

ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN MASIVA DEL HONGO
Trichoderma koningii Th003 MEDIANTE FERMENTACIÓN BIFÁSICA A
ESCALA PILOTO

LINA CAROLINA CRUZ MARTÍNEZ

ANDRÉS DÍAZ GARCÍA. DIRECTOR
ALBA MARINA COTES. CODIRECTORA
BALKYS QUEVEDO. ASESORA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D.C.
JUNIO DE 2007

ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN MASIVA DEL HONGO
Trichoderma koningii Th003 MEDIANTE FERMENTACIÓN BIFÁSICA A
ESCALA PILOTO

LINA CAROLINA CRUZ MARTÍNEZ

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D.C.
JUNIO DE 2007

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946:

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN MASIVA DEL HONGO
***Trichoderma koningii* Th003 MEDIANTE FERMENTACIÓN BIFÁSICA A**
ESCALA PILOTO

LINA CAROLINA CRUZ MARTÍNEZ

APROBADO

Andrés Díaz García I. Q.
Director

Alba Marina Cotes Ph.D.
Codirectora

Balkys Quevedo M.Sc.
Asesor

Aura Marina Pedroza Ph.D.
Jurado

Milton Forero M.Sc.
Jurado

ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN MASIVA DEL HONGO
Trichoderma koningii Th003 MEDIANTE FERMENTACIÓN BIFÁSICA A
ESCALA PILOTO

LINA CAROLINA CRUZ MARTÍNEZ

APROBADO

Ángela Umaña Muñoz M.Phil.
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Luís David Gómez M.Sc.
Director Carrera de
Microbiología Industrial

DEDICATORIA

A mis padres, por brindarme siempre su apoyo y confianza

*A toda mi familia, quienes han contribuido cada día a hacer de mí un mejor ser
humano*

A Dios, quien me ha servido de guía durante todo este tiempo

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alba Marina Cotes Prado, Directora del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria Corpoica, por brindarme la oportunidad de hacer parte de su equipo de trabajo.

Al Ingeniero Químico Andrés Díaz, Investigador del Laboratorio de Control Biológico, por su orientación, apoyo y paciencia durante el desarrollo de este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

A la Química Farmaceuta Laura Villamizar, Investigadora del Laboratorio de Control Biológico, por sus aportes y colaboración.

A Jimmy Zapata, Carlos A. Moreno y Camilo Beltrán, por brindarme su amistad y ser un apoyo en todo momento.

A los auxiliares de Laboratorio Claudia Mesa, Rubén Molina, Gabriela Perdomo y Juan Alberto Arias, quienes contribuyeron a la realización de este trabajo.

A los estudiantes del Laboratorio de Control Biológico, quienes estuvieron siempre ahí y me brindaron su respaldo y colaboración.

Gracias a todos.....

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
INTRODUCCIÓN	17
1. JUSTIFICACIÓN	20
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. OBJETIVO GENERAL	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. MARCO TEÓRICO	24
4.1. <i>Trichoderma koningii</i>	24
4.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	24
4.1.2. GENERALIDADES	24
4.1.3. CONDICIONES DE CRECIMIENTO	25
4.1.4. ASPECTO MACROSCÓPICO	28
4.1.5. ASPECTO MICROSCÓPICO	28
4.1.6. <i>Trichoderma</i> COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO	29
4.1.6.1. MODOS DE ACCIÓN	31
4.2. FERMENTACIÓN	32
4.2.1. FERMENTACIÓN LÍQUIDA	34
4.2.1.1. FERMENTACIÓN POR LOTES (BATCH)	34
4.2.2. FERMENTACIÓN SÓLIDA	35
4.2.3. FERMENTACIÓN BIFÁSICA	38
4.2.4. BIORREACTORES	39
4.2.4.1. FERMENTADOR AIRLIFT DE LAZO INTERNO	40
4.2.4.2. FERMENTADOR SÓLIDO DE BANDEJAS	44
4.3. CONSUMO DE SUSTRATO EN UN CULTIVO CELULAR	45
4.4. DETERMINACIÓN DE BIOMASA FÚNGICA	45
4.4.1. N-ACETILGLUCOSAMINA	45

4.4.2. CUANTIFICACIÓN DE N-ACETILGLUCOSAMINA	46
4.5. DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA PROCESOS FERMENTATIVOS	47
4.5.1. DISEÑOS TIPO FACTORIAL FRACCIONADO	47
4.5.2. DISEÑO SIMPLEX	48
5. MATERIALES Y MÉTODOS	49
5.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA DE INTERÉS	49
5.2. FERMENTACIÓN BIFÁSICA	49
5.2.1. Producción de preinóculos de <i>Trichoderma koningii</i> Th003	49
5.2.2. Descripción del biorreactor	50
5.2.3. Fermentación líquida	51
5.2.3.1. Selección de las condiciones de fermentación líquida	51
5.2.3.2. Fermentación en medio líquido	54
5.2.3.3. Determinación del consumo de sustrato	54
5.2.4. Determinación de biomasa fúngica a partir de la cuantificación de N-acetilglucosamina	55
5.2.4.1. Peso seco	55
5.2.4.2. Tratamiento ácido-térmico	55
5.2.4.3. Ensayo colorimétrico	55
5.2.5. Fermentación sólida	56
5.2.5.1. Preparación del sustrato sólido	56
5.2.5.2. Descripción del biorreactor	57
5.2.5.3. Selección de las condiciones de fermentación sólida	57
5.2.5.4. Inoculación del sustrato sólido	60
5.2.5.5. Cinética de crecimiento en medio sólido	60
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
6.1. FERMENTACIÓN BIFÁSICA	63
6.1.1. FERMENTACIÓN LÍQUIDA	63
6.1.1.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN BIORREACTOR AIRLIFT	63
6.1.1.2. CONSUMO DE SUSTRATO	71
6.1.1.3. CUANTIFICACIÓN DE N-ACETILGLUCOSAMINA	73
6.1.1.4. DISEÑO SIMPLEX	75
6.1.2. FERMENTACIÓN SÓLIDA	76
6.1.2.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR SÓLIDO DE BANDEJAS	76
6.1.2.2. EFECTO DEL INÓCULO	80
6.1.2.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA	81
6.1.2.4. EFECTO DE LA CANTIDAD DE BANDEJAS SOBRE LA ESPORULACIÓN DEL HONGO <i>T. koningii</i> Th003	82
6.1.2.5. EFECTO DE LA AIREACIÓN	84
6.1.2.6. CONTENIDO DE HUMEDAD	86
6.1.2.7. DISEÑO SIMPLEX	88
7. CONCLUSIONES	90
8. RECOMENDACIONES	91
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
10. ANEXOS	101
ANEXO 1. Curva de calibración para la cuantificación de consumo de sustrato mediante la técnica del ácido Dinitrosalicílico (DNS)	101
ANEXO 2. Elaboración de la curva patrón de N-acetilglucosamina	103
ANEXO 3. Protocolo para realizar la prueba de viabilidad	104
ANEXO 4. Protocolo para realizar la prueba de germinación de conidios	105

ANEXO 5. Medios de cultivo	106
ANEXO 6. Análisis estadístico de datos	107
ANEXO 6a. Análisis estadístico de la fermentación líquida	107
ANEXO 6b. Análisis estadístico de la fermentación sólida	111
ANEXO 7. Modelo cinético de la fermentación sólida	123

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cuadro comparativo entre los sistemas de fermentación líquida y sólida	37
Tabla 2. Niveles evaluados en la fermentación líquida del hongo <i>T. koningii</i> Th003 en un biorreactor airlift	52
Tabla 3. Valores de los factores evaluados en la fermentación líquida del hongo <i>T. koningii</i> Th003 en un biorreactor airlift	52
Tabla 4. Valores de los factores evaluados para las 2 fermentaciones líquidas adicionales mediante la aplicación del método simplex	53
Tabla 5. Niveles evaluados para la fermentación sólida del hongo <i>T. koningii</i> Th003 en un biorreactor de bandejas	58
Tabla 6. Valores de los factores evaluados en la fermentación sólida del hongo <i>T. koningii</i> Th003 en un biorreactor de bandejas	59
Tabla 7. Valores de los factores evaluados para las 2 fermentaciones sólidas adicionales mediante la aplicación del método simplex	60
Tabla 8. Resultados de peso seco del hongo <i>T. koningii</i> Th003 en biorreactor airlift	64
Tabla 9. Resultados de la cuantificación de N-acetilglucosamina para cada una de las fermentaciones líquidas en biorreactor airlift	74
Tabla 10. Niveles de los factores evaluados para los tratamientos adicionales a partir de la aplicación del diseño simplex durante la fermentación líquida	75
Tabla 11. Recuento de conidios en las fermentaciones sólidas llevadas a cabo en fermentador de bandejas	76
Tabla 12. Caudal de aire inyectado durante las	85

fermentaciones sólidas	
Tabla 13. Niveles de los factores evaluados para los tratamientos adicionales a partir de la aplicación del diseño simplex durante la fermentación sólida	89

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aspecto macroscópico del hongo <i>Trichoderma koningii</i> Th003.	28
Figura 2. Características microscópicas del hongo <i>Trichoderma koningii</i> Th003.	29
Figura 3. Estructura de un fermentador airlift de lazo interno.	41
Figura 4. Aspecto externo de un fermentador de bandejas empleado en fermentación sólida.	44
Figura 5. Ubicación de toma de muestras en las bandejas de acero inoxidable del fermentador sólido.	61
Figura 6. Aspecto macroscópico de los precultivos del hongo <i>T. koningii</i> Th003.	63
Figura 7. Representación grafica de los efectos principales de los factores evaluados sobre la concentración de biomasa en la fermentación líquida	66
Figura 8. Carta de Pareto para los factores evaluados en un biorreactor airlift para la fermentación líquida	67
Figura 9. Representación grafica de los efectos de las interacciones de los factores evaluados sobre la concentración de biomasa durante la fermentación líquida	69
Figura 10. Cuantificación de la concentración de azúcares reductores presentes en el medio SL1 mediante la técnica de DNS durante las fermentaciones líquidas	72

Figura 11. Comportamiento de la glucosamina en función del tiempo durante la fermentación 3	73
Figura 12. Comportamiento del hongo <i>T. koningii</i> Th003 durante la fermentación sólida 7	77
Figura 13a. Comportamiento del hongo <i>T. koningii</i> Th003 durante la fermentación sólida 3	78
Figura 13b. Comportamiento del hongo <i>T. koningii</i> Th003 durante la fermentación sólida 4	78
Figura 14. Representación grafica de los efectos principales sobre la concentración de conidios de los factores evaluados en la fermentación sólida	79
Figura 15. Representación grafica de las interacciones de los factores evaluados sobre la concentración de conidios durante la fermentación sólida	80
Figura 16. Carta de Pareto de la interacción entre los factores evaluados en la fermentación sólida	80
Figura 17. Disposición de las bandejas durante la fermentación sólida 7	83
Figura 18. Disposición de las bandejas durante la fermentación sólida 2	83
Figura 19. Aspecto macroscópico del sustrato inoculado y colonizado por el hongo <i>T. koningii</i> Th003 durante la fermentación sólida 5	84
Figura 20. Efecto de la aireación en las fermentaciones sólidas 11 y 12	86
Figura 21. Aspecto macroscópico del hongo <i>T. koningii</i> Th003 al final de la fermentación sólida 8	87

RESUMEN

Las especies del género *Trichoderma* son los microorganismos antagonistas más utilizados para el control de enfermedades en plantas ocasionadas por fitopatógenos. *Trichoderma* ha sido estudiado como agente de control biológico durante más de 70 años, pero solo hasta hace poco tiempo, las cepas de este microorganismo han comenzado a adquirir un valor comercial importante debido a que sus sistemas de producción han sido escalados a nivel piloto y semi-industrial. En este trabajo se llevó a cabo la estandarización de las condiciones de fermentación bifásica del hongo *T. koningii* cepa Th003 para alcanzar concentraciones de biomasa para su producción a escala industrial. La biomasa fúngica fue obtenida usando la técnica de fermentación líquida en un medio de cultivo codificado como SL1 compuesto de arroz y melaza. Inicialmente se determinó el tiempo óptimo para la producción del inóculo líquido en un biorreactor airlift y posteriormente se aplicó un diseño simplex. Se determinó que la aireación es el factor más importante que afecta el proceso para llevar a cabo su escalamiento. La mayor producción de biomasa fúngica (15.61 g/l de biomasa seca) se obtuvo en la fermentación 4 bajo condiciones de operación como: altura de la zona de ascenso 55.1cm, caudal de aire 0.5vvm y volumen de antiespumante 20ml. Además, la cuantificación de N-acetilglucosamina resultó ser un buen indicador del crecimiento fúngico al poder ser relacionado con la biomasa obtenida durante el proceso de fermentación líquida ($\pm 78.56 \mu\text{g}$ glucosamina/ g biomasa seca, con un coeficiente de variación de los datos de 10.23%).

De otro lado, la producción masiva de conidios se llevó a cabo en un fermentador de bandejas a escala piloto usando un sustrato sólido codificado como SS1 compuesto de arroz y salvado de trigo. Se aplicó un diseño factorial completo y luego el diseño experimental simplex. Se determinó que la aireación y el volumen de inóculo líquido fueron los factores de operación que más afectaron la cantidad de conidios obtenida después de 96 horas de fermentación, obteniéndose la mayor concentración durante la fermentación 5 equivalente a 8.44×10^9 conidios/g de sustrato.

ABSTRACT

Trichoderma species are the antagonistic microorganisms most used for the control of plant diseases caused by phytopathogens. *Trichoderma* has been studied as biological control agent during more than 70 years, but just recently strains of this microorganisms have begun to acquire an important commercial value because its production systems has been scaled to pilot and semi-industrial scale production. In this work was carried out the standardization of conditions of two-phase fermentation of the fungi *T. koningii* Th003 strain to obtain biomass concentrations for its industrial scale-up production. Fungal biomass was obtained using liquid fermentation technique in a culture medium codified as SL1 based on rice and cane molasses. Initially the optimal time was determined for inoculum production in airlift bioreactor and then, a simplex design was applied. We found aeration as the most important factor that influence or affect the scaling process. The biggest production of fungal biomass (15.61 g/l dry biomass) was obtained by fermentation 4 under operational conditions as: riser height 55.1cm, aeration 0.5vvm and antifoam volume 20ml. Moreover, the quantification of N-acetylglucosamine was a good indicator from the fungal growth to be related with the biomass obtained during the process of liquid fermentation ($\pm 78.56 \mu\text{g}$ glucosamine/ g dry biomass, with a data variation coefficient of 10.23%).

By other side, the massive production of conidia was carried out in a tray bioreactor to pilot scale using a solid substrate codified as SS1 based on rice and wheat bran. A complete factorial design and a simplex design were applied. We determined that aeration and liquid inoculum volume were the operation factors that most affected the quantity of conidia obtained after 96 hours of fermentation, being obtained the biggest concentration during the fermentation 5 equivalent to 8.44×10^9 conidia/g.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por organismos fitopatógenos tales como bacterias, nemátodos u hongos constituyen generalmente la mayor causa de pérdidas en la producción agrícola (Benítez *et al.*, 2004). Dentro de éstos, los hongos comprenden uno de los principales grupos tanto por su diversidad como por las pérdidas que originan a nivel económico (Benítez *et al.*, 2000). La persistencia de varias de las especies de hongos fitopatógenos tales como *Phythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* ha aumentado durante los últimos años debido a los cambios que se han presentado en las prácticas agrícolas; principalmente por el uso indiscriminado de químicos y también por la contaminación que se origina a causa de su empleo, con efectos perjudiciales no solo sobre los cultivos de importancia económica sino sobre los demás organismos, a través de la adquisición de resistencia a las estrategias desarrolladas en los últimos años para su control (Benítez *et al.*, 2000).

La práctica tradicional más común para la disminución y eliminación de los efectos perjudiciales ocasionados por los agentes fitopatógenos mencionados se basa en el empleo de plaguicidas, práctica conocida como control químico. Sin embargo, el aumento de la conciencia social que se tiene ante el enorme deterioro medioambiental que supone la utilización indiscriminada de estos compuestos químicos, ha provocado un gran interés en la búsqueda de sistemas ambientalmente sostenibles para el control de plagas y enfermedades. En este sentido, una estrategia promisoría es la utilización de microorganismos antagonistas de los agentes infecciosos y que desplazan a éstos de una manera natural, denominada control biológico (Benítez *et al.*, 2004). Como consecuencia de esto, existe un creciente interés por la explotación y utilización de los microorganismos para el control de plagas.

En general, las especies de *Trichoderma* producen enzimas extracelulares, sustancias antibióticas de naturaleza volátil y no volátil y compuestos antifúngicos,

pero también son fuertes competidores por espacio y nutrientes frente a otros fitopatógenos, además promueven el crecimiento de las plantas e inducen la resistencia sistémica en éstas (Hermosa *et al.*, 2000). Por tal razón, los hongos del género *Trichoderma* han sido los microorganismos antagonistas más utilizados para el control de enfermedades en plantas producidas por hongos durante más de 70 años, pero sólo hasta hace poco tiempo estas cepas han comenzado a adquirir un valor comercial importante; debido a los efectivos resultados obtenidos durante su aplicación y a la aparición de nuevas tecnologías para la producción masiva y el desarrollo de productos a base de este hongo (Clavijo, 1998).

En el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica, se han realizado estudios relacionados con el aislamiento, selección, producción, formulación y evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* como potenciales biocontroladores de hongos fitopatógenos. Este es el caso del hongo *Trichoderma koningii* (cepa Th003) aislado a partir de suelos de Cundinamarca, con el cual se ha obtenido entre un 70% y un 100% de control bajo condiciones de invernadero frente a patógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Betancourt, 1997), *Rhizoctonia solani* (Cárdenas, 1999; Saldamando, 1996), *Botrytis cinerea* y *Oidium* sp. (Moreno 2003) en tomate, *Pythium splendens* en frijol y pepino (Cotes, 1993), *Rhizoctonia solani* en frijol (Cotes, 1993), *Sclerotium cepivorum* en cebolla de bulbo (París y Cotes, 2002), *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga tipo batavia y *Alternaria dauci* en cilantro (Villamizar *et al.* 2004); demostrando la versatilidad de esta cepa para el biocontrol de fitopatógenos de suelo y foliares.

De ahí que se hayan desarrollado diferentes estrategias o sistemas de producción masiva de este hongo biocontrolador sobre varios sustratos usando técnicas de fermentación tanto líquida como sólida para la obtención de conidios en rendimientos que alcanzan rendimientos hasta 10^9 conidios/g (Peña, *et al.* 2002).

Por lo tanto, la estandarización e implementación de una técnica de fermentación bifásica que incorpore una fermentación líquida y otra fermentación en sustrato sólido a nivel piloto, se ha convertido en una etapa tecnológica crítica para la obtención de forma simple, económica y efectiva de las estructuras infectivas y de propagación a partir del hongo biocontrolador *Trichoderma koningii* cepa Th003, en cantidades suficientes para su utilización como principio activo de un bioplaguicida a nivel de campo.

1. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda, caracterización y producción a nivel de laboratorio e industrial de un producto biotecnológico, depende del microorganismo usado, del tipo de metabolito de interés y de los procesos involucrados en su obtención. La utilización de procesos con un alto desarrollo tecnológico tales como la fermentación líquida o sumergida y la fermentación en sustrato sólido, se han constituido en herramientas indispensables para la obtención comercial de este tipo de productos.

Trichoderma sp. es un habitante natural del suelo que se caracteriza por su comportamiento saprófito, propiedad que le proporciona ventajas antagónicas, tales como antibiosis, competencia por nutrientes y espacio y micoparasitismo, entre otros y que permiten su selección y uso para la producción de bioplaguicidas. El hongo *Trichoderma koningii* Th003 se ha convertido en uno de los microorganismos que aparece como una alternativa promisoriosa para ser empleado como agente de control biológico frente a diferentes especies de fitopatógenos, tales como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium oxysporum*, en el marco de un programa de manejo integrado de plagas eficaz para una agricultura más sana y productiva.

Teniendo en cuenta lo anterior, se han llevado a cabo diversos trabajos de investigación durante los últimos 10 años en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, los cuales han permitido aislar, seleccionar y evaluar cepas nativas de microorganismos como hongos, bacterias y levaduras con un alto potencial de control biológico frente a fitopatógenos para un posterior desarrollo de formulaciones de bioplaguicidas eficaces, que puedan ser usados dentro de un programa de manejo integrado de cultivos.

Gracias a los resultados promisorios obtenidos en estudios llevados a cabo en casa de malla, actualmente se está llevando a cabo el proceso de producción masiva de conidios del hongo *Trichoderma koningii* Th003 a escala de laboratorio y se desea estandarizar los niveles de producción a escala piloto, mediante la implementación

de un proceso de fermentación bifásica para posteriormente realizar la evaluación de su efectividad en pruebas a nivel de campo en tomate para el control de *Botrytis cinerea* y *Oidium* sp. en tomate, en lechuga para el control de *Sclerotinia sclerotiorum* y en cilantro para el control de *Alternaria dauci*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con el propósito de producir masivamente las cantidades de conidios del hongo *Trichoderma koningii* cepa Th003 necesarias para llevar a cabo la aplicación en campo de un bioplaguicida para el control de diversos fitopatógenos, es necesario establecer una homogeneidad dentro del proceso de producción masiva de un bioplaguicida que tiene como principio activo los conidios del hongo *Trichoderma koningii* cepa Th003; por lo tanto, en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica se considera necesario llevar a cabo la estandarización del proceso de producción masiva del hongo mediante fermentación bifásica a escala piloto.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Estandarizar la producción del inóculo líquido y la fermentación sólida del hongo biocontrolador *Trichoderma koningii* Th003.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer las condiciones fisicoquímicas adecuadas para la producción de preinóculos líquidos en fermentador airlift de 20 litros.
- Estandarizar el proceso de fermentación sólida del hongo *T. koningii* Th003 en un fermentador de bandejas a escala piloto.
- Implementar una técnica para la cuantificación de biomasa fúngica del hongo *T. koningii* Th003.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. *Trichoderma koningii*

4.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica del hongo *Trichoderma koningii* Th003 es la siguiente (NCBI, 2006):

SUPER REINO	Eucariota
REINO	Fungi
FILUM	Ascomycota
SUBFILUM	Pezizomycotina
CLASE	Sordariomycetes
SUBCLASE	Hypocreomycetidae
ORDEN	<i>Hypocreales</i>
FAMILIA	<i>Hypocreaceae</i>
GÉNERO	<i>Trichoderma</i>
ESPECIE	<i>Trichoderma koningii</i>

4.1.2. GENERALIDADES

El género *Trichoderma* es un grupo de hongos aislados comúnmente del suelo que se reproducen asexualmente. *Trichoderma* es un hongo filamentoso anamórfico, heterótrofo, aerobio, con una pared celular compuesta de quitina, de rápido crecimiento que puede utilizar una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono. Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son relativamente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelos ácidos (Harman *et al.*, 1981).

La población de *Trichoderma* decrece especialmente cuando la humedad del ambiente desciende por largos períodos de tiempo. Otros estudios han determinado

que el pH, la concentración de CO₂, HCO₃, sales y el contenido de materia orgánica son factores físicos y químicos determinantes para la variación de la poblacional de *Trichoderma*, además de la presencia o ausencia de otros microorganismos en el ambiente (Fonseca, 1998).

4.1.3. CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Dentro de los factores que afectan el crecimiento *Trichoderma* se encuentran los de tipo físico y de tipo nutricional como:

- **FOTOTROFÍA:** La mayoría de especies del género *Trichoderma* son fotosensibles, puesto que presentan una mayor esporulación al ser expuestas a la luz. Sin embargo, cuando se someten a períodos alternados de luz y oscuridad, se favorece la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos (Domsch *et al.*, 1980).
- **ESPORULACIÓN:** *Trichoderma* esporula fácilmente sobre muchos sustratos naturales y artificiales en un patrón concéntrico circular en respuesta a la alternación de luz diurna y oscuridad, donde los conidios se producen durante el período de luz. La exposición de los cultivos en agar durante 20 a 30 segundos a la luz es suficiente para inducir la esporulación. La mayor foto inducción de la conidiogénesis se obtiene con la exposición a la luz del día por 3 minutos o cerca de la radiación ultravioleta tipo A (366nm) de 10 a 30 segundos (Fonseca, 1998). Además, el número total de conidios producidos es inversamente proporcional a la concentración de la fuente de carbono. Cuando la concentración de carbono es inferior a 50g/l, la producción de conidios se eleva; por el contrario, cuando la concentración de carbono supera este valor, la esporulación tiende a disminuir (Astudillo, 1999). De igual manera, las sales minerales en general (NaCl, KCl, CaCl₂) en una concentración elevada (20-70g/l) inhiben la esporulación. Los iones de sodio y potasio producen una disminución de la presión osmótica de las células

inhibiendo la esporulación. Una baja concentración de iones calcio (1-10g/l), aumenta la presión osmótica dentro de las células fúngicas induciendo así la esporulación (Astudillo, 1999).

- **GERMINACIÓN:** La germinación de los conidios de *Trichoderma* depende del tipo de enlace que presenta la fuente de carbono, la cual puede ser un disacárido o un polisacárido. Para su aprovechamiento el hongo emplea enzimas como amilasas, α -glucosidasas y endo y exocelulasas que realizan la hidrólisis de los azúcares simples para dar inicio a la germinación en los diferentes medios de cultivo; mientras que para iniciar el proceso de infección, se debe tener en cuenta la composición química de la pared celular de los conidios (Astudillo, 1999).
- **SALINIDAD:** *Trichoderma* se ve inhibido en su crecimiento con altas concentraciones de cloruro de sodio (80g/l aproximadamente), aunque tolera hasta una concentración de 60g/l de cloruro de sodio, éstas condiciones pueden ocasionar mutaciones perjudicando el proceso de conidiogénesis, al disminuir notablemente la producción de esporas (Moore, 1996).
- **pH:** *Trichoderma* tiene un rango de pH relativamente amplio para su crecimiento. Presenta crecimiento a valores de pH comprendidos entre 2.0 y 9.0, con un pH óptimo que se encuentra entre 4.0 y 7.0. A pH ácido, la asimilación de nutrientes como glucosa ejerce una influencia importante sobre el crecimiento del hongo y su posterior esporulación. Además, procesos como la germinación, se ven afectados por la escasez de nutrientes y por niveles de pH por encima de 9.0 (Domsch *et al.*, 1980).
- **TEMPERATURA:** el rango de temperatura para el crecimiento de *Trichoderma* se encuentra entre los 10°C a los 40°C, considerándose una óptima de 25°C (Alexopoulos, 1996). Según otros estudios, se ha demostrado que el crecimiento saprófito en suelo de *Trichoderma koningii*,

se presenta a una temperatura que oscila entre los 20°C y los 30°C, con una temperatura óptima de 25°C.

- **HUMEDAD:** el contenido de humedad que favorece el crecimiento saprófito de *T. koningii* se encuentra alrededor del 70% y el 80% (Wakelin *et al.*, 1999).
- **NECESIDADES NUTRICIONALES:** *Trichoderma* es capaz de degradar sustratos muy complejos tales como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos como fuente de carbono para su crecimiento gracias a la variada maquinaria enzimática que posee (enzimas hidrolíticas tales como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras), aunque puede emplear también ácidos orgánicos y monosacáridos como fuente de carbono. Así mismo, *Trichoderma* asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoniaco y sulfato de amonio (Moore, 1996). Adicionalmente, se ha demostrado que la adición de nitrógeno en forma de sulfato de amonio al medio estimula e incrementa el crecimiento de este hongo, mientras que la adición de nitrógeno como nitrato de calcio genera un efecto supresivo en el crecimiento de *T. koningii* (Danielson *et al.*, 1973; Wakelin *et al.*, 1999).

Por otra parte, los microelementos, sales y vitaminas en grandes cantidades no son indispensables para el desarrollo de *Trichoderma* (Papavizas, 1985). Los elementos traza requeridos para el crecimiento de hongos en general incluyen hierro, zinc, cobre, manganeso y molibdeno en concentraciones muy pequeñas cercanas a 10^{-9} M. Dentro de las vitaminas necesarias se encuentran tiamina (B1), biotina (B7), piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), riboflavina (B2), cianocobalamina (B12) y ácido aminobenzoico (Moore, 1996).

4.1.4. ASPECTO MACROSCÓPICO

Trichoderma koningii se distingue por sus colonias, inicialmente se ven como una superficie lisa, pero la formación de esporas aéreas a través del tiempo, permite observarlas ligeramente algodonosas (Rifai, 1969). El color de las colonias cambia gradualmente de blanco a blanco verdoso por la formación de fialosporas que en última instancia se tornan de un color verde oscuro opaco (Domsch *et al.*, 1980) (Figura 1). Adicionalmente, las colonias de *T. koningii* no producen pigmentos en el medio de cultivo donde se desarrollan, por lo cual el reverso de la colonia es incoloro (Rifai, 1969). Así mismo, las colonias de *T. koningii* crecen rápidamente bajo condiciones favorables de temperatura (20°C - 25°C) con una temperatura óptima de 25°C y un período de incubación de 5 días con luz constante y un pH entre 3.7 y 6.0 (Domsch *et al.*, 1980).



Figura 1. Aspecto macroscópico del hongo *Trichoderma koningii* Th003.

4.1.5. ASPECTO MICROSCÓPICO

Trichoderma koningii es un hongo imperfecto que posee hifas hialinas septadas y ramificadas a ambos lados sin ser paralelas, conidióforos, fiálides, y conidios; aunque también pueden producir clamidosporas. Sus estructuras de reproducción son los conidios, mientras que sus estructuras de resistencia son las clamidosporas.

Estas últimas son similares a las de otros hongos formadores de clamidosporas, siendo de 5 a 10 veces más grandes que los conidios por sus voluminosas reservas de lípidos; son intercalares o terminales, de forma cilíndrica o globosa.



