

# Estudio de las condiciones de mezclado en fermentador para la producción de blastosporas de *Beauveria bassiana*

## Study of the mixing conditions in bioreactor for blastospores production of *Beauveria bassiana*

Cipriano García-Gutiérrez\*, María Berenice González-Maldonado\*\*, Hiram Medrano-Roldán\*\*\*, Aquiles Solís-Soto<sup>3</sup>

### Resumen

Se caracterizaron tres fermentadores: New Brunswick M-19 de 14 litros, Applikon Biocontroller 1035 de 7 litros y New Brunswick Bioflo III de 7 litros, determinando el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_{La}$ ), la retención de gas (RG) y el tiempo de mezclado ( $t_M$ ). El fermentador New Brunswick Bioflo III tuvo los mejores valores con una relación de diámetro del impulsor/diámetro del tanque ( $D_i/D_T$ ) de 0.43,  $K_{La} = 9.5-208 \text{ h}^{-1}$  y  $t_M = 1.0-3.0 \text{ s}$ , por lo que fue seleccionado para realizar la producción de blastosporas de *Beauveria bassiana*, utilizando melaza como fuente de carbono. Se estudiaron las condiciones de mezclado, utilizando diferentes combinaciones de impulsores tipo Rushton, Maxflo y Lightnin, bajo un diseño experimental factorial  $3^2$ . El tiempo de propagación fue de 4 días, el volumen de trabajo 4 litros, 10% de inóculo ( $1 \times 10^6$  blastosporas/ml), temperatura  $30^\circ\text{C}$ , agitación de 400-500 rpm, aireación de 0.5-1.0 vvm, y pH de 5.4. El hongo se desarrolló mejor utilizando la combinación de impulsores Rushton-Maxflo a 400 rpm y 1.0 vvm ( $F = 10.324$ ,  $p \leq 0.0123$ ) ( $DMS=0.585$ ), obteniendo una concentración de  $1.2 \times 10^9$  blastosporas/ml, 2.2 g/l de biomasa y 2.48 g/l de consumo de sustrato ( $Y_{x/s}=0.89$ ). Las condiciones de mezclado y los parámetros obtenidos pueden ser aplicados en otros fermentadores para optimizar la producción de blastosporas de *B. bassiana* en la elaboración experimental de bioinsecticidas.

**Palabras clave:** fermentación líquida, aireación, agitación, hongo entomopatógeno.

### Abstract

In this work three fermenters were characterized: New Brunswick M-19 of 14 liters, Biocontroller Applikon 1035 of 7 liters and New Brunswick Bioflo III of 7 liters, determining the volumetric coefficient oxygen transfer ( $K_{La}$ ), gas hold up (GH) and the mixing time ( $t_M$ ). The fermenter New Brunswick Bioflo III had the best values with a ratio of diameter of the impeller/vessel ( $D_i/D_T$ ) of 0.43,  $K_{La} = 9.5-208 \text{ h}^{-1}$  and  $t_M = 1.0-3.0 \text{ s}$ , so it was selected for the production of blastospores of *Beauveria bassiana*, using molasses as carbon source. We studied the mixing conditions, using different combinations of impellers, type Rushton, Lightnin and Maxflo under a factorial experimental design  $3^2$ . The propagation time was of 4 days, working volume 4l, 10% inoculum ( $1 \times 10^6$  blastospores/ml), temperature  $30^\circ\text{C}$ , agitation of 400-500 rpm, aeration 0.5-1.0 vvm, and pH of 5.4. The fungus growth better using a combination of impellers Rushton-Maxflo at 400 rpm and 1.0 vvm ( $F = 10.324$ ,  $p \leq 0.0123$ ) ( $LSD = 0.585$ ) obtaining a concentration of  $1.2 \times 10^9$  blastospores/ml, 2.2 g/l biomass and 2.48 g/l of substrate consumption ( $Y_{x/s} = 0.89$ ). The mixing conditions and the parameters obtained can be applied to optimize the blastospore productions of *B. bassiana* to fermenter level in the experimental production of bioinsecticides.

**Key words:** liquid fermentation, aeration, agitation, entomopathogenic fungus.

**Recibido:** noviembre 20 de 2012      **Aprobado:** noviembre 3 de 2013

\* Investigador del Instituto Politécnico Nacional. CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, COFAA, Guasave, Sinaloa, México. cgarciag@ipn.mx.

\*\* Investigador del Instituto Politécnico Nacional. CIIDIR-IPN Unidad Durango, COFAA, Durango, Dgo, México. mbgonzalez@ipn.mx.

\*\*\* Investigadores de la Unidad de Biotecnología industrial, ITD, Durango, Dgo. México.

