

# ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DEL BIOPLAGUICIDA A BASE DE *Trichoderma koningiopsis* Th003

Martha Isabel Gómez Ph.D., Andrés Díaz M.Sc.,  
Fredy Mauricio Cruz I.Q. y Alba Marina Cotes Ph.D.

Investigadores Laboratorio de Control Biológico,  
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB,  
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica.  
Km 14 vía Bogotá-Mosquera.  
E-mail: mgomez@corpoica.org.co



## CAPÍTULO 4

## RESUMEN

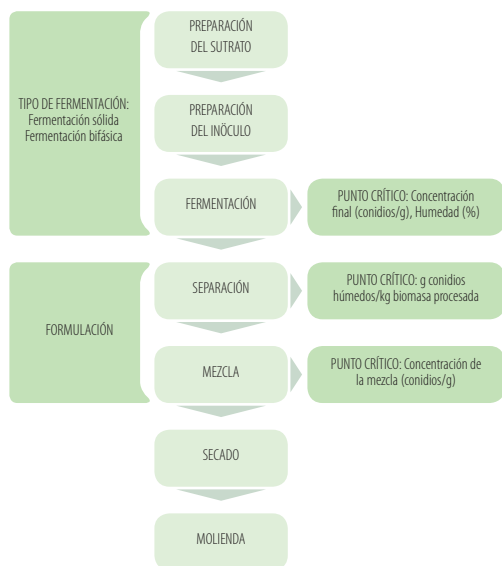
Teniendo en cuenta los resultados mostrados en el capítulo 2 sobre producción masiva, selección del medio de cultivo y condiciones de fermentación para *T. koningiopsis* Th003, en este estudio se evaluaron dos metodologías de fermentación para la producción del bioplaguicida a escala planta piloto. Se utilizaron equipos diseñados en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica y se evaluaron la fermentación bifásica en un fermentador de tipo airlift y la fermentación sólida en un fermentador de bandejas estáticas. Después de optimizar las condiciones y determinar la reproducibilidad de los procesos, el rendimiento promedio obtenido - medido en cantidad de conidios en el sustrato por tiempo de fermentación (conidios/Kg.h) - fue de  $5.97 \times 10^9$  conidios/Kg.h y  $1.42 \times 10^{10}$  conidios/Kg.h para la fermentación bifásica y sólida, respectivamente. La fermentación sólida fue seleccionada como metodología de fermentación para *T. koningiopsis* Th003. Las operaciones en el proceso de formulación del bioplaguicida polvo mojable (WP), así como la separación del principio activo, la mezcla con excipientes y el secado, fueron también estandarizadas a nivel planta piloto.

## 4.1 INTRODUCCIÓN

Las oportunidades económicas y comerciales de las bioplaguicidas dependen en gran medida de su facilidad de escalamiento. Este es un mecanismo mediante el cual se trasladan condiciones y variables de operación de un proceso en un equipo o sistema determinado, a otro de tamaño diferente (Gallego *et al.*, 2002). Con el escalamiento de la producción de bioplaguicidas se busca mantener las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo, la generación y separación de metabolitos y/o biomasa encontrados a nivel de laboratorio, obteniendo resultados similares en cuanto a rendimientos y productividades. Para el escalamiento se debe recoger la mayor cantidad de información posible del proceso en condiciones de laboratorio; esto implica conocer la fenomenología del proceso y factores tales como la temperatura, la concentración de nutrientes, el pH y la actividad del agua, entre otros. Adicionalmente, con los datos experimentales generados se deben realizar balances de materia y determinar los rendimientos en términos de cantidad de microorganismo por sustrato y cantidad de sustrato por producto final (Duarte, 1995). Teniendo en cuenta estos aspectos, para el escalamiento a nivel planta piloto de la producción del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* (Th003), surgieron las operaciones y puntos críticos descritos en la figura 1.

Entre las técnicas de fermentación más estudiadas para la producción de hongos filamentosos se encuentran la fermentación sólida (SSF), la fermentación sumergida (SmF) y la fermentación bifásica (mezcla de SSF y SmF). Para los procesos de SSF los factores más importantes incluyen el tipo de sustrato, el microorganismo, el contenido de humedad, el pH y la altura de la matriz sólida. De otra parte en la fermentación sumergida (SmF) para hongos filamentosos los factores más destacados por controlar, son las condiciones reológicas de operación como la viscosidad, la densidad, las velocidades de agitación, el pH y la concentración de oxígeno disuelto (Singhania *et al.*, 2008).

En el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica, tras varios



**Figura 1.** Esquema general del escalamiento de la producción del bioplaguicida a base del hongo *T. koningiopsis* Th003

estudios de evaluación del crecimiento comparativo para la producción masiva del hongo *T. koningiopsis* Th003, se desarrolló un método de producción masiva eficiente en un medio sólido codificado como SS1. Sin embargo, las condiciones del proceso de fermentación para este hongo no habían sido estandarizadas a nivel de planta piloto, por lo tanto se hizo necesaria su estandarización para la obtención de conidios del hongo biocontrolador.

Una vez las condiciones de producción masiva de *T. koningiopsis* Th003 a escala piloto se estandarizaron, este principio activo fue formulado para la obtención de un bioplaguicida en forma de polvo mojable (WP). Las operaciones unitarias de separación, mezcla, secado y molienda fueron escaladas a nivel de planta piloto y la eficiencia de las mismas se evaluaron teniendo en cuenta los puntos críticos de estos procesos (Figura 1).

El escalamiento de la producción a nivel de planta piloto fue realizado en la planta de bioplaguicidas ubicada en el Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica. Esta construcción cuenta con instalaciones adecuadas para la producción de bioplaguicidas a nivel semicomercial y equipos apropiados

para las operaciones de fermentación, separación continua de principio activo, mezcla, granulación y secado. También cuenta con áreas para el control de calidad tanto de materias primas como de productos en proceso y terminados.

## 4.2 METODOLOGÍA

### 4.2.1 Escalamiento del proceso de fermentación de *T. koningiopsis* Th003

#### 4.2.1.1 Fermentación bifásica

Para la estandarización de la fermentación bifásica, inicialmente se efectuó la fermentación líquida determinando las condiciones óptimas para maximizar la producción de conidios de Th003 en un fermentador de tipo airlift. Este medio de cultivo fue el inóculo para la fermentación sólida producida en un fermentador de bandejas. Ambos fermentadores fueron diseñados y puestos en marcha previamente en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica.