Figura 2. Características microscópicas de *Trichoderma koningii* Th003.

Los conidióforos son hialinos, al inicio de su desarrollo se observan ramificados pero cuando maduran comienzan a separarse por su formación aérea, son rectos y pueden llegar a presentar un aspecto piramidal (Rifai, 1969). Las fiáldes son hialinas, en forma de frasco o botella, e infladas en la base y están unidas a los conidióforos en ángulo recto. Los conidios tienen de 2 μm a 3 μm de diámetro en promedio, son redondeados o de forma ovoide, lisos y se observan hialinos o de color verde brillante al microscopio (Figura 2) (Rifai, 1969).

4.1.6. *Trichoderma* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico puede ser definido como la reducción del inóculo o de la actividad de un patógeno mediante la acción natural de uno o más microorganismos a través de la manipulación del ambiente, del hospedero, de los antagonistas o por una introducción masiva de uno o más microorganismos (Baker & Cook, 1983; citado por Clavijo, 1998). Esta forma de control de algunos problemas fitopatológicos ha tomado importancia en los últimos años, fundamentándose principalmente en la selección de organismos del suelo con propiedades antagónicas sobre organismos que generan enfermedades en las plantas (Valencia, 1998).

El uso comercial de *Trichoderma* como agente de control biológico se da por la identificación precisa, adecuada formulación y estudios acerca de los efectos sinérgicos de sus mecanismos de biocontrol (Hermosa *et al.*, 2000); además, porque presenta otras características tales como ubicuidad, facilidad para su aislamiento y cultivo, rápido crecimiento en un gran número de sustratos y porque no afecta a plantas superiores (Benítez *et al.*, 2000).

De las investigaciones realizadas en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica utilizando la cepa de *Trichoderma koningii* Th003, Saldamando y colaboradores en 1996, llevaron a cabo un estudio cuyo objeto fue la evaluación de una posible alternativa para el control de la enfermedad causada por el hongo *Rhizoctonia solani* en tomate (*Lycopersicon esculentum*) mediante una técnica de pregerminación controlada de semillas aplicando el agente de control biológico *Trichoderma koningii* cepa Th003, seleccionada en trabajos anteriores debido a su alta actividad biocontroladora frente a agentes causantes de enfermedades radiculares y de damping-off (volcamiento) en plantas de frijol y pepino (Cotes, 1993). Los resultados obtenidos demostraron la eficacia de la cepa seleccionada como agente de control al aumentar el porcentaje de protección de las semillas tratadas hasta en un 96.46% respecto al control.

Posteriormente, Betancourt (1997) realizó un estudio similar empleando la misma cepa de *Trichoderma* (Th003) frente al fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, en este trabajo se observó que el porcentaje de protección en preemergencia de las semillas de tomate fue el equivalente al 66.94% contra este tipo de fitopatógeno al compararse con el control. Asimismo, Cárdenas (1999), encontró que los porcentajes de control frente a *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* en cultivos de tomate fueron del 68% y 70% respectivamente, al emplear esta misma cepa de *Trichoderma* (Th003) durante la post-emergencia de las semillas en este cultivo bajo condiciones de invernadero, demostrando la eficiencia de esta cepa como agente biocontrolador.

4.1.6.1. MODOS DE ACCIÓN

El género *Trichoderma* está compuesto por un gran número de especies que actúan como agentes de control biológico debido a sus propiedades antagonistas, las cuales se basan en la activación de diferentes mecanismos. Las cepas de *Trichoderma* ejercen un biocontrol contra hongos fitopatógenos de manera indirecta a través de la competencia por nutrientes y espacio, modificando las condiciones medioambientales o promoviendo el crecimiento y los mecanismos de defensa y antibiosis en las plantas o directamente por mecanismos como el micoparasitismo. Estos mecanismos directos e indirectos actúan coordinadamente y su importancia en el proceso de biocontrol depende de la cepa de *Trichoderma* empleada, el hongo contra el cual ejercerá control como antagonista, el tipo de planta o cultivo, además de las condiciones ambientales como pH, disponibilidad de nutrientes, temperatura y concentración de hierro, principalmente (Benítez *et al.*, 2000).

El antagonismo es un mecanismo que se basa en la actividad inhibitoria directa que ejerce un microorganismo sobre otro y que presenta acciones opuestas en un mismo sistema. *Trichoderma* sp. puede ejercer su acción antagonista sobre fitopatógenos mediante mecanismos como micoparasitismo, antibiosis, lisis, competencia, predación, estimulación del crecimiento e inducción de respuestas de defensa en la planta (Cotes, 1993).

La lisis es el mecanismo en el cual intervienen las enzimas hidrolíticas producidas por los microorganismos antagonistas como factores biocontroladores. Se ha observado que *Trichoderma* sp. produce celulasas que degradan *in vitro* la celulosa de las paredes celulares de microorganismos Oomicetos; además de glucanasas y quitinasas que catalizan la hidrólisis de la quitina y de los β -1,3 glucanos de las paredes celulares de microorganismos Deuteromicetos (Cotes, 1993).

El término antibiosis hace referencia a la relación biótica de antagonismo en el que un compuesto producido por un microorganismo inhibe parcial o totalmente el

crecimiento de un patógeno a través de la producción de metabolitos tóxicos o antibióticos (Cotes, 1993). Los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium* sp., producen en común compuestos que actúan sobre la pared y la membrana celular de otros hongos, algunos de estos compuestos son: Alamethicina, Trichotoxina, Suzukacillina, Gliovirina, Gliodeliquesina y Gliotoxina, principalmente (Clavijo, 1998).

4.2. FERMENTACIÓN

El proceso conocido como fermentación implica el empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica, catalizadas por enzimas. Los productos comercialmente importantes de las fermentaciones industriales pertenecen a cuatro categorías principales: células microbianas, moléculas grandes como enzimas y polisacáridos, productos básicos y metabolitos secundarios que no son necesarios para el crecimiento celular. Las células utilizadas para obtener estos productos tienen una gran variedad de propiedades bioquímicas y fisiológicas. La producción comercial de productos de fermentación ha empleado principalmente diversas especies de bacterias, levaduras y hongos (Ward, 1989).

Para que un proceso de fermentación se desarrolle adecuadamente se debe establecer inicialmente el medio óptimo para el crecimiento de los microorganismos. Esto incluye la determinación de parámetros como pH, temperatura, oxígeno disuelto y nutrientes, entre otros; con el fin de que el microorganismo ya sea hongo, bacteria o levadura, desarrolle apropiadamente su metabolismo y obtener de esta manera la base para un producto de interés comercial (Forero, 2002).

En cualquier proceso de fermentación que sea objeto de estudio se deben evaluar una serie de variables para conocer, controlar y manipular el curso de la fermentación; estas variables se suelen dividir entre las que se pueden medir continuamente (temperatura, velocidad de agitación, presión, formación de espuma, oxígeno disuelto y pH principalmente) y las que típicamente se miden a ciertos

intervalos de tiempo (formación de biomasa y de producto y consumo de sustrato básicamente) (Montoya, 1989).

Los microorganismos implicados en los procesos de fermentación son principalmente quimiorganótrofos, es decir, que pueden obtener su energía y su fuente de carbono por la oxidación de compuestos orgánicos. Los hongos más importantes implicados en las fermentaciones industriales se clasifican principalmente en dos grupos: los Zygomycotina, con hifas aseptadas como los géneros *Mucor* y *Rhizopus*, y los Deuteromicotina, septados u hongos imperfectos, por ejemplo los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. En general, la producción masiva de microorganismos biocontroladores puede llevarse a cabo mediante dos técnicas: fermentación líquida o sumergida y fermentación sólida o en superficie (Ward, 1989).

En el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica se han realizado estudios para el desarrollo de diferentes sistemas de producción masiva de conidios del hongo *T. koningii* cepa Th003 para su empleo en el control de diversos fitopatógenos. Para esto, inicialmente se realizaron estudios que incluyeron la construcción y puesta en marcha de un fermentador airlift (Flórez, 2002) y otro de bandejas (Pinzón, 2001) para la producción masiva a escala piloto de diferentes microorganismos usados como agentes de control biológico. En cuanto a la producción masiva del hongo *T. koningii* cepa Th003, Peña (2002) llevó a cabo un estudio cuyo objeto fue evaluar el efecto de diferentes sustratos sobre el crecimiento y la producción de conidios de *Trichoderma koningii* Th003 y establecer así un método de producción masiva en medio sólido. Como resultado de este estudio se estandarizó la composición de un precultivo líquido y se seleccionó un sustrato sólido, en el cual se obtuvieron los mejores rendimientos en la producción de conidios (hasta 10^9 conidios/g).

4.2.1. FERMENTACIÓN LÍQUIDA

La fermentación líquida o sumergida es definida como la técnica de crecimiento de microorganismos en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos en el medio de cultivo y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones fisicoquímicas controladas, éste es el método más usado por la industria biotecnológica. En comparación con la fermentación sólida, presenta las siguientes ventajas: se obtiene un producto más homogéneo, es más sencillo el control de los factores de fermentación como temperatura, aireación, agitación y pH, presenta mejor distribución del oxígeno y del calor suministrado al sistema, y se puede llevar a cabo la medición directa de la biomasa. La fermentación sumergida se realiza principalmente usando tres métodos de alimentación de sustrato: fermentación en lote, fermentación en lote alimentado y fermentación en cultivo continuo (Crueger, 1989).

4.2.1.1. FERMENTACIÓN POR LOTES (BATCH)

Una fermentación discontinua o por lotes puede ser considerada como un sistema cerrado. A tiempo cero (t_0), la solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos y se permite que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se adiciona nada, excepto oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente de manera continua como resultado del metabolismo celular. A lo largo de la fermentación por lote se observan cuatro fases típicas de crecimiento: fase de adaptación, fase logarítmica o de crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de muerte celular (Crueger, 1989).

Este tipo de fermentación es la alternativa más usada debido a la facilidad que representa la operación del fermentador, ya que simplemente se carga con el medio de cultivo, se esteriliza y el control del proceso es simple: se fijan al inicio de la

fermentación la composición del caldo y el pH, durante la operación se mantienen constantes la temperatura, la agitación y el suministro de oxígeno. El tiempo de fermentación se fija hasta alcanzar la concentración celular deseada y posteriormente se llevan a cabo las etapas de separación y secado de la biomasa obtenida. Sin embargo, con este método se han obtenido productividades más bajas con respecto al lote alimentado y se requiere habilidad durante la operación para obtener calidades constantes entre lotes de producción (Forero, 2000).

4.2.2. FERMENTACIÓN SÓLIDA

La fermentación sólida es un proceso que involucra sólidos en ausencia parcial o total de agua libre; sin embargo, el sustrato debe tener la humedad suficiente para permitir el crecimiento del microorganismo y que lleve a cabo todos sus procesos metabólicos (Pandey, 2003); además, sirve como fuente de nutrientes y como soporte para que los microorganismos crezcan sobre él (Demain *et al.*, 2000). Este tipo de procesos tienen bajos requerimientos de energía y producen una menor cantidad de aguas residuales en comparación con los procesos de fermentación líquida (Pandey, 2003).

La técnica de fermentación sólida consta de las siguientes etapas: 1) preparación de la mezcla sólida, 2) reducción de la carga microbiana mediante la inyección directa de vapor de agua o por esterilización en autoclave, 3) inoculación de la matriz sólida con un inóculo líquido, 4) ajuste de la humedad y del pH, 5) puesta del medio en el fermentador, 6) inyección continua o intermitente de aire a temperatura y humedad controladas, 7) secado hasta obtener la humedad residual deseada, 8) molienda o adecuación de tamaño de partícula, 9) obtención del ingrediente activo (Forero, 2000).

Otro de los aspectos importantes a tener en cuenta para la fermentación sólida es la elección de los parámetros del proceso y su optimización. Estos incluyen parámetros fisicoquímicos y bioquímicos como: el tamaño de partícula, la humedad inicial, el pH,

el pretratamiento del sustrato, la humedad relativa, la temperatura de incubación, la agitación, la aireación, el volumen y la edad del inóculo, la composición del medio de cultivo, la suplementación con microelementos como sales e inductores de crecimiento así como de elementos traza, la extracción del producto y su posterior purificación, etc. Dependiendo de la clase, el nivel y la aplicación del experimento, una sola o varias variables pueden ser usadas como parámetros de optimización del proceso (Pandey, 2003).

Dentro de los parámetros mencionados anteriormente, la selección de un sustrato adecuado es un factor clave en los procesos de fermentación sólida. Generalmente se utilizan residuos agroindustriales debido a que suplen la demanda de nutrientes requerida por los microorganismos a un bajo costo. Algunos ejemplos son: bagazo de caña, trigo, melaza, arroz, maíz, residuos de té, café, pulpa de remolacha y harina de trigo, entre otros (Krishna, 2005). Adicionalmente, es necesario mantener un nivel óptimo de humedad, ya que una baja humedad tiende a reducir la difusión de nutrientes, el crecimiento del microorganismo, la estabilidad enzimática y la degradación del sustrato. En general, los contenidos de humedad encontrados en los procesos de fermentación sólida se encuentran entre el 30% y el 85%. Para cultivos bacterianos, la humedad del sustrato debe ser superior al 70%, mientras que en el caso de los hongos filamentosos, ésta podría encontrarse en un rango que oscila entre el 20% y el 70% (Raimbault, 1998).

De esta manera, los hongos filamentosos constituyen el grupo de microorganismos de mayor utilización en los procesos de fermentación sólida ya que su crecimiento en forma de micelio e hifas, así como su tolerancia ante condiciones tales como baja actividad de agua y una alta presión osmótica, les proporcionan ventajas sobre otros microorganismos en la colonización de sustratos sólidos y su utilización como fuente de nutrientes (Krishna, 2005).

Frente a la fermentación líquida, la fermentación sólida presenta unos rendimientos más altos, esto se atribuye probablemente a la semejanza que presenta la matriz

sólida al hábitat natural de algunos microorganismos, lo que permite que su actividad metabólica se incremente (Pandey, 2003). En la Tabla 1 se presenta una comparación entre los dos sistemas de fermentación.

Tabla 1. Cuadro comparativo entre los sistemas de fermentación líquida y sólida.

FACTOR	FERMENTACIÓN LÍQUIDA	FERMENTACIÓN SÓLIDA
TIPO DE SUSTRATOS EMPLEADOS	Sustratos solubles (azúcares)	Sustratos económicos de carácter agroindustrial y poliméricos insolubles (almidón, celulosa, pectina, lignina)
AGUA	Elevado consumo de agua	Consumo limitado de agua y baja actividad de agua
TEMPERATURA	Fácil control de la temperatura, alta transferencia de calor	Difícil control de la temperatura, baja capacidad de transferencia de calor en la matriz
AIREACIÓN	Se requiere la inyección de altos volúmenes de aire, el oxígeno soluble es limitado	Fácil aireación y alto intercambio de gases en la superficie de la matriz
CONTROL DE pH	Fácil control del pH por la homogeneidad del sistema	Difícil control de pH. Se deben emplear sustancias o sustratos con propiedades amortiguadoras
AGITACIÓN MECÁNICA	Se requiere para lograr una buena homogenización	No es necesaria, por tal razón se opera bajo condiciones estáticas.
ESCALAMIENTO	Disponibilidad de equipos a nivel industrial	Necesita el diseño de nuevos equipos y de un desarrollo ingenieril
INOCULACIÓN	Fácil inoculación	Fácil inoculación, el peligro de contaminación es menor
CONTAMINACIÓN	Alto riesgo de contaminación	El bajo contenido de

	bacteriana	humedad hace menos probable la contaminación por bacterias
GASTO ENERGÉTICO	Genera un elevado consumo energético	Los requerimientos de energía son bajos
TAMAÑO Y VOLUMEN DEL EQUIPO	Se manejan altos volúmenes y la inversión en equipos y tecnología es elevada	Se manejan volúmenes más bajos y el costo de los equipos es mucho menor
EFLUENTES Y POLUCIÓN	Altos volúmenes de efluentes y contaminantes	Bajos volúmenes de efluentes y contaminantes
CONCENTRACIÓN DEL PRODUCTO	Dependiendo del producto de interés	Fácil producción de propágulos y esporas fúngicas

Fuente: Raimbault, M. 1998.

4.2.3. FERMENTACIÓN BIFÁSICA

La fermentación bifásica está compuesta de una fermentación que se lleva a cabo secuencialmente en dos fases: una líquida y otra sólida. Generalmente, en una fermentación bifásica el hongo inicialmente crece en un medio líquido hasta el final de la fase de crecimiento exponencial, para después transferir esta biomasa a un sustrato sólido (Aponte *et al.*, 2000).

El medio líquido empleado en la primera etapa de producción contiene una concentración adecuada de carbono y nitrógeno, los cuales son esenciales para el crecimiento. En la fermentación sólida, el sustrato sólido además de proveer un área superficial alta para la aireación, sirve también como soporte físico al hongo para la producción de estructuras germinativas o conidios aéreos y puede ser usado como fuente de nutrientes (Lomer *et al.*, 2002). Dentro de las ventajas de la fermentación bifásica se encuentran (Lomer *et al.*, 2002):

- Si se evidencian signos de contaminación durante la fermentación líquida, el proceso puede ser detenido a tiempo para evitar la propagación de la contaminación en la fermentación sólida posterior.
- Aumenta la competitividad del hongo de colonizar el sustrato sólido y reducir la proporción de microorganismos contaminantes.
- La colonización y conidiación del sustrato sólido por el crecimiento activo del microorganismo durante la fermentación líquida es más rápida si se compara con una fermentación sólida en la cual no se emplea un inóculo proveniente de una fermentación líquida.
- Las características morfológicas del inóculo líquido (pellets o micelio libre) facilitan la cobertura del sustrato sólido y un crecimiento homogéneo del hongo sobre éste.

4.2.4. BIORREACTORES

Los biorreactores son aparatos donde se desarrollan una serie de reacciones, por la acción de microorganismos o de enzimas, bajo un ambiente controlado en el que se pretende un crecimiento celular o la producción de metabolitos de interés con una eficiencia óptima. Para lograr el desarrollo de un proceso fermentativo es necesario tener en cuenta que los microorganismos necesitan ciertos elementos nutricionales (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales y nutrientes específicos) para activar su metabolismo celular; adicionalmente, es indispensable la determinación y selección de las variables por medir, controlar y manipular en el curso de la fermentación (temperatura, velocidad de agitación, concentración de nutrientes, presión, oxígeno disuelto, pH, entre otros), para mantener unas condiciones óptimas de crecimiento (Pachón, 1997).

Debido a los altos costos de operación del reactor STR (Stirred Tank Reactor), surgió la necesidad de realizar investigaciones encaminadas a desarrollar un equipo que supliera de una manera más rentable y eficiente los altos coeficientes de transferencia de masa y los elevados índices de mezclado requeridos en la mayoría de los procesos de fermentación aerobios con un bajo consumo de energía. Es así como surgieron nuevos diseños de biorreactores, tales como los biorreactores de agitación neumática. A este tipo de biorreactor pertenecen las columnas de burbujeo y los reactores airlift, los cuales son equipos en donde el caldo de fermentación es aireado y agitado mediante la inyección de un gas (aire u oxígeno) suministrado a través de un distribuidor (sparger) en forma de pequeñas burbujas. El reactor airlift por su configuración geométrica, a diferencia de las columnas de burbujeo, induce la recirculación del medio de cultivo, lo que hace más atractiva e indicada su aplicación para el desarrollo eficiente de cualquier tipo de fermentación sumergida (Tsao, 1997; Doran, 1998).

4.2.4.1. FERMENTADOR AIRLIFT DE LAZO INTERNO

Los reactores airlift son equipos neumáticos de contacto gas-líquido empleados en procesos aerobios en los cuales el gas (aire u oxígeno) cumple las funciones de suministrar oxígeno y agitar el medio líquido contribuyendo a la transferencia de calor y de materia. Este concepto se utiliza principalmente en los reactores cilíndricos profundos que cuentan con conductos de aireación, tubos concéntricos abiertos en ambos extremos y localizados justo por encima del punto de difusión del aire (Tovar *et al.*, 1995). Se utilizan frecuentemente para cultivos de células animales y vegetales, además de catalizadores inmovilizados, debido a que los esfuerzos cortantes son muy inferiores a los que se presentan en los reactores agitados convencionales. El rasgo más característico que diferencia los reactores airlift de las columnas de burbujeo es que las corrientes de flujo de líquido están bien definidas, debido a la separación física de las corrientes ascendentes y descendentes (Doran, 1998).

Los reactores airlift proporcionan generalmente mejores mezclas que las columnas de burbujeo, excepto cuando se opera a velocidades bajas de líquido, donde se desarrollan corrientes de flujo heterogéneo. Además, esta configuración confiere un alto grado de estabilidad al flujo de líquido, pudiendo utilizarse mayores caudales de gas sin producir problemas de operación como puede ser el flujo pistón o nebulizaciones (Doran, 1998).

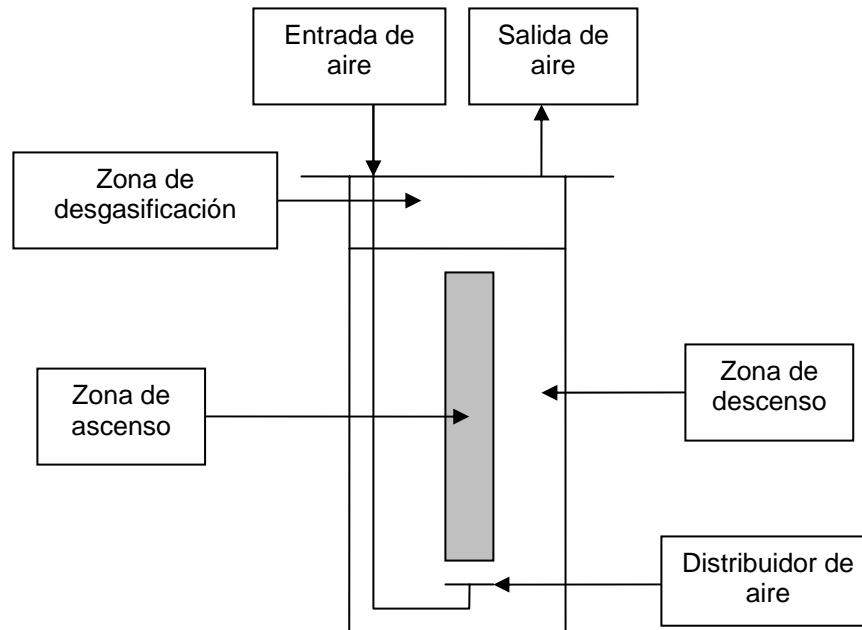


Figura 3. Estructura de un fermentador airlift de lazo interno (Fuente: Liu *et al.*, 2003).

Este tipo de biorreactores están constituidos por 3 secciones principales conectadas entre si (Figura 3): en la sección de ascenso (riser) el gas es burbujeado desde el fondo del reactor por medio de un distribuidor (sparger), en esta sección se inicia la dispersión del gas en el líquido en forma ascendente en contra de un fluido de dos fases (líquido con sólidos en suspensión). Esta sección tiene la más alta fracción de retención de gas debido a que el líquido posee una menor densidad y es el lugar donde existe mayor transferencia de masa gas-líquido.

El líquido elevado al final de la sección del riser entra a la zona de liberación de gas, denominada sección del separador gas-líquido donde el gas es removido. El líquido

más denso libre de gas fluye dentro de la sección de descenso (downcomer) y viaja hasta el fondo del reactor, donde es recirculado hacia la zona de ascenso. De esta forma, debido a la diferencia de presión hidrostática entre la zona de ascenso y la zona de descenso, el medio de cultivo en el interior del reactor airlift se mantiene en constante aireación y agitación (Siegel, 1992). Por lo general, la altura de los reactores airlift es alrededor de 10 veces su diámetro (Doran, 1998).

Los reactores de lazo interno con tubo concéntrico están compuestos de uno o varios tubos concéntricos dentro de la columna de burbujeo para la recirculación del líquido, este tipo de reactor tiene la ventaja de cumplir con los requerimientos necesarios de transferencia de masa, buena agitación y bajos consumos de potencia (Liu *et al.*, 1999). La principal diferencia entre el reactor de lazo interno y el de lazo externo radica en el diseño del separador gas-líquido, en los reactores de lazo interno es usualmente una extensión sin deflectores por encima de las secciones de ascenso y descenso, mientras que en los de lazo externo es una región de flujo horizontal sobre cualquiera de las secciones (Siegel, 1992).

El rendimiento de los reactores airlift está fuertemente influenciado por los detalles de construcción del fermentador. Por ejemplo, en los reactores de lazo interno, la variación de la distancia entre la parte inferior del tubo interno y la base del reactor modifica la presión en esta región y afecta la velocidad del líquido y el contenido de gas existente a través de toda la zona de ascenso. La profundidad a la que se coloca el tubo que conforma la zona de ascenso desde la parte superior del líquido afecta también las características de la mezcla y la transferencia de materia (Doran, 1998). Se ha demostrado que el tiempo de mezcla en el reactor airlift es mayor que en las columnas de burbujeo, ya que usualmente se requieren entre 4 y 9 ciclos para que el líquido alcance un mezclado total. El coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($K_L a$) es similar al de una columna de burbujeo, si las burbujas de gas recirculan a través de la zona de descenso. Sin embargo, cuando la zona de descenso no contiene burbujas de gas (usualmente es el caso de reactores airlift de

lazo externo), el coeficiente volumétrico de transferencia de masa es menor que el de las columnas de burbujeo (Chisti, 1989).

Las principales ventajas de un reactor airlift son (Siegel, 1995): 1) la circulación del líquido es inducida por el suministro de gas en forma de burbujas, formadas en el distribuidor. 2) el gas cumple una doble función de aireación y agitación, lo que facilita la fluidización de sólidos, posibilitando su utilización en procesos de tres fases. 3) satisfacen altos requerimientos de oxígeno de una manera eficiente, al presentar altos valores del coeficiente de transferencia de oxígeno. 4) son versátiles, ya que la operación puede ser continua o discontinua a diferentes presiones. 5) su construcción puede modificarse para trabajar con diferentes volúmenes en estudios hidrodinámicos. 6) puede ser empleado para la producción masiva de un amplio espectro de microorganismos tales como hongos, bacterias y levaduras. 7) de acuerdo con la construcción del equipo y el flujo del líquido (ciclo), permite una distribución y remoción del calor rápida y uniforme, donde el gas cumple una función importante como medio conductor. 8) por su configuración angosta, contribuye a que se ejerza una mayor turbulencia en el líquido, aumentando así la transferencia de masa y calor. 9) presenta bajos costos de construcción y operación ya que este tipo de reactor, al no incluir partes móviles, reduce el riesgo de contaminación y descarta la utilización de sellos y otras partes constitutivas; además, gracias al suministro de aire como medio de agitación, el consumo de potencia es bajo. 10) presenta aumentos en la productividad en algunos procesos de fermentación continua en comparación con los reactores de tanque agitado, ésto se atribuye al elevado coeficiente de transferencia de masa y a los bajos índices de cizalla (Chisti, 1989).

4.2.4.2. FERMENTADOR SÓLIDO DE BANDEJAS

Los fermentadores usados para llevar a cabo procesos de fermentación en sustrato sólido se pueden clasificar de acuerdo a sus características y aplicaciones (Durand, 2003). En el fermentador de bandejas (Figura 4), el sustrato inoculado se distribuye en bandejas inmóviles formando un lecho de altura generalmente inferior a 2cm. Las bandejas se colocan consecutivamente en hileras una sobre otra, con algunos centímetros de espacio entre ellas para permitir el flujo de aire y gases, y son colocadas en una cámara de acero inoxidable bajo condiciones controladas de temperatura y humedad durante cierto tiempo (Durand, 2003). Dentro de sus ventajas se encuentran: bajo costo de inversión en equipos, facilidad de aireación debido al aumento del área de transferencia, manejo de altos volúmenes de material, aunque no permite un control estricto del proceso de fermentación (Durand, 2003). A gran escala se emplean principalmente para la producción de productos alimenticios fermentados como natto, sake y soya.

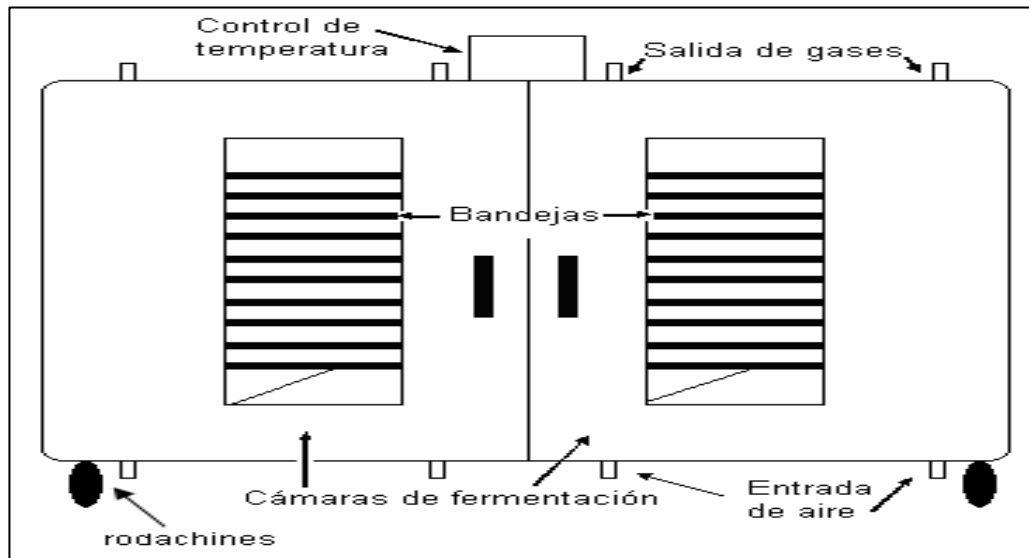


Figura 4. Aspecto externo de un fermentador de bandejas empleado en fermentación sólida (Fuente: Pinzón, 2001).

