conidios	22
Ecuación 2-2: Velocidad específica de crecimiento	22
Ecuación 3-2: Velocidad específica de crecimiento <i>Pleorotus ostreatus</i>	22
Ecuación 4-2: Velocidad específica de crecimiento <i>Agaricus brunnescens</i>	22
Ecuación 5-2: Tiempo de generación.....	23
Ecuación 6-2: Concentración de Biomasa por peso húmedo.....	23
Ecuación 7-2: Concentración de Biomasa por peso seco.....	23
Ecuación 8-2: Cálculo de la densidad.....	24
Ecuación 9-2: Balances de masas	25
Ecuación 10-2: Factor de seguridad volumétrica.....	25
Ecuación 11-2: Volumen total	25
Ecuación 12-2: Cálculo del número de Reynolds	26
Ecuación 13-2: Cálculo de la potencia.....	27
Ecuación 14-2: Cálculo del contenido de humedad de los sustratos.....	27
Ecuación 15-2: Cálculo del rendimiento.....	28

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** SIEMBRA, AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN DE *Pleurotus ostreatus* Y *Agaricus brunnescens*⁷⁷
- ANEXO B:** DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS DE LOS BIORREACTORES
- ANEXO C:** PRUEBAS PRE EXPERIMENTALES
- ANEXO D:** PREPARACIÓN DE LOS BIORREACTORES PROTOTIPO
- ANEXO E:** VISUALIZACIÓN CONSTRUCCIÓN BIORREACTORES PROTOTIPOS
- ANEXO F:** DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CONIDIOS
- ANEXO G:** DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA SECA
- ANEXO H:** PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DE MICELIO EN LOS SUSTRATOS
- ANEXO I:** RESULTADOS PRUEBAS PRE EXPERIMENTALES
- ANEXO J:** RESULTADOS A ESCALA LABORATORIO
- ANEXO K:** RESULTADOS BIORREACTORES PROTOTIPO
- ANEXO L:** RESULTADOS PROTEÍNAS *Agaricus brunnescens*
- ANEXO M:** RESULTADOS PROTEÍNAS *Pleurotus ostreatus*
- ANEXO N:** RESULTADOS COLONIZACIÓN DE MICELIO EN SUSTRATOS
- ANEXO O:** RESULTADOS PORCENTAJES DE RENDIMIENTOS DE *Pleurotus ostreatus* Y *Agaricus brunnescens*
- ANEXO P:** PRESUPUESTO
- ANEXO Q:** CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ÍNDICES DE ABREVIATURA

$\frac{\text{Conidios}}{\text{mL}}$	Concentración conidios sobre mililitro
<i>FD</i>	Factor de dilución
μ	Velocidad específica de crecimiento
<i>dt</i>	Tiempo de incubación
x	Concentración de conidios
μ_{Po}	Velocidad específica de crecimiento <i>Pleorotus ostreatus</i>
μ_{Ab}	Velocidad específica de crecimiento <i>Agaricus brunnescens</i>
<i>X_f</i>	Concentración final de conidios
<i>X_o</i>	Concentración inicial de conidios
<i>t_f</i>	Tiempo final de incubación
<i>t_o</i>	Tiempo inicial de incubación
<i>ge</i>	Tiempo de generación
ρ	Densidad del medio
μ_l	Viscosidad del medio líquido
<i>W</i>	Flujo de agua
<i>M</i>	Flujo de miel
<i>I_i</i>	Flujo de inóculo
<i>P</i>	Flujo producto de micelio
<i>V_p</i>	Volumen de producción del Bioreactor
<i>V_s</i>	Volumen seguridad volumétrica
<i>V_T</i>	Volumen total
<i>D_T</i>	Diámetro del tanque
<i>h_T</i>	Altura del tanque
<i>D_i</i>	Diámetro impulsor barra agitadora
<i>R_e</i>	Número de Reynolds
<i>N_p</i>	Número de potencia
<i>P_i</i>	Potencia requerida
Rpm	Revolución por minuto
<i>H_s</i>	Humedad del sustrato
<i>g</i>	Gramos
<i>mL</i>	Mililitros
<i>L</i>	Litros

<i>h</i>	Horas
<i>D</i>	Días
<i>m</i>	Metros
<i>cm</i>	Centímetros
<i>%</i>	Porcentaje
<i>Ri</i>	Rendimiento del hongo (%)
<i>Pfh</i>	Peso fresco del hongo
<i>Psh</i>	Peso del sustrato húmedo(g)

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue construir biorreactores para la obtención de micelio de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* mediante la técnica Honey tek, para lo cual se extrajeron impresiones de esporas mediante el método de cámara seca y se realizó la siembra en un caldo nutritivo, se usaron varios cálculos para conocer el rendimiento de biomasa, eficiencia biológica y metabolitos bioactivos presentes en cada hongo. La construcción de los biorreactores se llevó a cabo aplicando fórmulas, de las cuales, se dimensionó una cámara de cultivo de 2.5 L, con una producción de 2 L, diámetro interno de 0.06 m y altura 0.24 m. Se obtuvo micelio puro de ambos hongos por aislamiento y purificación, se inoculó en los biorreactores que contenían honey estéril, se agitaron cada 5 horas a 120 rpm (revoluciones por minuto) usando un agitador magnético y se incubó por 285 horas a 28°C en un cuarto oscuro. Se contaron los conidios/mL a los 3, 6, 9, 12 y 15 días con una cámara de Neubauer. Para el análisis estadístico, se usó el software Excel para generar tablas de temperatura, pH (potencial Hidrogeno), agitación y gráficas de rendimiento de biomasa micelial, unidades formadoras de colonias, número de conidios formados, diámetro del micelio y rendimiento de la eficiencia biológica. Los mejores sustratos fueron pulpa de café y bagazo de caña con las dosificaciones de 20 mL y 15 mL. Se concluye que el micelio obtenido en biorreactores presenta mayor rendimiento de biomasa, mejor calidad del micelio, mejor dispersión sobre los sustratos, en un tiempo de producción corto. Se recomienda en el estudio realizar análisis bromatológico a las setas frescas para corroborar la utilización de biorreactores en el cultivo de hongos comestibles a nivel industrial.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA>, <BIORREACTOR BATCH>, <MICELIO LÍQUIDO>, <BIOMASA>, <METABOLITOS BIOACTIVOS>.



1251-DBRA-UTP-2022

ABSTRACT

The aim of this study was to construct bioreactors for the obtention of mycelium from *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus brunnescens* mushrooms using the Honey tek technique. Thus, spore impressions were extracted through the dry chamber method and the sowing was performed in a nutrient broth. Several calculations were used in order to know the biomass yield, biological efficiency and bioactive metabolites present in each mushroom. The construction of the bioreactors was carried out with the application of formulas, from which a 2.5 L culture chamber was dimensioned with a production of 2 L, an internal diameter of 0.06 m and a height of 0.24 m. Pure mycelium from both types of mushrooms was obtained by isolation and purification and it was inoculated into bioreactors containing sterile honey. Then, it was shaken every 5 hours at 120 rpm (revolutions per minute) using a magnetic stirrer and incubated for 285 hours at 28°C in a dark room. Conidia/mL were counted at 3, 6, 9, 9, 12 and 15 days using a Neubauer chamber. For the statistical analysis, Excel software was used to generate temperature tables, pH (hydrogen potential), stirring and mycelial biomass yield graphs, colony forming units, number of formed conidia, mycelial diameter and biological efficiency yield. The best substrates were coffee pulp and sugarcane bagasse with dosages of 20 mL and 15 mL. It is concluded that the mycelium obtained in bioreactors presents higher biomass yield, better mycelium quality and better dispersion on the substrates in a short production time. It is recommended to perform bromatological analysis on fresh mushrooms to confirm the use of bioreactors in the cultivation of edible mushrooms at industrial level.

Keywords: <BIOTECHNOLOGY>, <BATCH BIORREACTOR>, <LIQUID MYCELIUM>, <BIOMASS>, <BIOACTIVE METABOLITES>.



Firmado electrónicamente por:
PAUL ROLANDO
ARMAS PESANTEZ

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de hongos de los géneros *Pleurotus* y *Agaricus* se ha incrementado significativamente y ahora se cultiva en casi todas las latitudes del mundo. Su caso merece especial atención más que cualquier otro género cultivado hasta la fecha, debido a la diversidad de sustratos sobre los que pueden crecer, lo que permite conocer de forma directa los efectos beneficiosos del cultivo de setas para el aprovechamiento de los residuos agrícolas.

Los hongos se están convirtiendo en un alimento de bajo costo que es fácil de cultivar y producir, con una huella de carbono relativamente baja. Así, puede ser una alternativa potencial para paliar las carencias nutricionales, las inseguridades alimentarias y los cambios climáticos y, en consecuencia, ser la opción alimentaria más popular en el futuro.

El cultivo sumergido de hongos requiere un control total del bioproceso en cuanto al seguimiento automático de todos los parámetros químicos y físicos, manteniéndolos en valores óptimos. El principal problema que debe resolver el proceso biotecnológico intensivo para el cultivo sumergido de hongos comestibles y medicinales sobre sustratos de desechos agrícolas resultantes del procesamiento de granos de cereales es convertir estos desechos naturales de la agricultura orgánica en biomasa nutritiva para ser utilizada como complemento alimenticio que se hacen a través de medios biológicos únicamente (Petre y Petre, 2016, pp.1-3).

Este proyecto técnico tiene como objetivo implementar el cultivo líquido sumergido en biorreactores para producir micelio de los hongos *Agaricus brunnescens* y *Pleurotus ostreatus* aplicando el método Honey tek. Esta técnica se considera muy factible ya que permite obtener una mayor cantidad y calidad de micelio y se puede aplicar más fácilmente sobre el sustrato. La vida útil de este micelio es de unos seis meses. Lo que ayudará a los cultivadores de hongos a reducir el tiempo de colonización, aumentar la productividad y la producción de biomasa.

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

En la actualidad, el método de obtención de micelio de hongos comestibles mediante la tecnología de fermentación sólida es muy lenta, con un alto costo de producción y un bajo rendimiento de biomasa, lo que constituye una de las principales dificultades para su producción a gran escala. El desarrollo de procesos de adquisición de micelio en estado sólido está dictado por las propiedades inherentes de estos sistemas heterogéneos, y no es posible tomar muestras durante el desarrollo para determinar las concentraciones correspondientes de biomasa, sustrato y producto. Este hecho se refleja de manera particularmente aguda cuando se requieren estudios cinéticos del proceso. Sin embargo, surgen serios problemas en los sistemas sólidos con la mezcla, la transferencia de oxígeno, el intercambio de calor y el control de la humedad y el pH, principalmente debido a la heterogeneidad y consistencia del sistema.

El mal manejo de la producción de biomasa, evaluación de sustratos, siembra, riego y cosecha en fermentación sólida afecta directamente la rentabilidad, producción y costo de propagación de micelio, lo que genera insatisfacción a sus productores.

1.1.1. *Pregunta de investigación*

¿La construcción del biorreactor ayudará a obtener micelio de los hongos *Agaricus brunnescens* y *Pleurotus ostreatus* de mejor calidad y en menor tiempo?

1.2. Justificación del proyecto

En la actualidad la producción de hongos comestibles ha ido creciendo constantemente, es así que la especie *Agaricus* es el más cultivado en el mundo, siguiéndole el *Pleurotus ostreatus* debido a sus propiedades nutricionales (buenos valores proteicos, vitamínicos y minerales), medicinales, valores económicos, sociales y ecológicos. Además, son capaces de transformar toda la biomasa lignocelulósica en alimento nutritivo y orgánico, en comparación con otros cultivos, su ciclo de producción es corto, la inversión es baja, y el sustrato después de la producción puede reutilizarse como fertilizante orgánico y alimento para animales.

Por esta razón el siguiente proyecto técnico se enfoca en encontrar una alternativa para la obtención de “micelio” mediante la utilización de un biorreactor que permita producir mayor

cantidad de biomasa de mejor calidad en menor tiempo, favoreciendo la adaptación y dispersión del hongo y facilitando su manipulación durante la siembra, además emplearemos la técnica honey tek (miel) para la preparación del medio líquido. También se realizará la observación del tiempo de colonización del micelio sobre tres tipos de sustratos: bagazo de caña, pulpa de café y cascarilla de arroz.

Por otro lado, el tiempo de vida útil de la técnica en medio sólido es de alrededor 4 meses, mientras que el método en medio líquido tiene una vida útil de 6 a 12 meses, lo que ayudaría al escalamiento de estos dos hongos a nivel piloto e industrial.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo General

- Construir un biorreactor para la obtención de micelio infinito del hongo Portobello (*Agaricus brunnescens*) y *Pleurotus ostreatus* mediante la técnica Honey tek.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Diseñar dos biorreactores de 2L para la producción de micelio de los hongos *Agaricus brunnescens* y *Pleurotus ostreatus*.
- Determinar los parámetros cinéticos de crecimiento micelial y la producción de biomasa de las cepas *Agaricus brunnescens* y *Pleurotus ostreatus* en medio líquido.
- Identificar los principales metabolitos bioactivos presentes en el micelio de los hongos *Agaricus brunnescens* y *Pleurotus ostreatus* obtenidos de la fermentación líquida sumergida.
- Registrar el tiempo de colonización de los micelios obtenido de los biorreactores sobre tres sustratos.
- Observar el rendimiento de los hongos *Agaricus brunnescens* y *Pleurotus ostreatus* sobre tres sustratos.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Los hongos forman parte del filo de hongos llamado *Basidiomycota*, que es un grupo hermano filogenético de *Ascomycota*, en el que se incluyen las trufas. Estos dos filos forman parte de una amplia categoría denominada “hongos superiores” (Bakratsas et al., 2021, pp.4-10). Según estimaciones, 12 000 especies forman parte de la familia de las setas, mientras que solo 2000 de ellas se reportan como comestibles. De los hongos comestibles, solo 35 especies podrían cultivarse comercialmente y 25 de ellas podrían aceptarse como fuente de alimento, siendo la cepa *Agaricus* el hongo cultivado más común en todo el mundo, seguida de *Pleurotus spp.*

Aunque la humanidad ha consumido hongos durante mucho tiempo, sus propiedades medicinales y nutraceuticas no se utilizan en todo su potencial en el mercado actual. Los hongos comestibles no solo son una opción barata y nutritiva para mitigar la desnutrición, sino que también producen biomasa efectiva. La utilización de biorreactores para el cultivo líquido sumergido, no solo es un método rentable para producir biomasa junto con exquisitos metabolitos bioactivos, sino que también reduce las posibilidades de contaminación y el tiempo de producción.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Importancia ecológica de los hongos

Los hongos son de importancia ecológica porque son los descomponedores más importantes de la materia orgánica que se encuentra en la naturaleza, también son de gran importancia a nivel biotecnológico utilizando sustratos para la mejora de los cultivos de *Pleurotus* y *Agaricus*, a nivel médico estos hongos contienen beneficios medicinales para personas con enfermedades cardiovasculares y obesidad; y como nivel alimentario estos hongos poseen altos aportes nutricionales en proteínas, vitaminas, antioxidantes siendo un alimento vegetal con bajas grasas saturadas. Por lo tanto, esta variedad de hongos comestibles puede crecer sobre una amplia variedad de sustratos que en su mayoría son de bajo costo y de fácil obtención.

2.2.2. *Importancia del Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens*

El cultivo de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* son muy importantes desde el punto de vista medioambiental, ya que permiten utilizarlo tanto como materia prima como subproducto para transformarlo en alimento o utilizarlo como fertilizante biológico. Su cultivo ha experimentado un desarrollo considerable debido a su capacidad de reproducción en diferentes sistemas de medios y su proceso de fermentación tecnológica relativamente simple, barato y económico.

2.2.3. *Importancia socioeconómica del Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens en el Ecuador*

2.2.3.1. *Importancia social del Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens*

Existen tecnologías de fermentación de cultivos sumergidos líquidos y sólidos amigables con el ambiente que nos permiten aprovechar y transformar productos rápidos con alto contenido nutricional de estos tipos de hongos, generando beneficios sociales y ambientales como reemplazar alimentos altamente consumidos por el incremento poblacional, este tipo de hongos comestibles ayudarán a generar una nueva fuente de alimento vegetal.

2.2.3.2. *Importancia económica del Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens*

La producción de los hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* representan una alternativa de comercial debido a su potencial económico y su alto contenido nutricional y medicinal, ya que a partir de las nuevas tecnologías alternativas de sistemas de fermentación líquida y sólida nos permite transformar subproductos para mejorar el cultivo rápido de hongos para ser consumidos por el público en general.

2.2.4. *Valor nutricional de Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens*

Las setas *Pleurotus* contienen proteínas de alto valor nutricional en comparación con las proteínas vegetales, ya que tienen propiedades similares a las proteínas de origen animal. La seta de ostra contiene en su estructura 14% fibra bruta y 57% hidratos de carbono; de los cuales el 47% es fibra dietética, la vitamina C también está presente en grandes cantidades, oscilando entre 90 y 144 mg/100 g de peso seco (Sánchez, 2010, pp.127-203).

Los champiñones Portobello contienen altos valores nutricionales de proteínas 2,09, carbohidratos totales 4,5 g/100g, fibra 1,5 g/100g, energía 27 kcal/100g y bajos en nutrientes grasa bruta 0,33g/100g (Pérez et al., 2010, pp.6-19).

Dado que ambos hongos son bajos en colesterol, son alimentos útiles para las personas con enfermedades cardiovasculares como medio para reducir la obesidad. El equilibrio nutricional entre el contenido de proteínas, el de hidratos de carbono y el de fibra de los *Pleurotus* y los *Agaricus* los convierte en un alimento excepcional.

2.2.5. Variabilidad de sustratos en la producción de hongos comestibles

El potencial biológico de los sustratos para la fructificación de hongos dependerá de su eficiencia biológicas, a las diferencias químicas, biológicas y físicas entre los medios de cultivo, también se debe al genotipo del hongo y a las condiciones en las que se desarrolla el cultivo.

La fase de mayor interés dentro del proyecto es la siembra, ya que se pueden utilizar diferentes sustratos como: bagazo de caña, bagazo de café, tamo de trigo, arroz precocido y cascarilla de arroz., la mayoría de los cuales suelen ser residuos de actividades agroindustriales y agrícolas y, por tanto, se pueden utilizar para la elaboración de hongos comestibles en la extracción de hongos del género *Pleurotus* y *Agaricus* como medios para desarrollarse.

2.3. Bases conceptuales

2.3.1. Fermentación líquida sumergida

La fermentación líquida sumergida ofrece la posibilidad de una alta producción de biomasa en un menor volumen, menor tiempo y mayor control de la contaminación. Si bien la fermentación en sustrato sólido sigue siendo el método elegido para la producción de hongos, habrá un aumento continuo en el desarrollo de la tecnología de fermentación líquida sumergida para producir una biomasa más uniforme y reproducible de hongos. Se ha demostrado que la fermentación líquida sumergida es interesante para productos medicinales valiosos o para la producción de enzimas, debido al procesamiento posterior simple. Una escala comercial depende de una mejor comprensión de los aspectos de ingeniería y bioprocesos para la producción de hongos micelio y metabolitos.

Los principales pasos biotecnológicos para lograr una biomasa micelial altamente nutritiva mediante fermentación líquida sumergida controlada son: (i) preparación del medio de cultivo, (ii) esterilización con vapor del recipiente de cultivo del biorreactor, (iii) inoculación aseptica de medios de cultivo esterilizados con los cultivos puros de cepas de hongos seleccionadas, (iv)

ejecutar los ciclos de cultivo sumergido en condiciones controladas de temperatura, aireación y pH y (v) recolectar, lavar y filtrar los gránulos de hongos obtenidos (Antunes et al., 2020, pp.4-10).

2.3.2. *Micelio*

El cultivo sumergido de hongos es una alternativa prometedora para la producción eficiente de micelio y metabolitos y ha recibido una atención creciente en todo el mundo. Los componentes de los medios de cultivo, incluida la concentración y el tipo de fuentes de carbono y nitrógeno, el pH inicial, el volumen del inóculo y la velocidad de agitación son factores principales que afectan significativamente la producción de biomasa. En lugar de utilizar cuerpos fructíferos como fuente de compuestos bioactivos, el uso de micelios cultivados en cultivo líquido sumergido garantiza un producto más confiable con un mayor nivel de control de su composición. Incluso para la producción de hongos, la producción de semilla líquida ofrece algunas ventajas que incluyen baja contaminación, alta eficiencia, bajo costo y estabilidad en la producción.

La fermentación líquida sumergida brinda la oportunidad de optimizar los rendimientos y permite manipular las propiedades químicas y físicas de los metabolitos mejorando sus bioactividades. Además, como la mayoría de los metabolitos se sintetizan extracelularmente, su recuperación también es mucho más sencilla. Sin embargo, la eventual explotación de la fermentación líquida sumergida o la fermentación en sustrato sólido estará determinada por su productividad y eficacia biológica. Por ejemplo, las propiedades químicas y biológicas del polisacárido producido en cultivo líquido sumergido son bastante diferentes de las sintetizadas por el cuerpo fructífero y, en algunos casos, no se produce polisacárido o carecen de actividad biológica debido a diferencias estructurales.

Cabe señalar que la estructura de polisacáridos en micelio cultivado puede depender de la composición del medio nutritivo utilizado para el cultivo. Además, los polisacáridos extraídos de los cuerpos fructíferos o del micelio cultivado de la misma especie también dependen del método de fraccionamiento utilizado, pero, en general, el contenido total de polisacáridos es mayor en los cuerpos fructíferos (Antunes et al., 2020, pp.11-20).

2.3.3. *Caldo de fermentación*

El caldo de fermentación del cultivo líquido sumergido es rico en polisacáridos extracelulares con bioactividad. En vista de la importancia de los polisacáridos extracelulares, se han hecho muchos intentos para obtener estos compuestos a partir de fermentación líquida sumergida. Las funciones principales de los polisacáridos extracelulares incluyen la adhesión de hongos al

sustrato, la inmovilización de enzimas extracelulares, la prevención de la deshidratación de las hifas, el almacenamiento del exceso de nutrientes y la participación en la degradación de la lignina. El micelio contiene polisacáridos como glucanos (homopolímeros de glucosa), y los produce a menudo en grandes cantidades extracelularmente, en condiciones apropiadas. Los compuestos bioactivos liberados por el caldo de fermentación se vuelven interesantes para varias aplicaciones, como la alimentación animal y los alimentos funcionales.

Los constituyentes del medio mostraron efectos sobre la composición, la estructura y la productividad de los polisacáridos extracelulares. Además, las condiciones óptimas de cultivo sumergido para la máxima producción de polisacáridos extracelulares dependen en gran medida de las especies y cepas utilizadas (Antunes et al., 2020, pp.21-30).

2.3.4. Nutrientes utilizados para el crecimiento de hongos

El crecimiento de los microorganismos está ligado a la presencia de agua. Las sustancias disueltas en el agua, de las que los microorganismos forman su material celular y obtienen energía, son los nutrientes. Las necesidades de los distintos microorganismos con respecto a la composición del medio de cultivo y otras condiciones ambientales son muy variables. A diferencia de otros microorganismos, los requisitos nutricionales de los hongos suelen ser bastante sencillos. El crecimiento de los hongos puede tener lugar en un medio sencillo que sólo contenga unas pocas fuentes de carbono y nitrógeno y algunas sales minerales (Ramírez, 2009, pp.45-51).

2.3.5. Formulación del medio de cultivo

La formulación del medio de cultivo es un paso esencial para el crecimiento de un microorganismo en los procesos de laboratorio, planta piloto y escala industrial. Los componentes del medio de cultivo deben satisfacer los requisitos elementales para la formación de biomasa celular y la producción de metabolitos. En la estequiometría para el crecimiento y la formación de productos de un microorganismo durante el cultivo aeróbico, se establece el siguiente balance de materia y energía (Ramírez, 2009, pp.60-89).

$$\begin{aligned} & \text{Fuente de carbono y energía} + \text{Fuente de nitrógeno} + O_2 + \text{Otros requerimientos} \\ & = \text{Biomasa} + \text{Productos} + CO_2 + H_2O + \text{Calor} \end{aligned}$$

Para la formulación del medio de cultivo y los requerimientos nutricionales de un microorganismo, es necesario partir del conocimiento de su composición elemental. La tabla 3 muestra la composición elemental de un hongo como porcentaje del peso seco.

Tabla 1-1. Composición elemental promedio de un hongo

Elemento	Porcentaje en peso seco
Carbono	40-63
Hidrogeno	-
Nitrógeno	7-10
Fósforo	0.4-4.5
Azufre	0.1-0.5
Potasio	0.2-2.5
Sodio	0.02-0.5
Calcio	0.1-1.4
Magnesio	0.1-0.5
Cloro	-
Fierro	0.1-0.2

Fuente: (Ramírez, 2009, p.6).

