



PRODUCCIÓN DE BIOMASA A PARTIR DE *Aspergillus oryzae* EN CULTIVO SUMERGIDO

BIOMASS PRODUCTION FROM *Aspergillus oryzae* IN SUBMERGED CULTURE

Alejandro De Jesús Cortés-Sánchez*¹, Luis Manuel Guadarrama², Mayra Díaz-Ramírez³

¹ Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Microbiología. México D.F.

² Escuela de Ingeniería en Alimentos, Biotecnología y Agronomía. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM)-Campus Querétaro.

³ Departamento de Alimentos. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Unidad Lerma. Edo. México.

RESUMEN

La producción de biomasa a partir de microorganismos probióticos, como *Aspergillus oryzae*, puede ser una alternativa para satisfacer la demanda creciente de alimentos. Además de ser considerado como probiótico, este microorganismo es muy utilizado en la elaboración de alimentos tradicionales fermentados en países del continente Asiático. En el presente estudio se evaluó la producción biomasa, consumo de sustrato, contenido de proteína, rendimiento y cambios de pH generados por *A. oryzae* en cultivo sumergido, a partir de dos diferentes sustratos no convencionales (leche de vaca en polvo sin grasa Svelty Nestle® y medio Litmus Milk Sigma-Aldrich®) y dos condiciones de proceso (35°C/160 rpm/96 h y 30°C/180 rpm/96 h). Los resultados muestran como *Aspergillus oryzae* cumplió su carácter de aerobio mostrando mejores niveles de crecimiento y generación de biomasa en condiciones de mayor agitación y menor temperatura, siendo la mejor condición de proceso a 180 rpm/30°C con un mayor rendimiento de 12.25g biomasa/g sustrato, utilizando como sustrato leche de vaca en polvo sin grasa Svelty Nestle®. Los cambios en pH no tuvieron un efecto significativo sobre la producción de biomasa, consumo de sustrato y proteína.

Palabras clave.- Leche, biomasa, hongos, *Aspergillus oryzae*, probióticos

ABSTRACT

The biomass produced by probiotic microorganisms, as *Aspergillus oryzae*, could be an alternative to meet the growing demand for human or animal food. This microorganism, is well known as a probiotic, and is extensively used in traditional fermented food in Asian countries. This study evaluated the biomass production, substrate consumption, pH changes, protein content and yield from *A. oryzae* grown in submerged culture with two non-conventional substrates (skim milk powder Svelty Nestle® and culture medium Litmus Milk Sigma-Aldrich®), and two process conditions (35°C/160 rpm/96 h y 30°C/180 rpm/96 h). The results show the aerobic behavior reported for *A. oryzae*, with higher levels of growth and biomass generation with higher agitation and lower temperature conditions, being the best process condition at 180 rpm/30°C

using defatted milk as substrate (skim milk powder Svelty Nestle®), the highest yield obtained at these conditions was 12.25g biomass/g substrate. The pH changes did not affect significantly the biomass production, substrate consumption nor protein content.

Key words: Milk, biomass, fungi, *Aspergillus oryzae*, probiotics.

INTRODUCCIÓN

La producción de biomasa o proteína unicelular a partir de diversos microorganismos como algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos, cultivados en condiciones fermentativas adecuadas y con sustratos baratos, compuestos o enriquecidos con carbono, nitrógeno y fósforo (Chacón, 2004; Carrillo-Inungaray *et al.*, 2010) parecen ser una alternativa inmediata de fuentes alimentarias para la nutrición animal (Chacón, 2004). En un futuro pueden considerarse para consumo humano, ya que algunos de estos microorganismos son considerados probióticos (Chaucheyras-Durand y Fonty, 2002; Chacón, 2004) que podrían destinarse para este fin. Diferentes bacterias del género *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, así como levaduras y hongos, entre los cuales figuran *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces carlbergiensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* son considerados ya como probióticos (Ashayerizadeh *et al.*, 2009; Musa *et al.*, 2009; Sayan *et al.*, 2013; Hernández y Borrel, 1993), siendo estos tres últimos microorganismos fuente de proteína unicelular y probióticos en la alimentación, producción y sanidad animal de rumiantes y aves (Martin y Nisbet, 1990; KyungWoo *et al.*, 2006; Ashayerizadeh *et al.*, 2009; Buitrago *et al.*, 2008).