#### Primera fase: fermentación líquida

##### *Preparación del preinóculo*

A partir de cultivos en medio PDA con el hongo crecido durante 7 días, se removieron los conidios mediante la adición de 10 ml de una solución de Tween 80 a 0.1% (v/v). La suspensión de conidios obtenida se puso en un tubo estéril y se homogeneizó en un agitador vibratorio durante 30 segundos. A partir de esta suspensión madre se realizaron diluciones seriadas en solución Tween 80 a 0.1% (v/v) con el fin de lograr una suspensión en concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml.

Esta suspensión se inoculó (2.5 ml) en Erlenmeyers de 125ml de capacidad que contenían 25 ml del medio de cultivo estéril codificado como SL1 (Peña, 2002). Los Erlenmeyers se incubaron a 25°C con agitación constante (180rpm) en un baño termostataado Lindberg Blue® durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se procedió al control de calidad del caldo de fermentación mediante una coloración de Gram para detectar la presencia de bacterias y

**Tabla 1.** Principales características del fermentador airlift, diseñado en el Laboratorio de Control Biológico.

Característica	Descripción
Volumen	20 litros
Tipo de lazo	Interno
Relación altura diámetro	5
Tipo de distribuidor de aire	Anular
Material de construcción	Acero inoxidable y vidrio

**Tabla 2.** Factores y niveles evaluados durante la fermentación líquida del hongo *T. koningiopsis* Th003 en un biorreactor airlift de 20 litros.

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

de azul de Lactofenol para visualizar las estructuras fúngicas. Posteriormente se llevaron a cabo tres cambios de volumen sucesivos en Erlenmeyers de 125ml, 500ml y 1000ml, manteniendo una relación volumen medio de cultivo a volumen del Erlenmeyer de 1:5. Los Erlenmeyers fueron incubados bajo las mismas condiciones ya descritas y las coloraciones mencionadas fueron realizadas para verificar la pureza del cultivo y para observar microscópi-

camente la morfología del hongo. Finalmente, los preinóculos se inyectaron a un fermentador tipo airlift para la evolución de la fermentación líquida y la estandarización del proceso.

#### Fermentación en biorreactor airlift de 20 litros

El fermentador airlift (Figura 2) es un equipo neumático de contacto gas-líquido, en el que el gas (aire u oxígeno) cumple las funciones de agitación, contribución a la transferencia de calor y suministro de oxígeno (Flórez, 2002).

En el diseño del equipo se tuvieron en cuenta parámetros como la geometría, el volumen del reactor, el tipo de lazo, la relación altura diámetro, el separador gas-líquido, la instrumentación y por supuesto el material de construcción. En la Tabla 1 se resumen las principales características del fermentador airlift diseñado en el Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA (Flórez, 2002).

La selección de los factores y niveles por evaluar para la fermentación líquida de *T. koningiopsis* Th003, se hizo teniendo en cuenta las características relacionadas con el equipo (altura de la zona de ascenso) y las condiciones físicas de la fermentación (caudal de aire y volumen de antiespumante) (Tabla 2).



**Figura 2.** Fermentador airlift utilizado para la producción del preinóculo de *T. koningiopsis* Th003

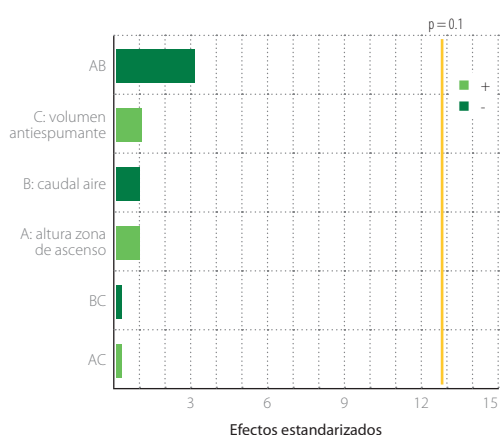
**Tabla 3.** Matriz del diseño experimental factorial fraccionado para la fermentación líquida del hongo *T. koningiopsis* Th003 en un biorreactor airlift de 20 litros.

Fermentación	Altura de la zona de ascenso (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
5	58.7	0.42	22
6	68.3	0.20	18

Para la estandarización se realizaron seis fermentaciones, empleando un diseño experimental factorial fraccionado a la mitad (Tabla 3). Las evaluaciones fueron hechas al cabo de 48 horas de incubación.

### 4.3.1 Resultados fermentación bifásica / primera fase

Durante las fermentaciones llevadas a cabo se presentó una morfología mixta de *T. koningiopsis* Th003 con presencia de agregados de diversos tamaños; se observó un rápido crecimiento micelial que incrementó la viscosidad del líquido y cambió gradualmente el color del medio de crecimiento a medida que transcurrió el tiempo de incubación (48 horas).



**Figura 3.** Diagrama de Pareto para los factores evaluados durante la fermentación líquida en un biorreactor airlift. Factores: A: Altura zona de ascenso, B: Caudal de aire, C: Volumen de antiespumante.

De acuerdo con lo anterior, durante las fermentaciones 1 y 2 en las que la velocidad de agitación fue elevada ( $\geq 0.75$  vvm), el micelio libre fue la forma de biomasa predominante. Por el contrario, en las fermentaciones 3, 4, 5 y 6 a velocidades de agitación bajas ( $\leq 0.5$  vvm), la forma de biomasa presente estuvo constituida en su totalidad por micelio en forma de agregados; sin embargo, en ningún caso se presentó una limitación de oxígeno ya que el disuelto se mantuvo en valores superiores a 50% con todos los caudales de aire evaluados.

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 de 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. Los mejores resultados en términos de biomasa seca (15.61g/l) se consiguieron bajo las condiciones definidas en la fermentación 4; éstas fueron: altura del riser: 55.1cm, caudal de aire: 0.5vvm y volumen de antiespumante: 20ml.

De ésta fase se concluyó que 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 es necesario llevar un control exacto sobre las condiciones de incubación respecto a la etapa del precultivo, la temperatura y la agitación.