2.3.1. Hongos

Todos los hongos pertenecen al reino fungi, un grupo muy diferente al de las plantas y los animales. A diferencia de las plantas, los hongos no producen su propio alimento, sino que dependen de otros compuestos y sus componentes para nutrirse; pueden ser saprofiticos, simbióticos o parasitarios. Forman micelio, que son pequeñas proyecciones en forma de hilo que surgen de las esporas. El micelio, al expandirse y crecer, formará una masa algodonosa blanca llamada micelio, que dará lugar a estructuras reproductivas.

Los hongos están formados por hifas, mientras que los cuerpos fructíferos son estructuras visibles a simple vista en el medio ambiente. Su función principal es producir esporas que se dispersan en el entorno. Los cuerpos fructíferos son estacionales y de corta duración, a diferencia del micelio, que puede persistir en el medio durante cientos de años.

Para obtener el micelio, se lleva a cabo un proceso de fermentación líquido-sólido, en el que el micelio se coloca en un sustrato y crece hasta alcanzar una cepa productiva, y se retiene el agua en parte del sustrato o se homogeneiza en el medio.

Este proceso es una alternativa para la gestión y utilización de diversos subproductos lignocelulósicos, además, al realizar fermentaciones sólidas y líquidas, se mejoran las propiedades físico-químicas de la sustancia, los residuos orgánicos y los nutrientes, que pueden utilizarse como abono del suelo o como fuente de alimentación animal.

2.3.2. *Basidiomicetos*

Los hongos basidiomicetos son un grupo de hongos que incluye más de treinta mil especies que se consideran de alto grado por su complejidad morfológica y la presencia de hongos basidiales, características que definen con precisión su identificación y clasificación taxonómica. Se caracterizan por la producción de esporas sexuales en cuerpos fructíferos llamados basidiocarpos o basidiomas con estructuras especiales llamadas basidiosporas, que al madurar producen cuatro basidiosporas y son expulsadas al exterior. La mayoría de los bacilos producen un micelio bien desarrollado de color blanco, amarillo brillante o naranja, que a menudo se extiende hacia adelante y crece en forma de abanico (Villamizar y Caycedo, 2013).

2.3.1.1. *Ciclo sexual de los basidiomicetos*

En los basidiomicetos, el ciclo sexual generalmente implica la fusión de hifas homocarióticas genéticamente distintas o células de levadura haploides para producir un dicarión, en el que los dos núcleos parentales haploides se replican de manera coordinada sin fusión durante el alargamiento de las hifas, lo que generalmente implica la formación de conexiones de abrazadera. es decir, una estructura similar a un gancho formada por células hifales para asegurar la distribución adecuada de los dos núcleos genéticamente distintos durante las divisiones celulares mitóticas; ver más abajo). Luego tiene lugar la fusión nuclear (cariogamia) en los basidios o en otras estructuras especializadas, después de lo cual el núcleo diploide sufre meiosis para generar basidiosporas haploides (meiosporas) y completar el ciclo de vida (Coelho et al., 2017, pp.4-6).

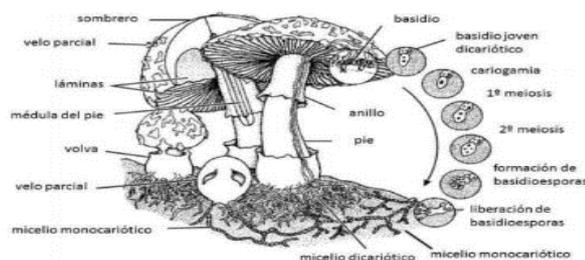


Figura 1-1 Ciclo sexual de los Basidiomicetos

Fuente: (Coelho et al., 2017: pp.4-6).

2.3.3. *Agaricus brunnescens* (Portobello)

Esta especie proviene de la rama del hongo (*Agaricus bisporus*), estas setas son grandes de color marrón en diferentes tonalidades. Tiene una consistencia muy espesa, una carne rica y un sabor muy rico porque se cosecha en una madurez más alta que otras variedades. Las cabezas de estos ejemplares pueden llegar a medir 9 cm de diámetro, por lo que, a pesar de la buena

textura, sabor y color, se asan como la carne. Actualmente, el consumo de Portobello en nuestro país es muy pequeño, pero el potencial es enorme y puede encontrar un nicho de mercado (Freundt- Espinosa, 2003, pp.1-10).

2.3.3.1. Taxonomía *Agaricus brunnescens*

- Nombre científico: *Agaricus brunnescens*
- Clase: Basidiomiceto
- Nombre vulgar: champiñón, portobello
- Forma: hongo tipo sombrero
- Tamaño: 5-9 cm.
- Color: marrón
- Habitación: bosques o lugares húmedos.
- Comestible: grato al paladar.



Figura 2-1 Hongo Portobello en sustrato

Fuente: (Freundt - Espinosa, 2003, pp.1-10).

2.3.3.2. Características del hongo Portobello

El *Agaricus brunnescens* tiene un sombrero redondeado, ligeramente aplanado en la parte superior, durante el proceso de crecimiento, está unido al pie mediante un anillo simple, es decir, girado sólo hacia la base; hacia el final de la fase de desarrollo, se abre, dejando al descubierto las típicas láminas de las agaricáceas. Éstas están libres del tallo y pasan gradualmente de un color rosado a un marrón oscuro con el tiempo.

El sombrero puede alcanzar los 9 cm de diámetro, y el tallo hasta 8 cm de longitud y 3 cm de diámetro, es de color marrón por fuera, pero al cortarlo, el interior es blanco, lo que lo hace muy atractivo. Este hongo es de tipo basidiomiceto de la familia de los Agaricales, largamente cultivado por su uso en la gastronomía (Freundt - Espinosa, 2003, pp.11-13).

Dependiendo del punto de maduración con el que se comercialice, éste se vende bajo el nombre de portobello que es más grande y desarrollado o crimini en estado juvenil, suele mostrar un

tamaño mayor que el champiñón blanco, y como su sombrero es más ancho y aplanado, se lo destina principalmente al consumo inmediato (Freundt - Espinosa, 2003, pp.14-20).

2.3.3.3. Composición química

Tabla 2-1 Composición química hongo Portobello

Agaricus brunnescens	Energía (Kcal.)	Humedad (%)	Proteína (g)	Grasas (g)	Cenizas (g)	Carbohidratos (mg)
Seco	272	10,6	18,1	3,1	4,5	6,7
Fresco	27	90,8	2,0	0,3	0,8	0,7

Fuente: (Freundt - Espinosa, 2003,p.20).

2.3.3.4. Condiciones ambientales para el desarrollo del Portobello

Siempre que la temperatura ambiental esté entre 15-25°C y la humedad entre 70-90%, se pueden cultivar *Agaricus*. La temperatura de desarrollo del micelio es de 28° C, y se detiene cuando supera los 34° C. El contenido de humedad del sustrato debe fluctuar entre 62-67%. El contenido de CO₂ en el medio ambiente juega un papel importante en la fructificación y no debe superar el 0,1% para evitar interferencias negativas. Por tanto, es necesaria una buena aireación (Freundt - Espinosa, 2003, pp.21-29).

2.3.4. *Pleurotus ostreatus*

Son hongos que poseen un sombrero liso, a veces algo escamoso hacia el centro o la base, de 5-10 cm de ancho (o hasta 15 cm), de color grisáceo o marrón grisáceo con tonos o reflejos metálicos. La capa final es blanca o rosa amarillenta cuando está seca, con poca o ninguna unión en la base, bordes más o menos finos y lisos. La carne es blanca, carnosa, menos correosa, de olor y sabor agradables (Ramos, 2010, pp.15-20).

En la parte inferior del sombrero hay unas láminas dispuestas radialmente como las costillas de un paraguas, que van desde el pie o tallo que lo sostiene, hasta el borde del sombrero. Son anchas, espaciadas entre sí, de color blanco o crema, a veces bifurcadas, y en ellas se producen las esporas para la reproducción de la especie. Estas esporas son pequeñas, oblongas, casi cilíndricas, que en gran número forman masas de polvo o esporas, de color blanco con una tonalidad lila-grisácea (Ramos, 2010, pp.21-35).

El tallo suele ser corto, algo lateral u oblicuo, ligeramente duro, blanco, con el comienzo de las láminas en la parte superior y algo peludo en la base. Pueden crecer individualmente en

superficies horizontales o en grupos, formando marcos laterales apilados a ambos lados del árbol (Ramos, 2010, pp.36-42).



Figura 3-1 Hongo *Pleurotus ostreatus*

Fuente: (Ramos, 2010, p. 40).

2.3.4.1. *Taxonomía Pleurotus ostreatus*

- Nombre científico: *Pleurotus ostreatus*
- Clase: Basidiomiceto
- Nombre vulgar: Hongo ostra
- Forma: Concha o ostra
- Tamaño: 0,8 a 11 x 0,3 a 0.4 cm
- Color: blanquecino
- Habitación: bosques o lugares húmedos.
- Comestible: grato al paladar.

2.3.4.2. *Condiciones ambientales para el desarrollo del hongo Pleurotus ostreatus*

Así pues, para el crecimiento micelial como para el desarrollo de los cuerpos fructíferos del hongo es necesario mantener las condiciones ambientales de la siguiente manera:

- ***Temperatura***

Los hongos degradadores de residuos lignocelulósicos crecen y se desarrollan mejor a temperaturas entre 20 - 30°C, con una temperatura óptima de crecimiento de 28°C, ya que se ha demostrado que las cepas de *Pleurotus ostreatus* se desarrollan mejor a esta temperatura, por lo que es necesario controlarla regularmente para mantenerla dentro del rango establecido. Durante la fase de fructificación del hongo, la temperatura oscila entre 16 - 22°C, y también es muy importante controlarla para evitar que la humedad del ambiente afecte a la calidad del producto (Ramos, 2010, p.45).

- ***Humedad del sustrato***

La humedad del sustrato facilitará su degradación, por lo que debe estar entre el 70 - 80%, es importante mantener el rango de humedad durante la fructificación para que el hongo tenga un aspecto agradable y pueda ser comercializado; si hay un exceso de humedad, el desarrollo del micelio se verá frenado, ya que los espacios están llenos de agua y el hongo se ahogará porque no tiene donde depositar sus enzimas, lo que limita la colonización. El contenido de humedad de los hongos es del 90%, por lo que es importante mantener el medio húmedo, especialmente después de la primera cosecha (Quizhpilema, 2013, pp.13-25).

- ***Humedad del ambiente***

La humedad del ambiente debe mantenerse entre 70 - 90% durante el proceso de todo el cultivo para que esta no afecte al desarrollo de los cuerpos fructíferos.

- ***Luz***

Durante la fase de fructificación es muy importante situar el cultivo a la luz natural. Exponerlo a una luminosidad moderada no afecta al crecimiento y desarrollo de los hongos, pero exponerlo directamente a la luz solar sí, ya que no habrá desarrollo micelial o éste se retrasará mucho, y también hay que tener en cuenta que la falta de luz o el exceso de ésta puede provocar el crecimiento de hongos contaminantes que impedirán el crecimiento de los hongos deseados (Quizhpilema, 2013, pp.14-45).

- ***Aireación***

La aireación es muy importante durante la fase de fructificación del hongo, que se desarrolla en concentraciones entre 20.000 y 30.000 ppm de CO_2 . Es necesario ventilar constantemente el aire para evitar el ataque de las bacterias anaerobias que aprovechan la baja cantidad de oxígeno y la alta cantidad de CO_2 para alimentarse e inhibir el crecimiento del hongo. Durante el cultivo del hongo pueden surgir problemas como la contaminación por esporas de otros hongos de crecimiento rápido, el ataque bacteriano, el aumento de CO_2 y el bajo contenido de oxígeno, por lo que para evitarlo se debe realizar un estricto control de la humedad del sustrato y el uso de ventiladores (Ramos, 2010, pp.46-67).

2.3.5. *Micelio*

El cultivo sumergido de hongos es una alternativa prometedora para la producción eficiente de micelio y metabolitos y ha recibido una atención creciente en todo el mundo. Los componentes de los medios de cultivo, incluida la concentración y el tipo de fuentes de carbono y nitrógeno, el pH inicial, el volumen del inóculo y la velocidad de agitación son factores principales que afectan significativamente la producción de biomasa.

En lugar de utilizar cuerpos fructíferos como fuente de compuestos bioactivos, el uso de micelios cultivados en cultivo líquido sumergido garantiza un producto más confiable con un mayor nivel de control de su composición. Incluso para la producción de hongos, la producción de semilla líquida ofrece algunas ventajas que incluyen baja contaminación, alta eficiencia, bajo costo y estabilidad en la producción.

La fermentación líquida sumergida brinda la oportunidad de optimizar los rendimientos y permite manipular las propiedades químicas y físicas de los metabolitos mejorando sus bioactividades. Además, como la mayoría de los metabolitos se sintetizan extracelularmente, su recuperación también es mucho más sencilla.

Sin embargo, la eventual explotación de la fermentación líquida sumergida o la fermentación en sustrato sólido estará determinada por su productividad y eficacia biológica. Por ejemplo, las propiedades químicas y biológicas del polisacárido producido en cultivo líquido sumergido son bastante diferentes de las sintetizadas por el cuerpo fructífero y, en algunos casos, no se produce polisacárido o carecen de actividad biológica debido a diferencias estructurales.

Cabe señalar que la estructura de polisacáridos en micelio cultivado puede depender de la composición del medio nutritivo utilizado para el cultivo. Además, los polisacáridos extraídos de los cuerpos fructíferos o del micelio cultivado de la misma especie también dependen del método de fraccionamiento utilizado, pero, en general, el contenido total de polisacáridos es mayor en los cuerpos fructíferos (Antunes et al., 2020, pp.10-30).

2.3.6. *Compuestos bioactivos*

Investigaciones más recientes han demostrado que muchos basidiomicetos pueden crecer en cultivos sumergidos y producir compuestos bioactivos útiles en los campos de la nutrición, la medicina y los productos farmacéuticos (Dudekula et al., 2020, pp.1-12).

Tabla 3-1. Compuestos bioactivos derivados de diferentes cepas de hongos de cultivo sumergido.

Cepa de hongos	Compuesto bioactivo	Cuerpo fructífero	Micelio
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Proteína cruda	36%	25,70%
	Lípidos totales	2%	3%
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Lípidos no polares	1,50%	4%
<i>Pleurotus ostreatus</i> n° 152	Proteína cruda	36%	40,10%
	Grasa	1,90%	2,60%
<i>P. ostreatoroseus</i>	azúcares libres	26mg/g	58mg/g
	Ácidos orgánicos totales	212 mg/g	91 mg/g
<i>Pleurotus spp. (P-184)</i>	Proteínas	45,20%	15%
	Carbohidratos	27,70%	70,40%
<i>Pleurotus spp.</i>	Proteínas	24,30%	23,30%
	Ácidos grasos	1,60%	1,50%
<i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001	Carbohidratos solubles	19,55%	4,10%
		36,36%	32,10%
	Proteínas	2,30%	10,20%
	Grasas totales		
<i>Agaricus bisporus</i>	Proteínas	46,30%	44,40%
	Grasa	2,80%	2,80%
<i>Agaricus brunneecens</i>	Proteínas	45,90%	47,10%
	Grasa	2,70%	5,80%
<i>Lentinus edodes (Berg)</i>	Proteínas	23-24%	17%
<i>Lentinula edodes</i>	lípidos	4%	20%
<i>Lentinula edodes</i>	Proteínas	26,50%	52,80%
<i>cordyceps militaris</i>	Proteínas	18,47%	21,06%
	Aminoácidos totales	18,57%	28,72%
<i>tubérculo sinense</i>	Aminoácidos umami	1,5mg/g	9,0mg/g
	totales	1883 µg/g	5740,4 µg/g

Cepa de hongos	Compuesto bioactivo	Cuerpo fructífero	Micelio
	Contenido de esteroides		

Fuente: (Kumar et al., 2021, pp. 3-6).

2.3.7. *Honey tek*

Honey tek es una técnica de cultivo que permite la creación y replicación de cultivos líquidos y se basa en la creación de cultivos en medios que aportan lo necesario para el crecimiento y regeneración micelial a base de esporas o micelio. Se suele hacer en una solución de agua y miel natural esterilizada que luego se inocula, pero hay muchas otras recetas (miel de palma, extracto de malta, solución de dextrosa, jarabe de maíz, etc), es un tek flexible ya que se puede hacer fácilmente en frascos de diferentes tamaños, siempre que se mantenga la proporción adecuada entre azúcares y agua (Marrison, 2022).

Este tek tiene la ventaja de no necesitar muchas esporas o micelio para reproducirlo casi infinitamente, a partir de una pequeña porción, se pueden hacer cien jeringas que a su vez se pueden reutilizar para hacer cientos de jeringas.

El propósito de la cultura líquida es facilitar la inoculación sobre sustratos sólidos, además, el riesgo de contaminación es menor porque el cultivo pasa de un entorno estéril (dentro del frasco o biorreactor) a la jeringa estéril y se inyecta en el nuevo entorno estéril en lugar de transferirlo con cuñas de agar, lo que aumenta el riesgo de contaminación, especialmente para los cultivadores menos experimentados (Marrison, 2022).

2.3.8. *Sustratos para crecimiento micelial*

Una gran cantidad de residuos agroindustriales se producen a nivel mundial en diversos sectores agrícolas y por diferentes industrias alimentarias. La eliminación y quema de estos desechos ha creado importantes problemas ambientales globales. Los desechos agroindustriales consisten principalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina, todos los cuales se definen colectivamente como materiales lignocelulósicos. Este desecho puede servir como sustrato adecuado en el proceso de fermentación en estado sólido que involucra hongos. Los hongos degradan sustratos lignocelulósicos a través de la producción de enzimas lignocelulósicas y utilizan los productos degradados para producir sus cuerpos fructíferos.

2.3.8.1. *Pulpa de café*

La pulpa de café ha sido ampliamente considerada para el cultivo de diferentes géneros de *Pleurotus* y *Agaricus*, ya que están compuestos por un alto porcentaje de celulosa (12,40 %), hemicelulosa (39,10 %) y lignina (23,90 %) (Ballesteros et al., 2014, pp.4-9).

La pulpa de café tiene propiedades ideales para el compostaje ya que contiene un alto contenido de azúcar (una fuente de energía), una buena relación carbono-nitrógeno (25 - 30:1) y un tamaño de partícula suficiente, por lo que el compostaje se ha convertido en una alternativa generalizada para el manejo de estos residuos.

2.3.8.2. *Bagazo de caña de azúcar*

Los residuos de la caña de azúcar son generados por la actividad comercial y por las grandes industrias azucareras del mundo. En algunas industrias azucareras se sigue utilizando la combustión del material lignocelulósico como tipo de combustible, pero esta combustión es ineficiente y causa daños al medio ambiente, por lo que se están buscando nuevas formas de utilización de este residuo lignocelulósico (Vallejos et al., 2016, pp.161-164).

La composición de la caña de azúcar es la siguiente: celulosa (43%), hemicelulosa (25%) y lignina (21%). No solo la celulosa y la hemicelulosa pueden ser utilizadas para producir azúcares, sino que la lignina también puede ser utilizada porque contiene ácido p-cumárico y ácido ferúlico (Vallejos et al., 2016, pp.165-169).

2.3.8.3. *Cascarilla de arroz*

Los altos niveles de sílice demostrados limitan su uso como alimento en dietas animales. Uno de los elementos utilizados para quemar la cascarilla de arroz es la celulosa $(C_6H_{10}O_5)_n$, que es el principal componente de este subproducto agrícola fibra. La composición de la cáscara es la siguiente: celulosa 25,89-35,5%, hemicelulosa 18,1-21,35%, lignina 18,20-24,6% (Valverde, 2007, pp.5-8).

2.3.9. *Biorreactor*

Un biorreactor es un recipiente o sistema que mantiene un entorno biológicamente activo. En algunos casos, dentro de un biorreactor se lleva a cabo un proceso químico que involucra un organismo bioquímicamente activo o una sustancia derivada de muchos organismos y puede ser aeróbico o anaeróbico. Los biorreactores suelen ser cilíndricos, con un tamaño que va desde

unos pocos mililitros hasta metros cúbicos, y suelen estar hechos de acero inoxidable y de vidrio (River & Suárez, 2013, pp.45-60).

Variando la velocidad del flujo de alimentación en el biorreactor puede variarse las condiciones ambientales en la fisiología celular, también se puede ajustar el pH de tal forma que en el tanque se mantenga constante (River & Suárez, 2013, pp.61-79).

Este equipo nos permite llevar a cabo una reacción biológica de manera controlada como la temperatura, pH, aireación, por tanto, la construcción de este biorreactor utilizando materiales, instrumentos y equipamiento de laboratorios accesibles y de bajo costo nos permitirá cumplir nuestro desempeño.

2.3.9.1. Dimensionamiento

El dimensionamiento de los biorreactores implica el volumen o el tiempo necesarios para alcanzar los objetivos de producción y la potencia que debe aplicarse a los agitadores y sopladores. Para determinar el volumen o el tiempo, hay que tener en cuenta los balances de masas globales de biomasa, sustrato y producto. Estos dependerán del modo de funcionamiento del reactor y de las hipótesis de dimensionamiento.

2.3.9.2. Tipos de cultivo

- **Cultivo Batch**

Los biorreactores funcionan por lotes, cuentan con etapas de carga, fermentación y descarga, donde se agrega el sustrato al inicio del proceso y se retira el producto al final. El coste del proceso estará ligado al tiempo que se tarde en alcanzar el nivel deseado de conversión o concentración del producto, por lo que es importante medir el tiempo por lotes. Este modo de operación es ampliamente utilizado en la industria, pero se prefiere en procesos donde el producto es de alto valor y donde el riesgo de contaminación puede conducir a pérdidas importantes y donde hay reacciones; reacción química, en la que la velocidad disminuye con al aumentar la temperatura, aumenta la concentración del producto, ya que el tiempo de carga es más corto en estos casos.

- **Cultivo fedbatch**

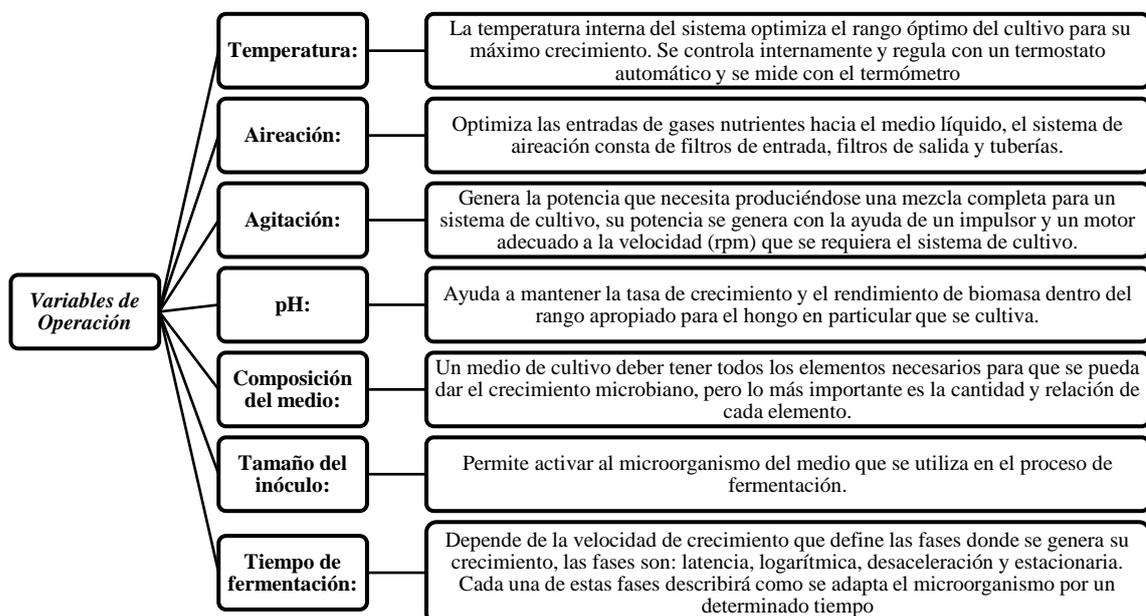
En este modo de operación, uno o más nutrientes se agregan al reactor de forma continua o intermitente durante la producción, pero el producto se retira al final del lote, por lo que no hay

una salida continua. Este método es una mejora sobre el proceso por lotes y una de sus ventajas es que se puede controlar la velocidad y la concentración de la alimentación. Es útil para evitar la inhibición del crecimiento por concentración de sustrato, para lograr una alta producción de biomasa, y también se utiliza para controlar la expresión de ciertos genes cuando depende de la adición de ciertos compuestos.

- **Cultivo continuo**

Los cultivos continuos se pueden operar de diferentes maneras: Chemostat (perfect shake) y Plug Flow (PFR). Se prefiere el cultivo continuo cuando la reacción es autocatalizada, como en el caso del crecimiento celular o productos relacionados con el crecimiento, porque la velocidad de estas reacciones aumenta con la concentración del producto. Algunas de las industrias donde los biorreactores operan continuamente son: procesamiento de MLI, producción de catabolitos y metabolitos, metabolismo con enzimas y producción de levadura de panadería.