## Introducción

Los bioinsecticidas elaborados a base de hongos entomopatógenos (HE) son utilizados en diferentes países del mundo debido a su especificidad y a su amplio rango de hospederos, dentro de los cuales *Beauveria bassiana* (Vuilleimin) Bálamo es el más utilizado. El ingrediente activo de este hongo son las esporas aéreas producidas a través de un sistema de fermentación bifásica (líquido-sólido) obteniendo concentraciones de esporas con toxicidad satisfactoria en un menor tiempo (Mascarin *et al.*, 2010).

La producción de blastosporas de *B. bassiana* en medio líquido es un proceso biotecnológico conveniente desde el punto de vista de eficiencia y rentabilidad, si se compara con la producción de esporas por fermentación en estado sólido (Lozano-Contreras *et al.*, 2007) donde la composición del medio de cultivo es uno de los factores determinantes que favorecen la formación de blastosporas, esporas y/o micelio (Riaz *et al.*, 2013). En estudios recientes se han utilizado diversas fuentes de carbono y nitrógeno tales como licor de maíz, aminoácidos y peptona de colágeno en el medio de cultivo, obteniendo abundante micelio y alta concentración de blastosporas en menores tiempos de fermentación (Romero-Rangel *et al.*, 2012).

La melaza es un residuo de la cristalización final del azúcar que contiene azúcares: sacarosa, glucosa y fructosa, sales minerales, proteínas y vitaminas, entre otros (Hernández-Domínguez *et al.*, 2003) los cuales proporcionan al microorganismo los nutrientes necesarios para la producción de biomasa.

Actualmente, las blastosporas son utilizadas para elaborar formulaciones empleadas en el control exitoso de varios insectos plaga en agricultura, debido a su rápida germinación en cultivo líquido, con la desventaja de que estos cuerpos infectivos tienden a perecer más rápidamente durante su almacenaje, debido a su sensibilidad al calor (Jaronsky y Jackson, 2012).

Para mejorar la producción, rendimiento y estabilidad de blastosporas de *Isaria fumosorosea* (Wise) (Brown & Smith) tolerantes a la desecación, Jackson *et al.* (2003) realizaron una comparación de medios de cultivo líquido suplementados con fuentes de nitrógeno complejas (caseína hidrolizada con ácido o extracto de levadura) obteniendo altas concentraciones de blastosporas ( $1 \times 10^9$  blastosporas/ml; con 79-82% de supervivencia después del secado) en comparación con los producidos con otras fuentes de nitrógeno (12-50% de supervivencia después del secado).

Respecto a la toxicidad, Chong-Rodríguez *et al.* (2011) compararon la actividad biológica de blastosporas secas producidas en medio líquido (sacarosa y licor de maíz fermentado) usando un fermentador con dos impulsores tipo Rushton y formuladas con tierra de diatomeas a una concentración de  $1 \times 10^8$  blastosporas/ml de *B. bassiana* sobre larvas del tercer estadio de desarrollo de *Plutella xylostella* (L.), las cuales causaron un 90% de mortalidad de larvas en comparación con otros dos medios de cultivo utilizados. Otro ejemplo es la preparación comercial PreFeRal® (*I. fumosorosea* cepa Apopka 97: 20%,  $2 \times 10^9$  UFC/g) elaborada con blastosporas y/o micelio-blastosporas, la cual se usa en Bélgica (Wraight *et al.*, 2000; Chan-Cupul *et al.*, 2010).

Por otro lado, Eyal *et al.* (1994) propagaron al hongo *I. fumosorosea* para obtener micelio activo contra insectos, empleando un fermentador de 20 litros con 16 litros de medio compuesto por 60-80g/l de melaza como fuente de carbono, obteniendo 30-50 g/l de micelio filamentoso (peso seco) en 4 a 6 días de fermentación con una agitación de 400 a 600 rpm y una aireación de 0.8 a 1.0vvm a las 96-100h de proceso. García *et al.* (2006) utilizaron melaza con extracto de levadura para la producción en medio líquido del hongo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, obteniendo una cantidad de biomasa tres veces superior a otros tratamientos (13.18 g/l), siendo importante el aporte de una fuente de nitrógeno (relación carbono-nitrógeno igual a 1).

El tiempo de mezclado, tiempo necesario para alcanzar el estado de homogeneidad de la mayor parte del líquido después de la adición de otro líquido (Kasat y Pandit, 2008), es usualmente el parámetro más importante para determinar la eficiencia de un sistema de agitación, el cual depende principalmente de las características reológicas del caldo de cultivo, del sistema de mezclado y de las condiciones de fermentación. Se sabe también que con los impulsores axiales se ha obtenido mejor producción de blastosporas que con los impulsores radiales, esto debido a que el mezclado de los primeros permite una distribución de temperaturas similar en todas las partes del líquido de fermentación (Manikowski *et al.*, 1994; Jaworski *et al.*, 1998; Sardeing *et al.*, 2004).

