



**Determinación del criterio de escalamiento en un cultivo sumergido
para la producción de quitinasas de *Lecanicillium lecanii***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

I.B.I. Monserrat Escobar Sánchez

Directora

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Comité Tutorial

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Dra. Zaizy Rocha Pino

Julio 2018

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana forma parte del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos del Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 237292).

Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie.

A NANCY, POR ENSEÑARME A IR TRAS MIS SUEÑOS Y NUNCA DARME POR VENCIDA, POR CREER SIEMPRE EN MI, POR SU GRAN AMOR INCONDICIONAL.

A EDMUNDO, POR AYUDARME A SER LA PERSONA QUE SOY, POR INCULCARME EL DESEO DE SUPERACIÓN Y AMOR POR EL CONOCIMIENTO.

A EDUARDO, JANETH, GUSTAVO Y ADOLFO POR SU GRAN AMOR, PACIENCIA, COMPLICIDAD Y APOYO CUANDO MÁS LO NECESITO.

A SABINO Y EDELMIRA (Q.E.P.D.) POR LLENARME DE SU SABIDURÍA, CULTURA, GASTRONOMÍA, CREATIVIDAD Y CALIDEZ.

A EVELIA POR SU CERCANÍA Y APOYO INCONDICIONAL DURANTE ESTA ETAPA Y MUCHO MÁS.

AGRADECIMIENTOS

En el desarrollo de mi tesis, elaborada entre 2017 y 2018 para obtener el grado de Maestra en Biotecnología muchas personas intervinieron para que ello fuera posible. Primeramente, un profundo agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por la confianza, apoyo y valiosos consejos.

Les agradezco al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas y Dra. Zaizy Rocha Pino, asesores de mi tesis, por guiarme en esta investigación, por sus sugerencias metodológicas, y sobre todo por el tiempo que me brindaron para dar sus comentarios en los seminarios finales de evaluación de cada trimestre y por la revisión del borrador y la versión final de la tesis.

Al Mtro. Yoyi Matsumoto Soulé y Jesús Rojas Osnaya por aceptar ser lectores y jurado de mi tesis. Asimismo, les agradezco sus comentarios y sugerencias que indudablemente enriquecieron la tesis.

Al Dr. Gabriel Viguera por asesorarme en el uso de equipos para poder desarrollar trabajo experimental y a mi compañero de servicio social futuro I.B.I. Arturo Vázquez Alonso por su apoyo y tiempo para desarrollar una valiosa parte del trabajo en laboratorio.

A mis colegas de la Planta Piloto 10 por su compañerismo y que durante los seminarios de grupo siempre escucharon atentamente mis avances de investigación e hicieron sugerencias o críticas constructivas hacia ella.

Al pueblo de México, que por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), me concedió una beca de manutención para cursar mi maestría.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	4
1 INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 <i>Lecanicillium lecanii</i>	5
1.2 Enzimas quitinolíticas.....	6
1.3 Criterios de escalamiento en cultivo sumergido.....	8
1.3.1 Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_{La}).....	11
1.4 Medición de CO₂ como medida indirecta de biomasa	14
2 ANTECEDENTES	15
2.1 Producción de quitinasas.....	15
2.2 Criterios de escalamiento	17
3 JUSTIFICACIÓN	20
4 HIPÓTESIS	21
5 OBJETIVOS	22
5.1 OBJETIVO GENERAL	22
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	22
6 METODOLOGÍA	23
6.1 Preparación de quitina coloidal.....	24
6.2 Microorganismo	24
6.3 Características del biorreactor utilizado	24
6.4 Cultivo sumergido y condiciones de operación	25
6.5 Determinación experimental del K_{La} y Re	26
6.6 Determinación del K_{La}	27
6.7 Determinación del Re	28
6.8 Determinación de la actividad Endo	29
6.9 Determinación de la actividad Nhasa.....	29
6.10 Determinación de proteasas neutras	30
6.11 Determinación de proteína soluble por el método de Lowry-Peterson	30
6.12 Determinación de proteína soluble por el método de Bradford.....	31
6.13 Purificación parcial	31
6.14 Cromatografía de exclusión molecular	31
6.15 Microscopía electrónica de barrido	31