2.3.9.3. Variables de Operación



Gráfica 1-2. Variables de operación en un Bioreactor batch.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A.,2022).

Todas estas variables de operación son necesarias considerar al momento de diseñar el tipo de biorreactor elegido (Franco, 2019, pp.17-38).

2.3.9.4. *Tipos de sistemas biológicos*

- **Células y microorganismos anaeróbicos**

La mayoría de las bacterias son microorganismos con descomposición metabólica (catabolismo); generalmente unicelulares, estos microorganismos son autónomos y nutricionalmente independientes (autótrofos); sus células (cuerpo) no respiran (no utilizan la glucólisis para la respiración celular), sino que utilizan vías alternativas, en las que se produce una molécula orgánica durante el metabolismo (catabolismo), utilizada como aceptor de electrones, en un proceso bioquímico llamada respiración oxidativa; Esta molécula se reduce a un producto orgánico en un proceso comúnmente conocido como fermentación.

- **Células y microorganismos aeróbicos**

La mayoría pertenecen al reino de los eucariotas -pero también existen los procariotas- que son microbianos y de respiración celular (utilizan la glucólisis como forma de respiración celular); Por tanto, su metabolismo es constructivo (anabólico) y tienen que obtener los nutrientes de diferentes fuentes. Sus principales grupos están representados por: bacterias y microorganismos aeróbicos, plantas y animales; Sus células pueden cultivarse en suspensiones celulares o en varios arreglos artificiales o modificados.

- **Células y microorganismos facultativos**

Son ambivalentes, tienen la posibilidad de vivir o existir entre ambientes aeróbico (con oxígeno) y anaeróbico (sin oxígeno); son microorganismos con metabolismo mixto, por lo cual tienen la posibilidad de descomponer (catabolizar) y edificar (asimilar) materia orgánica desde diferentes sustratos (materias primas), orgánicos e inorgánicos, mecánicos e inorgánicos. Pese a su variedad, sus primordiales representantes son microorganismos con colaboraciones parasitarias o simbióticas, como hongos y levaduras, por lo cual no permanecen bastante extendidos.

2.3.9.5. *Factores considerados para el diseño del Bioreactor batch*

Variables de la biomasa

❖ *Determinación del número de conidios*

Para verificar el número de conidios del inóculo y su morfología se realizó mediante la cámara de Neubauer o Hemocitometro con 0,100 mm de profundidad y área de 0,0025 mm² (Madigan & Martinko, 2004, pp.144-150).

$$\frac{\text{Conidios}}{\text{mL}} = N^{\circ} \text{ conidios} * 50.000 * FD \quad (\text{E. 1-2})$$

Donde:

$\frac{\text{Conidios}}{\text{mL}}$ = Concentración conidios sobre mililitro

$N^{\circ} \text{ conidios}$ = Total conidios en los 5 cuadrantes

FD = Factor de dilución

50000 = Valor constante de la cámara de neubauer o hemocitometo

❖ *Velocidad específica de crecimiento*

La velocidad de crecimiento dentro de un reactor Batch describe la variación de cierta sustancia, como biomasa o concentración de célula, se utiliza la fase logarítmica como muestra la siguiente ecuación diferencial (Scragg, 1996, pp.191-203).

$$\mu x = \frac{dx}{dt}$$

Donde: (Ec. 2-2)

μ = Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)

dt = Tiempo de incubación (h)

x = Concentración de conidios (conidios/mL)

La velocidad específica puede medirse como la inclinación de la curva de crecimiento cuando el logaritmo natural ln de x se traza con el tiempo. Aplicando logaritmos naturales la velocidad de crecimiento específica puede calcularse mediante la expresión:

Donde:

$$\mu_{Po} = \frac{\ln(Xf) - \ln(Xo)}{(tf - to)} \quad (\text{Ec. 3-2})$$

$$\mu_{Ab} = \frac{\ln(Xf) - \ln(Xo)}{(tf - to)} \quad (\text{Ec. 4-2})$$

μ_{Po} = Velocidad específica de crecimiento *Pleorotus ostreatus*
 μ_{Ab} = Velocidad específica de crecimiento *Agaricus brunnescens*
 X_f = Concentración final de conidios (conidios/mL)
 X_o = Concentración inicial de conidios (conidios/mL)
 t_f = Tiempo final de incubación (h)
 t_o = Tiempo inicial de incubación (h)

❖ *Tiempo de generación*

El tiempo de generación en un reactor batch describe como el tiempo que tarda en duplicarse la población. Se calcula con la siguiente expresión matemática (Madigan & Martinko, 2004, pp.151-165).

$$ge = \frac{0,693}{\mu} \quad (\text{Ec. 5-2})$$

Donde:

μ = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
 ge = Tiempo de generación

❖ *Concentración de Biomasa*

Para cuantificar la biomasa en medio líquido de los 2 hongos se utilizó el método gravimétrico y se determinó el peso seco (Pérez et al., 2017, pp.60-67).

❖ *Concentración de Biomasa por peso húmedo*

$$\begin{aligned}
 & \text{Biomasa Peso húmedo}_{\text{Hongos}} \left(\frac{g}{mL} \right) = \\
 & \left(\frac{\text{Peso papel con biomasa húmeda (g)} - \text{Peso papel filtro (g)}}{\text{Volumen de la muestra (mL)}} \right)
 \end{aligned} \quad (\text{Ec. 6-2})$$

❖ *Concentración de Biomasa por peso seco*

El peso seco se calculó una vez conocido el peso de la biomasa retenida en el papel filtro del *Pleorotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens*.

$$\begin{aligned}
 & \text{Biomasa Peso seco}_{\text{Hongos}} \left(\frac{g}{mL} \right) = \\
 & \left(\frac{\text{Peso papel con biomasa seca (g)} - \text{Peso papel filtro (g)}}{\text{Volumen de la muestra (mL)}} \right)
 \end{aligned} \quad (\text{Ec. 7-2})$$

2.3.9.6. *Propiedades físicas del medio y producto*

❖ **Densidad.**

Para calcular la densidad de los medios de cultivo líquidos se realizó con ayuda de picnómetros, realizando la relación entre el peso del medio y el volumen que ocupa mediante la expresión matemática (McCabe & Smith, 2007, pp.52-67).

$$\rho = \frac{m_l}{V_i} \quad (\text{Ec. 8-2})$$

Donde:

ρ = Densidad del medio (g/mL)

m_l = Peso del medio líquido (g)

V_i = Volumen del medio líquido (mL)

❖ **Viscosidad**

La viscosidad es la propiedad que tienden a oponerse los fluidos por una superficie. La viscosidad presente en los medios líquidos se calculó en un viscosímetro de Brookfield (McCabe & Smith, 2007, pp.68-98).

Donde:

μ_l = Viscosidad del medio líquido (Pa*s).

❖ **pH**

El pH es un factor que influye directamente en el crecimiento del microorganismo, se utilizó un potenciómetro para su medición.

2.3.9.7. *Balance de masa*

❖ **Balances de masa**

Para los balances de masa de los 2 Biorreactores se consideró todos los flujos que entra y sale de cada equipo como muestra la siguiente figura 4-2.



Figura 4-2. Balances de masa

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A.,2022).

Donde:

W = Flujo de agua (g)

M = Flujo de miel (g)

I_i = Flujo de inóculo (g)

P = Flujo producto de micelio (g)

Balance General de materia

$$W + M + I_i = P \quad (\text{Ec. 9-2})$$

2.3.9.8. Dimensionamiento del Biorreactor

❖ Volumen de la cámara de cultivo

Deseando una producción de 2 L de cultivo micelial con un factor de corrección de 25%

V_p = Volumen de producción del Bioreactor (L)

$$V_p = 2L$$

❖ Factor de seguridad volumétrica

$$V_s = V_p * 0,25 \quad (\text{Ec. 10-2})$$

Donde:

V_p = Volumen de producción del Bioreactor (L)

❖ Volumen total

$$V_T = V_p + V_s \quad (\text{Ec. 11-2})$$

$V_T = \text{Volumen Total (L)}$

$V_p = \text{Volumen de Producción (L)}$

$V_s = \text{Volumen de seguridad (L)}$

❖ **Diámetro y Altura de Tanque**

Se dota 2 envases termostáticos cilíndricos circulares rectos con un diámetro interno de 0,06 m y una altura de 0,024 m.

$D_T = 0,06 \text{ m}$

$h_T = 0,24 \text{ m}$

❖ **Sistema de agitación**

Para los 2 envases termoestáticos, se usó 2 barras agitadoras cilíndricas Fisherbrand autoclavables en cada con dimensiones de 5cm * 1cm a 120 rpm en un agitador magnético THERMO SCIENTIFIC S88857100 para evitar cualquier tipo de contaminación en el cultivo líquido micelial del hongo.

Por consiguiente:

$D_i = 0,05 \text{ m}$

$N = 120 \text{ rpm}$

Donde:

$D_i = \text{Diámetro impulsor barra agitadora (m)}$

❖ **Cálculo del número de Reynolds**

$$Re = \frac{ND_i^2 \rho}{\mu} \quad (\text{Ec. 12-2})$$

Donde:

$Re = \text{Número de Reynolds (Adimensional)}$

$N = \text{Número de revoluciones por segundo(rps)}$

$D_i = \text{Diámetro impulsor barra agitadora (m)}$

$\rho = \text{Densidad del medio micelial } \left(\frac{\text{kg}}{\text{m}^3}\right)$

❖ Número de potencia

Para el cálculo de número de potencia se obtiene el número de potencia, que interviene el número de Reynolds y el tipo de impulsor como muestra la figura 5-2 (McCabe y Smith, 2007, p.75).

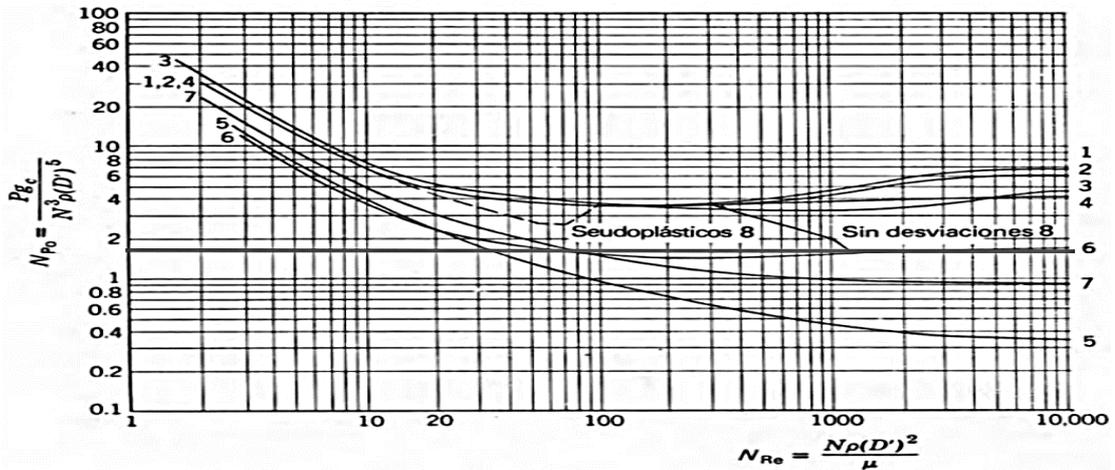


Figura 5-2. Número de Reynolds vs Número de potencia para diferentes tipos de agitadores, la curva 6 representa los agitadores palas inclinadas.

Fuente: (McCabe & Smith, 2007, p.75).

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

❖ Potencia

Una vez obtenido el número de potencia se calcula la potencia requerida de los biorreactores como detalla la siguiente ecuación (McCabe y Smith, 2007, p.65).

$$P_i = N_p * N^3 * D_i^5 * \rho \quad (\text{Ec. 13-2})$$

Donde:

P_i = Potencia requerida

N_p = Número de potencia

❖ Contenido de humedad de los sustratos

Se calculó el contenido de humedad mediante el método por secado en estufa presente en los tres tipos de sustratos con el fin de adquirir un contenido de humedad del 70%, como se detalla la siguiente ecuación:

$$H_s = \frac{P_w - P_s}{P_w} * 100 \quad (\text{Ec. 14-2})$$

Hs = Humedad del sustrato

Pw =Peso húmedo (g)

Ps = Peso seco (g)

❖ **Rendimiento**

$$Ri = \frac{pfh}{psh} * 100 \quad (\text{Ec. 15-2})$$

Ri = Rendimiento del hongo (%)

Pfh =Peso fresco del hongo (g)

Psh = Peso del sustrato húmedo(g)

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. *Tipo de Investigación*

El trabajo técnico: “Construcción de un biorreactor para la obtención de micelio infinito del hongo portobello (*Agaricus brunnescens*) y *Pleurotus ostreatus* mediante la técnica Honey Tek” utilizan un enfoque cuantitativo porque proporciona variables de control.

Según el objetivo de estudio es aplicativo, con un nivel de profundización explicativo y descriptivo en la obtención de micelio infinito de cada cepa de hongo usando un biorreactor de tanque agitado. Según la manipulación de variables es experimental, según el tipo de inferencia es inductiva y tiene un periodo longitudinal.

Este es un proyecto de investigación con soporte de artículos científicos, libros, investigaciones y otras bibliografías relacionadas al tema.

3.2. *Diseño de la Investigación*

3.2.1. *Localización del proyecto*

La investigación se llevará a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular, Genética y Microbiología, de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en la Panamericana Sur km 1 ½, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo a una temperatura promedio de 19 °C, una humedad relativa de 81% y una altitud de 2,756 msnm.

3.2.1.1. *Ubicación geográfica del proyecto*



Figura 6-3 Ubicación geográfica del proyecto

Fuente: (Google Earth Pro, 2022).

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A.,2022).

3.2.2. *Población de estudio*

La población de estudio hace referencia al micelio infinito producido en el Biorreactor, cuya materia prima proveniente de las cepas *Agaricus brunnescens* y *Pleurotus ostreatus* cultivadas, aisladas en medio PDA en el Laboratorio de Biología Molecular, Genética y Microbiología de la Facultad de Ciencias, conservadas a una temperatura de 25°C.

3.2.3. *Tamaño muestra*

Lo compone el total de muestras biomasa micelial recolectadas durante el desarrollo del proyecto, estableciéndose que, por cada hongo se tomará una muestra de su biomasa micelial.

3.2.4. *Método de muestreo*

El tipo de muestreo de la investigación es no probabilístico criterial, prevé un proceso de selección guiado por las características del estudio, más que por criterios estadísticos de generalización.

3.2.5. Técnicas de recolección de datos

La presente investigación utiliza protocolos o normas, y la observación experimental como parte técnica que consiste en contemplar, de forma sistemática y con detenimiento, como se desarrolla el fenómeno; biomasa micelial, con el objetivo de tomar información y registrarla para su posterior análisis, dicha técnica se complementará con el uso de instrumentos mecánicos, entre ellos: termómetro, potenciómetro, termohigrómetro, microscopio, biorreactor de 2,5L, agitador mecánico, termostato automático para acuarios.

3.2.6. Análisis Estadístico

Se utilizará el software Excel para la estadística descriptiva (Tablas y Gráficas) de datos tales como: temperatura, pH, agitación rpm, tiempo de agitación, rendimiento de biomasa micelial, unidades formadoras de colonias, número de conidios formados, diámetro del micelio, entre otros. Cabe recalcar que el análisis de los datos, dependerá del interés analítico del investigador.

3.2.6.1. Estudio observacional del rendimiento

Se observó el crecimiento y fructificación de los hongos *Agaricus brunneus* y *Pleurotus ostreatus* utilizando un diagrama de barras en el software Excel, mediante el cual se compara el porcentaje de rendimiento de los sustratos.

3.2.7. Etapas del proyecto:

3.2.7.1. Etapa 1. Caracterización de forma microscópica y morfológica de *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunneus*.

Se realizó un proceso de siembra, aislamiento, purificación y análisis en laboratorio usando cepas de hongos comerciales, como indica en el Anexo A.

Descripciones de los procedimientos, materiales, reactivos y equipos

❖ **Obtención de esporas (*Agaricus brunneceus* y *Pleurotus ostreatus*)**

La obtención de esporas (*Agaricus brunneceus* y *Pleurotus ostreatus*) como se indica en la tabla 4-3, se efectuó mediante el método de cámara seca.

Tabla 4-3. Obtención de esporas (*Agaricus brunneceus* y *Pleurotus ostreatus*)

Procedimiento	Materiales y reactivos	Equipos (marca)
<p>Se realizó la compra de bandejas de hongo Portobello (marca Guippii) y <i>Pleurotus ostreatus</i> (sin marca).</p> <p>Se desinfectó el área de trabajo con alcohol al 70%.</p> <p>Para el hongo <i>Agaricus brunneceus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> se cortó cuidadosamente la parte inferior que cubre al himenio, lugar donde se encuentran las laminillas y también el pie de la seta.</p> <p>A continuación, se colocaron dentro de cajas de cartón estériles por 3 días.</p> <p>Al finalizar el tercer día se pudo observar una impresión de esporas de cada sombrero.</p>	<p>Materiales</p> <p>Bisturí</p> <p>Papel estéril</p> <p>Cajas de cartón estériles</p> <p>Bandeja de Portobelo (marca Guippii)</p> <p>Bandeja de <i>Pleurotus</i> (sin marca)</p> <p>Reactivos</p> <p>Alcohol al 70%</p>	<p>Cámara de Flujo Laminar (Thermo Scientific Flow 0.9)</p>

Fuente: (Cataño, 2002, p.40).

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).



Figura 7-3. Obtención de esporas mediante cámara seca

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

❖ **Aislamiento de cepas (*Agaricus brunneceus* y *Pleurotus ostreatus*)**

El aislamiento de las cepas (*Agaricus brunneceus* y *Pleurotus ostreatus*) como se indica en la tabla 5-3, se efectuó tomando las esporas obtenidas en impresión por cámara seca.

Tabla 5-3. Aislamiento de cepas (*Agaricus brunneceus* y *Pleurotus ostreatus*)

Procedimiento	Materiales y reactivos	Equipos (marca)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se pesó 3,9 g de agar Sabouraud para 10 cajas Petri cada una de 10mL. ✓ Cada agar se colocó en un erlenmeyer con 50 mL de agua luz, se tapó con papel aluminio y se rotularon para evitar errores. ✓ Se metió los agares y los bisturís en la autoclave por 45 minutos para esterilizarlos y se dejó enfriar durante 5 minutos, se limpió la Cámara de flujo con alcohol al 70% y se introdujeron los materiales esterilizados, se prendió dos mecheros dentro de la Cámara de flujo. ✓ Plaqueamos 5 cajas Petri con agar Sabouraud y las otras 5 con agar PDA, dejar solidificar los agares. ✓ Tomamos un papel con impresión de esporas y cuidadosamente con el bisturí realizamos un raspado sobre el agar, y así sucesivamente en cada caja para ambos hongos. ✓ Se selló con cinta masking las cajas, rotulamos y dejamos incubar a 28°C por un período de 5 días. ✓ Transcurridos esos días purificamos las cepas. 	<p>Materiales</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Cajas Petri ✓ Cinta masking ✓ Erlenmeyers ✓ Bisturís ✓ Papel aluminio ✓ Mecheros ✓ Impresión de esporas <i>Agaricus brunneceus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> <p>Reactivos</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua luz ✓ Agar Sabouraud ✓ Agar PDA (Potatoes Dextrosa Agar) ✓ Alcohol al 70% 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Autoclave (FEDEGARI Autoclavispa 6631) ✓ Incubadora ✓ Cámara de Flujo Laminar (Thermo Scientific Flow 0.9) ✓ Balanza Analítica (AS220.R2)

Fuente: (Cataño, 2002, p.40).

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).



Figura 8-3. Aislamiento de cepas *A. brunneceus* y *P. ostreatus*. en agar PDA

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

❖ Caracterización microscópica

Para la caracterización microscópica de *Agaricus brunnescens* y *Pleurotus ostreatus* como se indica en la tabla 6-3, se usó media gota de azul de metileno y se observó en el microscopio en objetivo 10X.

Tabla 6-3. Caracterización microscópica.

Procedimiento	Materiales y reactivos	Equipos (marca)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se tomó 1mL en tubos de ensayo de cada medio de cultivo líquido micelial cada 24 horas por 15 días. ✓ Se incubó cada muestra por 24 horas, con una micropipeta se extrajo y se insertó una gota del medio de cultivo micelial y se colocó en el portaobjetos, se agrega media gota de azul de metileno y finalmente se agrega el cubreobjetos. ✓ Se observó en el microscopio a objetivo 10X y se registró en fotografías. 	<p>Materiales</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Cubre objetos y portaobjetos ✓ Micropipetas ✓ Tubos de ensayo con tapas <p>Reactivos</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua luz o destilada ✓ Alcohol al 96% ✓ Azul de metilo 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Microscopio ✓ Cámara de flujo ✓ Incubadora

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

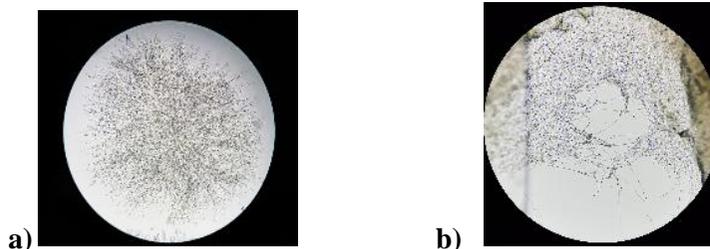


Figura 9-3. Caracterización microscópica (a)*A. brunnescens* y (b)*P. ostreatus*

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

3.2.7.2. *Etapa 2. Determinación de los parámetros para la obtención de micelio de los hongos Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens.*

Para la elección de las variables de producción se tomó como referencia hecha por Bakratsas et al. (2017). Con esta información se aplicó una temperatura de incubación de 28°C, pH de 3,0 a 7, una vez conocido los crecimientos y concentraciones óptimas de los hongos a evaluar para la producción de micelio, se llevaron estos medios a escala laboratorio de 250 mL y se aplicaron agitaciones de 120,140 y 150 rpm por 5 horas para elegir el mejor crecimiento, como se detalla en el Anexo B.

Descripciones de los procedimientos, materiales, reactivos y equipos

❖ **Preparación del caldo Honey Tek.**

La preparación del caldo Honey tek como se indica en la tabla 7-3, se efectuó usando miel de abeja como principal nutriente e inoculando el micelio purificado de las cajas antes sembrada con esporas, como se detalla en el Anexo C.

Tabla 7-3 Preparación del caldo Honey Tek.

Procedimiento	Materiales y reactivos	Equipos (marca)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se agregó 250 mL de agua luz y 7,5 mL de miel dentro del matraz de 250 mL. ✓ Se sometió a baño maría para acelerar la dilución de la miel y se homogenizó completamente. ✓ El mismo procedimiento se realizó para el otro matraz. ✓ Ambos matraces se sellaron con papel aluminio, se realizó un pequeño orificio y luego se cubrió con cinta micropore para favorecer la aireación. ✓ Se esterilizó por 40 minutos a 115°C y 1 psi en la autoclave. ✓ Terminada la esterilización, se dejó enfriar hasta obtener una temperatura de 28°C. ✓ Se desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol al 96% y se introdujeron los medios líquidos, bisturís, y cajas Petri con las cepas de <i>Agaricus brunnescens</i> y 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Materiales ✓ Cepas purificadas de <i>Agaricus brunnescens</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>. ✓ Bisturís ✓ Cinta micropore ✓ Erlenmeyers ✓ Franela ✓ Cinta masking ✓ Mecheros ✓ Probetas 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cámara de Flujo Laminar (Thermo Scientific Flow 0.9) ✓ Autoclave (FEDEGARI Autoclavispa 6631) ✓ Baño de maría ✓ Agitador magnético/reverbero (Thermo Scientific S88857100)

<p><i>Pleurotus ostreatus</i>.</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Se cortó y se agregó 2.5 g de micelio purificado (<i>Agaricus brunneceus</i>) en el primer erlenmeyer, el mismo procedimiento se realizó para el micelio purificado <i>Pleurotus ostreatus</i>. ✓ Se agregó una barra de agitación magnética a cada Erlenmeyer y se agitó por 5 hora a 120rpm a 28°C usando un agitador magnético/reverbero y se incubó por 19 horas a 28°C. ✓ Se repitió la agitación e incubación por 15 días teóricos, C, hasta que observar los primeros pallets de micelio. 	<p>✓ Reactivos</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua luz ✓ Agua estéril ✓ Miel de abeja ✓ Hipoclorito de sodio ✓ Alcohol al 70% 	
---	---	--

Fuente: (Bravo, 2017, pp. 4-7).

