

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**"EFECTO DE LAS CONDICIONES OPERACIONALES
DE FERMENTACION SOBRE LA PRODUCCION DE
PAECILOMYCES FUMOSOROSEUS CEPA 612
EN CULTIVO SUMERGIDO"**

**TESIS QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOTECNOLOGIA**

ING. MYRIAM ELIAS SANTOS

CIUDAD UNIVERSITARIA

MARZO DEL 2002

ING. MYRIAM ELIAS SANTOS

TD
SB975
.E4
2002
c.1



1080124428

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



"EFECTO DE LAS CONDICIONES OPERACIONALES DE FERMENTACIÓN
SOBRE LA PRODUCCION DE PAECILOMYCES FUMOSOROSEUS CEPA 612 EN
CULTIVO SUMERGIDO"

TESIS QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

EFECTO DE LAS CONDICIONES OPERACIONALES
DE FERMENTACION SOBRE LA PRODUCCION DE
PAECILOMYCES FUMOSOROSEUS CEPA 612
EN CULTIVO SUMERGIDO"

TESIS QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOTECNOLOGIA

SECRETARIO

DRA. CATALINA RIVAS MORALES
PRIMER VOCAL

ING. MYRIAM ELIAS SANTOS

SEGUNDO VOCAL

DRA. ELIA H. MORALES
TERCER VOCAL

Ciudad Universitaria

MARZO DEL 2002



TD

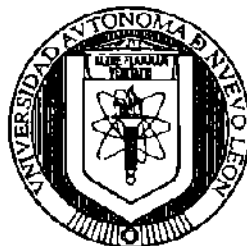
SB975

• E4

2002



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**"EFECTO DE LAS CONDICIONES OPERACIONALES DE FERMENTACIÓN
SOBRE LA PRODUCCION DE *PAECILOMYCES FUMOSOROSEUS* CEPA 612 EN
CULTIVO SUMERGIDO"**

**TESIS QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

ING. MYRIAM ELIAS SANTOS

COMITE TESIS

**DR. LUIS J. GALAN WONG
PRESIDENTE**

**DRA. KATHIUSKA AREVALO NIÑO
SECRETARIO**

**DR. HUGO ALBERTO LUNA OLVERA
SEGUNDO VOCAL**

**DRA. CATALINA RIVAS MORALES
PRIMER VOCAL**

**DRA. LILIA H. MORALES
TERCER VOCAL**

INDICE

TITULO	PAGINA
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
LUGAR DE TRABAJO	iv
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
IMPORTANCIA	5
HIPOTESIS	6
OBJETIVOS	6
ANTECEDENTES	7
Biotecnología en el sector vegetal	7
Dependencias que realizan investigación en biotecnología agrícola	7
Especies comunes de hongos entomopatógenos	8
Morfología de <i>P. fumosoroseus</i> cepa 612	10
Ventajas de producir blastoesporas de <i>P. fumosoroseus</i>	11
Condiciones para el crecimiento de un hongo entomopatógeno	11
Comportamiento de <i>P. fumosoroseus</i> en diferentes medios	12
Producción de <i>P. fumosoroseus</i> ..	13
Sistemas de producción de un bioplaguicida	14
Cultivo sólido	15
Cultivo líquido	15
Escalamiento de fermentadores	16
Criterios de escalamiento	17
Transferencia de oxígeno y medición de k_{La}	18
Correlaciones para estimar el k_{La}	19
Efecto de la tensión de oxígeno en una fermentación fúngica	20

**EFFECTO DE LAS CONDICIONES OPERACIONALES DE FERMENTACION SOBRE LA PRODUCCION
DE PAECILOMYCES FUMOSOROSEUS CEPA 612 EN CULTIVO SUMERGIDO**

Medición del consumo de potencia por agitación	21
Potencia sin aireación	22
Potencia con aireación (fluidos newtonianos)	23
MATERIAL Y METODO	25
Microorganismo	25
Activación de la cepa	25
Preparación del pre-inóculo	25
Medios de cultivo	26
Producción de blastoesporas a nivel matraz de las	26
Conteo de blastoesporas	26
Recuperación de las blastoesporas	27
Determinación del porcentaje de germinación (viabilidad)	27
Equipo de fermentación	27
Preparación del medio de cultivo	28
Preparación de las jarras de fermentación de 14 litros	28
Inoculación del fermentador	28
Condiciones de operación de los fermentadores	38
Métodos analíticos	29
Secuencia de cálculo de la correlación para estimar el k_{La}	31
Determinación de la productividad del proceso.....	32
Determinación del consumo de oxígeno (D.O.)	32
Medición de potencia volumétrica gaseada del fermentador	32
New Brunswick Scientific modelo MF-114	
Evaluación del torque para el dinamómetro neumático	33
Análisis estadístico	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62
LITERATURA CONSULTADA	63

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo brindado en los “Programas de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica” (PAICYT 2000 y 2001).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
por la beca otorgada para la realización del Doctorado.

Al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) con sede en Peoria, Illinois y Weslaco, Texas, por habernos capacitado en las técnicas para el manejo y bioensayos del hongo *Paecilomyces fumososroseus*

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM en la Unidad de Planta Piloto, por la asesoría y facilidades brindadas para usar sus instalaciones durante nuestros experimentos.

Al Dr. Luis J. Galán Wong , por la confianza depositada en mi y por su invaluable ayuda al asesorar y supervisar el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Catalina Rivas Morales por su apoyo y asesoría en el desarrollo de la tesis, así como sus sugerencias durante la investigación.

Al Dr. Hugo Alberto Luna Olvera, gran amistad, apoyo y sugerencias.

Al Dr. Mark A. Jackson, por la capacitación recibida en su Laboratorio del USDA y los valiosos consejos recibidos durante este trabajo.

Al Dr. Enrique Galindo Fentanes, por sus consejos y facilidades brindadas.

Al Dr. Leobardo Serrano Carreón, por sus sugerencias, gran apoyo y amistad.

Al Técnico Mario Caro Bermudes, por la ayuda proporcionada.

Al M.C. Martín Patiño, por su gran apoyo.

Al I. Q. Boris Jiménez Barrera, por su apoyo y amistad.

A mi compañera y Jefa del Laboratorio Dra. Isela Quintero Zapata.

A mi alumnos Raquel, Gilberto y Marcela por todo su apoyo y amistad.

A mis grandes amigas y amigos:

*Beatriz Gómez, Elena Gómez, Norma Hernández, Yolanda Cantú, Dusstthon Llorente, Oscar
Olivares, Valdemar Díaz , por apoyarme incondicionalmente, gracias.*

DEDICATORIA

A Dios:

Por darme la vida, sabiduría y permitirme estar aquí.

A mis dos grandes tesoros, Myriam y Karen:

Por ser lo mas bello y hermoso que me ha dado Dios y saber tener la paciencia, comprensión y amor para su madre.

A mis padres, Sr. Leobigildo Elías Flores y Sra. María del Carmen Santos de Elías:

Con todo respeto y cariño por apoyarme incondicionalmente, los amo.

A mis hermanos,

David, Sara, Chacho, Rosario, Judith, Paty, Carmen y Rafael:

Por creer en mí, los amo.

A la Sra. Isabel Marchand Alvarado:

Por estar con nosotras, gracias

A mi alumna Q.B.P. Mónica Guadalupe Lozano Contreras:

Gracias por confiar en mí.

LISTA DE TABLAS

LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo se realizó en la Unidad de Fermentación del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Luis J. Galán Wong, y la coasesoría de Dra. Catalina Rivas Morales; El National Center of Agricultural Utilization Research (NCAUR), United States Department of Agriculture (USDA), con la supervision del Dr. Mark A. Jackson; El Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo del Dr. Enrique Galindo Fentanes y el Dr. Leobardo Serrano Carreón. El financiamiento para desarrollar este trabajo fue obtenido del CONACyT y la UANL.



LISTA DE TABLAS

No.	TITULO	PAGINA
1	Correlaciones empíricas para estimar k_{La} .	20
2	Condiciones de operación del fermentador.	28
3	Producción de blastoesporas de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> (<i>Pfr</i>) en dos medios a nivel fermentador a diferentes condiciones.	42
4	Sobrevivencia de las blastoesporas de <i>Pfr</i> cultivadas en fermentador con agitación a 400 rpm, 0.5 vvm y almacenadas a 4°C y 22°C .	44
5	Sobrevivencia de las blastoesporas de <i>Pfr</i> cultivadas en fermentador con agitación a 520 rpm, 1 VVM y almacenadas a 4°C y 22°C.	44
6	Valores de productividad, obtenidos en las diferentes condiciones de agitación y aireación en el medio de casaminoácidos y medio de peptona de colágeno.	45
7	Valores de k_{La} obtenidos a diferentes condiciones de agitación y aireación.	48
8	Evaluación de la potencia suministrada sin aireación en el dinamómetro de cojinete neumático.	50
9	Valores obtenidos de potencia a diferentes condiciones de agitación y aireación en el dinamómetro de cojinete neumático.	51
10	Correlación ajustada para estimar el k_{La} en fermentadores de 14 l con volumen nominal de 5 l.	54
11	Correlación fermentador 14 l (10 l de operación) empleando agua potable a 30 °C.	54
12	Variación con la escala de operación de la constante K y los coeficientes α , β de la correlación obtenida para predecir el k_{La} en fermentadores de 5 y 10 l.	55

LISTA DE FIGURAS

NO.	TITULO	PAGINA
1	Micrografía de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> (40 X).	10
2	Dependencia de la fermentación y las variables de operación.	18
3	Determinación del k_{La} por el método de desgasificación.	29
4	Determinación del k_{La} .	30
5	Producción de blastoesporas en medio casaminoácidos a nivel de matraz.	36
6	Producción de blastoesporas en medio peptona de colágeno a nivel de matraz.	36
7	Sobrevivencia de blastoesporas de <i>P. fumosoroseus</i> producidas en matraces bafleados conteniendo medios líquidos de casaminoácidos y peptona de colágeno y almacenadas a temperatura ambiente.	38
8	Sobrevivencia de blastoesporas de <i>P. fumosoroseus</i> producidas en matraces bafleados conteniendo medios líquidos de casaminoácidos y peptona de colágeno y almacenadas a 4°C.	38
9	Producción de blastoesporas de <i>P. fumosoroseus</i> cepa 612 en medio de peptona de colágeno a escala de fermentador bajo diferentes condiciones de operación.	41
10	Producción de blastoesporas de <i>P. fumosoroseus</i> cepa 612 en medio de casaminoácidos a escala de fermentador bajo diferentes condiciones de operación.	41
11	Micrografía de pellets de <i>P. fumosoroseus</i> (40 X) obtenidos de fermentaciones a 600 rpm y 0.5 VVM en medio de casaminoácidos.	46
12	Micrografía de esporas de <i>P. fumosoroseus</i> (2 X) obtenidas de fermentaciones a 520 rpm y 1.0 VVM en peptona de colágeno.	46

13	Efecto de la potencia suministrada en fermentador de 14 l (volumen de trabajo 5 l) sobre k_{La} experimental.	48
14	Consumo de potencia en fermentador de 14 l (volumen de trabajo 5 l) a diferentes condiciones de agitación y flujos de aire en medio de casaminoácidos.	50
15	Cinética de consumo de oxígeno de <i>P. fumosoroseus</i> en fermentador de 14 l (volumen de trabajo 5 l) bajo condiciones óptimas de producción en los medios de casaminoácidos y peptona de colágeno.	52
16	Cinética de consumo de oxígeno de <i>P. fumosoroseus</i> en fermentador de 14 l (volumen de trabajo 5 l) bajo condiciones menos óptimas de producción en los medios de casaminoácidos y peptona de colágeno.	53
17	Correlación entre el k_{La} experimental y teórico en función de las variables de proceso en fermentador de 14 l (volumen de trabajo 5 l) usando medio de casaminoácidos.	56
18	Escalamiento en la producción de blastoesporas de <i>P. fumosoroseus</i> cepa 612, con base en el cálculo de potencia usando el medio de casaminoácidos.	57
19	Escalamiento en la producción de blastoesporas de <i>P. fumosoroseus</i> cepa 612, con base en el cálculo del k_{La} usando el medio de casaminoácidos.	58
20	Escalamiento de la producción de blastoesporas de <i>P. fumosoroseus</i> cepa 612, con base en el cálculo de potencia usando el medio de peptona de colágeno.	59
21	Escalamiento de la producción de blastoesporas de <i>P. fumosoroseus</i> cepa 612, con base en el cálculo del k_{La} usando el medio de peptona de colágeno.	59

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ANOVA	Análisis de varianza
ARS	Agricultural Research Service
B	Brazo de palanca
<i>B. bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
<i>B. tabaci</i>	<i>Bemisia tabaci</i>
°C	Grados centígrados
C_g^*	Concentración del oxígeno disuelto en el equilibrio con el oxígeno de la fase gaseosa (g/l o ppm)
C_c^*	Concentración crítica de oxígeno disuelto
C_L	Concentración del oxígeno disuelto (ppm)
C_1	Concentración en la primera fase
C_2	Concentración en la segunda fase
$CaCO_3$	Carbonato de calcio
Cols.	Colaboradores
d	Días
dc/dt	Derivada de la concentración/ tiempo
D_i	Diámetro del impulsor (m, cm)
Dr.	Doctor
Dra.	Doctora
D_t	Diámetro del impulsor
esp/mL	Esporas por mililitro
Exp.	Experimento
F	Fuerza (Kg.f)
F. Calc.	Prueba de "F" calculada
$FeSO_4$	Sulfato de hierro
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
H_2O	Agua
HP	Caballos de fuerza (horse power)
h	Horas
J	Velocidad angular (seg ⁻¹)
K	Constante
k_{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h ⁻¹)
Kg/cm ²	Kilogramos por centímetro cuadrado
KH_2PO_4	Fosfato ácido de potasio

Ln	Logaritmo natural
M	Torque (Km)
mg	Miligramos
μg	Microgramos
MgSO_4	Sulfato de magnesio
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm^2	Milímetro cuadrado
N	Velocidad de agitación (seg^{-1})
N^3	Velocidad de agitación al cubo
No.	Número
NS	Diferencia no significativa
P	Potencia de agitación (Watts)
P_0	Potencia sin aireración
P. de error	Probabilidad de error
P_g/V	Potencia por unidad de volumen (Hp/m^3)
PDA	Agar papa dextrosa
<i>P. farinosus</i>	<i>Paecilomyces farinosus</i>
<i>P. fumosoroseus</i>	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
pH	Potencial de hidrógeno
QO_2	Coefficiente de respiración del microorganismo
rpm	Revoluciones por minuto
R^2	Coefficiente de regresión lineal
Re	Número de Reynolds (adimensional)
Solución Co	Solución de cobalto
Solución Mg	Solución de magnesio
Solución Zn	Solución de zinc
Sp	Especie
Spp	Especies
USDA	United States Department of Agriculture
V	Volumen
V/V	Volumen en volumen (adimensional)
V_s	Velocidad superficial del gas (m/h)
μ	Viscosidad cinética del caldo de cultivo (m^2/s)
α	Constante alfa
β	Constante beta
Σ	Sumatoria (adimensional)
%	Por ciento

RESUMEN

Se llevó a cabo una investigación para desarrollar un proceso biotecnológico que permitiera reducir los costos de producción del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* a nivel reactor de 14 l. Para tal propósito, la estrategia central consistió en probar una fuente de nitrógeno alterna en el medio de producción a la de casaminoácidos usada comercialmente, en este caso, un subproducto de la industria pecuaria a base de peptona de colágeno. Por otro lado, este enfoque también abordó la optimización en el consumo de energía por los reactores utilizados en el proceso de fermentación. Entre los objetivos particulares que se definieron en este trabajo fueron el comparar el medio de peptona de colágeno con el de casaminoácidos en cuanto a su rendimiento, periodo para alcanzarlo y vida de anaquel de las blastoesporas obtenidas. Asimismo, el diseño de un modelo para conocer el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) en fermentador de 14 l, se incluyó dentro de los parámetros operacionales clave para trasladar los resultados obtenidos a escalas mayores, con el concomitante establecimiento de la óptima correlación entre potencia suministrada y productividad del proceso. Los resultados obtenidos de las fermentaciones a nivel de matraz mostraron que *P. fumosoroseus* alcanza en el medio de casaminoácidos una productividad de 7.28×10^8 esp/ml a las 72 h, mientras que en el medio peptona de colágeno, es posible obtener hasta 4.8×10^8 esp/ml en el mismo periodo de tiempo. La viabilidad comparativa de las blastoesporas en los experimentos de almacenamiento de formulados a 22 y 4°C durante 3 meses, permitió denotar claras diferencias nutricionales para las células del entomopatógeno recuperadas a partir de ambos medios, ya que del primero sobrevivieron el 48% de las blastoesporas sometidas a la mayor temperatura, mientras que del segundo la recuperación fue del 38%. En contraste, las menores de las temperaturas de almacenamiento permitieron extender la vida de anaquel de las blastoesporas con una recuperación de células viables hasta del 81 y 74% respectivamente, durante el periodo de prueba. A nivel de fermentador estos resultados también manifestaron su consistencia con 2.6×10^8 y 0.4×10^8 blastoesporas/ml/h. Cabe destacar que en el medio de casaminoácidos a una potencia aplicada de 2.64 watts y un k_{La} de 35 h^{-1} se obtiene la máxima productividad, mientras que en el de peptona de colágeno esto se logra a valores de 4.09 watts y 115.38 h^{-1} , lo cual representa un importante criterio de escalamiento, ya que el uso de menor cantidad de energía representa una ventaja económica para la producción masiva de *P. fumosoroseus*.

ABSTRACT

A research was carried out to develop a biotechnological process to reduce the production cost of *Paecilomyces fumosoroseus*, and entomopathogenic fungus. Our strategy was to test an alternative source of nitrogen in the culture medium, instead of commercially available casaminoacids. We used in this case collagen peptone, a by product of the animal farming industry. Our approach also tested the optimization and the consumption of energy by the reactors used in the fermentation process. As a specific objective of this research, we compared collagen peptone vs. casaminoacids regarding a) yield and time to reach the highest peak, b) shelf life of the blastospores obtained. Also, we designed a model to measure the volumetric coefficient of oxygen-transfer (k_{La}) in the 14 liter fermentor. This is a key parameter to correlate the obtained yield to a high-output yield. Our results from flask-fermentation showed that *P. fumosoroseus* reached in the casaminoacids medium a yield of 7.28×10^3 spores/ml at 72 h whereas the collagen-peptone medium yielded 4.3×10^8 spores/ml in the same time. The comparative viability of the produced blastospores in the "storage" experiment made at 22 and 4°C for 3 months, showed nutritional differences in either or both media. In the casaminoacids medium there was a 48% survival in spores exposed to 22°C whereas those grown in peptone-collagen-medium showed a 38% survival under the same conditions. On the other hand, the lower storage temperatures allowed a longer shelf life of spores, with a spore-retrieval (survival) of 81 and 74% respectively. At the fermentor level, these results also showed consistency, with 2.6×10^8 and 0.4×10^8 spores/ ml/hour. We found the best yields in the casaminoacids medium using 2.64 watts and a k_{La} of 35 h^{-1} , whereas by the collagen-peptone-medium, highest yield was achieved using 4.09 watts and 115.38 h^{-1} this represents an important factor in the scale-up process.

INTRODUCCION

Actualmente en la agricultura requiere de la aplicación de bioinsecticidas y variedades mejoradas de cultivos agrícolas para aumentar los rendimientos de las cosechas. Para que estos agentes biológicos puedan ser utilizados como una estrategia viable que remplace los agroquímicos, deben cubrir diferentes expectativas: ser productos formulados, estandarizados, tener alta persistencia en almacén, alta eficacia, costos comparables a los insecticidas químicos y fáciles de usar (Wilson y Huffaker, 1976).

Por lo anterior, el control biológico en la agricultura, cada vez será una alternativa más viable a los plaguicidas químicos, en la medida en que logren ser productos efectivos, de sencilla producción y que cuenten con la confianza de los productores agrícolas, además de ser económicamente atractivos para las empresas que los fabrican (Middleton, 1985; Rainer, 1990).

El estudio de especies fúngicas ha originado durante décadas un gran interés en la comunidad industrial debido a los múltiples productos farmacéuticos (antibióticos, ácidos orgánicos, enzimas, vitaminas) obtenidos a partir de procesos de fermentación. Sin embargo, este interés se ha incrementado de manera notable durante los últimos años debido principalmente a la implementación y creación de nuevas y mejores herramientas para su estudio en procesos a nivel de reactores, para realizar por ejemplo: análisis de imágenes, reometría, medición de potencia en línea o medir incluso las relaciones entre la hidrodinámica y la productividad de estos cultivos microbianos (Aiba y cols, 1973).

Los estudios cinéticos a nivel de laboratorio que incluyen la medición de parámetros determinantes como la agitación y aireación durante la producción de bioinsecticidas, son una herramienta muy valiosa para llevar al cabo el escalamiento de procesos a nivel de planta piloto (Resendiz y cols, 1991) .

La información sobre procesos biotecnológicos para la producción masiva del exitoso agente entomopatógeno fúngico *Paecilomyces fumosoroseus* es limitada en comparación a los estudios de este organismo a nivel laboratorio. De tal forma que esta investigación se ha propuesto explorar un campo de acción que pudiese detallar el comportamiento de este hongo dentro de un reactor biológico, bajo condiciones de agitación y aireación bien definidas, obteniendo de esta manera, cinéticas de actividad biológica de gran interés por los aspectos tanto económicos como científicos que involucran en el campo de la Bioingeniería. Uno de los parámetros operacionales de mayor importancia para el escalamiento de procesos, es el coeficiente de transferencia de oxígeno y la potencia suministrada; los cuales nos llevan a predecir la cuantificación y eficiencia a escalas mayores (Jackson y cols, 1997).

La presente investigación forma parte de una colaboración binacional entre México y Estados Unidos, en la que los dos países representados por la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA-ARS en Peoria, Illinois) respectivamente, abordan un problema común en ambos lados de la frontera en el combate a las plagas agrícolas mediante el uso de *P. fumosoroseus* cepa 612, una cepa altamente infectiva a uno de los más dañinos insectos como es la mosquita blanca. Tal problemática involucra la producción masiva del bioinsecticida a través de procesos de fermentación que resulten en un producto bastante competitivo en términos de actividad biológica y precio en el mercado. Para tal propósito, se diseñaron estrategias que nos permitieran evaluar el efecto de los parámetros del proceso (agitación y flujo de aire) sobre la productividad, con la finalidad de identificar y manipular estas variables para trasladar los resultados obtenidos a otras escalas de operación.

IMPORTANCIA

Esta investigación es un esfuerzo importante para evaluar los efectos independientes de las variable físicas, así como el coeficiente de transferencia de oxígeno y la potencia suministrada en el procesos de producción de la cepa de *Paecilomyces fumosoroseus* 612.