4.3. CONSUMO DE SUSTRATO EN UN CULTIVO CELULAR

Las células consumen sustrato del medio de cultivo y lo canalizan a través de diferentes rutas metabólicas, parte del sustrato puede utilizarse directamente en el crecimiento y en la síntesis de producto, mientras que otra parte se utiliza para generar la energía necesaria para las actividades de mantenimiento. El sustrato requerido para dicho mantenimiento varía considerablemente dependiendo del organismo y de las condiciones de cultivo (Doran, 1998). Para la determinación de los parámetros de crecimiento es necesario implementar y estandarizar técnicas analíticas que permitan evaluar las transformaciones llevadas a cabo por las células.

La presencia de azúcares reductores se puede determinar mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), la cual es una técnica de oxidorreducción que se basa en la capacidad que tiene la glucosa de oxidarse y reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico en condiciones alcalinas. Esta reducción se evidencia por la producción de una coloración que se hace más intensa a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores, razón por la cual esta técnica se encuentra dentro de las denominadas técnicas colorimétricas (Miller, 1959). La concentración se determina mediante la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro de acuerdo con la ley de Lambert - Beer.

4.4. DETERMINACIÓN DE BIOMASA FÚNGICA

4.4.1. N-ACETILGLUCOSAMINA

La pared de los hongos es rígida, lo que proporciona forma y textura a la célula; es funcionalmente inerte, pero necesaria para la célula en razón de que sin ella las enormes tensiones superficiales que tendría que soportar la destruirían. Los estudios de la composición química de la pared celular de los hongos muestran que ésta es bastante compleja, pero en general, tiene como constituyente principal un polisacárido (quitina, glucano, escleroglucano, entre otros), que difiere en su

composición según se trate de un moho o una levadura y entre géneros y especies presentan grandes diferencias (Franco & Santaella, 2000).

El compuesto básico de la pared celular de un hongo filamentoso es la quitina, la cual es un polímero lineal, similar a la celulosa, pero consiste en residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) con enlaces β -(1 \rightarrow 4) en lugar de residuos de glucosa. En la quitina el grupo hidroxilo (-OH) en el átomo del carbono en posición 2 de cada subunidad de glucosa está reemplazado por un grupo que contiene nitrógeno. Como los residuos de GlcNAc están cargados negativamente, las fibras de quitina son polianiónicas y pueden formar complejos con varios cationes. La fijación de los cationes a la matriz de quitina le confiere rigidez y resistencia a la pared celular. Naturalmente, el contenido de quitina es muy variable, no se encuentra en algunos hongos pero es el principal compuesto de otros (Horton, 1995).

4.4.2. CUANTIFICACIÓN DE N-ACETILGLUCOSAMINA

Muchos autores han descrito métodos indirectos para cuantificar la biomasa que se obtiene por fermentación sólida. Estos métodos indirectos están basados en la medición del contenido de diferentes componentes celulares tales como quitina, ergosterol, proteínas y ácidos nucleicos; pero también a través de la medición de actividades biológicas como la respiración. El contenido de los diferentes componentes celulares puede cambiar de manera específica entre los hongos dependiendo de la especie, de las condiciones de crecimiento y de la edad del cultivo. Uno de los métodos más utilizados para la determinación del crecimiento fúngico durante un proceso de fermentación sólida es la cuantificación del contenido de glucosamina, ya que se ha demostrado que este componente celular es proporcional a la biomasa de una muestra determinada (Desgranges *et al.*, 1993; Durand *et al.*, 1991; Tomaselli *et al.*, 2001).

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que el contenido de glucosamina varía de acuerdo con la edad y las condiciones del cultivo, la composición del medio, el

método de cultivo usado y es así mismo afectado por la naturaleza de la fuente del carbono. La principal desventaja de la técnica es que el tiempo necesario para el procesamiento de las muestras excede las 24 horas (Krishna, 2005).

4.5. DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA PROCESOS FERMENTATIVOS

Un modelo que conduzca al mejoramiento de los procesos fermentativos debe empezar por la medición del rendimiento del producto de interés como una respuesta a la influencia de factores tales como la composición del medio de cultivo (balance nutricional, fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno), temperatura, pH, aireación, entre otros (Demain *et al.*, 2000).

El desarrollo y el comportamiento de los procesos fermentativos han sido modelados y explicados frecuentemente usando los métodos clásicos de experimentación, con un solo factor que cambia o varía en el tiempo, mientras que los demás se mantienen constantes. Sin embargo, las técnicas de diseño de experimentos presentan una alternativa más equilibrada para lograr el modelamiento de este tipo de procesos. Idealmente, el diseño de experimentos es un proceso secuencial (Haaland, 1989 citado por Demain *et al.*, 2000) en el que los factores más importantes son estudiados inicialmente para determinar las condiciones nutricionales y físicas que ejercen una mayor influencia sobre la variable de respuesta clave y posteriormente se van eliminando en orden de significancia, hasta obtener una lista más manejable y real de los factores para optimizar el proceso.

4.5.1. DISEÑOS TIPO FACTORIAL FRACCIONADO

El diseño factorial fraccionado es un modelo que incluye sólo una fracción de todas las combinaciones posibles que comprende un factorial completo (Demain *et al.*, 2000). Los diseños factoriales fraccionados consisten en 2 partes expresadas como N^{k-p} , donde N hace referencia a los niveles correspondientes de cada factor, k es el número total de factores involucrados y $(1/2)^p$ es la fracción del diseño de un

factorial completo, donde el valor de p es menor al valor de k . La utilidad de un diseño factorial fraccionado se basa en la noción de que los efectos principales son los más importantes para el modelamiento y entendimiento de un proceso multifactorial, asumiendo que la interacción de los factores no es significativa.

Una interacción estadística entre dos factores ocurre cuando el efecto principal de uno de los factores depende del nivel elegido para el segundo factor. La aplicación de este modelo de experimentos en procesos fermentativos se da por ejemplo, en procesos en los cuales se evalúan los efectos de un número elevado de factores tales como la temperatura, la salinidad y el pH sobre el crecimiento de ciertos microorganismos (Demain *et al.*, 2000).

4.5.2. DISEÑO SIMPLEX

El método simplex es una técnica evolucionaria que puede ser usada para mejorar continuamente y/o lograr la optimización de procesos (Deming & Morgan, 1973 citado por Demain *et al.*, 2000). El procedimiento comienza por la selección de dos o más factores críticos para el proceso, el número de experimentos que se llevan a cabo es igual al número de variables o factores críticos. Los resultados de las corridas experimentales establecen la dirección hacia la cual se encuentra la mejor respuesta para cada factor evaluado.

El diseño simplex es un modelo que se utiliza cuando se tienen muchos factores, como en las etapas exploratorias o de screening o bien cuando es necesario utilizar un mínimo de puntos de prueba debido al costo de cada corrida experimental. El diseño consiste de $N=k+1$ puntos, que es el número de parámetros en el modelo de primer orden con k factores. Por lo tanto, se requieren de repeticiones si se quiere probar la significancia de los coeficientes, lo que aumenta el número de corridas. Un simplex es una figura geométrica de n dimensiones constituido de $n+1$ dimensiones donde cada dimensión corresponde a una variable a ser optimizada (Gutierrez & De la Vara, 2004).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), en el Centro de Investigaciones Tibaitatá ubicado en el Km.14 - vía Mosquera.

5.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA DE INTERÉS

Para este trabajo se empleó la cepa del hongo *Trichoderma koningii* codificada como Th003, suministrada por el Banco de Germoplasma de Microorganismos del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica tras ser reactivada en agar PDA (agar papa dextrosa) (Anexo 5). La colección de trabajo se mantuvo a través de repiques en agar PDA por la técnica de punción central con un máximo de dos pases sucesivos, los cuales se incubaron durante siete días a una temperatura de 25°C para permitir la esporulación del hongo.

5.2. FERMENTACIÓN BIFÁSICA

5.2.1. Producción de preinóculos de *Trichoderma koningii* Th003

Para la obtención de los preinóculos de *T. koningii* Th003, se preparó una suspensión madre de conidios a partir del raspado superficial de una caja de agar PDA con el hongo esporulado. Los conidios se suspendieron en 10ml de agua destilada con Tween 80 al 0.1% (v/v), esta suspensión madre se homogeneizó en un agitador vibratorio durante 10 segundos, se realizaron diluciones decimales seriadas con la adición de Tween 80 al 0.1% (v/v) y se ajustó la concentración inicial de los preinóculos a 1×10^7 conidios/ml mediante recuento de los conidios en cámara de Neubauer.

Posteriormente, se inocularon 2ml de la suspensión de conidios preparada anteriormente en erlenmeyers de 125ml que contenían 25ml del medio estéril SL1 compuesto principalmente de arroz y melaza (Anexo 5) estandarizado previamente (Peña, 2002), y se incubaron a 25°C con agitación constante (180 rpm) durante 24 horas. Bajo las condiciones mencionadas anteriormente se llevaron a cabo los cambios de volumen correspondientes a erlenmeyers de 500ml y 1000ml conservando en todos los casos la relación geométrica de 1/5 respecto al volumen empleado. Se realizaron cuatro repeticiones para obtener un volumen de preinóculo equivalente a 1408ml. La concentración final se determinó por recuento en cámara de Neubauer y la pureza del caldo se verificó mediante la observación microscópica con azul de lactofenol.

5.2.2. Descripción del biorreactor

El equipo empleado para llevar a cabo las fermentaciones en medio líquido fue un biorreactor airlift de lazo interno diseñado y construido en un trabajo previo en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica (Flórez, 2002). El equipo está acoplado a una línea de aire, que se esteriliza previamente mediante filtración y se humidifica para ser luego inyectado desde el fondo del biorreactor en forma de burbujas a través de un distribuidor anular de acero inoxidable que posee 36 agujeros de 1mm de diámetro cada uno. Según los parámetros de diseño, el biorreactor presenta un volumen de trabajo de 20 litros, con una zona de desgasificación de 5 litros aproximadamente. Además, su construcción permite el uso de diferentes secciones del riser para trabajar con diferentes volúmenes de medio líquido.

El caudal de aire inyectado puede ser monitoreado visualmente a través de un rotámetro y controlado mediante el accionamiento de una válvula. Por otra parte, el control de la temperatura se realiza mediante un pirómetro digital, el cual se encuentra conectado a una resistencia que cumple la función de calentamiento y mantenimiento de la temperatura, además está acoplado a una termocupla que

permite el registro de la temperatura en todo momento del proceso de fermentación (Urón, 2005).

5.2.3. Fermentación líquida

5.2.3.1. Selección de las condiciones de fermentación líquida

Se realizaron 6 fermentaciones sumergidas empleando el medio SL1 estandarizado previamente para este microorganismo (Peña, 2002). Este medio tiene una relación C/N de 8.89 y está compuesto en un 80% de carbohidratos estructurales en forma de almidón hidrosoluble principalmente (Anexo 5). Las condiciones iniciales para llevar a cabo la fermentación líquida con el hongo *T. koningii* fueron determinadas en trabajos anteriores (Peña, 2002). Estas condiciones fueron: temperatura de 25°C y un tiempo de fermentación de 48 horas. Los factores a evaluar se escogieron teniendo en cuenta dos tipos de características: relacionadas con el equipo y con las condiciones físico-químicas de la fermentación del hongo *T. koningii* cepa Th003.

El volumen de antiespumante fue seleccionado como variable de estudio ya que la generación de espuma ocasiona pérdidas de la biomasa durante el proceso de fermentación, disminuyendo su productividad. Según estudios previos (Liu *et al.*, 2003; Pelton, 2002), la concentración que generalmente se emplea en procesos de fermentación que involucran fermentadores airlift es de 0.1% v/v y este valor se utilizó como nivel alto en el diseño experimental. La altura de la zona de ascenso juega un papel importante en el desarrollo de una fermentación líquida, ya que la altura de la zona de ascenso está relacionada con la recirculación del caldo de fermentación, la eliminación de zonas muertas y el tiempo de mezcla. El caudal de aire inyectado al sistema también fue seleccionado como variable de estudio, puesto que según Doran (1998), se ha demostrado que tiene una influencia directa sobre la velocidad de crecimiento, la concentración de biomasa y la morfología del microorganismo empleado. De otro lado, como variable de respuesta se escogió la concentración de biomasa, puesto que dicha biomasa serviría para la posterior

inoculación del sustrato sólido. Los niveles evaluados para cada variable se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Niveles evaluados en la fermentación líquida del hongo *T. koningii* Th003 en un biorreactor airlift.

Factores	Nivel bajo	Nivel alto	Variable de respuesta
Altura de la zona de ascenso	44.3cm	55.1cm	Concentración de biomasa (micelio principalmente)
Caudal del gas de entrada	0.5vvm	0.75vvm	
Volumen de antiespumante	0.075% (v/v) 15ml	0.1% (v/v) 20ml	

El diseño experimental aplicado para generar la matriz o núcleo de experimentos inicial fue un diseño factorial fraccionado a la mitad. Los valores de los factores seleccionados para llevar a cabo las 4 fermentaciones líquidas iniciales que se obtuvieron aplicando este diseño experimental, se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de los factores evaluados en la fermentación líquida del hongo *T. koningii* Th003 en un biorreactor airlift.

Fermentación	VARIABLES		
	Altura del riser (cm)	Caudal de aire (vvm)	Volumen de antiespumante (ml)
1	44.3	0.75	15
2	44.3	0.75	20
3	55.1	0.5	15
4	55.1	0.5	20

Para llevar a cabo la implementación de las fermentaciones adicionales se empleó el método evolucionario simplex (K+2), donde K es el núcleo de la matriz, equivalente a las 4 fermentaciones iniciales. Para cumplir la condición de evolucionario, es decir,

que permita avanzar hacia la optimización del proceso, se realizaron 2 fermentaciones adicionales, cuyos niveles fueron el resultado de la elección de las mejores respuestas de las 4 fermentaciones anteriores (Tabla 4).

Para obtener los nuevos tratamientos se halló el centroide de la hiperfase para cada variable, el cual estaba definido por:

$$P_c = (1/k)(P_1 + P_2 + \dots + P_{j-1} + P_{j+1} + \dots + P_k + P_{k+1})$$

Donde:

P_c : Centroide de la hiperfase

K : Número de dimensiones del simplex

P_j : Vértice correspondiente a la peor respuesta

El nuevo simplex fue definido por esta fase y un nuevo vértice P que correspondió a la reflexión del vértice rechazado P_j a través de la fase por el centroide P_c :

$$P = P_c + (P_c - P_j)$$

Tabla 4. Valores de los factores evaluados para las 2 fermentaciones líquidas adicionales mediante la aplicación del método simplex.

Fermentación	VARIABLES		
	Altura del riser (cm)	Caudal de aire (vvm)	Volumen de antiespumante (ml)
5	58.7	0.42	22
6	68.3	0.20	18

Cada una de las fermentaciones líquidas realizadas (6 en total) constituyó un único tratamiento, sin repeticiones.

5.2.3.2. Fermentación en medio líquido

La fermentación líquida se llevó a cabo en un biorreactor airlift bajo las condiciones descritas anteriormente. El monitoreo del crecimiento fúngico se realizó a través de la toma de muestras de 250ml del caldo de fermentación, cada 6 horas durante las 48 horas del proceso de fermentación, para un total de 8 muestreos. La toma de muestras se realizó empleando una bomba peristáltica PD-50006.

La pureza del cultivo se verificó mediante una coloración de azul de lactofenol para la observación de estructuras fúngicas. La viabilidad del hongo se evaluó mediante la técnica de recuento en placa sobre agar Saboureaud-Rosa de Bengala y la germinación de conidios se evaluó a través de la siembra en agar extracto de malta. Ambos procedimientos se realizaron por triplicado y siguiendo el protocolo establecido para tal fin en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica (Anexos 3 y 4).

5.2.3.3. Determinación del consumo de sustrato

El consumo de sustrato fue evaluado mediante la técnica colorimétrica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) siguiendo el protocolo descrito por Miller (1959) para determinar la presencia de azúcares reductores. Previamente se elaboró una curva patrón de DNS con la cual fue posible cuantificar el consumo de sustrato en función del tiempo de fermentación (Anexo 1). Esta metodología se llevó a cabo después de centrifugar muestras de 2ml del caldo de fermentación, durante 20 minutos a 15000 rpm, a una temperatura de 2°C y recuperando el sobrenadante.

5.2.4. Determinación de biomasa fúngica a partir de la cuantificación de N-acetilglucosamina

Para la cuantificación de la biomasa fúngica se empleó la técnica colorimétrica de la glucosamina, según el protocolo descrito por Drysdale & Ride (1972), Tomaselli y colaboradores (2001) y Durand y colaboradores (1991).

5.2.4.1. Peso seco

Para cada muestra se centrifugaron 160ml del caldo de fermentación durante 30 minutos a 8000 rpm y a una temperatura de 8°C en una centrifuga Sorval Biofuge Stratos modelo D-37520, la biomasa húmeda obtenida se secó durante 72 horas a 50°C hasta obtener un peso constante (Tomaselli *et al.*, 2001).

5.2.4.2. Tratamiento ácido-térmico

La biomasa seca obtenida en el numeral anterior fue resuspendida en 4ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 72% (v/v) y se incubó en un baño termostataado durante 30 minutos a 25°C con agitación constante (130 rpm). Posteriormente se realizó una dilución en 54ml de agua destilada estéril y esta mezcla se esterilizó en autoclave durante 2 horas a 121°C. A cada una de las muestras se le ajustó el pH a 7.0 por adición de hidróxido de sodio (NaOH) 15M y 0.5M respectivamente, usando un potenciómetro Schott.

5.2.4.3. Ensayo colorimétrico

Para el desarrollo del ensayo colorimétrico se siguió el protocolo descrito por Drysdale & Ride (1972), usando como blanco el medio estéril autoclavado sin inoculación del hongo. Inicialmente se mezclaron 1.5ml de la solución neutralizada en la etapa anterior con 1.5ml de nitrito de sodio (NaNO₂) al 5% (p/v) y 1.5ml de sulfato básico de potasio (KHSO₄) al 5% (p/v). Esta solución fue sometida a

agitación constante (130rpm) durante 15 minutos a 25°C en un baño termostatado. Se sacaron por triplicado muestras de 1.5ml y a cada una se le adicionaron 0.5ml de sulfamato de amonio ($\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$) al 12.5% (p/v) y se sometieron a una agitación de 130rpm durante 5 minutos a 25°C. Posteriormente se adicionaron 0.5ml de MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride hydrate) al 0.5% (p/v), las muestras fueron sometidas a una temperatura de ebullición de 92°C durante 3 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, a estas muestras se les adicionó 0.5ml de cloruro férrico (FeCl_3) al 0.5% (p/v) para completar un volumen final de 3ml y se dejaron durante 30 minutos en reposo antes de llevar a cabo la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Spectronic Milton Roy 601 a una longitud de onda de 650nm. La concentración de N-acetilglucosamina se determinó al reemplazar los valores de absorbancia obtenidos en la curva de calibración elaborada para tal fin.

La curva de calibración para glucosamina se construyó siguiendo el protocolo descrito anteriormente, utilizando como patrón glucosamina hidrociorada y como blanco agua destilada estéril (Drysdale & Ride, 1972) (Anexo 2).

5.2.5. Fermentación sólida

5.2.5.1. Preparación del sustrato sólido

El sustrato sólido estandarizado previamente (Peña, 2002) compuesto de arroz y salvado de trigo principalmente y codificado como SS1, se preparó colocando 550g de éste sustrato en bolsas de polietileno de alta densidad y adicionando 352ml de agua para obtener una humedad teórica inicial del 39%. Las bolsas con sustrato SS1 se sometieron a un proceso de esterilización a una temperatura de 121°C durante 20 minutos y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

5.2.5.2. Descripción del biorreactor

El fermentador de bandejas que se empleó para la realización de este trabajo fue diseñado en un trabajo previo en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica (Pinzón, 2001). Este equipo consta de dos cámaras independientes, cada una de las cuales cuenta con un escabiladero en acero inoxidable que sirve como soporte a 60 bandejas de 70cm de largo por 44cm de ancho y 1cm de profundidad. Adicionalmente, el equipo posee un sistema de distribución de aire interno tipo flauta entre bandejas, que permite la adecuada distribución de aire sobre el sustrato y un control de temperatura PID mediante un pirómetro digital que controla una resistencia eléctrica. El proceso de esterilización del fermentador se realiza *in situ* con calor seco a una temperatura de 100°C durante 4 horas.

El equipo tenía una capacidad volumétrica por cámara de 48000cm³ y por bandeja de 1680cm³. El nivel alto del número de bandejas por utilizar (15), corresponde a un espacio de 4cm entre bandejas y un volumen de trabajo de las bandejas de 25200cm³; mientras que para el nivel bajo del número de bandejas por utilizar (10), el espacio entre bandejas corresponde a 6cm y un volumen de trabajo de las bandejas de 16800cm³.

5.2.5.3. Selección de las condiciones de fermentación sólida

Se realizaron 12 fermentaciones sólidas empleando el medio SS1 estandarizado previamente para este microorganismo (Peña, 2002). Este medio tiene una relación C/N de 8.89 y está compuesto en un 80% de carbohidratos estructurales, en forma de almidón hidrosoluble, principalmente (Anexo 5). La elección de los factores a evaluar se efectuó teniendo en cuenta 3 tipos de características: las relacionadas con el equipo, con las condiciones físico-químicas de la fermentación y las relacionadas con el hongo *T. koningii* cepa Th003.

Se eligió la temperatura debido a que es un factor clave dentro del proceso de fermentación sólida, puesto que está directamente relacionado con la actividad metabólica del microorganismo y la velocidad de crecimiento de éste (Krishna, 2005). Por tanto, es importante tener presente el caudal del aire inyectado al sistema debido a que regula el control de la temperatura y de la humedad dentro del sistema a través de la transferencia de masa y la remoción de calor (Krishna, 2005).

El volumen del inóculo líquido obtenido en el fermentador airlift y aplicado al sustrato sólido es un factor importante, ya que de su concentración final depende la velocidad de colonización del sustrato sólido (Krishna, 2005; Pandey, 2003). Por último, la cantidad de bandejas empleada para llevar a cabo cada corrida experimental es importante, puesto que el espacio entre bandejas limita la entrada de luz al sistema (sustrato+microorganismo). Se ha demostrado en trabajos previos (Roncal *et al.*, 2003) que este factor es fundamental para que ocurra el proceso de esporulación de algunos hongos filamentosos incluyendo al hongo *T. koningii*.

La variable de respuesta escogida fue la concentración final de conidios, puesto que éstos son el producto biotecnológico de interés, al constituir el principio activo de un bioplaguicida. Los niveles seleccionados para cada uno de los factores se determinaron teniendo en cuenta los valores reportados por la literatura consultada para este tipo de procesos (Tabla 5).

Tabla 5. Niveles evaluados para la fermentación sólida del hongo *T. koningii* Th003 en un biorreactor de bandejas.

VARIABLES DE ESTUDIO	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO	VARIABLE DE RESPUESTA
Temperatura	25°C	27°C	Concentración de conidios
Cantidad de bandejas	10	15	
Volumen de inóculo líquido	110ml	220ml	

Caudal de aire inyectado	0vvm, 0.25vvm, 0.5vvm y 1vvm	
-------------------------------------	---------------------------------	--

El diseño experimental empleado para generar el núcleo de experimentos inicial en la fermentación sólida fue un factorial fraccionado a la mitad, el cual implicó llevar a cabo 8 corridas experimentales. Las condiciones de operación para cada fermentación se establecieron de acuerdo con los tratamientos obtenidos por el diseño de experimentos seleccionado (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de los factores evaluados en la fermentación sólida del hongo *T. koningii* Th003 en un biorreactor de bandejas.

Fermentación	VARIABLES			
	Caudal de gas (vvm)	Temperatura (°C)	Número de bandejas	Volumen de inóculo líquido (ml)
1	0.5	27	15	220
2	0.5	25	15	110
3	1.0	27	10	110
4	1.0	25	10	220
5	0.25	25	10	110
6	0	25	15	220
7	0	27	15	110
8	0.25	27	10	220

Para llevar a cabo la implementación de las fermentaciones adicionales se empleó el método evolucionario simplex (K+2), donde K es el núcleo de la matriz, equivalente a las fermentaciones pertenecientes al núcleo de experimentos. Para cumplir la condición de evolucionario, es decir, el acercamiento hacia las condiciones óptimas, se realizaron 4 fermentaciones adicionales (Tabla 7), cuyos niveles se obtuvieron siguiendo el procedimiento empleado en la fermentación líquida (numeral 5.2.3.1.).

Tabla 7. Valores de los factores evaluados para las 2 fermentaciones sólidas adicionales mediante la aplicación del método simplex.

Fermentación	VARIABLES			
	Caudal de gas (vvm)	Temperatura (°C)	Número de bandejas	Volumen de inóculo líquido (ml)
9	0.33	24.33	8	220
10	0.33	24.33	8	110
11	0.58	25.76	12	94.28
12	0.58	25.76	12	47.14

Para cada una de las fermentaciones sólidas o tratamientos evaluados se emplearon cuatro repeticiones.

5.2.5.4. Inoculación del sustrato sólido

El sustrato sólido obtenido en la etapa anterior se inoculó con el caldo de fermentación proveniente del biorreactor airlift (numeral 5.2.3.2.), el volumen de inóculo para cada bolsa fue dependiente del tratamiento (Tablas 6 y 7); por lo tanto, la humedad teórica inicial del sustrato dependía directamente del tratamiento evaluado. La homogeneización del inóculo sobre el sustrato se realizó manualmente. Posteriormente, el sustrato inoculado se distribuyó de manera uniforme sobre las bandejas de acero inoxidable del fermentador sólido en un cuarto estéril de acuerdo con el tratamiento a emplear. Finalmente, el equipo se cerró herméticamente y se ajustaron la temperatura y el caudal de aire según las condiciones de fermentación establecidas por el diseño experimental.

5.2.5.5. Cinética de crecimiento en medio sólido

El tiempo de fermentación fue de 7 días, ya que éste es el tiempo requerido por el hongo *T. koningii* cepa Th003 para llevar a cabo la colonización del sustrato sólido y su esporulación y fue establecido en un trabajo anterior (Peña, 2002). La evaluación del proceso de esporulación del hongo se realizó durante los días 5, 6 y 7 de

fermentación a partir de un muestreo diario según una distribución espacial preestablecida (Figura 5).

La cuantificación de la biomasa (expresada en conidios/g) se realizó mediante la técnica de recuento de conidios en cámara de Neubauer. Para esto, se tomaron 0.1g de muestra homogeneizada (conidios + sustrato) y se adicionaron a 10ml de agua destilada con Tween 80 al 0.1% (v/v), esta suspensión se homogeneizó en un agitador vibratorio durante 10 segundos y posteriormente se realizaron diluciones decimales seriadas hasta obtener la dilución apropiada (10^{-3}) usando agua destilada con Tween 80 al 0.1% (v/v), estimando el número de conidios/ml. El número de conidios/g de sustrato se obtuvo multiplicando el promedio del número de conidios/ml por el volumen empleado en la suspensión inicial y dividiendo por el peso de la muestra.

La viabilidad del hongo se evaluó realizando siembras en agar Saboureaud-Rosa de Bengala y la germinación del hongo se evaluó mediante siembra en agar extracto de malta, aplicando los procedimientos establecidos para tal fin (Anexos 3 y 4).

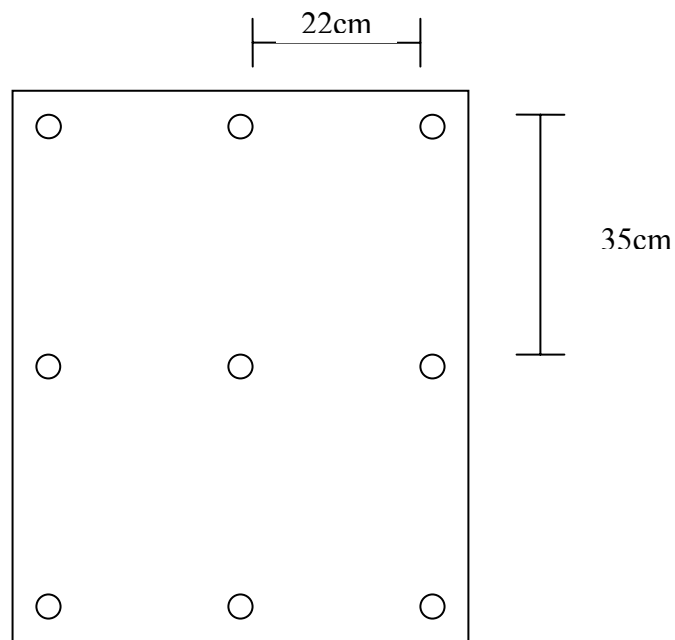


Figura 5. Ubicación de toma de muestras en las bandejas de acero inoxidable del fermentador sólido.

5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos obtenidos se realizó empleando el programa estadístico Statgraphics. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza ANOVA y a la prueba de comparación de medias LSD (diferencia mínima significativa) a un nivel de confianza del 95%; además se emplearon cartas de pareto para determinar el efecto de los factores evaluados sobre la variable de respuesta.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. FERMENTACIÓN BIFÁSICA

6.1.1. FERMENTACIÓN LÍQUIDA

Cuando se llevó a cabo la producción de *T. koningii* Th003 a nivel de erlenmeyer (precultivo), se observó un rápido desarrollo del micelio en el medio de cultivo y abundante acumulación en las paredes del recipiente (Figura 6); además, se evidenció un incremento de la viscosidad y un cambio gradual de color del medio (oscurecimiento) al final del periodo de incubación (72 horas). Sin embargo, la morfología micelial fue variable observándose la presencia de pellets o aglomerados de micelio hasta la esporulación del hongo en las paredes del recipiente, lo cual es un indicativo de las diferentes estructuras que presenta el hongo en medio líquido.