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser consumidos en cantidades apropiadas proporcionan beneficios a la salud del huésped (Guarner *et al.*, 2011; Ashayerizadeh *et al.*, 2009; Musa *et al.*, 2009; Sayan *et al.*, 2013; Hernandez y Borrel, 1993; KyungWoo *et al.*, 2006). Esto mediante distintos mecanismos, como son la acidificación de la luz intestinal, liberación de sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, efectos inmunomoduladores, hipocolesterolémicos y anticancerígenos (Lorente y Serra, 2001). Para la alimentación animal se basan en las propiedades benéficas que se les atribuyen al mejorar

*Autor para envío de correspondencia: Alejandro De Jesús Cortés-Sánchez
Correo electrónico: alecortes_1@hotmail.com

Recibido: 20 de enero de 2014

Aceptado: 12 de abril de 2014

la eficiencia de conversión alimenticia, promoción del crecimiento, reducción del número de coliformes y patógenos intestinales. Además, pueden ser sustitutos de terapias con antibióticos por métodos menos agresivos que con lleven a una mejor salud animal, producción y fuente de alimentos destinados al consumo humano (Rosmini *et al.*, 2004).

Por otro lado, el cultivo sumergido ha sido considerado un buen método para la generación y obtención de diversos metabolitos de interés en diversas industrias como la farmacéutica, de salud y la alimentaria, inclusive para la obtención de biomasa como producto final. Este método de cultivo prevalece por encima de otros sistemas convencionales, ya que presenta varias ventajas, entre las cuales están el control y seguimiento de condiciones de cultivo como temperatura, pH, agitación, concentración de nutrientes, esterilidad, disminución del tiempo para la obtención de biomasa y moléculas bioactivas, así como la reducción de costos de obtención, separación y purificación de los metabolitos de interés (Zapata *et al.*, 2007). Para el caso de estudios de hongos en cultivo sumergido, este tiene ventajas importantes, ya que se ha reportado que tiene una producción de micelio mayor en un espacio compacto, en menor tiempo y con menor riesgo de contaminación (Kim *et al.*, 2002; Friel y McLoughlin, 2000; Yang y Liao, 1998), además los gradientes de temperatura, de concentración de oxígeno y nutrientes son pequeños a ausentes por lo que puede utilizarse para la producción de biomasa de *A. oryzae* (Biesebeke *et al.*, 2002).

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de dos diferentes condiciones de temperatura y agitación y de dos tipos de sustrato en el crecimiento y generación de biomasa, consumo de sustrato, rendimiento y proteína en cultivo sumergido por parte de una cepa probiótica como *A. oryzae*.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Sustratos como medios de cultivo.

Se utilizaron dos sustratos como medio de cultivo: a) Leche de vaca en polvo sin grasa Svelty Nestle® y b) Medio Litmus Milk Sigma-Aldrich® (medio de cultivo microbiológico de composición química definida).

Material biológico.

La cepa de *Aspergillus Oryzae* fue proporcionada de la colección microbiológica de la Escuela de Ingeniería en Alimentos, Biotecnología y Agronomía del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey-campus Querétaro, Querétaro, México.

Conservación y propagación de cepa fúngica.

El hongo se cultivó en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona caseína, 2% dextrosa (Ausubel *et al.*, 1994), a 30°C/ 200 rpm/ 48 h en una incubadora de agita-

ción orbital y temperatura controlada (KS3000i Marca IKA). Posteriormente, se transfirió 0.5 mL del cultivo en viales de 1.5 mL estériles y se les adicionó 0.5 mL de glicerol al 50% previamente esterilizado y posteriormente se procedió a su almacenamiento a -70°C.

Cultivo iniciador.