7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
7.1	Caracterización químico proximal de quitina cruda utilizada para la producción quitinolítica de <i>L. lecanii</i> en el cultivo sumergido	33
7.2	Actividad Nhasa en el cultivo sumergido de <i>L. lecanii</i> para los diferentes tratamientos empleando quitina coloidal con 4.8% de proteína.....	37
7.3	Medición del oxígeno disuelto en el cultivo sumergido para determinación experimental de K_{La}	40
7.4	Determinación del número de Reynolds en el cultivo sumergido.	44
7.5	Determinación del criterio de escalamiento, curvas de productividad con K_{La} y número de Reynolds en el cultivo sumergido.....	46
7.6	Efecto de la combinación agitación-aireación sobre el criterio de escalamiento K_{La} 50	
7.7	CO ₂ como medición indirecta de biomasa	51
7.8	Actividad Nhasa en el cultivo sumergido de <i>L. lecanii</i> para el T1 empleando quitina coloidal con 12 % de proteína	55
7.9	Efecto de la aireación y agitación sobre la morfología del hongo	59
8	CONCLUSIONES	62
9	PERSPECTIVAS	63
10	TRABAJOS PRESENTADOS	64
11	BIBLIOGRAFÍA	65
12	ANEXOS	71
12.1	Curva de <i>p-Nitrofenol</i> para determinación de actividad Nhasa	71
12.2	Metodología para determinación de proteína de Lowry Peterson y curva patrón de seroalbúmina	71
12.3	Curva patrón para determinación de proteína por Bradford	72
12.4	Determinación de CO ₂ como medición indirecta de biomasa	73
12.5	ANOVA en la determinación de oxígeno disuelto	76
12.6	ANOVA en la determinación de K_{La}	77
12.7	Muestra liofilizada de quitinasas	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Forma en que quitinasas hidrolizan la cadena de quitina. Modificado de Seidl y col., 2008	7
Figura 2. Flujo de aire en un reactor de tanque agitado, modificado de Raffo-Duran, 2014. 9	
Figura 3. Transferencia de un componente en fase gaseosa desde el centro de la burbuja hasta el interior de la célula (Doran y col., 1995).....	10
Figura 4 . Esquema del diseño experimental.....	23
Figura 5 .Características del biorreactor, A: Biorreactor de tanque agitado, jarra de 3L, B: Propela tipo Rushton.	25
Figura 6. A: Actividad específica del cultivo T1, B: Actividad volumétrica del cultivo T1.	35
Figura 7. C: Actividad específica del cultivo T2, D: Actividad volumétrica del cultivo T2.	36
Figura 8. Actividad específica Nhasa en los tratamientos con variación en el nivel de agitación y aireación durante las 120 h del cultivo sumergido.....	38
Figura 9. Actividad volumétrica Nhasa en los tratamientos con variación en el nivel de agitación y aireación durante las 120 h del cultivo sumergido.....	39
Figura 10. Efecto de realizar la medición de %OD en los diferentes tiempos del T1 (100rpm y 1vvm). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.....	41
Figura 11. Oxígeno disuelto medido durante el cultivo sumergido en los diferentes tiempos para el tratamiento 1 (100 rpm y 1vvm). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.	42
Figura 12. Oxígeno disuelto medido en el cultivo sumergido a las 120 h para los diferentes tratamientos.	43
Figura 13. Curva de productividad Nhasa con K_{La} . Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.	46
Figura 14. Curva de productividad Nhasa con número de Re. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.	47
Figura 15. Efecto del nivel de agitación y aireación sobre el Re en el cultivo sumergido. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.	49
Figura 16. Efecto del nivel de agitación y aireación sobre el K_{La} en el cultivo sumergido. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.	50
Figura 17. Cinética de crecimiento de <i>L. lecanii</i> en los diferentes tratamientos a lo largo del cultivo.	51
Figura 18. Cinéticas de crecimiento de <i>L. lecanii</i> . Resultados de biomasa ajustados a modelo logístico: A) T1, B) T2, C) T3 y D) T5.	52
Figura 19. Efecto del K_{La} sobre el crecimiento del hongo en el cultivo sumergido.	53
Figura 20. Correlación entre la biomasa máxima con el K_{La}	54
Figura 21. Actividad Nhasa específica y volumétrica del T1 utilizando quitina coloidal con 12% proteína residual.	56