No obstante, existe poca información sobre el efecto combinado de este tipo de impulsores en la producción de hongos entomopatógenos, y en particular sobre la propagación de *B. bassiana* para la producción de blastosporas con diferentes medios de cultivo a nivel de pruebas de escalamiento en fermentadores de mayor volumen de trabajo. En este estudio es también de interés el uso de la melaza de caña de azúcar como

fuente de carbono, por ser un producto económico que proporciona nutrientes a este hongo.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue estudiar las condiciones de mezclado en fermentador (agitación y aireación) usando una combinación de tres tipos de impulsores, para determinar los parámetros biotecnológicos de fermentación, utilizando melaza de caña como fuente de carbono, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y sales minerales en la producción de blastosporas de *B. bassiana*.

## Materiales y métodos

### Caracterización de los fermentadores

Se caracterizaron tres fermentadores: New Brunswick M-19 de 14 litros, Applikon Biocontroller 1035 de 7 litros y New Brunswick Bioflo III de 7 litros, con volúmenes de trabajo de 10, 5 y 4 litros, respectivamente, a los cuales se les determinó el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_{La}$ ), la retención de gas (RG) y el tiempo de mezclado  $t_M$ .

### Coficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_{La}$ )

Se determinó por el método del sulfito (Rajesch et al., 2012), para lo cual se cargó el fermentador con una solución 0.8N de sulfito de sodio, se agregó  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  a una concentración de  $1 \times 10^3$  M. Con aireación de 0.5 vvm y agitación de 200 rpm, se tomaron muestras por duplicado de la solución en matraces de 250 ml que contenían una solución de yodo 0.1 N, se tituló el exceso de yodo con tiosulfato de sodio 0.1 N y almidón como indicador; se repitió esta operación a intervalos de cinco minutos y se le dio el tratamiento anterior. Se aumentó la velocidad de agitación a 400, 600, 800 y 1000 rpm con una aireación de 1 y 1.5 vvm y se realizaron las mismas operaciones descritas. Todos los componentes de las soluciones y medios fueron obtenidos de Difco Laboratories Inc. (Detroit, Mi, USA).

### Retención de gas (RG)

La retención de gas fue cuantificada a través de una medición directa del nivel del líquido en el fermentador, diferenciando el nivel antes de iniciar la aireación y la agitación. Estos valores se convirtieron luego a volumen de líquido. Las mediciones fueron tomadas a la mitad de las olas superficiales (Junker et al., 1998).

### Tiempo de mezclado ( $t_M$ )

Se tomó el tiempo en segundos requerido para lograr que el líquido en el tanque del fermentador fuese homogéneo en un solo punto (Hadjiev et al., 2006), como indicador se agregó fenolftaleína con NaOH 0.1N (Nuñez-Ramírez et al., 2012). Los niveles de agitación fueron 400 y 500 rpm, y de aireación 0.5 y 0.6 vvm.

### Geometría del fermentador

En los tres fermentadores se midió la distancia entre los impulsores y los espacios entre el fondo del tanque y los impulsores, después se seleccionó el tipo de fermentador más adecuado para el desarrollo del hongo, con base a los mejores valores de  $K_{La}$ , RG y  $t_M$ .

### Sistema de mezclado

Para determinar el efecto de las mejores condiciones de agitación y aireación se usó una combinación de impulsores: Rushton, Maxflo y Lightnin, bajo un diseño experimental factorial  $3^2$  cuyas variables fueron; tres tipos de impulsores y dos posiciones: arriba y abajo (tabla 1).

**Tabla 1.** Posición de los diferentes impulsores en la determinación de  $K_{La}$ , RG y  $t_M$ .

Posición del impulsor	
Arriba	Abajo
Rushton	Rushton
Rushton	Lightnin
Rushton	Maxflo
Lightnin	Lightnin
Lightnin	Rushton
Lightnin	Maxflo
Maxflo	Maxflo
Maxflo	Rushton
Maxflo	Lightnin

### Velocidad de transferencia de oxígeno volumétrica $N_A$

Se determinó por el método dinámico (Casas-López et al., 2006). Para la determinación de la velocidad de transferencia de oxígeno volumétrica  $N_A$  ( $mgO_2/l^*hora$ ), se llevó la concentración de oxígeno disuelto hasta valores de 65-80%, posteriormente se cortó la aireación y la agitación, se tomaron lecturas de la concentración de oxígeno disuelto a intervalos de 5 s durante 1 min, des-

pués cada 15 s durante 2 min, posteriormente se reestablecieron las condiciones de agitación y aireación.

Los valores de oxígeno disuelto se convirtieron a gramos de oxígeno y se graficaron con respecto al tiempo, obteniéndose una curva de consumo de oxígeno, cuya pendiente corresponde a la velocidad de transferencia de oxígeno volumétrica ( $N_A$ ).