El cultivo iniciador se preparó al adicionar a temperatura ambiente el contenido de un criovial con *A. oryzae* almacenado a -70°C, a un matraz con medio de cultivo YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona caseína, 2% dextrosa) y se colocó en una incubadora de agitación orbital y temperatura controlada (KS3000i Marca IKA) a 30°C/ 180 rpm/96 h.

Preparación de medios de cultivo lácteos.

Se prepararon dos diferentes medios de cultivo de origen lácteo, en una proporción de 4,67 g /35 mL (Leche sin grasa Svelty Nestle®) y 3,53 g/ 35 mL (Medio Litmus Milk); ambos fueron reconstituidos con agua destilada y posteriormente esterilizados a 121°C/15 min/15 lb para su posterior fermentación.

Fermentación de los medios de cultivo lácteos.

Se emplearon matraces Erlenmeyer de 100mL con un volumen de operación de 35 mL y se inocularon con 1 mL del cultivo iniciador en YPD de 72h con una biomasa de 7,34 g/L, posteriormente se incubaron a dos diferentes condiciones: 35°C/160 rpm/96 h y 30°C/180 rpm/96 h. A cada cultivo se les determinó la biomasa generada (X_t), cambios de pH en el medio de cultivo, azúcares reductores (S_t) y proteína soluble cada 24h.

Determinación de azúcares reductores (S_t). Se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó 10000 rpm/30 min, y al sobrenadante obtenido se le adicionó 3 mL de reactivo 3,5-dinitro salicílico (DNS) (Sigma-Aldrich), la mezcla se calentó a 90°C entre 5-15 minutos y se le agregó 1 mL de una solución de tartrato de sodio potasio al 40%. Se procedió a enfriar la mezcla en un baño de agua y se registró la lectura en un espectrofotómetro (UVD-3500 marca Labomed) a 575nm (Miller, 1959).

Análisis de proteína. Se tomó 1 mL de medio de cultivo y se le agregó 0.5 mL butanol/etanol (1:1), se mezcló vigorosamente y se colocó en una centrifuga (Z 383 K marca Hermler) operándose a 11310 rpm/30 min, al precipitado se le adicionó 1 mL de NaOH 1M y se calentó en baño maría a 95°C/20 min, se dejó enfriar, se mezcló vigorosamente y posteriormente se centrifugó nuevamente a 11310 rpm/30 min y a la solución sobrenadante (Spoeckner *et al.*, 1999) se le realizó la determinación de proteínas (Bradford, 1976).

Cuantificación de pH y biomasa (X_t). Se determinó el pH del medio de cultivo a 25°C utilizando un potenciómetro Thermo Scientific (Orion 3-Star Plus) previamente calibrado. Posteriormente se obtuvo la biomasa (X_t) vertiendo el contenido total del matraz de fermentación a través de un papel filtro Whatman No.1 previamente secado y pesado, posteriormente el papel filtro fue secado en un horno (Binder

No. 10-21821) a 90-100°C hasta su peso constante (Oshoma y Ikenebomeh, 2005).

Determinación de los parámetros de crecimiento.

A partir de los datos obtenidos de biomasa (X_t) y su valor inicial (X_0) a los diferentes tiempos, se graficó X (g/L) vs t (h) obteniendo de la fase logarítmica el valor de la velocidad de crecimiento (μ) y considerando que ésta permanece constante se utilizó la ecuación 1.

Para el cálculo de la velocidad de consumo de sustrato (q_s) considerando S_0 como el valor inicial de consumo y S_t el consumo al tiempo (t), de la gráfica S_t vs t se obtiene el valor de la pendiente (q_s) considerando la ecuación 2.

El rendimiento final (Y_x) se calculó con la ecuación 3.