Figura 22. Cromatograma de exclusión molecular.....	58
Figura 23. SEM del cultivo sumergido hasta las 120 h para los diferentes tratamientos: A) T1 a x500, B) T1 a x5,000, C) T2 a x500, D) T2 a x5,000, E) T4 a x500, F) T4 a x2,000, G) T5 a x500, H) T5 a x5,000, I) T9 a x500, J) T9 a x5,000, Quitina y sales (Q);.....	60
Figura 24. Curva patrón de <i>p-Nitrofenol</i> para determinación de actividad Nhasa (Tronsmo y Harman, 1993).....	71
Figura 25. Curva patrón para la determinación de proteína por Lowry-Peterson (Peterson, 1977).....	72
Figura 26. Curva patrón para la determinación de proteína por microensayo (Bradford, 1976).....	72
Figura 27. Captura de pantalla de la producción de CO ₂ del software Gaslab®.....	74
Figura 28. Sistema en línea del monitoreo automatizado de CO ₂ : 1) Caja del sensor K33-ICB, 2) Reactor 3 L, 3) Manguera de flujo de aire de salida del reactor al sensor, 4) cable USB que conecta sensor a computadora.....	74
Figura 29. Curva de correlación construida utilizando como fuente de carbono sacarosa y condiciones del tratamietno 1.	76
Figura 30. Etiqueta de una muestra liofilizada.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dimensiones del reactor de tanque agitado utilizado para el cultivo sumergido. ..	25
Tabla 2. Matriz de diseño factorial 3^2 empleado en las determinaciones del K_{La} y Re	26
Tabla 3. Caracterización químico proximal de quitina cruda y actividad Nhasa.	33
Tabla 4. Actividad Nhasa de los tratamientos a las 120 h del cultivo.	39
Tabla 5. K_{La} en los tratamientos a las 120 h de cultivo.	44
Tabla 6. Re y viscosidad en los tratamientos a las 120 h del cultivo.	45
Tabla 7. Productividad Nhasa en los tratamientos con K_{La} y Re	47
Tabla 8. Caracterización químico proximal de quitina cruda.	55
Tabla 9. Purificación parcial de la Nhasa de <i>L. lecanii</i> en cultivo sumergido T1 utilizando quitina coloidal con 12% proteína residual.	57
Tabla 10. Características del sensor utilizado para monitoreo del CO_2	73
Tabla 11. ANOVA de oxígeno disuelto.	76
Tabla 12. Prueba post hoc de Tukey-Kramer para OD en el tratamiento 1.	76
Tabla 13. Reporte del ANOVA del efecto de los factores agitación, aireación y tratamiento sobre el K_{La}	77

ABREVIATURAS

Endo	Endoquitinasa
Exo	Exoquitinasa
GlcNac	<i>N</i> -acetil glucosamina
K_{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de masa
Nhasa	β - <i>N</i> -acetilhexosaminidasa
Re	Número de Reynolds
rpm	Revoluciones por minuto
vvm	Volumen de aire por volumen de medio por minuto

RESUMEN

El propósito del presente proyecto fue determinar el criterio de escalamiento de la producción de quitinasas de *Lecanicillium lecanii* en un cultivo sumergido, utilizando un biorreactor de 3 L. Para tal fin, se determinó el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_{LA}) y el número de Reynolds (Re). Estos criterios fueron seleccionados debido a que se trabajó con un cultivo aerobio, por lo que se necesitaba conocer como afecta la transferencia de oxígeno al proceso y por otra parte se deseaba conocer el tipo de fluido que comporta el cultivo y si cambia o no su viscosidad.

En la primera etapa del proyecto se llevó a cabo el proceso de producción de enzimas quitinolíticas en cultivo sumergido, para lo cual se utilizaron las condiciones previamente reportadas por Rojas-Osnaya y col. (2015) las cuales fueron a una temperatura de 25°C, pH 6, volumen de trabajo de 1.6 L y utilizando una quitina coloidal con 4.8% de proteína residual como fuente de carbono y se analizó el efecto de la agitación y la aireación sobre la actividad quitinolítica de *L. lecanii*. El oxígeno disuelto, viscosidad y densidad fueron determinados para calcular el K_{LA} y Re de cada tratamiento, además se determinó el CO_2 como medida indirecta de la biomasa en el cultivo. Posteriormente la actividad específica N_{hasa} de los tratamientos se utilizó para la construcción de dos curvas de productividad para los criterios K_{LA} y Re . En esta etapa, el tratamiento con el cual se obtuvo la mayor productividad N_{hasa} fue empleando 100 rpm de agitación y 1vvm de aireación, obteniéndose una actividad específica N_{hasa} de 0.54 ± 0.0195 U mg^{-1} proteína y una productividad de $0.0045 \pm 1.62 \times 10^{-4}$ U mg^{-1} proteína h^{-1} con un valor de K_{LA} de 5.58 ± 0.25 h^{-1} y un Re de 38.1. La productividad enzimática mostró que el criterio de escalamiento con mayor relevancia fue el K_{LA} , ya que se observa un intervalo de K_{LA} en el que ésta se mantiene alta no obstante que se aumenta K_{LA} . En la región comprendida de K_{LA} entre los 5-20 h^{-1} las productividades disminuyen. En cambio, en el Re , las productividades se mantienen constantes cuando Re aumenta. La hidrodinámica del reactor en el rango de variación de 100-400 rpm de agitación y 1-3vvm de aireación fue menos relevante sobre la productividad del proceso, no obstante que se mejoró la transferencia de oxígeno.