De acuerdo con el análisis Pareto (Figura 3), ninguno de los factores presentó un efecto significativo sobre la concentración de la biomasa obtenida después del proceso de fermentación líquida. Se pudo observar que el resultado más importante fue la interacción de los factores altura de la zona de ascenso y caudal de aire (AB) con un efecto negativo, mientras que el menor efecto lo presentó el caudal de aire y el volumen de antiespumante (BC) de forma también negativa. En cuanto a la combinación altura de la zona de ascenso y volumen de antiespumante su efecto fue positivo.

### Segunda Fase: fermentación sólida

Una vez conocidas las mejores condiciones para la producción de *T. koningiopsis* Th003 en fermentación líquida y utilizando este caldo resultante como inóculo, se evaluó la fase de fermentación sólida. Para esta segunda fase se utilizó el sustrato sólido codificado como SS1.

Existen tres grandes tipos de biorreactores para la fermentación sólida: el lecho empacado con aireación forzada, el tambor rotatorio y las bandejas con sustrato estático (Gervais, *et al* 2003); a este último grupo pertenece el fermentador utilizado, situado en el Laboratorio de Control Biológico. El fermentador sólido empleado contiene una cámara en acero inoxidable que permite poner 47 bandejas separadas entre sí, cargadas con 1.1 kg de sustrato húmedo, con una capacidad de carga de 60 kg. Tal fermentador tiene un sistema de control de temperatura de tipo proporcional On / Off y dos resistencias de 208 Watts para esterilización *in situ*.

Para determinar las condiciones óptimas de operación, se aplicó un diseño experimental simplex. La elección de los factores se efectuó teniendo en

cuenta 3 tipos de características: las relacionadas con el equipo (número de bandejas), las condiciones físicas de la fermentación (temperatura) y las relacionadas con el hongo *T. koningiopsis* Th003 (volumen de inóculo).

Se eligió la temperatura debido a que es un factor clave dentro del proceso de fermentación sólida, así mismo está directamente relacionado con la actividad metabólica del microorganismo y con la velocidad de crecimiento (Krishna, 2005). El volumen del inóculo líquido obtenido en el fermentador airlift y aplicado al sustrato sólido es un factor importante pues de su concentración final depende la velocidad de colonización del sustrato sólido (Krishna, 2005 y Pandey, 2003). La cantidad de bandejas empleada para llevar a cabo cada corrida experimental también es importante puesto que el espacio entre ellas limita la entrada de luz al sistema (sustrato+microorganismo). La variable de respuesta escogida fue la concentración final de conidios y 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 4).

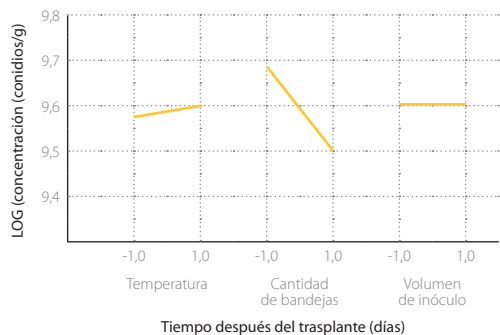
El sustrato sólido se inoculó con el caldo de fermentación proveniente del biorreactor airlift y la temperatura y el caudal de aire se ajustaron según las condiciones de fermentación establecidas.

### 4.3.2 Resultados fermentación bifásica / segunda fase

La evaluación del proceso de esporulación del hongo se hizo al día 7 de fermentación. Los factores evaluados durante la fermentación bifásica tuvieron diferentes efectos sobre la concentración de conidios obte-

**Tabla 4.** Factores y niveles evaluados para la fermentación sólida del hongo *T. koningiopsis* Th003 en un biorreactor de bandejas.

Variables de estudio	Nivel bajo	Nivel alto	Variable respuesta
Temperatura	25°C	27°C	Concentración de conidios (conidios/g)
Cantidad de bandejas	10	15	
Volumen de inóculo líquido	110 ml	220 ml	
Caudal de aire inyectado	0vvm, 0.25vvm, 0.5vvm y 1vvm		



**Figura 4.** Representación gráfica de los efectos principales sobre la concentración de conidios de los factores evaluados en la fermentación sólida.

nida. Al analizar por separado el efecto de los factores principales, se precisó que la cantidad de bandejas fue el que tuvo mayor influencia sobre la variable de respuesta, siendo éste un efecto negativo. En segundo lugar de 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 tamaño se refiere a la concentración del inóculo proveniente de la fermentación líquida anterior y no presentó efecto alguno sobre la conidiación del hongo *T. koningiopsis* Th003 (Figura 4).

En función de estos resultados se concluyó 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 bifásica, 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. Sin embargo, la combinación del volumen de inóculo con el factor temperatura, mostró tener el mayor efecto negativo sobre la producción final de los conidios del hongo.

La mayor concentración del hongo se alcanzó bajo las condiciones de temperatura de incubación de 27 °C, flujo de aire de 0 vvm y 220 ml de inóculo (Tabla 5, Figura 5). La concentración de conidios en las bandejas fue del orden de  $10^9$  conidios/g, siendo el valor máximo  $2.79 \times 10^9$  conidios/g y el valor promedio de  $1.29 \times 10^9$  conidios/g.

Después de 9 días de fermentación, divididos en 2 días de fermentación líquida y 7 días de fermentación sólida, la productividad promedio de la fermentación bifásica fue de  $5.97 \times 10^9$  conidios/Kg.h. Este valor es relativamente bajo comparado con los alcanzados por Kubota (1995) y Agosin *et al.* (1997) quienes obtuvieron valores de  $6.0 \times 10^{10}$  conidios/Kg.h y  $1.4 \times 10^{11}$  conidios/Kg.h respectivamente, en fermentación sólida de *Trichoderma harzianum*.