Análisis de resultados. Todos los experimentos se hicieron por triplicado. Para el análisis de resultados se utilizó el software MS-Excel 2007 y Sigma-plot versión 10.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biomasa generada

La Figura 1 muestra el efecto de las condiciones de operación en cultivo sumergido (agitación y temperatura) y del sustrato utilizado (Leche sin grasa y medio Litmus) en el crecimiento o generación de biomasa (X_t) de *A. Oryzae*. El crecimiento de este microorganismo alcanzó un máximo a las 72 h de cultivo en todas las condiciones utilizadas, con excepción del cultivo en medio Litmus a 160 rpm/35°C (48h), alcanzando los valores máximos de X_t a mayores velocidades de agitación (180 rpm), independientemente del sustrato utilizado, siendo de 43.64 ± 1.5 g/L para Leche sin grasa (Svelty) y de 43.05 ± 2.0 g/L para medio Litmus. En cuanto al efecto de la temperatura, se encontró que X_t aumenta a me-

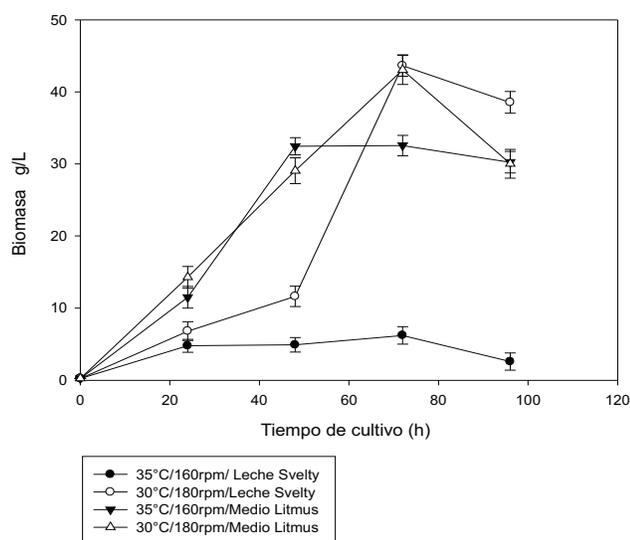


Figura 1.- Biomasa generada en dos diferentes medios y condiciones de cultivo por *Aspergillus oryzae*.

Figure 1.- Biomass generated from two different media and culture conditions for *Aspergillus oryzae*.

nor temperatura ya que en condiciones de 35°C los valores de obtención de X_t fueron significativamente menores con respecto al crecimiento a 30°C con ambos sustratos (Leche Svelty, 6.21 ± 1.2 g/L y Medio Litmus, 32.56 ± 1.4 g/L). Al utilizar el medio Litmus a 35°C/160 rpm se observó que X_t es mayor con respecto al valor obtenido usando Leche Svelty, sin embargo en condiciones de 30°C/180rpm X_t no fue significativamente diferente, por lo que se sugiere, a partir de estos resultados, que las condiciones de cultivo (aireación y temperatura) son los factores que determinan o limitan la producción de biomasa (X_t) en mayor grado que el tipo de sustrato. Sin embargo, al analizar los valores de velocidades de crecimiento (Cuadro 1) se observa que no sólo las condiciones del cultivo afectan el crecimiento, sino también el tipo de sustrato, ya que éstas fueron significativamente diferentes al pasar de un medio a otro, observando el valor mayor utilizando como sustrato leche desgrasada Svelty (0.049 h⁻¹). Se ha reportado, en estudios realizados por diversos investigadores, sobre el crecimiento fúngico y producción de metabolitos de interés alimenticio, que cepas del género *Aspergillus sp.* como *Aspergillus niger* presentan un máximo crecimiento en cultivo sumergido, aproximadamente superior a 20 g/L a los 4 días/30°C/180 rpm en sustratos de origen lácteo como el suero de leche (Toro *et al.*, 2004). Asimismo, la proporción de biomasa generada por cepas de *Aspergillus niger* en el suero de leche sometido a un proceso de hidrolizado fue de 15,21 g/L y en suero entero de 8,75 g/L al día 8 de cultivo a 30°C (Leal *et al.*, 2011).