En la última etapa del trabajo experimental se empleó una quitina coloidal con mayor porcentaje de proteína residual (12.3%) con las condiciones de aireación y agitación determinadas como las mejores. En este cultivo sumergido se obtuvo una mayor actividad específica Nhasa de 1.15 ± 0.03 U mg^{-1} proteína a las 144 h. El extracto crudo enzimático obtenido de este cultivo fue parcialmente purificado, recuperándose el 3.05% de la enzima con una actividad específica de 2.30 U mg^{-1} proteína y un factor de purificación de 1.14 mediante precipitación con sulfato de amonio (60%) y cromatografía de exclusión molecular.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the scaling criterion for the production of chitinases from the fungus *Lecanicillium lecanii* in submerged culture, in a 3 L bioreactor. For this purpose, the volumetric mass transfer coefficient (K_{La}) and the Reynolds number (Re) were determined. In the first stage of the experimental work, the production process of chitinolytic enzymes in submerged culture was carried out under the culture conditions previously reported by Rojas-Osnaya et al. (2015), using colloidal chitin with 4.8% remained protein varying agitation and aeration. The dissolved oxygen, viscosity and density were determined to calculate the K_{La} and Re for each treatment. The CO_2 was determined as an indirect measurement of the fungal biomass. The specific Nhas activity of the treatments was calculated and expressed as productivity as function of K_{La} and Re criteria. In this stage, the treatment with the highest Nhas activity (0.54 ± 0.0195 U mg^{-1} protein) and productivity ($0.0045 \pm 1.62 \times 10^{-4}$ U mg^{-1} protein h^{-1}) was 100 rpm of agitation and 1 vvm of aeration with a K_{La} of 5.58 ± 0.25 h^{-1} and a Re of 38.1. The enzymatic productivity showed that the most indicated scaling criterion was the K_{La} , since its variation showed a high productivity range. In the K_{La} region between 5-20 h^{-1} , the productivities decreased. On the other hand, in the Re, the productivities remained constant when Re increased. The hydrodynamics of the reactor in the range of variation of 100-400 rpm of agitation and 1-3 vvm of aeration was less relevant to the productivity of the process, although the oxygen transfer was improved.

In the last stage of the experimental work, colloidal chitin with the high percentage of residual protein (12.3%) was used with the conditions of aeration and agitation previously selected. In this submerged culture batch the highest specific Nhas activity of 1.15 ± 0.03 U mg^{-1} protein was achieved at 144 h. The crude enzyme extract obtained from this batch was partially purified from proteases by salting out with ammonium sulfate (60%) and size exclusion chromatography, recovering 3.05% of the enzyme with specific activity of 2.30 U mg^{-1} Protein and purification factor of 1.14.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el criterio de escalamiento que permitirá aumentar el volumen de producción de quitinasas de *Lecanicillium lecanii*?

1 INTRODUCCIÓN

Las propiedades catalíticas eficaces de las enzimas han promovido su introducción en varios productos y procesos industriales. Los recientes desarrollos en biotecnología, particularmente en áreas como la ingeniería de proteínas y la evolución dirigida, han proporcionado importantes herramientas para el desarrollo eficiente de nuevas enzimas. Esto ha dado como resultado el desarrollo de enzimas con propiedades mejoradas para aplicaciones técnicas establecidas y en la producción de nuevas enzimas hechas a medida para áreas totalmente nuevas de aplicación donde las enzimas no se han usado previamente. La introducción de enzimas como catalizadores efectivos que trabajan en condiciones suaves, común a la mayoría de las aplicaciones, resulta en ahorros significativos en recursos tales como energía y agua en beneficio tanto de la industria en cuestión como del medio ambiente. En un mundo con una población que aumenta rápidamente y se acerca al agotamiento de muchos recursos naturales, la tecnología enzimática ofrece un gran potencial para muchas industrias para ayudar a enfrentar los desafíos que enfrentarán en los próximos años (Kirk y col., 2002).