La baja productividad en la fermentación bifásica fue consecuencia del largo tiempo de fermentación (216 horas), que incluye la producción del preinó-

**Tabla 5.** Producción de conidios de *T. koningiopsis* Th003 durante la fermentación bifásica.

Bandeja	Concentración (conidios/g)	Log concentración
1	$1,71 \times 10^9$	9,23
2	$9,80 \times 10^8$	8,99
3	$2,79 \times 10^9$	9,45
4	$9,84 \times 10^8$	8,99
5	$6,70 \times 10^8$	8,83
6	$1,13 \times 10^9$	9,05
7	$1,08 \times 10^9$	9,03
8	$1,00 \times 10^9$	9,00
	Desviación estándar	0,19
	Promedio concentración	$1,29 \times 10^9$
	Coefficiente de variación (%)	0,02



**Figura 5.** Crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 por fermentación bifásica.

culo (48 horas), haciendo que la concentración del orden de  $10^9$  conidios/g, encontrada al final de la fermentación sólida, no sea suficiente para alcanzar una productividad superior a  $1.0 \times 10^{10}$  conidios/Kg.h.

#### 4.2.1.2 Fermentación sólida

La fermentación en estado sólido (SSF) se define como el cultivo de microorganismos sobre un soporte sólido humedecido, un vehículo inerte o sobre sustratos insolubles que además pueden ser usados como fuente de carbono y de energía. Esta fermentación tiene lugar en ausencia o con muy baja cantidad de agua libre (Holker *et al.*, 2004). Es utilizada en varios bioprocesos como bioremediación, biodegradación de compuestos tóxicos y biotransformación de residuos agrícolas, así como en la producción de metabolitos secundarios como antibióticos, alcaloides, factores de crecimiento de plantas, enzimas, ácidos orgánicos, biocombustibles y bioplaguicidas. Frente a la fermentación líquida, la sólida presenta rendimientos más altos para el caso de hongos filamentosos; esto se atribuye principal-

mente a que tal fermentación simula el hábitat natural del microorganismo (Pandey, 2003).

La fermentación sólida de *T. koningiopsis* Th003 se llevó a cabo en el mismo fermentador sólido estático de bandejas descrito anteriormente. El sustrato fue el mismo que el utilizado para la fermentación bifásica, es decir el codificado como SS1 pero con un pH ajustado a 4.0 (HCl 0.1 M), el cual reduce el riesgo de contaminación por bacterias y favorece la esporulación del hongo (Peña, 2002).

Con el fin de estandarizar los procedimientos de fermentación sólida a escala piloto, y teniendo en cuenta los resultados encontrados en la fermentación bifásica en cuanto a la influencia del número de bandejas, se realizaron 4 lotes con 14 bandejas cada uno. El inóculo se preparó a partir del hongo crecido durante 7 días en cajas de Petri con medio de cultivo PDA, al cual se le adicionaron 10 ml de solución estéril Tween 80 a 0.1% (v/v) y se removieron los conidios. La concentración de la suspensión de estos fue ajustada a  $1.0 \times 10^7$  conidios/ml.

A diferencia de la fermentación bifásica, donde la inoculación del sustrato se hizo desde la bomba de inyección a través de boquillas de 1 mm, la inoculación del sustrato con *T. koningiopsis* Th003 en fermentación sólida se efectuó por aspersión directa, usando atomizadores de 500 ml los cuales permitieron una aspersión homogénea de la suspensión de conidios sobre la superficie. Bajo condiciones de asepsia se aplicaron 15 ml de la suspensión para una cantidad aproximada de  $1.5 \times 10^8$  conidios/bandeja. Posteriormente, las bandejas fueron incorporadas al fermentador, donde se mantuvieron en condiciones de 27 °C, una humedad de 60 a 65% y ausencia de inyección de aire.

Después de seis días de incubación se procedió a un muestreo al azar tomando 5 g del sustrato colonizado por cada bandeja. A estas muestras se les determinó la concentración (conidios/g) por recuento en cámara de Neubauer y el contenido de humedad (%), usando una balanza halógena OHAUS MB 45. A los resultados se les fijó el coeficiente de variación para verificar el nivel de reproducibilidad entre lotes.

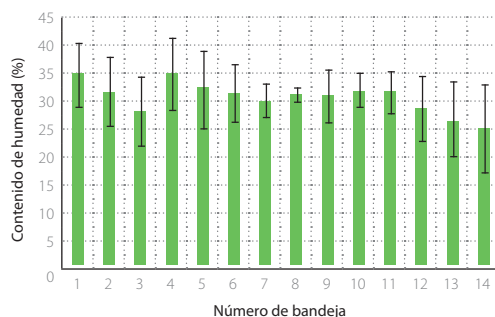
**Tabla 6.** Coeficientes de variación de la humedad (%) y concentración final (conidios/g) del sustrato esporulado para la fermentación sólida.

Lote	Coefficiente de variación para la humedad (%)	Coefficiente de variación para la concentración (%)
Lote 1	14.75	1.14
Lote 2	15.69	2.60
Lote 3	18.10	2.42
Lote 4	18.44	1.64

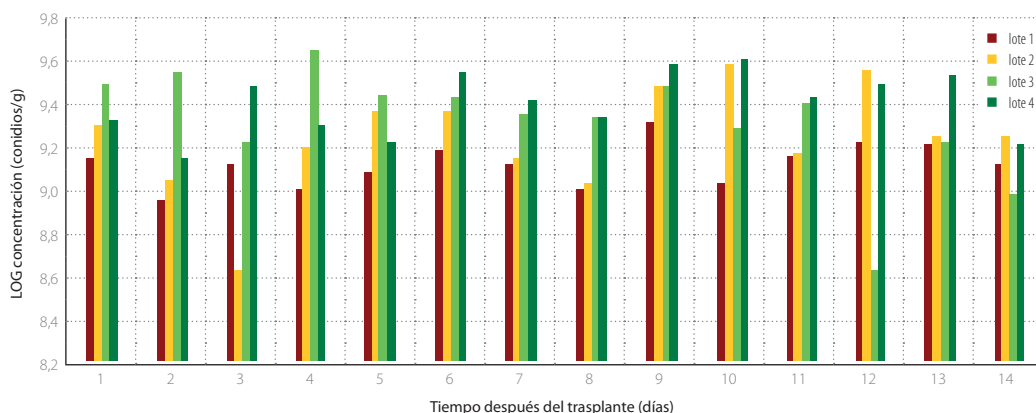
### 4.3.3. Resultados fermentación sólida

En los cuatro lotes de producción se observó que la humedad del sustrato dentro del fermentador presentó variabilidad entre las bandejas para la variable de respuesta, dándose los menores valores en las bandejas cercanas a la resistencia del fermentador (Figura 6). Adicionalmente, los coeficientes de variación entre lotes fueron superiores a 10%, encontrándose valores entre 14.75% y 18.44% (Tabla 6). Esta variabilidad en el contenido de humedad podría ser causada por el gradiente dentro de la cámara del fermentador. Resultados similares fueron encontrados por Cruz (2007) quien reportó un gradiente de humedad al finalizar la fermentación entre 19% y 39%.