El contenido de carbohidratos presentes en el cultivo (Figura 2) también se cuantificó, midiendo el consumo con respecto al tiempo (S_t), mostrando que en medio Litmus esta variable se comporta de manera similar en ambas condiciones de cultivo, mientras que en el caso de Leche Svelty hay una mayor disminución del sustrato (S_t) en condiciones de mayor agitación (180 rpm) y menor temperatura (30°C). Esto se confirma con los valores de velocidad de consumo de sustrato q_s obtenidos (Figura 1), ya que en medio Litmus los valores de q_s no son significativamente diferentes, independientemente de las condiciones utilizadas; mientras que en el caso de Leche Svelty, q_s es significativamente mayor en condiciones de 180 rpm/30°C. De estos resultados se obtuvo el rendimiento final (Y_x) de biomasa generada por consumo de sustrato durante el proceso y se observó que a pesar de que hay una velocidad de consumo mayor de sustrato en el medio Litmus con respecto al medio de Leche desgrasada Svelty, la velocidad de crecimiento en este último medio fue mucho mayor en condiciones de mayor agitación y menor temperatura (180rpm/30°C), siendo su rendimiento considerablemente mayor (12.25 g_x/g_s) con respecto a los otros tratamientos, posicionándolo como la mejor opción de las estudiadas para la producción de biomasa.

Otro aspecto importante a evaluar fue el contenido de proteína (Figura 3) durante el crecimiento de *A. oryzae*, donde se observa que los valores mayores se presentaron nuevamente en condiciones con una agitación de 180rpm y 30°C en los medios Litmus (14.95 ± 0.5 mg/mL) y leche Svelty

Tabla 1. Velocidades de crecimiento μ (h^{-1}) de la fase logarítmica de crecimiento de *Aspergillus oryzae* utilizando $X_t = X_0 e^{\mu t}$, consumo de sustrato (q_s) utilizando $S_t = S_0 e^{-q_s t}$ y rendimiento final (Y_f) a diferentes condiciones y sustratos en cultivo sumergido.

Table 1.- Growth rates μ (h^{-1}) in the logarithmic growth phase of *Aspergillus oryzae* using $X_t = X_0 e^{\mu t}$, substrate consumption (q_s) using $S_t = S_0 e^{-q_s t}$ and final yield (Y_f) at different growth conditions and substrates in submerged culture.

Condiciones	Sustrato									
	Leche Svelty					Medio Litmus				
	μ (h^{-1})	R^2	q_s	R^2	Y_x (g_x/g_s)	μ (h^{-1})	R^2	q_s	R^2	Y_x (g_x/g_s)
160rpm/35°C	0.006	0.851	0.00091	0.787	6.34	0.015	0.657	0.007	0.853	2.14
180rpm/30°C	0.049	0.987	0.004	0.913	12.25	0.021	0.976	0.008	0.871	2.16

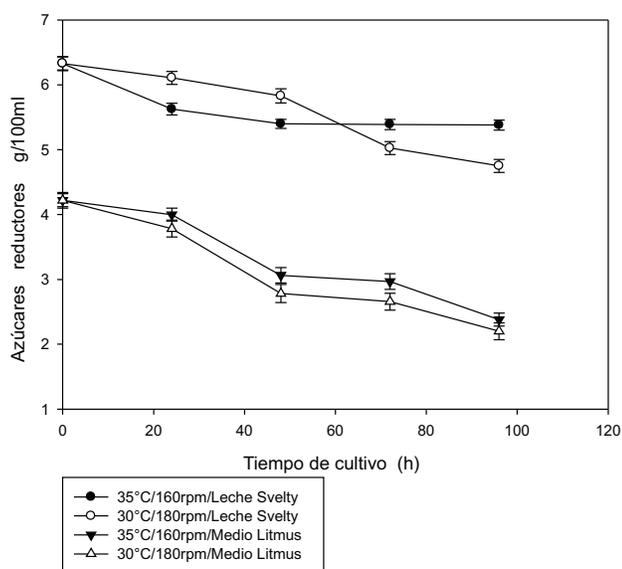


Figura 2.- Azúcares reductores residuales en el medio de cultivo de *Aspergillus oryzae* durante su crecimiento en 2 diferentes medios y condiciones de cultivo.