1.1 *Lecanicillium lecanii*

El control biológico se define como el uso de organismos antagonistas que interfieren en la supervivencia de patógenos, dentro de estos agentes de control biológico se encuentran virus, bacterias, hongos, nematodos y protozoarios (Cederkvist y col., 2008). Hasta la fecha, varias cepas de hongos entomopatógenos como *Lecanicillium* (nombre anterior, *Verticillium*), *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* y *Nomuraea rileyi* se han utilizado para controlar diversas plagas de insectos (Vu y col., 2007).

En su uso comercial como biopesticida *Lecanicillium lecanii* es capaz de infectar insectos como la mosquita blanca, pulgones y cochinillas. Su utilidad como agente de control biológico es una alternativa muy atractiva a los productos químicos convencionales utilizados en el manejo de plagas y enfermedades de las plantas. *Lecanicillium lecanii* generalmente sigue la vía típica de la patogénesis de hongos entomopatógenos: adherencia de los conidios a la cutícula del huésped, producción de enzimas quitinolíticas, la

germinación de los conidios, la penetración de la cutícula, producción de blastosporas, ramificación de los micelios y la invasión de los tejidos que causan la muerte del huésped y finalmente, la producción de conidios en la superficie del cadáver (Goettel y col., 2008).

Además de la aplicación de quitinasas como biopesticida, se han utilizado para la producción de proteína unicelular para alimentación animal y acuícola, para el aislamiento de protoplastos fúngicos, preparación de quito-oligosacáridos bioactivos y para la inhibición de fitopatógenos. (Matsumoto, 2004). También han sido utilizados en el desarrollo de los andamios de cultivo de células 3D y producción de glucosamina (Zakariassen y col., 2010).

1.2 Enzimas quitinolíticas

Las quitinasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar la quitina y son reguladas por productos de degradación de dicho polímero, tales como oligómeros de diversos tamaños y su monómero, la *N*-acetil glucosamina. Durante el desarrollo del hongo, estas enzimas participan en la elongación de las hifas ya que hidrolizan parte de la quitina presente en la pared celular permitiendo el crecimiento del hongo. Durante la patogénesis, las quitinasas actúan sobre la quitina contenida en la cutícula del insecto liberando *N*-acetil glucosamina, el mecanismo de corte se muestra en la Figura 1, la cual sirve como fuente de carbono y nitrógeno para el hongo (Rocha-Pino y col., 2014).

Las quitinasas han sido clasificadas hasta ahora en dos diferentes familias por sus secuencias, familias 18 y 19, basados en la similitud de la secuencia de aminoácidos, estructura, mecanismo de acción y los dominios catalíticos (Henrissat y Davies, 1995). Las quitinasas de la familia 18, que incluyen la mayoría de las quitinasas de bacterias y hongos, catalizan la hidrólisis de la quitina y sustratos relacionados, a través de sustrato asistido, mecanismo que implica la formación de un ión oxazolinio intermediario. La hidrólisis enzimática de la quitina se lleva a cabo por dos sistemas sinérgicos y consecutivos: Endoquitinasas (EC3.2.1.14), que producen oligómeros solubles, de masa molecular baja, como la quitotetraosa, quitotriosa y diacetilquitobiosa, esta actividad enzimática involucra

el rompimiento al azar en puntos internos de la cadena del polímero. El segundo grupo son las exoquitinasas, que actúan progresivamente en los extremos no reductores de la cadena, liberando GlcNAc; dentro de éstas, se encuentran las quitobiosidasas (EC3.2.1.29), que catalizan la liberación progresiva de quitobiosa; y las β -*N*-acetilhexosaminidasas, que hidrolizan la quitobiosa y oligómeros de mayor tamaño, liberando GlcNAc (Matsumoto, 2001, Duo-Chuan, 2006).