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

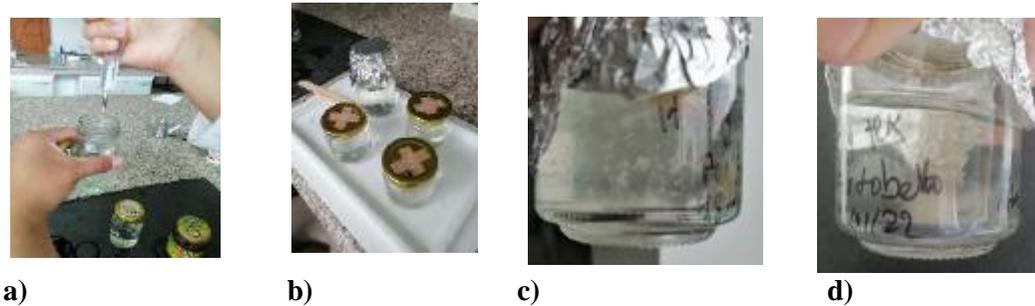


Figura 10-3 (a)Preparación caldo Honey tek. (b) Colocación de cinta micropore. (c) y (d) Crecimiento micelio *Pleurotus ostreatus* *Agaricus brunneceus* respectivamente.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

❖ Preparación Honey Tek prototipo

Para la preparación de Honey tek a escala piloto como se indica en la tabla 8-3, se tomó en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas pre experimentales, como se detalla en el Anexo D.

Tabla 8-3 Preparación Honey tek a escala piloto.

Procedimiento	Materiales y reactivos	Equipos (marca)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se agregó 2000 mL de agua luz y 60 mL de miel dentro del envase del biorreactor de 2,5 L. ✓ Se sometió a baño maría para acelerar la dilución de la miel y se homogenizó completamente. ✓ Ambos matraces se sellaron con papel aluminio, se realizó un pequeño orificio y luego se cubrió con cinta micropore para favorecer la aireación. ✓ Se esterilizó por 45 minutos a 115°C y 1 psi en la autoclave. ✓ Terminada la esterilización, se dejó enfriar hasta obtener una temperatura de 28°C. ✓ Se desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol al 96% y se introdujeron los medios líquidos, bisturís, y cajas Petri con las cepas de <i>Agaricus brunneceus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>. ✓ Se cortó y se agregó 10 g de micelio purificado (<i>Agaricus brunneceus</i>) en el primer Biorreactor, el mismo procedimiento se realizó para el micelio purificado <i>Pleurotus ostreatus</i>. ✓ Se agregó una barra de agitación de 5cm magnética a cada Biorreactor y se agitó por 5 horas a 120rpm a 28°C usando un agitador magnético/reverbero y se incubó por 19 horas a 28°C. ✓ Se repitió la agitación e incubación hasta completar los 15 días teóricos, hasta que observar los primeros pallets de micelio. 	<p>Materiales</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Cepas purificadas de <i>Agaricus brunneceus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>. ✓ Cinta micropore ✓ Erlenmeyers ✓ Franela ✓ Cinta masking ✓ Mecheros ✓ Probetas <p>Reactivos</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua luz ✓ Miel de abeja ✓ Alcohol al 70% 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cámara de Flujo Laminar (Thermo Scientific Flow 0.9) ✓ Autoclave (FEDEGARI Autoclavispa 6631) ✓ Agitador magnético/reverbero (Thermo Scientific S88857100)

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).



Figura 11-3. Preparación Honey tek prototipos (a)*Pleurotus o.* (b) *Agaricus b.*

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

❖ **Determinación del número de conidios y curva de crecimiento.**

Para la determinación del número de conidios y curva de crecimiento de *Agaricus brunnecens* y *Pleurotus ostreatus* como se indica en la tabla 9-3, se usó la cámara de Neubauer y se contó en cinco cuadrantes de la misma, como se detalla en el Anexo F.

Tabla 9-3. Determinación del número de conidios y curva de crecimiento.

Procedimiento	Materiales y reactivos	Equipos (marca)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se tomó 1mL en tubos de ensayo de cada medio de cultivo líquido micelial cada 24 horas por 15 días. ✓ Se incubó cada muestra por 24 horas. ✓ Se tomó una muestra, y con una micropipeta extrajo y se insertó una gota del medio de cultivo micelial y se colocó en la cámara de Neubauer. ✓ Se observó en el microscopio a 10X. ✓ Se determinó el cuadrante central de la cuadrícula, y se realiza el conteo de los conidios en 5 cuadrantes. ✓ Se calcula el total de conidios mediante la ecuación antes ya descrita. ✓ Se realizó la curva de crecimiento entre Concentración de conidios/mL vs Tiempo. 	<p>Materiales</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Tubos de ensayo con tapa ✓ Micropipetas ✓ Gradilla ✓ Marcador Sharpie ✓ Vasos de precipitados 100 mL ✓ Mechero <p>Reactivos</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua luz o destilada ✓ Alcohol al 96% 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Microscopio ✓ Cámara de Neubauer o Hemocitometro 0,100 m de profundidad y área de 0,0025 mm² ✓ Cámara de flujo ✓ Incubadora

Fuente: (Colcha et al., 2016: pp.28-29).

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).



Figura 12-3. Determinación del número de conidios en cámara de Neubauer.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

3.2.7.3. Etapa 3. Características fisicoquímicas de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens*.

Para la determinación de las características fisicoquímicas de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens*, se utilizó como base metodologías de técnicas de laboratorio que se realizaron en el laboratorio de microbiología de la facultad de ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, excepto el análisis de proteínas se realizó en el laboratorio acreditado LASA localizado en la ciudad de Quito.

Descripciones de los procedimientos, materiales, reactivos y equipos

❖ Determinación de la temperatura

En la determinación de la temperatura se utilizó un termómetro de mercurio y un termómetro digital en base a la norma técnica APHA 2550 B como detalla el Anexo B.

❖ Determinación del pH

En la determinación del pH se utilizó un potenciómetro OAKLON PC 2700 muestras de 20 mL para cada cultivo líquido como detalla el Anexo B.

❖ Determinación de la densidad en los medios de cultivo líquidos

La densidad presente en los medios de cultivo líquidos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* se utilizó el método del picnómetro, realizando la relación entre el peso del medio y el volumen que ocupa como detalla la Ecuación 8-2 y Anexo B.

❖ Determinación de la viscosidad

La viscosidad dinámica presente en los medios líquidos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* se calculó en un viscosímetro de Brookfield VISCOLEAD ADV de acero inoxidable AISI 316 como detalla el Anexo B.

❖ **Determinación de las proteínas.**

La determinación de las proteínas de los medios líquidos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* transcurridos los 20 días se realizó mediante el método de Kjeldahl según Méndez (2020), en el laboratorio acreditado LASA localizado en la ciudad de Quito como detalla en el Anexo L y Anexo M.

❖ Determinación de Biomasa por peso húmedo

Para la determinación de biomasa por peso húmedo de *Agaricus brunneceus* y *Pleurotus ostreatus* como se indica en la tabla 10-3, se centrifugaron las muestras y se filtraron por papel filtro.

Tabla 10-3 Determinación de Biomasa por peso húmedo.

Procedimiento	Materiales y reactivos	Equipos (marca)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se tomaron muestras cada 3 días hasta completar los 15 días de incubación. ✓ Se tomaron muestras de 5 mL de solución inicial de cultivo líquido micelial <i>Pleorutus ostreatus</i> y <i>Agaricus brunneceus</i> y se colocó en 2 tubos de ensayos cada hongo. ✓ Se centrifugó los tubos a 4000 rpm por un tiempo de 15 minutos. ✓ Se pesó el papel filtro ✓ Se filtró cada muestra de cultivo micelial con agua destilada hasta que deje de escurrir. ✓ Se pesó la muestra de biomasa retenida del papel filtro. ✓ Se calculó el peso húmedo de la biomasa de ambos hongos <i>Pleorutus ostreatus</i> y <i>Agaricus brunneceus</i> mediante la ecuación ya descrita. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Materiales ✓ 10 tubos de ensayo con tapas. ✓ 2 jeringas de 10 mL ✓ 10 papeles filtro ✓ 10 envases ✓ Probetas ✓ Reactivos ✓ Agua destilada ✓ Alcohol al 96% 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Centrifugadora (..) ✓ Balanza analítica (..)

Fuente: (Sánchez, 2012, pp. 7-8).

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).



Figura 13-3. Determinación de Biomasa por peso húmedo

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

❖ **Determinación de Biomasa por peso seco**

Para la determinación de biomasa por peso seco de *Agaricus brunnecens* y *Pleurotus ostreatus* como se indica en la tabla 11-3, las muestras antes ya centrifugadas fueron sometidas a una temperatura de 105°C en una estufa, como se detalla en el Anexo G.

Tabla 11-3 Determinación de Biomasa por peso seco.

Procedimiento	Materiales y reactivos	Equipos (marca)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se continuó este proceso una vez conocido el peso de la biomasa retenida en el papel filtro del <i>Pleorutus ostreatus</i> y <i>Agaricus brunnecens</i>. ✓ Se llevó las muestras a una estufa, a una temperatura de 80-105°C por un tiempo de 3 horas. ✓ Se pesó la muestra de biomasa retenida del papel filtro. ✓ Se calculó el peso húmedo de la biomasa de ambos hongos <i>Pleorutus ostreatus</i> y <i>Agaricus brunnecens</i>. 	<p>Materiales</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 10 tubos de ensayo con tapas. ✓ 2 jeringas de 10 mL ✓ 10 papeles filtro ✓ 10 envases ✓ Probetas <p>Reactivos</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua destilada ✓ Alcohol al 96% 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Centrifugadora (..) ✓ Balanza analítica (..)

Fuente: (Sánchez, 2012, p. 9).

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).



Figura 14-3. Determinación de Biomasa por peso seco

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

3.2.7.4. *Etapa 4. Observación del tiempo de colonización de micelio de los hongos Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens en sustratos*

Para la observación del tiempo de corrida de micelio líquido de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* obtenido de los biorreactores, se evaluó el tiempo de colonización de micelio en tres tipos de residuos o sustratos (pulpa de café, bagazo de caña y cascarilla de arroz) a diferentes dosis (20 mL, 15 mL, 10 mL, 5mL), como se detalla en la tabla 12-3 y y Anexo H.

Tabla 12-3. Evaluación tiempo de colonización de *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* en tres tipos de sustratos a diferentes concentraciones.

SUSTRATO	T1(20 mL)	T2 (15 mL)	T3 (10 mL)	T4 (5 mL)
S1	S1T1	S1T2	S1T3	S1T4
S2	S2T1	S1T2	S2T3	S2T4
S3	S3T1	S3T2	S3T3	S3T4

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

S: Sustrato

S1= Cascarilla de Arroz

S2= Bagazo de caña

S3= Pulpa de café

T: Dosis

T1= 20 mL

T2= 15 mL

T3= 10 mL

T4= 5 mL

❖ **Preparación de los sustratos (pulpa de café, cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar)**

La preparación de los sustratos como se indica en la tabla 13-3, se efectuó tomando muestras representativas de los mismos.

Tabla 13-3 Preparación de los sustratos (pulpa de café, cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar)

Procedimiento	Materiales y reactivos	Equipos (marca)
<ul style="list-style-type: none"> ✓Se colocó en el desecador cada uno de los residuos durante 12 horas. ✓Se procedió a moler a un diámetro de 2cm los residuos completamente secos. ✓Se remojó los residuos por 48 horas luego se escurrió utilizando la prueba de puño. ✓Se colocó 100 gramos de cada residuo en envases pequeños autoclavables. ✓Se esterilizó los 6 envases de residuos a 115°C, 1 psi por 40 minutos en la autoclave. ✓Se extrajo 6 mL de micelio <i>Agaricus brunneus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> crecido en medio líquido y se inoculó 2 mL en cada sustrato. ✓Se incubó por 7 días a 28°C, transcurrido los días se observó y registró el tiempo de colonización de micelio de cada cepa sobre cada sustrato. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓Materiales ✓Residuos pulpa de café, cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar ✓6 recipientes autoclavables con capacidad de 125 gramos. ✓Balde ✓2 jeringas de 10 mL ✓Papel Aluminio ✓Mecheros ✓Reactivos ✓Agua luz ✓Alcohol al 96% 	<ul style="list-style-type: none"> ✓Secador de bandejas tipo armario (FC-L.PI-02) ✓Molino ✓Autoclave (FEDEGARI Autoclavispa 6631) ✓Cámara de Flujo Laminar (Thermo Scientific Flow 0.9) ✓Balanza Analítica (AS220.R2) ✓Incubadora

Fuente: (Cueva, 2015, p. 32-35).

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).



Figura 15-3. Preparación de la pulpa de café, cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar, (izquierda) *P. ostreatus* y (derecha) *A. brunneus* respectivamente.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

❖ **Inoculación de *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* en sustratos (pulpa de café, cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar)**

La inoculación de los sustratos como se indica en la tabla 14-3, se efectuó tomando muestras representativas de los sustratos y se agregó 20 mL, 15 mL, 10 mL y 5 mL respectivamente del medio líquido.

Tabla 14-3. Inoculación de *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* en sustratos (pulpa de café, cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar).

Procedimiento	Materiales y reactivos	Equipos (marca)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se limpio la cámara de flujo laminar con alcohol al 70%. ✓ Se introdujo las fundas con sustratos ya antes esterilizadas y las diluciones seriadas realizadas. ✓ Se prendió dos mecheros. ✓ Con ayuda de las jeringas se tomaron 20 mL, 15 mL, 10 mL, 5 mL de cultivo liquido micelial (<i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Agaricus brunnescens</i>) y se inyectó a cada sustrato. ✓ Los sustratos listos fueron llevados al invernadero ubicado en la Facultad de Recursos Naturales. 	<p>Materiales</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Jeringas ✓ Cinta micropore ✓ Fundas de basura negras ✓ Franela ✓ Cinta masking ✓ Mecheros <p>Reactivos</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua luz ✓ Hipoclorito de sodio ✓ Alcohol al 70% 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cámara de Flujo Laminar (Thermo Scientific Flow 0.9)

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).



Figura 16-3. Inoculación de *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* sobre sustratos

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

3.2.7.5. Esquema del proceso

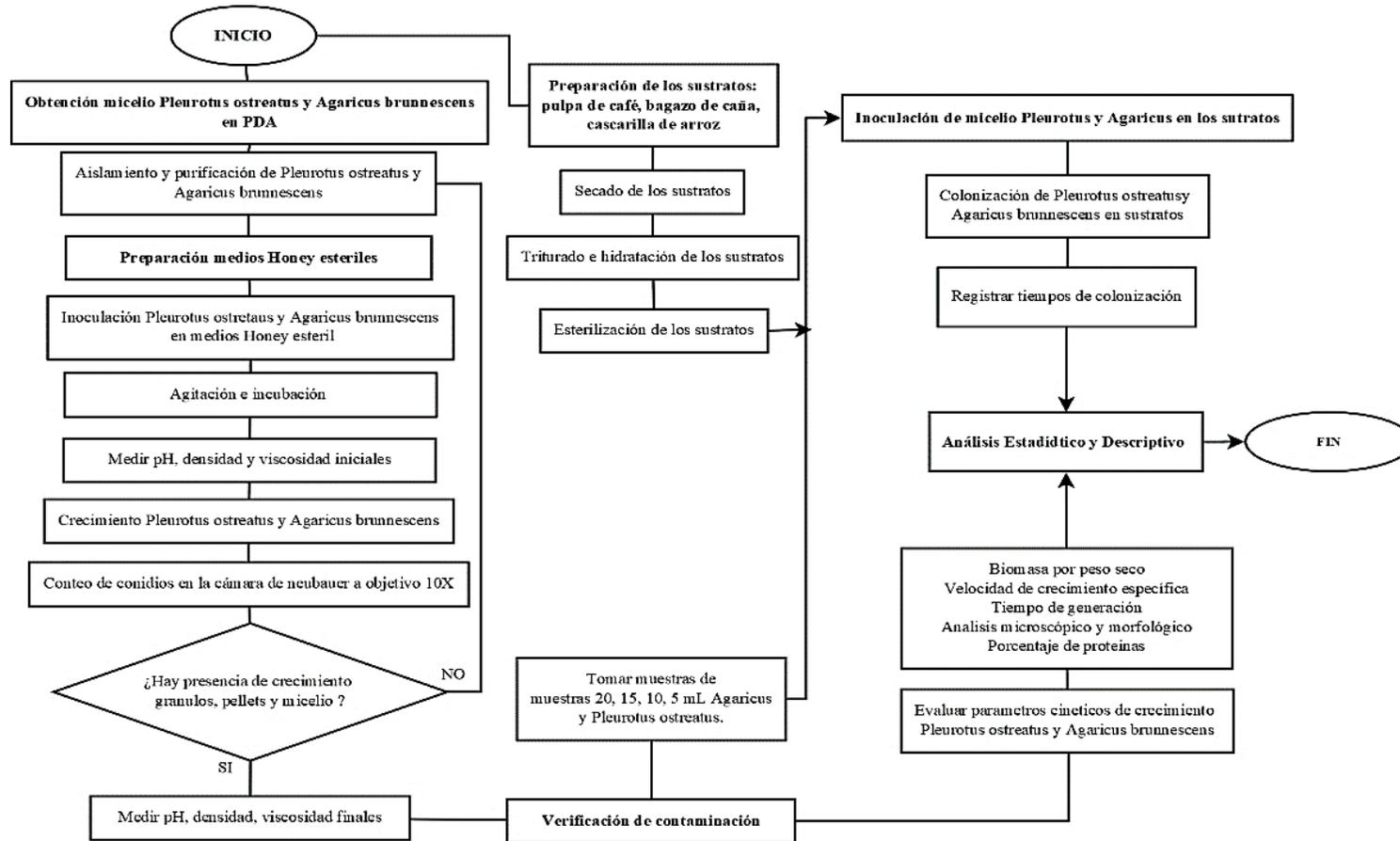


Figura 17-3. Esquema del proceso

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

3.2.8. Cálculos

3.2.8.1. Propiedades físicas del medio y producto

❖ Cálculos de las densidades.

Se realizaron 2 mediciones de la densidad antes y después del proceso de cada cultivo líquido de cada Biorreactor.

Tabla 15-3. Valores experimentales de la densidad final

Inóculo Hongo	Densidad Final (g/mL)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,9899
<i>Agaricus brunnescens</i>	1,0023

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

❖ Cálculos de las viscosidades

Tabla 16-3. Valores experimentales de la viscosidad final

Inóculo Hongo	Viscosidad Final (kg/ms)* 10 ⁻⁴
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1,8
<i>Agaricus brunnescens</i>	1,4

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

3.2.8.2. Balances de masa

❖ Balances de masa

Para los balances de masa de los 2 Biorreactores se considerará todos los flujos que entran y salen de cada equipo como muestra la siguiente figura.



Figura 18-3. Transferencias de masa de los biorreactores

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

Balance General de la materia

Conociendo los valores máxicos y concentraciones de cada uno de los nutrientes necesarios para la producción de 2L de agua y las densidades respectivas.

$$\rho_{agua} = 1 \frac{g}{mL}$$

$$\rho_{agua} = 1 \frac{g}{mL} * \frac{2000 mL}{1} = 2000g$$

$$\rho_{miel} = 1,403 \frac{g}{mL} * \frac{60 mL}{1} = 84,18g$$

Tabla 17-3. Datos para el balance de masa

Compuestos	Cantidad	Cantidad en masificación (g)
Agua	2000 mL	2000 g
Miel	60 mL	84,18 g
Inóculo	10 g	10 g

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

Balance General de materia

Usando la Ecuación 9-2:

$$W + M + I_i = P$$

$$2000 + 84,18 + 10 = P$$

$$P = 2094,18 g$$

Cada biorreactor tiene un producto líquido micelial de 2094,18 g luego de 15 días de masificación en el biorreactor

3.2.8.3. Cálculos para el diseño del Biorreactor

Volumen de la cámara de cultivo

Deseando una producción de 2 L de cultivo micelial con un factor de corrección de 25%.

❖ Factor de seguridad volumétrica

Usando la Ecuación 10-2:

$$V_s = 2 * 0,25$$

$$V_s = 0,5 L$$

❖ Volumen total

Usando la Ecuación 11-2:

$$V_T = 2 + 0,5$$

$$V_T = 2,5 L = 0,025 m^3$$

❖ Diámetro y Altura del Tanque

Se dota 2 envases termostáticos cilíndricos circulares rectos con un diámetro interno de 0,06 m y una altura de 0,24 m.

$$D_T = 0,06 m$$

$$h_T = 0,24 m$$

❖ Sistema de agitación

Para los 2 envases termostáticos, se usará 2 barras agitadoras cilíndricas Fisherbrand autoclavables en cada con dimensiones de 5cm * 1cm a 120 rpm en un agitador magnético THERMO SCIENTIFIC S88857100 para evitar cualquier tipo de contaminación en el cultivo líquido micelial del hongo.

Por consiguiente:

$$D_i = 0,05 m$$

$$N = 120 rpm$$

Donde:

D_i = Diámetro impulsor barra agitadora (m)

No se consideró usar agitadores mecánicos porque en las pruebas pre experimentales presentaron contaminación en el cultivo micelial del hongo, los agitadores mecánicos requieren

el uso de lubricantes y al sellarse herméticamente debe regularse constantemente sus condiciones de cultivo.

❖ **Cálculo del número de Reynolds**

Usando la Ecuación 12-2:

$$R_e = \frac{\left(\frac{120 \text{ rpm}}{60 \text{ rps}}\right)(0,05\text{m})^2(989,9 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3})}{0,0018 \frac{\text{kg}}{\text{ms}}}$$

$$R_e = 2749,72$$

Número de Reynold *Agaricus brunnescens*

$$R_e = \frac{\left(\frac{120 \text{ rpm}}{60 \text{ rps}}\right)(0,05\text{m})^2(1002,3 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3})}{0,0014 \frac{\text{kg}}{\text{ms}}}$$

$$R_e = 3579,64$$

$10 < R_e < 10000$ es régimen transitorio

❖ **Cálculo del número de potencia**

Usando la Figura 5-2, se obtiene:

Número de potencia *Pleurotus ostreatus*

$$N_p = 1,7$$

Número de potencia *Agaricus brunnescens*

$$N_p = 1,9$$

❖ **Cálculo de la potencia**

Usando la Ecuación 13-2:

Potencia *Pleurotus ostreatus*

$$P_i = 1,7 * \left(\frac{120\text{rpm}}{60\text{rps}}\right)^3 * (0,05\text{m})^5 * (989,9 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3})$$

$$P_i = 0,004201 \text{ W}$$

Potencia *Agaricus brunnescens*

$$P_i = 1,9 * \left(\frac{120rpm}{60rps}\right)^3 * (0,05m)^5 * (1002,3 \frac{kg}{m^3})$$

$$P_i = 0,00476 W$$

3.2.8.4. Cálculo del contenido de humedad de los sustratos

Conociendo que el peso seco de cada sustrato a evaluar equivale a 500 gramos, se desea saber el peso húmedo para conseguir una humedad al 70% y usando la Ecuación 14-2:

$$P_s = 200 \text{ g}$$

$$200 \text{ g } \textit{Peso seco} * \frac{0,70 \text{ g } \textit{agua}}{0,30 \text{ g } \textit{peso seco}} =$$

$$P_w = 466,67 \text{ g } \textit{Peso húmedo}$$

3.2.8.5. Dimensionamiento del Biorreactor

❖ Tapas del Biorreactor

En base a los cálculos de la geometría propuesta para los 2 biorreactores prototipos tendrán un volumen de 2,5 L, 6 cm de diámetro y de altura 24 cm, se dotará 2 tapas succionadoras herméticas de 2,5 L de capacidad que se utilizan en equipos de succión rodante YX 930D, cada tapa posee 2 orificios de ¼”, uno para succión y otro para facilitar el intercambio de oxígeno, se visualiza en el Anexo E.

❖ Construcción de Tuberías

Se usará 2 tubos de succión ¼” 360 tipo cánula Yankauer estériles de 3,6 metros, luego en una cámara de flujo se cortará con un bisturí 45 cm de largo, para luego insertar el tubo en la tapa succionadora hermética.

Los tubos de succión ¼” 360 tipo cánula Yankauer poseen puertos de inyección de 5cm de largo, en base a estos puertos se dotará de jeringas estériles de 60 mL para favorecer la succión y extraer muestras de micelio, se visualiza en el Anexo E.