Figura 6. Aspecto macroscópico de los precultivos del hongo *T. koningii* Th003.

6.1.1.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN BIORREACTOR AIRLIFT

Los datos de peso seco obtenidos experimentalmente (Tabla 8), permitieron comprobar la hipótesis de que los factores evaluados afectaron directamente la productividad del proceso de fermentación líquida, ya que las diferencias entre

tratamientos alcanzaron hasta un 43.33%. Además, la variación de la morfología del hongo *T. koningii* Th003 fue un elemento que influyó sobre la biomasa obtenida al final del proceso de fermentación líquida, por lo cual se deduce que es necesario realizar un control exacto sobre las condiciones de incubación respecto a la etapa de precultivo; la alteración de estas condiciones (temperatura y agitación, principalmente) se refleja sobre la cantidad de biomasa final producida y sobre el tipo de morfología adoptada por el hongo para iniciar la fermentación posterior en el biorreactor airlift.

Se determinó que el mejor tratamiento se presentó durante la fermentación líquida 4, con una producción final de biomasa de 15.61 g/l, en la cual las condiciones de operación fueron: caudal de aire 0.5vvm, altura de la zona de ascenso 55.1cm y volumen de antiespumante 20ml; mientras que el peor tratamiento se presentó durante la fermentación líquida 1 con una producción final de biomasa de 4.19 g/l, bajo las siguientes condiciones de operación: caudal de aire 0.75vvm, altura de la zona de ascenso 44.3cm y volumen de antiespumante 15ml.

Tabla 8. Resultados de peso seco del hongo *T. koningii* Th003 en biorreactor airlift, tiempo de fermentación: 42 horas. Las letras representan los grupos homogéneos obtenidos al aplicar un análisis de comparación de medias LSD con un nivel de confianza del 95% (Anexo 6a).

FERMENTACIÓN	BIOMASA SECA (g/l)	GRUPOS HOMOGÉNEOS
1	4.19	a
2	9.91	ab
3	8.86	ab
4	15.61	b
5	6.34	ab
6	8.65	ab

El tiempo de fermentación y la concentración de los preinóculos, establecidos en trabajos previos y empleados para este estudio (Peña, 2002), están directamente relacionados con la productividad del proceso de producción masiva del hongo *T. koningii* Th003. Respecto a la concentración de los preinóculos usados para el proceso de fermentación líquida en este trabajo, Crueger (1989) y Papagianni (2002) argumentan que con el fin de tener suficiente inóculo para el proceso de fermentación es necesario llevar a cabo una etapa de precultivo, que equivale al 5-10% del volumen total empleado para la fermentación líquida en el biorreactor, puesto que si una fermentación inicia con demasiado o poco inóculo del realmente necesario, el crecimiento del microorganismo se retrasa y la velocidad de formación de producto que en este caso es biomasa, puede ser insatisfactoria; viéndose esto reflejado en las cantidades de biomasa obtenidas al final del proceso, las cuales difieren a las esperadas inicialmente.

Según Peña (2002), el tiempo de fermentación óptimo para este hongo es de 48 horas, pero en el presente trabajo se encontró que el incremento de biomasa (expresada en g/l de biomasa seca) entre la hora 42 y la hora 48 no es importante sobre la cantidad de biomasa global generada al final proceso de fermentación, aproximadamente de 1g/l para todas las corridas experimentales, excepto en la fermentación 2 y 3 en las que el incremento fue de 2.5g/l.

Sin embargo, se utilizaron para los análisis posteriores los valores de la hora 42 de fermentación, debido a que los valores de biomasa seca obtenidos permiten suponer que en este tiempo el hongo se encuentra todavía en su idiofase y está listo para ser transferido al sustrato sólido. Por esta razón, se llegó a la conclusión de que no es necesario llevar el proceso de fermentación líquida en biorreactor airlift hasta el tiempo mencionado por Peña (2002), principalmente por practicidad y costos de operación.

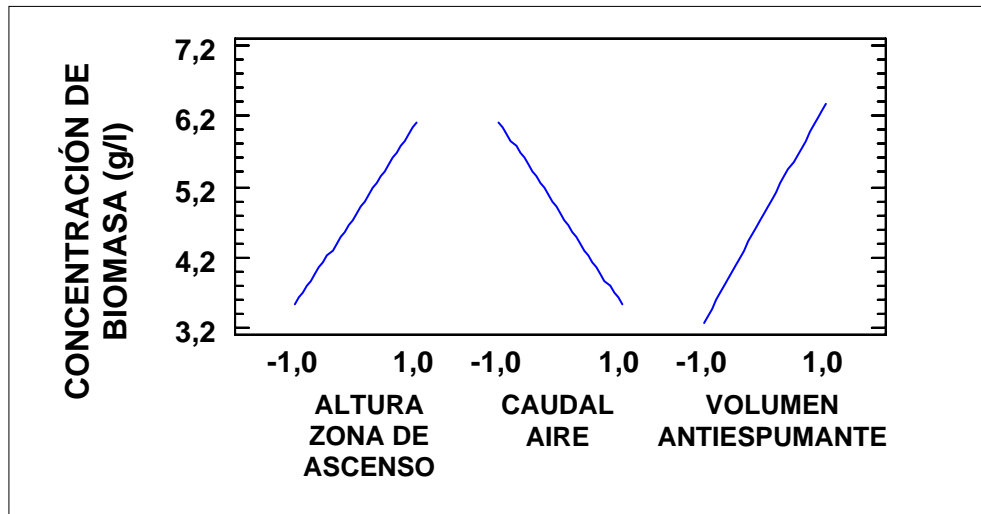


Figura 7. Representación gráfica de los efectos principales de los factores evaluados sobre la concentración de biomasa en la fermentación líquida. Las pendientes representan los efectos negativos o positivos.

A partir de los resultados obtenidos se llevó a cabo un análisis de Pareto (Figura 8) y un análisis de interacciones entre factores (Figura 7) que permitió establecer que tanto las condiciones de operación, la geometría del equipo y las condiciones fisicoquímicas tienen una influencia directa sobre la formación del producto (biomasa) durante el proceso de fermentación. Al analizar por separado los efectos de cada uno de los factores evaluados, se observó que el mayor efecto lo tuvo el volumen de antiespumante, siendo éste un efecto positivo para el sistema de fermentación. De igual manera, se observó que el factor altura de la zona de ascenso tuvo un efecto positivo y el factor caudal de aire, tuvo un efecto negativo sobre la producción de biomasa al final del proceso (Figuras 7 y 8).

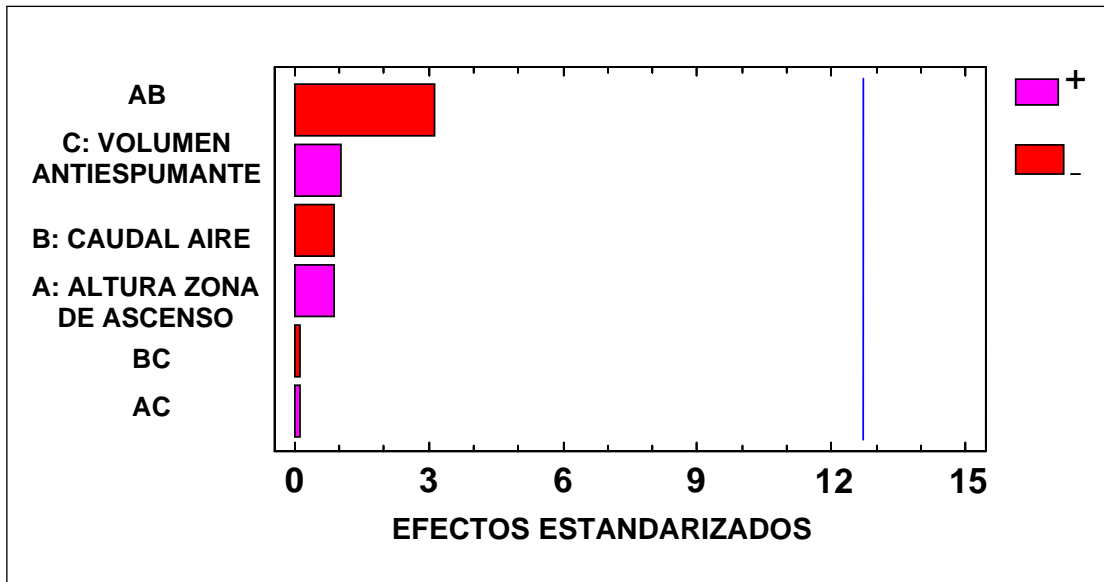


Figura 8. Carta de Pareto para los factores evaluados en un biorreactor airlift para la fermentación líquida.

De acuerdo con el análisis de Pareto (Figura 8) ninguno de los factores evaluados presentó un efecto significativo sobre la concentración de biomasa obtenida después del proceso de fermentación líquida, aunque se pudo observar que el efecto más importante fue la interacción de los factores altura de la zona de ascenso y el caudal de aire (AB) con un efecto negativo, mientras que el menor efecto lo presentó la interacción de los factores caudal de aire y volumen de antiespumante (BC) de forma negativa, así como la combinación altura de la zona de ascenso y volumen de antiespumante (AC) tuvo un efecto positivo sobre el proceso de fermentación líquida.

En general, para todas las fermentaciones llevadas a cabo se presentó una morfología mixta (pellets+micelio libre) en diferentes proporciones. Para las fermentaciones 1 y 3 en las que la velocidad de agitación fue elevada debido a los altos caudales de aire inyectados (≥ 0.75 vvm), el micelio libre fue la forma de biomasa predominante. Por el contrario, en las fermentaciones 2, 4, 5 y 6 a velocidades de agitación y aireación bajas (≤ 0.5 vvm), la biomasa estaba constituida principalmente por micelio en forma de pellets.

Así mismo, en las fermentaciones 1 y 3 la producción final de biomasa seca fue baja con valores de 4.19 y 8.86 g/l respectivamente, en comparación con las fermentaciones 2, 4, 5 y 6 donde la concentración de biomasa obtenida al final de cada fermentación fue de 9.91 g/l, 15.61 g/l, 6.34 g/l y 8.65 g/l respectivamente, estableciéndose que si existieron diferencias significativas entre los valores de biomasa seca obtenida entre las fermentaciones líquidas realizadas (Anexo 6a). Finalmente, se puede decir que durante las fermentaciones líquidas empleando el hongo *T. koningii* Th003, el mayor incremento en la biomasa se presentó generalmente entre las horas 18 a 42, con lo cual se estableció que el microorganismo se encontraba todavía en su idiofase.

Esto pudo ser comprobado a través de las pruebas de viabilidad y de germinación realizadas, ya que éstas indicaron que el porcentaje de germinación del hongo *T. koningii* Th003 se mantuvo superior al 95%, mientras que la viabilidad fue de 1×10^7 UFC/ml en promedio para las fermentaciones líquidas realizadas en el biorreactor airlift.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Miura (*et al.*, 2003), en los que se demostró que la inyección de diferentes caudales de aire en procesos de fermentación líquida usando biorreactores airlift, tienen un efecto directo sobre la velocidad de agitación, la velocidad de crecimiento y la morfología, así como sobre la producción de metabolitos secundarios y biomasa en diferentes microorganismos, incluyendo hongos filamentosos tales como *Trichoderma harzianum* (Astudillo, 1999) y *Trichoderma reesei* (Domingues, 2000) .

La evaluación de condiciones referentes a la geometría del biorreactor, como lo es la altura de la zona de ascenso del líquido, arrojó como resultado que este factor ejerce un efecto positivo sobre la producción de biomasa del hongo *T. koningii* (Figura 7). Esto se presenta como consecuencia de la recirculación y mezcla del caldo de fermentación ya que el incremento en la altura de la zona del riser permite una mejor distribución del aire suministrado al sistema contribuyendo a la

homogeneización de las propiedades reológicas dentro del biorreactor. En este sentido, varios autores reportan que la altura de la zona de ascenso es un parámetro geométrico que tiene influencia sobre la velocidad de descenso del líquido en la zona de descenso y sobre el tiempo de mezcla, viéndose esto reflejado directamente sobre la productividad del proceso, ya que se ha reportado que la diferencia de presión hidrostática existente entre la zona de ascenso y la zona de descenso se encuentra directamente relacionada con la transferencia de masa gas – líquido dentro del biorreactor (Siegel, 1992; Doran, 1998; Bentifraouine, *et al.*, 1997).

Adicionalmente, se pudo corroborar que la acción combinada de los factores altura de la zona de ascenso y caudal de aire inyectado al sistema, ejercieron el mayor efecto y de carácter negativo sobre la concentración de la biomasa obtenida (Figuras 8 y 9). De otra parte, la combinación de los factores altura de la zona de ascenso - volumen de antiespumante y caudal de aire - volumen de antiespumante, presentaron una magnitud similar con efectos opuestos (Figura 9).

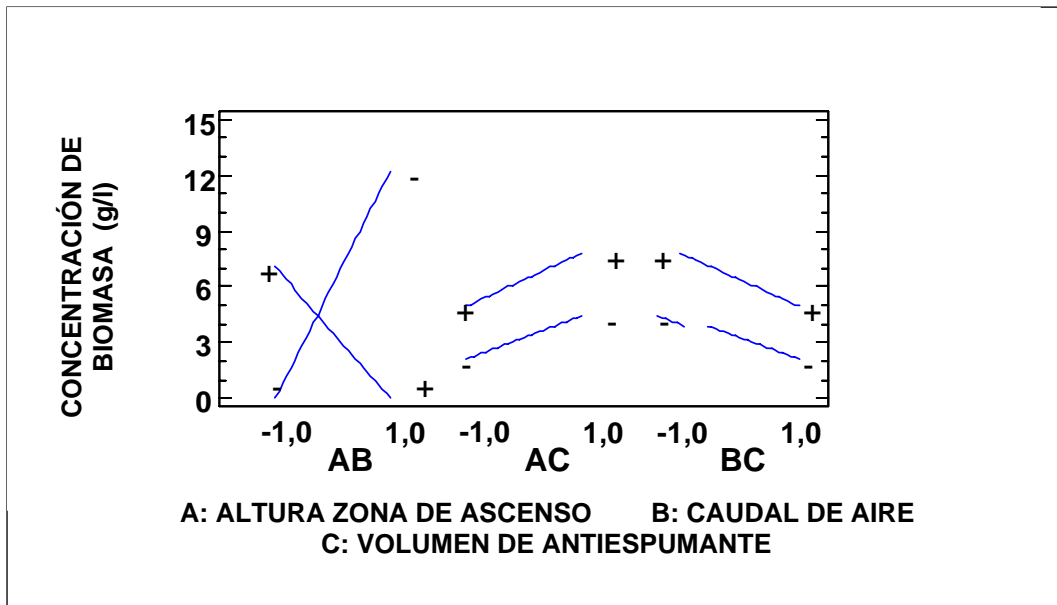


Figura 9. Representación gráfica de los efectos de las interacciones de los factores evaluados sobre la concentración de biomasa durante la fermentación líquida. Las pendientes representan los efectos positivos o negativos.

En concordancia con lo anterior, el peor comportamiento se presentó en la fermentación 1, en la cual se empleó el nivel bajo de la altura de la zona de ascenso y con el que se obtuvo una cantidad de biomasa seca equivalente a 4.19 g/l (Tabla 8). Así mismo, el mejor comportamiento se presentó en la fermentación 4, en la cual se empleó el nivel alto de la altura de la zona de ascenso y con el cual se obtuvo la mayor concentración de biomasa (15.61 g/l) de todas las fermentaciones líquidas realizadas; la variación de la concentración de biomasa estuvo directamente relacionada con la combinación de cada uno de los factores evaluados y no fue dependiente de la acción de uno solo (Figura 9).

Una posible explicación de este resultado puede ser que la variación de la distancia de la zona de ascenso junto a la acción de agitación que ejerce la inyección de aire, generaron cambios en las velocidades de transferencia de materia (principalmente de nutrientes y oxígeno) y de las características de mezcla del caldo de fermentación, ocasionando las variaciones en la concentración de biomasa obtenida al final de cada fermentación (Doran, 1998). Además, Miura y colaboradores (2003) sostienen que existe una correlación lineal entre el coeficiente de transferencia de materia y la velocidad de aireación, ya que a valores de aireación muy bajos (≤ 0.2 vvm), el microorganismo presenta la tendencia a aglomerarse en pequeños pellets y disminuye la productividad del proceso, con lo que la transferencia de oxígeno al interior del pellet disminuye y puede ser una limitante para el desarrollo del proceso de fermentación.

Por otra parte, se pudo comprobar que la adición de un antiespumante al sistema de fermentación al analizarse individualmente presentó un efecto positivo sobre la producción de biomasa del hongo *T. koningii* (Figuras 7 y 8); sin embargo, teniendo en cuenta los datos experimentales, este efecto no fue significativo. La acción conjunta de este factor junto con el caudal de aire presentó un efecto de carácter negativo, mientras que la combinación con la altura de la zona de ascenso ejerció un efecto positivo sobre la variable de respuesta pero sin llegar a ser significativo en ninguno de los dos casos.

6.1.1.2. CONSUMO DE SUSTRATO

Al inicio del proceso de fermentación líquida, la cantidad de azúcares cuantificados fue muy baja (± 1.128 g/l), esto probablemente se debió a que la esterilización del medio de cultivo contribuyó a que el sustrato SL1 sufriera un proceso térmico de degradación y en consecuencia, la cantidad de carbohidratos y/o azúcares simples disponibles en el medio se viera afectada (Astudillo, 1999).

De otro lado, se observó que durante la fermentación líquida 4 la cantidad de azúcares reductores alcanzó una concentración final muy superior (13.76 g/l) en comparación con los demás tratamientos en los que se alcanzaron concentraciones inferiores a 5.1 g/l al usar el mismo sustrato durante todas las fermentaciones realizadas. Esto se podría explicar en parte por el hecho de que el microorganismo empleó el sustrato más simple presente en el medio de cultivo (SL1) para iniciar su crecimiento y posteriormente expresó su maquinaria enzimática (Astudillo, 1999).

Se podría suponer entonces que la expresión de enzimas hidrolíticas permitió la degradación de polisacáridos complejos (almidón, celulosa, etc.) presentes en el medio SL1, hasta carbohidratos más simples y algunos de carácter reductor como la glucosa, los cuales pudieron ser cuantificables mediante la técnica del DNS (Miller, 1959), pero que no fueron aprovechados en su totalidad debido a que su concentración superaba a la requerida por el microorganismo (Crueger, 1989), esto le permitió degradar el sustrato complejo presente en el medio y esto se reflejó en el aumento de la concentración de azúcares reductores a través del tiempo.

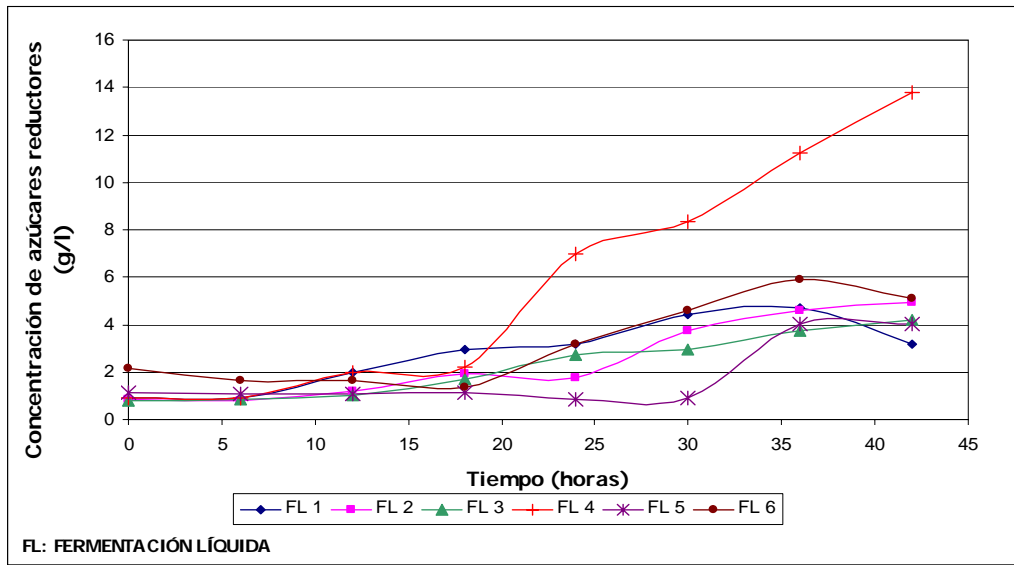


Figura 10. Cuantificación de la concentración de azúcares reductores presentes en el medio SL1 mediante la técnica de DNS durante las fermentaciones líquidas.

La diferencia entre los tratamientos evaluados pudo deberse principalmente a la actividad metabólica del hongo y al efecto de la interacción entre los factores, reflejándose en la capacidad enzimática del hongo para degradar o hidrolizar el sustrato.

La elevada concentración de carbohidratos y nitrógeno que poseen las fuentes nutricionales presentes en el medio de cultivo SL1 permitió al microorganismo llevar a cabo la síntesis de compuestos necesarios para su desarrollo. Por tal razón, se evidenció que la fuente de carbono no ejerció un factor inhibitorio sobre el crecimiento del hongo *T. koningii* Th003; puesto que las especies del género *Trichoderma* son microorganismos que almacenan generalmente los carbohidratos en forma de disacáridos y alcoholes azucarados a diferencia de otros hongos (Moore, 1998).

En conclusión, puede decirse entonces que la cuantificación del consumo de sustrato es considerada como una medida indirecta del crecimiento de un microorganismo sobre un determinado sustrato, ya que puede emplearse como un estimativo de la

actividad enzimática que presenta el microorganismo durante un proceso de fermentación. Sin embargo, para las fermentaciones líquidas realizadas con el hongo *T. koningii* en el biorreactor airlift, este parámetro no presentó una relación directa con los valores de biomasa seca obtenida para las fermentaciones realizadas debido a las interferencias presentadas por el medio de cultivo SL1 usado en este trabajo.

6.1.1.3. CUANTIFICACIÓN DE N-ACETILGLUCOSAMINA

En cuanto a la cuantificación de biomasa fúngica a partir de la degradación de la quitina en N-acetilglucosamina, se pudo observar que el contenido de glucosamina es directamente proporcional a la concentración de biomasa fúngica (μg glucosamina/g biomasa seca). Así mismo, se pudo determinar que el comportamiento de la glucosamina es independiente del tiempo de fermentación y la edad del microorganismo (Figura 11).

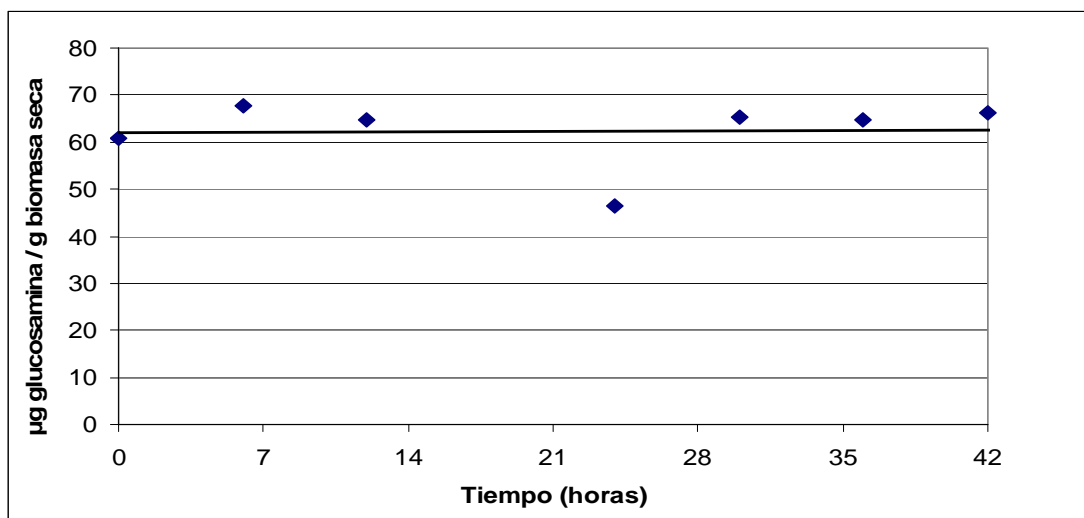


Figura 11. Comportamiento de la glucosamina en función del tiempo durante la fermentación 3.

Como se muestra en la Figura 11, el cociente entre el contenido de glucosamina y la biomasa seca permanece constante durante el transcurso de la fermentación líquida ($\pm 64.87 \mu\text{g}$ glucosamina/g biomasa seca para la fermentación líquida 3), lo que

permite relacionar la absorbancia obtenida en la prueba colorimétrica con su equivalente en biomasa seca usando la curva patrón de glucosamina (Anexo 2). Los datos obtenidos para cada una de las corridas experimentales se presentan en la Tabla 9, se pudo observar un comportamiento similar en todas las fermentaciones, a excepción de la fermentación 4, en la cual la concentración de glucosamina (expresada como μg glucosamina/ g de biomasa seca) es muy superior a las demás (104.78 μg glucosamina/ g biomasa seca), a pesar de emplear el mismo medio de cultivo. Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los reportados por Tomaselli (2001), Desgranges (1991) y Ride & Drysdale (1972), que obtuvieron resultados similares para hongos como *Beauveria bassiana* (116-122 μg glucosamina/ g biomasa seca) y *Fusarium oxysporum* (77.90 μg glucosamina/ g biomasa seca).

Tabla 9. Resultados de la cuantificación de N-acetilglucosamina para cada una de las fermentaciones líquidas en biorreactor airlift.

Fermentación	μg glucosamina/ g de biomasa seca
1	81.16
2	86.13
3	64.87
4	104.78*
5	80.90
6	79.72
Promedio	78.56

Coefficiente de variación: 10.23%

* Este valor no fue tenido en cuenta para el análisis de los datos, debido a que se encuentra fuera de la tendencia general.

La variación de las condiciones de operación del biorreactor airlift no presentó un efecto directo sobre la cantidad de glucosamina encontrada, ya que la relación μg

glucosamina/ g biomasa seca permaneció constante, independientemente de la cantidad de biomasa seca obtenida al final del proceso de fermentación líquida.

6.1.1.4. DISEÑO SIMPLEX

A partir del empleo del diseño simplex, se llevó a cabo un primer acercamiento hacia la optimización de las condiciones del proceso de producción masiva del hongo *T. koningii* Th003 evaluando tres parámetros que tienen influencia directa sobre la producción de biomasa durante la fermentación líquida. Este diseño de experimentos permitió descartar aquellas condiciones de operación que ejercieron un efecto negativo sobre la variable de respuesta (concentración de biomasa); sin embargo, al llevar a cabo las fermentaciones secuenciales 5 y 6 se observó que no se alcanzaron los valores óptimos de operación (Tabla 10) ya que la cantidad de biomasa del hongo *T. koningii* Th003 fue de 6.34 g/l para el tratamiento 5 y 8.65 g/l para el tratamiento 6. Estos valores fueron muy inferiores al obtenido en la fermentación 4, en la cual se logró la mayor producción de biomasa (15.61 g/l), lo cual indica que se deben aplicar etapas de evaluación adicionales.

Tabla 10. Niveles de los factores evaluados para los tratamientos adicionales a partir de la aplicación del diseño simplex durante la fermentación líquida.

	Fermentación 5	Fermentación 6
Caudal de aire (vvm)	0.42	0.20
Volumen de antiespumante (ml)	22	18
Altura del riser (cm)	58.7	68.3
Biomasa seca (g/l)	6.34	8.65

Por lo tanto, se tomó la decisión de trabajar con los niveles bajos de factores como caudal de aire y volumen de antiespumante, principalmente por aspectos económicos mientras se alcanzan los valores óptimos de operación con lo cual se espera que la concentración de biomasa obtenida cercana a 20 g/l.

6.1.2. FERMENTACIÓN SÓLIDA

6.1.2.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR SÓLIDO DE BANDEJAS

Para la fermentación sólida, el crecimiento del hongo *T. koningii* Th003 se evaluó mediante el recuento de conidios en cámara de Neubauer. En la Tabla 11 se observa que en todas las corridas experimentales, la concentración de conidios estuvo en el orden de 10^8 conidios/g y 10^9 conidios/g, siendo el valor máximo el que se presentó en la fermentación 5 con 8.44×10^9 conidios/g de sustrato y el valor mínimo encontrado se presentó en la fermentación 10 con $6,70 \times 10^8$ conidios/g de sustrato. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los obtenidos por Pérez y colaboradores (2000) para la producción masiva de *Trichoderma harzianum*, usando arroz como sustrato, en los cuales la concentración máxima obtenida después de llevar a cabo un proceso de fermentación sólida en un sustrato similar fue del orden de 1.80×10^9 conidios/g de sustrato.

Tabla 11. Recuento de conidios en las fermentaciones sólidas llevadas a cabo en fermentador de bandejas. Las letras representan los grupos homogéneos al aplicar un análisis de comparación de medias LSD con un nivel de confianza del 95% (Anexo 6b).

FERMENTACIÓN	PROMEDIO RECUENTO conidios/g	LOG	GRUPO HOMOGÉNEO
1	$1,71 \times 10^9$	9,233	c
2	$9,80 \times 10^8$	8,991	b
3	$7,12 \times 10^9$	9,852	fg
4	$8,02 \times 10^9$	9,904	g
5	$8,44 \times 10^9$	9,926	g
6	$6,86 \times 10^9$	9,836	fg
7	$4,03 \times 10^9$	9,605	e
8	$2,79 \times 10^9$	9,446	d
9	$9,84 \times 10^8$	8,993	ab
10	$6,70 \times 10^8$	8,826	a

11	$4,30 \times 10^9$	9,633	e
12	$5,82 \times 10^9$	9,765	ef

En general, el comportamiento cinético del hongo *T. koningii* Th003 obedeció a un modelo de orden exponencial (Anexo 7) ya que al realizar el análisis de los datos obtenidos, solamente este modelo fue el que presentó un coeficiente de correlación aceptable (96.2%) para el ajuste de los datos en todas las fermentaciones (Figuras 12, 13a y 13b). A partir de este modelo se podría dar una explicación acerca del comportamiento de la esporulación del hongo *T. koningii* sobre el sustrato sólido. Además, después de realizar el análisis estadístico de los datos empleando la prueba de comparación de medias LSD a un nivel de confianza del 95%, se demostró que sí se presentaron diferencias significativas de la concentración de conidios entre los tratamientos al final del proceso de fermentación sólida (144 horas) (Anexo 6b).