Figure 2.- Residual reducing sugars in the culture medium of *Aspergillus oryzae* during growth in two different media and culture conditions.

sin grasa (17.6 ± 0.5 mg/mL), los que presentaron las mayores proporciones de proteína a las 72h y 48h de cultivo respectivamente, comparados con los resultados obtenidos a una temperatura de incubación mayor de 35°C, pero a una menor agitación con 160 rpm. En estas condiciones (180 rpm y 30°C) y de acuerdo con los resultados obtenidos, la leche sin grasa Svelty resultó ser mejor sustrato para la obtención de proteína comparada con el medio Litmus, ya que se obtuvo una mayor cantidad de proteína en un menor tiempo, lo que sugiere que la asimilación de este sustrato por *A. oryzae* para la producción de proteína fue favorecida tanto por el tipo de sustrato como por las condiciones de agitación y temperatura.

Por último, se observaron los cambios de pH (Figura 4), debido a la actividad metabólica de asimilación del sustratos, principalmente azúcares y generación de metabolitos de carácter ácido por parte del hongo durante su crecimiento de los medios de cultivo a través del tiempo y su relación con la generación de biomasa (X_t), consumo de azúcares (S_t) y ob-

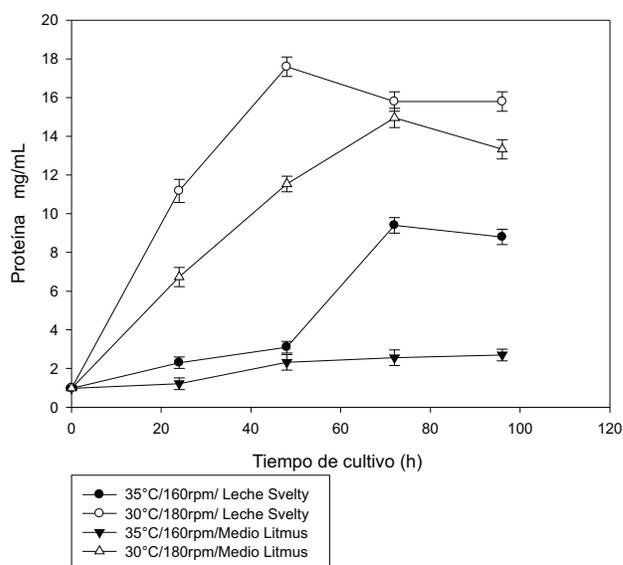


Figura 3.- Proteína presente en dos diferentes medios y condiciones de cultivo durante el crecimiento de *Aspergillus oryzae*.

Figure 3.- Protein content in two different media and culture conditions during growth of *Aspergillus oryzae*.

tención de proteína (Tabla 2). La Figura 4 muestra que el valor de pH disminuyó durante las 72 h de cultivo en condiciones de menor temperatura y mayor agitación (180 rpm/30°C), siendo más drástico el cambio en el medio de cultivo Litmus con respecto a la Leche Svelty, esto podría relacionarse con la fase de crecimiento del hongo, mientras que en las condiciones de menor aireación y mayor temperatura el pH disminuyó durante las primeras 48h de cultivo y posteriormente se incrementó, siendo notable nuevamente el cambio en el medio de cultivo Litmus. El incremento de pH en el medio se debe posiblemente a la hidrólisis y posterior asimilación de la fuente proteínica, como son caseínas presentes en el medio y cuya liberación de sus respectivos grupos amino que las conforman alcalinizan el medio de cultivo, originando un incremento de pH. El medio constituido por leche sin grasa a 35°C y 160 rpm tuvo sólo ligeros cambios durante el transcurso de las siguientes horas del cultivo. El Cuadro 2 muestra el análisis estadístico de la relación que existe entre el cambio de pH y las demás variables evaluadas en este estudio, sin

Tabla 2. Relación entre el pH, producción de biomasa (X_t), consumo de sustrato (S_t) y producción de proteína.
Table 2. Relationship between pH, biomass production (X_t), substrate consumption (S_t) and protein production.