Tabla 18-3. Dimensionamiento para los dos biorreactores

Descripción	Simbología	Cantidad	Indicador
Volumen de la cámara de cultivo	Vp	2	L
Volumen Total	VT	2,5	L
Diámetro	DT	0,06	m
Altura	hT	0,24	m
SISTEMA DE AGITACIÓN			
Diámetro impulsor barra agitadora	Di	0,05	m
Velocidad de agitación	N	120	rpm
Potencia <i>Pleurotus ostreatus</i>	Po	0,004201	W
Potencia <i>Agaricus brunnescens</i>	Po	0,00476	W

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

❖ Tipos de materiales

Tabla 19-3. Materiales utilizados en la construcción de los biorreactores

Denominación	Características	Cantidad
Envases termostáticos autoclavables	2,5 L de capacidad	2
Barras agitadoras cilíndricas Fisherbrand autoclavables	5 cm*1 cm	2
Tubos de succión 1/4" 360 cánula Yankauer	3,6 m largo	2
Tapas succionadoras herméticas equipos de succión rodante YX 930D	6 cm diámetro	2
Jeringas estériles	60 mL	10
Pistola termómetro infrarrojo	-	1
Recipiente de vidrio rectangular	Largo 38 cm*ancho 21 cm*base 24,5 cm	1
Termostato automático para acuarios HX-906 AC110 V	25 W capacidad 80L	2

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

❖ **Materiales utilizados en el invernadero**

Tabla 20-3. Materiales utilizados en el invernadero

Denominación	Material	Cantidad
Fundas Ziploc	Polietileno	30
Fundas Autoclavables Yipak 190mm*360mm	Polipropileno y cartón	60
Alacena 3 pisos 3,50 m largo, altura 1,2 m; base 50 cm*3,50m	Madera	1
Carpa negra 10 m*5 m	Polietileno	1
Baldes 5 L	Plástico	10
Cinta skotch grande	Polietileno	3
Clavos	Cobre	20
Martillo	Acero	1
Pulverizador agua 2 L	Polietileno	1

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

CAPÍTULO IV

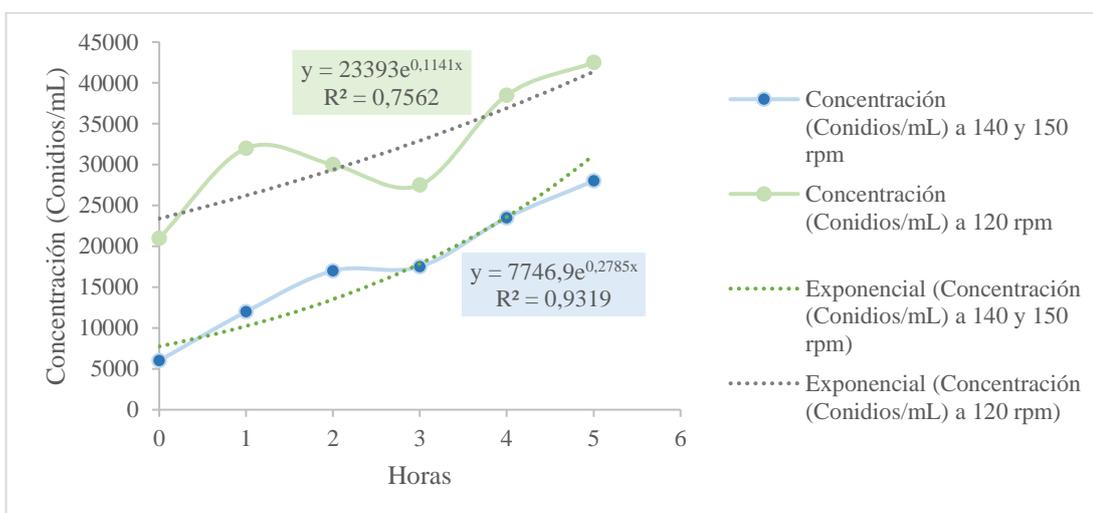
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados pruebas preexperimentales

Las variables de operación fueron elegidas a partir de los resultados obtenidos en las pruebas pre experimentales tales como: temperatura óptima 28 C, velocidad de agitación 120 rpm.

Según la investigación de Bakratsas et al., (2016), demuestra que a una temperatura óptima de 28 C y velocidad de agitación de 120 rpm favorece el crecimiento de hongos en medio líquido ya que las células fúngicas reciben los nutrientes para metabolizarlos y crear gránulos de esferas de micelio de numerosos tamaños.

Los resultados obtenidos indican las concentraciones de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* en Honey Tek. a diferentes agitaciones, como se indica en la gráfica 2–4 y en la gráfica 3–4 y se detallan en el Anexo I. Donde se tomó la velocidad de agitación óptima de 120 rpm para las pruebas a escala laboratorio.



Gráfica 2-4. Indica la curva crecimiento preexperimental *Pleurotus ostreatus* a diferentes velocidades de agitación.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

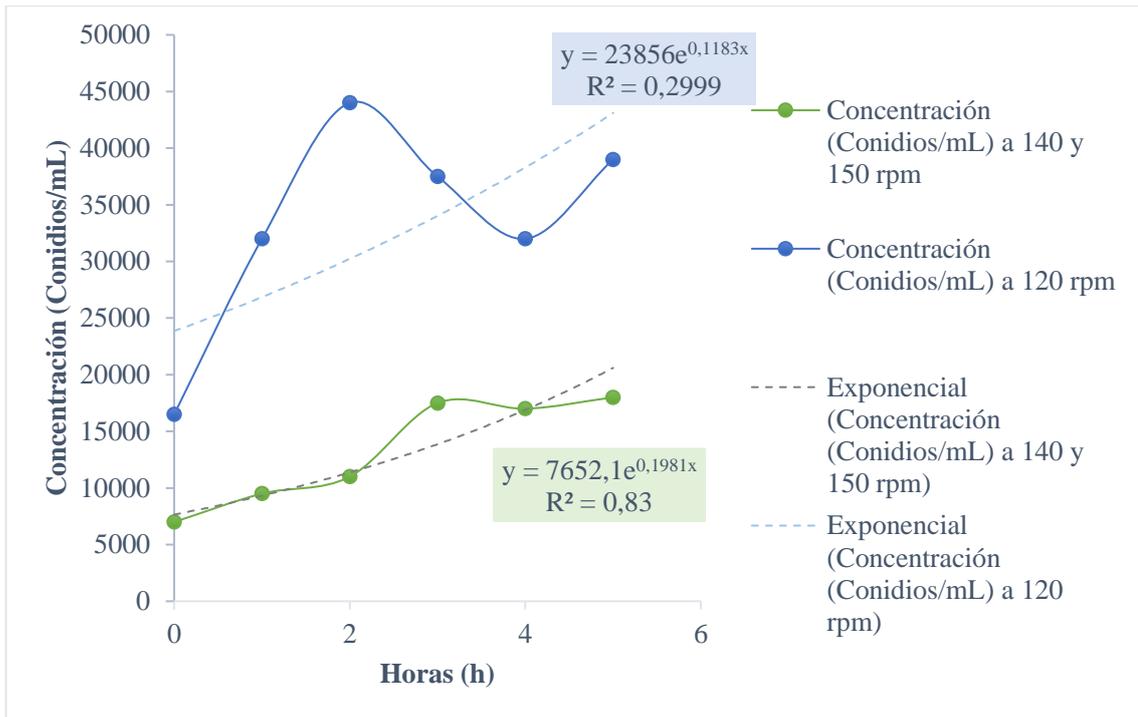
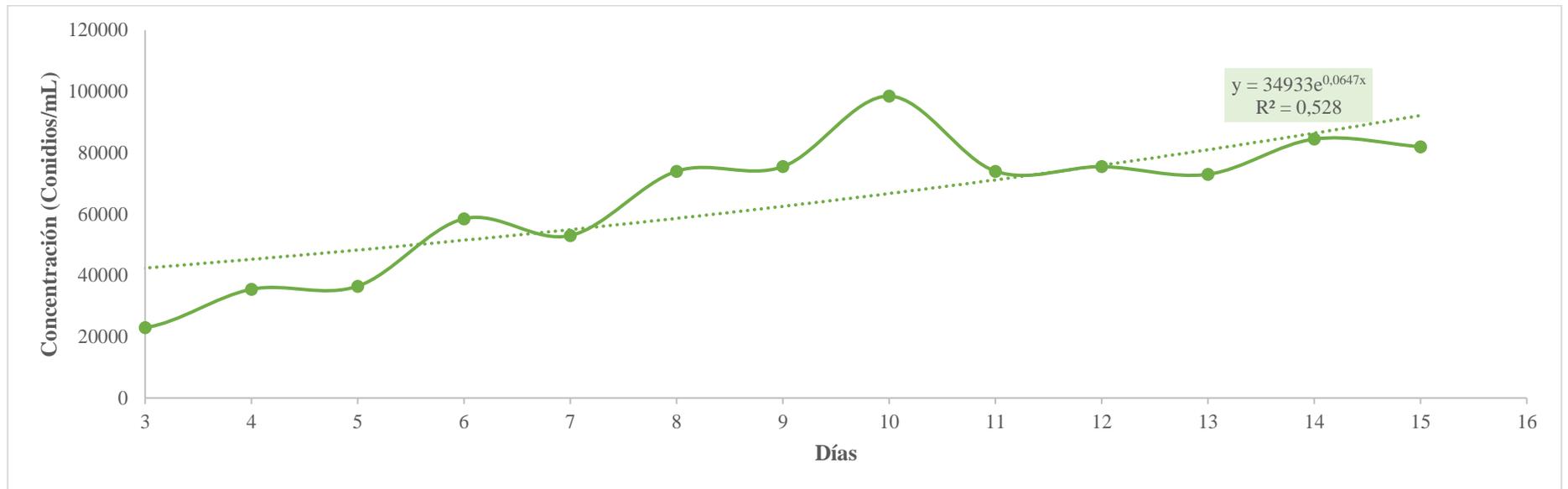


Gráfico 3-4. Indica la curva crecimiento preexperimental *Agaricus brunnescens*

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A.,2022).

4.2. Resultados a escala laboratorio

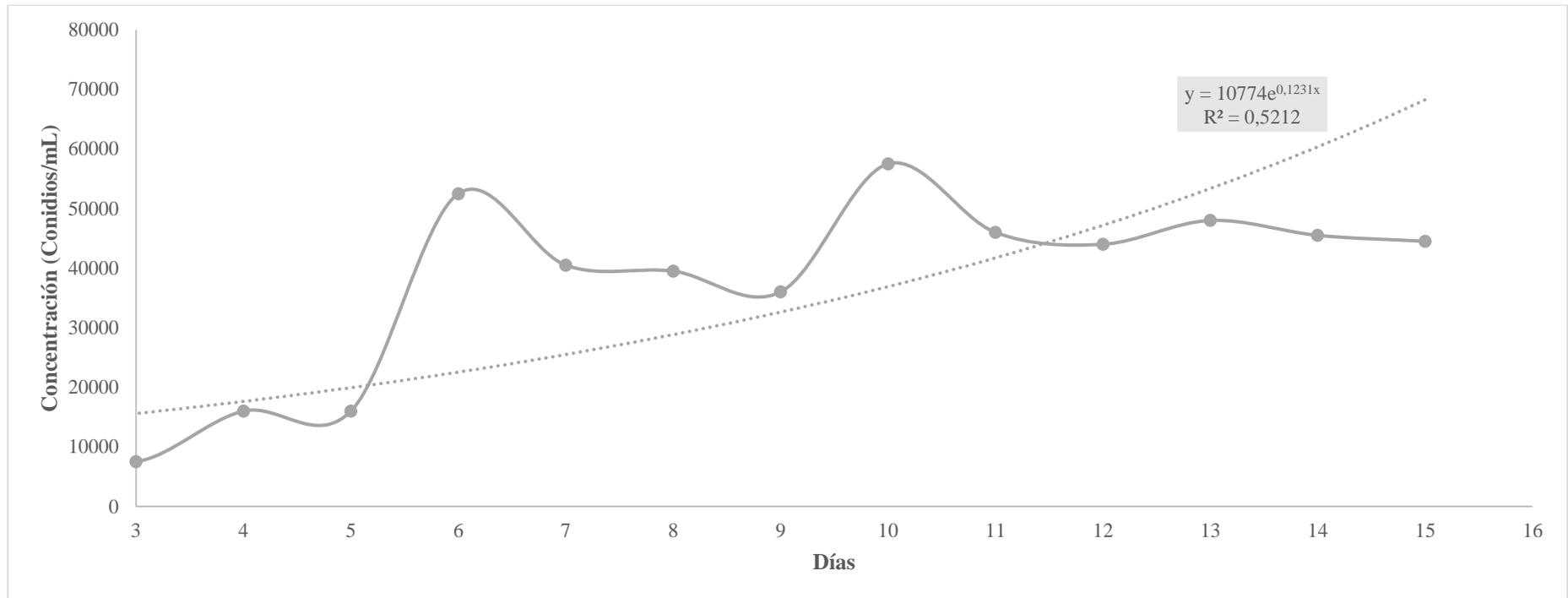
En la gráfica 4-4, indican las concentraciones del hongo *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* con 5 horas agitación a 120rpm y 19 horas incubación 28°C con un tiempo teórico de 15 días y se detallan en el Anexo J.



Gráfica 4-4. Curva crecimiento a escala laboratorio del hongo *Pleurotus ostreatus* en Honey Tek.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

En la gráfica 5-4, indican las concentraciones del hongo *Agaricus brunnescens* con 5 horas agitación a 120rpm y 19 horas incubación 28°C con un tiempo teórico de 15 días y se detallan en el Anexo J.

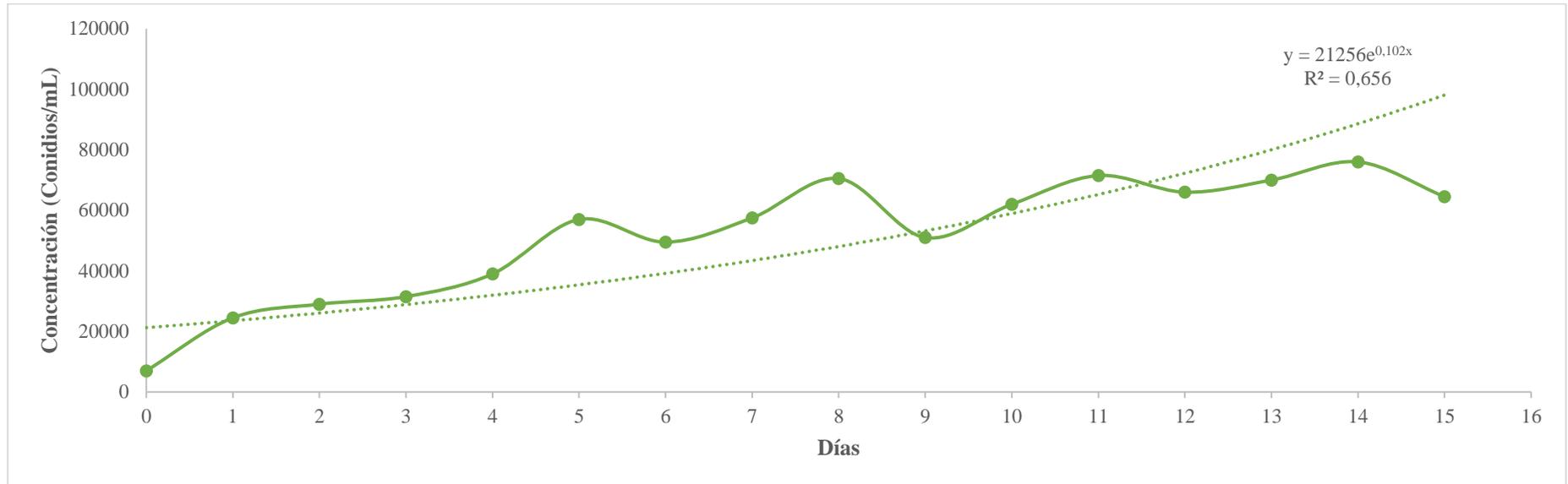


Gráfica 5-4. Curva crecimiento a escala laboratorio del hongo *Agaricus brunnescens* en Honey Tek.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

4.3. Resultados biorreactores prototipo

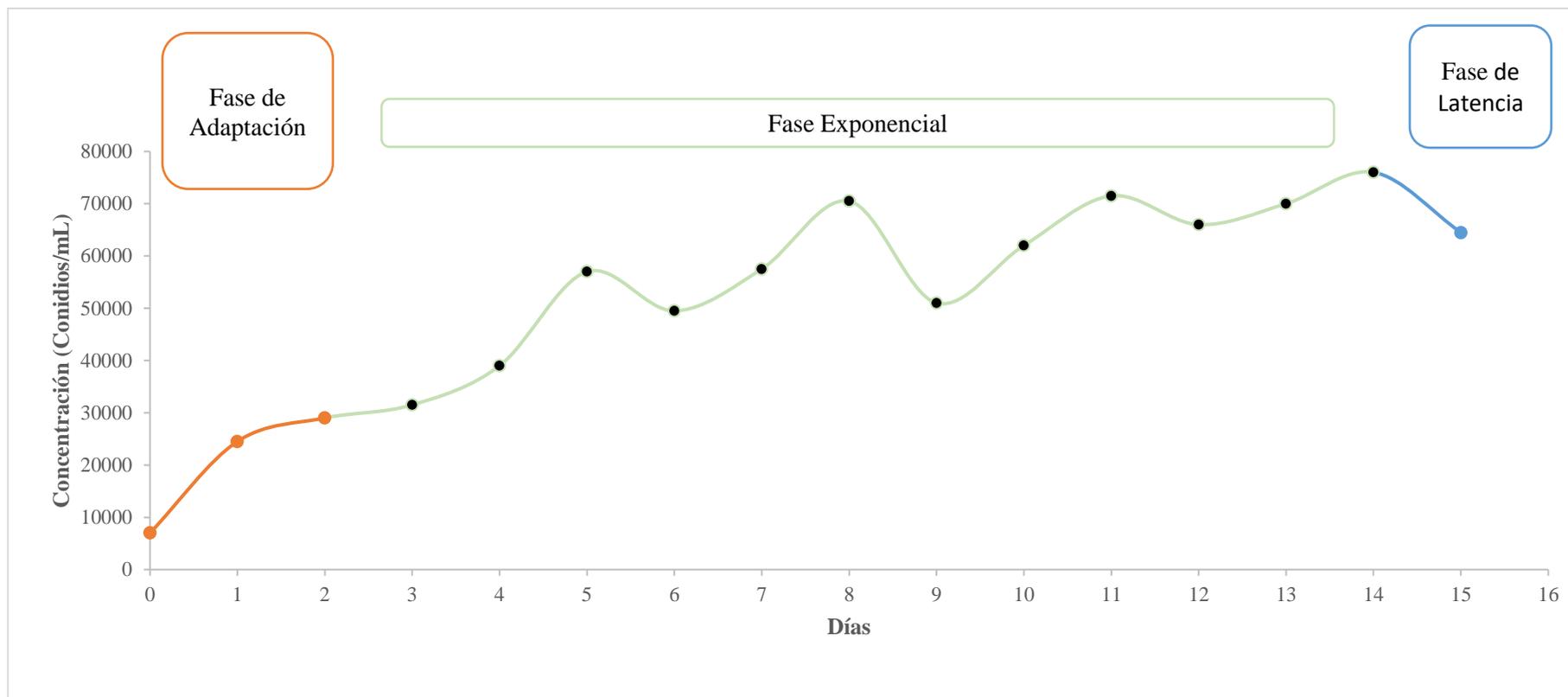
En la gráfica 6-4, indican las concentraciones del hongo *Pleurotus ostreatus* con 5 horas agitación a 120rpm y 19 horas incubación 28°C con un tiempo teórico de 15 días y se detallan en el Anexo K.



Gráfica 6-4. Curva crecimiento prototipo del hongo *Pleurotus ostreatus* en Honey Tek.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

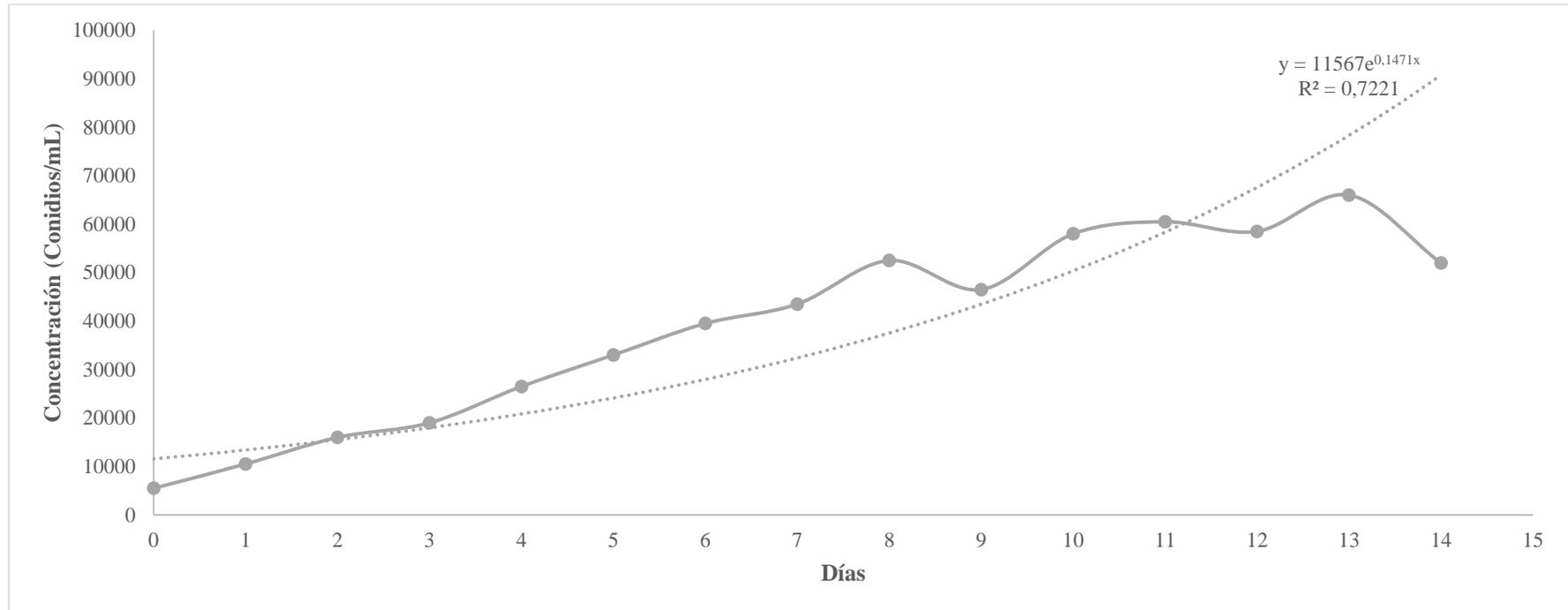
En la gráfica 7-4, indican las fases de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* en honey tek por 15 días, la fase de adaptación tuvo lugar desde el día cero hasta el segundo día, la fase exponencial se dio en el tercer día hasta el día 14, la formación de plaquetas inició en el segundo día, al octavo día se presenciaron gránulos y al doceavo día se observó la presencia y desarrollo de pellets.



Gráfica 7-4. Fases de crecimiento prototipo del hongo *Pleurotus ostreatus* en Honey Tek.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

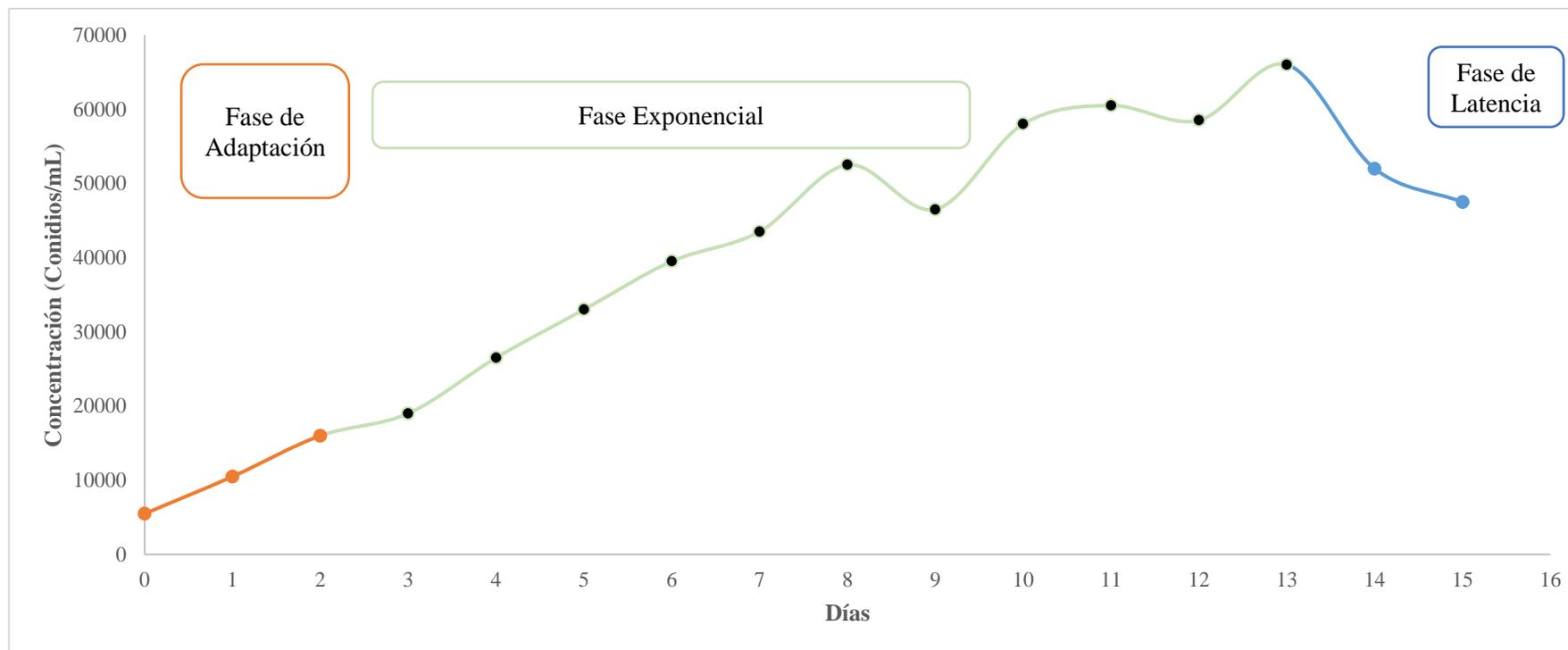
En la gráfica 8-4, indican las concentraciones del hongo *Agaricus brunnescens* con 5 horas agitación a 120rpm y 19 horas incubación 28°C con un tiempo teórico de 15 días y se detallan en el Anexo K.