### **Diseño experimental en el fermentador**

Bajo estas condiciones se determinó la producción de blastosporas a dos velocidades de agitación (400 y 500 rpm) y a dos condiciones de aireación (0.5 y 1.0 vvm). Los datos de las diferentes concentraciones obtenidas fueron analizados con un ANOVA en el paquete Statistica (1993). Se empleó una prueba DMS para separar las medias de la producción de blastosporas.

Una vez seleccionado el mejor fermentador, que en este caso fue el New Brunswick Bioflo III, se determinaron los parámetros del sistema de mezclado; condiciones de aireación y agitación, con énfasis en la combinación de impulsores. Con esta finalidad se realizó la propagación de *B. bassiana* de la manera siguiente:

### **Obtención del hongo entomopatógeno**

Se utilizó un aislamiento de *B. bassiana* clave BbPM de la colección de cepas del CIIDIR IPN Unidad Durango, el cual fue aislado de insectos micosados encontrados en manzanas, el que resultó tóxico para el control de larvas de cinco días de desarrollo de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) con niveles de toxicidad del 96% a las 72h (Solís-Soto *et al.*, 2006).

### **Preparación del inoculo y propagación en fermentador**

El aislamiento de *B. bassiana* se produjo en medio de cultivo SDA a 30 °C durante 15 días hasta su óptimo desarrollo, después se preparó una suspensión con agua destilada que sirvió para inocular matraces de 500 ml con 100 ml de medio de cultivo líquido con melaza como fuente de carbono, este medio se usó para inocular al fermentador. Las blastosporas fueron producidas en un fermentador Bioflo III. Se usó un medio de cultivo con la siguiente composición: Melaza 14.5ml/l,  $(NH_4)_2SO_4$  6g/l,  $KH_2PO_4$  3.5g/l,  $MgSO_4$  0.5g/l, NaCl 0.1g/l,  $CaCl_2$  0.1g/l, con un volumen de trabajo de 4 l, y un tamaño de inóculo del 10%, con una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  blastosporas/ml, a una temperatura de 30°C y pH de 5.4. El tiempo de

propagación fue de 4 días (hasta que el hongo alcanzó el 80% de la fase logarítmica de crecimiento).

### **Determinación de biomasa**

Se tomaron muestras del cultivo del hongo cada 24h para determinar la biomasa producida (blastosporas-micelio) mediante la determinación de peso seco, con el filtrado de las muestras a través de un papel filtro Whatman™ No. 42, previamente secado a 75 °C durante 24h. Posteriormente, se enfriaron y se pesaron, obteniendo así los gramos por litro de medio de cultivo (AOAC, 1990).

### **Consumo de azúcares reductores**

La cuantificación de la sacarosa, glucosa y fructosa, a partir de melaza fue realizada por cromatografía líquida utilizando un HPLC de alta resolución marca Wyatt, con una columna Shodex OH pak® (39x300 mm), de acuerdo a la metodología descrita por Matissek *et al.* (1998). Se pesaron de 0.75 g a 1.0 g de melaza y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml para su dilución y después se homogenizó la muestra, esta fue filtrada por una membrana de 0.45  $\mu m$  provista de un prefiltró Sep-Pak® para la inyección en la columna, dependiendo de la geometría de los hidroxilos de los diferentes azúcares. Para la preparación de la fase móvil se prepararon 1000 ml de solución de EDTA (sal cálcica) de 50 ppm, esta se filtró por membrana y se desgasificó. Para los estándares de calibración externos se prepararon 100 ml de soluciones, registrando el peso exacto utilizado en la preparación. Las concentraciones de estándares de calibración fueron: sacarosa 5 ppm, glucosa 0.5 ppm y fructosa 0.5 ppm.

Las condiciones para la operación de HPLC fueron: Velocidad de la fase móvil: 0.5 a 0.6 ml/min en elución isocrática, Presión  $\leq$  1300 psi, Temperatura de 80 a 85 °C y un Volumen de inyección de muestras de 20  $\mu l$ . La prueba se realizó cada 24h.

## **Resultados y discusión**

### **Caracterización y geometría de los fermentadores**

La caracterización de los fermentadores en cuanto a  $K_{La}$ ,  $t_M$  y RG, así como los valores de la geometría del tanque aparecen en las tablas 2 y 3, donde se observa que el fermentador Bioflo III tuvo la mejor relación  $D_i/D_T = 0.43$  (el  $K_{La}$  aumenta a mayor relación  $D_i/D_T$  y menores tiempos de mezclado), una  $K_{La} = 9.5-208 h^{-1}$  y un  $t_M = 1.0-3.0 s$ , en comparación con el fermentador New Brunswick M-19 que presentó la menor relación

$D_i/D_T$ , así como también los valores más bajos de  $K_{La}$  y los más altos en cuanto al tiempo de mezclado. En relación a este resultado Mehta y Sharma (1971) encontraron que una relación  $D_i/D_T$  de 0.4 a 0.5 son los adecuados para lograr un contacto gas-líquido eficaz en un tanque agitado, dichos valores son semejantes a los encontrados en nuestro estudio, así como los valores reportados por Junker *et al.*, (1998) de  $D_i/D_T=0.34-0.47$  para la producción de *Streptomyces* utilizando impulsores Rushton y Maxflo por separado.