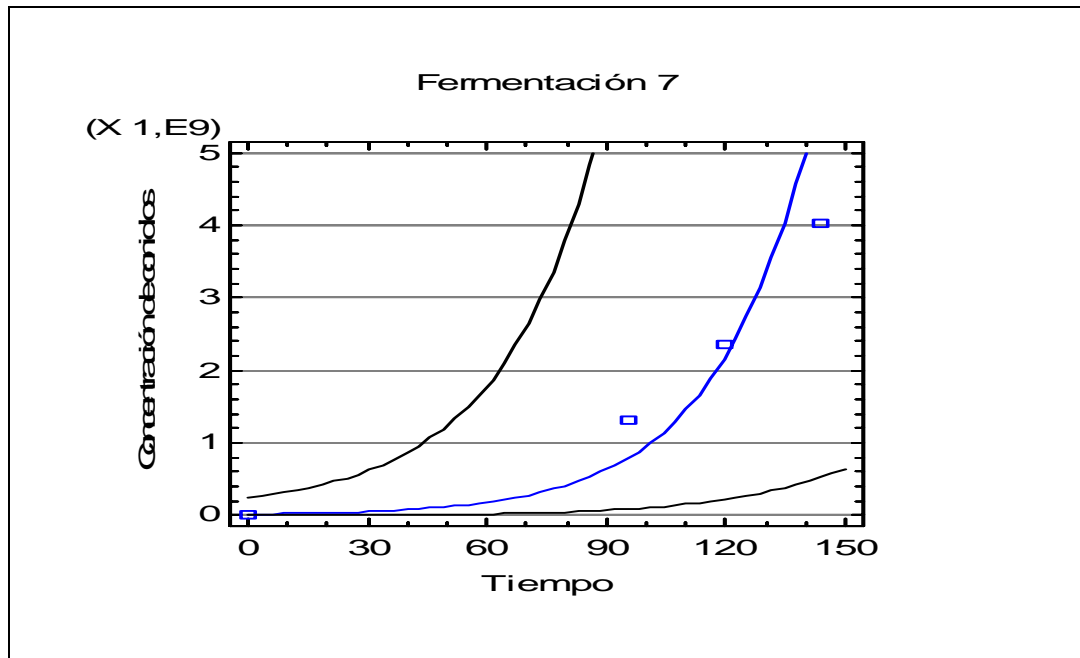


Figura 12. Comportamiento del hongo *T. koningii* Th003 durante la fermentación sólida 7. Las líneas negras representan los límites de ajuste al modelo establecido por el programa estadístico y la línea azul representa el ajuste de los datos al modelo. En el eje X se encuentra el tiempo de fermentación dado en horas y en el eje Y el logaritmo de la concentración de conidios/g.

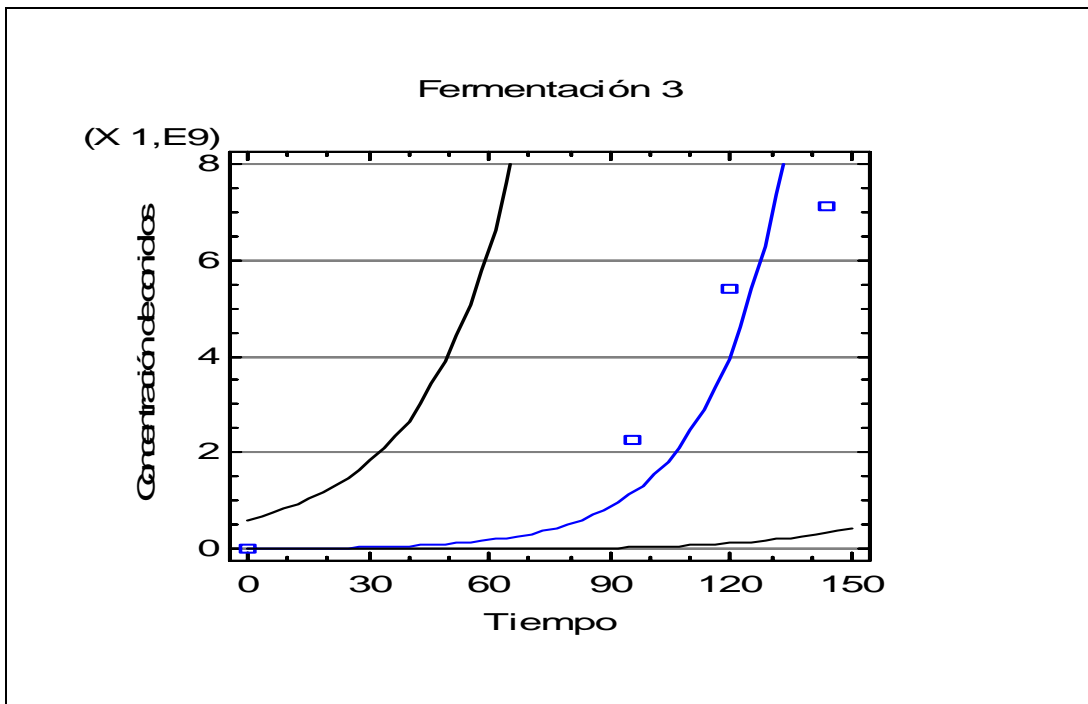


Figura 13a. Comportamiento del hongo *T. koningii* Th003 durante la fermentación sólida 3.

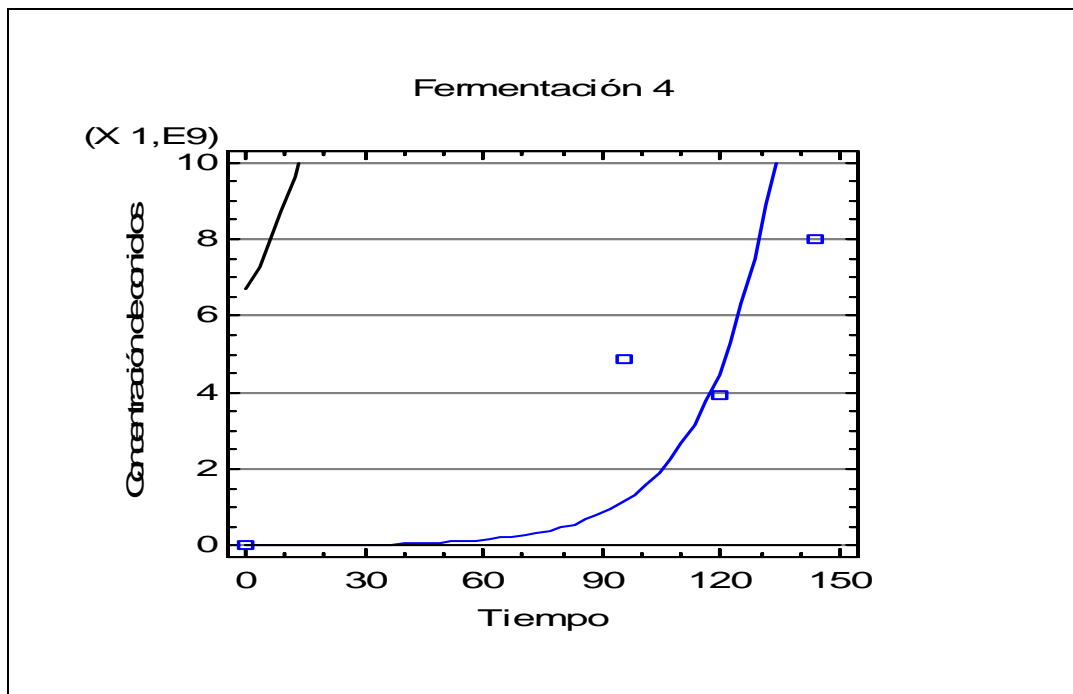


Figura 13b. Comportamiento del hongo *T. koningii* Th003 durante la fermentación sólida 4.

De acuerdo con las Figuras 14 y 15, los factores evaluados durante el proceso de fermentación sólida tuvieron diferentes efectos sobre la concentración de conidios obtenida. Como se observa en la Figura 14, al analizar por separado el efecto de los factores principales, se registró que la cantidad de bandejas fue el que tuvo mayor influencia sobre la variable de respuesta, siendo éste un efecto negativo. En segundo lugar en magnitud se encontró el factor temperatura, el cual presentó un efecto positivo sobre la concentración de conidios; mientras que el tercer factor en orden de magnitud se refiere a la concentración del inóculo proveniente de la fermentación líquida anterior y no presentó efecto alguno sobre la conidiación del hongo *T. koningii* Th003.

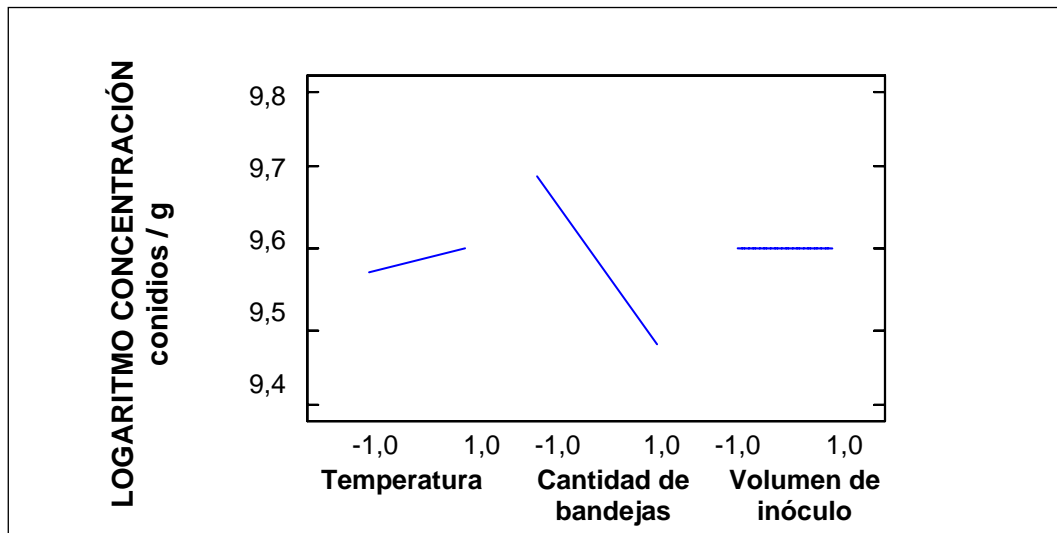


Figura 14. Representación gráfica de los efectos principales sobre la concentración de conidios de los factores evaluados en la fermentación sólida.

La interacción de los factores evaluados se presenta en la Figura 15, donde se puede observar gráficamente que el efecto más importante lo tiene la combinación de los factores temperatura - volumen de inóculo líquido, las otras combinaciones son más complejas y requieren análisis numérico. Aunque es evidente la importancia de la interacción de los factores, se pudo establecer que no tienen un efecto significativo sobre la variable de respuesta (Figura 16).

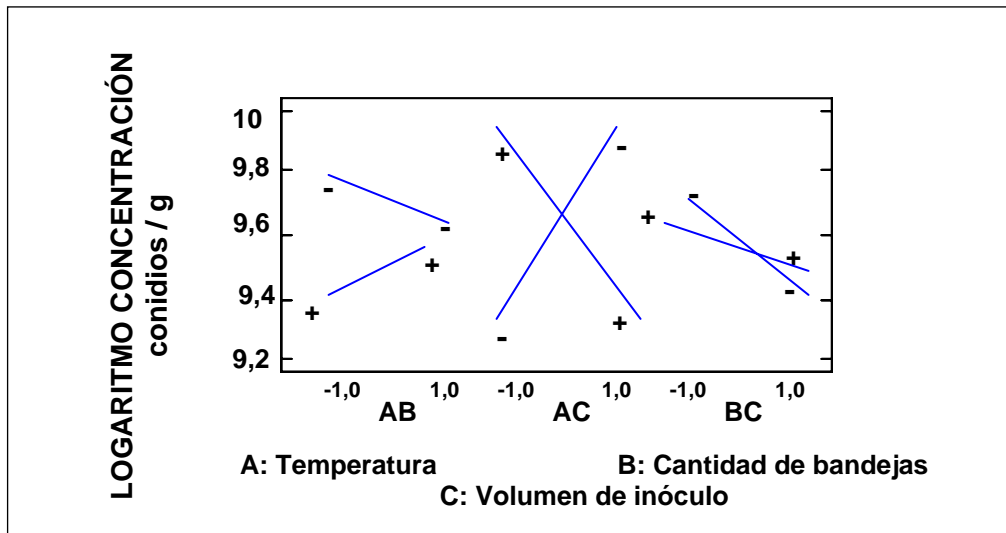


Figura 15. Representación gráfica de las interacciones de los factores evaluados sobre la concentración de conidios durante la fermentación sólida.

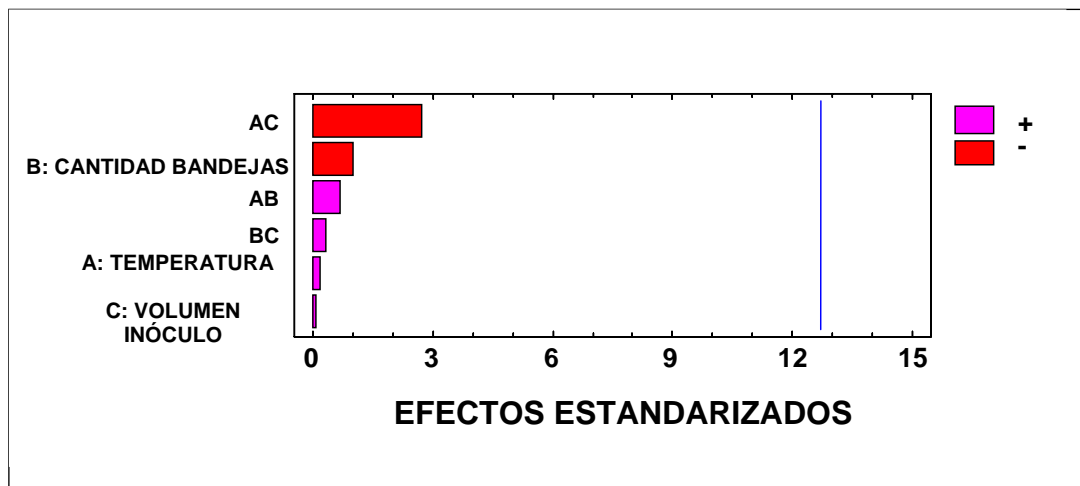


Figura 16. Carta de Pareto de la interacción entre los factores evaluados en la fermentación sólida.

6.1.2.2. EFECTO DEL INÓCULO

En función de los resultados obtenidos para las concentraciones de conidios para cada fermentación, se pudo concluir que el volumen de inóculo empleado (en forma de micelio principalmente) no presentó un efecto significativo sobre la concentración de conidios obtenida al final de la fermentación debido a que los niveles de los

volúmenes evaluados fueron suficientes para cubrir de forma homogénea el sustrato sólido y permitir así una esporulación similar (Figura 17).

Sin embargo, la combinación del volumen de inóculo con el factor temperatura, mostró tener el mayor efecto negativo sobre la producción final de conidios del hongo *T. koningii* Th003. De igual manera, se estableció que la interacción conjunta de los factores volumen de inóculo y cantidad de bandejas empleadas, ejercieron en menor magnitud un efecto positivo sobre la producción de conidios. De lo mencionado anteriormente, se puede concluir que el crecimiento y la posterior conidiación del hongo *T. koningii* Th003 sobre el medio SS1 es afectado principalmente por la interacción entre los diferentes factores evaluados más que por su efecto individual.

6.1.2.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Se determinó que el factor temperatura individualmente ejerció un efecto positivo pero no significativo sobre la esporulación del hongo *T. koningii* Th003; en contraste, el efecto de la interacción entre los factores temperatura y volumen de inóculo líquido presentó un efecto negativo, siendo el predominante o de mayor importancia con respecto a las demás interacciones de factores.

Los resultados obtenidos durante el proceso de fermentación sólida (expresados como concentración de conidios/g) fueron similares a los descritos por Astudillo (1999) y Peña (2002), quienes determinaron que una temperatura cercana a los 25°C se encuentra dentro del rango aceptable para el crecimiento de hongos filamentosos como *T. koningii*. Además, otros estudios han establecido que el aumento de la temperatura en un proceso de fermentación favorece aspectos negativos como la desaceleración o detención de la actividad microbiana, la deshidratación del medio sólido y por último, el metabolismo es desviado como un mecanismo de defensa ante el calor o ante la deshidratación (Gervais & Molin, 2003).

De ahí que se pueda decir entonces, que la temperatura más adecuada para llevar a cabo un proceso de fermentación sólida usando el hongo *T. koningii* Th003 es la que se encuentra alrededor de los 25°C, un valor reportado como cercano a la temperatura óptima de crecimiento establecida para este microorganismo (Peña, 2002).

6.1.2.4. EFECTO DE LA CANTIDAD DE BANDEJAS SOBRE LA ESPORULACIÓN DEL HONGO *T. koningii* Th003

De acuerdo con lo observado durante el desarrollo del presente trabajo, se evidenció que el factor individual que más influencia tuvo sobre la esporulación del hongo *T. koningii* Th003 en el fermentador de bandejas fue la cantidad y la disposición de éstas dentro del biorreactor con una magnitud negativa (Figura 14). Sin embargo, al evaluar las interacciones de este factor con la temperatura y la concentración de inóculo líquido aplicado al sistema, se observó una compensación de los efectos que produjeron un efecto neto positivo sobre la producción de conidios de *T. koningii* Th003.

La esporulación de las bandejas al finalizar el proceso de fermentación fue dependiente de la disposición de éstas dentro del biorreactor, puesto que si el espacio existente era muy amplio (4cm o más), la cantidad de luz que podía entrar a través del equipo cubría un área mayor del sustrato sólido, induciendo así una mayor esporulación (Figuras 17 y 18).



Figura 17. Disposición de las bandejas durante la fermentación sólida 7. Distancia entre bandejas: 6cm.



Figura 18. Disposición de las bandejas durante la fermentación sólida 2. Distancia entre bandejas: 4cm.

Adicionalmente, en la parte frontal de la bandeja se presentó el mayor índice de esporulación mientras que la parte posterior presentó crecimiento micelial con pequeños parches o zonas de escasa esporulación del microorganismo debido a la ausencia de luz constante (Figura 19). Por lo tanto, se puede afirmar que la cepa del

hongo usada en este estudio es muy sensible a la luz y creció de manera heterogénea por toda la superficie del sustrato, presentando zonas que diferían en el aspecto morfológico descrito para el hongo *T. koningii* Th003.



Figura 19. Aspecto macroscópico del sustrato inoculado y colonizado por el hongo *T. koningii* Th003 durante la fermentación sólida 5.

6.1.2.5. EFECTO DE LA AIREACIÓN

Gervais & Molin (2003) reportaron que la regulación de la temperatura está directamente relacionada con la aireación. La temperatura es un factor que tiene una gran influencia sobre el crecimiento de los microorganismos, y en fermentaciones aerobias una gran cantidad de calor es producida durante el crecimiento microbiano. De ahí que una limitación importante de los procesos de fermentación sólida es la dificultad de llevar a cabo la remoción del exceso de calor metabólico debido al bajo nivel de conductividad térmica del sustrato sólido. Por esta razón, en el presente trabajo, el aire fue empleado como un método indirecto para realizar un control de la temperatura a través de todo el proceso de fermentación sólida y tratar de inducir un aumento en la esporulación del hongo *T. koningii* Th003.

A partir de un análisis estadístico de comparación de medias realizado para determinar la influencia del caudal de aire sobre la esporulación del hongo *T. koningii* (Anexo 6b, Tabla 12), se estableció que existieron diferencias significativas

al emplear diferentes niveles de caudal de aire en el sistema de fermentación. Este factor es muy importante ya que la circulación de aire, de manera similar a como ocurre en el fermentador airlift, actúa como suministro de aire para el microorganismo además de contribuir a la transferencia tanto de energía como de oxígeno y ayuda a controlar la humedad dentro del sistema al remover el calor generado por el microorganismo a través de su actividad metabólica.

Tabla 12. Caudal de aire inyectado durante las fermentaciones sólidas. Las letras representan los grupos homogéneos obtenidos al aplicar un análisis de comparación de medias LSD con un nivel de confianza del 95%.

Fermentación	Caudal de aire (vvm)	Grupos homogéneos
1 - 2	0.5	b
3 - 4	1.0	a
5 - 6	0	a
7 - 8	0.25	a

En el presente trabajo se determinó que el hongo *T. koningii* Th003 no requirió de aireación forzada para su crecimiento, puesto que ante la ausencia de este factor (0 vvm) como se evaluó durante las fermentaciones sólidas 5 y 6, se obtuvieron algunos de los rendimientos más altos en cuanto a concentración de conidios (8.44×10^9 y 6.86×10^9 conidios/g, respectivamente).

Al utilizar un caudal de aire de 0.5 vvm se obtuvieron los peores resultados durante las fermentaciones sólidas 1 y 2 (1.71×10^9 conidios/g y 9.80×10^8 conidios/g, respectivamente) que fueron significativamente diferentes con respecto a los demás tratamientos.

Por otra parte, se observó que la inyección de caudales de aire superiores a 0.5 vvm, ocasionaron que el contenido de humedad del sustrato disminuyera drásticamente y rápidamente sin permitir que el microorganismo llevara a cabo la colonización y esporulación completa sobre el sustrato sólido (Figura 20). Este efecto fue evidente

en las fermentaciones 11 y 12, en las cuales el caudal de aire inyectado al sistema fue de 0.58 vvm y la concentración final fue de $4,30 \times 10^9$ conidios/ g para la fermentación 11 y de $5,82 \times 10^9$ conidios/ g para la fermentación 12, respectivamente (Tabla 11).

Lo anterior concuerda con lo reportado por otros autores como Astudillo (1999), quien evaluó el efecto que ejercía el aire sobre la productividad del proceso de producción masiva de conidios de *Trichoderma*, y determinó que la eficiencia de la aireación forzada es facilitada por las propiedades del sustrato empleado tales como porosidad, tamaño de partícula y humectabilidad, entre otras; lo cual se ve reflejado en la productividad del proceso de fermentación.



Figura 20. Efecto de la aireación en las fermentaciones sólidas 11 y 12. Caudal de aire: 0. 58vvm.

6.1.2.6. CONTENIDO DE HUMEDAD

La humedad teórica con la cual iniciaron todas las fermentaciones sólidas para la producción masiva de *T. koningii* Th003 estuvo comprendida entre el 39% y 51% dependiendo del volumen de inóculo líquido evaluado; al finalizar el proceso de fermentación sólida se encontraron valores que oscilaron entre el 19% y el 21%. Este descenso en el valor humedad al final del proceso se debió por una parte, al

efecto evaporativo que ejercía la inyección de aire en el sistema de fermentación y por otra, al incremento en la temperatura generado por el calor metabólico liberado por el microorganismo durante su crecimiento.

Estos resultados coinciden con los reportados por Viccini (2006) quien demostró que un contenido de humedad cercano al 46% proporcionó el mejor balance para el hongo *Clonostachys rosea*, permitiendo una actividad de agua suficiente para un crecimiento temprano del microorganismo, mientras que también permitió que el sustrato se secase lo suficiente para que el proceso de esporulación fuera estimulado. Otros autores (Gervais & Molin, 2003) mencionan que el contenido de humedad necesario para el crecimiento de algunas especies de *Trichoderma* se encuentra cercano al 55%, ya que en este valor de humedad la producción de ciertas enzimas se incrementa. Además, Peña (2002) reporta que es necesario que el sustrato empleado en la fermentación sólida tenga una humedad comprendida entre 40% - 70% para lograr el crecimiento y la esporulación del hongo *T. koningii* Th003 en medio sólido.

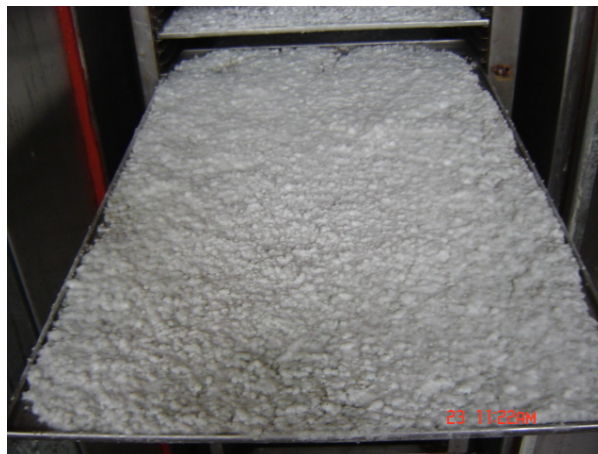


Figura 21. Aspecto macroscópico del hongo *T. koningii* Th003 al final de la fermentación sólida 8. Humedad teórica inicial: 51%, Humedad final: 20.26%.

Los resultados del presente trabajo demostraron que el crecimiento, la colonización del sustrato sólido y la esporulación por parte del hongo *T. koningii* Th003 son

altamente dependientes del contenido de humedad presente en el sustrato al momento de iniciar el proceso de fermentación sólida y a través del desarrollo de ésta, ya que para llevar a cabo los procesos de crecimiento y colonización (Figura 21), la humedad del sustrato debe ser superior al 50% mientras que para el proceso de esporulación es necesario mantener un contenido de humedad en el sustrato entre 35% - 40% (Moore, 1996).

Para finalizar, las pruebas de viabilidad y de germinación realizadas (Anexo 3 y 4) indicaron que el porcentaje de germinación del hongo *T. koningii* Th003 se encontraba entre el 90% y el 95%, mientras que la viabilidad se mantuvo en una magnitud de 10^9 UFC/cm² en promedio, para cada una de las fermentaciones sólidas en el biorreactor de bandejas.

6.1.2.7. DISEÑO SIMPLEX

El empleo del diseño simplex permitió llevar a cabo un primer screening para seleccionar aquellas condiciones de operación que permitirían el mejor desarrollo y productividad del hongo *T. koningii* Th003 durante la fermentación bifásica. Gracias a la aplicación de este diseño de experimentos se descartaron las peores respuestas para la obtención de los nuevos tratamientos, logrando de esta manera un mayor acercamiento a los valores óptimos de operación en la fermentación sólida.

Sin embargo, en el presente trabajo no se alcanzaron los valores óptimos de cada uno de los factores evaluados durante la fermentación sólida; debido a que los tratamientos adicionales (fermentaciones 9 – 12) no condujeron a la detección de mejores respuestas para llevar a cabo la optimización del proceso (Tabla 13). Por lo tanto, de aquí en adelante se debe enfocar el trabajo en el montaje de nuevas corridas experimentales que permitan mejorar en los resultados obtenidos y así acercarse a los valores óptimos de operación.

Tabla 13. Niveles de los factores evaluados para los tratamientos adicionales a partir de la aplicación del diseño simplex durante la fermentación sólida.

	Fermentación 9	Fermentación 10	Fermentación 11	Fermentación 12
Temperatura (°C)	24.33	24.33	25.76	25.76
Número de bandejas	8	8	12	12
Concentración de inóculo líquido (ml)	220	110	94.28	47.14
Caudal de aire (vvm)	0.33	0.33	0.58	0.58
Concentración de conidios/g	9.84 x 10⁸	6.70 x 10⁸	4.30 x 10⁹	5.82 x 10⁹

De forma contraria como ocurrió en la fermentación líquida, el análisis de los datos permitió establecer que existieron diferencias significativas con respecto a la concentración de conidios/g obtenida entre los tratamientos 9, 10, 11 y 12 generados tras la aplicación del diseño simplex, las cuales fueron de 9.84×10^8 conidios/g, 6.70×10^8 conidios/g, 4.30×10^9 conidios/g y 5.82×10^9 conidios/g, respectivamente (Anexo 6b). Además, ninguno de estos valores se acercó a la máxima concentración de conidios alcanzada en la primera etapa, la cual se presentó en la fermentación 5 y fue de 8.44×10^9 conidios/g. Por tal motivo, se determinó que para llevar a cabo la producción masiva del hongo *T. koningii* Th003 mientras se alcanzan las condiciones de operación óptimas a partir de nuevas aplicaciones del diseño simplex, es conveniente trabajar por aspectos económicos con los niveles bajos de factores como temperatura, concentración de inóculo líquido y caudal de aire, con lo cual se espera obtener un rendimiento por encima de 1×10^{10} conidios/g.

7. CONCLUSIONES

- Los resultados demostraron que para la fermentación líquida el mejor comportamiento con respecto a la producción de biomasa fúngica, se presentó empleando una altura de la zona de ascenso de 55.1cm, un volumen de antiespumante de 20ml y un caudal de aire inyectado de 0.5vvm, con una producción de 15.61 g/l de biomasa seca.
- La cuantificación de N-acetilglucosamina resultó ser un buen indicador del crecimiento fúngico al poder ser relacionado con la biomasa obtenida durante el proceso de fermentación líquida, ya que fue independiente de la edad del microorganismo y del tiempo de fermentación.
- Se comprobó que la interacción de factores tales como temperatura, humedad relativa y la cantidad de bandejas empleadas en el biorreactor, son los que tienen un mayor efecto sobre la producción de conidios del hongo *T. koningii* Th003 mediante la técnica de fermentación sólida.
- La utilización del diseño de experimentos simplex permitió llevar a cabo los primeros avances que conducen a la optimización y posterior escalamiento del proceso de producción masiva del hongo *T. koningii* Th003.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios posteriores que permitan reevaluar y establecer si la relación C/N presente en los medios de cultivo SL1 y SS1 usados para la producción del hongo *T. koningii* Th003, es la más adecuada para llevar a cabo la producción masiva de este hongo.
- Llevar a cabo estudios que permitan establecer los ciclos de luz y oscuridad a los cuales el hongo *T. koningii* Th003 debe ser expuesto para inducir su proceso de esporulación de manera más eficiente.
- Llevar a cabo el escalamiento a nivel piloto de la producción masiva del hongo *T. koningii* Th003.
- Realizar la optimización de las condiciones fisicoquímicas tanto en la fermentación líquida como en la fermentación sólida, usando la herramienta del diseño evolucionario simplex.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexopoulos, C., Mims, C., Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. Fourth edition. Editorial Willey. New York. 237 p.