A través de literatura se sabe que en las fermentaciones aerobias, la velocidad de agitación, aireación afectan significativamente la velocidad específica de consumo de oxígeno como la producción de algún compuesto de interés comercial. Sin embargo, en nuestro caso, se pudo detectar que el requerimiento mínimo de potencia para nuestro microorganismo en ambos medios, representa economía del proceso, se reduce atractivamente desde el punto de vista industrial, las condiciones de agitación y aireación son vitales para el logro satisfactorio de nutrientes al interior de la célula, aspecto detectado mediante la productividad del proceso y viabilidad de nuestras blastoesporas a un periodo de vida de anaquel mas largo.

Por lo que nuestra investigación ha demostrado lo importante que es el control de las condiciones operacionales sobre la calidad del proceso de fermentación para la producción de un bioinsecticida. De esta forma, todo la información que nos proporciona un estudio de bioingeniería forma una plataforma de gran interés para el desarrollo biotecnológico de insecticidas biológicos.

HIPOTESIS

El estudio del efecto de las condiciones de agitación y aireación sobre la producción y calidad de blastoesporas de *Paecilomyces fumosoroseus* a nivel de biorreactor, permitirá establecer las bases para su producción a escala semipiloto.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la producción de blastoesporas de *P. fumosoroseus* cepa 612 a nivel fermentador como una función de parámetros de proceso (agitación y aireación) y del medio de cultivo.

Objetivos Particulares

- Utilizar un subproducto industrial para suplementar el medio Casaminoácidos para la producción de *Paecilomyces fumosoroseus* (Pfr) cepa 612 en cultivo sumergido.
- Optimización de las condiciones de producción (agitación y aireación) a nivel fermentador.
- Escalar el proceso de producción a nivel Fermentador de 14 Litros.
- Mejorar la productividad del proceso por medio del efecto del k_La .
- Decrecer el consumo potencia al optimizar las condiciones de agitación y aireación en fermentadores de 14 Litros.
- Llevar a cabo estudios de vida de anaquel a temperatura ambiente y 4° C, del producto de las esporas producidas bajo las mejores condiciones.

ANTECEDENTES

Biotecnología en el sector vegetal

Actualmente en México alrededor de 60 dependencias de diferentes instituciones trabajan sobre la investigación y el desarrollo tecnológico en el área de la biotecnología vegetal, las cuales atienden diversos campos. Esta disciplina tiene favoreció su desarrollo en nuestro país a partir de la década de los setenta, cuando surgieron nuevos métodos de cultivo de tejidos *in vitro* que permitieron la propagación masiva (clonación) de plantas generalmente idénticas y libres de patógenos (Herrera, 2001). Hacia 1987, estaban trabajando aproximadamente 50 unidades de investigación, concentrados en siete dependencias administrativas. En estas unidades se podían identificar al menos cinco campos de investigación: 1) micro propagación y conservación de germoplasma; 2) mejoramiento genético; 3) biotecnología industrial de plantas; 4) estudios básicos y 5) fijación de nitrógeno. (Casas, 1993)

Dependencias que realizan investigación en biotecnología agrícola

Es importante mencionar que la zona Centro cuenta con el mayor número de dependencias que realizan investigación en biotecnología agrícola y la cual corresponde al 49% del total. En esta zona se encuentran 30 dependencias de diferentes instituciones distribuidas principalmente en los estados de Jalisco, Guanajuato, Estado de México, Morelos y en el Distrito Federal, siendo los dos últimos los que cuentan con el mayor número de centros de investigación en biotecnología agrícola en el país (Herrera, 2001).

En la zona Sureste, los estados de Veracruz y Yucatán son los que cuentan con el mayor número de centros que realizan investigación en este campo. Cabe mencionar que la investigación con mayor antigüedad en la región se efectúa en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) (Herrera, 2001).

La zona Noroeste es la región del país que cuenta con el menor número de dependencias que llevan a cabo investigación en este sector. De las 11 instituciones que se encuentran aquí, se considera que solo una ha destacado en investigación sobre biotecnología agrícola con un grado importante de consolidación: la Universidad Autónoma de Nuevo León, la cual se realiza a través de las Facultades de Ciencias Biológicas y Agronomía (Herrera, 2001).

Especies comunes de hongos entomopatógenos

El control biológico en la agricultura será una alternativa real a los pesticidas químicos en la medida que se logren productos efectivos, fáciles de usar, de alta vida de anaquel que cuenten con la confianza de los productos agrícolas y que sean económicamente atractivos para las empresas que los fabricaran. La protección de los cultivos es dominada aún por los pesticidas químicos, las ventas de insecticidas a escala mundial en 1995 alcanzaron \$8,5 billones de dólares, de los cuales únicamente 1.5 a 2 % correspondientes a bioplaguicidas (Barlett y Jaronski, 1988).

Los micoinsectidas, productos formulados con hongos entomopatógenos constituyen una pequeña fracción de los bioplaguicidas (Charnley, 1997). Sin embargo, el incremento en el costo de la producción de los pesticidas químicos, la resistencia desarrollada por las plagas y la presión que existe por reducir la contaminación en el ambiente, han asegurado el creciente interés en estrategias alternativas para el manejo de plagas incluyendo los hongos entomopatógenos (Rodgers, 1993).

Existen más de 700 especies de hongos entomopatógenos en aproximadamente 100 géneros que son conocidos porque se presentan con una distribución mundial, sin embargo, solo unos pocos son estudiados en forma intensiva (Roberts y Humber, 1981; Roberts, 1989; Roberts y cols, 1991). Los hongos destacan por su manera de infección ya que invaden a través de la cutícula y no necesitan ser ingeridos; por lo tanto son los principales microorganismos que infectan insectos chupadores como son los áfidos,

mosquita blanca, etc. Los hongos se encuentran asociados con insectos que viven en diversos hábitats, incluyendo agua, suelo y partes aéreas (Carruthers y Hural, 1990).

Entomophthora muscae infecta a varias especies de moscas, las especies susceptibles incluyen a *Delia* (Hylemya) *antiqua*, *Delia radicum* y *Delia platura*. Este hongo se multiplica dentro del huésped, el cual se agranda; posteriormente aparecen bandas amarillentas de esporas sobre el abdomen del insecto. Especies relacionadas incluyen a *Pandora neoaphidis*, un entomopatógeno de áfidos de ocurrencia natural que es particularmente efectivo durante los períodos de humedad. Otro hongo común que posee un amplio rango de hospederos es *Zoophthora radicans*, y en este momento, varias cepas han sido aisladas de saltamontes, áfidos, gorgojos y *Plutella xylostella* (Büchs y cols, 2000).

Un destacado entomopatógeno es *Beauveria bassiana* que se encuentra naturalmente en algunas plantas y en el suelo. Las epizootias causadas por este hongo, son favorecidas por climas templados y húmedos, las larvas infectadas se tornan de color blanco o gris. *Beauveria* que es utilizada como bioinsecticida por muchos países, tiene una lista extensa de hospederos que incluye: moscas blancas, áfidos, saltamontes, termitas, escarabajos, gorgojos, chinches, hormigas y mariposas. (Valenzuela, 1987, Deacon, 1984). Incluso, se han encontrado infectando los pulmones de roedores silvestres y en los orificios nasales del ser humano. Existen diferentes cepas de *Beauveria* que exhiben una considerable variación en cuanto a su virulencia, patogenicidad y rango de hospederos, aunque en el suelo se desempeña como saprófito (Feng y cols, 1994; Valenzuela, 1987).

Entre los enemigos naturales de *Diabrotica spp*, gorgojos y otros escarabajos, *Metarhizium spp* ha sido probado extensivamente y además posee un enorme potencial contra un amplio rango de hospederos, y en Brasil se emplea para proteger cultivos de alfalfa y caña de azúcar contra chinches de la familia Cercopidae .

Otra especie de hongo entomopatógeno que ha demostrado su capacidad en el control de plagas es *Verticillium lecanii*, que es usado en Europa contra la mosquita blanca, trips y áfidos, especialmente en cultivos de invernadero. Para controlar los ácaros, *Nomuraea rileyi* y *Neozygites floridana* se han utilizado diversas especies: *Trichoplusia* spp, *Plathypena scabra*, *Heliothis zea*, *Pieris rapae* e *Hirsutella thompsonii* (Calam y cols, 1986).

Morfología de *Paecilomyces fumosoroseus* cepa 612

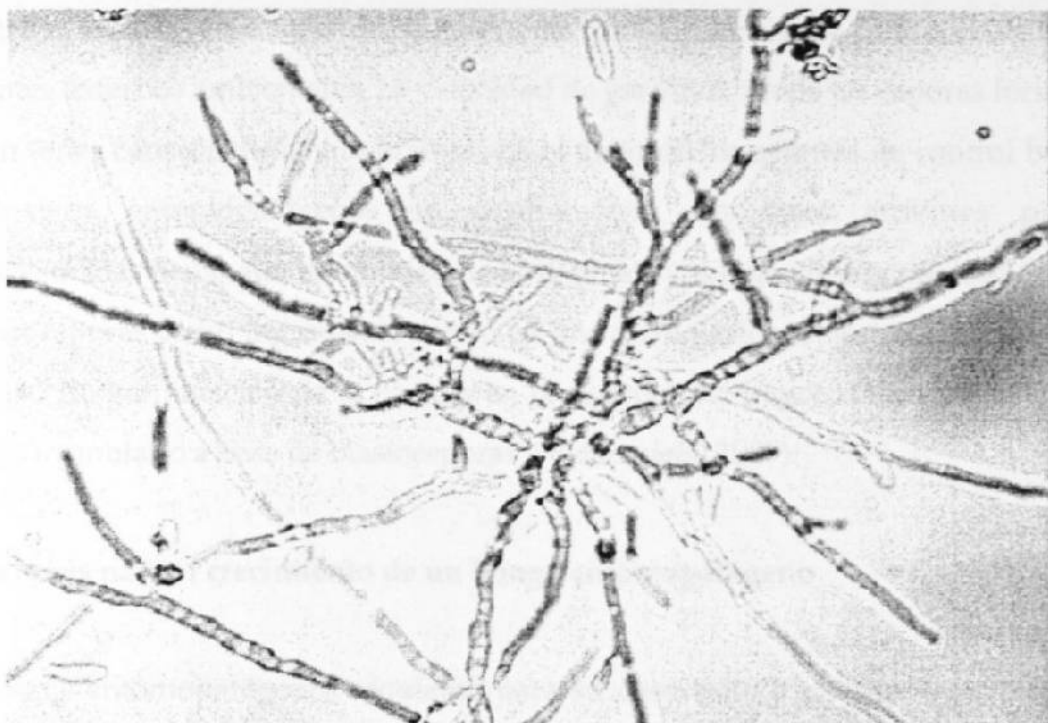


Figura 1. Micrografía de *P. fumosoroseus* (40X)

Este hongo tiene hifas, amarillentas y septadas de paredes suaves. Sus estructuras conidiógenas son sinetosas o mononematosas (figura 1), que consisten en ramales de conidióforos verticales o irregulares, que presentan en cada una de las ramas acumulos de células conidiogenas solitarias en las hifas fértiles. Las conidias están en cadenas basipetales divergentes o agrupadas, y hialinas ligeramente pigmentadas con paredes suaves (Smith, 1993). *P. fumosoroseus* produce dos tipos de propágulos: blastoesporas en un medio líquido y conidias en un medio sólido.

Ventajas de producir blastoesporas de *P. fumosoroseus*

La rápida velocidad de germinación, la cual ha sido confirmada en experimentos *in vitro* (Jackson, datos no publicados) indica que las blastoesporas durante el crecimiento aíslan sus reservas endógenas con todos los nutrientes necesarios para accionar la germinación y estos propágulos no son dependientes de los nutrientes externos ambientales para su rápida germinación.

Por otra parte, la velocidad de germinación de la conidia es influenciada por los nutrientes externos ambientales. La velocidad de germinación de las esporas formuladas pueden tener consecuencias importantes en el éxito de los agentes de control biológico con hongos entomopatógenos en colaboración con otros atributos para los micoinsecticidas como alta estabilidad de almacenaje y tolerancia a la desecación. El uso de blastoesporas como ingrediente activo en una formulación muestra ventajas sobre la velocidad de germinación de la conidia en la cutícula del insecto *B. argentifolli*, usando material formulado a base de blastoesporas (Valenzuela, 1987).

Condiciones para el crecimiento de un hongo entomopatógeno

Los hongos entomopatógenos requieren para su desarrollo y proceso infectivo de una serie de condiciones ambientales, así como de determinado estado fisiológico del insecto hospedante. Para iniciar este proceso infectivo es necesario que la espora esté en contacto con la cutícula del insecto y que haya disponibilidad de nutrientes, agua y oxígeno. Esto permite que la espora incremente su volumen e inicie la germinación (Hajek y Leger, 1994). La disponibilidad de agua en el ambiente juega un importante papel para que la espora no pierda su viabilidad; si existen condiciones de baja humedad y temperatura adversa su potencial se ve limitado. Se sabe que las células de los hongos entomopatógenos acumulan polihidroxi alcoholes (polioles) ante la baja disponibilidad de agua, lo que favorece que se lleven funciones esenciales en la célula (Hernández y Alatorre, 2000).

La trealosa es uno de los componentes de las células de los hongos involucrados con una mayor tolerancia ante la desecación o al estrés hídrico (Hallsworth y Mangan, 1994), aunque los carbohidratos más comúnmente almacenados por los hongos son el glicógeno, glicerol, manitol, eritritol y trealosa. En *B. bassiana* estos carbohidratos afectan varios estados fisiológicos, por ejemplo: la producción de biomasa, la síntesis de enzimas extracelulares, la producción de blastosporas y el pH del cultivo.

El estado fisiológico de *B. bassiana* por la presencia de determinados carbohidratos pueden permitir la prolongación de su vida misma, por lo que su presencia en el hongo o adición en la formulación ayudaría en gran medida a su sobrevivencia durante las aplicaciones en campo, e incluso con su posible adaptación y consecuente establecimiento (Bidochka y cols, 1990).

Comportamiento de *P. fumosoroseus* en diferentes medios

Las esporas de los hongos pueden ser producidas en masa usando cultivos sólidos y sumergidos (Lisansky y Hall, 1983). Los deuteromycetes cuando crecen en un medio sólido producen diferentes esporas asexuales, las cuales son genéticamente estables (Mangenot, 1976), y en un cultivo sumergido, éstas usualmente forman células individuales por separación esquizoolítica a septa o por fragmentación mecánica de las hifas (Rombach, 1989). Aún cuando las blastoesporas son usualmente un solo tipo de propagación en un cultivo sumergido, una serie de estudios reporta también la formación de conidias (Feng, 1994). Se ha reportado que varios hongos entomopatógenos son capaces de producir altas concentraciones de blastosporas (Bidochka, 1987), y este tipo de propagación es usualmente menos resistente que la conidia aerial para su secado (Vidal, 1998). Chapple y cols, en 1996, reportan que en un cultivo sumergido con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas oscuridad, se incrementa la producción de conidias hasta un 88.8% en 46 h de fermentación, para luego decrecer bruscamente después de 79 h debido a que inicia su germinación, produciendo así blastoesporas.

Producción de *P. fumosoroseus*

En 1990, Humphery y cols, llevaron a cabo una comparación de esporulación entre *P. farinosus* y *B. bassiana* en cultivos continuos limitados en glucosa y amonio, encontraron que solo en cultivos continuos limitados en glucosa, *P. farinosus* creció en un medio mínimo y con una buena producción de blastoesporas, desarrollando un sistema de fermentación líquida para una producción a gran escala de blastoesporas del hongo entomopatógeno.

Agudelo y Falcón, en 1983 investigaron la producción en masa de *P. farinosus* así como su aplicación bajo condiciones de campo y el efecto de algunos factores físicos en la supervivencia del inóculo y encontraron que el proceso en medio sólido es lento e ineficiente, en cambio en un medio líquido se observaron mejores resultados. Se ha observado que en cultivos limitados de carbono, *P. fumosoroseus* puede producir blastoesporas rápidamente durante la fase exponencial y continúa formándolos durante la fase estacionaria (Inch, Humpreys y Trinci, 1986).

Las técnicas de producción masiva de hongos entomopatógenos más utilizadas, involucra tanto cultivos en superficie o cultivos en dos estados, en el cual el hongo se hace crecer primero bajo condiciones sumergidas y entonces puestos a esporular sobre medios de cultivo líquidos o sólidos (Agudelo y Falcón, 1983).

Recientemente Jackson y cols (1997), trabajaron distintos medios de cultivo con diferentes concentraciones de carbono y relaciones de carbono nitrógeno, para producir blastoesporas de *P. fumosoroseus* tolerantes a la desecación. Todos los medios probados soportaron la esporulación en cultivos sumergidos, incrementaron la concentración de blastoesporas, en medios conteniendo 80 grs. de glucosa y 13.2 grs. casaminoácidos y un alto porcentaje (79%) de las blastoesporas que sobreviven al secado por aire, mostraron una favorable LD₅₀ para *B. argentifolli*. Se observó que en almacenaje

de 4°C más del 60% de las blastoesporas liofilizadas producidas se mantuvieron viables después de 7 meses de almacenaje, mientras que menos del 25% de blastoesporas sobreviven después de 90 días de almacenaje.

Por su parte, García y cols, (1997), cultivaron conidias y esporas de *B. bassiana* provenientes de un aislamiento de la colección de cepas de hongos entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, en medio líquido con la siguiente composición $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno, melaza como fuente de carbono y (KH_2PO_4) . En contraste, Cliquet y Jackson (1999) usaron como única fuente de nitrógeno el glutamato, probándolo con varios carbohidratos y demostraron que *P. fumosoroseus* crece mejor en glucosa (18.8 mg biomasa mL), pero produce concentraciones similares de blastosporas ($7.3 - 11.0 \times 10^8$ blastosporas) cuando crece con glucosa, glicerol, fructosa, o sacarosa y cuando *P. fumosoroseus* crece en un medio con citrato de sodio o galactosa como única fuente de carbohidratos, produce menores concentraciones de blastosporas, pero sus esporas son más tolerantes a la desecación.

Actualmente a nivel comercial en México existen varios productos que contienen la conidia aerial de *P. fumosoroseus*, como lo es la producida por Agrobiológicos del Noroeste, S.A. en Culiacán Sinaloa, la cual ya es aplicada en los campos de cultivo (Torres y Cárdenas, 1996). En Estados Unidos y Europa se enfocan al desarrollo de las blastoesporas o en preparaciones a base de blastoesporas y micelio usando la cepa *Pfr-97* y *PreFeRal* utilizadas para el control de la mosquita blanca en los cultivos. (Eyal y cols, 1994; Bolckmans y cols, 1995; Jackson y cols, 1997).

Sistemas de producción de un bioplaguicidas

Entre los diferentes métodos existentes para la producción del propágulo fúngico, se encuentran los que usan medios de cultivo sólido y los que utilizan medios de cultivo líquido, entre otros muchos.

Cultivo sólido

La esporulación en un substrato sólido es ventajosa desde el punto de vista que realiza una rápida esporulación a nivel laboratorio y a menudo los propágulos producen en un medio aéreo conidias, que son más tolerantes a la desecación y más estables para la preparación del secado comparado con la producción de esporas en un cultivo sumergido. La esporulación en un substrato sólido es ventajosa desde el punto de vista que realiza una rápida esporulación a nivel laboratorio y a menudo los propágulos producen en un medio aéreo conidias, que son más tolerantes a la desecación y más estables para la preparación del secado comparado con la producción de esporas en un cultivo sumergido.

Desgraciadamente la producción comercial de esporas usando métodos de substrato sólido, sufren de numerosas limitantes técnicas y económicas (Barlett, 1988). El escalamiento de un método de producción usando substrato sólido a escala comercial, es dificultoso debido a problemas asociados con la esterilización del substrato, cambio de gas, control de temperatura, mantenimiento del cultivo puro y recuperación del producto mismo. El tiempo de fermentación para esporular de este cultivo generalmente requiere de semanas, de tal modo que incrementa los costos de producción, por lo que hace que sea no costeable para uso comercial (Silman y cols, 1993).

Cultivo líquido

Actualmente las fermentaciones en cultivo líquido son el método más económico para producir la mayoría de los agentes microbianos de biocontrol. Los métodos de producción en la industria diariamente han demostrado que la biomasa derivada de fermentaciones a base de cultivo líquido, pueden ser económicamente producidos y pueden ser estabilizados para su preparación de secado.

Este éxito comercial usando fermentaciones con cultivos líquidos, fortalece a la industria aceptando este método como el más adecuado. Un ejemplo, 3 de los 4 bioherbicidas registrados en Norteamérica son usando este tipo de fermentaciones, en las cuales se necesita de un medio nutricional homogéneo que se pueda mantener y monitorear.

La homogeneidad de un medio líquido simplifica la producción y los métodos de proceso. El desarrollo de las condiciones nutricionales óptimas para la producción, como son: la temperatura, aireación y pH, son fácilmente controlados en comparación a fermentaciones de cultivo sólido. El control nutricional y las condiciones en el medio así como la habilidad en el proceso de escalamiento y la facilidad de recuperación del producto, es lo que lo hace un proceso de bajo costo por lo que es más empleado este método. Por tal motivo se sugiere el uso de cultivo líquido para la producción de blastoesporas de *P. fumosoroseus* para un control efectivo en contra de la mosquita blanca (Jackson, 1997).

Escalamiento de fermentadores

Con la finalidad de llevar al mercado un sinnúmero de productos biotecnológicos, surge la necesidad de trasladar los resultados de la planta piloto a la escala industrial. El escalamiento de fermentadores requiere de un análisis cuidadoso de cada una de las escalas, tanto en sus variables fisicoquímicas como biológicas. Los criterios más usados para escalar son parámetros físicos relacionados con las variables de operación. Si se emplea como criterio del k_La , debe especificarse las condiciones ambientales y tipo de fermentación en que se determinó éste, pues puede ocurrir que se escoja un k_La menor que el necesario y hacer el cambio de escala, descubrir que no es suficiente (Quintero, 1981).

Los problemas en el cambio de nivel surgen por la forma en que son afectados los parámetros de proceso por el tamaño de la unidad. Mientras que los factores químicos como la concentración de sustrato, de precursor, etc., pueden mantener sin cambio a

diferentes niveles, los factores físicos como transferencia de masa y de calor, el mezclado, etc., son muy dependientes del tamaño. Un ejemplo típico de esto es el efecto de nivel o escala en la superficie específica de la unidad. Cuanto más grande sea el fermentador menor superficie específica tendrá.

Tradicionalmente el estudio de los eventos asociados con el cambio de nivel o escala se ha conocido como escalamiento, sin diferenciar si se realiza de un fermentador menor a un fermentador mayor o viceversa. Actualmente se pueden decir que el término escalamiento se aplica a aquellos ejercicios de cambio de nivel que se realizan de un fermentador menor a un fermentador mayor, mientras que la operación inversa se conoce como escalamiento descendente (Salvador, 1983).