El diámetro de los impulsores para el fermentador Bioflo III fue de 7.3 cm, para el Applikon 6.0 cm y 7.3 cm para el M-19, mientras que el valor de RG fue de 15% para el Bioflo III, y para los otros dos fermentadores de 7 y 9 %, respectivamente. Junker *et al.*, (1998) reportaron valores más bajos de RG (12% para agua, y más bajo para glicerol, 5%) al ir aumentando el diámetro del impulsor. Sin embargo, en éste estudio el diámetro de los impulsores se mantuvo constante, lo que permitió que se mantuviera homogéneo el medio de cultivo y existiera mejor dispersión del mismo, lo que propició el desarrollo adecuado de las blastosporas del hongo, esto se atribuye al tipo de flujo axial y radial generado, con los diferentes tipos de fermentadores empleados.

### **Tiempo de mezclado**

Los tiempos de mezclado en los tres fermentadores fueron en general bajos, aunque otros autores reportan tiempos de mezclado mínimos de 12 segundos para un sistema de dos impulsores, a 400 rpm y utilizando agua (Oniscu *et al.*, 2002). Esta diferencia puede deberse principalmente al método utilizado para la determinación del tiempo de mezclado. La posición correcta de los impulsores, representa un factor determinante en la eficiencia del mezclado. La distancia óptima entre dos impulsores es de 1-2 veces el diámetro, la posición incorrecta puede ocasionar un mezclado deficiente (Karimi *et al.*, 2013). La separación de impulsores que se empleó fue de una vez su diámetro. Oniscu *et al.*, (2002) obtuvieron una distancia óptima entre impulsores de 1.5. Si se aumenta la distancia entre los impulsores a 1.5, podría disminuirse el tiempo de mezclado en los fermentadores aquí caracterizados y aumentar la eficiencia en la transferencia de oxígeno. En este estudio el tiempo de mezclado disminuyó considerablemente con la velocidad del impulsor, tendiendo a un valor constante, alcanzado entre 400 y 600 rpm, resultados similares fueron reportados por Nuñez-Ramírez *et al.*, (2012), quienes encontraron que la velocidad de agitación fue mejor a 300 rpm que a 100 u 800 rpm, obteniendo cortos tiempos de mezclado debido a la estabilidad mecánica, logrando

un fluido homogéneo en la evaluación del comportamiento reológico de *B. bassiana* en fermentador con impulsores Rushton-Maxflo.

### **Velocidad de transferencia de oxígeno volumétrica ( $N_A$ )**

El mejor valor de la  $N_A$  se obtuvo con la combinación de impulsores Rushton-Maxflo (170 mgO<sub>2</sub>/l\*h). Sobre esto, Mavituna (1983) encontró una  $N_A$  para hongos de 100-250 mgO<sub>2</sub>/l\*h, lo que demuestra que los resultados presentados en este trabajo corresponden a los mejores valores de  $K_{La}$  para la misma combinación de impulsores y que el volúmen del gas contenido en el fermentador es adecuado, permitiendo el buen crecimiento de este tipo de hongos; resultados similares fueron obtenidos por Doran (1995). Sin embargo, en este estudio los valores de  $N_A$  fueron bajos, lo cual se atribuye a problemas que se presentaron en la membrana del electrodo de oxígeno. En todas las corridas se presentó un enmascaramiento en la disminución en la concentración de oxígeno en el caldo de fermentación, tanto por la concentración de biomasa como por la reología del caldo de cultivo. Existió diferencia estadística significativa entre las condiciones de aireación y agitación del experimento ( $F = 10.324$ ,  $p \leq 0.0123$ ). Las mejores condiciones de estos parámetros en el sistema de mezclado fueron: agitación de 400 rpm y aireación de 1.0 vvm ( $DMS = 0.585$ ) (tabla 4).

### **Cinética de crecimiento de *Beauveria bassiana***

La fase de adaptación de *B. bassiana* fue de 24 h, el tiempo de duplicación ( $T_d$ ) de 31 h y la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  de 0.022 h<sup>-1</sup>. Humphreys *et al.* (1990) obtuvieron un  $\mu$  de 0.21 y 0.19 h<sup>-1</sup> para *B. bassiana*, usando glucosa como fuente de carbono. Estas velocidades de crecimiento son 10 veces mayores que las obtenidas en el presente estudio usando melaza. No obstante, el principal objetivo fue lograr buenos rendimientos de esporas (1x10<sup>8</sup> blastosporas/ml); colateralmente la biomasa formada por micelio puede usarse como ingrediente activo (Eyal *et al.*, 1994).