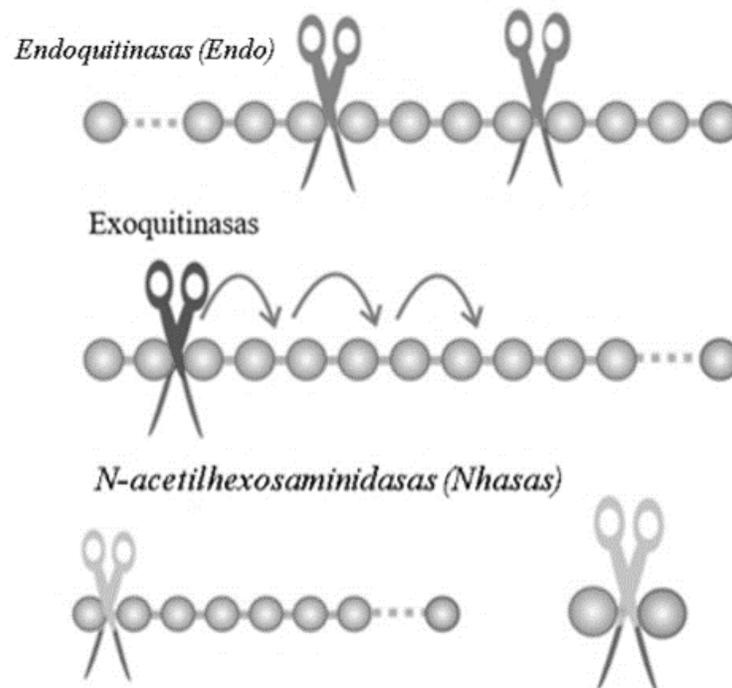


Figura 1. Forma en que quitinasas hidrolizan la cadena de quitina. Modificado de Seidl y col., 2008

Las Nhasas en bacterias se encuentran como un monómero de proteína, con una masa molecular aparente de 150 kDa, mientras que, en hongos, se encuentran en forma de dímeros con una masa molecular en el rango de 11-150 kDa (Scigelova y Crout, 1999). Las β -*N*-acetilhexosaminidasas, presentan la clasificación EC 3.2.1.52, su nombre sistemático es 2-acetamido-2-deoxi- β -Dhexapiranosida-acetamidodeoxihexohidrolasa, son hidrolasas que catalizan el rompimiento del enlace glicosídico de los residuos terminales compuestos de *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilgalactosamina (Slámová y col., 2010).

La importancia de la producción y detección de oligosacáridos deriva en sus posibles aplicaciones, por su actividad antioxidante, antimicrobiana y antitumoral. Los oligosacáridos como *N*-acetilquitohexaosa y *N*-acetilquitoheptaosa presentan actividad antitumoral ya que favorecen la desaparición de metástasis en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Yoon, 2015).

Las quitinasas, presentan un gran potencial para uso biotecnológico, sin embargo, los precios aún no son lo suficientemente bajos para poderlas aplicar a nivel industrial. El principal problema es que la gama de quitinasas de las que se puede disponer es limitada. La producción se obtiene principalmente de *Serratia marcescens* y *Streptomyces griseus*; de acuerdo con los catálogos de Sigma-Aldrich y Mybiosource, solo existe en el mercado una preparación comercial de quitinasa de origen fúngico, la cual pertenece a *Trichoderma viride*, el precio de esta enzima es de \$276 y \$432 pesos/unidad enzimática respecto de cada catálogo (www.sigmaaldrich.com, www.mybiosource.com). No obstante, desde los años setentas se publicaron a detalle las características de una Nhasa aislada de la preparación comercial Takadiastase®, que podría servir como fuente de la enzima a un menor precio (Yamamoto, 1973).

1.3 Criterios de escalamiento en cultivo sumergido

El comportamiento de los cultivos bioquímicos está fuertemente influenciado por una serie de operaciones de transferencia. Es posible que un determinado cultivo, en especial los aeróbicos, esté limitado en sus posibilidades de mejorar su rendimiento y productividad, no por razones propias de las características de las células sino por problemas en el diseño que permita satisfacer la alta demanda de transferencia de masa, y en especial de oxígeno. Debido a la baja solubilidad del O₂ en agua (7 mg L⁻¹ a 35°C) y a que los microorganismos son capaces de utilizar solamente el O₂ disuelto, es evidente que éste deberá ser suministrado continuamente al medio de cultivo. Para lograrlo, es necesario transferir O₂ desde la fase gaseosa (normalmente aire) a la fase líquida (medio de cultivo) de modo permanente. En la Figura 2 puede observarse un tipo de biorreactor (tanque agitado) empleado para la producción en gran escala. La corriente de aire ingresa al biorreactor por