En cuanto a la concentración del sustrato colonizado, después de seis días de fermentación en los cuatro lotes, en la mayoría de los casos se encontraron valores superiores a  $1.0 \times 10^9$  conidios/g (Figura 7), mostrando una homogeneidad en el crecimiento del hongo en

**Figura 6.** Humedad del sustrato colonizado por *T. koningiopsis* Th003 en la fermentación sólida. Las líneas sobre las barras representan la desviación estándar de los datos de humedad de cuatro lotes de fermentación ( $n=4$ ).**Tabla 7.** Rendimiento en el proceso de fermentación sólida de *T. koningiopsis* Th003.

Lote	Rendimiento SSF (conidios/kg hora)
Lote 1	$9.15 \times 10^9$
Lote 2	$1.41 \times 10^{10}$
Lote 3	$1,63 \times 10^{10}$
Lote 4	$1.93 \times 10^{10}$

**Figura 7.** Concentración de conidios de *T. koningiopsis* Th003 en el sustrato colonizado en la fermentación sólida

la totalidad de los lotes evaluados. Este crecimiento fue uniforme no sólo en la superficie del sustrato, sino también en su interior (Figura 8). Al determinar los coeficientes de variación por lote (Tabla 7) se encontraron valores entre el 1.14 y 2.60%, inferiores a 10%, y por lo tanto indicaron que la producción entre lotes fue reproducible en el tiempo.

Al evaluar el rendimiento en los cuatro lotes en términos de conidios/kg.hora se encontraron valores entre  $9.15 \times 10^9$  y  $1.93 \times 10^{10}$  conidios/kg.hora, con un valor promedio de  $1.42 \times 10^{10}$  conidios/kg.hora (Tabla 8). Estos resultados son cercanos a los encontrados por Kubota (1995) y Agosin *et al.* (1997) quienes reportaron rendimientos de  $6.0 \times 10^{10}$  conidios/kg.hora y  $1.4 \times 10^{11}$  conidios/kg.hora respectivamente, con *T. harzianum* para fermentaciones sólidas con granos de maíz como sustrato.

Al comparar los resultados de rendimiento de la producción de conidios, tanto en fermentación bifásica ( $5.97 \times 10^6$  conidios/kg.hora) como en fermentación sólida ( $1.42 \times 10^{10}$  conidios/kg.hora), se concluyó que el proceso SSF presentó cerca del doble de rendimiento; este análisis permitió seleccionar la fermentación SSF como el proceso estándar para la producción de la biomasa utilizada como principio activo del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003.

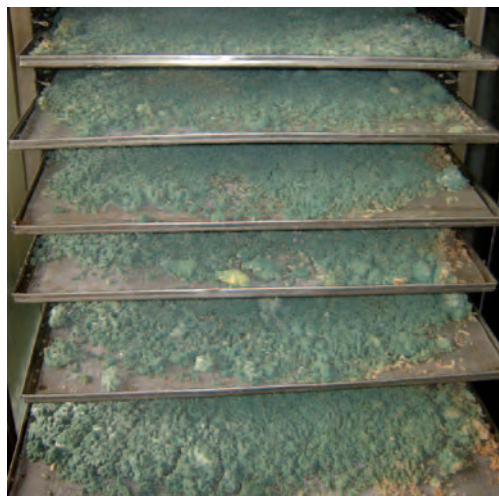


Figura 8. Crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 por fermentación sólida.

Un factor muy importante es la propiedad hidrofóbica que exhiben los conidios producidos en un sistema de fermentación sólida, determinado por la acumulación en la pared celular de proteínas hidrofóbicas y compuestos como las tricozianinas, que en conjunto repelen el agua. Esto tiene gran importancia para una rápida y persistente adherencia a la superficie de las plantas y de otros hongos que tienen iguales propiedades de hidrofobicidad (Jenkins *et al.*, 2000).

#### 4.2.2 Escalamiento del proceso de formulación de *t. Koningiopsis* th003

Una vez se estandarizó la metodología de fermentación para la producción masiva de *T. koningiopsis* Th003, se desarrolló el escalamiento, a nivel de planta piloto, de la formulación del bioplaguicida diseñado como un polvo mojable (WP) teniendo en cuenta las operaciones descritas en la figura 1.

Para dicho escalamiento se definieron los puntos críticos de cada una de las operaciones unitarias involucradas. La importancia de esos puntos radica en el control que ejercen sobre los procesos, de manera que permiten definir si un lote terminado o en curso es aprobado. Los puntos críticos del proceso de formulación fueron en su orden: el rendimiento de separación en peso de conidios húmedos por unidad de biomasa procesada (g/kg), la concentración de la mezcla (conidios/g) y la concentración final después del proceso de secado (conidios/g). Para el escalamiento de las operaciones de formulación se evaluaron cuatro lotes piloto de aproximadamente 10 Kg, y a los resultados encontrados se les determinó el coeficiente de variación con el fin de evaluar la reproducibilidad del proceso.

##### Separación de los conidios

Los conidios obtenidos en la fermentación sólida fueron separados por medio de un proceso de centrifugación continua. Inicialmente fueron apartados del sustrato mediante un lavado utilizando solución Tween 80 (0.1% v/v) y posteriormente filtrados a través de una tela muselina. La suspensión de conidios sin sustrato fue alimentada con una bomba peristáltica (Pump drive PD5006) a razón de 24 L/h hacia una

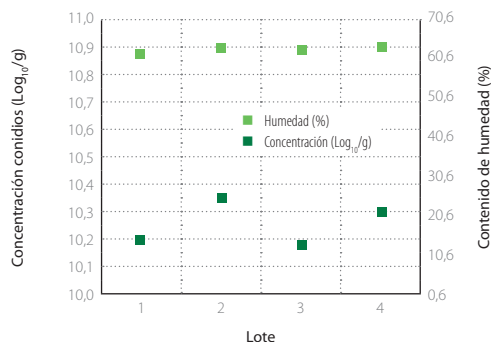
centrífuga continua (Carl Padberg 77933) cuya velocidad promedio de operación fue de 27.000 rpm.