El escalamiento de procesos industriales es una actividad todavía con un alto grado de empirismo. Fundamentalmente, para escalar un proceso se requiere conocer la influencia de un determinado criterio de escalamiento sobre una función objetivo de la fermentación. Algunas de las funciones carbono, la actividad específica o volumétrica de una enzima, la productividad, etc. Las relaciones de criterio de escalamiento *versus* función objetivo tienen generalmente la forma de una hipérbola (o de saturación) y en algunos casos, las curvas pasan por un máximo para luego presentar valores menores de la función objetivo conforme el valor del criterio de escalamiento se incrementa. (Galindo, 1996).

Criterios de escalamiento

En la figura 2 se muestra esquemáticamente la concentración relativa del producto final en una fermentación afectada por P/V o $k_L a$. El patrón hiperbólico que se observa es general, independiente de las especies microbianas: bacterias, levaduras o mohos. Lo mejor es seleccionar una variable de operación cuando la concentración del producto ya no aumente (la línea continua de la Figura 2) mientras que para fermentaciones que

sigan la línea discontinua es aconsejable seleccionar la concentración máxima del producto. Otros factores tales como los requerimientos de energía, conveniencia de operación, disponibilidad de equipo deben considerarse antes de determinar el valor óptimo de P/V o $k_L a$ para el escalamiento. En la práctica se han escogido varios criterios para efectuar el cambio de escala, todos ellos basados en resultados empíricos (Aiba, 1973). En el anexo 1 se resumen los criterios empleados para cambio de escala en tanques agitados por medios mecánicos y las relaciones entre variables de operación y diseño.

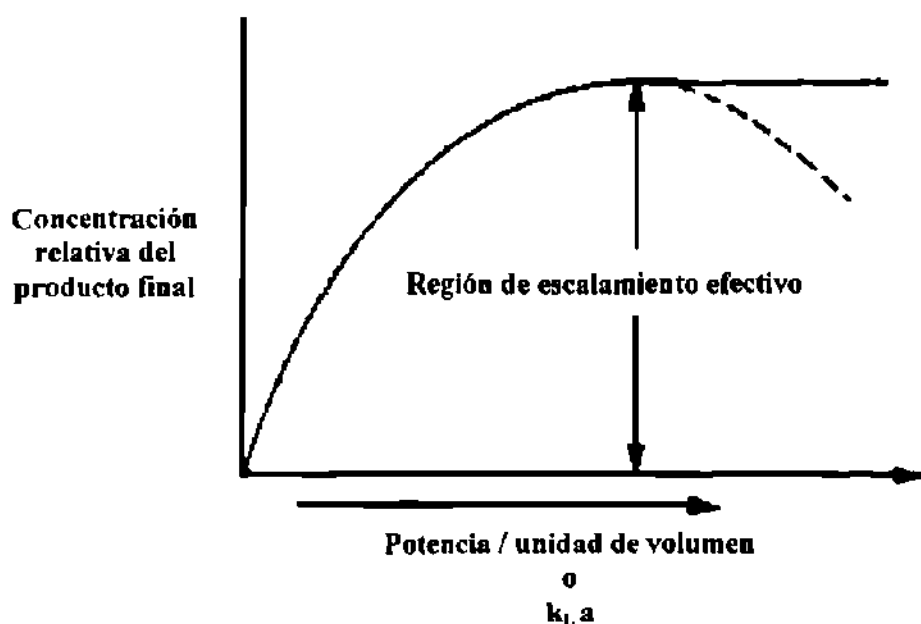


Figura 2. Dependencia de la fermentación y las variables de operación.

Transferencia de oxígeno y medición de $k_L a$.

El crecimiento de un organismo aerobio en el cultivo sumergido requiere oxígeno disuelto en el medio. El oxígeno debe ser aportado continuamente ya que es solo escasamente soluble en solución acuosa. La transferencia de oxígeno del gas hacia los microorganismos se lleva a cabo en varias etapas. Primeramente el oxígeno debe viajar a través del gas hacia la interfase gas-líquido, después a través de la interfase, a través del líquido y finalmente, hacia el organismo (Middleton y cols, 1985). Para determinar el $k_L a$ se han desarrollado un gran número y variedad de métodos. Todas las técnicas se basan

en el balance de oxígeno ya sea un proceso de reacción química o de una fermentación en particular y se pueden aplicar con buenos resultados dentro de su rango recomendado de operación. Las técnicas utilizadas más comúnmente se basan en dos tipos de medición (Quintero, 1981; Rainer, 1990):

Medición indirecta: Se denomina así porque se lleva a cabo en sistemas donde no se está efectuando una fermentación; los valores obtenidos solo indican un orden de magnitud y se emplean para hacer comparaciones entre diferentes reactores que operan en condiciones similares. Pueden ser medidas por:

- a) oxidación de sulfito.
- b) técnica de eliminación de gas.

Medición directa: Como la anterior se realiza con fermentaciones reales, tanto batch como continuas, el valor obtenido es más representativo del sistema en cuestión. Pueden ser medidas por:

- a) balance de oxígeno en el sistema.
- b) técnica dinámica.

Correlaciones para estimar el k_{La}

En la práctica el k_{La} se ve afectado por la aireación y agitación del sistema principalmente. Como la intensidad de la agitación se expresa usualmente en términos de la disipación de energía por unidad de volumen unitario del líquido, la mayoría de las correlaciones para definir el k_{La} se reportan como una función de este parámetro. La primera de ellas la propusieron Cooper, Fernstrom y Miller en 1994, bajo la forma de:

$$k_{La} = 32.3(P_g/V)^{0.95}(V_s)^{0.67}$$

Esto se aproxima a que el k_{La} sea directamente proporcional a la energía aplicada por unidad de volumen unitario multiplicado por un factor que considera la aireación suministrada al sistema (Winkler, 1993); para estimar el k_{La} se han reportado varias

correlaciones empíricas. En la tabla 1 se presentan 5 correlaciones empíricas de la literatura recopiladas por Belmar (1984).

Tabla 1. Correlaciones empíricas para estimar el k_{La} .

Correlación	Sistema	Escala (litros)
$k_{La} = 99.8(Pg/V)^{0.72}(Vs)^{0.11}$	Levadura	20000*
$k_{La} = 106.8(Pg/V)^{0.33}(Vs)^{0.56}$	Glucosamylasa	20, 60, 300 y 30000
$k_{La} = 32.3(Pg/V)^{0.95}(Vs)^{0.67}$	Agua con iones	10, 76, 8.5
$k_{La} = 1319.26(Pg/V)^{0.4}(Vs)^{0.2}$	Agua	2 a 2600**
$k_{La} = 43.064(Pg/V)^{0.69}(Vs)^{0.49}$	Agua con iones	17

Unidades: $k = (-)$, $k_{La} = h^{-1}$, $Pg/V = Hp/m^3$, $Vs = m/h$, * Fermentador Waldh, * Fermentador desconocido, todos los demás fermentadores son estándar.

Las correlaciones son muy específicas, determinadas por diferentes métodos. Son válidas en un rango de volumen y para diferentes sistemas. Por lo tanto, para fines de estimación, se debe de tener cuidado al elegir alguna correlación.

Efecto de la tensión de oxígeno en una fermentación fúngica

El oxígeno es sin duda alguna el elemento más difícil de abastecer en cultivos sumergidos debido a su baja solubilidad en agua (alrededor de 20 ppm empleando aire a 1 atm y a temperatura ambiente (Atkinson y Mavituna, 1991), por lo que debe suministrarse continuamente mediante aireación. El aire o gases empleados se adicionan al medio a través de un difusor colocado debajo del impulsor inferior, permitiendo esto una mejor dispersión del gas. Sin embargo, debido a la baja solubilidad del oxígeno y a las múltiples barreras físicas que debe atravesar el gas, frecuentemente se generan gradientes de este elemento en el medio, lo cual puede causar serias limitaciones en los cultivos (Rocha, 1999).

Se reporta que la tensión del oxígeno disuelto afecta la productividad, la autólisis de la célula, la rigidez de las paredes de la célula y así en las fermentaciones fúngicas. Algunas de las observaciones se contradicen una de la otra; por ejemplo Zetelaki y Vas (1968) mencionan en un cultivo de *Aspergillus niger* que la burbuja de aire y el oxígeno para la producción de la glucosa oxidasa; en este cultivo oxigenado se produce dos veces más la glucosa oxidasa.

Sakurai e Imai (1992), encuentran que la producción de ácido cítrico específico se incrementa con la tensión del oxígeno disuelto en un disco giratorio automático usando *A. niger*. Por su parte, Giuseppin en 1984, muestra que la producción de lipasa de *Rhizopus delemar* disminuye cuando la tensión de oxígeno disuelto baja cerca de un 18% de aire saturado. Ya en 1962, Clark había encontrado que la presurización del oxígeno en una fermentación con *A. niger* marca el efecto en la densidad del crecimiento periférico y prolonga la autólisis de la célula. Una alta presurización de oxígeno (1.7 atm) reduce la autólisis en los pellets.

Aunque con una presurización de oxígeno de un 0.2 atm, los pellets, son más lagos y tienen una densidad en el crecimiento uniforme. Cui, 1997 reporta que la fracción de los filamentos miceliales en el total de biomasa se incrementa con el incremento de la agitación.

Medición del consumo de potencia por agitación

La potencia suministrada a un tanque agitado es información muy útil, ya que de ello depende en gran medida la capacidad de un sistema de agitación para mezclar el fluido y transferir oxígeno. Debe remarcarse que la potencia que tiene relevancia para el proceso de fermentación es únicamente aquella que se disipa en el fluido. Aunque las pérdidas por fricción en reductores de velocidad, baleros, sellos, estoperos, etc.,

contabilizan en la economía de un cierto proceso, no tienen nada que ver con el comportamiento del cultivo (King, 1981).

A escala industrial, la cuantificación de potencia se puede llevar a cabo (con bastante precisión) a partir de mediciones eléctricas en el motor (Oosterhuis, 1981). En este nivel, las pérdidas por fricción en el reductor de velocidad y sellos, constituyen un porcentaje muy bajo de la potencia total suministrada al caldo de fermentación. En fermentadores a nivel laboratorio, las pérdidas por fricción pueden llegar a ser hasta del 75% del total consumido por el motor. Brown (1977), ha publicado una revisión de las técnicas de medición del consumo de potencia en tanques agitados. Para el caso de tanques pequeños abiertos, los dinamómetros basados en un balero de fricción despreciable (neumático o hidráulico) y en donde se mide el torque de reacción, son la mejor opción (Nienow y Miles, 1989).

A nivel piloto, el sistema más preciso es aquel, en el que se usan deflectores de esfuerzo montados en la flecha. Nienow y cols (1989) han reportado un ingenioso sistema basado en un tren de válvulas montadas sobre una flecha hueca. Este sistema es susceptible de estabilizarse y en consecuencia, es posible llevar a cabo mediciones muy precisas de potencia a lo largo de una fermentación. Es importante resaltar que prácticamente ningún fermentador comercial de nivel piloto, cuenta con instrumentación para hacer mediciones de potencia en forma precisa (Kubol y Allsford, 1983).

Potencia sin aireación

Si se midiera la potencia consumida por impulsores cada vez más grandes, pero que mantuvieran la relación D/T constante, en el mismo fluido y para diferentes velocidades de agitación, se obtendrían curvas similares a las presentadas en el anexo 2. Sin importar el diámetro del impulsor, la pendiente de las rectas obtenidas permanece constante y es igual a 3. (Galindo y cols, 1993). Ello significa que:

$$P \propto N^3$$

Si ahora fijáramos la velocidad de agitación y observamos el comportamiento de la potencia en términos del diámetro del impulsor, se podría ver que:

$$P \propto D^5$$

o sea que:

$$P \propto N^3 D^5$$

En ingeniería química o bioquímica, es común el presentar las correlaciones en términos de números adimensionales. Para este caso, las relaciones de potencia se han reportado en función de:

$$\text{El número de potencia} = \frac{P}{\rho N^3 D^5} = P_o$$

$$\text{y el número de Reynolds} = \frac{ND^2\rho}{\mu} = Re$$

Potencia con aireación (fluidos newtonianos)

Cuando un fluido en agitación se airea, la potencia consumida por el agitador disminuye. La caída en la potencia frecuentemente se expresa como la relación entre la potencia sin airear respecto a la potencia aireada (P_g/P). En el caso de los fluidos newtonianos, esta caída en la potencia puede ser correlacionada con el número de aireación (Q/ND^3), de acuerdo a la muy conocida gráfica de Ohyama y Endoh (1955), la cual se reproduce en el anexo 3. Michael y Miller (1962), han publicado correlaciones

para estimar la potencia gaseada en términos de las variables de operación. Sin embargo, debe mencionarse que el número de aireación no es capaz de correlacionar los datos para varias combinaciones de N y D en un tanque definido o para las mismas N en varios tanques.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

Se utilizó la cepa 612 de *P. fumosoroseus*, la cual fue aislada de *B. tabaci* en Texas, y fue proporcionada por el United States Department of Agricultural Research Service, de la Colección de Hongos Entomopatógenos, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USDA-ARS. La cepa se conservó en viales con 1 mL de glicerol al 10% a - 80°C hasta su uso para la preparación del inóculo, resemebrándose semanalmente (anexo 4).

Activación de la cepa

De la cepa preservada se tomó 100 µl de los viales, que posteriormente se depositaron en cajas Petri conteniendo PDA. La caja se incubó a 28° C durante 21 días (anexo 5).

Preparación del pre-inóculo

Al cultivo anterior se le adicionó de 5 a 10 mL de agua desionizada estéril para remover las conidias y de esta suspensión se pasaron a un frasco de dilución conteniendo agua desionizada estéril, se agitaron y se contaron las conidias en una cámara Neubauer que se observaron a 40x en un microscopio de contraste de fase (Rossbach Modelo LSC-BLH) hasta obtener una concentración de 5×10^5 conidias/mL. Posteriormente se tomaron 10% v/v y se depositaron en un matraz Erlenmeyer bafleado de 250 mL de capacidad con 150 mL del medio reportado por (Jackson y cols, 1996) se mantuvo en agitación a 300 rpm a una temperatura de 28 °C (anexo 6) durante 72 h en una incubadora (New Brunswick Scientific).

Medios de cultivo

El medio de cultivo basado en casaminoácidos patentado por Jackson y cols (1996), contiene por litro KH_2PO_4 2.0g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 37 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14 mg. Estos son los componentes del medio basal, por otro lado, la fuente de carbono utilizada fue la glucosa, la cual se esteriliza aparte del medio basal, para ser adicionada al inicio de la fermentación. El otro medio de cultivo utilizado, fue de peptona de colágeno desarrollado por Rivas (patente en tramite numero de registro 9810892) en 1998, el cual contiene peptona de colágeno 15g, extracto de levadura 5g, KH_2PO_4 4g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g y 80 g de glucosa por litro (anexo 8).

Producción de blastoesporas a nivel matraz

Del preinoculo obtenido del punto 2.3 se inocularon 6 matraces Erlenmeyer bafleados de 500 mL con un volumen de trabajo de 100 mL conteniendo ambos medios de cultivo (medio de casaminoácidos y peptona de colágeno), los cuales se mantuvieron en agitación a 300 rpm en una incubadora modelo (New Brunswick Scientific) a una temperatura de 28° C durante 72 h. Se tomaron muestras durante el proceso cada 12 h para determinar la producción de blastoesporas totales.

Conteo de blastoesporas

De los medios de cultivo inoculados se tomo un 1.0 mL de cada uno y se adicionaron a 9.0 mL de agua destilada estéril contenida en un tubo de ensaye para ser contadas en la Cámara de Neubauer y posteriormente fueron observadas a una amplificación de 40 X en un microscopio de contraste de fases (Rossbach Modelo LSC-BLH) en el cual observaremos la dilución 1:10. Después se efectuaron diluciones a 1:100 y 1:1000 conforme avanzó la producción de blastoesporas hasta su terminación en un periodo comprendido de 72 h. Estos resultados son reportados en esporas/mL.

Recuperación de las blastoesporas

Se utilizó la técnica de secado por aire, para la separación y recuperación de las blastoesporas a partir de los diferentes medios de cultivo utilizados, los cuales fueron pasados dos veces a través de una malla. Del sobrenadante recuperado se tomaron 50 mL al que se le adiciono 2.5 g de tierra de diatomeas, para posteriormente realizar la filtración con una bomba de vacío sobre papel filtro Whatman No. 1. Este extracto se pasó a una Caja Petri y se secó durante toda la noche bajo una campana de flujo laminar (marca VECO) a una humedad relativa del 70%.

Determinación del porcentaje de germinación

Del extracto recuperado se tomó una muestra de 50 mg y se le adicionó a 50 mL de caldo extracto de papa, contenidos en un matraz bafleado de 250 mL y se puso en una incubadora (New Brunswick Scientific) con una agitación tangencial, a 300 rpm durante 6 h. Al finalizar el periodo de incubación, de un fresco directo del cultivo se contaron 100 esporas (germinadas y no germinadas) y se reportó el porcentaje de germinación.

Equipo de fermentación

Se empleo un fermentador New Brunswick Scientific modelo MF-114 de (anexo 7) un volumen nominal de 14 l con un diámetro de tanque (D_t) igual a 0.21 m, con un impulsor tipo Rushton de 6 paletas de 7 cm de diámetro, ($1/3 D_t$) equipado con un analizador de oxígeno disuelto (O_2D) Ingold modelo 170, analizador y controlador de pH modelo 2300 con electrodos marca Ingold, el volumen de trabajo empleado fue de 5 l, (h/D_t igual a 0.8 cm).

Preparación del medio de cultivo

Para los experimentos realizados en jarras de vidrio, se pesaron y se disolvieron por separado cada uno de los componentes de los medios mencionados en el anexo 8 y se les agregó agua desionizada estéril hasta completar 5 l. Se ajustó el pH a 5.5 en ambos medios. La esterilización se realizó en autoclave, a 121 °C durante 15 minutos.

Preparación de las jarras de fermentación de 14 litros

Los cultivos se llevaron al cabo en fermentadores de 14 l de capacidad, con 5 l de volumen de trabajo (ver anexo 7), a los cuales se le agregaron los medios de cultivo, se llevaron a su esterilización cuidando especialmente los puertos de muestreo, salida de aire, adición de ácido y base, y adición de antiespumante, por último se ajustaron las condiciones de operación.

Inoculación del fermentador

Inicialmente se estabilizaron las condiciones de operación del equipo de fermentación. A continuación se transfirió un volumen del pre-inóculo de 5×10^6 blastoesporas/mL el cual fue ajustado el total de las blastoesporas alcanzadas en el pre-inóculo.

Condiciones de operación de los fermentadores

Tabla 2. Condiciones de operación del fermentador.

Volumen del Fermentador (litros)	Velocidad de Agitación (rpm)	Volumen de Aireación (VVM)	
5	^a 200	1.0	0.5
5	^b 400	1.0	0.5
5	^b 520	1.0	0.5
5	^b 590	1.0	0.5
5	^a 600	-	0.5

^a solo en Medio Control, ^b Ambos medios.

En cada condición de agitación, se midieron el k_La y el consumo de oxígeno para cada nivel de aireación. Se hicieron dos experimentos por cada condición de operación y se determinó el promedio.

Métodos analíticos

Cálculo del k_La de la fermentación: Cuando el fermentador se encuentra aireado, y la concentración de oxígeno disuelto está cambiando con respecto al tiempo, la transferencia de oxígeno esta dada por:

$$(dC/dt) = k_La(C_g^* - C_L) - QO_2$$

Se realizó la integración (ver la solución de la integración en anexo 10) de la ecuación anterior, y se obtuvo

$$\ln[(C_g^* - C_2)/(C_g^* - C_1)] = -k_La(t)$$

Como se muestra en la figura 3 representamos los pasos del método indirecto de desgasificación para la medición experimental del k_La en nuestros medios en estudio, se saturó con oxígeno (100% de concentración), posteriormente se elimina el oxígeno y se burbujeo nitrógeno en lugar de aire. Una vez que C_L es casi cero, se introduce oxígeno y se toman lecturas de concentración de oxígeno a diferentes tiempos.

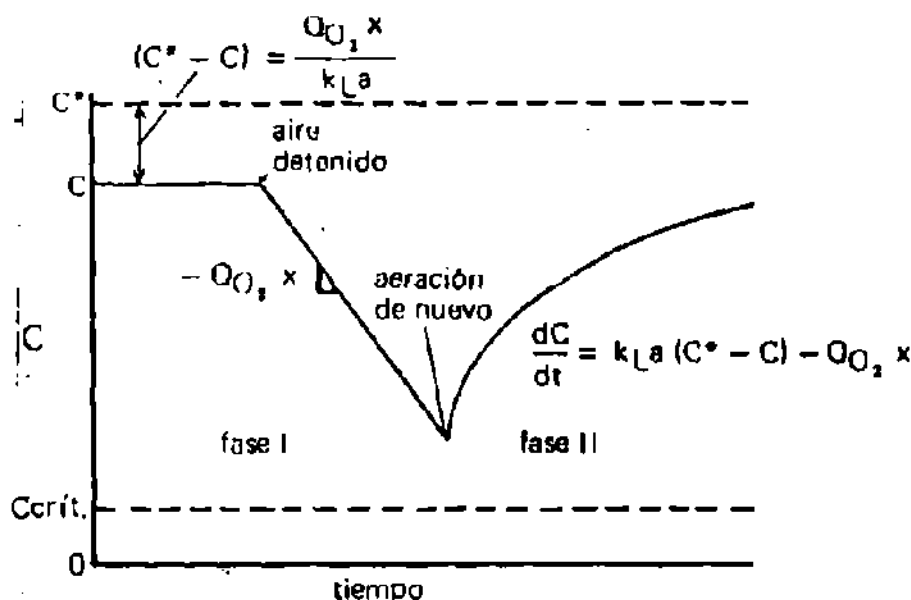


Figura 3. Determinación del k_La por el método de desgasificación.

Posteriormente, se determinó el logaritmo a las concentraciones obtenidas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\ln [(C_g^* - C_2)/(C_g^* - C_1)]$$

Donde

C_g^* concentración de l oxígeno disuelto en equilibrio con el oxígeno de la fase gaseosa (constante 100%)

C_L concentración del oxígeno disuelto en el seno del líquido

C_1 concentración inicial del oxígeno disuelto (primera concentración determinada en todo el cálculo)

C_2 concentración del oxígeno disuelto en el tiempo t tiempo (h)

Por último, se grafican los resultados obtenidos de la ecuación: $\ln [(C_g^* - C_2)/(C_g^* - C_1)]$ (los valores negativos) contra el tiempo en horas. Donde el valor absoluto de la pendiente de la recta interior ajustada es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) en h^{-1} , determinado para cada condición de operación, como lo muestra la figura 4.