Aponte, G., Carmona, I. 2000. Producción de conidiosporas de *Beauveria bassiana* como base para el desarrollo de un bioinsecticida. Tesis de pregrado. Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional. Pp. 6-22, 54.

Astudillo, M.C., Blanco, B. 1999. Establecimiento de los parámetros de producción semi-industrial del hongo *T. harzianum*, utilizado en control biológico. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Pp. 7-11, 14, 20.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology. Vol 7: 249-260.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Rey, Manuel., Delgado-Jarana, J. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Revista Iberoamericana de Micología. Vol 17: S31-S36.

Bentifraouine, C., Xuereb, C., Riba J. P. 1997. Effect of gas liquid separator and liquid height on the global hydrodynamic parameters of an external loop airlift contactor. Chemical Engineering Journal. Vol 66: 91-95.

Betancourt, J. C.1997. Evaluación de una técnica de pregerminación controlada en matriz sólida en combinación con los agentes de control biológico *Trichoderma koningii* y *Pseudomonas fluorescens* para el control del marchitamiento vascular del tomate *Lycopersicum esculentum* causado por el hongo *Fusarium oxysporum*. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes. Pp. 29-45.

Cárdenas, A. 1999. Control biológico bajo condiciones de invernadero de *Rhizoctonia solana* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici saccardo* en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill empleando pregerminación controlada de semillas y los agentes biocontroladores *Trichoderma koningii* Oudemans y *Pseudomonas fluorescens* Migula. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Pp. 53.

Chisti, M. Y. 1989. Airlift Bioreactors. Elsevier, New York.

Clavijo, G. 1998. Estudio de la actividad quitinolítica en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* Kuhn en tomate (*Lycopersicon sculentum*), mediante tratamientos de pregerminación controlada de semillas en presencia de *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de pregrado. Biología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 29-32, 56-57.

Cook, J., Baker, K. 1983. *Trichoderma*. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Third edition. APS Press. Minnesota-United States. pp 58, 374-382.

Cotes, A. M. 1993. Study of common bean protection against damping-off by treatment of seeds with *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de Doctorado. Gembloux, Facultad de Ciencias Agronómicas. Bélgica. 120 p.

Crueger W & Crueger, A. 1989. Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial. Editorial Acríbia S.A. Zaragoza-España. Pp. 73,115-118.

Danielson, R.M. & Davey, C.B. 1973. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. Soil Biology and Biochemistry. Vol 5: 495-504.

Danielson, R.M. & Davey, C.B. 1973. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. Soil Biology and Biochemistry. Vol 5: 505-515.

Demain, A., Hilton, M. 2000. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Second edition. ASM Press. Washington. pp 49-93, 221-239.

Deming, S.N. & Morgan, S.L. 1973. Simplex optimization of variables in analytical chemistry. Analytical Chemistry. Vol 45: 278-583.

Desgranges, C., Venague, A., Roche, N., Durand, A. 1993. Use of chitin measurement to estimate fungal biomass in solid state fermentation. Biotechnology Advances. Vol 11: 677-683.

Domingues, F. C., Queiroza, J. A., Cabral, J. M. S., Fonseca, L. P. 2000. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulose production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Enzyme and Microbial Technology. Vol 26: 394-401.

Domsch, K., Anderson, W., Yersoon, T. H. 1980. Compendium of soil fungi. Revision of the genus *Trichoderma*. Academic Press. London. Pp 136-139, 794-810.

Doran, P. 1998. Principios de Ingeniería en los bioprocesos. Editorial Acríbia S.A. Zaragoza-España. Pp 349-358.

Drysdale, R.B. & Ride, J.P. 1972. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. Physiology Plant Pathology. Vol 2: 7-15.

Durand, A., Desgranges, C., Georges, M., Vergoignan, C. 1991. Biomass estimation in solid state fermentation I and II. Applied Microbiology and Biotechnology Vol 35 (2): 200-205, 206-210.

Durand, A. 2003. Bioreactor designs for solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. Vol 13: 113-125.

Flórez, J. 2002. Diseño y puesta en marcha de un reactor airlift para la producción masiva de microorganismos de interés en control biológico. Tesis de pregrado. Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad de América. Pp. 20-35.

Fonseca, A. 1998. Estudio preliminar sobre la dinámica poblacional del biocontrolador *Trichoderma* spp. en el suelo. Tesis de Pregrado. Bacteriología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 29-32.

Forero, M. 2002. Producción masiva de microorganismos biocontroladores. Programa de Manejo Integrado de Plagas MIP. Centro de Investigación Tibaitatá. Corpoica. Publicación.

Franco, M., Santaella, M. 2000. Manual de Fundamentos de Micología. Centro Editorial Javeriano CEJA. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 59p.

Garzón, C. 2002. Desarrollo y caracterización microbiológica y física de preformulados en polvo a base del hongo *Trichoderma koningii* para el control de fitopatógenos. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Pp. 6-43.

Gervais, P., Molin, P. 2003. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 85-101.

Gutiérrez, H. & De la Vara, R. 2004. Análisis y diseño de experimentos. Editorial Mc Graw Hill. México. pp 492-493.

Haaland, P.D. 1989. *Experimental Design in Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc. New York.

Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews-Microbiology*. Vol 2: 46-53.

Harman, G., Chet, I., Baker, K. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seed of biocontrol agent. *Phytopatology*. Vol 71: 579-582.

Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E., Garcia-Acha, I. 2000. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 66 (5): 1890-1898.

Horton, R., Moran, L., Ochs, R., Rawn, J.D., Scrimgeour, K. 1995. *Bioquímica*. Editorial Prentice Hall. México. pp 8:21, 8:22.

Jin, X., Taylor, A. G., Harman, G. E. 1996. Development of media and automated liquid fermentation methods to produce desiccation-tolerant propagules of *Trichoderma harzianum*. *Biological Control*. Vol 7: 267-274.

Krishna, C. 2005. Solid-State Fermentation Systems-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. Vol 25: 1-30.

Liu, Chun-Zao., Guo, Chen., Wang, Yu-Chun., Ouyang, Fan. 2003. Comparison of various bioreactors on growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. shoot cultures. *Process Biochemistry*. Vol 39: 45-49.

Lomer, H., Lomer, C. 2002. *Pathologie d` Insectes*. Editorial Lubilosa. 244 p.

Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicilic acid-reagent for determination of reducing sugar. *Annales Chemistry*. Vol. 31: 426-428.

Miura, S., Arimura, T., Hoshino, M., Kojima, M., Dwiarti, L., Okabe, M. 2003. Optimization and Scale-Up of L - lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK – 96 – 1196 in airlift reactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol 96 (1): 65 – 69.

Montoya, D. 1989. Las fermentaciones como soporte de los procesos biotecnológicos. Instituto de biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Bogota. Pp. 1-11.

Moore, E. 1996. Fundamentals of the Fungi. Fourth edition. Prentice Hall. New Jersey. 574p.

Moreno, V. C. A. 2003. Control biológico de enfermedades foliares del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con énfasis en mildew polvoso (*Oidium* sp.). Trabajo de grado. Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Colombia. 106 p.

Pachón, J. 1997. Puesta en marcha de un biorreactor airlift y pruebas preliminares con el hongo del té. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. Pp. 4, 5, 18-20,23-27.

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

Papavizas, G. 1985. *Trichoderma* y *Gliocladium*. Biology, Ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology. Vol. 23: 23-54.

Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. Vol 13: 81-84.

París, A., Cotes, A. M. 2002. Biological control of *Sclerotium cepivorum* in onion with a yeast and bacteria. En: Y. Elad, J. Köhl & N. Delen (eds.). Program and Abstracts. Influence of Abiotic and Biotic Factors on Biocontrol Agents. Seventh meeting of the IOBC/WPRS WG. Mayo de 2002. Turkia. Pune Bay, Kusadasi. pp. 100.

Pedroza, A. M., Matiz, A., Quevedo, B. 2004. Manual de Laboratorio Procesos Biotecnológicos. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. pp 7-10.

Pelton, R. 2002. A review of antifoam mechanisms in fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Vol 29: 149-154.

Peña, V. 2002. Efecto de diferentes sustratos sobre la producción de conidios de *Trichoderma koningii* en medio sólido. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 153p.

Pérez, L., Ramírez, C. 2000. Efecto de las variables, condiciones de la fermentación y del sustrato en la producción de *Trichoderma harzianum*. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Pp. 50.

Pinzón, Y. 2001. Diseño de un fermentador para la producción del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en medio sólido. Tesis de pregrado. Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad de América. Pp 51-54.

Raimbault, M. 1998. General and Microbiological aspects Solid Substrate Fermentations. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 1 (3): 174-188.

Rifai, M. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Paper. Bogoriense*, Bogor. Java-Indonesia. pp 30-34.

Rodríguez-Porcel, E. M., Casas-López, J. L., Sánchez-Pérez, J. A., Fernández-Sevilla, J. M., Chisti, Y. 2005. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. *Biochemical Engineering Journal*. Vol 26: 139-144.

Roncal, T., Ugalde, U. 2003. Conidiation induction in *Penicillium*. Mini-review. Research in Microbiology 154: 539-546.

Saldamando, Clara I. 1996. Control de *Rhizoctonia solani* Kuhn en tomate mediante una combinación de tratamientos de pregerminación controlada y el agente de control biológico *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de pregrado. Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes. Bogotá. Pp 12,33.

Siegel, M., Robinson, C. 1992. Applications of airlift Gas-Liquid Solid reactors in Biotechnology. 47 (13-14): 3215-3229.

Tomaselli, C., Vergoignan, C., Feron, G., Durand, A. 2001. Glucosamine measurement as indirect method for biomasa estimation of *Cunninghamella elegans* in solid state cultivation conditions. Biochemical Engineering Journal. Vol 7: 1-5.

Tovar, W., Prieto, D. 1995. Estudio preliminar sobre un reactor airlift. Tesis de pregrado. Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional. Pp 9-12, 19, 29.

Tsao, G. 1997. Annual Reports on Fermentation process. Volume 1. Editorial Academic Press. London. pp 136-139.

Urón, J. 2005. Estandarización de las condiciones de producción del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* mediante fermentación bifásica. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 151 pp.

Valencia, J. 1998. Control biológico de la pudrición basal del tallo en crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) ocasionada por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* con algunos aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. Tesis de pregrado.

Bacteriología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Pp. 28, 30, 35, 40.

Viccini, G. 2006. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochemistry* (2006), doi:10.1016/j.procbio.2006.07.006

Villamizar, L., Moreno, C., Paris, A., Cotes, A., Garzón, C. 2004. Development of biopesticide prototypes for controlling pathogens in vegetables. En: *Diseases Biocontrol. International Workshop: Development of biocontrol agents of diseases for commercial applications in food productions systems. Book of abstracts.* Sevilla, España. Ediciones de la UdL. Pp. 136.

Wakelin, S.A., Sivasithamparam, K., Cole, A.L.J., Skipp, R.A. 1999. Saprophytic growth in soil of a strain of *Trichoderma koningii*. *New Zeland Journal of Agricultural Research*. Vol 42: 37-345.

Ward, O. 1989. *Biotechnología de las fermentaciones.* Editorial Acríbia S. A. Zaragoza-España. Pp. 173-185.

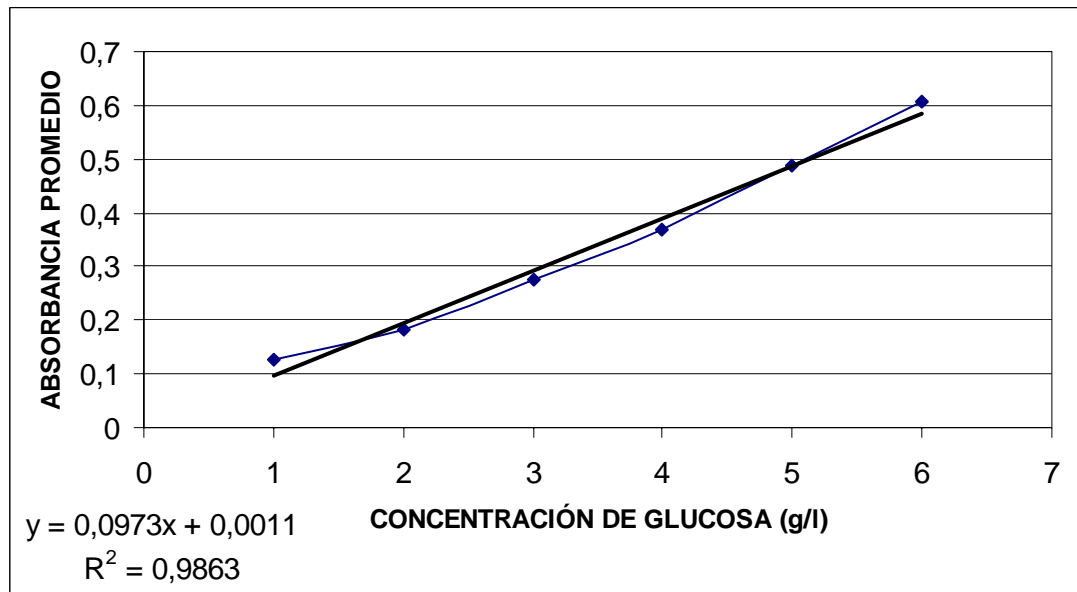
10. ANEXOS

ANEXO 1

Elaboración de la curva patrón para la determinación de azúcares reductores mediante la técnica del Acido Dinitrosalicílico (DNS)

La curva patrón para la determinación de azúcares reductores se elaboró según el protocolo descrito por Miller (1959) y citado por Pedroza y colaboradores (2004). Como sustancia de referencia se empleó glucosa anhidra. Se prepararon 6 soluciones de glucosa de concentraciones conocidas con un volumen final de 2ml. Las concentraciones evaluadas fueron de 0.5 g/l, 0.7 g/l, 1 g/l, 1.5 g/l, 1.7 g/l y 2g/l, respectivamente. Se tomaron 0.25ml de cada una de las soluciones preparadas anteriormente y se les adicionó 0.25ml del reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), los tubos se llevaron a ebullición durante 5 minutos y se detuvo la reacción al sumergir los tubos en hielo. A cada tubo se le adicionó 2.5ml de agua destilada y se procedió a leer las absorbancias a una longitud de onda de 540nm, ajustando el cero de absorbancia con el blanco de la prueba, el cual se construyó con agua destilada.

Replica	Absorbancia 540nm					
	0.5g/l	0.7g/l	1g/l	1.5g/l	1.7g/l	2g/l
1	0.142	0.207	0.269	0.347	0.415	0.566
2	0.114	0.163	0.251	0.324	0.417	0.587
3	0.114	0.184	0.287	0.325	0.482	0.608
4	0.127	0.218	0.253	0.364	0.54	0.627
5	0.134	0.17	0.279	0.52	0.548	0.659
6	0.136	0.173	0.284	0.412	0.471	0.636
7	0.118	0.162	0.294	0.354	0.504	0.588
8	0.139	0.183	0.273	0.314	0.529	0.581
Promedio	0.128	0.183	0.274	0.370	0.488	0.607



Ecuación patrón de azúcares reductores:

$$Y = 0.0973x + 0.0011$$

$$R^2 = 0.9863$$

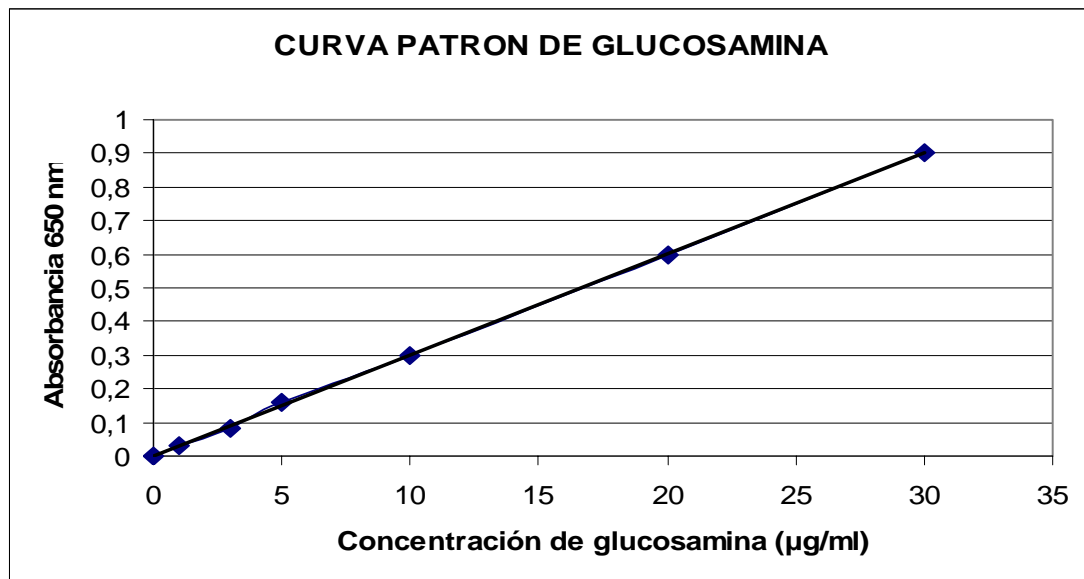
Donde **Y** representa la absorbancia registrada a 540nm, **x** la concentración de azúcares reductores (g/l), **b** el punto de corte con el eje X y **a** la pendiente.

ANEXO 2

Elaboración de la curva patrón de N-acetilglucosamina

La curva de calibración para glucosamina se construyó siguiendo el protocolo descrito por Drysdale & Ride (1972), utilizando como patrón glucosamina hidrociorada y como blanco agua destilada estéril.

Concentración μg glucosamina/ml	Absorbancia promedio 650nm
0	0
1	0,03
3	0,08
5	0,16
10	0,3
20	0,6
30	0,9



Ecuación patrón de glucosamina:

$$Y = 0.03x - 0.0003$$

$$R^2 = 0.9997$$

ANEXO 3

Protocolo para realizar la prueba de viabilidad

La viabilidad fue evaluada mediante la técnica de recuento en placa en agar Saboreaud-Rosa de bengala. Para el caso de la fermentación líquida se tomaron los pellets de *T. koningii* producidos en el biorreactor airlift y se licuaron durante 30 segundos. Se realizaron diluciones decimales seriadas tomando 1ml de la suspensión madre obtenida anteriormente y se adicionaron a 9ml de agua estéril con Tween 80 al 0.1% (v/v). Posteriormente se inocularon 0.1ml de la dilución 10^{-1} en cajas de agar Saboreaud-Rosa de bengala por triplicado, estas cajas fueron incubadas durante 48 horas a 25°C y la lectura se reportó como UFC/ml. Se empleó la dilución 10^{-1} puesto que ésta fue la dilución en la cual se hizo el recuento de conidios en cámara de Neubauer.

En el caso de la fermentación sólida, se tomaron 0.1g de sustrato esporulado y se adicionaron a un tubo de ensayo que contenía 10ml de Tween 80 al 0.1%. La suspensión se homogenizó en vortex, se tomó 1ml de la suspensión inicial y se pasó a otro tubo de ensayo con 9ml de Tween 80 al 0.1% (dilución 10^{-3}). De aquí en adelante se procedió de la misma manera como se hizo para la fermentación líquida y el resultado se reportó como UFC/g.

ANEXO 4

Protocolo para realizar la prueba de germinación de conidios

La germinación de los conidios de *T. koningii* se evaluó a través de la siembra de 0.1ml de la dilución empleada para la prueba de viabilidad en placas de agar extracto de malta por triplicado. Estas cajas fueron incubadas durante 17 horas a 22°C. El resultado se informó como el porcentaje de conidios germinados, entendiéndose como conidio germinado aquel que presentó un tubo germinal con una longitud igual o mayor al tamaño del conidio. Esto se hizo a través del conteo de conidios en 10 campos ópticos en el objetivo 40x, determinando el número total de conidios y el número de conidios germinados por campo. El porcentaje de germinación se calculó empleando la fórmula:

$$\% \text{ GERMINACIÓN} = \frac{\text{CONIDIOS GERMINADOS}}{\text{TOTAL CG+NG}} * 100$$

Donde CG representa los conidios germinados y NG los conidios no germinados.

ANEXO 5
MEDIOS DE CULTIVO

AGAR PAPA-DEXTROSA

Agar 18g

Sacarosa 2g

Extracto de papa 200g

Agua destilada 1000ml

AGAR SABOUREAUD-ROSA DE BENGALA

Agar 20g

Peptona 5g

Sulfato de Magnesio heptahidratado 0.5g

Fosfato dipotásico 1g

Glucosa 10g

Rosa de Bengala al 5% (p/v) 0.5ml

Cloramfenicol 0.1g

Agua destilada 1000ml

AGAR EXTRACTO DE MALTA

Extracto de malta 30g

Agar 15g

Agua destilada 1000ml

MEDIOS SL1 Y SS1

Fuente de Carbono 80%

Fuente de Nitrógeno 9%

Relación C/ N 8.89

ANEXO 6
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

ANEXO 6a: FERMENTACIÓN LÍQUIDA

ANÁLISIS DE VARIANZA

Tabla ANOVA para BIOMASA SECA según FERMENTACIÓN

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	149,587	5	29,9175	1,77	0,2536
Intra grupos	101,565	6	16,9275		
Total (Corr.)	251,153	11			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de BIOMASA SECA en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. El F-ratio, que en este caso es igual a 1,76738, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las BIOMASA SECA medias de un nivel de FERMENTACIÓN a otro para un 95,0%.

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS LSD

Tabla de Medias para BIOMASA SECA según FERMENTACIÓN
con 95,0 intervalos LSD

FERMENTACIÓN	Frec.	Media	Error Estándar (s agrupada)	Límite inf.	Límite sup.
1	2	4,195	2,90926	-0,838691	9,22869
2	2	9,91	2,90926	4,87631	14,9437
3	2	8,865	2,90926	3,83131	13,8987
4	2	15,61	2,90926	10,5763	20,6437
5	2	6,34	2,90926	1,30631	11,3737
6	2	8,65	2,90926	3,61631	13,6837
Total	12	8,92833			

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la BIOMASA SECA media para cada nivel de FERMENTACIÓN. También muestra el error estándar de cada media, que es la medida de su variabilidad en la muestra. El error estándar es el resultado de dividir la desviación típica agrupada por la raíz cuadrada del número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo que incluye cada media. Los intervalos mostrados actualmente se basan en el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Se construyen de tal manera que si dos medias son iguales, sus intervalos se solaparán 95,0% de las veces. Puede ver los intervalos gráficamente seleccionando Gráfico de Medias en la lista de Opciones Gráficas. En los Tests de Rangos Múltiples, estos intervalos se utilizan para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

Contraste Múltiple de Rango para BIOMASA SECA según FERMENTACIÓN

Método: 95,0 porcentaje LSD

FERMENTACIÓN	Frec.	Media	Grupos homogéneos
1	2	4,195	X
5	2	6,34	XX
6	2	8,65	XX
3	2	8,865	XX
2	2	9,91	XX
4	2	15,61	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	-5,715	10,0674
1 - 3	-4,67	10,0674
1 - 4	*-11,415	10,0674
1 - 5	-2,145	10,0674
1 - 6	-4,455	10,0674
2 - 3	1,045	10,0674
2 - 4	-5,7	10,0674
2 - 5	3,57	10,0674
2 - 6	1,26	10,0674
3 - 4	-6,745	10,0674
3 - 5	2,525	10,0674
3 - 6	0,215	10,0674
4 - 5	9,27	10,0674
4 - 6	6,96	10,0674
5 - 6	-2,31	10,0674

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de uno de los pares, indica que éste muestra diferencia estadísticamente significativa a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE ACUERDO A LOS FACTORES EVALUADOS

Análisis de la Varianza para CONCENTRACION BIOMASA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:ALTURA RISER	13,4421	1	13,4421	0,69	0,5584
B:CAUDAL AIRE	13,4421	1	13,4421	0,69	0,5584
C:VOLUMEN ANTIESPUMA	19,4376	1	19,4376	1,00	0,5000
AB	185,956	1	185,956	9,57	0,1991
AC	0,132613	1	0,132613	0,01	0,9475
BC	0,132613	1	0,132613	0,01	0,9475
Error Total	19,4376	1	19,4376		
Total (corr.)	251,98	4			

R-cuadrado = 92,2861 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 46,0024 por ciento

Error Estándar de Est. = 4,40881

Error absoluto de la media = 1,55875

Estadístico Durbin-Watson = 2,0

Autocorrelación residual Lag 1 = -0,125

El StatAdvisor

La tabla de ANOVA divide la variabilidad en CONCENTRACION BIOMASA en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos. después pruebe la significación estadística de cada efecto comparando la media al cuadrado contra una estimación del error experimental. En este caso, 0 de los efectos tienen los p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 92,2861% de la variabilidad en CONCENTRACION BIOMASA. El estadístico R-cuadrado ajustado, el cual es más adecuado para la comparación de números diferentes de variables independientes, es 46,0024%. El error estándar de la estimación muestra la desviación normal de los residuos para ser 4,40881. El error absoluto de la media (MAE) de 1,55875 es el promedio del valor de los residuos. El estadístico Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay cualquier correlación significativa basada en el orden en el que se suceden en el fichero de datos.

ANEXO 6b: FERMENTACION SÓLIDA

ANÁLISIS DE VARIANZA - DISEÑO FACTORIAL COMPLETO

Análisis de la Varianza para CONCENTRACION CONIDIOS

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:TEMPERATURA	0,00183013	1	0,00183013	0,02	0,9082
B:CANTIDAD BANDEJAS	0,0842551	1	0,0842551	0,97	0,5046
C:CONCENTRACION INOC	0,000253125	1	0,000253125	0,00	0,9656
AB	0,0368561	1	0,0368561	0,42	0,6322
AC	0,628881	1	0,628881	7,25	0,2264
BC	0,00838513	1	0,00838513	0,10	0,8081
Error Total	0,0867361	1	0,0867361		
Total (corr.)	0,847197	7			

R-cuadrado = 89,762 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 28,3339 por ciento

Error Estándar de Est. = 0,29451

Error absoluto de la media = 0,104125

Estadístico Durbin-Watson = 2,5

Autocorrelación residual Lag 1 = -0,375

El StatAdvisor

La tabla de ANOVA divide la variabilidad en CONCENTRACION CONIDIOS en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos. después pruebe la significación estadística de cada efecto comparando la media al cuadrado contra una estimación del error experimental. En este caso, 0 de los efectos tienen los p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 89,762% de la variabilidad en CONCENTRACION CONIDIOS. El estadístico R-cuadrado ajustado, el cual es más adecuado para la comparación de números diferentes de variables independientes, es 28,3339%. El error estándar de la estimación muestra la desviación normal de los residuos para ser 0,29451. El error absoluto de la media (MAE) de 0,104125 es el promedio del valor de los residuos. El estadístico Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay cualquier correlación significativa basada en el orden en el que se suceden en el fichero de datos.