La biomasa obtenida (conidios húmedos) fue pesada y se determinaron la concentración (conidios /g) y la humedad (%). Al final de la operación se anotó el rendimiento en términos de g de conidios húmedos/kg de sustrato procesado para los cuatro lotes evaluados.

#### 4.3.4 Resultados escalamiento de la formulación / separación

Los conidios húmedos obtenidos en los 4 lotes presentaron humedades entre 61.08% y 63.65% con una media de 62.36%. En cuanto a la concentración se encontraron valores entre  $1.5 \times 10^{10}$  y  $3.0 \times 10^{10}$  conidios/g con un valor promedio de  $2.25 \times 10^{10}$  conidios/g (Figura 9). Para lograr que el polvo mojable de *T. koningiopsis* tuviera una concentración final de  $1.0 \times 10^9$  conidios/g fue necesario partir de conidios húmedos con una concentración mínima de  $1.0 \times 10^{10}$  conidios/g; en esa forma los cuatro lotes evaluados estuvieron dentro de este rango, con lo cual se garantizó que el producto final cumpliera con los límites de aceptación establecidos.

En cuanto al rendimiento en términos de g de conidios/kg de biomasa procesada se observaron valores entre 73.20 y 84.40 g/kg (Tabla 8). Esta variable fue considerada como un punto crítico para el desarrollo de la operación de centrifugación ya que permite controlar el proceso y asegurar que no se tengan problemas con el equipo (centrífuga continua), con la inyección de la suspensión (bomba peristáltica) y con los tiempos de operación. Teniendo en cuenta los valores obtenidos para estos cuatro lotes y los resultados previamente encontrados en



**Figura 9.** Concentración y contenido de humedad de conidios de *T. koningiopsis* Th003 obtenidos después del proceso de centrifugación.

condiciones de laboratorio, se decidió establecer como límite un rendimiento de separación mínimo de 70 g de conidios/kg de biomasa procesada.

#### Operación de mezcla

Los conidios húmedos fueron mezclados con excipientes que brindan al bioplaguicida final propiedades de desintegración y protección frente a los rayos ultravioleta del sol. Inicialmente, esos excipientes fueron introducidos por cinco minutos en un mezclador planetario; luego los conidios húmedos y agua estéril fueron adicionados en la marmita poco a poco. Al final de la mezcla se tomaron muestras de tres puntos de la marmita con el fin de determinar la concentración (conidios/g) y la humedad (%).

El tiempo de mezcla ideal fue determinado evaluando diferentes lapsos (10, 15 y 20 min) a la máxima velocidad de agitación. La distribución del microorganismo se determinó mediante el IM (Índice de Mezcla), utilizando como trazador la concentración de conidios de *T. koningiopsis* en la marmita.

**Tabla 8.** Resultados obtenidos en la operación de separación para cuatro lotes de *T. koningiopsis* Th003

Lote	Concentración (conidios/g)	Rendimiento (g conidios/ húmedos/kg biomasa procesada)	Humedad (%)
1	$1.56 \times 10^{10}$	73.20	61.08
2	$2.19 \times 10^{10}$	82.73	63.65
3	$1.51 \times 10^{10}$	84.42	62.07
4	$1.99 \times 10^{10}$	81.80	62.44

### 4.3.5 Resultados escalamiento de la formulación / mezcla

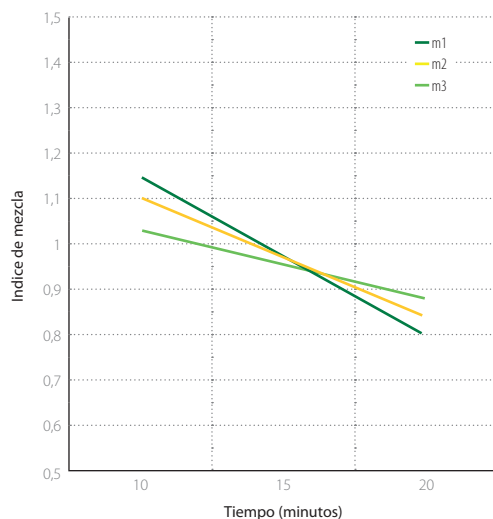
En la Figura 10 se observa que a los 10 y 20 minutos el índice de mezcla está alejado del valor de 1, mientras que a los 15 minutos es igual o cercano a 1, es decir que los valores teóricos de la concentración de conidios y los determinados experimentalmente fueron muy similares. De esa manera un tiempo de 15 minutos fue seleccionado como el tiempo óptimo de mezcla. Este comportamiento también se observó en los demás lotes evaluados (Tabla 9). En cuanto a la humedad final de la mezcla no se encontraron diferencias significativas entre lotes, por lo que se estableció para esta característica un rango de aceptabilidad comprendido entre 43 y 45%.

Para garantizar una concentración final de  $1.0 \times 10^9$  conidios/g en el producto final seco, se determinó como límite de aceptación en el proceso de mezcla una concentración mínima de  $6.0 \times 10^8$  conidios/g en los tres puntos muestreados de la marmita. Los cuatro lotes fabricados cumplieron con los límites fijados tanto de humedad como de concentración, asegurando así la homogeneidad del producto obtenido.

#### Operación de secado

El porcentaje de humedad es de gran importancia, ya que para que el microorganismo se encuentre en un estado de latencia es necesario almacenarlo a bajas humedades. Para la mayoría de productos de control biológico se sugiere mantenerlos con humedades inferiores a 10% (Burges, 2000).