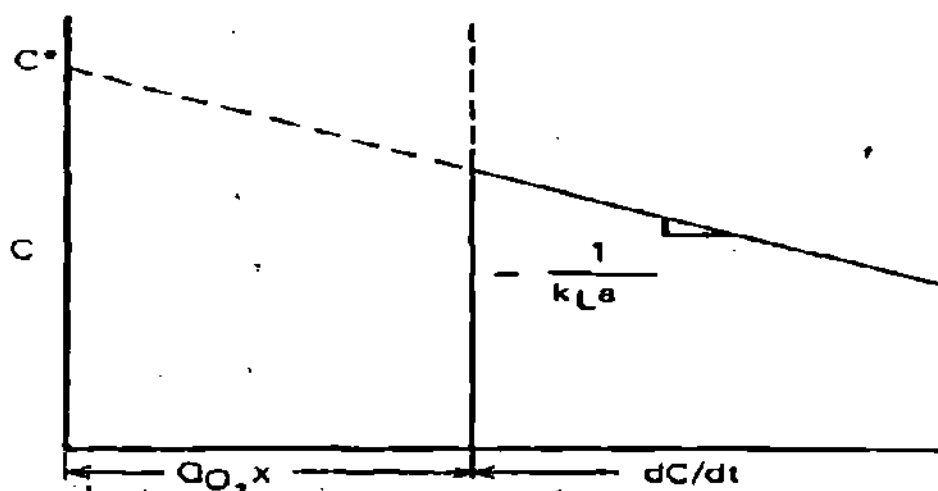


Figura 4. Determinación de $k_L a$.

Secuencia de cálculo de la correlación para estimar k_{La}

Con los valores del k_{La} experimental evaluado y la potencia gaseada volumétrica y velocidad superficial del gas, se procedió a la determinación de la constante k , y los coeficientes α y β para estimar k_{La} de acuerdo a la ecuación empírica:

$$k_{La} = K (Pg/V)^{\alpha} (Vs)^{\beta} .$$

Para encontrar los valores de k , α y β de nuestra ecuación $k_{La} = K (Pg/V)^{\alpha} (Vs)^{\beta}$, se realizó una regresión lineal a las tres series de datos, empleando el método de mínimos cuadrados, descrito en el anexo 11; esto es debido a que para resolver la ecuación empírica del k_{La} se resuelven tres ecuaciones simultáneas por el siguiente método:

A nuestra ecuación:

$$k_{La} = K (Pg/V)^{\alpha} (Vs)^{\beta} .$$

Aplicamos el logaritmo en ambos lados y se obtiene:

$$\ln (k_{La}) = \ln K + \alpha \ln (Pg/V) + \beta \ln (Vs)$$

Siguiendo el razonamiento del anexo 6 se puede llegar a las ecuaciones normales:

$$\sum \ln (k_{La}) = nk^* + \alpha \sum \ln (Pg/V) + \beta \sum \ln (Vs) \quad (1)$$

$$\sum (Pg/V) \ln (k_{La}) = k^* \sum \ln (Pg/V) + \alpha \sum (\ln (Pg/V))^2 + \beta \sum \ln (Pg/V) \ln (Vs) \quad (2)$$

$$\sum (Vs) \ln (k_{La}) = k^* \sum \ln (Vs) + \alpha \sum \ln (Pg/V) \ln (Vs) + \beta \sum (\ln (Vs))^2 \quad (3)$$

Se determinan las sumatorias y se resuelve por ecuaciones simultáneas las expresiones normales (1, 2 y 3) para finalmente obtener los valores de k , α y β . Puesto que el valor de k^* , es igual al $\ln$ de k , determinamos el exponencial al valor de k^* para obtener la constante k . (ver anexo 12) de los resultados estadísticos generados por la regresión lineal múltiple de los logaritmos de k_{La} experimental contra potencia gaseada y velocidad superficial, empleando el programa "Estadístico SPSS 10.0" para determinar dichos valores k , α y β .

Determinación de la productividad del proceso

Esta determinación se realizó con la cantidad total de blastoesporas/mL dividido entre el tiempo de proceso:

$$\text{Productividad} = \frac{\text{Esporas / mL}}{\text{Tiempo (h)}}$$

Determinación del consumo de oxígeno (D.O.)

Esta determinación se realizó con un electrodo de Oxígeno Tipo Johnson -Borkowsky basándose en plomo y plata, el cual independientemente de medir actividad de oxígeno, nos permite dilucidar el porcentaje de saturación del gas en un medio de cultivo.

Medición de potencia volumétrica gaseada del fermentador New Brunswick Scientific modelo MF-114

La potencia volumétrica gaseada del fermentador fue medida directamente con ayuda de un dinamómetro de cojinete neumático (Resendiz y cols, 1991), usando un tanque geoméricamente similar al fermentador de 14 l. Para este punto se siguió el procedimiento de Vázquez 1995, en el cual primero se instala un tanque de 0.205 m de diámetro sobre el cojinete neumático, después llenamos el recipiente hasta el nivel

requerido de 5 l en esta fermentación, se colocaron los impulsores de acuerdo a la geometría seleccionada para ajustar la velocidad de agitación y flujo de aire requerido, permitiendo que las condiciones se estabilicen. Por último se capturan las condiciones de operación en el programa de computación. En el anexos 13 y 15 se muestra el dinamómetro de cojinete neumático de la Planta Piloto del Instituto de Biotecnología y Bioingeniería de la UNAM, para medición de potencia del tanque de 5 l de operación. Se utilizó un volumen de 5 l del medio control (casaminoácidos) a temperatura ambiente (28° C) para la determinación del consumo de potencia. Se cuidó siempre que el nivel del fluido en cada corrida experimental se mantuviera constante.

Del torque para el dinamómetro neumático

El torque se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación

$$M = FB$$

Donde

M = Torque en N.m

F = fuerza en Kg.f

B = brazo de palanca utilizado

Se utilizo un brazo de palanca de 0.2 m. La potencia se relaciona como el torque (M) transmitido por el impulsor, de acuerdo a la siguiente relación:

$$P = JM$$

$$P = 2\pi i NM$$

Donde

P = Potencia en watts

J = Velocidad angular (2piN) en seg⁻¹

N = Velocidad de agitación en seg⁻¹

La potencia gaseada determinada en la expresión anterior, se dividió entre el volumen de operación para obtener la potencia volumétrica gaseada del fermentador de 5 l de operación (Vázquez, 1995).

Análisis estadísticos

Para la optimización de condiciones se utilizó un diseño factorial incompleto, para la viabilidad de las blastoesporas obtenidas al final de la fermentación de las mejores condiciones de operación. Se realizó un Análisis de Varianza Factorial bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Para los resultados estadísticos generados por la regresión lineal múltiple de los logaritmos de k_{La} experimental contra potencia gaseada y velocidad superficial, se empleó el programa estadístico "SPSS 10.0" para determinar los valores k , α y β .

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Producción de blastoespores a nivel matraz

Ambos medios presentaron características distintas respecto a la producción de blastoespores. De esta manera el medio de peptona de colágeno disparó de una manera más rápida el crecimiento de *P. fumosoroseus*, ya que a partir de las 36 h de fermentación se notó claramente el ascenso en el número de blastoespores de tal forma que a las 72 h ya se había obtenido 4.8×10^8 blastoespores/mL (Figura 4). En contraste, el medio de casaminoácidos retardó el inicio de tal crecimiento y solo hasta las 48 h pudo notarse este crecimiento alcanzando una concentración final de 7.28×10^8 blastoespores/mL (Figura 5) al final de la fermentación. La cinética de producción de los medios estudiados pudo ser debida en parte por el uso de peptona de colágeno, que los nutrientes contenidos eran más fáciles de asimilar por el organismo, de tal forma que facilitaron el rápido crecimiento, no obstante, su concentración era menor a la necesaria para sostener una abundante producción celular. El caso contrario puede establecerse para el medio que contenía casaminoácidos donde casi el doble de blastoespores/mL fueron obtenidas respecto al primero.

Jackson y cols, (1996) han desarrollado experimentos para producir *P. fumosoroseus* a nivel matraz utilizando también como medio de elección la fuente de casaminoácidos suplementado con vitaminas donde ha obtenido 5.8×10^8 blastoespores/mL, tales datos son indicativos por una parte que el medio de peptona de colágeno casi igualo la productividad de este medio, por otro lado, el medio casaminoácidos bajo las condiciones de operación de este estudio, logrando una producción mayor en un tiempo de 4 días. López y cols (2000) reportan una producción de 3×10^8 blastoespores/mL usando un medio más barato, el cual contiene 20 g/l de glucosa, 10 g/l peptona de caseína y 2 g/l de extracto de levadura, en este caso el otro medio empleado son casi similares, pero aun así en este experimento se logra obtener una producción algo más alta que la reportada.

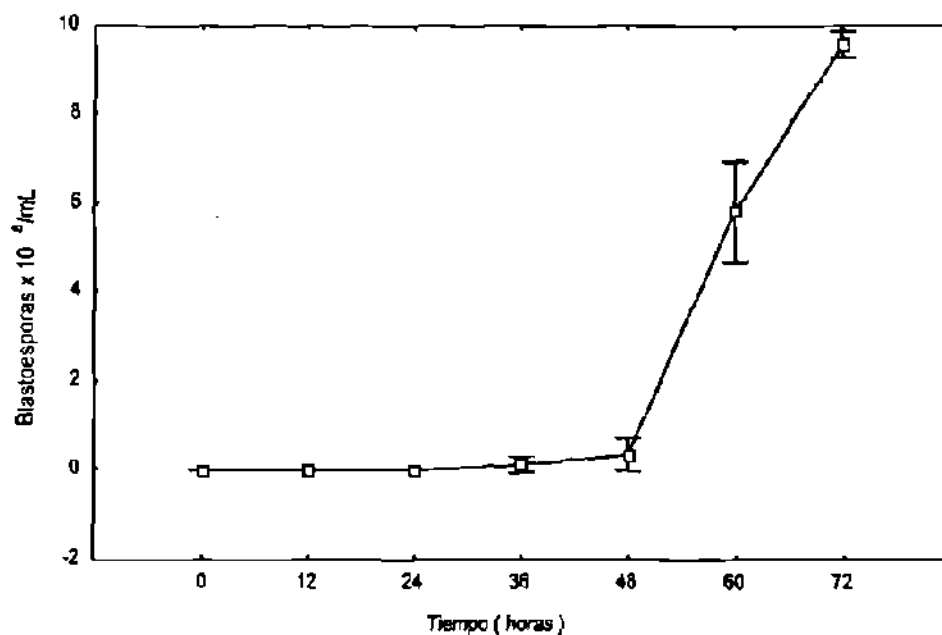


Figura 5. Producción de blastoesporas en medio de casaminoácidos a nivel de matraz.

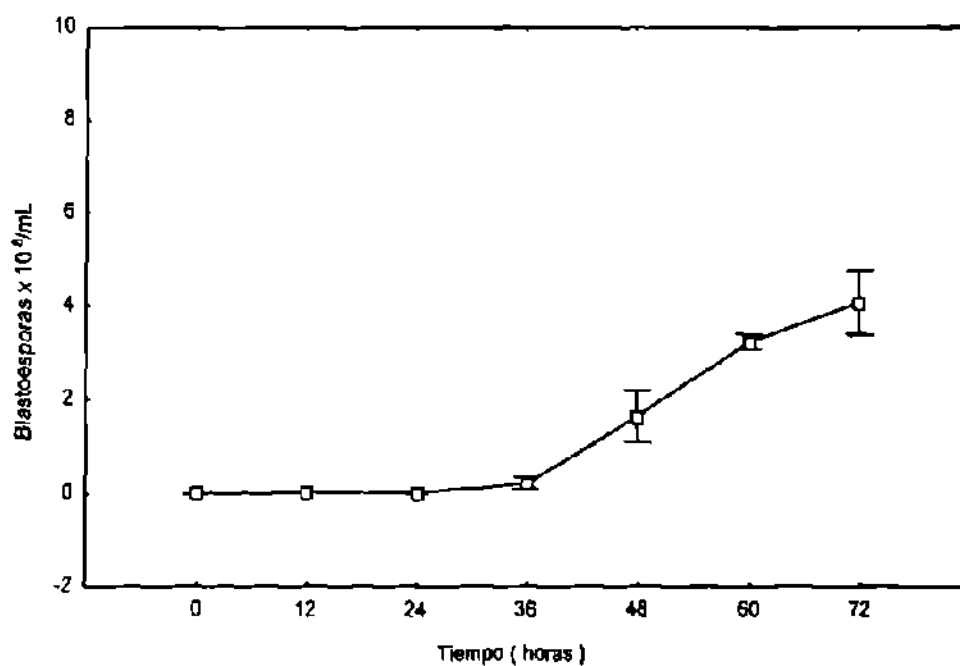


Figura 6. Producción de blastoesporas en medio peptona de colágeno a nivel de matraz.

Sobrevivencia de las blastoesporas a nivel matraz

El almacenaje es un problema clave para las preparaciones industriales de hongos entomopatógenos que necesitan ser almacenadas al menos por un año sin pérdida de viabilidad. Con las condiciones de este estudio la viabilidad de los extractos recuperados de los medios de cultivo utilizados se muestra en la Figura 6, los cuales corresponden a un promedio de 3 experimentos, observando que el producto recuperado y almacenado a una temperatura de 22°C después de 3 meses, tiene una sobrevivencia del 38% en el medio peptona de colágeno y un 48% en el medio de casaminoácidos. Las blastoesporas almacenadas a una temperatura de 4°C muestran una sobrevivencia del 74% en el medio de peptona de colágeno y un 81% en el medio de casaminoácidos, esto después de 3 meses (Figura 8).

Un reporte publicado por Jackson en 1996 menciona una viabilidad del 88% después de 5 meses de almacenaje a 4 °C. Pero en este estudio las blastoesporas son liofilizadas con el interés de obtener una mayor sobrevivencia, aunque en nuestro experimento no empleamos esta técnica, las blastoesporas presentan una mejor respuesta en ambos medios. Estudios con otros hongos han demostrado que el crecimiento y esporulación en medio líquido y sólido con reducción de actividad del agua aumenta la sobrevivencia de la spora por el incremento de la acumulación de trehalosa y alcoholes polihidroxilados. (Jin, Harman y Taylor, 1991; Halls Worth y Magan, 1994). Estos resultados nos demuestran una vez mas que las bajas temperaturas son necesarias para un mayor almacenamiento a largo plazo y que a temperatura ambiente la mayoría de los hongos rápidamente pierden viabilidad, frecuentemente en menos de un mes. Los análisis estadísticos de los extractos almacenados a 4° C y 22° C hasta un periodo de 90 días nos muestran una diferencia significativa, entre los medios ($\alpha=0.05$) los resultados fueron dados del programa estadístico SPSS versión 8.0 (n=3) usando una ANOVA multifactorial (ver el Anexo 16).

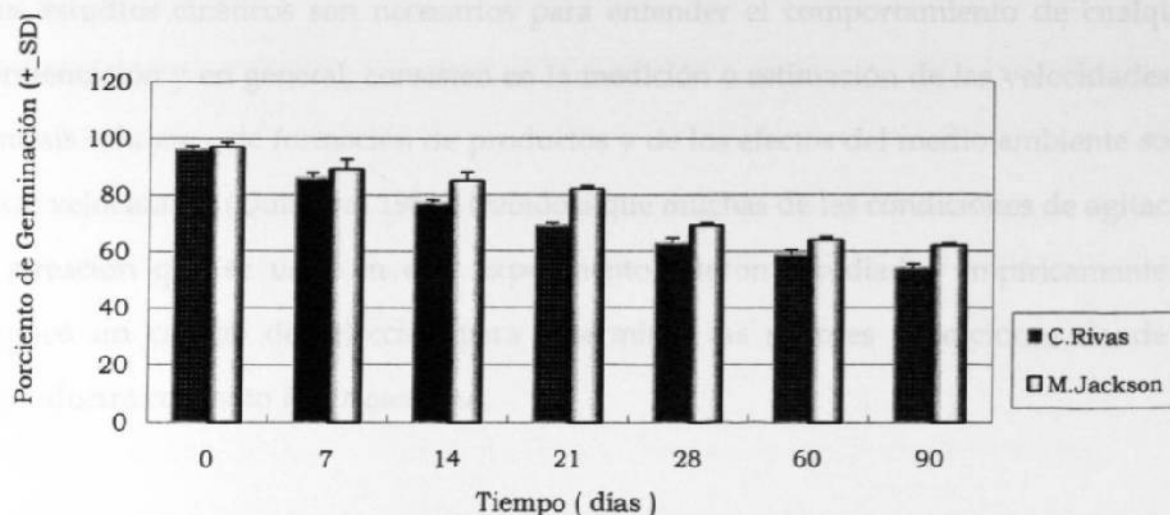


Figura 7 Sobrevivencia de blastoesporas de *P. fumosoroseus* producidas en matraces bafleados conteniendo medios líquidos de casaminoácidos y peptona de colágeno y almacenadas a temperatura ambiente.

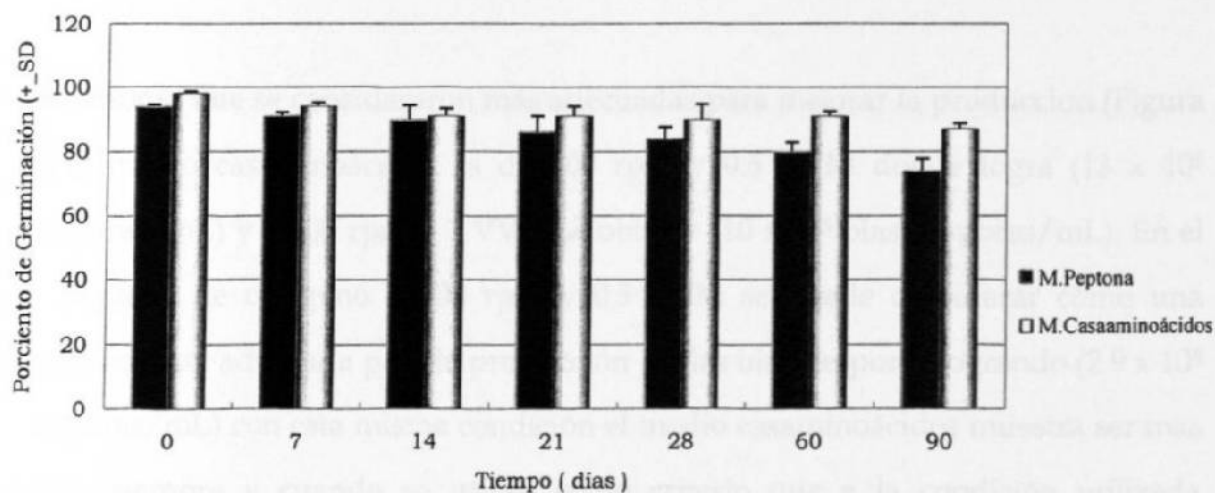


Figura 8. Sobrevivencia de blastoesporas de *P. fumosoroseus* producidas en matraces bafleados conteniendo medios líquidos de casaminoácidos y peptona de colágeno y almacenadas a 4° C.

Producción de blastoesporas a escala fermentador

Los estudios cinéticos son necesarios para entender el comportamiento de cualquier fermentación y en general, consisten en la medición o estimación de las velocidades de síntesis celulares, de formación de productos y de los efectos del medio ambiente sobre estas velocidades (Quintero, 1981). Debido a que muchas de las condiciones de agitación y aireación que se usan en este experimento, fueron estudiadas empíricamente se empleó un criterio de selección para determinar las mejores condiciones donde se reproducirá con éxito *P. fumosoroseus*.

Entre las condiciones donde experimentamos una producción alta, encontramos que las mejores condiciones para el medio peptona de colágeno fueron 520 rpm y 1 VVM (Figura 9), donde se logra una producción de (27×10^8 blastoesporas/mL) mientras que el medio casaminoácidos se logra después de 72 h (1×10^8 esp/mL). Otra condición ideal para producción sería 590 rpm y 1 VVM donde muestra (6×10^8 esp/mL) más que en el medio casaminoácidos (Tabla 3 y Figura 10) donde se logra solo (0.9×10^8 blastoesporas/mL).

Las condiciones que se consideraron más adecuadas para mejorar la producción (Figura 10) en el medio casaminoácidos es de 400 rpm y 0.5 VVM donde logra (13×10^8 blastoesporas/mL) y a 400 rpm y 1 VVM se obtiene (10×10^8 blastoesporas/mL). En el medio peptona de colágeno a 400 rpm y 0.5 VVM se puede considerar como una condición no muy adecuada para la producción de las blastoesporas logrando (2.9×10^8 blastoesporas/mL) con esta misma condición el medio casaminoácidos muestra ser más favorable, siempre y cuando se utilice como criterio que a la condición utilizada produzca el mayor número de blastoesporas. El medio peptona de colágeno a 400 rpm y 1 VVM logra (1.8×10^8 blastoesporas/mL) pero también es superada por el otro medio a estas mismas condiciones. Por otra parte, se encontró que la condición de agitación

(600 rpm y 0.5 VVM) presenta una producción muy pobre de (0.9×10^8 blastosporas/mL) en el medio casaminoácidos (Figura 10) siendo este un motivo para no considerar esta agitación útil para la reproducción del microorganismo. Para los dos medios utilizados las diferentes condiciones de agitación y aireación fueron un factor determinante para la producción de *P. fumosoroseus* en este estudio.

Entre los reportes encontrados de producción de *P. fumosoroseus* a escala fermentador observamos Latgé y cols (1986), reporta con un medio específico de glucosa y extracto de levadura que *B. bassiana* produce una alta concentración de propágulos (1×10^9 blastosporas/mL) aun así el medio peptona de colágeno reporta una concentración más alta para la producción de *P. fumosoroseus*.

Quintero-Zapata, (2001) reporta una producción de (1.48×10^8 blastosporas /mL) a 24 h de fermentación usando una agitación de 400 rpm y 1.5 VVM con un medio a base de 2.0 g de sacarosa y 4.5 g de peptona de colágeno. A esa misma agitación en este experimento con el medio estudiado se logra obtener un 5.0×10^8 esp/mL. En 1996, de la Torre y Cárdenas Cota, reportan la producción de conidias en un cultivo sumergido de *P. fumosoroseus* usando una fuente simple de carbono, glucosa (30g/l) y una fuente simple de nitrógeno, nitrato de amonio (0.7 g/l) suplementada con extracto de levadura (1g/l). Las conidias sumergidas se presentaron en una concentración de 10 conidias/mL en un fermentador de 6L (usando un volumen de 4 l) manteniendo el oxígeno disuelto sobre 20% de saturación con aire.