Gráfica 8-4. Curva crecimiento prototipo del hongo *Agaricus brunnescens* en Honey Tek.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

En la gráfica 9-4, indican las fases de crecimiento del hongo *Agaricus brunnescens* en honey tek por 15 días, la fase de adaptación tuvo lugar desde el día cero hasta el segundo día, la fase exponencial se dio en el tercer día hasta el día trece, la formación de plaquetas inició en el tercer día, al octavo día se presenciaron gránulos y al treceavo día se observó la presencia y el desarrollo de pellets.



Gráfica 9-4. Fases de crecimiento prototipo del hongo *Agaricus brunnescens* en Honey Tek.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

4.4. Obtención de micelio *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* en medio PDA

Luego del tercer día posterior a la inoculación de *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* en medio PDA, se observó en cada caja Petri el crecimiento de ambos hongos de color blanco uniforme y de apariencia tipo algodón, no se observó presencia de contaminación por bacterias u otros tipos de hongos. Al séptimo día posterior a la inoculación observamos la completa colonización de ambos hongos en las cajas Petri. Los resultados de la figura 18-4, indicaron el crecimiento del micelio *Pleurotus ostreatus* y del micelio *Agaricus brunnescens* en medio PDA.

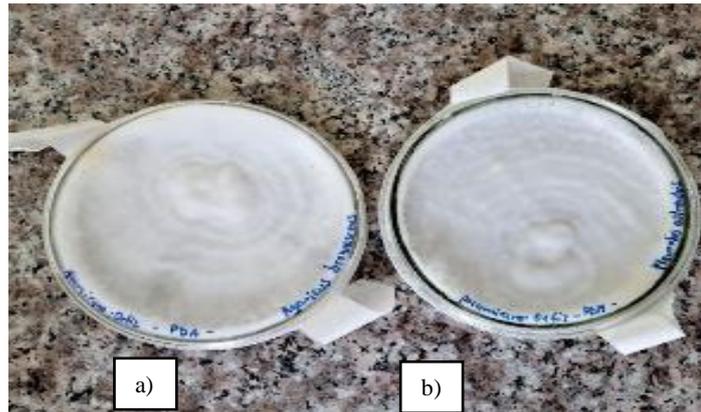


Figura 19-4. Obtención micelio *Pleurotus ostreatus* (a) y micelio *Agaricus brunnescens* (b) en medio PDA.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

4.5. Resultados caracterización microscópica y morfológica del prototipo *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido Honey Tek

Al quinceavo día posterior de la inoculación en el biorreactor, los resultados microscópicos extraídos del Biorreactor prototipo *Pleurotus ostreatus*, a objetivo 10X, se observó la presencia de hifas formando micelio y esporangios. Los resultados morfológicos del micelio dentro del prototipo *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido Honey Tek, al segundo día se observó el desarrollo de hifas, posterior al doceavo día se observó el desarrollo de gránulos blancos densos y pellets, el cultivo no presentó turbiedad. Estos resultados se detallan en la figura 19-4.

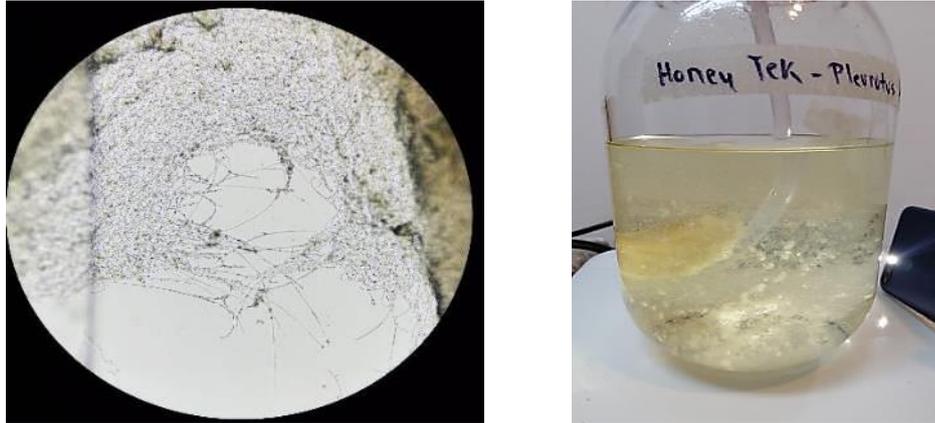


Figura 20-4. Caracterización microscópica a objeto 10X (izquierda) y caracterización morfológica (derecha) del biorreactor prototipo *Pleurotus ostreatus*.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

4.6. Resultados caracterización microscópica y morfológica del prototipo *Agaricus brunnescens* en cultivo sumergido Honey Tek

Al quinceavo día posterior de la inoculación en el biorreactor, los resultados microscópicos extraídos del Biorreactor prototipo *Pleurotus ostreatus*, a objetivo 10X, se observó la presencia de hifas formando micelio y esporangios. Los resultados morfológicos del micelio dentro del prototipo *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido Honey Tek, se observó el desarrollo de hifas al tercer día, al treceavo día se observó el desarrollo de gránulos blancos densos y pellets, el cultivo no presentó turbiedad. Estos resultados se detallan en la figura 20-4.



Figura 21-4. Caracterización microscópica a objeto 10X (izquierda) y caracterización morfológica (derecha) del biorreactor prototipo *Agaricus brunnescens*.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

4.7. Verificación de contaminación

Al iniciar y al finalizar se extrajeron muestras de 2mL de micelio líquido de los 2 biorreactores prototipo. Se observó y verificó pasado los 7 días de inoculación, el micelio *Pleurotus ostreatus* (superior), *Agaricus brunnescens* (inferior) y blanco (centro) crecen sin contaminación en medio PDA, como se detalla en la figura 21-4.



Figura 22-4. Verificación crecimiento *Pleurotus ostreatus* (superior), *Agaricus brunnescens* (inferior) y blanco (centro) en medio PDA.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

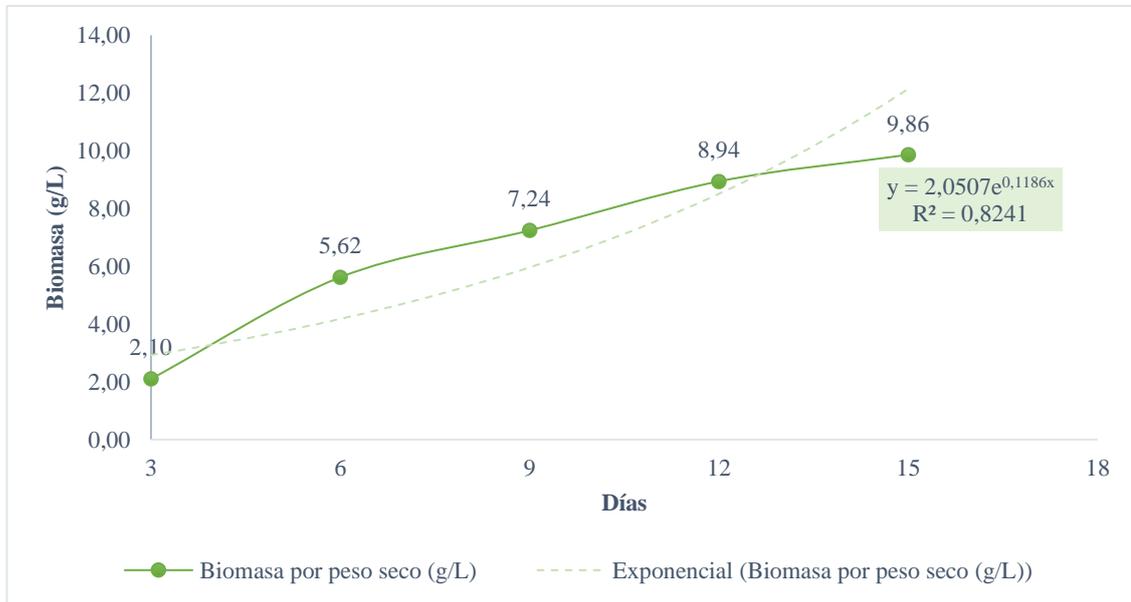
4.8. Resultados obtención de la biomasa por peso seco de los Biorreactores prototipos

En la tabla 21-4, se muestra los valores obtenidos de la biomasa por peso seco del Biorreactor prototipo *Pleurotus ostreatus* analizada cada 3 días con 5 horas de agitación a 120 rpm y 19 horas de incubación a 28°C con un tiempo teórico de 15 días. Se obtuvo una biomasa final de 9,86 g/L con una velocidad específica de crecimiento de $0,0054 h^{-1}$, la biomasa final está dentro del rango mencionado por Tello et al., (2015), que alcanzó oscilaciones de biomasa 61.071 ± 4.314 g/L y $\mu = 0.233 \pm 0.054 h^{-1}$, los valores de la velocidad específica de crecimiento están indirectamente relacionados, ofrecen un marco inicial de referencia. Además, en este cultivo sumergido el desarrollo de hifas y micelio crece más rápidamente que el cultivo sumergido *Agaricus brunnescens*.

Tabla 21-4. Valores obtenidos de la biomasa por peso seco del Biorreactor prototipo *Pleurotus ostreatus*

Días	Horas	Biomasa por peso húmedo (g/L)	Biomasa por peso seco (g/l)	Curva de crecimiento exponencial Log(biomasa seca g/l)	Velocidad de crecimiento específica (μ) h-1	Población o tiempo de generación 0,693/u	Ecuación
3	72	381,2800	2,10	4,36172784	0,0054	129,0512	y = 2,0507e ^{0,1186x}
6	144	391,6000	5,62	4,76715587			
9	216	436,6200	7,24	4,87794695			
12	288	433,5000	8,94	4,87794695			
15	360	587,0800	9,86	4,91381385			

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).



Gráfica 10-4. Resultados de la biomasa por peso seco (g/L) prototipo del hongo *Pleurotus ostreatus* en Honey Tek por 15 días.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

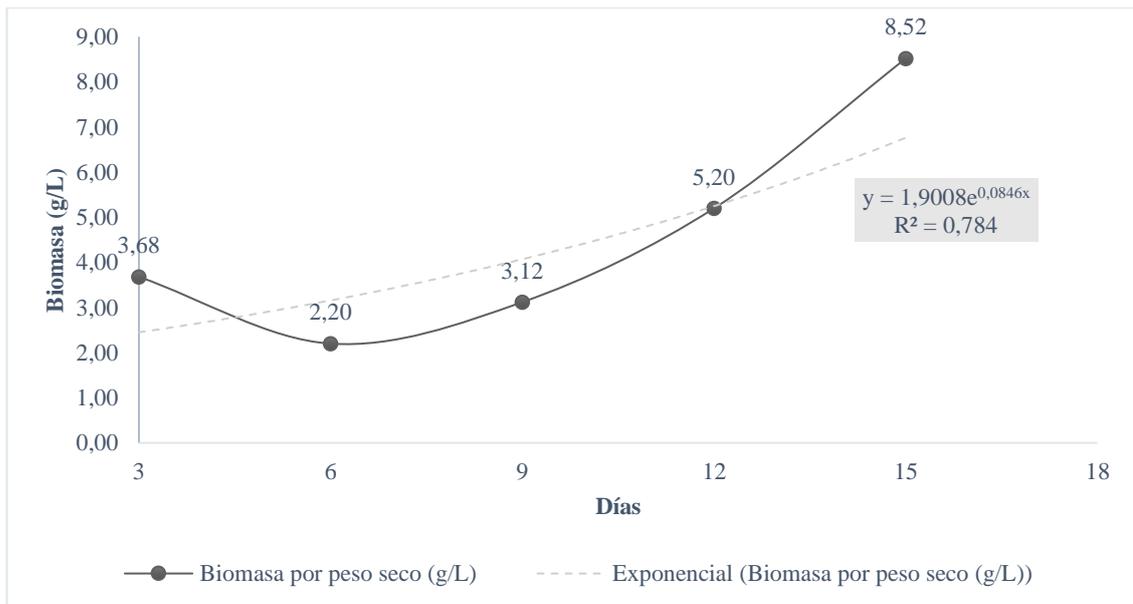
En la tabla 22-4, se muestra los valores obtenidos de la biomasa por peso seco del Biorreactor prototipo *Agaricus brunnescens* analizada cada 3 días con 5 horas de agitación a 120 rpm y 19 horas de incubación a 28°C con un tiempo teórico de 15 días. Se obtuvo una biomasa final de 8,52 g/L con una velocidad específica de crecimiento de $0,0029 h^{-1}$, la biomasa final está cercano del rango mencionado por Kyoungju et al., (2016), que alcanzó una biomasa final seca de 10.0 g/L, los valores de la velocidad especifican de crecimiento están indirectamente relacionados, ofrecen un marco inicial de referencia. Sin embargo, se pudo notar que del día 3 al

6 hubo una recaída de biomasa, esta se debió a un daño mecánico del agitador magnético, ya que se había alterado su velocidad de agitación.

Tabla 22-4. Valores obtenidos de la biomasa por peso seco del Biorreactor prototipo *Agaricus brunnescens*.

Días	Horas	Biomasa por peso húmedo (g/L)	Biomasa por peso seco (g/L)	Curva de crecimiento exponencial Log (Biomasa seca g/L)	Velocidad de crecimiento específica (μ) h-1	Población o tiempo de generación 0,693/u	Ecuación
3	72	918,8200	3,68	3,87506126	0,0029	237,7405	$y = 1,9008e^{0,0846x}$
6	144	985,3400	2,20	4,7201593			
9	216	987,8600	3,12	4,5563025			
12	288	1.078,9200	5,20	4,64345268			
15	360	1.022,1000	8,52	4,64836001			

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

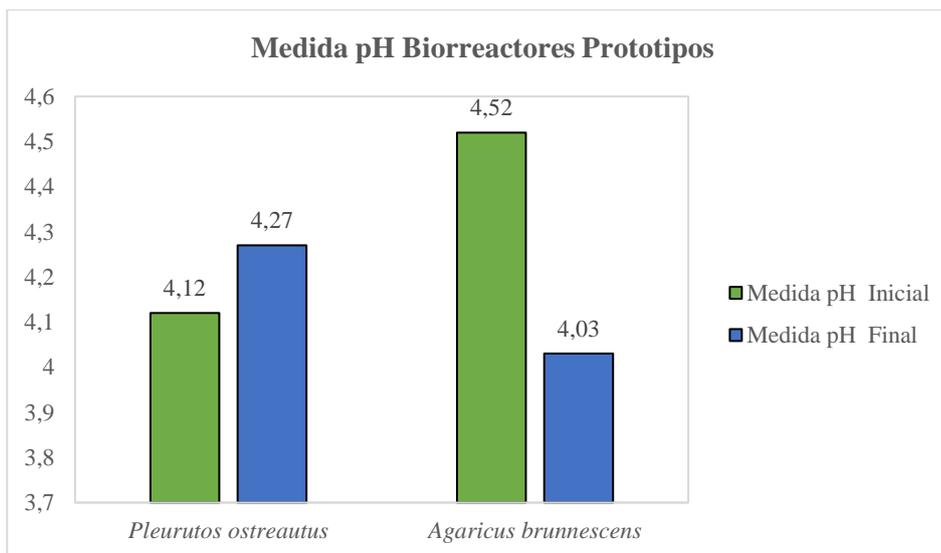


Gráfica 11-4. Resultados de la biomasa por peso seco (g/L) prototipo del hongo *Agaricus brunnescens* en Honey Tek por 15 días.

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

4.9. Resultados medición pH

En la gráfica 12-4 , detalla la medición del pH en los biorreactores prototipos.



Gráfica 12-4. Resultados de medición pH

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

Cabe mencionar que el pH usado en los biorreactores fue tomado de varias investigaciones y comparadas en las pruebas pre experimentales, y de esta manera se tomó el valor de pH con el mejor desarrollo micelial. De acuerdo con Kim et al., (2018), el pH óptimo en medio líquido para crecimiento de micelio *Pleurotus ostreatus* oscila entre 4-6.5. Mientras que para el desarrollo del micelio *Agaricus brunnescens*, según Bakratsas et al., (2021), el pH óptimo oscila entre 4-6. Por lo tanto, el pH= 4,12 obtenida de esta investigación se encuentra dentro de los rangos establecidos por dichos autores.

4.10. Resultados metabolitos bioactivos (proteínas)

Los resultados obtenidos del análisis de proteínas de las muestras de *Agaricus brunnescens* (Anexo L) y *Pleurotus ostreatus* (Anexo M) se muestran en la tabla 23-4, de los cuales se establece que la producción de proteínas en cultivos sumergidos tiene propiedades nutricionales en la biomasa y aminoácidos esenciales en esta investigación.

Tabla 23-4. Resultados de proteínas de los biorreactores prototipo

Muestra	n	Resultado	Unidad
<i>Agaricus brunnescens</i>	1	41,06	%
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1	23,50	%

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

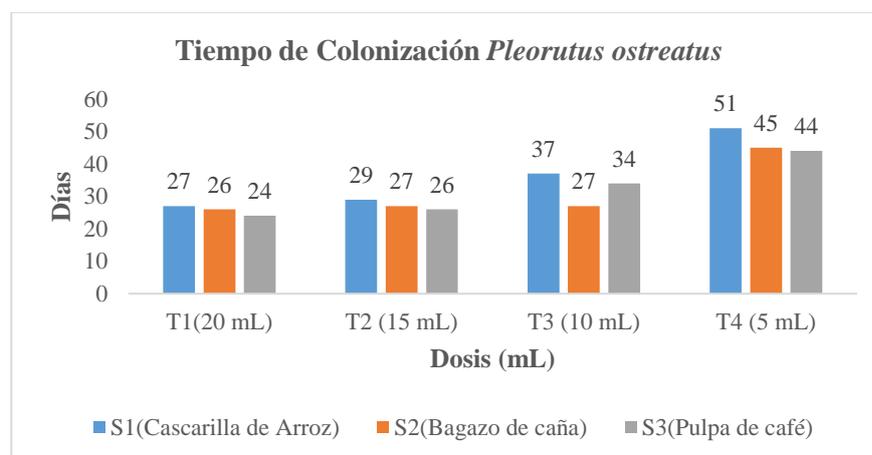
Los resultados de proteínas del micelio *Pleurotus ostreatus* se obtuvo un 23,50 %, valor que está dentro del rango mencionado por Bakratsas et al., (2021), reportando oscilaciones entre 10,20 a 25,70 % de proteínas presentes del micelio *Pleurotus ostreatus* en cultivos sumergidos. Los resultados de proteínas del micelio *Agaricus brunnescens* se obtuvo un 41,06 %, valor que está cercano al reportado por Bakratsas et al., (2021), que alcanzó 47,10 % de proteínas presentes del micelio *Pleurotus ostreatus* en cultivos sumergidos.

4.11. Resultados tiempo de colonización en los sustratos

En la gráfica 13-4, gráfica 14-4 y como muestra la evidencia fotográfica del Anexo N, se detallan los días que tardaron en colonizar completamente los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* extraídos de los biorreactores prototipo en tres tipos de sustratos (cascarilla de arroz, bagazo de caña y pulpa de café) evaluando a 4 diferentes dosis (20 mL, 15 mL, 10 mL y 5mL).

En la gráfica 13-4, se puede evidenciar los días que el micelio *Pleurotus ostreatus* colonizó en tres sustratos; la pulpa de café registra los mejores tiempos de colonización a 24 días a 20 mL de micelio, su crecimiento oscila entre 24 días y 44 días de colonización; el bagazo de caña fue el segundo mejor sustrato con 26 días de colonización a 20 mL y su crecimiento oscila entre los 26 a 45 días; la cascarilla de arroz fue el último sustrato en colonizar con 27 días a 20 mL, y su crecimiento oscila entre 27 días a 51 días.

Al evaluar los tiempos de colonización reportados por diferentes autores, como es el caso de Rojas, (2016), quien reportan tiempos de 30 días para la pulpa de café, 28 días para el bagazo de caña según Calero, (2018), y 45 días para la cascarilla de arroz según García, (2000), valores cuales fueron comparados con esta investigación.

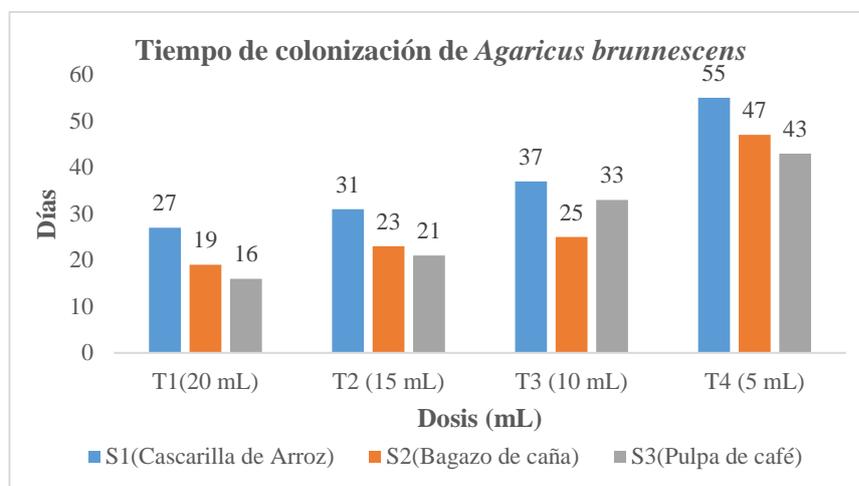


Gráfica 13-4. Resultados tiempo de colonización de *Pleurotus ostreatus*

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

En la gráfica 14-4, se puede evidenciar los días que el micelio *Agaricus brunnescens* colonizó en tres sustratos; la pulpa de café registra los mejores tiempos de colonización a 16 días a 20 mL de micelio, su crecimiento oscila entre 16 días y 43 días de colonización; el bagazo de caña fue el segundo mejor sustrato con 19 días de colonización a 20 mL y su crecimiento oscila entre los 19 a 47 días; la cascarilla de arroz fue el último sustrato en colonizar con 27 días a 20 mL, y su crecimiento oscila entre 27 días a 55 días.

Al evaluar los tiempos de colonización reportados por diferentes autores, como es el caso de Martínez-Carrera et al., (2000), quienes reportan tiempos de 25 días para la pulpa de café, 28 días para el bagazo de caña según Andrade et al., (2017), y 41 días para la cascarilla de arroz según Kumla et al., (2020), valores cuales fueron comparados en esta investigación.