debajo del agitador y al ser golpeado por las paletas se transforma en miles de pequeñas burbujas. El primer efecto que se consigue con la agitación es aumentar enormemente el área interfacial gas-líquido facilitando la transferencia de O_2 desde la fase gaseosa a la líquida. La presencia de deflectores impide la formación de vórtice y hace que el sentido de circulación del líquido sea el indicado por las flechas en la figura. De este modo las burbujas no ascienden directamente hacia la superficie, sino que quedan temporalmente retenidas por la circulación del líquido. El aumento del tiempo de retención de las burbujas implica un aumento en la transferencia de O_2 (Villadsen y col., 2011).

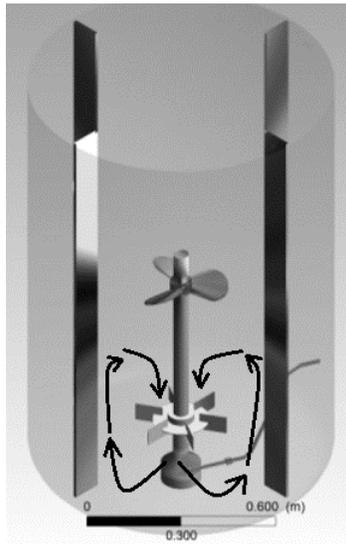


Figura 2. Flujo de aire en un reactor de tanque agitado, modificado de Raffo-Duran, 2014.

La característica general de los problemas de transferencia de masa en un sistema fermentativo es que el oxígeno pasa desde una fase a otra en la cual se encuentra el microorganismo. De acuerdo con la teoría de Lewis y Whitman (1942) y la Ley de Fick (1885), las distintas etapas presentes en este fenómeno son (Nielsen y col.,2002):

- Transporte del oxígeno desde la fase gaseosa hacia la interfase gas-líquido.
- Difusión del oxígeno a través de la interfase gas-líquido.
- Transporte del oxígeno a través de la fase líquida hasta las vecindades del microorganismo.
- Difusión del oxígeno en la interfase líquido-sólido (célula).
- Difusión intra-partícula (intracelular).
- Reacción bioquímica intracelular.

Cada una de las etapas mencionadas de este fenómeno de transferencia de masa se muestra esquemáticamente en la Figura 3.

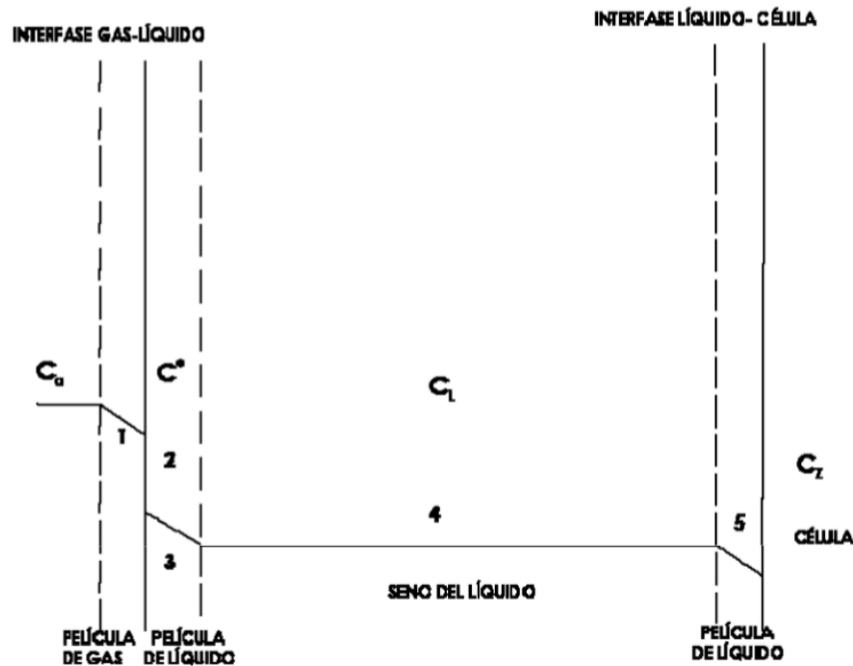


Figura 3. Transferencia de un componente en fase gaseosa desde el centro de la burbuja hasta el interior de la célula (Doran y col., 1995).