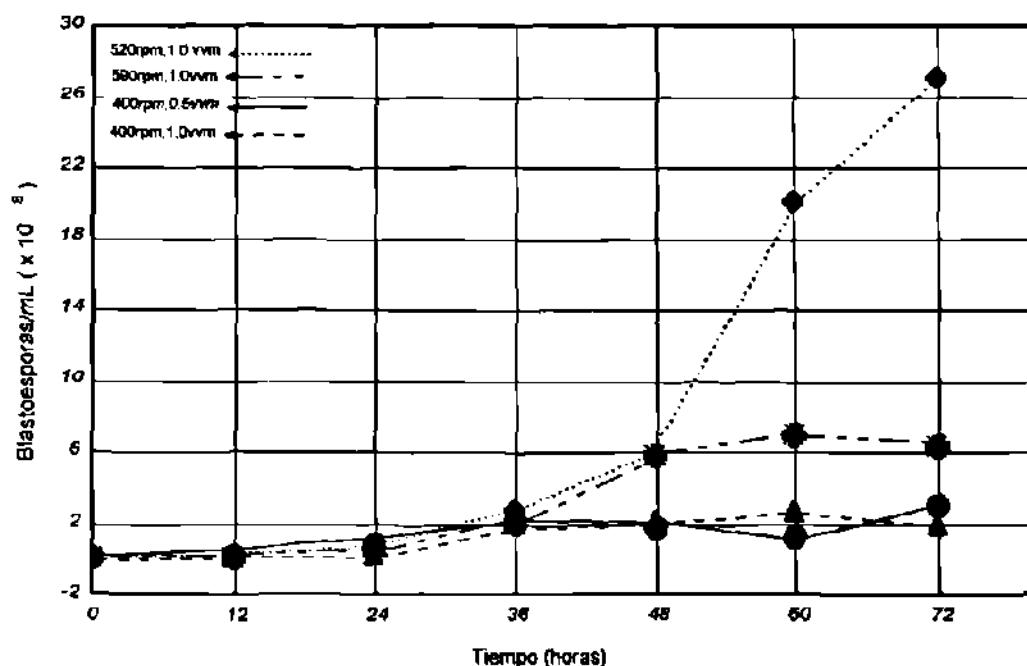


Figura 9. Producción de blastoesporas de *P. fumosoroseus* cepa 612 en medio de peptona de colágeno a escala de fermentador bajo diferentes condiciones de operación.

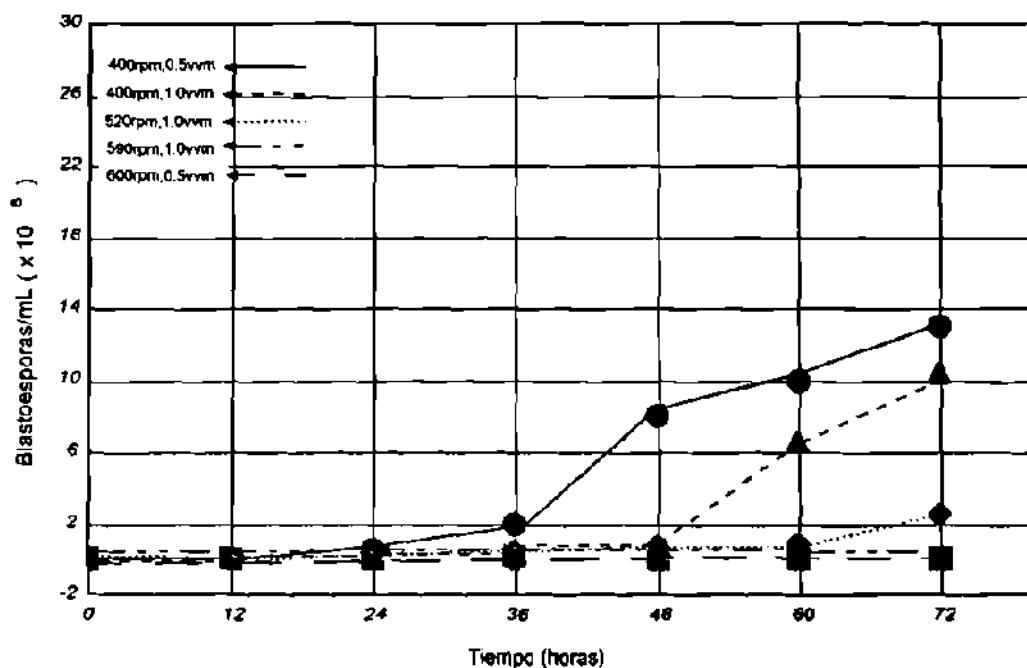


Figura 10. Producción de blastoesporas de *P. fumosoroseus* cepa 612 en medio de caseína a escala de fermentador bajo diferentes condiciones de operación.

Tabla 3. Producción de blastoesporas de *P. fumosoroseus* cepa 612 en dos medios de cultivo, a escala fermentador a diferentes condiciones de producción

Medio	Condición		^a Blastoesporas/mL x 10 ³
	Agitación rpm	Aireación VVM	
1	400	0.5	13.0
2			2.9
1	400	1.0	10.0
2			1.8
1	520	1.0	1.0
2			27
1	590	1.0	.012
2			6.0
1	600	0.5	0.9

Medios (¹ casaminoácidos, ² peptona de colágeno) Fermentaciones a 28° C, 72 h, * (n=3)

Viabilidad a nivel fermentador

Usando el criterio de selección donde solo se emplearon las condiciones en las cuales el organismo obtiene mejor reproducibilidad, las blastoesporas finales de estos experimentos fueron secados y almacenadas en un periodo de 5 meses para determinar su sobrevivencia.

De las dos condiciones de almacenaje empleados se observa (Tabla 4) que la viabilidad de los extractos obtenidos a una agitación de 400 rpm y 0.5 VVM en el medio casaminoácidos tiene (67%) y un (35%) el medio peptona de colágeno esta sobrevivencia corresponde a una temperatura de almacenaje de 4°C. Mientras que las blastoesporas almacenadas a 22°C presentan una sobrevivencia de (27%) en el medio peptona de colágeno y un (32%) en el medio casaminoácidos, esto después de 5 meses. Por lo que se puede concluir que en estas condiciones de agitación y aireación, el medio que presenta mayor porcentaje de viabilidad fue el medio casaminoácidos. Mientras que la viabilidad de las extractos obtenidos a 520 rpm y 1 VVM observamos (Tabla 5) una tendencia de poca sobrevivencia en el medio casaminoácidos a una temperatura de 4 °C tiene (40%) y la almacenada a 22 °C es de (23%). En el medio peptona de colágeno la sobrevivencia a 22 °C fue de (23%) casi igual a la obtenida a 400 rpm y mientras que la que fue almacenada a 4 °C fue de (59%).

Las blastoesporas secadas por aire presentan una mayor viabilidad contraria a la que reporta (López, 2000) donde tiene un 30% de viabilidad después de 30 días de almacenaje a 4 °C y las blastoesporas que reporta almacenadas a 22 °C solo sobreviven (1%) después de 30 días, mientras que las alcanzadas en este experimento, presentan un porcentaje mayor después de 5 meses. La preparación de nuestras blastoesporas presenta un alto porcentaje de viabilidad después de 5 meses del 67% de almacenamiento a 4° C en medio casaminoácidos, semejante a la reportada por Jackson y cols (1996), el 68% de las blastoesporas liofilizadas después de 150 días cuando se almacenó a 4° C.

Por otra parte, se observa diferencia significativa entre los dos medios, en los extractos almacenados a 4° C y 22° C ($\alpha=0.05$) datos en el Anexo 17, los datos son un promedio de los resultados obtenidos hasta 150 días de almacenaje, donde empleamos el programa estadístico SPSS versión 8.0 realizando una ANOVA multifactorial.

Tabla 4. Supervivencia de las blastosporas de *P. fumosoroseus* cultivadas en fermentador con agitación a 400 rpm, 0.5 VVM y almacenadas a 4 y 22°C.

Medio	% Viabilidad (días)								
	0	7	14	21	28	60	90	120	150
Casaminoácidos	^a 100	96	91	87	84	81	76	72	67
	^b 100	97	83	74	66	60	53	44	32
Peptona de Colágeno	^a 96	91	89	83	78	64	54	45	35
	^b 100	86	78	74	71	64	47	37	27

^a 4°C, ^b 22°C n = 3, ($\alpha=0.05$)

Tabla 5. Supervivencia de las blastosporas de *P. fumosoroseus* cultivadas en fermentador con agitación a 520 rpm, 1 VVM y almacenadas a 4°C y 22°C.

Medio	% Viabilidad (días)								
	0	7	14	21	28	60	90	120	150
Casaminoácidos	^a 94	90	86	82	74	65	61	49	40
	^b 96	86	76	66	57	54	41	35	23
Peptona de Colágeno	^a 97	94	89	84	78	75	70	65	59
	^b 100	95	76	67	61	54	49	42	31

^a 4°C, ^b 22°C n = 3 ($\alpha=0.05$)

Evaluación de la productividad de *P. fumosoroseus* a diferentes condiciones de fermentación

Tabla 6. Valores de productividad, obtenidos en las diferentes condiciones de agitación y aireación en el medio de casaminoácidos y medio de peptona de colágeno.

Medio	Condición		Productividad (blastoesporas/mL/h) x 10 ⁸
	Agitación rpm	Aireación VVM	
1	200	0.5	0.021
1	200	1.0	0.05
1	400	1.0	1.25
1	400	1.0	0.20
1	400	0.5	2.35
1	400	0.5	0.06
1	520	1.0	0.4
1	520	1.0	0.5
1	590	1.0	0.115
1	590	1.0	0.60
1	600	0.5	0.0134

n=2

La productividad del proceso de fermentación se muestra en la Tabla 6, se evaluaron a diferentes condiciones de operación, en la cual se observa que la productividad se ve afectada por las condiciones de agitación como de aireación, en ambos medios es diferente en el medio casaminoácidos a mayor agitación la esporulación se inhibe y hay formación de pellets como se muestra en la Figura 10, y a menores condiciones de

agitación hay menor crecimiento, las mejores condiciones para medio casaminoácidos fueron (400 rpm y 0.5 VVM) obteniendo un valor de 2.35×10^8 blastoesporas/mL/h, a las 48 h de fermentación para el medio peptona de colágeno. A mayor agitación (520 rpm, y 1 VVM) *P. fumosoroseus* esporula rápidamente (Figura 11) y es posible obtener una productividad de 0.4×10^8 blastoesporas/mL/h, a las 30 h de fermentación, estos valores se obtienen cuando la concentración del producto ya no aumenta, es decir existe la máxima esporulación sobre el tiempo de fermentación.

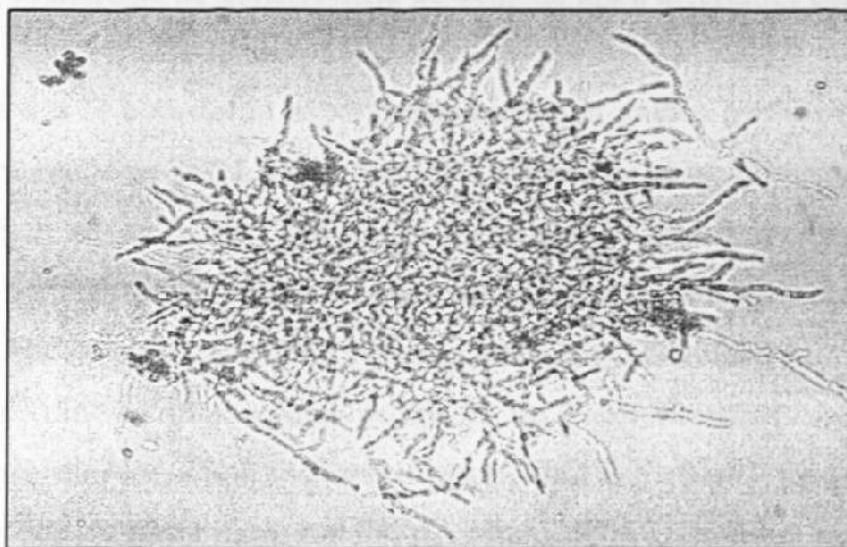


Figura 11. Micrografía de pellets de *P. fumosoroseus* (40 X) obtenidos de fermentaciones a 600 rpm y 0.5 VVM en medio de casaminoácidos.

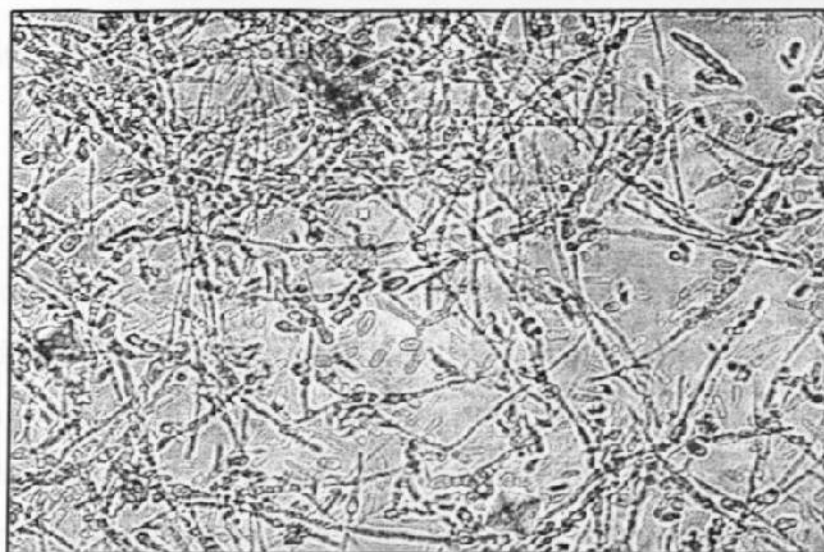


Figura 12. Micrografía de esporas de *P. fumosoroseus* (2 X) obtenidas de fermentaciones a 520 rpm y 1.0 VVM en medio de peptona de colágeno.

Se han reportado que el micelio puede ser usado como un producto bioplaguicida. Eyal y cols (1994), desarrollaron un proceso para producir *P. fumosoroseus*, en cultivo sumergido usando un fermentador de 20 l y lograron obtener 30 g/l de biomasa, en el cual al menos el 80% se formó como micelio filamentoso al mantener la agitación entre 400 - 600 rpm para evitar la agregación de hifas (diseño de impulsores no reportados) y mantener la aireación entre 0.8 y 1.0 VVM.

Evaluación del coeficiente de transferencia de oxígeno k_{La} a diferentes condiciones de fermentación.

Los valores de k_{La} se obtuvieron experimentalmente en ambos medios de cultivos a 28°C en los fermentadores de 5 l, por el método indirecto de desgasificación al inicio de cada fermentación en todas las condiciones mencionadas anteriormente, obteniendo valores de 7.2 h⁻¹ (200 rpm y 0.5 VVM) para las menores condiciones de agitación y aireación hasta 167 h⁻¹ para las condiciones más altas que fue de (600 rpm y 0.5 VVM). En la Tabla 7 se muestran los valores promedio de 3 experimentos evaluados en el medio de casaminoácidos. Los valores típicos de k_{La} para tanques agitados mecánicamente son de 60 h⁻¹ hasta 240 h⁻¹ (Quintero,1981). Cabe mencionar que estos valores fueron obtenidos en un tanque New Brunswick Scientific modelo MF-114 de un volumen nominal de 14 litros, la evaluación se realizó con un volumen nominal de trabajo de 5 l de volumen de trabajo, por lo cual lo denominamos (fermentador no estandar).

Flores (1998), reporta valores de k_{La} obtenidos con los mismos tanques (New Brunswick Scientific modelo MF-114 de un volumen nominal de 14 l pero con un volumen de trabajo de 10 l, donde obtiene a 200 rpm y 1 VVM un k_{La} experimental de 34.3 h⁻¹, estos valores pueden compararse ya que se trabajó con agua potable, la cual presenta una cantidad de sales como nuestro medio en estudio, (medio de casaminoácidos) donde observamos un k_{La} experimental de 11.16 h⁻¹. Si se realizaran estudios con agua destilada obtendríamos valores de k_{La} mayores ya que el agua destilada no contiene sales que puedan inhibir la solubilidad del oxígeno.

Como ya sabemos el k_{LA} está expresado como función de variables de operación y diseño. En la Figura 13 se muestra el efecto de la potencia suministrada sobre el k_{LA} aquí se observa que a medida que aumenta la potencia el k_{LA} aumenta, para la selección de un fermentador es necesario transferir oxígeno con un mínimo de energía posible.

Tabla 7. Valores de k_{LA} obtenidos a diferentes condiciones de agitación y aireación.

Agitación rpm	Aireación VVM	k_{LA} experimental h^{-1}
200	0.5	7.2
200	1.0	11.16
400	0.5	35.6
400	1.0	37.92
520	1.0	115.38
590	1.0	143
600	0.5	167.3

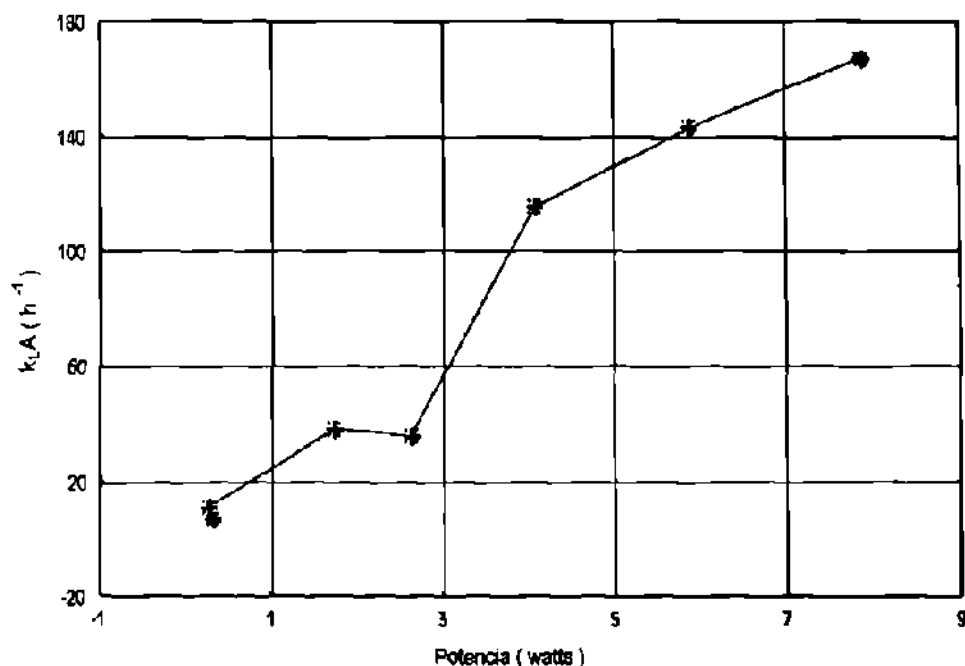


Figura 13. Efecto de la potencia suministrada en fermentador de 14 l (volumen de trabajo 5 l) sobre k_{LA} experimental.

Evaluación de la potencia suministrada a diferentes condiciones de agitación y aireación.

Cuando un fluido en agitación se airea, la potencia consumida por el agitador disminuye. La caída de potencia se expresa como la relación entre la potencia sin airear respecto a la potencia aireada (P_g/P), en esta investigación se realizó un barrido de agitaciones y aireaciones en el dinamómetro de cojinete neumático para determinar la potencia requerida en nuestro proceso de fermentación, (datos anexo 14). Como se observa en la Tabla 8, se muestran los valores de potencia evaluadas sin aireación, aquí los valores de potencia van aumentando conforme aumenta la energía de agitación aplicada al medio de cultivo. En la Figura 14 se observa que al aumentar la aireación la potencia suministrada cae notablemente, y para 200 rpm y 0 VVM es necesario aplicar una potencia de 0.3 watts y de esta manera si aumentamos la aireación a 0.5 VVM tendremos un valor de potencia 0.308 watts, a 1 VVM tenemos un valor de potencia 0.265 watts, a 1.5 VVM tenemos un valor de potencia 0.264 watts y a 2.0 VVM tenemos un valor de potencia 0.272 watts. En esta misma Figura se aprecia el fenómeno de inundación del impulsor donde el agitador es incapaz de dispersar el gas y forma un túnel de aireación, esto sucede bajo ciertas condiciones de agitación a medida que se aumenta el flujo de aire (Galindo, 1993).

En la Tabla 9 se muestran los valores obtenidos de potencia en nuestras condiciones de trabajo, donde se observa que el rango empleado para el medio casaminoácidos fue desde 0.308 watts hasta 7.88 watts. Con estos valores se podrá analizar en que rango de potencia es conveniente trabajar, al compararlo con la productividad del proceso. En la Tabla 9 se muestran los valores obtenidos de potencia en nuestras condiciones de trabajo, donde se observa que el rango empleado para el medio casaminoácidos fue desde 0.308 watts hasta 7.88 watts. Con estos valores se podrá analizar en que rango de potencia es conveniente trabajar, al compararlo con la productividad del proceso.

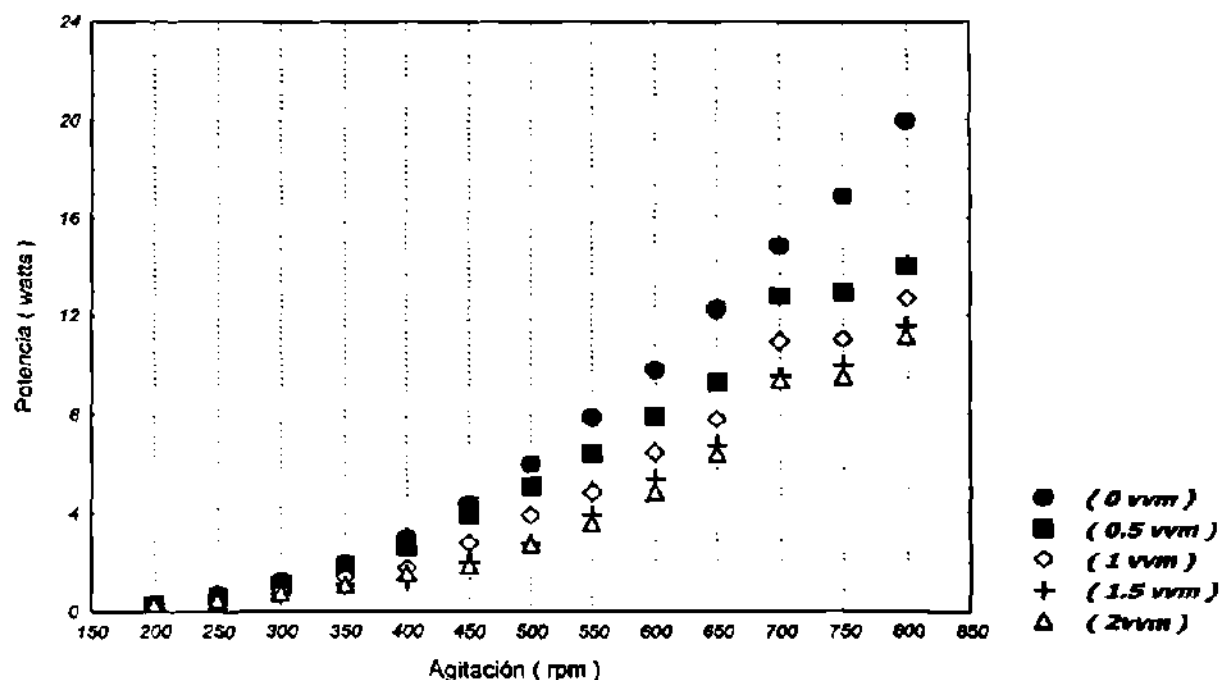


Figura 14. Consumo de potencia en fermentador de 14 l (volumen de trabajo 5 l) a diferentes condiciones de agitación y flujos de aire en medio de casaminoácidos.