Para precisar el efecto de la temperatura sobre el porcentaje de germinación y la pérdida de humedad de los conidios de *T. koningiopsis* Th003, se eva-



**Figura 10.** Índice de mezcla (IM) para el lote 1 de *T. koningiopsis* Th003. m: muestra.

luaron cuatro cinéticas de secado a 27 °C, 30 °C, 33 °C y 36 °C. La cinética a 27 °C se mantuvo como control por ser ésta la temperatura recomendada en estudios previos realizados en condiciones de laboratorio. El cuarto de secado utilizado para las cinéticas presenta las siguientes características: dimensiones de 1,3x1x2 m de alto, 41 cortinas móviles para el paso del aire y controladores de temperatura *Autonics* del tipo TZ4ST y TZN4S para un secado directo con aire, de HR promedio de 50% (Figura 11).

Una vez iniciadas las cinéticas de secado, se tomaron dos muestras cada dos horas durante aproximadamente 25 horas con el fin de determinar la humedad (%) y la germinación de los conidios (%) mediante las técnicas de pérdida de peso y microscopía respectivamente.

**Tabla 9.** Resultados de la operación de mezcla húmeda de 4 lotes de *T. koningiopsis* Th003.

Lote	Tiempo de mezcla ideal (minutos)	Humedad (%)	Concentración promedio (conidios/g)
1	15	44.06	$7.60 \times 10^8$
2	15	44.96	$9.40 \times 10^8$
3	15	44.24	$8.31 \times 10^8$
4	15	43.18	$9.21 \times 10^8$



Figura 11. Cuarto de secado de bandejas.

### 4.3.6 Resultados escalamiento de la formulación / secado

Al realizar las cinéticas de secado a las diferentes temperaturas (27, 30, 33 y 36°C) se observó respecto a la pérdida de humedad que a mayor temperatura el producto se seca más rápido, hasta llegar a valores de humedad por debajo de 6% (Figura 12). Para llegar a este valor se requirieron 17 horas a 27°C y 17,5,

13 y 5 horas a 30°C, 33°C y 36°C respectivamente. En cuanto a la germinación los resultados demuestran que con el aumento de temperatura la germinación de los conidios se ve afectada negativamente, acentuándose este efecto a mayores tiempos de exposición (Figura 13). A 27°C después de 17 horas de secado se presentó una reducción de la germinación en 5.1%, mientras que a 30°C disminuyó 7.08% después de 19 horas. A 33°C la merma fue relativamente alta (12.10%); no obstante, el mayor efecto se presentó a 36°C ya que con sólo 5 horas de secado tales valores se redujeron en 30% (Figura 14). La pérdida en la germinación a 30°C no fue significativamente diferente comparada con la obtenida a 27°C, por lo que estas temperaturas podrían ser utilizadas en el proceso de secado. Las temperaturas de 33°C y 36°C no fueron recomendadas para el secado, ya que aunque los tiempos fueron cortos, las pérdidas en germinación fueron superiores a 10%.

#### Operación de Molienda

Al producto seco obtenido se le disminuyó el tamaño de partícula hasta obtener uno de 500 µm.

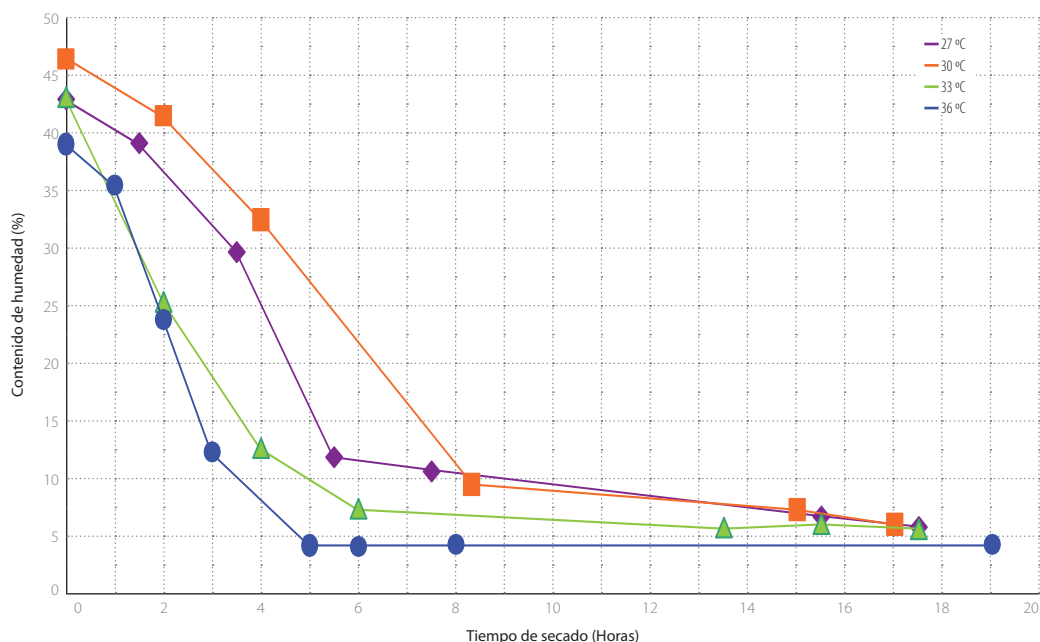


Figura 12. Efecto de la temperatura de secado sobre la dinámica de pérdida de humedad del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003.