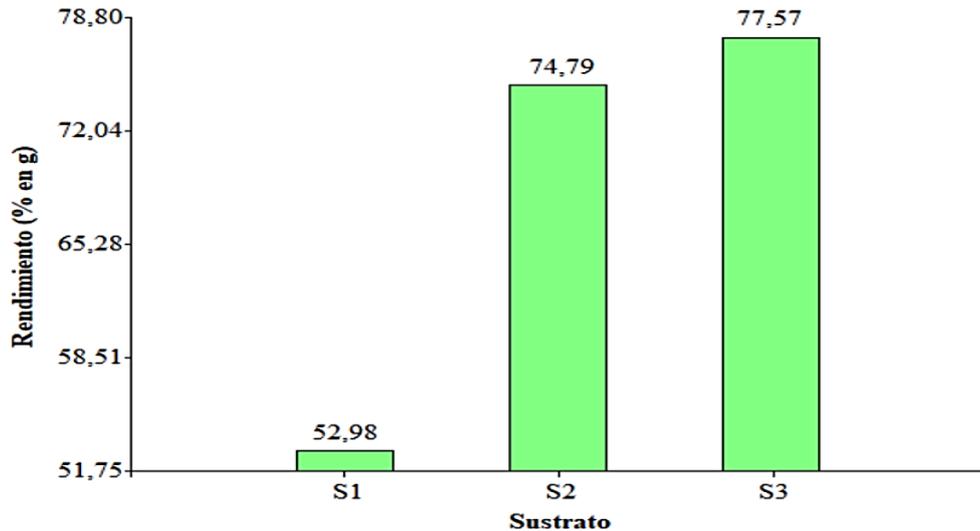
Gráfica 14-4. Resultados tiempo de colonización de *Agaricus brunnescens*

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

4.12. Análisis estadístico

4.12.1. Observación del Rendimiento *Pleurotus ostreatus*

Según el Anexo O, se puede apreciar los resultados de los porcentajes de los rendimientos de *Pleurotus ostreatus* en los diferentes sustratos. A continuación, se realizó la gráfica de barras:



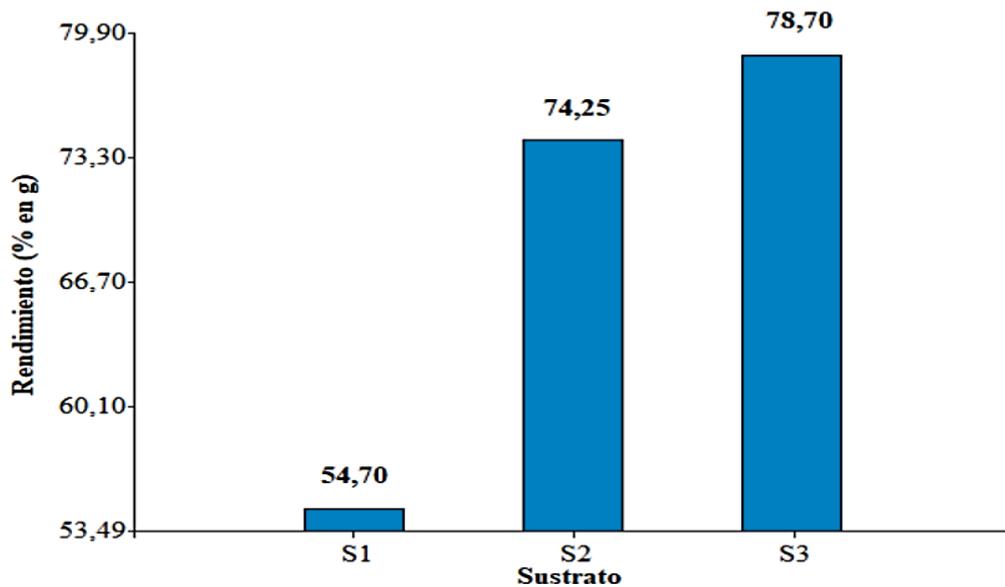
Gráfica 15-4. Observación del rendimiento *Pleurotus ostreatus* con separación de medias

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

Los resultados de rendimiento de la eficiencia biológica en peso húmedo para los tres tipos de sustratos con respecto a la primera y segunda cosecha se observa que el mejor sustrato para la producción de *Pleurotus ostreatus* es la pulpa de café que posee un mayor porcentaje de 77.57%, considerándose como el más adecuado y eficiente, incluso este resultado supera al reportado por Tuchan, (2018) quien obtuvo un rendimiento de 58.74%; seguido del bagazo de caña con 74.79% y el menos adecuado para la producción de este hongo es la cascarilla de arroz con un 52.98%, esto debido a que se debe controlar constantemente el pH y humedad. De la misma manera este porcentaje de rendimiento en cascarilla de arroz es superior al resultado reportado por Guzmán, (2018) quien obtuvo un rendimiento de 9.8% usando cascarilla de arroz como sustrato, sin embargo, al usar la cascarilla de arroz combinada con diferentes sustratos se puede obtener un rendimiento de 63.7%, afirma el autor.

4.12.2. Observación del Rendimiento de *Agaricus brunnescens*

Según el Anexo O, se puede apreciar los resultados de los porcentajes de los rendimientos de *Agaricus brunnescens* en los diferentes sustratos. A continuación, se realizó la gráfica de barras:



Gráfica 16-4. Observación del rendimiento *Agaricus brunnescens* con separación de medias

Realizado por: (Altamirano, K y Ortiz, A., 2022).

Los resultados de rendimiento de la eficiencia biológica en peso húmedo para los tres tipos de sustratos con respecto a la primera y segunda cosecha se observa que el mejor sustrato para la producción de *Agaricus brunnescens* es la pulpa de café que posee un mayor porcentaje de 78.70%, considerándose como el más adecuado y eficiente, superando al rendimiento reportado por Martínez-Carrera et al., (2000) quienes obtuvieron un rendimiento de 61.30%; seguido del bagazo de caña con 74.25% y menos adecuado para la producción de este hongo es la cascarilla de arroz con un 54.70%, debido a que se debe controlar constantemente el pH y humedad.

CONCLUSIONES

- En el presente trabajo técnico se diseñó y construyó dos biorreactores para la obtención de micelio de los hongos *Agaricus brunnescens* y *Pleurotus ostreatus*, en donde se usó miel de abeja (honey tek) para la preparación de los caldos, los cuales presentaron una adaptación sin problemas durante todo el desarrollo de los micelios, se determinó la temperatura y pH adecuados siendo 28° C y 4.12 respectivamente.
- En base al dimensionado realizado de los biorreactores se obtuvo, una cámara de cultivo de 2.5 L, diámetro interno del tanque de 0.06 m, altura del tanque 0,24 m, una velocidad de agitación de 120 rpm, además se construyó un baño maría para mantener la temperatura interna con una dimensión de 38 cm* 21 cm* 24,5 cm y se empleó un termostato 25 W de capacidad.
- El metabolito principal e importante de cada uno de los micelios fue la proteína, la cual fue identificada mediante el método de Kjeldahl, después de haber transcurrido los 20 días, obteniendo 41.06 % para *Agaricus brunnescens* y 23.5 % *Pleurotus ostreatus* respectivamente, de lo cual podemos concluir que las proteínas de los hongos presentan una alta relación proteína/energía, beneficios nutricionales adicionales y, por supuesto, su contribución a la disminución del consumo de carne y la huella de carbono, sin duda, deben tenerse en cuenta.
- Se observó los tiempos de colonización de los micelios sobre tres tipos de sustratos pulpa de café, bagazo de caña y cascarilla de arroz con 4 diferentes disoluciones (20 mL, 15 mL, 10 mL y 5mL). Para el *Pleurotus ostreatus* en la pulpa de café se obtuvo un tiempo de colonización de 16 días a 20 mL de micelio, el bagazo de caña con 26 días de colonización a 20 mL y la cascarilla de arroz con 27 días a 20 mL. Por otro lado, para el *Agaricus brunnescens* en la pulpa de café se obtuvo un tiempo de colonización de 16 días a 20 mL de micelio, el bagazo de caña con 19 días de colonización a 20 mL y la cascarilla de arroz fue el último sustrato en colonizar con 27 días a 20 mL. La relación C/N fue más elevada en el sustrato de café con una relación 30:1, favoreciendo su colonización.
- Finalmente, se observó los porcentajes de rendimientos siendo la pulpa de café y el bagazo de caña los mejores sustratos obteniéndose; para *Agaricus brunnescens* la pulpa de café obtuvo rendimientos de 78,70% y el bagazo de caña obtuvo 74,25%; para *Pleurotus ostreatus* la pulpa de café obtuvo rendimientos de 77,57% y el bagazo de caña obtuvo rendimientos de 74,79%.

RECOMENDACIONES

- Realizar análisis de laboratorio con sistemas con control de oxigenación para verificar si genera más cantidad de micelio de cada hongo estudiado.
- Realizar control de pH en dos etapas durante su periodo de cultivo entre un rango de 5 a 6,5 agregando solución ácida ó alcalina para estudiar la formación de gránulos o micelios filamentosos.
- Diseñar y trabajar en un biorreactor prototipo automatizado con las variables de agitación: pH, oxigenación, temperatura, agitación.
- Realizar una curva de calibración usando un espectrofotómetro uv-visible.
- Evaluar la eficiencia biológica y análisis bromatológico de ambos hongos.
- Realizar un análisis completo de todos los metabolitos bioactivos que contiene el micelio como carbohidratos y lípidos.
- Analizar la cantidad exacta de C/N contenido en los sustratos de pulpa de café, bagazo de caña y cascarilla de arroz.
- Investigar sobre los residuos que se generan de los sustratos cuando ya se terminan su tiempo de producción.
- Realizar repeticiones con las dosificaciones en los sustratos antes ya estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

ANDRADE, M. “Yield of four *Agaricus bisporus* Strains in three Compost Formulations And Chemical Composition Analyses of the mushrooms”. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 5, n°6 (2017), (Bazil) pp. 6-9.

ANTUNES, F., MARÇAL, S., TAOFIQ, O., MORAIS, A., FREITAS, A., FERREIRA, I. & PINTADO, M. “Valorization of Mushroom By-Products as a Source of Value-Added Compounds and Potential Applications”. *Molecules* [en línea], 2020, (Portugal) 25(11), pp. 4-30. ISSN 5300-253. [Consulta: 10 enero 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules25112672>.

BAKRATSAS, G., POLYDERA, A., KATAPODIS, P. & STAMATIS, H. “Recent trends in submerged cultivation of mushrooms and their application as a source of nutraceuticals and food additives”. *Future Foods* [en línea], 2021, (United State of America) 4(13), pp. 4-10. [Consulta: 20 noviembre 2021]. ISSN 1089-8654. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100086>.

BALLESTEROS, L., TEIXEIRA, J. & MUSSATTO, S. “Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin”. *Food and Bioprocess Technology* [en línea], 2014, (Portugal) 7(12), p. 4-9. Disponible en: 10.1007/s11947-014-1349-z.

BRAVO, D. *Guía Honey Tek*. Chile, 2017, pp. 4-5.

CALERO, L. Valoración del crecimiento del hongo Ostra Rosado (*Pleurotus djamor*) sobre formulaciones de sustratos de residuos agroindustriales y forestales de la provincia de Cotopaxi para la producción de setas comestibles en la empresa ASOPROTEC [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. 2018. [Consulta: 17 enero 2022]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/28371/1/BQ155.pdf>.

CATAÑO Z, J. *Prácticas de laboratorio de Fitopatología*. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, 2002, p. 40.

COELHO, M., BAKKEREN, G., SUN, S., HOOD, M. & GIRAUD, T. “Fungal Sex: The Basidiomycota”. *Microbiology spectrum* [en línea], 2017, (Portugal) 5(3), pp. 4-6. [Consulta: 17 enero 2022]. Disponible en: [10.1128/microbiolspec.FUNK-0046-2016](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0046-2016).

COLCHA LEÓN, M.L., MORILLO BRITO, S.M. & GONZÁLEZ, J. Determinación del medio de cultivo adecuado para la magnificación de la producción de *Saccharomyces cerevisiae* (CE-1118) y liofilización del producto obtenido con fines comerciales [en línea] (Trabajo de titulación) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2016. pp. 28-29. [Consulta: 02 febrero 2022]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6210/1/236T0230.pdf>.

CUEVA CALVA, C.M. Aprovechamiento de residuos de plátano, cacao y maíz como sustratos para la producción del hongo “*Pleurotus ostreatus*”, en la comunidad la Magdalena de Francisco de Orellana [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2015. pp. 32-35. [Consulta: 02 febrero 2022]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/10172/1/236T0370.pdf>.

DUDEKULA, U., DORIYA, K. & DEVARAI, S. “A critical review on submerged production of mushroom and their bioactive metabolites”. *Biotech* [en línea], 2020, (India) 8(337). pp. 1-12. [Consulta: 03 marzo 2022]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-020-02333-y>.

FRANCO, M. Diseño de un bioreactor para la producción de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) de panificación, utilizando como sustrato melaza para la empresa panificadora LEFSKI PAN [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2019. pp. 17-38. [Consulta: 03 marzo 2022]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/10619/1/96T00526.pdf>.

FREUNDT-ESPINOSA, P. Producción y Comercialización de hongos comestibles para el Mercado Nacional e Internacional [en línea] (Trabajo de titulación) (Pregrado). Universidad de Piura. 2003. pp. 1-29. [Consulta: 06 marzo 2022]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/11042/1314>.

GARCÍA, D. Utilización de rastrojos de maíz (*Zea mays* L.) y cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) como sustrato para el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. [en línea] (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, Guatemala.

2000. pp. 35-46. [Consulta: 17 febrero 2022]. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_1901.pdf.

GUZMAN, L. Evaluación de diferentes tipos de sustratos para la producción de *Pleurotus ostreatus* en el Municipio de Villanueva Casanare. [en línea] (trabajo de titulación). (Pregrado) Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Nariño, Colombia. 2018.[Consulta: 18 mayo 2022]. Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/13517>.

KIM, K., CHOI, B., LEE, I., LEE, H., KWON, S., OH, K. & KIM, A. “Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [en línea], 2018, (Seúl) 91(32), pp. 9. [Consulta: 25 marzo 2022]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.4348>.

KUMAR, K., MEHRA, R., GUINE, R., LIMA, M., KUMAR, N., KAUSHIK, R., AHMED, N., YADAV, A. & KUMAR, H. “Edible Mushrooms: A Comprehensive Review on Bioactive Compounds with Health Benefits and Processing Aspects”. *Foods* [en línea], 2021, (India) 10(12), pp. 3-6. [Consulta: 25 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8700757/>.

KUMLA, J., SUWANNARACH, N., SUJARIT, K., PENKHRUE, W., KAKUMYAN, P., JATUWONG, K. & LUMYONG, S. “Cultivation of Mushrooms and Their Lignocellulolytic Enzyme Production Through the Utilization of Agro-Industrial Waste”. *Molecules* [en línea], 2020, (Tailandia) 2(12). [Consulta: 25 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/12/2811>.

KYOUNGJU KIM , BYUNGSUN CHOI, INHEE LEE, HYEYOUNG LEE, SOONHYANG KWON & KYOUNGYOUNG OH, A.Y.K. “Bioproducción de micelio de hongos de *Agaricus brunnescens* por fermentación sumergida comercial”. PubMed [en línea], 2011, (South Korea) 91(9). [Consulta: 25 marzo 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21445867/>.

MADIGAN, M. & MARTINKO, J. *Brock. Biología de los Microorganismos*. Décima ed. Madrid: Pearson educación, 2004. ISBN 84-205-3679-2. pp.144-165.

MARRISON, S. *How To Make Liquid Culture For Mushroom Growing* [blog]. USA: mcelial editor, 2022. [Consulta: 21 enero 2022]. Disponible en: <https://archersmushrooms.co.uk/how-to-make-liquid-culture-for-mushroom-growing/>.

MARTÍNEZ-CARRERA, D., AGUILAR, A., MARTÍNEZ, W., BONILLA, M., MORALES, P. & SOBAL, M. “Mushroom Cultivation on Coffee Pulp Commercial Production And Marketing of Edible Mushrooms Cultivated on Coffee Pulp in Mexico”. *Coffee biotechnology and quality* [en línea], 2000 (México) 8(45). pp. 471-488. [Consulta: 29 marzo 2022]. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-1068-8_45.

MCCABE, W. & SMITH, J.H. *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química*. Séptima ed. México: McGraw-Hill, 2007. ISBN 9788578110796. pp. 52-98.

MÉNDEZ, L. *Manual de Análisis de Alimentos*. Facultad de Química Farmacéutica Biológica de la Universidad Veracruzana [en línea]. México, 2020. pp. 42-46. [Consulta: 06 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Manual-Analisis-de-Alimentos-1.pdf>.

PEREZ, B., MAYETT, Y. & MARTINEZ, D. “Propiedades nutricionales y medicinales de los hongos comestibles”. *Revista de divulgación científica, tecnológica y humanística* [en línea], 2010, (México) 5(4), pp. 6-19. [Consulta: 8 febrero 2022]. Disponible en: http://concytep.puebla.gob.mx/images/docs/revista/revista_saberes_anio04_num05.pdf#:~:text=Los hongos comestibles son un alimento ex- cepcional,cantidad de proteína%2C que los vegetales en general.

PÉREZ, S., ARONE, M., CALZADILLO, J., RODRIGUEZ, I. & DIAZ, M. “Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos. Afinidad [en línea], 2017, (Cuba) 74(577), pp. 60-67. [Consulta: 8 febrero 2022]. Disponible en: <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/320783>.

PETRE, M. & PETRE, V. “Biotechnology of Mushroom Growth Through Submerged Cultivation”. *Mushroom Biotechnology* [en línea], 2016, (Rumania) 5(11), pp. 1-3. [Consulta: 23 febrero 2022]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128027943000011?via%3Dihub#!>

QUIZHPILEMA, L. Validación de la Tecnología para la Producción e Industrialización de Hongos Comestibles *Pleurotus ostreatus* utilizando Sustratos Orgánicos [en línea] (Trabajo de

titulación). (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2013. pp. 13-45. [Consulta: 03 marzo 2022]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2944/1/27T0219.pdf>.

RAMIREZ, L. Caracterización Bioquímica de Clorogenato esterasa producida por fermentación en medio sólido sobre residuos del café [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Mexico. 2009. pp. 45-89. [Consulta: 29 marzo 2022]. Disponible en: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/444/1/LorenaRamírezVelasco.pdf>.

RAMOS, G. Pleurotus ostreatus Cultivado en Residuos de Palma Aceitera como Importante Fuente Proteica para la Dieta Humana [en línea] (Trabajo de titulación) (Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2010. pp. 15-67. [Consulta: 27 marzo 2022]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/221/1/236T0002.pdf>.

RIVER, M. & SUÁREZ, D. Diseño y Construcción de un Bioreactor Batch Aerobio para Cultivo de Bacterias Biodegradadoras de Petróleo Biodegradadoras de Petróleo. [en línea] (Trabajo de titulación) . (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2013. pp. 45-79. [Consulta: 15 marzo 2022]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2651>.

ROJAS, J. Producción del Hongo Comestible Pleurotus ostreatus en Pulpa de Café [en línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Peru. 2016. p. 52. [Consulta: 21 marzo 2022]. Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/873/BC-TES-4828.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

SÁNCHEZ, J. *Determinación de la Biomasa*. Peru-Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, 2012, pp. 7-9.

SANCHEZ, J. “La biología y el cultivo de Pleurotus spp” Journal Research [en línea], 2010, (Chiapas) 12(2), pp. 127-203. [Consulta: 11 marzo 2022]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/256526787_Book_La_biologia_y_el_cultivo_de_Pleurotus_spp.

SCRAGG, E.H. Biotechnology for engineers. Michigan- United States, 1996. ISBN 968-18-4708-3. pp. 191-203.

TELLO, E. MONTIEL, O. & ROMERO, E. “Crecimiento micelial comparativo de *Pleurotus djamor* y *Pleurotus ostreatus* en medios de cultivo”. *Journal of Pure and Applied Microbiology* [en línea], 2015, (México) 10(3), pp. 1-5. [Consulta: 30 marzo 2022]. Disponible en: <https://microbiologyjournal.org/comparative-mycelial-growth-of-pleurotus-djamor-and-pleurotus-ostreatus-in-culture-media/>.

TUCHAN, O. Evaluación del efecto de la pulpa de café (*Coffea arábica*) en el incremento de la eficiencia biológica de la cepa INIREB-8 de *Pleurotus ostreatus* utilizando cascara de cacao (*Theobroma cacao*) y bambu (*Bambusa vulgaris* var. *Striata*) como sustratos. [en línea] (trabajo de titulación). (Pregrado) Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos, Guatemala. 2018.[Consulta: 18 mayo 2022]. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2112.pdf

VALLEJOS, M., CHADE, M., MERELES, E., BENGOCHEA, D., BRIZUELA, J., FELISSIA, F. & AREA, M. “Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse”. *Industrial Crops and Products*, vol. 9, n° 4 (2016), (Argentina) pp. 161-169.

VALVERDE, A. Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz. [en línea] (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia. 2017. pp. 5-8. [Consulta: 01 marzo 2022]. Disponible en: <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/717edd83-8b0b-4035-a237-c18cebec24cd/content>.

VILLAMIZAR, A. & CAYCEDO, J. *Basidiomycetes Características Generales* [en línea]. Pamplona-España: Ediciones Universidad de Pamplona, 2013. [Consulta: 01 marzo 2022]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/181340428/Basidiomycetes-Caracteristicas-Generales-pdf>.

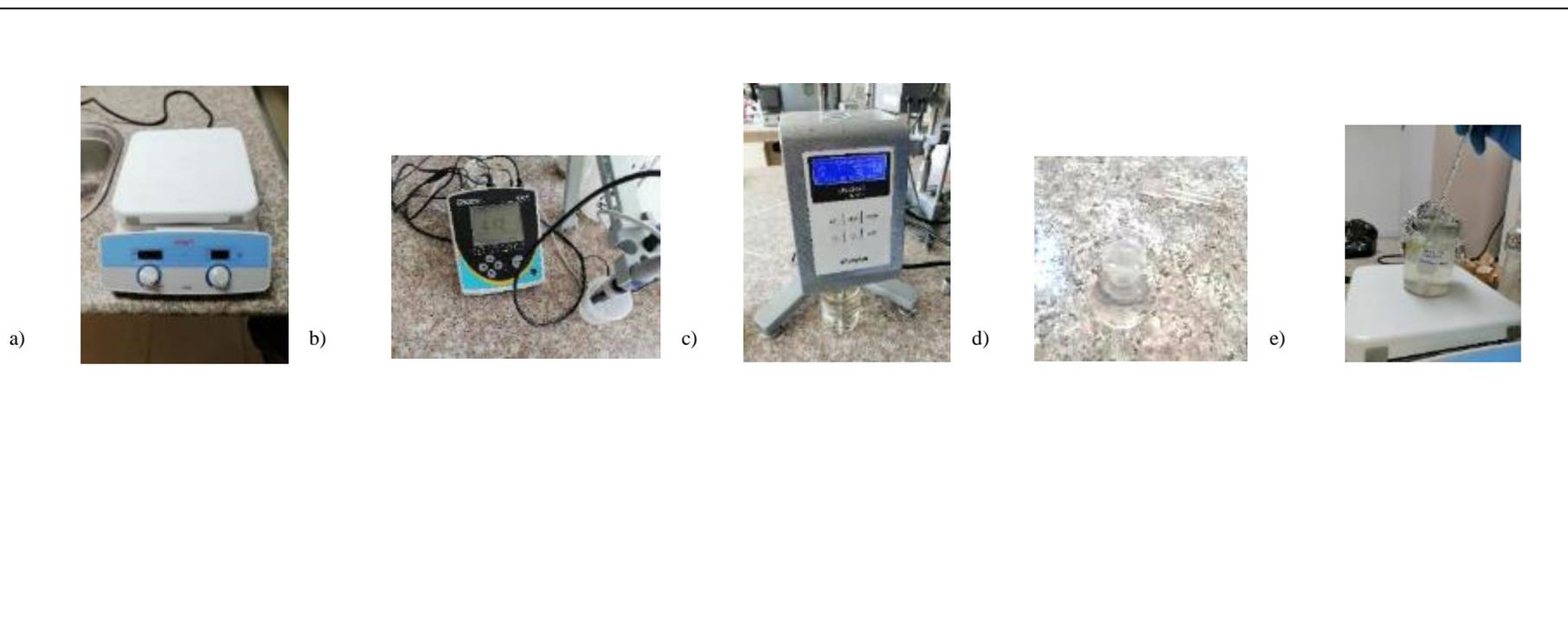
ANEXOS

ANEXO A: SIEMBRA, AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN DE *Pleurotus ostreatus* Y *Agaricus brunnescens*.



<p>DESCRIPCIÓN:</p> <p>a. Obtención de esporas de los hongos <i>A. brunnescens</i> y <i>P. ostreatus</i> mediante cámara seca.</p> <p>b. Observación del crecimiento del micelio en agar de <i>A. brunnescens</i> y <i>P. ostreatus</i>.</p> <p>c. Observación microscópica y morfológica de <i>A. brunnescens</i> y <i>P. ostreatus</i> a objetivo 10X.</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>ELABORADO POR:</p> <p>*Altamirano Kevin * Ortiz Angela</p>	<p>ANEXO A: SIEMBRA, AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN DE <i>Pleurotus ostreatus</i> Y <i>Agaricus brunnescens</i>.</p>		
		<p>LÁMINA</p> <p>1</p>	<p>ESCALA</p> <p>1:1</p>	<p>FECHA</p> <p>2022/03/16</p>

ANEXO B: DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS DE LOS BIORREACTORES



DESCRIPCIÓN:	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO ELABORADO POR: *Altamirano Kevin * Ortiz Angela	ANEXO B: DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS DE LOS BIOOREACTORES		
a. Agitador magnético Thermo Scientific S88857100 usado para la elección de la velocidad de agitación de los cultivos y temperatura. b. Medición de pH del cultivo liquido de <i>A. brunnescens</i> y <i>P. ostreatus</i> . c. Medición de viscosidad del cultivo usando un viscosímetro de Brookfield d. Medición de la densidad del cultivo liquido usando un picnómetro. e. Medición de la temperatura usando un termómetro de cobre.		LÁMINA	ESCALA	FECHA
		2	1:1	2022/03/16

ANEXO C: PRUEBAS PRE EXPERIMENTALES.