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS LSD – DISEÑO FACTORIAL COMPLETO

Contraste Múltiple de Rango para LOG CONIDIOS según FERMENTACIÓN

Método: 95,0 porcentaje LSD

FERMENTACIÓN	Frec.	Media	Grupos homogéneos
2	7	9,07957	X
1	8	9,21025	X
8	5	9,414	X
7	5	9,6016	X
6	7	9,82614	X
3	5	9,8448	X
4	5	9,8876	X
5	8	9,92338	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*0,130679	0,123704
1 - 3	*-0,63455	0,136262
1 - 4	*-0,67735	0,136262
1 - 5	*-0,713125	0,119509
1 - 6	*-0,615893	0,123704
1 - 7	*-0,39135	0,136262
1 - 8	*-0,20375	0,136262
2 - 3	*-0,765229	0,139955
2 - 4	*-0,808029	0,139955
2 - 5	*-0,843804	0,123704
2 - 6	*-0,746571	0,127761
2 - 7	*-0,522029	0,139955
2 - 8	*-0,334429	0,139955
3 - 4	-0,0428	0,151169
3 - 5	-0,078575	0,136262
3 - 6	0,0186571	0,139955
3 - 7	*0,2432	0,151169
3 - 8	*0,4308	0,151169
4 - 5	-0,035775	0,136262
4 - 6	0,0614571	0,139955
4 - 7	*0,286	0,151169
4 - 8	*0,4736	0,151169
5 - 6	0,0972321	0,123704
5 - 7	*0,321775	0,136262
5 - 8	*0,509375	0,136262
6 - 7	*0,224543	0,139955
6 - 8	*0,412143	0,139955
7 - 8	*0,1876	0,151169

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 22 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 5 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla de Medias para LOG CONIDIOS según FERMENTACIÓN
con 95,0 intervalos LSD

FERMENTACIÓN	Frec.	Media	Error Estándar (s agrupada)	Límite inf.	Límite s
1	8	9,21025	0,0418743	9,1505	9
2	7	9,07957	0,0447655	9,01569	9,14
3	5	9,8448	0,0529672	9,76922	9,92
4	5	9,8876	0,0529672	9,81202	9,96
5	8	9,92338	0,0418743	9,86362	9,98
6	7	9,82614	0,0447655	9,76226	9,89
7	5	9,6016	0,0529672	9,52602	9,67
8	5	9,414	0,0529672	9,33842	9,48
Total	50	9,58298			

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la LOG CONIDIOS media para cada nivel de FERMENTACIÓN. También muestra el error estándar de cada media, que es la medida de su variabilidad en la muestra. El error estándar es el resultado de dividir la desviación típica agrupada por la raíz cuadrada del número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo que incluye cada media. Los intervalos mostrados actualmente se basan en el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Se construyen de tal manera que si dos medias son iguales, sus intervalos se solaparán 95,0% de las veces. Puede ver los intervalos gráficamente seleccionando Gráfico de Medias en la lista de Opciones Gráficas. En los Tests de Rangos Múltiples, estos intervalos se utilizan para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

ANÁLISIS CAUDAL DE AIRE

ANÁLISIS DE VARIANZA

Tabla ANOVA para CONCENTRACION CONIDIOS según CAUDAL AIRE

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,79106	3	0,263687	22,21	0,0059
Intra grupos	0,047484	4	0,011871		
Total (Corr.)	0,838544	7			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de CONCENTRACION CONIDIOS en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. El F-ratio, que en este caso es igual a 22,2127, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las CONCENTRACION CONIDIOS medias de un nivel de CAUDAL AIRE a otro para un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS LSD – CAUDAL DE AIRE

Contraste Múltiple de Rango para CONCENTRACION CONIDIOS según CAUDAL AIRE

Método: 95,0 porcentaje LSD

CAUDAL AIRE	Frec.	Media	Grupos homogéneos
0,5	2	9,112	X
0,25	2	9,685	X
1	2	9,878	X
0	2	9,881	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
0 - 0,25	0,196	0,302506
0 - 0,5	*0,769	0,302506
0 - 1	0,003	0,302506
0,25 - 0,5	*0,573	0,302506
0,25 - 1	-0,193	0,302506
0,5 - 1	*-0,766	0,302506

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

ANÁLISIS FERMENTACIONES ADICIONALES – DISEÑO SIMPLEX

ANÁLISIS DE VARIANZA

Tabla ANOVA para LOG CONIDIOS según FERMENTACIÓN

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Val	
Entre grupos	3,00626	3	1,00209	58,06	0,000	
Intra grupos	0,276148	16	0,0172593			
Total (Corr.)	3,2824	19				

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de LOG CONIDIOS en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. El F-ratio, que en este caso es igual a 58,0608, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las LOG CONIDIOS medias de un nivel de FERMENTACIÓN a otro para un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS LSD

Tabla de Medias para LOG CONIDIOS según FERMENTACIÓN
con 95,0 intervalos LSD

FERMENTACIÓN	Frec.	Error Estándar		Límite inf.	Límite su
		Media	(s agrupada)		
9	4	8,9795	0,0656872	8,88103	9,077
10	4	8,82125	0,0656872	8,72278	8,919
11	6	9,62217	0,0536334	9,54177	9,702
12	6	9,7375	0,0536334	9,6571	9,81
Total	20	9,36805			

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la LOG CONIDIOS media para cada nivel de FERMENTACIÓN. También muestra el error estándar de cada media, que es la medida de su variabilidad en la muestra. El error estándar es el resultado de dividir la desviación típica agrupada por la raíz cuadrada del número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo que incluye cada media. Los intervalos mostrados actualmente se basan en el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Se construyen de tal manera que si dos medias son iguales, sus intervalos se solaparán 95,0% de las veces. Puede ver los intervalos gráficamente seleccionando Gráfico de Medias en la lista de Opciones Gráficas. En los Tests de Rangos Múltiples, estos intervalos se utilizan para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

Contraste Múltiple de Rango para LOG CONIDIOS según FERMENTACIÓN

Método: 95,0 porcentaje LSD

FERMENTACIÓN	Frec.	Media	Grupos homogéneos
10	4	8,82125	X
9	4	8,9795	X
11	6	9,62217	X
12	6	9,7375	X

Contraste	Diferencias	+/- Límite
9 - 10	0,15825	0,196931
9 - 11	*-0,642667	0,179772
9 - 12	*-0,758	0,179772
10 - 11	*-0,800917	0,179772
10 - 12	*-0,91625	0,179772
11 - 12	-0,115333	0,160793

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

TODAS LAS FERMENTACIONES SÓLIDAS REALIZADAS

ANÁLISIS DE VARIANZA

Tabla ANOVA para LOG CONIDIOS según FERMENTACIÓN

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Va
Entre grupos	8,84361	11	0,803965	53,89	0,00
Intra grupos	0,865309	58	0,0149191		
Total (Corr.)	9,70892	69			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de LOG CONIDIOS en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. El F-ratio, que en este caso es igual a 53,8882, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las LOG CONIDIOS medias de un nivel de FERMENTACIÓN a otro para un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

COMPARACIÓN DE MEDIAS LSD ENTRE TODAS LAS FERMENTACIONES

Tabla de Medias para LOG CONIDIOS según FERMENTACIÓN
con 95,0 intervalos LSD

FERMENTACIÓN	Frec.	Error Estándar		Límite inf.	Límite sup.
		Media	(s agrupada)		
1	8	9,21025	0,0431844	9,14913	9,27137
2	7	9,07957	0,046166	9,01423	9,14492
3	5	9,8448	0,0546244	9,76748	9,92212
4	5	9,8876	0,0546244	9,81028	9,96492
5	8	9,92338	0,0431844	9,86225	9,9845
6	7	9,82614	0,046166	9,7608	9,89149
7	5	9,6016	0,0546244	9,52428	9,67892
8	5	9,414	0,0546244	9,33668	9,49132
9	4	8,9795	0,0610719	8,89306	9,06594
10	4	8,82125	0,0610719	8,73481	8,90769
11	6	9,62217	0,049865	9,55159	9,69275
12	6	9,7375	0,049865	9,66692	9,80808
Total	70	9,52157			

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la LOG CONIDIOS media para cada nivel de FERMENTACIÓN. También muestra el error estándar de cada media, que es la medida de su variabilidad en la muestra. El error estándar es el resultado de dividir la desviación típica agrupada por la raíz cuadrada del número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo que incluye cada media. Los intervalos mostrados actualmente se basan en el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Se construyen de tal manera que si dos medias son iguales, sus intervalos se solaparán 95,0% de las veces. Puede ver los intervalos gráficamente seleccionando Gráfico de Medias en la lista de Opciones Gráficas. En los Tests de Rangos Múltiples, estos intervalos se utilizan para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

Contraste Múltiple de Rango para LOG CONIDIOS según FERMENTACIÓN

Método: 95,0 porcentaje LSD

FERMENTACIÓN	Frec.	Media	Grupos homogéneos
10	4	8,82125	X
9	4	8,9795	XX
2	7	9,07957	X
1	8	9,21025	X
8	5	9,414	X
7	5	9,6016	X
11	6	9,62217	X
12	6	9,7375	XX
6	7	9,82614	XX
3	5	9,8448	XX
4	5	9,8876	X
5	8	9,92338	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*0,130679	0,12654
1 - 3	*-0,63455	0,139385
1 - 4	*-0,67735	0,139385
1 - 5	*-0,713125	0,122249
1 - 6	*-0,615893	0,12654
1 - 7	*-0,39135	0,139385
1 - 8	*-0,20375	0,139385
1 - 9	*0,23075	0,149724
1 - 10	*0,389	0,149724
1 - 11	*-0,411917	0,132044
1 - 12	*-0,52725	0,132044
2 - 3	*-0,765229	0,143163
2 - 4	*-0,808029	0,143163
2 - 5	*-0,843804	0,12654
2 - 6	*-0,746571	0,13069
2 - 7	*-0,522029	0,143163
2 - 8	*-0,334429	0,143163
2 - 9	0,100071	0,153247
2 - 10	*0,258321	0,153247
2 - 11	*-0,542595	0,136026
2 - 12	*-0,657929	0,136026
3 - 4	-0,0428	0,154634
3 - 5	-0,078575	0,139385
3 - 6	0,0186571	0,143163
3 - 7	*0,2432	0,154634
3 - 8	*0,4308	0,154634
3 - 9	*0,8653	0,164014
3 - 10	*1,02355	0,164014
3 - 11	*0,222633	0,148051
3 - 12	0,1073	0,148051
4 - 5	-0,025775	0,139385

3 - 12	0,1073	0,148051
4 - 5	-0,035775	0,139385
4 - 6	0,0614571	0,143163
4 - 7	*0,286	0,154634
4 - 8	*0,4736	0,154634
4 - 9	*0,9081	0,164014
4 - 10	*1,06635	0,164014
4 - 11	*0,265433	0,148051
4 - 12	*0,1501	0,148051
5 - 6	0,0972321	0,12654
5 - 7	*0,321775	0,139385
5 - 8	*0,509375	0,139385
5 - 9	*0,943875	0,149724
5 - 10	*1,10213	0,149724
5 - 11	*0,301208	0,132044
5 - 12	*0,185875	0,132044
6 - 7	*0,224543	0,143163
6 - 8	*0,412143	0,143163
6 - 9	*0,846643	0,153247
6 - 10	*1,00489	0,153247
6 - 11	*0,203976	0,136026
6 - 12	0,0886429	0,136026
7 - 8	*0,1876	0,154634
7 - 9	*0,6221	0,164014
7 - 10	*0,78035	0,164014
7 - 11	-0,0205667	0,148051
7 - 12	-0,1359	0,148051
8 - 9	*0,4345	0,164014
8 - 10	*0,59275	0,164014
8 - 11	*-0,208167	0,148051
8 - 12	*-0,3235	0,148051
9 - 10	0,15825	0,172886
9 - 11	*-0,642667	0,157823
9 - 12	*-0,758	0,157823
10 - 11	*-0,800917	0,157823
10 - 12	*-0,91625	0,157823
11 - 12	-0,115333	0,141161

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 53 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 7 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

ANEXO 7

MODELO CINÉTICO FERMENTACIÓN SÓLIDA

Exponential model: $Y = \exp(a + b \cdot X)$

Y: Log concentración de conidios/g

X: Tiempo de fermentación (horas)

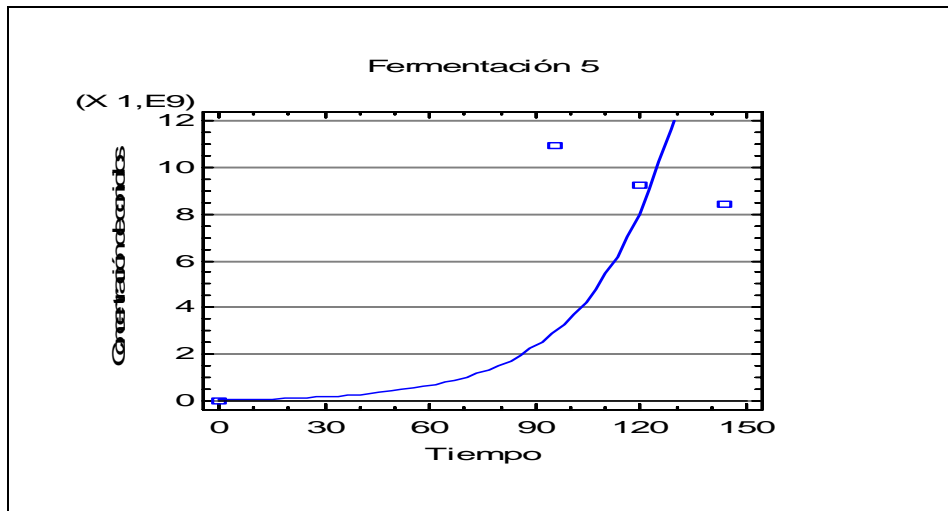
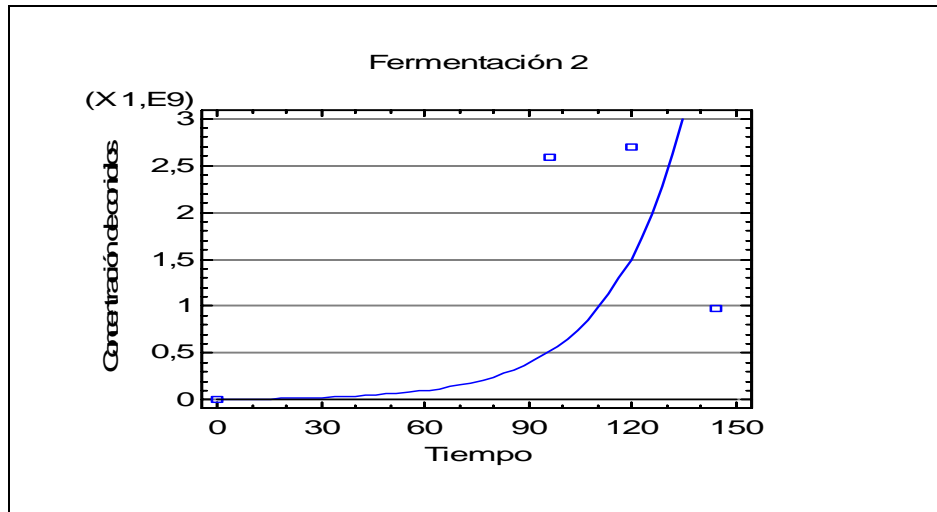
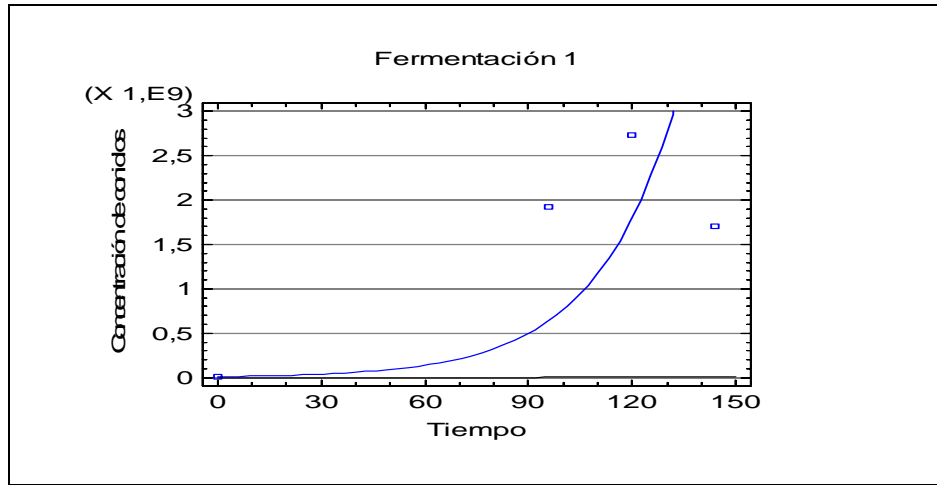
a: pendiente

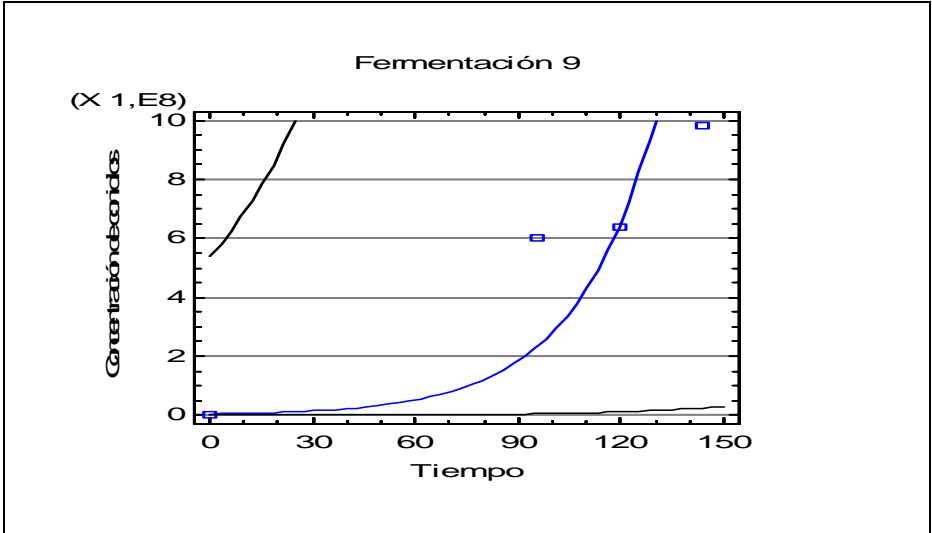
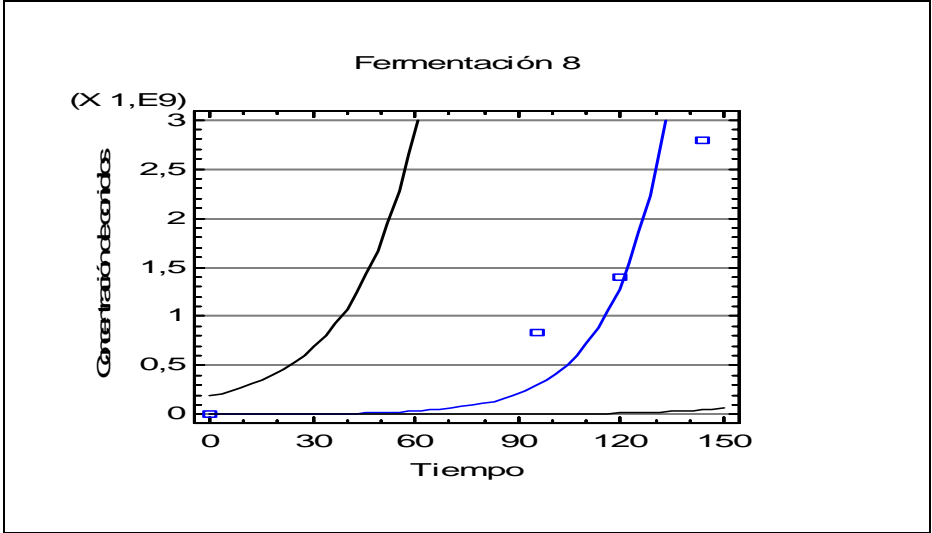
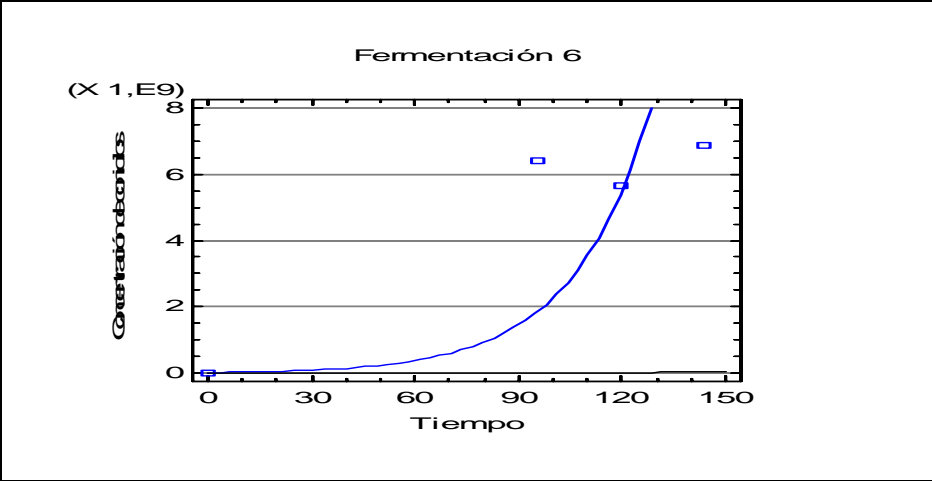
b: intercepto en el eje X

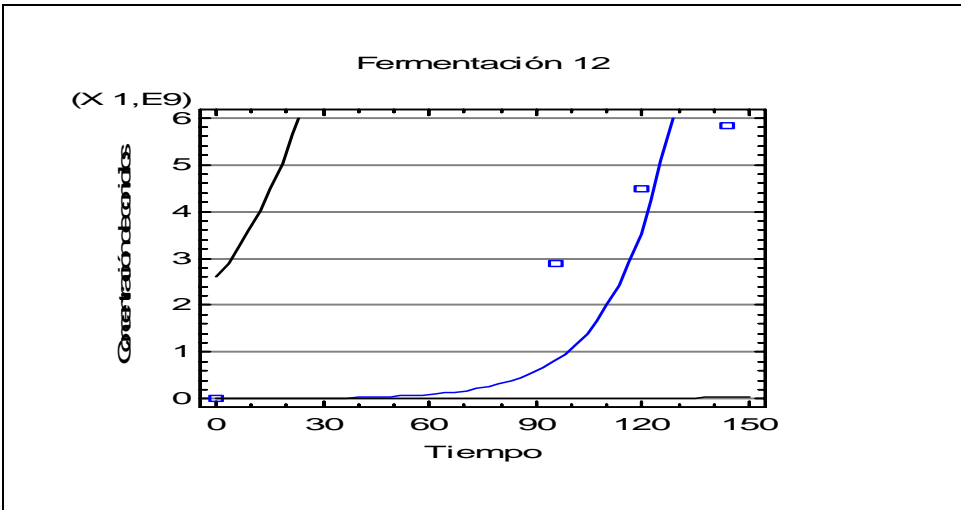
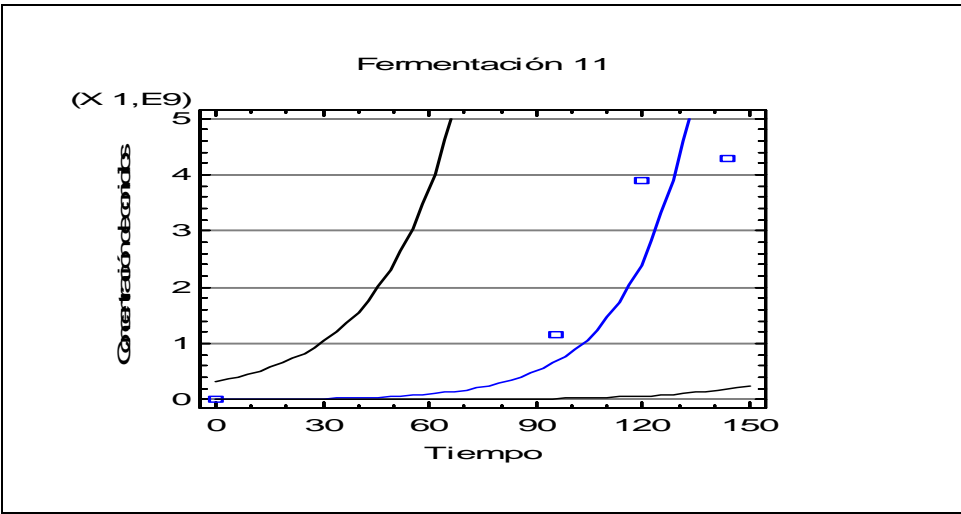
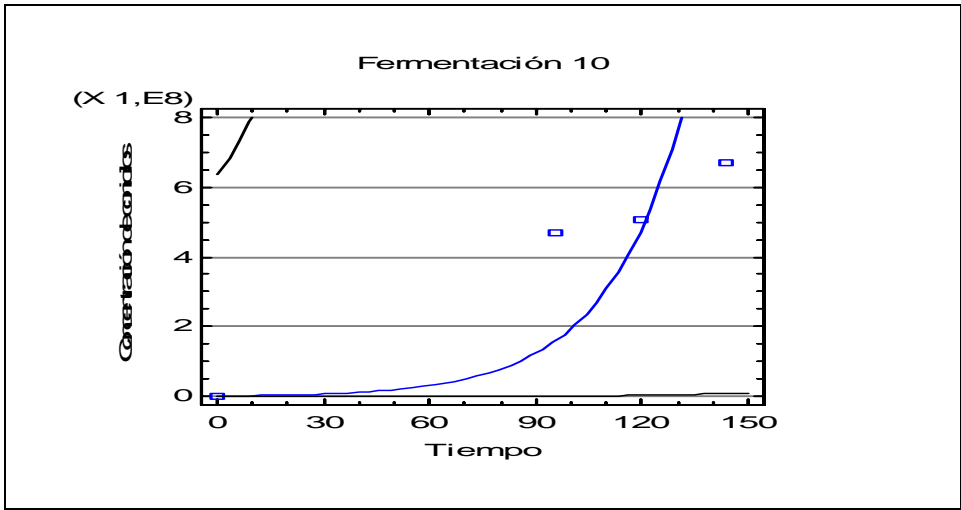
FERMENTACIÓN	AJUSTE MODELO EXPONENCIAL
1	$Y = \exp(16,1789 + 0,0427683 \cdot X)$ $R^2 = 88,9147$ Coeficiente correlación = 0,942946
2	$Y = \exp(15,683 + 0,0455925 \cdot X)$ $R^2 = 81,3068$ Coeficiente correlación = 0,901703
3	$Y = \exp(16,0043 + 0,0510043 \cdot X)$ $R^2 = 96,8991$ Coeficiente correlación = 0,984373
4	$Y = \exp(15,493 + 0,0563515 \cdot X)$ $R^2 = 93,0208$ Coeficiente correlación = 0,964473
5	$Y = \exp(17,8609 + 0,0413481 \cdot X)$ $R^2 = 88,0301$ Coeficiente correlación = 0,938244

6	$Y = \exp (17,1326 + 0,0441074 * X)$ $R^2 = 90,8402$ Coeficiente correlación = 0,953101
7	$Y = \exp (16,532 + 0,0414694 * X)$ $R^2 = 97,9816$ Coeficiente correlación = 0,989856
8	$Y = \exp (13,7021 + 0,0608208 * X)$ $R^2 = 96,4865$ Coeficiente correlación = 0,982275
9	$Y = \exp (15,2347 + 0,0421858 * X)$ $R^2 = 94,11$ Coeficiente correlación = 0,970103
10	$Y = \exp (14,5946 + 0,0449738 * X)$ $R^2 = 93,058$ Coeficiente correlación = 0,964666
11	$Y = \exp (15,2287 + 0,0533383 * X)$ $R^2 = 96,9442$ Coeficiente correlación = 0,984603
12	$Y = \exp (14,7278 + 0,0607299 * X)$ $R^2 = 94,2048$ Coeficiente correlación = 0,970592

En las figuras, las líneas negras representan los límites de ajuste al modelo establecido por el programa estadístico y la línea azul representa el ajuste de los datos al modelo. En el eje X se encuentra el tiempo de fermentación dado en horas y en el eje Y el logaritmo de la concentración de conidios/g.







**ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN MASIVA DEL
HONGO *Trichoderma koningii* Th003 MEDIANTE FERMENTACIÓN
BIFÁSICA A ESCALA PILOTO**

C. CRUZ – M.¹, A. DÍAZ², A. M. COTES³.

Resumen

Las especies del género *Trichoderma* son los microorganismos antagonistas más utilizados para el control de enfermedades en plantas ocasionadas por fitopatógenos. *Trichoderma* ha sido estudiado como agente de control biológico durante más de 70 años, pero solo hasta hace poco tiempo, las cepas de este microorganismo han comenzado a adquirir un valor comercial importante debido a que sus sistemas de producción han sido escalados a nivel piloto y semi-industrial. En este trabajo se llevó a cabo la estandarización de las condiciones de fermentación bifásica del hongo *T. koningii* cepa Th003 para alcanzar concentraciones de biomasa para su producción a escala industrial. La biomasa fúngica fue obtenida usando la técnica de fermentación líquida en un medio de cultivo codificado como SL1 compuesto de arroz y melaza. Inicialmente se determinó el tiempo óptimo para la producción del inóculo líquido en un biorreactor airlift y posteriormente se aplicó un diseño simplex. Se determinó que la aireación es el factor más importante que afecta el proceso para llevar a cabo su escalamiento. La mayor producción de biomasa fúngica (15.61 g/l de biomasa seca) se obtuvo en la fermentación 4 bajo condiciones de operación como:

¹ Estudiante de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. e-mail: caroc10@yahoo.com, l-cruz@javeriana.edu.co

² Investigador. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica - CBB Km. 14 vía Mosquera, Colombia. e-mail: andresdiazg@yahoo.com

³ Directora. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica - CBB Km. 14 vía Mosquera, Colombia. e-mail: cotesprado@yahoo.com, acotes@corpoica.org.co

altura de la zona de ascenso 55.1cm, caudal de aire 0.5vvm y volumen de antiespumante 20ml. Además, la cuantificación de N-acetilglucosamina resultó ser un buen indicador del crecimiento fúngico al poder ser relacionado con la biomasa obtenida durante el proceso de fermentación líquida ($\pm 78.56 \mu\text{g}$ glucosamina/ g biomasa seca, con un coeficiente de variación de los datos de 10.23%).

De otro lado, la producción masiva de conidios se llevó a cabo en un fermentador de bandejas a escala piloto usando un sustrato sólido codificado como SS1 compuesto de arroz y salvado de trigo. Se aplicó un diseño factorial completo y luego el diseño experimental simplex. Se determinó que la aireación y el volumen de inóculo líquido fueron los factores de operación que más afectaron la cantidad de conidios obtenida después de 96 horas de fermentación, obteniéndose la mayor concentración durante la fermentación 5 equivalente a 8.44×10^9 conidios/g de sustrato.

Palabras claves: Fermentación bifásica, *Trichoderma koningii*, fermentador airlift, cuantificación de biomasa fúngica, diseño simplex.

Abstract

Trichoderma species are the antagonistic microorganisms most used for the control of plant diseases caused by phytopathogens. *Trichoderma* has been studied as biological control agent during more than 70 years, but just recently strains of this microorganisms have begun to acquire an important commercial value because its production systems has been scaled to pilot and semi-industrial scale production. In this work was carried out the standardization of conditions of two-phase fermentation of the fungi *T. koningii* Th003 strain to obtain biomass concentrations for its industrial scale-up production. Fungal biomass was obtained using liquid

fermentation technique in a culture medium codified as SL1 based on rice and cane molasses. Initially the optimal time was determined for inoculum production in airlift bioreactor and then, a simplex design was applied. We found aeration as the most important factor that influence or affect the scaling process. The biggest production of fungal biomass (15.61 g/l dry biomass) was obtained by fermentation 4 under operational conditions as: riser height 55.1cm, aeration 0.5vvm and antifoam volume 20ml. Moreover, the quantification of N-acetylglucosamine was a good indicator from the fungal growth to be related with the biomass obtained during the process of liquid fermentation ($\pm 78.56 \mu\text{g}$ glucosamine/ g dry biomass, with a data variation coefficient of 10.23%).