Variables	pH				
		Leche Svelty		Medio Litmus	
		160rpm/35°C	180rpm/35°C	160rpm/35°C	180rpm/35°C
X_t	r	-0.680	-0.328	0.173	-0.723
	P	0.207	0.590	0.781	0.168
S_t	r	0.842	0.167	-0.513	0.311
	P	0.0736	0.788	0.376	0.610
Proteína	r	-0.214	-0.520	0.424	-0.607
	P	0.729	0.239	0.477	0.278

r: Coeficientes de correlación. Valores de P mayores a 0.050 no presentan una relación significativa entre ambas variables

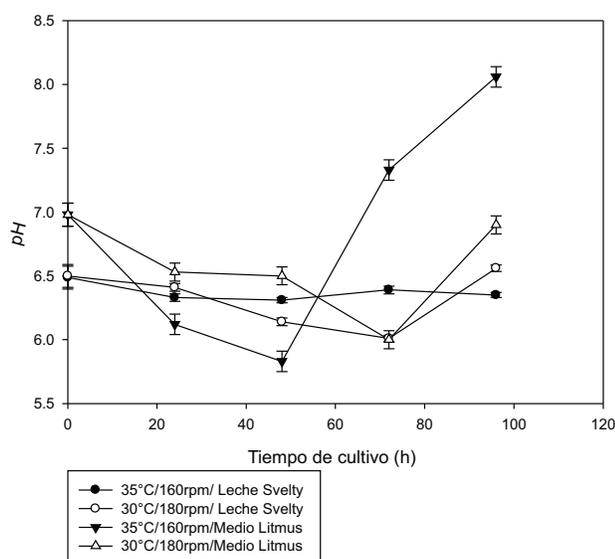


Figura 4.- Cambios de pH en dos diferentes medios y condiciones de cultivo durante el crecimiento de *Aspergillus oryzae*.

Figure 4.- pH Changes in two different media and culture conditions during growth of *Aspergillus oryzae*.

embargo, como se observa, no hubo una relación clara entre los cambios de pH observados y las demás variables evaluadas (biomasa, consumo de sustrato, producción de proteína).

CONCLUSIÓN

A. oryzae es un hongo capaz de crecer y desarrollarse en medios de cultivo con componentes de origen lácteo, siendo las condiciones que promueven la aireación como 30°C/180 rpm las que dieron lugar a una mayor generación de biomasa en un tiempo de cultivo de 72 h, mostrando además en este caso particular que las condiciones aerobias, las cuales están sujetas a la velocidad de agitación, son nece-

sarias y de relevancia para una mayor generación de biomasa en un mismo medio de cultivo. El mayor rendimiento se obtuvo en condiciones altas de agitación y menor temperatura, utilizando como sustrato Leche sin grasa Svelty. El pH no tuvo efecto significativo sobre la generación de biomasa, consumo de sustrato y producción de proteína bajo las condiciones utilizadas en este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey- campus Querétaro, por las facilidades brindadas para la realización del presente trabajo, así como del apoyo mediante una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) en el periodo 2012-2013 y 2013-2014.

REFERENCIAS

- Ashayerizadeh, O., Dastar, B., Shargh, M. S., Ashayerizadeh, A., y Mamooee, M. 2009. Influence of Antibiotic, Prebiotic and Probiotic Supplementation to Diets on Carcass Characteristics, Hematological Indices and Internal Organ Size of Young Broiler Chickens. *Journal of Animal and veterinary Advances*. 8, 1772-1776.
- Ausubel, FM., Brent, R., Kingston, RE., Moore, DD., Seidman, JG., Smith, JA., Struhl, K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols. Brooklyn. Nueva York.
- Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y.S.P., Hoogschagen, M., Heerikhuisen M., Levin, A., van Driel, K.G.A., Schutyser, M.A.I., Dijksterhuis, J., Zhu, Y., Weber, F.J., de Vos, W.M., van den Hondel, K.A.M.J.J., Rinzema, A. y Punt, P.J. 2002. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS Yeast Research*. 2, 245.248.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 77, 248-254.
- Buitrago, Glorymar et al. Producción continua de proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*