Tabla 8. Evaluación de la potencia suministrada sin aireación en el dinamómetro de cojinete neumático.

Aireación VVM	Agitación rpm	Potencia watts	Volumen L
0	200	0.32	5
0	250	0.704	5
0	300	1.241	5
0	350	2.015	5
0	400	3.027	5
0	450	4.416	5
0	500	5.992	5
0	550	7.857	5
0	600	9.784	5
0	650	12.263	5
0	700	14.835	5
0	750	16.914	5
0	800	19.953	5

Tabla 9. Evaluación de la potencia suministrada sin aireación en el dinamómetro de cojinete neumático.

Agitación rpm	Aireación VVM	Potencia watts
200	0.5	0.308
200	1.0	0.265
400	0.5	2.64
400	1.0	1.76
520	1.0	4.087
590	1.0	5.89
600	0.5	7.88

Cinética de consumo de oxígeno.

En la Figura 15 se muestra la cinética de consumo de oxígeno de *P. fumosoroseus*, bajo diferentes condiciones de agitación y aireación, se observa que este microorganismo en el medio casaminoácidos a (400 rpm y 0.5 VVM) agota el oxígeno hasta un 5% de saturación a las 48 h manteniéndose así hasta el final del proceso, donde se presenta la mayor producción de las blastoesporas, mientras que en el medio peptona de colágeno a (520 rpm y 1 VVM) se observa un consumo de oxígeno del 50 % a las 36 h hasta llegar a un 5% a las 48 h, con este medio *P. fumosoroseus* presenta una esporulación más rápidamente cuando está en ausencia de oxígeno.

En la Figura 16 se observa el consumo de oxígeno en las condiciones donde la producción fue más baja en ambos medios, en el medio casaminoácidos (600 rpm, 0.5 VVM) a las 36 h presenta un 90% de saturación y a las 60 h se mantiene en un 50%, debido a que la esporulación del hongo no se vio favorecida, por tal motivo se conserva

el mismo porcentaje de oxígeno hasta el final de la fermentación, mientras en el medio peptona de colágeno (400 rpm y 0.5 vvm) a las 22 h se consume casi el total de oxígeno llegando a un 3% de saturación, el cual aumenta debido a la escasa esporulación de *P. fumosoroseus* que resultó ser hasta un 50% al final de proceso. En estudios anteriores de la Torre y Cárdenas Cota (1996), reportan una producción de 1×10^8 conidias/mL en fermentadores de 6 L (4 L) manteniendo el oxígeno disuelto sobre el 20 % de saturación con el aire; pero en nuestro estudio logramos obtener una concentración de 27×10^6 blastoesporas/mL (medio peptona de colágeno a 520 rpm) sin controlar el oxígeno disuelto presentándose la fase exponencial cuando la saturación de oxígeno llega a un 5% del total disuelto.

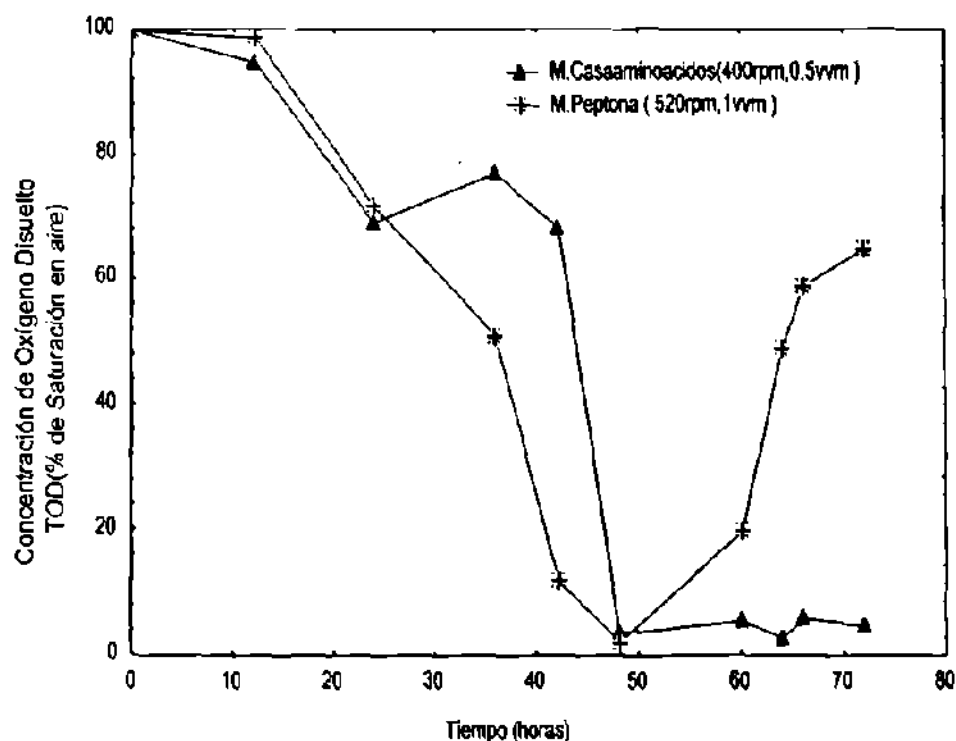


Figura 15. Cinética de consumo de oxígeno de *P. fumosoroseus* en fermentador de 14 l (volumen de trabajo 5 l) bajo condiciones óptimas de producción en los medios de casaminoácidos y peptona de colágeno.

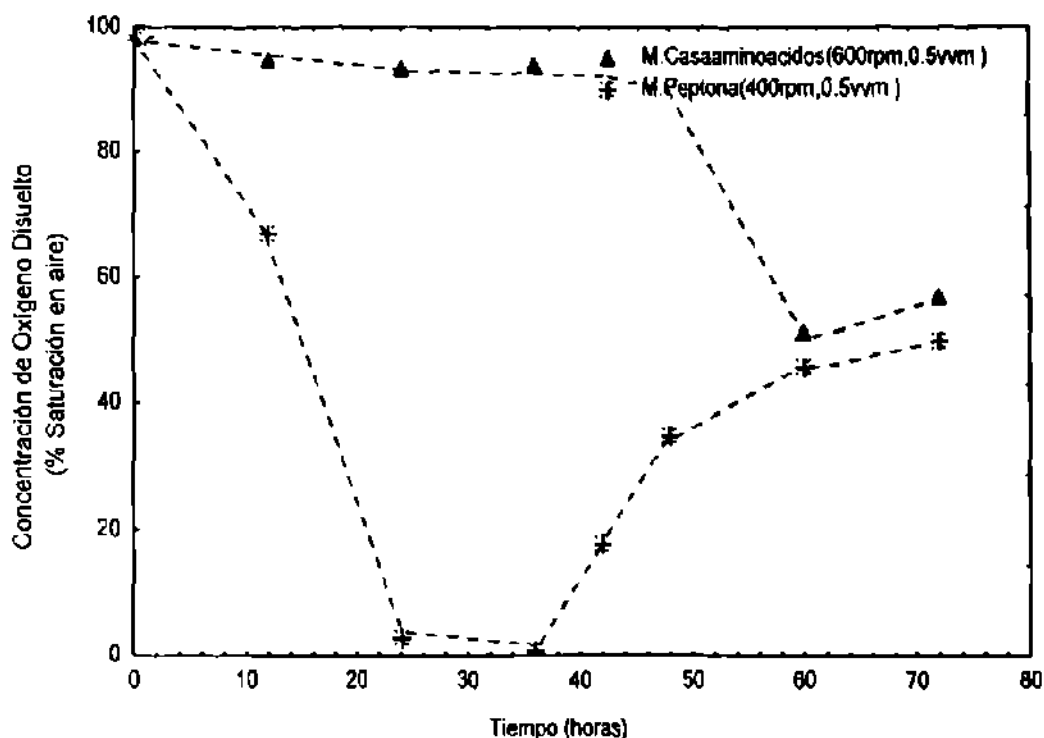


Figura 16. Cinética de consumo de oxígeno de *P. fumosoroseus* en fermentador de 14 l (volumen de trabajo 5 l) bajo condiciones menos óptimas de producción en los medios de casaminoácidos y peptona de colágeno.

Correlación para estimar el k_{La}

Cuando se desea trasladar un proceso de una escala a otra, es necesario usar un criterio específico para lograrlo. Los criterios más usados son parámetros físicos relacionados con las variables de operación. Gran número de trabajos de literatura correlacionan el k_{La} con la potencia volumétrica gaseada y la velocidad superficial. Por ello se estableció la correlación en función de estas variables de proceso. La forma más general reportada por Belmar (1984) en la literatura es la siguiente (Tabla 1):

$$k_{La} = K (Pg/V)^{\alpha} (Vs)^{\beta}$$

En Tabla 10 se muestra la correlación ajustada para estimar el Coeficiente de transferencia de oxígeno, evaluado con los medios en estudio, trabajando a 28° C, la cual presenta un coeficiente de correlación bueno y es de fácil manejo.

Tabla 10. Correlación ajustada para estimar el k_{LA} en fermentadores de 14 l con volumen nominal de 5 l.

Correlación	r^2
$k_{LA} = 69.31 (Pg/V)^{0.81} (Vs)^{1.009}$	0.9834

Flores (1998), reporta una correlación (Tabla 11) obtenida en el fermentadores New Brunswick Sientific modelo MF-114 de un volumen nominal de 14 l (10 l de trabajo), empleando agua potable a 30° C y su coeficiente de regresión lineal.

Tabla 11. Correlación obtenida del fermentador 14 l (10 l de operación) empleando agua potable a 22 °C.

Correlación	r^2
$k_{LA} = 16.39 (Pg/V)^{0.619} (Vs)^{0.635}$	0.987

En la Tabla 12 se presentan la correlación general de 5 y 10 litros utilizando medio Control y agua potable de la variación con la escala en operación de las constantes k y los coeficientes α , β , de las correlaciones para predecir k_{LA} .

Tabla 12. Variación con la escala de operación de la constante K , y los coeficientes α , β de la correlación obtenida para predecir el k_{La} en fermentadores de 5 y 10 l.

Escala	k	α	β
1			
5	69.31	0.810	1.009
10	16.9	0.619	0.635

Quintero 1981, reporta que conforme aumente la escala la constante k debe aumentar, sin embargo este no fue el caso en este estudio ya que la constante aumenta, esto debido a las diferentes relaciones de superficie volumen y de la turbulencia que ocurre en las diferentes escalas, entre los coeficientes α y β hay una ligera diferencia. Otros parámetros que cambian necesariamente con la escala son: la agitación y la aireación, la presión hidrostática, la transferencia de calor, la presión (en el fondo de un tanque industrial puede ser de varias atmósferas, mientras que en fermentadores de laboratorio o piloto la diferencia entre la presión entre la superficie y el fondo es mínima), y por último las condiciones ambientales por los problemas de homogeneidad (los fermentadores pequeños, en general pueden considerarse bien mezclados).

En la Figura 17 se muestra los datos de los valores de k_{La} experimental contra el teórico, en donde podemos observar que existe un rango de trabajo en el cual se puede realizar fermentaciones en volúmenes similares de trabajo entre 7 y 39 h^{-1} , rango en el cual se recomienda trabajos de escalamiento y /o caracterización.

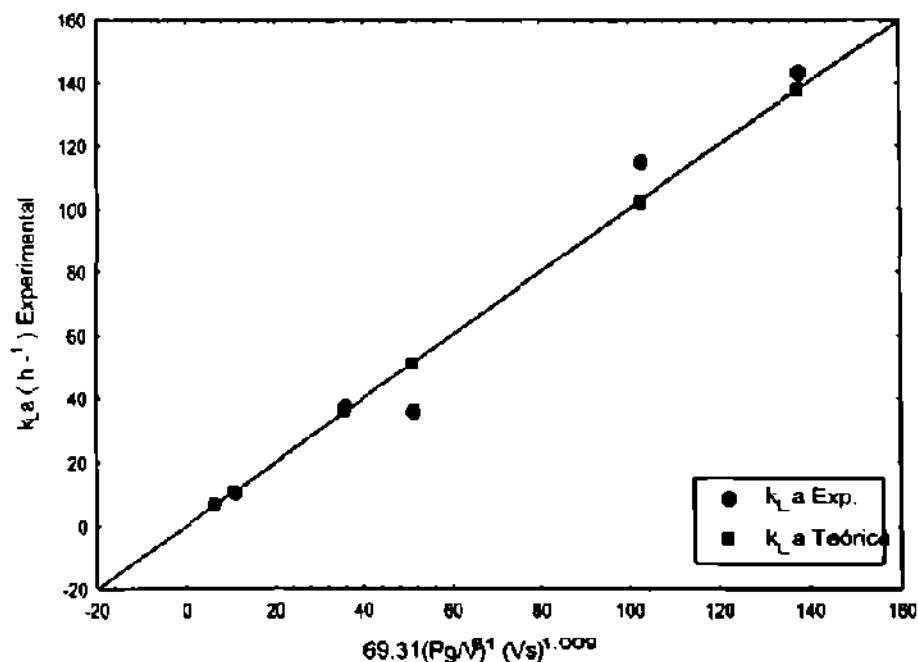


Figura 17. Correlación entre el k_{La} experimental y teórico en función de las variables de proceso en fermentador de 14 l (volumen de trabajo 5 l) usando medio de casaminoácidos.

Efecto del k_{La} y la potencia suministrada sobre la productividad de *P. fumosoroseus*.

En las grafica 18 se observa que conforme aumenta la potencia suministrada, después se indica una influencia marcada en la disminución de la productividad, en el medio casaminoácidos, en esta grafica es posible ver un máximo de 2.64×10^8 blastoesporas mL/h a una potencia suministrada de 2.34 watts, la menor productividad obtenida es de $.9 \times 10^8$ blastoesporas /mL/h a una potencia de 7.8 watts desde el punto de vista de económica energética, es recomendable usar las siguientes condiciones de máxima productividad a bajas potencia requerida. En medio casaminoácidos *P. fumosoroseus* se ve afectado en condiciones de alta agitación y la formación de pellets disminuye la productividad del proceso. Es importante resaltar la obtención de región de escalamiento efectivo que está en un rango de potencia 1.78 watts donde la productividad de *P. fumosoroseus* inicia su aumento de productividad y 3.0 watts antes de que decaiga la productividad, donde la potencia de 2.64 watts representa el valor de escalamiento para nuestro proceso.

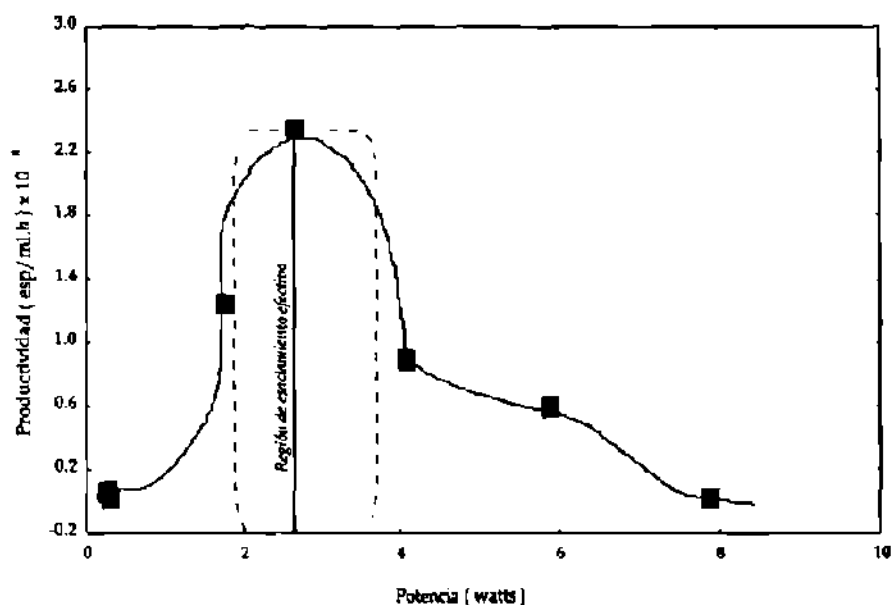


Figura 18. Escalamiento en la producción de blastoespores de *P. fumosoroseus* cepa 612, con base en el cálculo de potencia usando el medio de casaminoácidos.

Son pocos los datos reportados de estudios sobre bioingeniería en la producción de *P. fumosoroseus*. Como se observa en la Figura 19 de productividad vs k_{LA} , se encuentra una máxima productividad al trabajar con k_{LA} de 35 h^{-1} , en la cual se observa una tendencia de disminución de productividad arriba de 60 h^{-1} , hasta llegar a un mínimo de productividad de $.01 \times 10^8 \text{ esp/mL/h}$ a 167 h^{-1} , aquí obtenemos una región de escalamiento entre 15 h^{-1} donde empieza el aumento de productividad hasta un valor no mayor de 37 h^{-1} donde cae la productividad del proceso. En este medio el fenómeno de transferir oxígeno a la célula es relativamente bajo, es decir, la actividad respiratoria del microorganismo no se ve afectada con la eficiencia de nutrientes y oxígeno a la célula. Lo anterior debe considerarse para la obtención no solo de una concentración celular de blastoespores sino de una alta productividad del proceso.

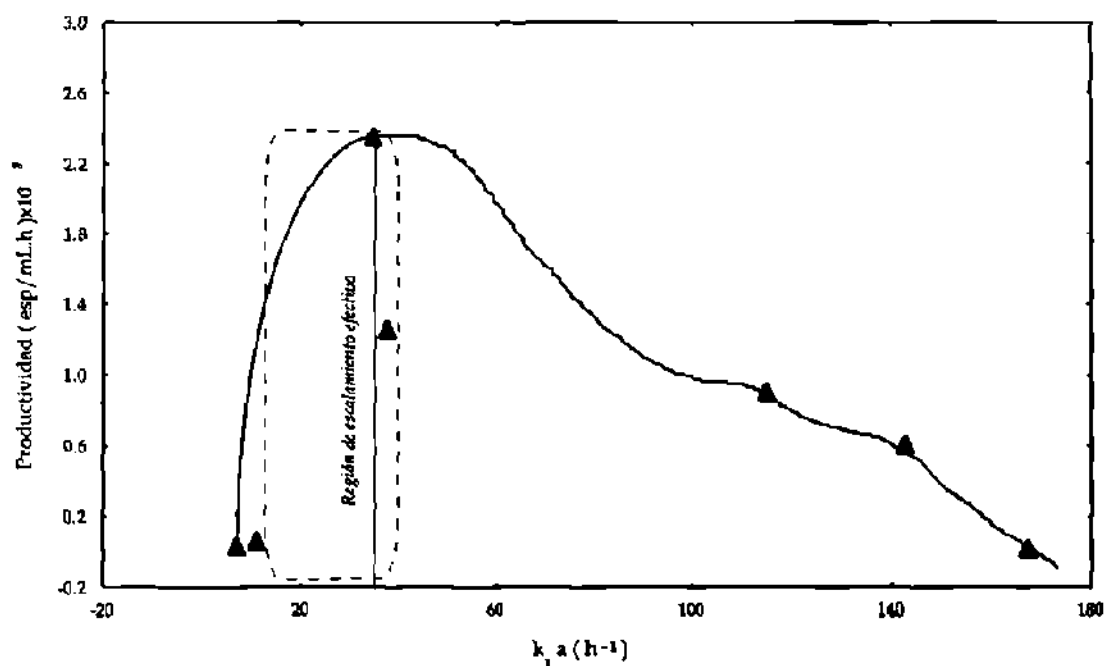


Figura 19. Escalonamiento en la producción de blastoesporas de *P. fumosoroseus* cepa 612, con base en el cálculo del k_{La} usando el medio de casaminoácidos.

En la Figura 20 se observa el efecto de la potencia suministrada sobre la productividad de *P. fumosoroseus* en medio peptona de colágeno, donde se observa una productividad de 0.4 (blastoesporas/mL/h) x 10⁸ a una potencia de 4.09 watts, aquí el rango de trabajo es entre 3 watts pero no mayor de 4.1 watts, en este medio *P. fumosoroseus* tiene una rápida esporulación en el cual, el caldo de fermentación se hace más viscoso por la formación de micelio y esporas por lo que la potencia requerida es mas alta. La actividad respiratoria por parte del sistema microbiano es relativamente alta, lo cual la capacidad de transferir oxígeno y nutrientes en este medio es más difícil, el k_{La} requerido para *P. fumosoroseus* en este medio para obtener una máxima productividad es de 115 h⁻¹, nuestro rango de trabajo (Figura 21) está entre 100 y 120 h⁻¹.

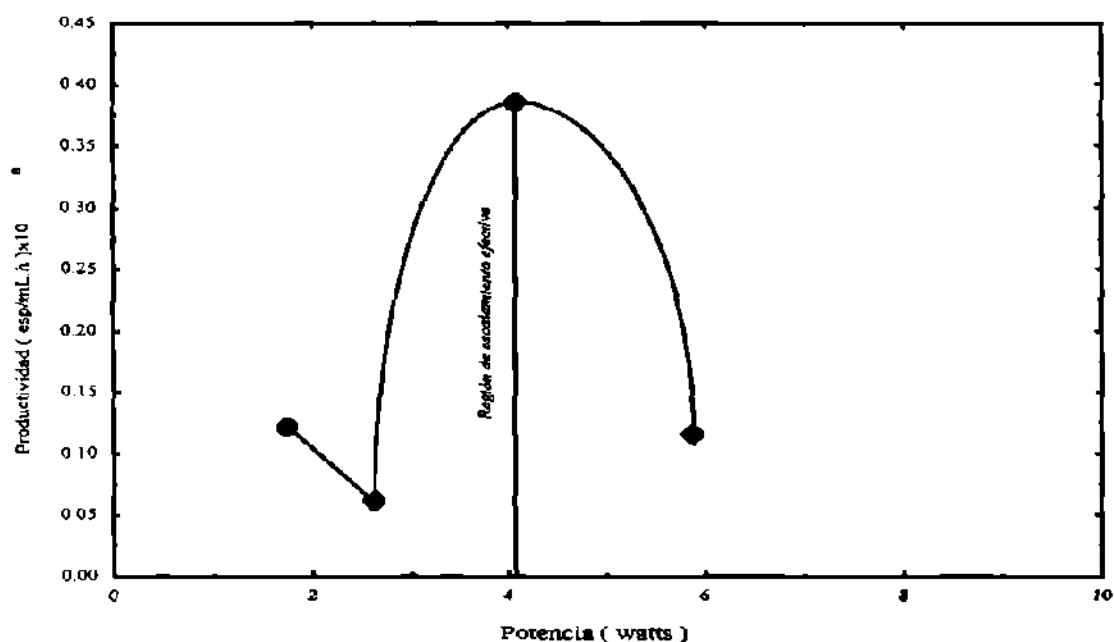


Figura 20. Escalamiento de la producción de blastoesporas de *P. fumosoroseus* cepa 612, con base en el cálculo de potencia usando el medio de peptona de colágeno.