El mayor valor de  $\mu$  (0.0321 h<sup>-1</sup>) se presentó en la combinación de impulsores Rushton-Maxflo, es decir que se tuvo un mejor mezclado y por lo tanto una mejor transferencia de oxígeno, lo que permitió un adecuado desarrollo del microorganismo.

El mejor rendimiento de blastosporas fue de 1.2x10<sup>9</sup> blastosporas/ml, al iniciar la fase estacionaria de crecimiento a los 4 días (figura 1). Este rendimiento se

**Tabla 2.** Geometría de los fermentadores New Brunswick M-19, Applikon Biocontroller 1035 y New Brunswick Bioflo III.

Fermentador	Wb	Hb	H <sub>i</sub>	D <sub>T</sub>	D <sub>i</sub>	H <sub>L</sub>	D <sub>i</sub> /D <sub>T</sub>	H <sub>i</sub> /D <sub>T</sub>	N
M-19	1.7	11.0	7.3	21.4	7.3	26.0	0.34	1.68	2
APPLIKON	1.5	6.3	6.0	16.0	6.0	19.0	0.37	1.18	2
BIOFLO III	1.5	6.3	7.3	17.5	7.3	17.0	0.43	0.97	2

Wb = Ancho del baffle, Hb = Altura del fondo al primer impulsor, H<sub>i</sub> = Separación entre impulsores, D<sub>T</sub> = Diámetro del tanque, D<sub>i</sub> = Diámetro del impulsor, H<sub>L</sub> = Altura del líquido, N = Número de impulsores.

**Tabla 3.** Caracterización de los fermentadores New Brunswick M-19, ApplikonBiocontroller 1035 y New Brunswick Bioflo III.

Fermentador	Transferencia de Oxígeno K <sub>La</sub> (h <sup>-1</sup> )	Tiempo de Mezclado t <sub>M</sub> (s)	Retención de gas RG (%)	Volumen de trabajo (l)
M-19	9.5-150	1.5-5.0	N.D-7.0	10
APPLIKON	8.5-154	1.0-5.0	N.D-9.0	5
BIOFLO III	9.5-208	1.0-3.0	N.D-15.0*	4

\*Vórtice, N.D: No detectable.

**Tabla 4.** Condiciones del sistema de mezclado y rendimiento de blastosporas de *B. bassiana* en fermentador tipo Bioflo III.

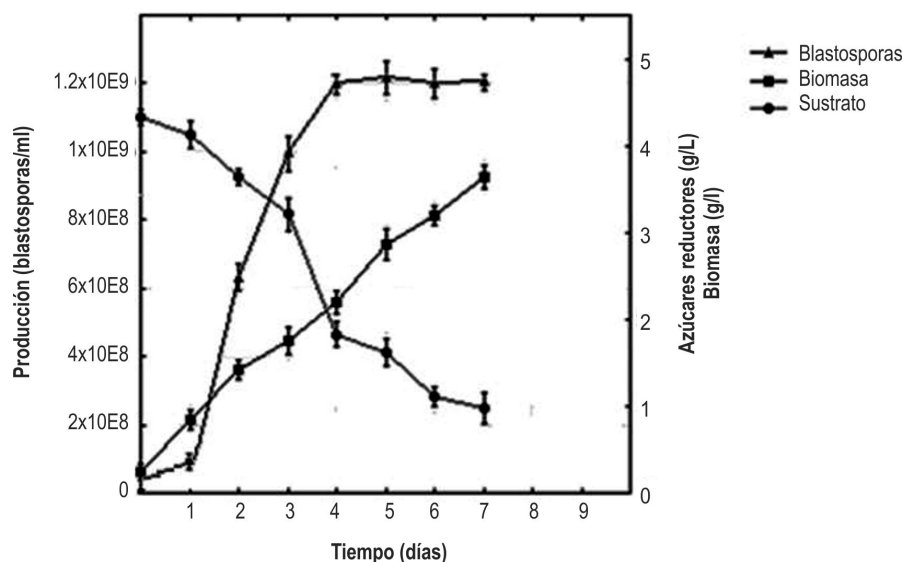
Agitación (rpm)	Aireación (vvm)	Producción blastosporas/ml
400	0.5	8.40x10 <sup>8</sup> ab*
	1.0	1.20x10 <sup>9</sup> a
500	0.5	7.30x10 <sup>8</sup> b
	1.0	7.40x10 <sup>8</sup> b

\* Valores con letras distintas fueron estadísticamente diferentes (F=10.324, p ≤ 0.0123) (DMS = 0.585).

encuentra dentro de los valores establecidos para la producción de bioinsecticidas en fermentación líquida (1x10<sup>8</sup> blastosporas/ml) (Riaz *et al.*, 2013).