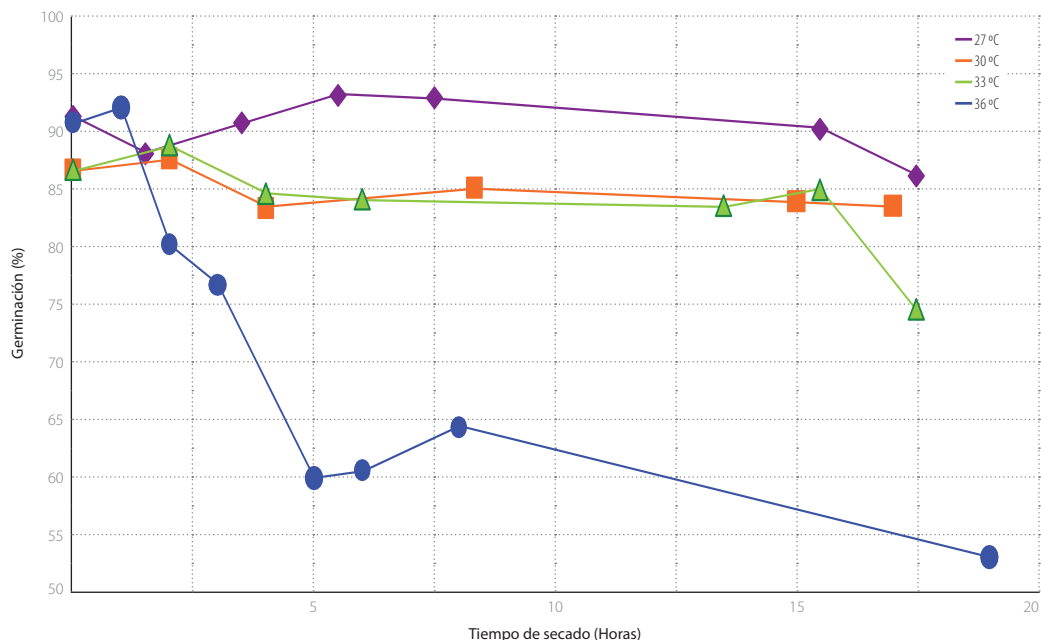


Figura 13. Efecto de la temperatura de secado sobre la germinación de los conidios de *T. koningiopsis* Th003 en el bioplaguicida .

El polvo resultante fue empacado en bolsas metalizadas con capacidad de 500 g y selladas al vacío. Finalmente, se llevaron muestras por duplicado de 5 g de cada lote al laboratorio certificado (Biotécnica) para realizar el control de calidad del producto terminado.

#### 4.3.7 Resultados escalamiento de la formulación / molienda

Una vez terminados los procesos de producción del bioplaguicida, cada uno de los lotes se sometió a protocolos de análisis de control de calidad. La concentración de los productos finales se estimó mediante el recuento por triplicado en cámara de Neubauer, mientras que la germinación (%) de los conidios formulados se determinó después de 24 horas de incubación en medio agar agua con el recuento de los conidios germinados comparado con el total.

Los controles de calidad de los lotes obtenidos se resumen en la Tabla 10.

Al comparar los resultados de control de calidad de los lotes, se puede concluir que todos fueron aprobados en función de los límites de aceptabilidad del producto, los cuales fueron: una concentración final superior a  $1,0 \times 10^9$  conidios/g, una humedad entre 3 y 7 % y por ultimo una germinación superior a 80 % después de 24 horas.

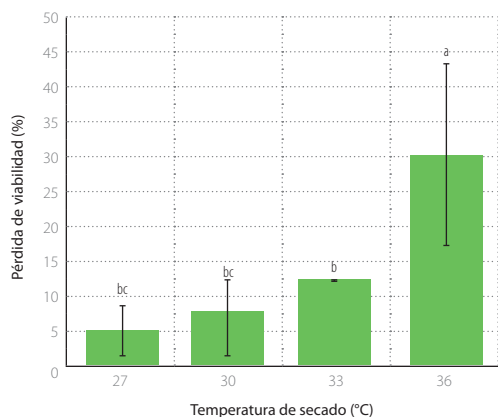


Figura 14. Pérdida de viabilidad de los conidios de *T. koningiopsis* Th003 por efecto de la temperatura de secado a la que fue sometido el bioplaguicida.

**Tabla 10.** Resultados control de calidad del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003.

Lote	Concentración (conidios/g)	Germinación (%)	Humedad (%)
1	1,51x10 <sup>9</sup>	81.37	3.52
2	1,58 x10 <sup>9</sup>	86.55	5.07
3	1,70 x10 <sup>9</sup>	89.55	3.36
4	1,67 x10 <sup>9</sup>	80.34	3.34

## 4.4 CONCLUSIONES

En la fermentación bifásica de *T. koningiopsis* Th003, la combinación del volumen de inóculo con el factor temperatura, tiene el mayor efecto sobre la producción final de los conidios del hongo, siendo la concentración promedio de  $1.29 \times 10^9$  conidios/g la alcanzada para el mejor tratamiento.

La mejor metodología de producción de *T. koningiopsis* Th003 a nivel planta piloto y reproducible en el tiempo fue la fermentación sólida, con una productividad de  $1.42 \times 10^{10}$  conidios/kg.

Se estandarizaron los límites de aceptabilidad y los puntos críticos de las operaciones involucradas en la producción a nivel planta piloto del bioplaguicida polvo mojable (WP) a base de *T. koningiopsis* Th003.

## AGRADECIMIENTOS

Los investigadores de Corpoica expresan sus agradecimientos a los investigadores Laura Villamizar Ph.D., Carlos Andrés Moreno M.Sc, Liz Alejandra Uribe M.I., Adriana Santos M.I., así como a las tesis Carolina Cruz, Isabel Quiroga y Eliana Cañón de Microbiología Industrial de la Universidad Javeriana y a los auxiliares del Laboratorio de Control Biológico Juan Carlos Barrios y Aura María Salamanca, quienes colaboraron con las presentes investigaciones y desarrollos.

## REFERENCIAS

- Agosin, E., Latorre, B., San Martín, R., Vásquez, G., 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against botrytis bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection*, 209-21416,
- Cruz, C. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 127.
- Drysdale, R., Ride, J. 1972. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiology Plant Pathology*. 2: 7-15.
- Duarte, A. 1995. Introducción a la Ingeniería Bioquímica. Editorial Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. pp 125-135.
- 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.
- Gallego, D., Laverde, M. 2002. Introducción a la ingeniería bioquímica. Editorial Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. pp 150-160
- Gervais P, Molin, P. 2003. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 85-101.
- Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64:175-86.
- Jenkins, N., Grzywacz, D. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents-Assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10: 753-777.
- Krishna, C. 2005. Solid-State Fermentation Systems-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25: 1-30.
- Kubota, T. 1995. 1998. *Trichoderma harzianum* SK-55 fungus fungicide containing it, method of manufacture of the same and its use. United States Patent, 5: 422,107.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84.
- Peña, V. 2002. Efecto de diferentes sustratos sobre la producción de conidios de *Trichoderma koningii* en medio sólido. Tesis de grado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 153 p.
- Singhania, A. K., Patel R., Soccol, A. 2008. Recent advances in solid-state fermentation. *India CSIR, Trivandrum School of Life Sciences*, 695 019.
- 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*, 7: 1-5.