- a partir de lactosuero diluido. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia [online]. 2008, vol.31, n.Especial [citado 2013-12-30], pp. 107-113. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702008000400013&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0254-0770.
- Carrillo-Inungaray, M.L., Aguilar-Zarate M., Wong-Paz, J.E., Muñoz-Márquez D.B. 2010. Biomass production of *Candida utilis* (Henneberg) Lodder y Kreger from molasses. U. Tecnociencia. 4, 32-40.
- Chacón Villalobos A. 2004. Perspectivas actuales de la proteína unicelular (scp) en la agricultura y la industria. Agronomía mesoamericana. 15, 93-106.
- Chaucheyras-Durand, F. y Fonty, G. 2002. Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentations in the rumen of newborn lambs. Microbial ecology in health and disease. 14, 30-36.
- Friel, M.T. y McLoughlin, A.J. 2000. Production of a liquid inoculum/ spawn of *Agaricus bisporus*. Biotechnology Letters. 22, 351-354.
- Guarner, F., Khan, A.G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., y Kim, N. 2011. Probióticos y prebióticos. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. pp.1-29.
- Hernández, E., y Borrell, J. 1993. Probióticos en avicultura. Selecciones Avícolas (España). Set, 35, 569-579.
- Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, J.P., Cho, Y.J., Song, C.H. y Yun J.W. 2002. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. Letters in Applied Microbiology. 34, 56-61.
- KyungWoo, L., Soo Kee L., y Bong Duk L. 2006. *Aspergillus oryzae* as Probiotic in Poultry - A Review. International Journal of Poultry Science. 5, 01-03.
- Leal, D., Pico, Y., Castro, J., Guerra, J., y Castro, G. 2011. Producción de ácido cítrico a partir de suero lácteo entero e hidrolizado con *Aspergillus niger*, por vía fermentativa. Alimentos Hoy. 19, 32-38.
- Lorente, F.B., y Serra, D.J. 2001. Alimentos funcionales: probióticos. Acta Pediatr Espan, 59, 150-5.
- Martin, S.A. y Nisbet D.J. 1990. Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation of aminoacids, bemudagrass and starch by mixed ruminal microorganisms in vitro. J. Anim. Sci. 68:2142-2149.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31: 426.
- Musa, H.H., Wu, S.L., Zhu, C.H., Seri, H. I., y Zhu, G.Q. 2009. The potential benefits of probiotics in animal production and health. Journal of Animal and Veterinary Advances. 8, 313-321.
- Rosmini, M.R., Sequeira, G.J., Guerrero-Legarreta, I., Martí, L.E., Dalla-Santina, R., Frizzo, L., y Bonazza, J.C. 2004. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. Revista mexicana de ingeniería química. 3, 181-191.
- Oshoma, C.E. y Ikenebomeh, M.J. 2005. Production of *Aspergillus niger* Biomass from Rice Bran. Pakistan Journal of Nutrition. 4, 32-36.
- Sayan Bhattacharyya, y Bhattacharyya Satarupa. Fungi in health and disease. 2013. World Journal of Science and Technology. 3, 22-25.
- Spoeckner, S., Wray, V., Nimtz, M., Lang, S. 1999. Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. Appl. Microbiol. Biotechnology. 51, 33-39.
- Toro, Ó.J.S., Buriticá, M.C.O., y Garcés, A.L.B. 2004. Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus spp*. Revista Colombiana de Biotecnología. 6, 43-54.
- Yang, F.C. y Liau, C.B. 1998. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. Process Biochemistry. 33, 547-553.
- Zapata, P., Rojas, D., Fernández, C., Ramírez, D., Restrepo, G., Orjuela, V., y Atehortúa, L. 2007. Producción de biomasa y exopolisacáridos de *Grifola frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. Revista EIA. 7, 137-144.