*B. bassiana* consumió 2.48 g/l de azúcares reductores totales para su desarrollo (4 días), es decir que a mayores niveles de concentración de azucares es posible

aumentar la concentración de biomasa para así lograr mayores niveles de producción (figura 1) (biomasa producida = 3.65 g/l). Estos resultados fueron inferiores a los valores reportados por Eyal *et al.*, (1994), Li *et al.*, (2010), Nuñez-Ramírez *et al.* (2012) para hongos entomopatógenos, quienes obtuvieron altos rendimientos de biomasa (10.06-50 g/l).



**Figura 1.** Producción de blastosporas, biomasa y consumo de sustrato de *B. bassiana* en el sistema de mezclado con una combinación de impulsores Rushton-Maxflo, con agitación de 400 rpm y aireación de 1.0 vvm.

## Conclusiones

El fermentador Bioflo III presentó el mejor coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, respecto a los otros fermentadores, así como los menores tiempos de mezclado y el mejor valor de RG en el sistema de fermentación. Estas condiciones permitieron el crecimiento y obtención de una buena concentración de blastosporas de *B. bassiana* utilizando melaza como sustrato.

Con la combinación de los impulsores Rushton-Maxflo, a una agitación de 400 rpm y una aireación de 1.0 vvm, se obtuvieron  $1.2 \times 10^9$  blastosporas/ml. Estas condiciones propiciaron el crecimiento adecuado de las blastosporas del hongo, debido al tipo de flujo axial y radial generado. La cantidad de blastosporas, biomasa y consumo de sustrato fueron aceptables y se encuentran dentro de los estándares para la producción de un bioinsecticida.

Los parámetros biotecnológicos estudiados y las condiciones del sistema de mezclado generadas en este trabajo, se pueden aplicar en el escalamiento y optimización de proceso en fermentador para la producción de blastosporas del hongo entomopatógeno *B. bassiana* a nivel de laboratorio.

## Referencias bibliográficas

AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15<sup>ava</sup> Edición. Arlington, Estados Unidos de América: Association of Official Analytical Chemists.

Casas-López J.L., Rodríguez-Porcel E.M., Oller-Alberola, I., Ballesteros-Martin M.M., Sánchez-Pérez J.A., Fernández-Sevilla J.M., Chisti Y. 2006. Simultaneous determination of oxygen consumption rate and volumetric oxygen transfer coefficient in pneumatically agitated bioreactors. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 45(3): 1167-1171.

Chan-Cupul W., Ruiz-Sánchez E., Cristóbal-Alejo J., Pérez-Gutiérrez A., Munguía-Rosales R., Lara-Reyna J. 2010. Desarrollo *in vitro* de cuatro cepas nativas de *Paecilomyces fumosoroseus* y su patogenicidad en estados inmaduros de mosquita blanca. *Agrociencia*. 44(5): 587-597.

Chong-Rodríguez M.J., Maldonado-Blanco M.G., Hernández-Escareño J.J., Galán-Wong L.J., Sandoval-Coronado C.F. 2011. Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability and toxic activity using different liquid media. *African Journal of Biotechnology*. 10(30): 5736-5742. DOI: 10.5897/AJB10.2264

Doran P.M. 1995. *Bioprocess engineering principles*. San Diego, Estados Unidos de América: Academic Press Inc. 439 pp.

Eyal J., Walter J.F., Osborne L., Landa Z. 1994. *Method for production and use of pathogenic fungal preparation for pest control*. US Patent 5.360.607.

García I., Del-Pozo E., Méndez A., Céspedes Y. 2006. Producción de biomasa de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, aislamiento NR-003, en diferentes medios de cultivo con agitación. *Revista Protección Vegetal*. 21(3): 173-177.

Hernández-Domínguez J., Solís-Fuentes J.A., Durán-de-Bazúa C. 2003. Separación de fructosa de melaza de caña de azúcar por acomplejamiento con hidróxido de calcio. *Tecnología, Ciencia, Educación (IMIQ)*. 18(1):16-24.

Hadjiev D., Sabiri N.E., Zanati A. 2006. Mixing time in bioreactors under aerated conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 27(3): 323-330.

Humphreys A.M., Matewele P., Cunliffe B., Trinci A. 1990. Comparison of sporulation of *Paecilomyces farinosus* and *Beauveria bassiana* in batch and fed-batch culture. *Mycological Research*. 94 (8): 1046-1050.