By other side, the massive production of conidia was carried out in a tray bioreactor to pilot scale using a solid substrate codified as SS1 based on rice and wheat bran. A complete factorial design and a simplex design were applied. We determined that aeration and liquid inoculum volume were the operation factors that most affected the quantity of conidia obtained after 96 hours of fermentation, being obtained the biggest concentration during the fermentation 5 equivalent to 8.44×10^9 conidia/g.

Keywords: Biphasic fermentation, *Trichoderma koningii*, airlift bioreactor, fungal biomass estimation, simplex design.

Introducción

Las enfermedades producidas por organismos fitopatógenos tales como bacterias, nemátodos u hongos constituyen generalmente la mayor causa de pérdidas en la producción agrícola (Benítez *et al.*, 2004). La práctica tradicional más común para la disminución y eliminación de los efectos perjudiciales ocasionados por los agentes

fitopatógenos mencionados se basa en el empleo de plaguicidas, práctica conocida como control químico. Sin embargo, el aumento de la conciencia social que se tiene ante el enorme deterioro medioambiental que supone la utilización indiscriminada de estos compuestos químicos, ha provocado un gran interés en la búsqueda de sistemas ambientalmente sostenibles para el control de plagas y enfermedades. En este sentido, una estrategia promisorio es la utilización de microorganismos antagonistas de los agentes infecciosos y que desplazan a éstos de una manera natural, denominada control biológico (Benítez *et al.*, 2004). Como consecuencia de esto, existe un creciente interés por la explotación y utilización de microorganismos para el control de plagas.

De ahí que para el desarrollo de nuevos productos de origen biológico se deben tener en cuenta diferentes aspectos: primero, definir un medio de cultivo óptimo y el mejor sistema para la obtención masiva de un inóculo que permita una buena relación costo - rendimiento en la producción; segundo, establecer bioensayos de control de calidad a escala de laboratorio; tercero, garantizar la estabilidad del producto y determinar las condiciones de almacenamiento; cuarto, asegurar su facilidad de aplicación, y por último, asegurar una efectividad similar a la presentada por los agroquímicos en pruebas de invernadero y campo.

En el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica, se han llevado a cabo trabajos encaminados a la producción de un bioplaguicida a base del hongo *Trichoderma koningii*. Peña (2002) llevó a cabo un estudio cuyo objeto fue evaluar el efecto de diferentes sustratos sobre el crecimiento y la producción de conidios de *Trichoderma koningii* Th003 y estableció un método de

producción masiva eficiente en un medio sólido codificado como SS1. Por lo tanto, en este trabajo los objetivos fueron: realizar la estandarización e implementación a nivel piloto de una técnica de fermentación bifásica que incluye una fermentación líquida y otra fermentación sobre un sustrato sólido, para la obtención de las estructuras infectivas del hongo biocontrolador *Trichoderma koningii* cepa Th003, en cantidades suficientes para su aplicación masiva a nivel de campo usado como principio activo de un bioplaguicida y simultáneamente implementar una técnica colorimétrica para la cuantificación de biomasa fúngica del hongo *T. koningii* Th003.

Materiales y métodos

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de biotecnología y Bioindustria de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) ubicado en el Km.14 - vía Mosquera.

- **Obtención y mantenimiento de la cepa de interés**

El microorganismo empleado fue la cepa del hongo *Trichoderma koningii* codificada como Th003, suministrada por el Banco de Germoplasma de microorganismos del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica.

- **Producción de preinóculos**

A partir de cajas de agar PDA con el hongo crecido, se adicionaron 10ml de una solución de Tween 80 al 0.1% (v/v) en agua destilada y se removieron los conidios mediante desprendimiento usando un asa bacteriológica. La suspensión de conidios obtenida se ubicó en un tubo estéril y se homogeneizó en un agitador vibratorio durante 30 segundos. A partir de esta suspensión madre se realizaron diluciones

seriadas usando una solución de Tween 80 al 0.1% (v/v) en agua destilada y se realizó un recuento de conidios en cámara de Neubauer para ajustar la concentración de los preinóculos a 1×10^7 conidios/ml.

Posteriormente se inocularon 2.5ml de la suspensión de conidios mencionada arriba en erlenmeyers de 125ml que contenían 25ml del medio estéril SL1, estandarizado previamente (Peña, 2002), estos se incubaron a 25°C con agitación constante (180rpm) en un baño termostatado Lindberg Blue durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó el control de calidad del caldo de fermentación mediante una coloración de Gram para detectar presencia de bacterias y de azul de lactofenol para visualizar las estructuras fúngicas. Seguidamente, se llevaron a cabo tres cambios de volumen sucesivos en erlenmeyers de 125ml, 500ml y 1000ml manteniendo una relación medio de cultivo:volumen del erlenmeyer de 1/5, incubándose bajo las mismas condiciones y se realizaron las coloraciones antes mencionadas para verificar la pureza del cultivo y para observar microscópicamente la morfología del hongo. Adicionalmente, se llevó a cabo un recuento de conidios en cámara de Neubauer para cuantificar crecimiento y establecer la concentración final de conidios de los preinóculos.

- **Fermentación líquida en biorreactor airlift de 20 litros**

Las fermentaciones líquidas se llevaron a cabo en un fermentador airlift de 20 litros de lazo interno diseñado en un trabajo anterior (Flórez, 2002), en estos sistemas de fermentación, el aire se inyecta a través del tubo interno y por diferencia de densidades fluye a través del tubo externo para generar así homogeneización y aireación al líquido. El equipo está construido en acero inoxidable y permite el

control del caudal de gas de entrada y de la temperatura del caldo de fermentación, adicionalmente, permite el uso de diferentes alturas del tubo interno para estudios hidrodinámicos. La selección de los factores evaluados y sus niveles para cada fermentación se realizó teniendo en cuenta características relacionadas con el equipo (altura de la zona de ascenso) y con las condiciones fisicoquímicas de la fermentación (caudal de aire y volumen de antiespumante) (Tabla 1).

Se empleó un diseño experimental factorial fraccionado a la mitad que incluyó cuatro fermentaciones (Tabla 2) y luego se aplicó el método evolucionario simplex ($k+2$). Para cumplir la condición de evolucionario, se realizaron dos fermentaciones adicionales, cuyos niveles fueron el resultado de la elección de las mejores respuestas de las cuatro fermentaciones anteriores (Tabla 3), donde cada fermentación era equivalente a un único tratamiento. Las condiciones iniciales para llevar a cabo la fermentación líquida fueron determinadas en trabajos anteriores (Peña, 2002); dichas condiciones fueron: temperatura de 25°C y un tiempo de fermentación de 48 horas.

Se realizaron ocho muestreos cada 6 horas empleando una bomba peristáltica PD-50006 tomando 250ml del caldo de fermentación para llevar a cabo las siguientes determinaciones: coloración de Gram y observación microscópica para verificar la pureza del cultivo, determinación de la biomasa fúngica mediante la técnica colorimétrica de la N-acetilglucosamina, pruebas de germinación de conidios sobre placas de agar extracto de malta incubadas a 25°C y leídas a las 17 horas y pruebas de viabilidad sobre placas de agar Saboureaud-Rosa de Bengala (RSB), incubadas a 25°C durante 7 días. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

- **Cuantificación de biomasa fúngica**

Para la cuantificación de biomasa fúngica se empleó la técnica colorimétrica que determina directamente la conversión de la quitina en N-acetilglucosamina. Se tomaron 160ml del caldo de fermentación y se sometieron a centrifugación durante 30 minutos a 8000rpm, se descartó el sobrenadante y la biomasa se lavó nuevamente con agua destilada estéril. La biomasa húmeda obtenida se secó en una estufa de corriente de aire durante 72 horas a 50°C. La biomasa seca obtenida se sometió a un tratamiento enzimático con el fin de eliminar los residuos del medio de cultivo (Tomaselli *et al.*, 2001). El precipitado obtenido se sometió a un tratamiento ácido-térmico seguido de la aplicación de la técnica colorimétrica desarrollada por Drysdale & Ride (1972), se utilizó como blanco el medio de cultivo estéril. La curva de calibración para glucosamina se construyó siguiendo el protocolo descrito anteriormente, utilizando como patrón glucosamina hidrociorada y como blanco agua destilada estéril (Drysdale & Ride, 1972).

- **Fermentación sólida en biorreactor de bandejas**

La selección de los factores y los niveles se realizó teniendo en cuenta características relacionadas con la geometría del equipo (Número de bandejas) y con características fisicoquímicas de la fermentación (temperatura, caudal de aire, volumen de inóculo líquido). Los factores y los niveles evaluados se determinaron teniendo en cuenta los valores reportados por la literatura para este tipo de procesos (Tabla 4). Como variable de respuesta se seleccionó la concentración final de conidios, puesto que éstos se consideran el producto biotecnológico de interés. Se aplicó un diseño

experimental factorial completo que implicó el montaje de ocho fermentaciones como núcleo (Tablas 5 y 6) y cuatro fermentaciones adicionales generadas por la aplicación del método simplex (Tabla 7). Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento.

La cantidad de sustrato sólido SS1 estandarizado en trabajos anteriores (Peña, 2002), fue de 550g por bandeja. La humedad teórica inicial del sustrato se encontraba entre 39% y 51% y el tiempo de fermentación fue de 7 días ya que éste es el tiempo requerido para llevar la esporulación del hongo, establecido en un trabajo anterior (Peña, 2002). Se realizó un muestreo diario y se tomaron tres muestras con un sacabocados de 1cm² en cada una de las bandejas, éstas se mezclaron para una muestra total de 5g aproximadamente. Se evaluó la concentración de conidios mediante recuentos en cámara de Neubauer usando diluciones decimales seriadas, se realizaron pruebas de germinación y viabilidad de conidios de acuerdo al protocolo establecido por Corpoica.

El análisis de los datos obtenidos se realizó empleando el programa estadístico Statgraphics. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza ANOVA y a la prueba de comparación de medias LSD (diferencia mínima significativa) a un nivel de confianza del 95%; además se emplearon cartas de pareto para determinar el efecto de los factores evaluados sobre la variable de respuesta.

Resultados y discusión

- **Fermentación líquida**

Los datos de peso seco obtenidos experimentalmente permitieron comprobar la hipótesis de que los factores evaluados afectaron directamente la productividad del proceso de fermentación líquida, ya que las diferencias entre tratamientos presentaron

una variación hasta del 10.23% y al realizar el análisis estadístico de los datos empleando la prueba LSD, con un 95% de confianza se determinó que existieron diferencias significativas entre fermentaciones. Además, el cambio en la morfología del hongo fue un elemento que influyó de manera negativa sobre la producción de biomasa al final del proceso, por lo que se deduce que es necesario realizar un control exacto sobre las condiciones de incubación respecto a la etapa de precultivo; la alteración de estas condiciones (temperatura y agitación, principalmente) se reflejó en la cantidad de biomasa producida y en la morfología adoptada por el hongo durante la fermentación en biorreactor airlift. Los mejores resultados en términos de biomasa seca se obtuvieron bajo las condiciones definidas en la fermentación 4 y los peores en la fermentación 1. Además, se observó que la combinación de los factores caudal de aire y altura de la zona de ascenso presentaron el mayor efecto sobre la producción de biomasa pero sin ser significativos (Figura 1).

En general, durante las fermentaciones llevadas a cabo generalmente se presentó una morfología mixta con presencia de agregados fúngicos de diversos tamaños, este es un fenómeno ampliamente descrito en la literatura y es debido principalmente a la intensidad de la agitación. En concordancia con lo anterior, durante las fermentaciones 1 y 3 en la que la velocidad de agitación fue elevada ($\geq 0.75\text{vvm}$), el micelio libre fue la forma de biomasa predominante. Por el contrario, en las fermentaciones 2, 4, 5 y 6 a velocidades de agitación bajas ($\leq 0.5\text{vvm}$), la forma de biomasa presente estuvo constituida en su totalidad por micelio en forma de agregados. En cuanto a la cuantificación de biomasa fúngica, se observó que el contenido de glucosamina fue directamente proporcional a la concentración de

biomasa fúngica, independiente del tiempo de fermentación y de la edad del microorganismo. Estos resultados coinciden con los trabajos de Tomaselli (2001), Desgranges (1993) y Drysdale & Ride (1972).

Ejemplo de esto se muestra en la Figura 2, en la cual se representó el comportamiento de la glucosamina en función del tiempo para la fermentación líquida 3, se obtuvo un valor constante de 64.87 μg glucosamina/g biomasa seca, con este valor y usando la curva patrón de glucosamina fue posible predecir la cantidad de biomasa fúngica en cualquier tiempo de la fermentación.

- **Fermentación sólida**

A partir del monitoreo constante de las variables claves de fermentación, se estableció que el fermentador mantuvo de forma adecuada las condiciones de temperatura para el crecimiento del microorganismo ya que el promedio fue de $26^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Se evidenció que la combinación de factores como caudal de aire inyectado al fermentador, y la concentración del inóculo líquido, presentaron la mayor influencia sobre la esporulación del hongo sobre el medio sólido pero sin ser significativos (Figura 3).

En general, el comportamiento del hongo *T. koningii* Th003 obedeció a un modelo de orden exponencial con un ajuste de 96.2% (Figuras 4a y 4b). Además, después de realizar el análisis estadístico de los datos empleando la prueba LSD, con un 95% de confianza se determinó que existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Se observó que en todas las corridas experimentales, la concentración de conidios/g siempre estuvo en el orden de 10^9 siendo el valor máximo el que se presentó en la fermentación número 5 con 8.44×10^9 conidios/g de sustrato.

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron similares a los obtenidos por Pérez y colaboradores (2000) con *Trichoderma harzianum*, en los cuales la concentración máxima obtenida después de llevar a cabo un proceso de fermentación sólida en un sustrato compuesto por arroz fue de 1.80×10^9 conidios/g de sustrato.

Conclusiones

Los resultados demostraron que para la fermentación líquida el mejor comportamiento con respecto a la producción de biomasa fúngica principalmente en forma de micelio, se presentó empleando una altura de la zona de ascenso de 55.1cm, un volumen de antiespumante de 20ml y un caudal de aire inyectado de 0.5vvm, con una producción de 15.61 g/l de biomasa seca.

La cuantificación de N-acetilglucosamina demostró ser un buen indicador del crecimiento fúngico al poder ser relacionado con la biomasa seca independiente de condiciones como edad del microorganismo y tiempo de fermentación.

Se comprobó que la interacción de factores tales como temperatura, humedad relativa y la cantidad de bandejas empleadas en un biorreactor de bandejas, son los que tienen un mayor efecto sobre la producción de conidios del hongo *T. koningii* Th003 durante la fermentación sólida.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica por facilitar la logística requerida para llevar a cabo el trabajo y a Colciencias por el financiamiento del proyecto en el que se enmarcó el presente trabajo.

Bibliografía

Astudillo, M.C., Blanco, B. 1999. Establecimiento de los parámetros de producción semi-industrial del hongo *T. harzianum*, utilizado en control biológico. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 7-11, 14, 20.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. Vol 7: 249-260.

Betancourt, J. C. 1997. Evaluación de una técnica de pregerminación controlada en matriz sólida en combinación con los agentes de control biológico *Trichoderma koningii* y *Pseudomonas fluorescens* para el control del marchitamiento vascular del tomate *Lycopersicon esculentum* causado por el hongo *Fusarium oxysporum*. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes, p. 29-45.

Cárdenas, A. 1999. Control biológico bajo condiciones de invernadero de *Rhizoctonia solana* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici saccardo* en tomate *Lycopersicon esculentum Mill* empleando pregerminación controlada de semillas y los agentes biocontroladores *Trichoderma koningii* Oudemans y *Pseudomonas fluorescens* Migula. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, p. 53.

Desgranges, C., Venague, A., Roche, N., Durand, A. 1993. Use of chitin measurement to estimate fungal biomass in solid state fermentation. *Biotechnology Advances*. Vol 11: 677-683.

Drysdale, R.B. & Ride, J.P. 1972. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiology Plant Pathology*. Vol 2: 7-15.

Flórez, J. 2002. Diseño y puesta en marcha de un reactor airlift para la producción masiva de microorganismos con interés en control biológico. Tesis de Pregrado. Facultad de Ingeniería. Universidad de América.

Peña, V. 2002. Efecto de diferentes sustratos sobre la producción de conidios de *Trichoderma koningii* en medio sólido. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 153p.

Pérez, L., Ramírez, C. 2000. Efecto de las variables, condiciones de la fermentación y del sustrato en la producción de *Trichoderma harzianum*. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 153p.

Pinzón, Y. 2001. Diseño de un fermentador para la producción del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en medio sólido. Tesis de pregrado. Facultad de Ingeniería. Universidad de América. pp. 51 -54.

Saldamando, C. 1996. Control de *Rhizoctonia solani* Kuhn en tomate mediante una combinación de tratamientos de pregerminación controlada y el agente de control biológico *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes. Bogotá. pp. 12, 33.

Tomaselli, C., Vergoignan, C., Feron, G., Durand, A. 2001. Glucosamine measurement as indirect method for biomasa estimation of *Cunninghamella elegans* in solid state cultivation conditions. *Biochemical Engineering Journal*. Vol 7: 1-5.

Tablas y Figuras

Tabla 1

Factores y niveles evaluados durante la fermentación líquida

Factores	Nivel bajo	Nivel alto	Variable de respuesta
Altura de la zona de ascenso	44.3cm	55.1cm	Concentración de biomasa (micelio principalmente)
Caudal del gas de entrada	0.5vvm	0.75vvm	
Volumen de antiespumante	0.075% (v/v) 15ml	0.1% (v/v) 20ml	

Tabla 2

Matriz del diseño experimental factorial fraccionado para la fermentación líquida

Fermentación	VARIABLES		
	Altura de la zona de ascenso (cm)	Caudal de aire (vvm)	Volumen de antiespumante (ml)
1	-	+	-
2	-	+	+
3	+	-	-
4	+	-	+

Tabla 3

Niveles de los factores evaluados para los tratamientos adicionales mediante la aplicación del método simplex

	Fermentación 5	Fermentación 6
Caudal de aire (vvm)	0.42	0.20
Volumen de antiespumante (ml)	22	18
Altura de la zona de ascenso (cm)	58.7	68.3
Biomasa seca (g/l)	6.34	8.65

Tabla 4

Factores y niveles evaluados durante la fermentación sólida

FACTOR	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO	VARIABLE DE RESPUESTA
Temperatura	25°C	27°C	Concentración de conidios
Cantidad de bandejas	10	15	
Volumen de inóculo líquido	110ml	220ml	
Caudal de aire inyectado	0vvm, 0.25vvm, 0.5vvm y 1vvm		

Tabla 5
Matriz del diseño experimental factorial completo para la fermentación sólida

Fermentación	FACTORES		
	Temperatura (°C)	Número de bandejas	Volumen de inóculo líquido (ml)
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	-	-
4	-	-	+
5	-	-	-
6	-	+	+
7	+	+	-
8	+	-	+

Tabla 6
Caudal de aire inyectado durante las fermentaciones sólidas

Fermentación	Caudal de aire (vvm)	Grupos homogéneos respecto a conidios/g
1 - 2	0.5	b
3 - 4	1.0	a
5 - 6	0	a
7 - 8	0.25	a

Tabla 7
Valores de los factores evaluados para tratamientos adicionales mediante la aplicación del método simplex

	Fermentación 9	Fermentación 10	Fermentación 11	Fermentación 12
Temperatura (°C)	24.33	24.33	25.76	25.76
Número de bandejas	8	8	12	12
Volumen de inóculo líquido (ml)	220	110	94.28	47.14
Caudal de aire (vvm)	0.33	0.33	0.58	0.58
Concentración de conidios/g	9.84 x 10⁸	6.70 x 10⁸	4.30 x 10⁹	5.82 x 10⁹

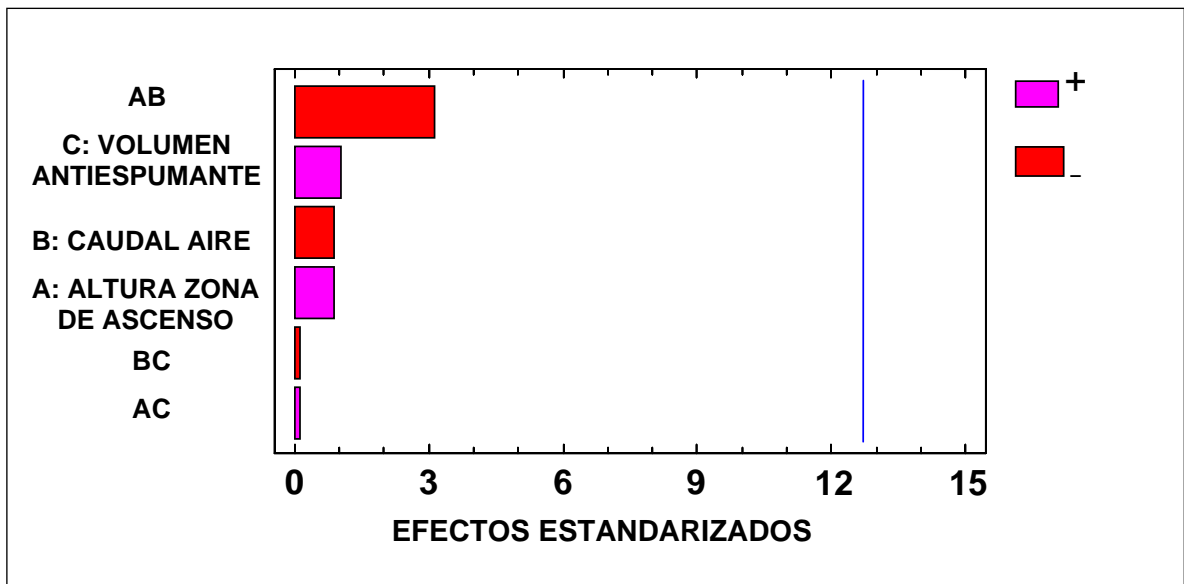


Figura 1. Carta de Pareto para los factores evaluados en un biorreactor airlift durante la fermentación líquida.

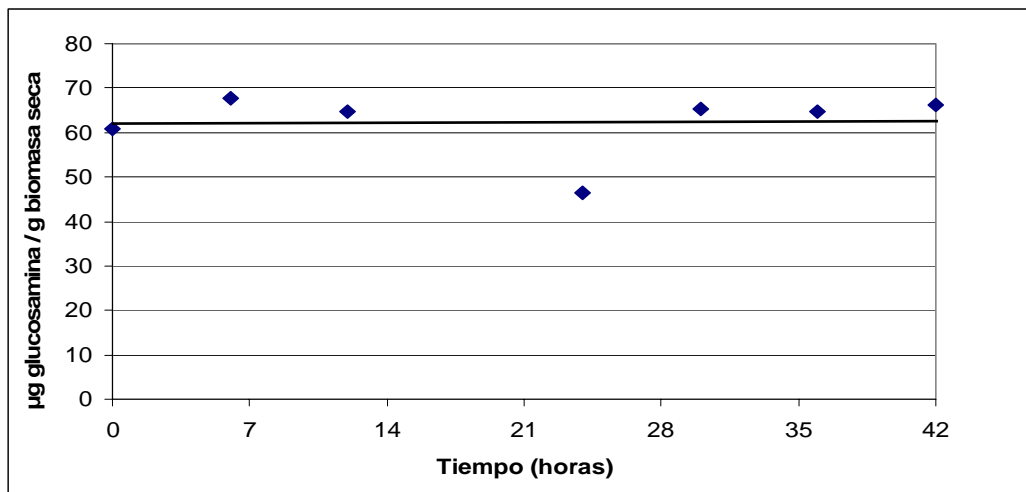


Figura 2. Relación entre el contenido de glucosamina y la cantidad de biomasa producida durante la fermentación líquida del hongo *T. koningii* Th003.

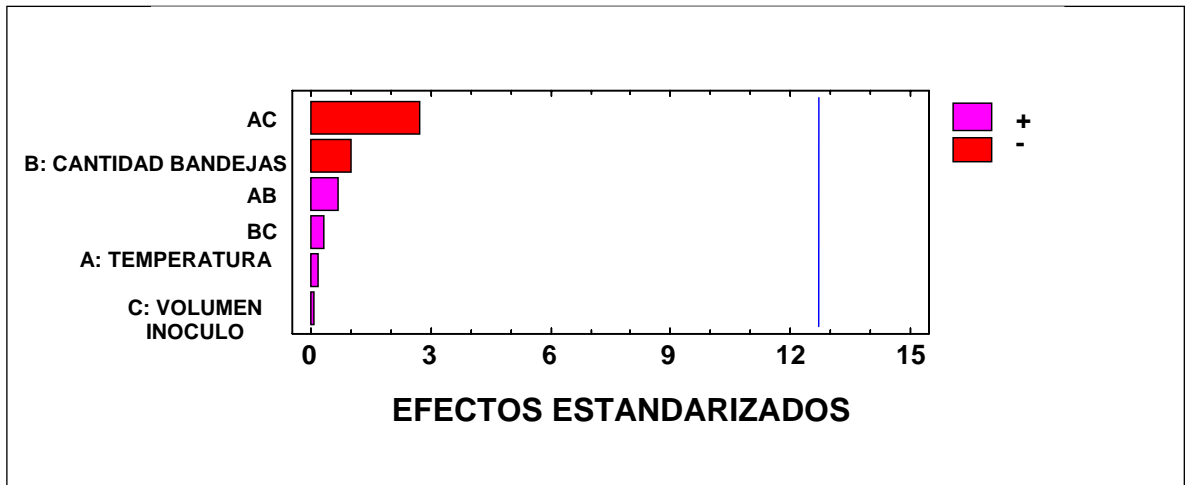


Figura 3. Carta de Pareto para los factores evaluados en un biorreactor de bandejas durante la fermentación sólida.

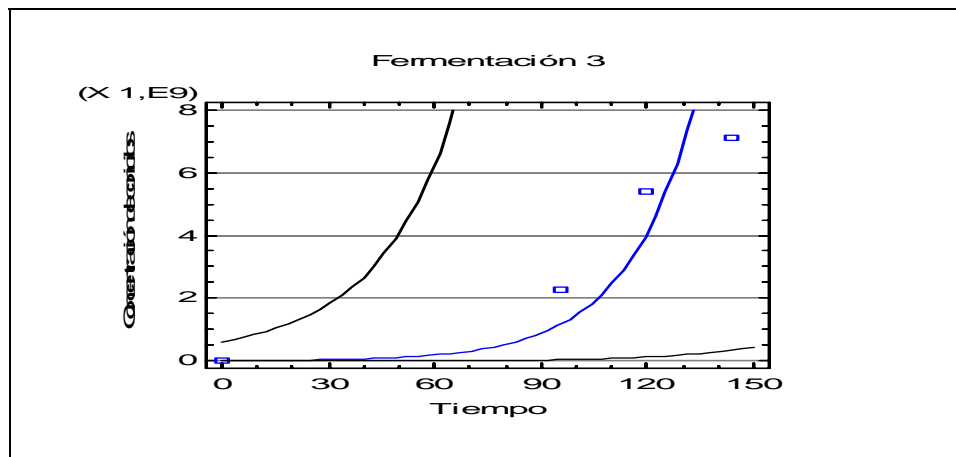


Figura 4a. Comportamiento del hongo *T. koningii* Th003 durante la fermentación sólida 3. Las líneas negras representan los límites de ajuste al modelo establecido por el programa estadístico y la línea azul representa el ajuste de los datos al modelo. En el eje X se encuentra el tiempo de fermentación dado en horas y en el eje Y el logaritmo de la concentración de conidios/g.

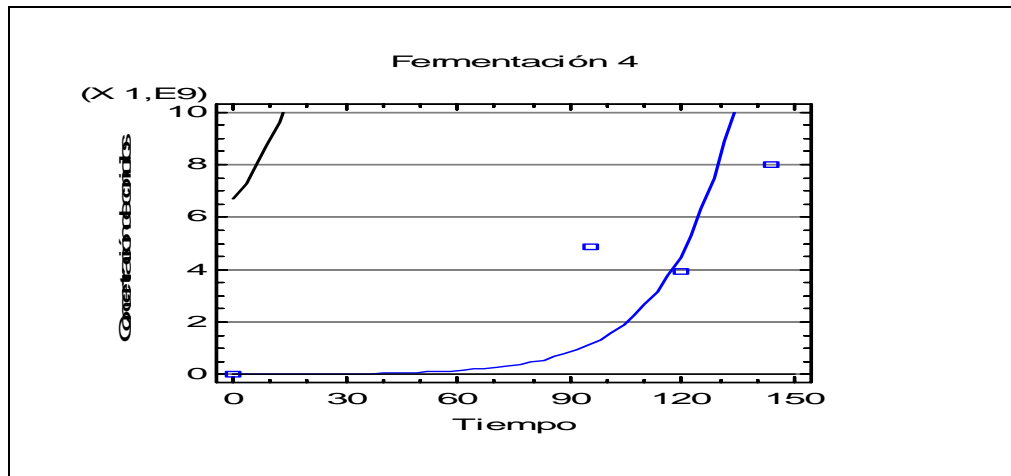


Figura 4b. Comportamiento del hongo *T. koningii* Th003 durante la fermentación sólida 4. Las líneas negras representan los límites de ajuste al modelo establecido por el programa estadístico y la línea azul representa el ajuste de los datos al modelo. En el eje X se encuentra el tiempo de fermentación dado en horas y en el eje Y el logaritmo de la concentración de conidios/g.