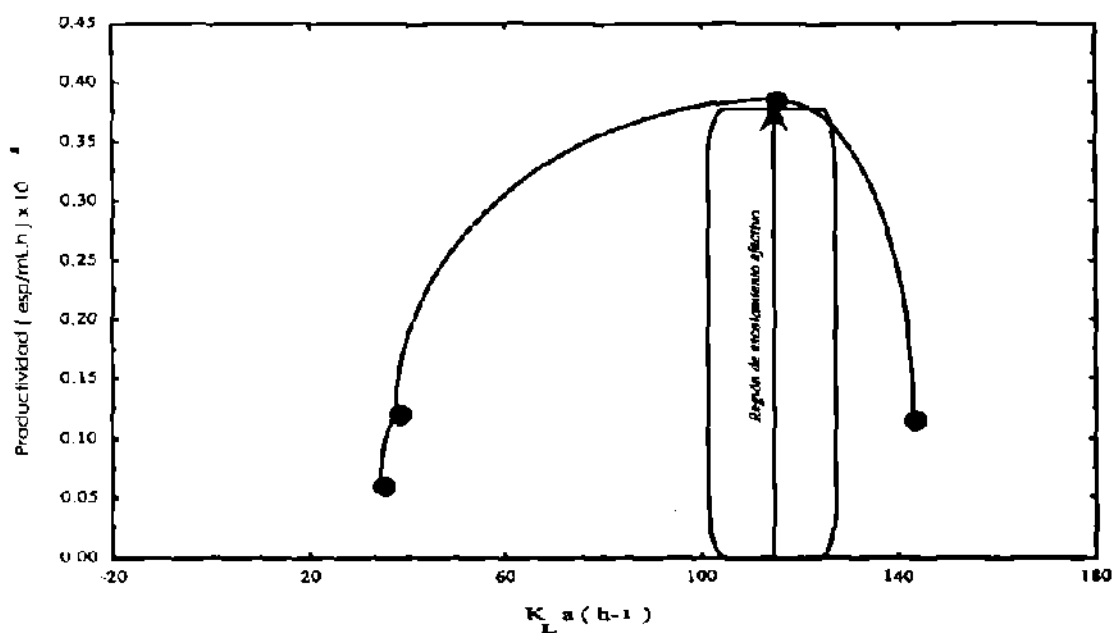


Figura 21. Escalamiento de la producción de blastoesporas de *P. fumosoroseus* cepa 612, con base en el cálculo del $k_L a$ usando el medio de peptona de colágeno.

Los resultados obtenidos muestran que el escalamiento del proceso y la evaluación de las condiciones físicas de proceso, tales como la potencia consumida y el k_La favorecieron nuestro extracto conservando su vida de anaquel a un periodo más largo, los cuales son datos determinantes para llevar nuestro proceso a otros niveles de producción. Por otra parte se amplió nuestra perspectiva de estudio en donde se pueden resolver problemas atacando parámetros físicos independientes del sistema de fermentación como el mezclado del medio de cultivo, capacidad de dispersión del aire, transferencia de calor, dinámica del fluido alrededor de los impulsores, así como parámetros dependientes del sistema de fermentación, como el crecimiento y secreción del producto, daños al microorganismo, así como sus cambios morfológicos. Finalmente, la hipótesis de nuestro trabajo se cumplió por el hecho de haber encontrado condiciones de operación óptimas para el proceso de producción en fermentadores de 14 litros, obteniendo criterios de escalamiento basados en la potencia suministrada (watts) y k_La (h^{-1}) y poder aplicar estos en escalas a nivel industrial.

CONCLUSIONES

1. Se logra obtener a nivel matraz en el medio de casaminoácidos a una concentración de blastoesporas /mL final de 7.28×10^8 y en el medio de peptona de colágeno se logra una producción final de 4.8×10^8 blastoesporas/mL.
2. Se obtuvo una producción de 13×10^8 blastoesporas/mL en el medio de casaminoácidos a 400 rpm y 0.5 VVM, y en el medio peptona de colágeno una producción de 27×10^8 blastoesporas/mL a 520 rpm y 1 VVM.
3. Se logro la máxima productividad para medio de casaminoácidos de 2.64×10^8 blastoesporas /ml./h con una potencia suministrada de 2.34 watts y un $k_L a$ de 7.2 h^{-1} .
4. Se logro la máxima productividad para el medio de peptona de colágeno de 0.385×10^8 blastoesporas /ml.h con una potencia suministrada de 4.09 watts y un $k_L a$ de 115 h^{-1} .
5. Para el medio de casaminoácidos la mejor condición de operación fue (400 rpm y 0.5 VVM) donde se obtuvo la una productividad de 2.64×10^8 blastoesporas /ml/h en el medio.
6. Para el medio de peptona de colágeno, la mejor condición de operación fue (520 rpm y 1 VVM) donde se mejoro la producción de las blastoesporas superando a las del medio de casaminoácidos.
7. Se obtiene una región efectiva de escalamiento para la productividad *P. fumosoroseus* en el medio de peptona de colágeno (potencia 3.0 watts - 4.1 watts) y ($k_L a$ 100 h^{-1} - 120 h^{-1}).
8. Se obtiene una región efectiva de escalamiento para la productividad *P. fumosoroseus* en el medio casaminoácidos de (potencia 1.78 watts -3 watts) y ($k_L a$ 15 h^{-1} - 37 h^{-1}).

PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

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

1. Realizar un estudio reológico para observar el esfuerzo de corte sobre las esporas y el micelio.
2. Utilizar los criterios de operación expuestos para abordar el problema de reproducibilidad a otros niveles.
3. En cuanto al fenómeno de transferencia de oxígeno y potencia suministrada muestra una oportunidad amplia de investigación para definir el criterio de escalamiento del proceso, empleando los medios de cultivo estudiados así como el microorganismo en cuestión.
4. Realizar estudios de morfología del microorganismo durante los procesos de fermentación.
5. Estudiar mas ampliamente el perfil de oxígeno para elevar la productividad o mantenerla constante (por agitación).
6. Realizar bioensayos con los extractos obtenidos de las diferentes condiciones para determinar su toxicidad.
7. Es importante extender nuestra visión de trabajo en cuanto a los procesos de producción a nivel planta piloto, los cuales nos conducirán a la obtención de nuevas perspectivas de escalamiento.

LITERATURA CONSULTADA

1. Agudelo, F. and L. Falcón. 1983. Mass production, infectivity and field applications studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 42: 124-132.
2. Aiba, S. A.E. Humphrey y M. W. Thring. 1973. Pilot plant models and scale up methods, McGraw-Hill, Nueva York.
3. Atkinson, B.; and Mavituna, F. 1991. Stoichiometric aspects of microbial metabolism. Microbial activity, gas-liquid mass transfer. *Biochemical Engineering and Biotechnology Hand book*, Second Edition. Stockton Press. USA. Cap. 3, 4 y 9.
4. Barlett, MC. And ST. Jaronski. 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. In: *Fungi in Biological Control Systems*, Manchester University Press, Manchester, UK.
5. Belmar, M. T. 1984. Revisión Bibliográfica, análisis y evolución sobre la aplicación de los criterios de escalamiento en fermentaciones aerobias. Tesis de Licenciatura. Ingeniería de Alimentos. Facultad de Estudios Superiores. Cuatitlán Izcalli. UNAM. México. Pp: 8-74.
6. Bidochka, MJ., Pfeifer TA. Khachatourians GG. 1987. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. *Mycopathologia*. 99: 77-83.
7. Biobest Sistemas Biológicos. [on line] <http://www.biobest.be/sp>

8. Biodochka, M. J; Low, N. H. & Khachatourians, G. G. 1990. Carbohydrate storage in the entomopatogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology. 56 (10): 3186-3190.
9. Bolckmans, K., Sterk, G., Eyal, J., Sels, B., and Stepman, W. 1995. PreFeRal, (*Paecilomyces fumosoroseus* strain Apopka 97), a new microbial insectide for the biological control of whiteflies in greenhouse. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent. 60: 713 – 717.
10. Brown, D. E. 1977. The measurement of fermenter power input. Chemical Industrial. 16 August: 684-688.
11. Büchs, J., Maier, U., Milbradt. C. 2000. Power consumption in shaking flaks on rotary shaking machines: 1. Power consumption measurement unbaffled flasks at low liquid viscosity. Biotechnology and Bioengineering. 68, No (6). June 20.
12. Calam. C. T. 1986. Shake flaks fermentations. In: Demain AL, Solomon NA. Editoris. Manual of industrial microbiology and Biotechnology. Washington, D.C: American Society for Microbiology. Pp: 59-65.
13. Carruthers, I. R., and Hural K. 1990. Fungi as natural occurring entomopathogens. New Directions in Biological Control: Alternatives for Supressing Agricultural Pest and Diseases 115-138 pp. Alan R. Liss , Inc.
14. Casas, R. 1993. La investigación biotecnológica en México: tendencias en el sector agroalimentario. Colección Problemas Nacionales. Instituto de Investigaciones Sociales. UNAM. México.
15. Chapple, A. C., R. A. Downer, T. M. Wolf, R. A. Taylor, F. R. Hall. 1996. The application biological pesticides: limitations an practical solution.

16. Charnley, A. K., 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships. Wicklow/Soderström (Eds.) Pp:185-201.
17. Chatwin, S. and Nienow, A. W. 1985. Successful power measurement in agitated vessels. Laboratory, Science and Technology. (September): 19.
18. Clark, D. S. 1962. Submerged citric acid fermentation of ferrocyanide-treated beet molasses: morphology pellets of *B. bassiana*. Microbiology. 8: 133-136.
19. Cliquet, S. MA. Jackson. 1999. Influence of conditions on production and freeze-drying tolerance of *Paecilomyces fumosoroseus* blastospores. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 23: 97-102.
20. Cooper, C. M., Fernstrom, G. A., and Miller, S. A. 1994. Performance of agitated gas liquid contactors. Industrial Engineering. Chemical 36(6). Pp 504-509.
21. Cui, Y. Q., R. G. J. M. VanderLans. 1997. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical force on fungal morphology in submerged fermentation. Biotechnology and Bioengineering. 57. (4) Pp: 409-419.
22. Deacon, J. W. 1984. Aspect of microbiology 7: microbial, control of plant pest and diseases. Van Nostrand Reinhold. UKO Co. Ltd. Pp 31-42.
23. Eyal, J., Walter, J. F., Osborne, L., and Landa, Z. 1994. Method for production and use of pathogenic fungal preparation for pest control. United States Patent Number 5: 360 - 607.
24. Eyal, J., Walter, J. F., Osborne, L., & Landa, Z. 1994. U.S. Patent 5,360,607.

25. Feng, M. G.; Paprowski, T. J. And G. G. Khachatourians. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control; current status. *Biocontrol Science and Technology*. 4 : 3-34.
26. Galindo, E. 1996. (A) Selección y diseño de fermentadores a varias escalas, En: Escalamiento de Procesos Biotecnológicos, Quintero, R. y López-Mungía A. (Eds). Universidad de las Naciones Unidas, Tokio. En prensa.
27. Galindo, E. F. 1993. (B) Mezclado y Transferencia de Oxígeno en Fermentadores. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, México. Pp: 2-9.
28. García, G.C.; Hernández, V.V.; Segovia, V. e H. Medrano. 1997. Producción de conidia-esporas de *Beauveria bassiana* en medios líquido y su evaluación en larvas de *Epilachna varivestis*. XX Congreso Nacional de Control Biológico. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. Pp: 37-38.
29. Giuseppin, M. L. F. 1984. Effects of dissolved oxygen concentration on lipase production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 20: 151-165.
30. Hajek, A. E. & St. Leger, R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology*. 39: 293-322.
31. Hallsworth, J. E. & Mangan, N. 1994. Improved biological control by changing polyols/trehalose in conidia of entomopathogens. In: Proceedings-Brighton Crop Protection conference, Pest and Disease. 3:1091-1096. BCPC Publications.
32. Hernández-Rosas, F. y Alatorre, R. R. 2000. Crecimiento y esporulación de *Beauveria sp.* en substratos con diferente actividad de agua. XXIII Congreso Nacional de Control Biológico. Symposium: Control Biológico. Guanajuato, Gto. pp. 70-72.

33. Herrera, L. E., Larqué, A. S. 2001. La biotecnología en el sector agrícola. Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI Retos y Oportunidades. CONACYT. México. Pp 147-163.
34. Humphreys, A.M.; P. Matewelw y P.J. Trinci. 1990. Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*. Transaction Mycological Research. **94**: 1040 - 1050.
35. Inch, J.M.M.; Humphreys, A.M.; Trinci, A.P. and A.T. Gillespies. 1986. Growth and blastospores formation by *Paecilomyces fumosoroseus*, a pathogen of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). British Mycology Society. **87**: 215 - 222.
36. Información Agrícola. [on line] <http://www.infoagrio.com>
37. Jackson , M. A., Mc. Guire, M. R., Lacey L. A., Wraight, S. P. 1997. Liquid culture production of disiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Transaction of the British Mycological Society. **101** (1): 35-41
38. King, R. L., Hiller, R. A. And Tatterson, G. B. 1981. Power consumption in mixer. A. J. Ch. E. J. **34** (6): 506-509.
39. Kubul, R., Nienow, A.W. and Allsford, K.V. 1983. A multipurpose stirred tank facility for flow visualization and dual impeller power measurement, Chemical Engineering Community. **22**: 29-39.
40. Lisansky, S. G. & Hall, R. A. 1983. In. The Filamentous Fungi **4**. London:Edward Arnold. pp. 327-345.

41. López, E. V., Chavarria, N. H. Fernández, P. S. 2000. Fermentation process for bioinsecticide production. An overview Recent Research Development. *Biotechnology and Bioengineering*. 3: 1-20.
42. Mangenot, F. Reisinger O. 1976. Form and function of conidia as related to their development. In: Weber D.J. Hess W.M., eds. *The Fungal Spore, Form and Function*. New York; Wiley: 789-847.
43. McDaniel, L.E., Baeiley, E.G., Zimmerli, A. 1965. Effect of oxygen supply rates on growth of *Escherichia coli*. I. Studies in unbaffled shake flasks. *Applied Microbiology*. 13: 109.
44. Michael, B. J. And Miller, S. A. 1962. Power requerimients of gas-liquid agitated systems, *A. J. Ch. E. J.* 8(2): 262- 266.
45. Middleton, J. C. 1985. Gas-liquid dispersion and mixing. In: *Mixing in the process industries*. Harnby, N., Edwards, M. F., Nienow, A. W. (Eds) Butterworths, London. Pp: 322-355.
46. Nienow A.W. and Miles, D. 1969. A dynamometer for the accurate measurement of mixing torque, *Journa of Science Institute. (Journal Physics E) Series 2*, 2: 994-995.
47. Nienow A.W. Chatwin, S., Xueming, Z., Kent, C.A. and Dawson, M. 1989. The development of strain gauging for power measurement in stirred bioractors: philosophy and some initial results, In: *Procc. Int. Workshop on Bioreactor Performance*, OGBT Graz, Australia, Pp: 164-165.
48. Ohyama, Y. And Endoh, K. 1955. Power characteristic of gas-liquid contacting mixers, *Journal of Chemical Engeenering Japanese*. 19: 2-5.

49. Oosterhuis, N. M. G. And Kossen, N. W. F. 1981. Power input measurements in a production scale bioreactor. *Biotechnology Letters*. 3(11): 645-650.
50. Quintero, I.Z. 2001. Producción en diferentes medios de cultivo y sobrevivencia de las blastosporas de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith (Deutomycotina: Hyphomycetes). Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. Pp. 57.
51. Quintero, R. 1981. Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones. Alambra, México. Pp. 81-291
52. Rainer, B.W. 1990. Determination methods of the volumetric oxygen transfer coefficient k_{La} in bioreactors. *Chemical Biochemical Engineering*. 4(4). Pp 185-196.
53. Resendiz, R, Martinez, A., Ascario, and Galindo, E. 1991. New pneumatic bearing dinamometer for power input mesurement in stirred tanks. *Chemical Engeneering and Technology*. 14: 105-108.
54. Roberts,D.W.,R.A. 1989. World picture of biological control of insects by fungi. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil*. 84, Sup. III, Pp:89-100.
55. Roberts,D.W.,R.A. Humber. 1981. Entomogenous Fungi. In: Cole, G.T., B.Kendrich (Eds): *Biology of conidial fungi*. New York, Academic Press.
56. Roberts,D.W.,R.A., J.R. Fuxa., R. Gaugler., M.Goettel., R.Jaques y J. Maddox.1991. Use of pathogens in insect control. En: D. Pimentel (ed. *Handbook of pests management in agriculture*, 2nd. Ed. 2 CRC Press. Boca Raton, Fl. Pp:243-278.

57. Rocha, V. J. 1999. Efecto de la configuración impulsor-difusor sobre el cultivo tetrafásico de *Trichoderma harzianum*. Tesis de Maestría Post-grado en Biotecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
58. Rodgers, P.B. 1993. Potential of biopesticidas in agriculture. *Pesticides Science*. 39:117-129.
59. Rombach, M.C. 1989. Production of *Beuveria bassiana* (Deuteromycotina Hyphomycetes) sympoduloconidia in submerged culture. *Entomophaga*; 34: 45-52.
60. S. Aiba, A. E. Humprey y N.F. Mills. 1973. *Biochemical Engineering*, 2ª Ed., Academic Press, Nueva York.
61. Sakurai, A., Imai, H. 1992. Effect of operational conditions on the rate of citric acid production by rotating disk contactor using *B. Bassiana*. *Fermentation Bioengineering*. 73: 251-254.
62. Salvador, M. 1983. Escalamiento de procesos de fermentación. *Memorias del Curso de Ingeniería Bioquímica, CEINGEBI/UNAM*. Pp: 1-22.
63. Silman, R.W., R.J. Bothastand and DA Schisler. 1993. Production of *Colletotrichum truncatum* forseas a mycoherbicide: effects of culture, drying and storage on recovery and efficacy. *Biotechnology Advances*. 11: 561 - 575.
64. Smith, P. 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potencial of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticiede. *Biocontrol News Information*. 14: 71-78.

65. Torres, S. E., and Cárdenas, C. H. M. 1996. Producción y comercialización de hongos entomopatógenos en Sinaloa. En "XIX Congreso Nacional de Control Biológico: Memorias". Sociedad Mexicana de Control Biológico. Pp: 21-22
66. Valenzuela, L. E. 1987. Microorganismos entomopatógenos; su aprovechamiento en el control de insectos plaga. 1 Edición. Editorial Silva Castillejo. México. Pp: 15-26.
67. Vázquez, E.J. 1995. Efecto de las mamparas sobre el consumo de potencia en recipientes agitados mecánicamente. Tesis de licenciatura en Ingeniería Química. UAEM, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, México. Pp.7-33.
68. Vidal C., Fargues, J., Lacey, L. A., & Jackson, M. A. 1998. Mycopathologia, 143: 33-46.
69. Wilson, F. and C.B. Huffaker. 1976. The philosophy, scope and importance of biological control.. In: C.B. Huffaker y P.S. Messenger (eds.), Theory and practice of biological control. Academic Press, N.Y. (1) Pp: 3-15
70. Winkler, M. A. 1993. Tratamiento biológico de aguas de desecho, 2º Edición. Editorial LIMUSA. México. Pp: 72-81.
71. Zetelak, K., Vas, K. 1968. The role of aeration and agitation in the production of glucose oxidase in submerged culture. *Biotechnology Bioengineering*. 10: 45-49.

ANEXO 1

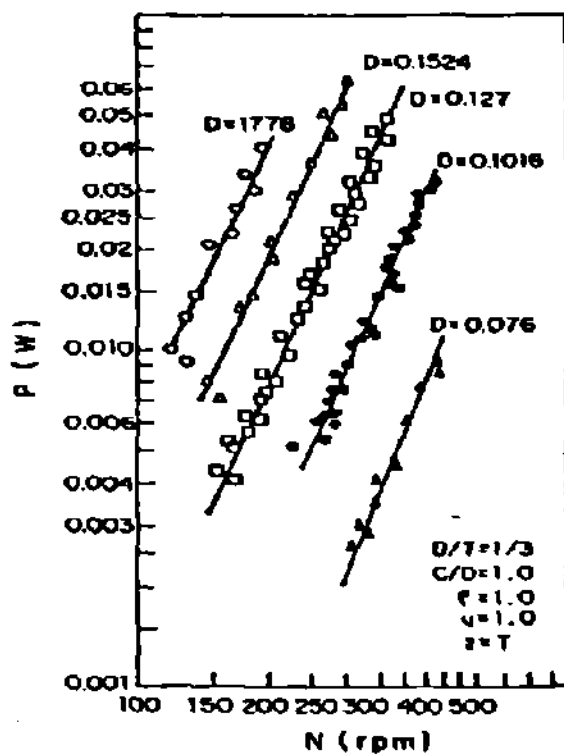
Diferentes criterios para cambio e escala en tanques geoméricamente similares, con medio y propiedades físicas constantes ($N_{Re} > 10^4$, $N_p = \text{constante}^*$)

Criterio	Relación	Relación
Potencia por unidad de volumen constante	$P/V \propto (N^3 D^3)$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{2/3}$
Flujo proveniente del impulsor por unidad de volumen constante	$Q/V \propto N$	$\frac{P_1}{P_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^5$
Velocidad tangencial constante	$\pi ND = K'$	$\frac{N_1}{N_2} = \frac{D_2}{D_1}$
N_{Re} similar	$N_{Re} \propto ND^2$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^2$
Tiempo de mezclado igual	$t = t_M N^{3/4} D^{-1/4}$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{1/4}$
k_L constante	$k_L \propto (ND)^{2\alpha-1}$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^{\frac{2\alpha-1}{\alpha}}$
k_L a constante	$k_L \propto \left(\frac{P}{D^3}\right)^\alpha$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{2/3}$
k_L a constante	$k_L \propto \left(\frac{P}{D^3}\right)^\alpha V^\beta$	$\frac{N_1 \alpha_1}{N_2 \alpha_2} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^{\beta/3} \left(\frac{D_2 \alpha_2}{D_1 \alpha_1}\right)^{2/3}$
$\alpha \neq K \quad \beta = K$		