Jaworski Z., Dyster K.N., Mishra V.P., Nienow A.W., Wyszynski M.L. 1998. A study an up and down pumping wide blade hydrofoil

- impeller. Part II: CFD Analysis. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 76 (5): 866-876.
- Jaronski S.T., Jackson M.A. 2012. Mass production of entomopathogenic hypocreales. 255-284 pp. En: *Manual of techniques in invertebrate pathology*. 2d Edition. Chapter VIII. Lacey A.L. (Ed.). Academic Press. Oxford, N.Y. 484 p.
- Jackson M.A., Cliquet S., Iten L.B. 2003. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Science and Technology*. 13(1): 23-33.
- Junker B.H., Stanik M., Barna C., Salmon P., Paul E., Buckland B.C. 1998. Influence of impeller type on power input in fermentation vessels. *Bioprocess Engineering*. 18(6): 401-412.
- Karimi A., Golbabaee F., Reza M., Neghab M., Mohammad K., Nikpey A., Reza P.M. 2013. Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 10(6): 1-9.
- Kasat G.R., Pandit A.B. 2008. Mixing time studies in multiple impeller agitated reactors. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 82(5): 802-904.
- Li R., Jiang X., Guan H. 2010. Optimization of mycelium biomass and exopolysaccharides production by *Hirsutella* sp. In submerged fermentation and evaluation of exopolysaccharides antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*. 9(2): 195-202.
- Lozano-Contreras M.G., Elías-Santos M., Rivas-Morales C., Luna-Olvera H.A., Galán-Wong L.J., Maldonado-Blanco M.G. 2007. *Paecilomyces fumosoroseus* blastospore production using liquid culture in a bioreactor. *African Journal of Biotechnology*. 6(18): 2095-2099.
- Manikowski M., Bodemeier S., Lübbert A., Bujalski W., Nienow A.W. 1994. Measurement of gas and liquid flows and stirred tank reactors with multiple agitators. *The Canadian Journal of Chemistry Engineering*. 72 (5): 769-781. DOI: 10.1002/cjce.5450720502
- Matissek R., Steiner G., Schnepel F.M. 1998. *Análisis de los Alimentos: Fundamentos, Métodos, Aplicaciones*. Editorial Acribia. S. A. México, D.F. 416 p.
- Mavituna C.G. 1983. Mass and energy transfer. En: *The Filamentous Fungi*. Vol. 4: Fungal technology. London: Edward Arnold Publishers Ltd. pp. 20-76.
- Mehta V.D., Sharma M.M. 1971. Mass transfer in mechanically agitated gas-liquid contactors. *Chemical Engineering Science*. 26(3): 461-479.
- Mascarin M.G., Alves S.B., Lopes, R.B. 2010. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinose*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53(4):753-761.
- Nuñez-Ramírez D.M., Medina-Torres L., Valencia-López J.J., Calderas F., López-Miranda J., Medrano-Roldán H., Solís-Soto A. 2012. Study of the rheological properties of a fermentation broth of the fungus *Beauveria bassiana* in a bioreactor under different hydrodynamic conditions. *Journal of microbiology and biotechnology*. 22(11): 1494-1500.
- Rajesh G., Roshan M., Shridhar S.B. 2012. Mass transfer coefficient evaluation for lab scale fermenter using sodium sulphite oxidation method. *Chemical and Process Engineering Research*. 2: 10-17.
- Riaz A., Shah F.A., Butt T.M. 2013. Intra-Specific variability among *Metarhizium anisopliae* strains in their ability to produce blastospores in liquid culture media. *Pakistan Journal of Botany*. 45(3): 1099-1103.
- Romero-Rangel O., Maldonado-Blanco M.G., Aguilar-López C.C., Elías-Santos M., Rodríguez-Guerra R., López-Arroyo J.I. 2012. Production of mycelium and blastospores of *Hirsutella* sp. in submerged culture. *African Journal of Biotechnology*. 11(87):15336-15340. DOI: 10.5897/AJB11.4043
- Oniscu C., Galaction A.I., Cascaval D., Ungureanu F. 2002. Modeling of mixing in stirred bioreactors. 2. Mixing time for non-aerated simulated broths. *Biochemical Engineering Journal*. 12(1): 61-69.
- Sardeing R., Aubin J., Xuereb C. 2004. Gas-liquid mass transfer: A comparison of down- and Up-pumping axial flow impellers with radial turbines. *Chemical Engineering Research and Design*. 82(12): 1589-1596.
- Statistica Program ver. 4.3 Stat Soft, Inc. 1993.
- Solís-Soto A., García-Gutiérrez C., González-Maldonado M.B., Medrano-Roldán H., Galán-Wong L.J. 2006. Toxicidad de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Vuill) sobre palomilla del manzano *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Folia Entomológica Mexicana*. 45 (2): 195-200.
- Wraight S.P., Carruters R.I., Jaronski S.T., Bradley C.A., Garza C.J., Galaini-Wraight S. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*. 17 (3) : 203-217.