<p>DESCRIPCIÓN:</p> <p>a. Preparación medios de cultivo Honey Tek de <i>A. brunnescens</i> y <i>P. ostreatus</i>.</p> <p>b. Selección de velocidad de agitación optima de crecimiento micelial de <i>A. brunnescens</i> y <i>P. ostreatus</i>.</p> <p>c. Obtención de gránulos de micelio de <i>A. brunnescens</i> y <i>P. ostreatus</i> en la experimentación.</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO ELABORADO POR: *Altamirano Kevin * Ortiz Angela</p>	<p>ANEXO C: PRUEBAS PRE EXPERIMENTALES</p>		
		<p>LÁMINA</p>	<p>ESCALA</p>	<p>FECHA</p>
		<p>3</p>	<p>1:1</p>	<p>2022/03/16</p>

ANEXO D: PREPARACIÓN DE LOS BIORREACTORES PROTOTIPO

a)



b)



c)



DESCRIPCIÓN:

- Preparación de Honey tek en los biorreactores.
- Inoculación del micelio purificado en PDA en los biorreactores prototipos
- Ensamblaje de tapas y mangueras PVC de los biorreactores

**ESCUELA SUPERIOR
POLITECNICA DE
CHIMBORAZO**

ELABORADO POR:

*Altamirano Kevin

* Ortiz Angela

**ANEXO D: PREPARACIÓN DE LOS
BIORREACTORES PROTOTIPO**

LÁMINA

ESCALA

FECHA

4

1:1

2022/03/16

ANEXO E: VISUALIZACIÓN CONSTRUCCIÓN BIORREACTORES PROTOTIPOS

a)



b)



DESCRIPCIÓN:

- Observación de los Biorreactores prototipos *A. brunnescens* y *P. ostreatus* dentro de un baño maría construido dimensiones Largo 38 cm*ancho 21 cm*base 24.5 cm, acompañado de un termómetro automático 25 W capacidad 80L a 28°C.
- Extracción de muestras usando una jeringa de 60 mL usando un agitador magnético automático a 120 rpm y 28°C.

ESCUELA SUPERIOR
POLITECNICA DE
CHIMBORAZO
ELABORADO POR:

*Altamirano Kevin
*Ortiz Angela

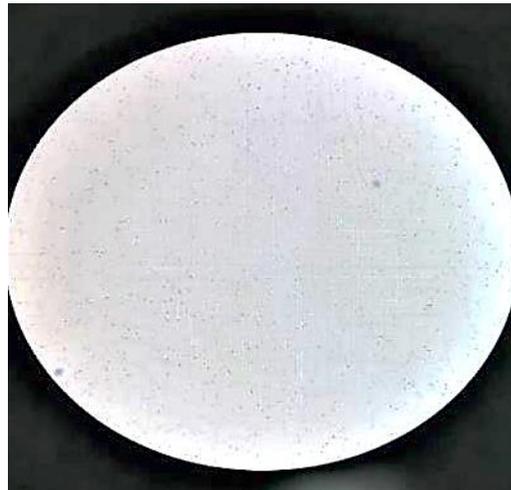
ANEXO E: VISUALIZACIÓN
CONSTRUCCIÓN BIORREACTORES
PROTOTIPOS

LÁMINA	ESCALA	FECHA
5	1:1	2022/03/16

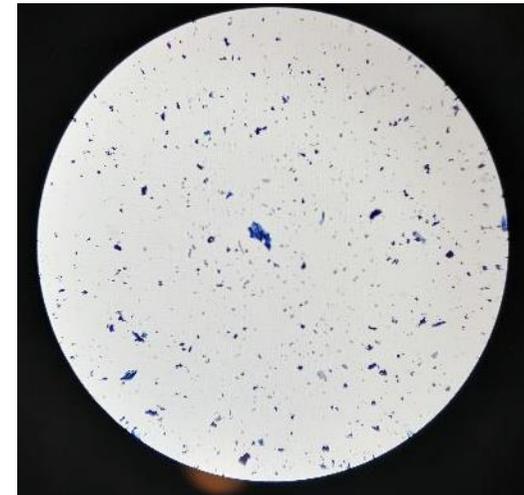
ANEXO F: DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CONIDIOS



a)



b)



c)

DESCRIPCIÓN:

- a. Observación de conidios mediante un microscopio electrónico.
- b. Observación de conidios *A. brunnescens* en la cámara de Neubauer a objetivo 10 X.
- c. Observación de conidios *P. ostreatus* en la cámara de Neubauer a objetivo 10 X.

**ESCUELA SUPERIOR
POLITECNICA DE
CHIMBORAZO**

ELABORADO POR:

*Altamirano Kevin

* Ortiz Angela

**ANEXO F: DETERMINACIÓN DEL
NÚMERO DE CONIDIOS**

LÁMINA	ESCALA	FECHA
6	1:1	2022/03/16

ANEXO G: DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA SECA



a)



c)



d)



DESCRIPCIÓN:

- Centrifugación de las muestras *A. brunnescens* y *P. ostreatus* a 4000 rpm por un tiempo de 15 minutos.
- Observación micelio precipitado de las muestras *A. brunnescens* y *P. ostreatus* de los biorreactores.
- Filtración de las muestras de cultivo micelial y pesaje de la biomasa húmeda.
- Se pesó en la balanza analítica luego del proceso de secado y se calculó la biomasa seca.

**ESCUELA SUPERIOR
POLITECNICA DE
CHIMBORAZO**
ELABORADO POR:

*Altamirano Kevin
* Ortiz Angela

ANEXO G: DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA SECA

LÁMINA	ESCALA	FECHA
7	1:1	2022/03/16

ANEXO H: PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DE MICELIO EN LOS SUSTRATOS



DESCRIPCIÓN:

- Molienda e hidratación de los sustratos.
- Preparación de sustratos en fundas autoclavables e inoculación de micelio *A. brunnescens* y *P. ostreatus*.
- Incubación de los sustratos en la alacena construida en el invernadero entre 26°C-28°C.

**ESCUELA SUPERIOR
POLITECNICA DE
CHIMBORAZO**

ELABORADO POR:

*Altamirano Kevin

* Ortiz Angela

**ANEXO H: PREPARACIÓN E
INCOULACIÓN DE MICELIO EN LOS
SUSTRATOS**

LÁMINA	ESCALA	FECHA
8	1:1	2022/03/16

ANEXO I: RESULTADOS PRUEBAS PRE EXPERIMENTALES.

a)

Resultados curva de crecimiento pre-experimental <i>Pleorutus ostreatus</i>		
Tiempo (Horas)	Concentración (Conidios/mL) a 140 y 150 rpm	Concentración (Conidios/mL) a 120 rpm
0	6000	21000
1	12000	32000
2	17000	30000
3	17500	27500
4	23500	38500
5	28000	42500

b)

Resultados curva de crecimiento pre-experimental <i>Agaricus brunnescens</i>		
Tiempo (Horas)	Concentración (Conidios/mL) a 140 y 150 rpm	Concentración (Conidios/mL) a 120 rpm
0	7000	16500
1	9500	32000
2	11000	44000
3	17500	37500
4	17000	32000
5	18000	39000

DESCRIPCIÓN:

- a. Resultados curva de crecimiento pre-experimental *Pleorutus ostreatus*
- b. Resultados curva de crecimiento pre-experimental *Agaricus brunnescens*

**ESCUELA SUPERIOR
POLITECNICA DE
CHIMBORAZO**
ELABORADO POR:

*Altamirano Kevin
* Ortiz Angela

**ANEXO I: RESULTADOS PRUEBAS PRE
EXPERIMENTALES**

LÁMINA	ESCALA	FECHA
9	1:1	2022/03/16

ANEXO J: RESULTADOS A ESCALA LABORATORIO

Resultados pruebas a escala laboratorio <i>Pleurotus ostreatus</i>					Resultados pruebas a escala laboratorio <i>Agaricus brunnescens</i>				
Días	Horas	Número de Conidios	Concentración (conidios/mL)	Curva de crecimiento exponencial log(Conidios/mL)	Días	Horas	Numero de Conidios	Concentración (Conidios/mL)	Curva de crecimiento exponencial log(Conidios/mL)
0	0	139	69500	4,841984805	0	0	31	15500	4,190331698
1	24	91	45500	4,658011397	1	24	16	8000	3,903089987
2	48	51	25500	4,40654018	2	48	21	10500	4,021189299
3	72	46	23000	4,361727836	3	72	15	7500	3,875061263
4	96	71	35500	4,550228353	4	96	32	16000	4,204119983
5	120	73	36500	4,562292864	5	120	32	16000	4,204119983
6	144	117	58500	4,767155866	6	144	105	52500	4,720159303
7	168	106	53000	4,72427587	7	168	81	40500	4,607455023
8	192	148	74000	4,86923172	8	192	79	39500	4,596597096
9	216	151	75500	4,877946952	9	216	72	36000	4,556302501
10	240	197	98500	4,99343623	10	240	115	57500	4,759667845
11	264	148	74000	4,86923172	11	264	92	46000	4,662757832
12	288	151	75500	4,877946952	12	288	88	44000	4,643452676
13	312	146	73000	4,86332286	13	312	96	48000	4,681241237
14	336	169	84500	4,926856709	14	336	91	45500	4,658011397
15	360	164	82000	4,913813852	15	360	89	44500	4,648360011

DESCRIPCIÓN: a. Resultados pruebas a escala laboratorio <i>Pleurotus ostreatus</i> b. Resultados pruebas a escala laboratorio <i>Agaricus brunnescens</i>	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO ELABORADO POR: *Altamirano Kevin * Ortiz Angela	ANEXO J: RESULTADOS A ESCALA LABORATORIO		
		LÁMINA 10	ESCALA 1:1	FECHA 2022/03/16

ANEXO K: RESULTADOS BIORREACTORES PROTOTIPO

Biorreactor prototipo <i>Pleurotus ostreatus</i>					Biorreactor prototipo <i>Agaricus brunnescens</i>				
Días	Horas	Número de Conidios	Concentración (conidios/mL)	Curva de crecimiento exponencial log(Conidios/mL)	Días	Horas	Numero de Conidios	Concentración (Conidios/mL)	Curva de crecimiento exponencial log(Conidios/mL)
0	0	14	7000	3,84509804	0	0	11	5500	3,740362689
1	24	49	24500	4,389166084	1	24	21	10500	4,021189299
2	48	58	29000	4,462397998	2	48	32	16000	4,204119983
3	72	63	31500	4,498310554	3	72	38	19000	4,278753601
4	96	78	39000	4,591064607	4	96	53	26500	4,423245874
5	120	114	57000	4,755874856	5	120	66	33000	4,51851394
6	144	99	49500	4,694605199	6	144	79	39500	4,596597096
7	168	115	57500	4,759667845	7	168	87	43500	4,638489257
8	192	141	70500	4,848189117	8	192	105	52500	4,720159303
9	216	102	51000	4,707570176	9	216	93	46500	4,667452953
10	240	124	62000	4,792391689	10	240	116	58000	4,763427994
11	264	143	71500	4,854306042	11	264	121	60500	4,781755375
12	288	132	66000	4,819543936	12	288	117	58500	4,767155866
13	312	140	70000	4,84509804	13	312	132	66000	4,819543936
14	336	152	76000	4,880813592	14	336	104	52000	4,716003344
15	360	129	64500	4,809559715	15	360	95	47500	4,67669361

DESCRIPCIÓN: a. Resultados biorreactor prototipo <i>Pleurotus ostreatus</i> b. Resultados biorreactor prototipo <i>Agaricus brunnescens</i>	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO ELABORADO POR: *Altamirano Kevin * Ortiz Angela	ANEXO K: RESULTADOS BIORREACTORES PROTOTIPO		
		LÁMINA 11	ESCALA 1:1	FECHA 2022/03/16

ANEXO L: RESULTADOS PROTEÍNAS *Agaricus brunnescens*.



INFORME DE RESULTADOS

INF LASA-22-03-22-1125
ORDEN DE TRABAJO No. 22-1161

INFORMACIÓN DEL CLIENTE		
SOLICITADO POR: ANGELA SOFIA ORTIZ BASTIDAS	DIRECCIÓN: 13 DE JUNIO Y EQUINOCCIAL (SAN ANTONIO DE PICHINCHA)	
TELÉFONO/FAX: 0967487385	TIPO DE MUESTRA: ESPECIAL	PROCEDENCIA: PLANTA
IDENTIFICACIÓN: <i>Micelio de Agaricus brunnescens</i>	CODIGO INICIAL: MI	

Información suministrada por el cliente

INFORMACIÓN DEL LABORATORIO		
MUESTREO POR: SOLICITANTE	FECHA DE MUESTREO: -	INGRESO AL LABORATORIO: 16/03/2022
FECHA DE ANÁLISIS: 16-22/03/2022	FECHA DE ENTREGA: 22/03/2022	NÚMERO DE MUESTRAS: Una (1)
CÓDIGO DE MUESTRA: 22-3274	REALIZACIÓN DE ENSAYOS: LABORATORIO	

ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO

ITEM	PARÁMETROS	UNIDADES	RESULTADOS	INCERTIDUMBRE U (k=2)	MÉTODO DE ENSAYO
1	PROTEÍNA (f. 6.25)	%	41,06	-	^b PEE LASA.FQ.11 KJELDAHL *

Los ensayos marcados con * NO están incluidos en el alcance de acreditación del SAE
Los ensayos marcados con (b) NO están incluidos en el alcance de acreditación de A2LA.

Q.A. VANESSA RENTERÍA
JEFE DE DEPARTAMENTO

Prohibida la reproducción parcial por cualquier medio sin permiso por escrito del laboratorio.
LASA se responsabiliza exclusivamente del resultado correspondiente a los ensayos en la muestra recibida en el laboratorio, por el contrario no se responsabiliza de la información proporcionada por el cliente asociada a la muestra así como sus datos descriptivos.
Los criterios de conformidad serán emitidos solamente si el cliente lo solicita por escrito.
El laboratorio se compromete con la Imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (la aceptación de este informe implica la aceptación de la política relativa al tema y declarada en www.laboratoriolasa.com)

Pág. 1 de 1

Juan Ignacio Pareja 065-97 y Simón Cárdenas | clientes@laboratoriolasa.com
(02) 2269012 | (02) 2468659 | 0995707705

DESCRIPCIÓN:	ESCUELA SUPERIOR	ANEXO L: RESULTADOS		
Resultados biorreactor <i>Agaricus brunnescens</i>	POLITECNICA DE CHIMBORAZO	PROTEÍNAS <i>Agaricus brunnescens</i>		
	ELABORADO POR:	LÁMINA	ESCALA	FECHA
	*Altamirano Kevin * Ortiz Angela	12	1:1	2022/03/16

ANEXO M: RESULTADOS PROTEÍNAS *Pleurotus ostreatus*



INFORME DE RESULTADOS

INF LASA-22-03-22-1126
ORDEN DE TRABAJO No. 22-1161

INFORMACIÓN DEL CLIENTE		
SOLICITADO POR: ANGELA SOFIA ORTIZ BASTIDAS	DIRECCIÓN: 13 DE JUNIO Y EQUINOCCIAL (SAN ANTONIO DE RICHINCHA)	
TÉLEFONO/FAX: 0967487385	TIPO DE MUESTRA: ESPECIAL	PROCEDENCIA: PLANTA
IDENTIFICACIÓN: Micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i>	CODIGO INICIAL: M2	

Información suministrada por el cliente

INFORMACIÓN DEL LABORATORIO		
MUESTREO POR: SOLICITANTE	FECHA DE MUESTREO: -	INGRESO AL LABORATORIO: 16/03/2022
FECHA DE ANÁLISIS: 16-22/03/2022	FECHA DE ENTREGA: 22/03/2022	NÚMERO DE MUESTRAS: Una (1)
CÓDIGO DE MUESTRA: 22-3275	REALIZACIÓN DE ENSAYOS: LABORATORIO	

ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO

ITEM	PARÁMETROS	UNIDADES	RESULTADOS	INCERTIDUMBRE U (k=2)	MÉTODO DE ENSAYO
1	PROTEÍNA (f. 6,25)	%	23,5	-	^b PEE LASA FQ.11 KJELDAHL *

Los ensayos marcados con * NO están incluidos en el alcance de acreditación del SAE
Los ensayos marcados con (b) NO están incluidos en el alcance de acreditación de A2LA.

Q.A VANESSA RENTERÍA
JEFE DE DEPARTAMENTO

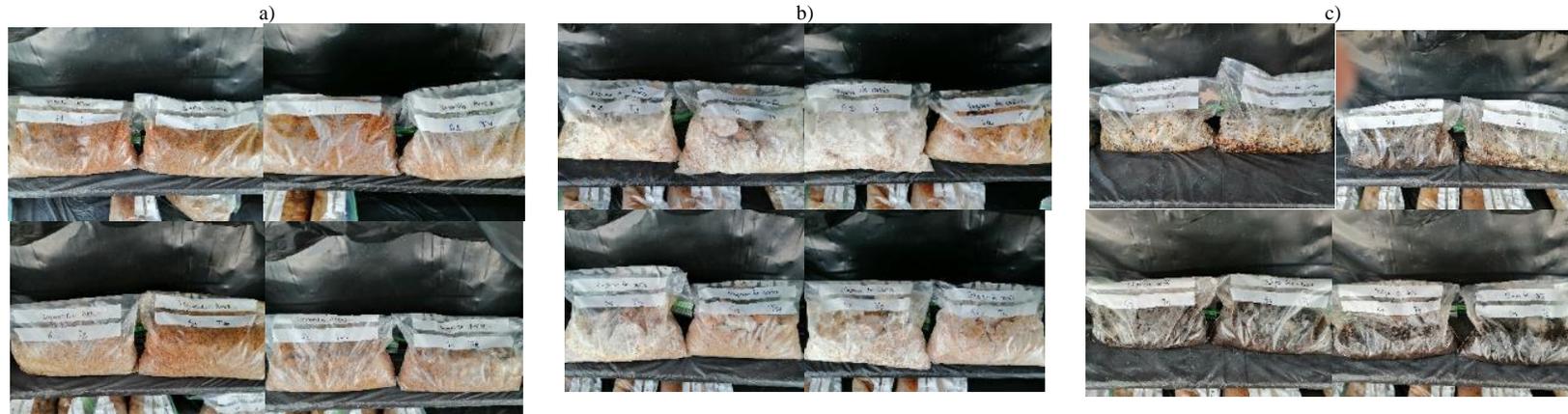
Prohibida la reproducción parcial por cualquier medio sin permiso por escrito del laboratorio.
LASA se responsabiliza exclusivamente del resultado correspondiente a los ensayos en la muestra recibida en el laboratorio, por el contrario no se responsabiliza de la información proporcionada por el cliente asociada a la muestra así como sus datos descriptivos.
Los criterios de conformidad serán emitidos solamente si el cliente lo solicita por escrito.
El laboratorio se compromete con la Imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (la aceptación de este informe implica la aceptación de la política relativa al tema y declarada en www.laboratoriolasa.com)

Pág. 1 de 1

Juan Ignacio Pareja Qe5-97 y Simón Cárdenas | clientes@laboratoriolasa.com
(02) 2269012 | (02) 2468659 | 0995707705

DESCRIPCIÓN: Resultados proteínas biorreactor prototipo <i>Pleurotus ostreatus</i>	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO ELABORADO POR: * Altamirano Kevin * Ortiz Angela	ANEXO M RESULTADOS BIORREACTORES PROTOTIPO		
		LÁMINA	ESCALA	FECHA
		13	1:1	2022/03/ 16

ANEXO N: RESULTADOS COLONIZACIÓN DE MICELIO EN SUSTRATOS



DESCRIPCIÓN:	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO ELABORADO POR: *Altamirano Kevin * Ortiz Angela	ANEXO N: RESULTADOS COLONIZACIÓN DE MICELIO EN SUSTRATOS		
a. Colonización de <i>A. brunnescens</i> y <i>P. ostreatus</i> . en cascarilla de arroz.		LÁMINA	ESCALA	FECHA
b. Colonización de <i>A. brunnescens</i> y <i>P. ostreatus</i> . en bagazo de caña. c. Colonización de <i>A. brunnescens</i> y <i>P. ostreatus</i> . en pulpa de café.		14	1:1	2022/03/16

ANEXO O: RESULTADOS PORCENTAJES DE RENDIMIENTOS DE *Pleurotus ostreatus* Y *Agaricus brunnescens*

a)					b)				
Sustrato	Tratamiento	Peso fresco hongo (g)	Peso sustrato húmedo (g)	Rendimiento (%)	Sustrato	Tratamiento	Peso fresco hongo (g)	Peso sustrato húmedo (g)	Rendimiento (%)
Cascarilla de arroz	S1T1	268,00	466,67	57,43	Cascarilla de arroz	S1T1	269,00	466,67	57,64
Cascarilla de arroz	S1T2	246,00	466,67	52,71	Cascarilla de arroz	S1T2	257,00	466,67	55,07
Cascarilla de arroz	S1T3	239,00	466,67	51,21	Cascarilla de arroz	S1T3	252,00	466,67	54,00
Cascarilla de arroz	S1T4	236,00	466,67	50,57	Cascarilla de arroz	S1T4	243,00	466,67	52,07
Bagazo de caña	S2T1	355,00	466,67	76,07	Bagazo de caña	S2T1	352,00	466,67	75,43
Bagazo de caña	S2T2	354,00	466,67	75,86	Bagazo de caña	S2T2	350,00	466,67	75,00
Bagazo de caña	S2T3	345,00	466,67	73,93	Bagazo de caña	S2T3	343,00	466,67	73,50
Bagazo de caña	S2T4	342,00	466,67	73,29	Bagazo de caña	S2T4	341,00	466,67	73,07
Pulpa de café	S3T1	371,00	466,67	79,50	Pulpa de café	S3T1	382,00	466,67	81,86
Pulpa de café	S3T2	363,00	466,67	77,79	Pulpa de café	S3T2	377,00	466,67	80,79
Pulpa de café	S3T3	359,00	466,67	76,93	Pulpa de café	S3T3	365,00	466,67	78,21
Pulpa de café	S3T4	355,00	466,67	76,07	Pulpa de café	S3T4	345,00	466,67	73,93

DESCRIPCIÓN: a.Resultados porcentajes de rendimientos de las siembras <i>Pleurotus ostreatus</i> b.Resultados porcentajes de rendimientos de las siembras <i>Agaricus brunnescens</i>	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO ELABORADO POR: *Altamirano Kevin * Ortiz Angela	ANEXO O: RESULTADOS PORCENTAJES DE RENDIMIENTOS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Agaricus brunnescens</i>		
		LÁMINA 15	ESCALA 1:1	FECHA 2022/03/16

ANEXO P: PRESUPUESTO

a)				b)			
Recursos	Fuente propia	Fuente externa	Precio Total (\$)	Recursos	Fuente propia	Fuente externa	Precio Total (\$)
Mano de obra para la construcción de los Biorreactores	X		200	Materiales para la construcción de los biorreactores	X		185
Mano de obra para la construcción de la alacena en el invernadero	X		350	Materiales para obtención y siembra en sustratos	X		145
				Materiales para la obtención del cultivo micelial	X		124
TOTAL			550	TOTAL			454

c)	
Descripción	Monto (\$)
Presupuesto recursos humanos	550
Presupuesto recursos totales	454
TOTAL	1004

DESCRIPCIÓN: a. Recursos humanos b. Recursos materiales c. Recursos totales	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO ELABORADO POR: *Altamirano Kevin * Ortiz Angela	ANEXO P: PRESUPUESTO		
		LÁMINA	ESCALA	FECHA
		16	1:1	2022/03/16

ANEXO Q: CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	TIEMPO															
	MES 1				MES 2				MES 3				MES 4			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Obtención micelio <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Agaricus brunnescens</i> en PDA	█															
Aislamiento y purificación de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Agaricus brunnescens</i>	█															
Preparación medios Honey estériles		█														
Inoculación <i>Agaricus brunnescens</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> en los medios Honey		█														
Agitación a 120 rpm e incubación a 28°C de Honey		█														
Medición pH, densidad y viscosidad inicial			█													
Identificación microscópica del crecimiento de <i>Agaricus brunnescens</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>				█												
Conteo de conidios en la cámara de Neubauer a objetivo 10X					█											
Medición pH, densidad y viscosidad final						█										
Verificación de contaminación biorreactores						█										
Preparación de sustratos: pulpa de café, bagazo de caña y cascarilla de arroz						█	█	█								
Secado de los sustratos							█	█								
Triturado e hidratación de los sustratos									█							
Esterilización de los sustratos									█							
Inoculación micelio sobre sustratos									█							
Registro tiempos de colonización en los sustratos										█	█	█				
Determinación de biomasa final y porcentaje de proteínas													█	█	█	



epoch

**Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje**

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS
BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y
BIBLIOGRAFÍA**

Fecha de entrega: 16 / 06 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Kevin Javier Altamirano Cabay Angela Sofia Ortiz Bastidas
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Ingeniería en Biotecnología Ambiental
Título a optar: Ingeniero en Biotecnología Ambiental
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.


DIRECCION DE BIBLIOTECAS
Y RECURSOS PARA EL APRENDIZAJE
Y LA INVESTIGACION
 Ing. Jhonatan Parreno Uquillas MBA
DBRA / ANALISTA DE BIBLIOTECA 1



1251-DBRA-UTP-2022