* N_p = número de potencia

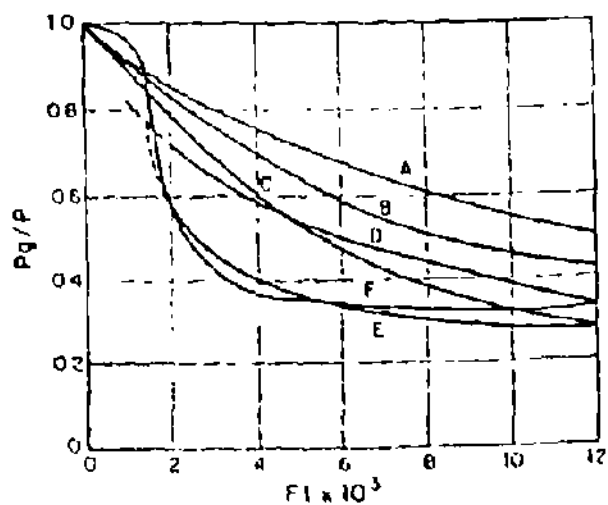
ANEXO 2

Potencia consumida por impulsores con una relación D/T constante



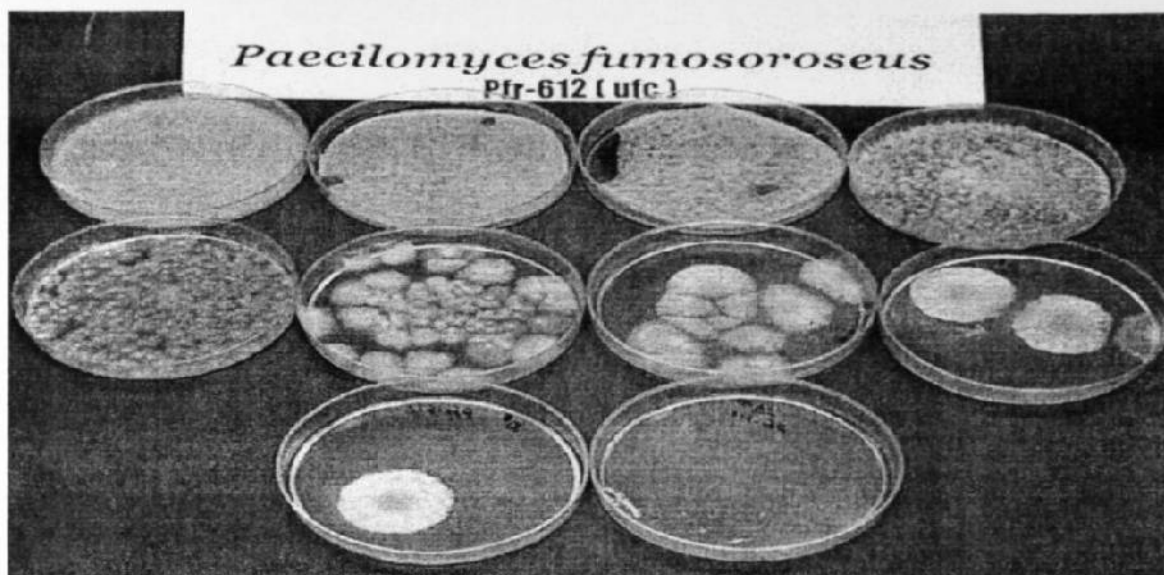
ANEXO 3

Grafica de Ohyama y Endoh



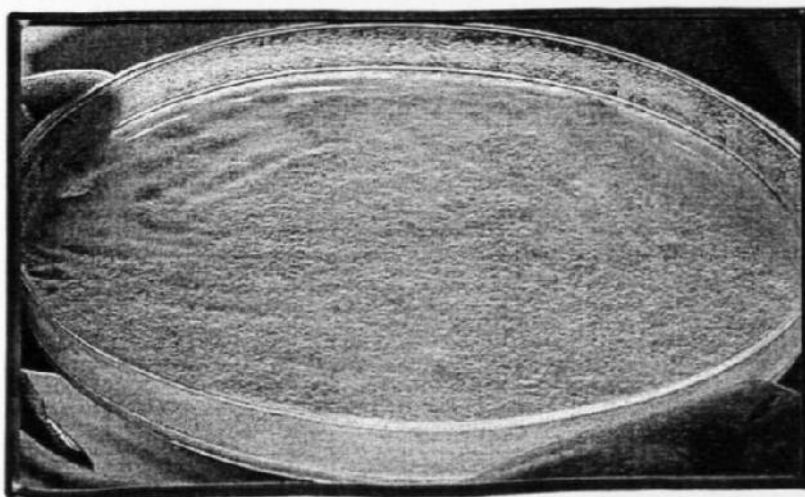
ANEXO 4

Crecimiento de *Paecilomyces fumosoroseus* cepa 612 (Dilución $10^0 - 10^9$)



Anexo 5

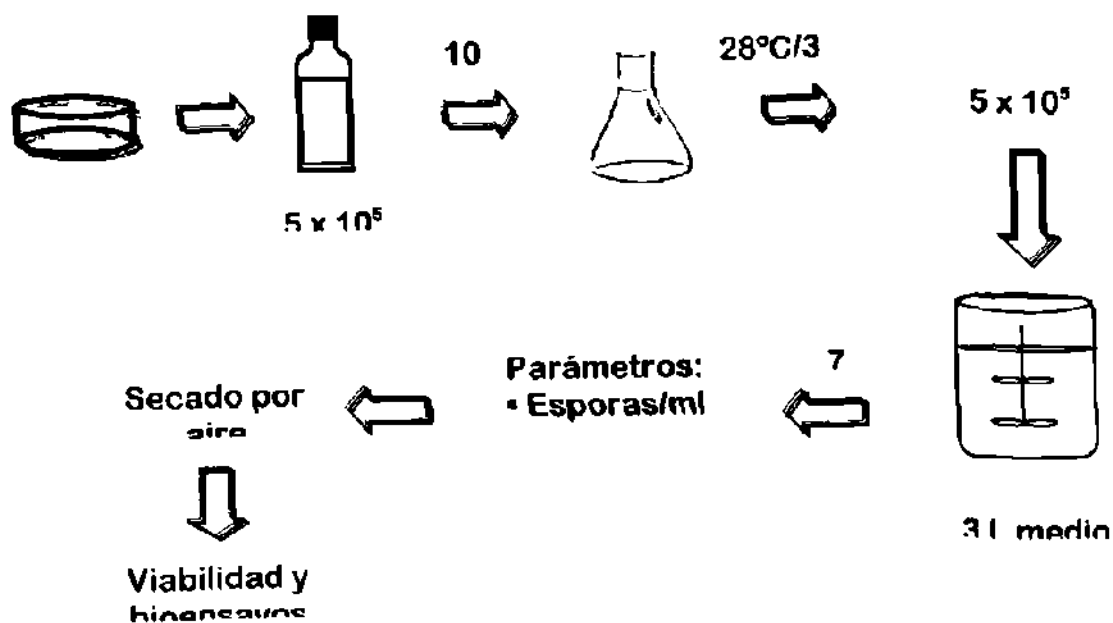
Paecilomyces fumosoroseus cepa 612 (21 días de incubación a 28°C)



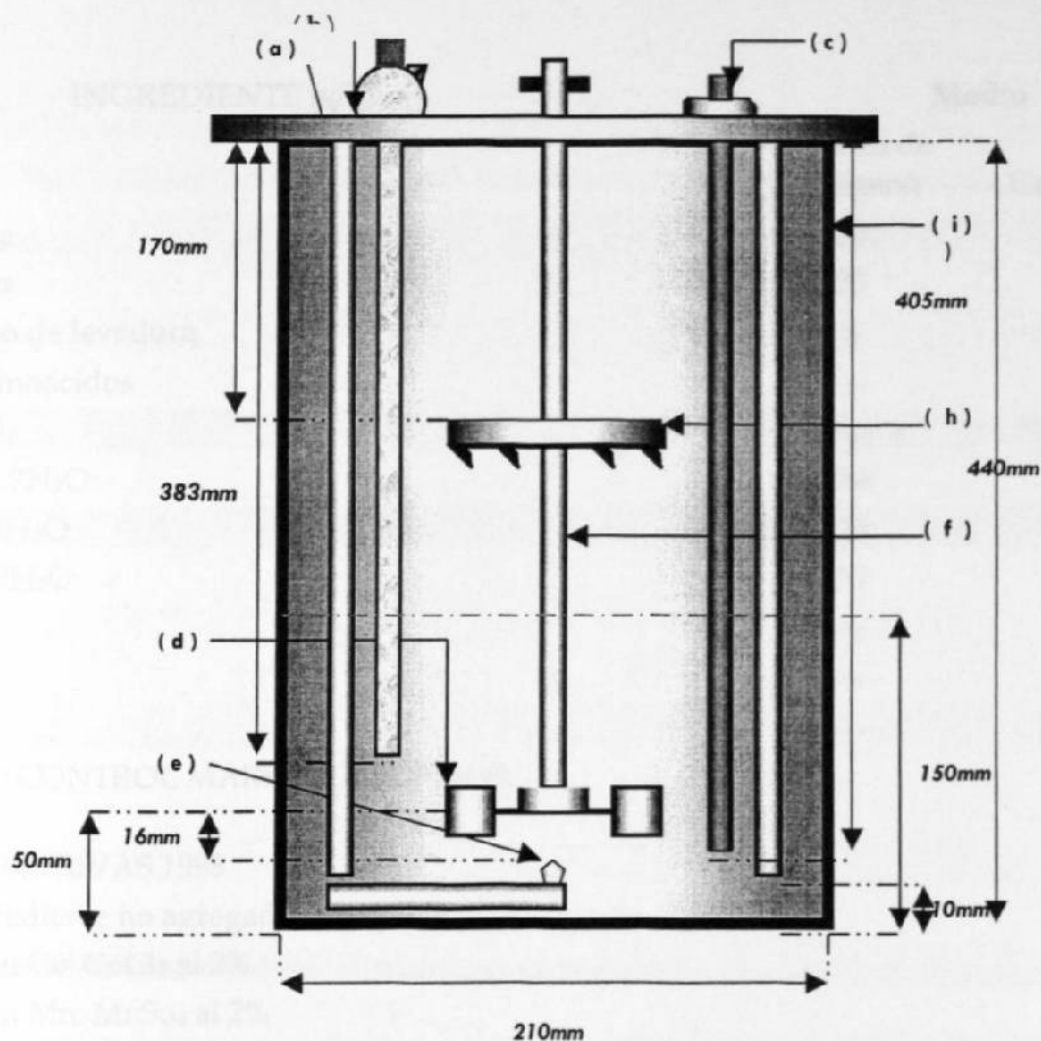
ANEXO 6

Preinoculo Pfr en medio control (de 5×10^5 blastoesporas / mL)

Preparación del preinóculo



ANEXO 7



Esquema de la disposición geométrica del fermentador que se utilizó para la caracterización del fermentador de 5 litros: (a) mamparas, (b) electrodo pH, (c) electrodo oxígeno, (d) impulsor, (e) difusor de aire, (f) flecha de agitación, (h) Eliminador de espuma, (i) jarra del biorreactor.

ANEXO 8

COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO ESTUDIADOS

INGREDIENTE (g/L)	Medio	
	Peptona de Colágeno	Casaminoácidos
Glucosa	80	80
Peptona	25	—
Extracto de levadura	5	—
Casaminoácidos	—	25
KH_2PO_4	4	4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.6	0.6
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.8	0.8
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	0.1
CoCl_2	—	0.02
MnSO_4	—	0.02
ZnSO_4	—	0.02
MEDIO CONTROL MARK JACKSON et al. 1996		
MEDIO C. RIVAS 1998.		
— Ingrediente no agregado		
Solución Co: CoCl_2 al 2%		
Solución Mn: MnSO_4 al 2%		
Solución Zn: ZnSO_4 al 2%		

ANEXO 10

Integración de la ecuación de transferencia de oxígeno disuelto

$$(dC/dt) = k_L a (C_g^* - C_L) \dots\dots\dots 1$$

Despejando y reacomodando la ecuación 1 se tiene:

$$(dC)/(C_g^* - C_L) = k_L a dt \dots\dots\dots 2$$

Integrando definitivamente de C_1 a C_2 la ecuación 2 se obtiene:

$$\int_{C_1}^{C_2} (dC) / (C_g^* - C_L) = \int k_L a dt \dots\dots\dots 3$$

$$\text{si } \int (dC) / (C) = \ln C$$

donde:

$$C = C_g^* - C_L$$

$$dC = 0 - dC_L$$

$$\text{y la } \int dC = C$$

Ayres y Mendelson (1991)

entonces la ecuación 3 se transforma en:

$$-\int_{C_1}^{C_2} (-dC) / (C_g^* - C_L) = k_L a \int dt$$

la solución de la integral definida es:

$$-\ln [C_g^* - C_L]_{C_1}^{C_2} = k_L a(t)$$

$$\ln [C_g^* - C_L]_{C_1}^{C_2} = -k_L a(t)$$

$$\ln (C_g^* - C_2) - \ln (C_g^* - C_1) = -k_L a(t)$$

$$\text{si } \ln ((x)/(y)) = \ln (x) - \ln (y)$$

la solución de la ecuación 3 (integral definida) es:

$$\ln ((C_g^* - C_2)/(C_g^* - C_1)) = -k_L a(t)$$

ANEXO 11

Curva de ajuste. A menudo, en la práctica se encuentra que existe una relación entre dos o más variables, y se desea expresar esta relación en forma matemática, determinando una ecuación que conecte las variables.

Regresión. Uno de los propósitos principales de la curva de ajuste es estimar una de las variables (la variable dependiente) de la otra (la variable independiente). El proceso de estimación se conoce como regresión. Si y se va a estimar a partir de x por medio de alguna ecuación, la llamamos ecuación de regresión de y sobre x y a la curva correspondiente, curva de regresión de y sobre x .

Método de mínimos cuadrados. Generalmente, más de una curva de un tipo dado parece ajustar un conjunto de datos. Para evitar el juicio individual en la construcción de rectas, parábolas, u otras curvas de aproximación, es necesario obtener una definición de la "mejor recta de ajuste", "mejor parábola de ajuste", etc.

De todas las curvas de aproximación de un conjunto de puntos de datos, la curva que tenga la propiedad de que

$$d_1^2 + d_2^2 + \dots + d_n^2 = \text{mínimo}$$

por definición, es la mejor curva de ajuste (Spiegel, 1988 y Maisel, 1973).

siendo " d_i " la distancia vertical entre el punto (x_i, y_i) y la curva propuesta. Una curva con esta propiedad se dice que ajusta los datos en el sentido de mínimos cuadrados y se llama curva de regresión de mínimos cuadrados o simplemente curva de mínimos cuadrados.

Línea de regresión. Si la curva que se propone es una recta, la distancia vertical del punto (x_1, y_1) hasta la recta $y = a + bx$, es:

$$d = |y_i - a - bx_i|$$

Por lo tanto, los cuadrados de las distancias verticales de los n puntos de una muestra a la recta, tiene la suma:

$$\sum d^2 = u \sum_{i=1}^n (y_i - a - bx_i)^2 \dots\dots\dots 4$$

donde "u" es función de a y de b. Para que la ecuación 4 tenga un mínimo, es necesario que:

$$(\partial u / \partial a) = 0 \qquad \text{y} \qquad (\partial u / \partial b) = 0$$

por lo tanto:

$$(\partial u / \partial a) = - 2 \sum (y_i - a - bx_i)^2 = 0$$

$$(\partial u / \partial b) = - 2 \sum x_i (y_i - a - bx_i)^2 = 0$$

y finalmente:

$$\sum y_i = na + b \sum x_i \dots\dots\dots 5$$

$$\sum x_i y_i = a \sum x_i + b \sum x_i^2 \dots\dots\dots 6$$

Las ecuaciones 5 y 6 se conocen como ecuaciones normales para la recta de mínimos cuadrados, las cuales, resolviéndolas por simultáneas, se determinan las constantes a y b, quedando de esta forma determinada la recta que se propuso.

Curva de regresión múltiple. Las definiciones anteriores también pueden generalizarse a más variables. Si hay una relación lineal entre una variable dependiente z y dos variables independientes x, y, entonces se buscará una ecuación conectando las variables que tenga la forma:

$$z = a + bx + cy \dots\dots\dots 7$$

Puesto que la ecuación 7 representa un plano en un sistema de coordenadas rectangulares tridimensional, se llama, con frecuencia, plano de regresión. Para hallar el plano de regresión de mínimos cuadrados determinamos a, b y c de la ecuación 7.

ANEXO 12

Análisis Estadísticos para Correlación del k_{La}

$$k_{La} = 69.31 (Pg/V)^{0.81} (Vs)^{1.009}$$

Regresión no Lineal Variable Dependiente k_{La}

Origen	DF	Suma de Cuadrados
Regresión	3	64199.16347
Residual	4	436.37813
Total no corregido	6	26362.71874
(Total corregido)	6	26362.71874

$$R \text{ cuadrada} = 1 - \text{Residual SS} / \text{Corregido SS} = .98345$$

Intervalo de Confianza
Asintótico 95 %

Parámetro	Estimado	Confianza de error Std.	Intervalo de Confianza Asintótico 95 %	
			Bajo	Superior
B1	69.318718710	16.322081037	.441862052	114.63608071
B2	0.810704416	.108592509	.509203275	1.112205557
B3	1.009141075	.441862052	-.217664657	2.235946807



ANEXO 14

Evaluación de potencia gaseada, potencia por unidad de volumen obtenida en el Dinamómetro de Cojinete Neumático a diferentes condiciones Operacionales

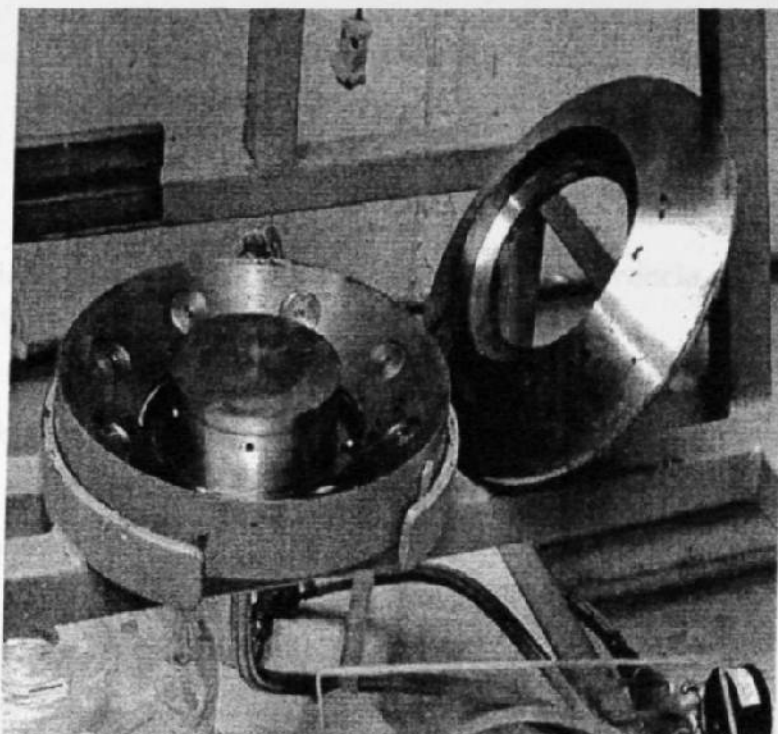
Aireación (vvm)	RPS	RPM	Pg	Pg/V	Volumen
0	3.333	200	0.32	0.064	5
0	4.167	250	0.704	0.141	5
0	5	300	1.241	0.248	5
0	5.833	350	2.015	0.403	5
0	6.667	400	3.027	0.605	5
0	7.5	450	4.416	0.883	5
0	8.333	500	5.992	1.198	5
0	9.167	550	7.857	1.571	5
0	10	600	9.784	1.957	5
0	10.833	650	12.263	2.453	5
0	11.667	700	14.835	2.967	5
0	12.5	750	16.914	3.383	5
0	13.333	800	19.953	3.991	5
0.5	3.333	200	0.308	0.0616	5
0.5	4.167	250	0.587	0.1174	5
0.5	5	300	1.083	0.2166	5
0.5	5.833	350	1.747	0.3494	5
0.5	6.667	400	2.643	0.5286	5
0.5	7.5	450	3.919	0.7838	5
0.5	8.333	500	5.1	1.02	5
0.5	9.167	550	6.406	1.2812	5
0.5	10	600	7.88	1.576	5
0.5	10.833	650	9.268	1.8536	5
0.5	11.667	700	12.771	2.5542	5
0.5	12.5	750	12.921	2.5842	5
0.5	13.333	800	14.026	2.8052	5
1	3.333	200	0.265	0.053	5
1	4.167	250	0.456	0.0912	5
1	5	300	0.787	0.1574	5
1	5.833	350	1.383	0.2766	5
1	6.667	400	1.76	0.352	5

**EFFECTO DE LAS CONDICIONES OPERACIONALES DE FERMENTACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
PAECILOMYCES FUMOSOROSEUS CEPA 612 EN CULTIVO SUMERGIDO**

1	7.5	450	2.804	0.5608	5
1	8.333	500	3.917	0.7834	5
1	9.167	550	4.844	0.9688	5
1	10	600	6.407	1.2814	5
1	10.833	650	7.753	1.5506	5
1	11.667	700	10.9	2.18	5
1	12.5	750	10.994	2.1988	5
1	13.333	800	12.687	2.5374	5
1.5	3.333	200	0.264	0.0528	5
1.5	4.167	250	0.435	0.087	5
1.5	5	300	0.684	0.1368	5
1.5	5.833	350	1.059	0.2118	5
1.5	6.667	400	1.257	0.2514	5
1.5	7.5	450	2.004	0.4008	5
1.5	8.333	500	2.79	0.558	5
1.5	9.167	550	3.929	0.7858	5
1.5	10	600	5.363	1.0726	5
1.5	10.833	650	6.685	1.337	5
1.5	11.667	700	9.538	1.9076	5
1.5	12.5	750	9.976	1.9952	5
1.5	13.333	800	11.58	2.316	5
2	13.333	200	0.272	0.0544	5
2	12.5	250	0.441	0.0882	5
2	11.667	300	0.708	0.1416	5
2	10.833	350	1.045	0.209	5
2	10	400	1.554	0.3108	5
2	9.167	450	1.875	0.375	5
2	8.333	500	2.769	0.5538	5
2	7.5	550	3.616	0.7232	5
2	6.667	600	4.832	0.9664	5
2	5.833	650	6.382	1.2764	5
2	5	700	9.363	1.8726	5
2	4.167	750	9.52	1.904	5
2	3.333	800	11.166	2.2332	5

ANEXO 15

Dinamómetro de cojinete neumático



ANEXO 16

Análisis de Varianza Factorial de los resultados de Supervivencia de las blastoesporas en la producción de *P. fumosoroseus* a nivel matraz.

Variable	F.Calculada	P.Error	Significancia
22° C	62.386	0.000	AS
4° C	22.876	0.000	AS

AS= Alta diferencia significativa

NS= No existe diferencia significativa

ANEXO 17

Análisis de Varianza Factorial de los resultados de Supervivencia de las blastoesporas en la producción de *P. fumosoroseus* a nivel Fermentador de las mejores condiciones probadas.

Condición	Variable	F. Calculada	P. Error	Significancia
400 rpm Peptona	(a)	57.315	0.000	DS
400 rpm	(b)	117.325	0.000	DS
400 rpm Casaminoácidos	(a)	92.190	0.000	DS
400 rpm	(b)	85.489	0.000	DS
520 rpm Casaminoácidos	(a)	270.047	0.000	DS
520 rpm	(b)	176.084	0.000	DS
520 rpm Peptona	(a)	48.565	0.000	DS
520 rpm	(b)	62.195	0.000	DS

* Blastoespora almacenada a 22° C b Blastoespora almacenada a 4° C

DS= Diferencia significativa

NS= No existe diferencia significativa



DONAT. O