En cultivos donde se forman agregados celulares o "pellets", la difusión del oxígeno a través de los agregados se constituye como el paso limitante. El producto del coeficiente de transferencia de oxígeno y el área de la interfase gas-líquido representan un índice de la capacidad de aireación de un biorreactor. El valor de este parámetro depende del diseño del biorreactor, del grado de agitación, del flujo de aire (medidos como vvm), de la viscosidad del medio, de la presencia de antiespumantes, entre otros. En consecuencia, el diseño y las condiciones de operación del biorreactor deben ser tal que satisfacen los requerimientos de oxígeno por el microorganismo.

El problema del paso de una escala a otra es uno de los aspectos de mayor importancia, no sólo en los cultivos bioquímicos sino en la industria en general. En la práctica, se han escogido varios criterios para efectuar el cambio de escala, todos ellos basados en resultados empíricos (Aiba y col., 1973). Posteriormente, se han empleado los métodos de

modelación matemática basados en microbalances de momentum, masa y calor (Pérez, 2000). Sin embargo, se plantea que en tanques agitados (geoméricamente similares), con medio y propiedades físicas constantes, los criterios más utilizados son: potencia por unidad de volumen (PV^{-1}) y coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_{La}) (Quintero, 1993).

1.3.1 Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_{La})

El coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_{La}) es una medida de la oportunidad que el medio circundante le ofrece a un gas para movilizarse a través de la interfaz gas-líquido por unidad de fuerza motriz, la cual es el grado de concentración de gas entre el líquido y el gas. Macroscópicamente, la transferencia de O_2 puede explicarse mediante la ecuación 1:

$$RO_2 = K_L a (C^* - C_L) \quad (1)$$

donde RO_2 es la tasa de transferencia de O_2 , K_{La} es el coeficiente volumétrico de transferencia de O_2 , C^* es la concentración que estaría en equilibrio con la presión parcial de O_2 en el seno de la fase gaseosa. Según la ley de Henry, $PO_2 = H.C^*$ y C_L es el valor de la concentración de O_2 en el seno del líquido. La diferencia de estos dos últimos términos es la fuerza impulsora de la transferencia.

La medición de la capacidad de transferencia de masa, oxígeno, en un biorreactor aerobio es de suma importancia, por cuanto dicho valor determinará la productividad del sistema, siempre y cuando la productividad dependa del oxígeno disuelto. La agitación y la aireación son los parámetros más importantes con el fin de permitir la ampliación del proceso a nivel industrial. El K_{La} podría mejorarse aumentando la aireación y / o la agitación, pero con limitaciones técnicas y fisiológicas (Fenice y col., 2012).

1.3.1.1 Determinación experimental del K_{La}

Los métodos más utilizados para la determinación experimental del K_{La} son (Nielsen y col.,2002):

- Oxidación de una solución de sulfito de sodio (método indirecto)
- Eliminación de gas (método indirecto)
- Balance de oxígeno
- Técnica dinámica

1.3.1.1.1 Método de oxidación del sulfito

El fundamento de este método es la oxidación del sulfito sódico a sulfato en presencia de un catalizador como el Cu^{++} y aún cuando ha sido utilizado ampliamente, su uso no es frecuente actualmente, ya que dependen de la pureza de los reactivos y la reproducibilidad de los resultados depende del operador y generalmente se obtienen valores de K_{La} mayores que con otras técnicas. Existe un método de sulfito modificado, el cual es una combinación del método del sulfito y del método de desgasificación; en éste por costos y aumento de la precisión, la eliminación del oxígeno se realiza inicialmente mediante la adición del sulfito y el catalizador hasta obtener determinado valor de oxígeno disuelto, para luego hacer llegar la concentración hasta el valor mínimo con la adición de nitrógeno a la fase líquida. El mismo, tal cual fue desarrollado, posee una simplicidad que lo hace muy útil, pero, por otro lado, tiene el inconveniente de que como la reacción es muy rápida, el gradiente alrededor de la burbuja se ve alterado y los resultados que se obtienen son sobredimensionados (Cooper y col., 1994)

1.3.1.1.2 Método del balance de oxígeno

En este método se mide el contenido de oxígeno en las corrientes gaseosas hacia y desde el fermentador. De un balance de materia en estado estacionario, entre la entrada y la salida, se determina la velocidad de transferencia de oxígeno desde el gas hacia el líquido para

determinar C^* y C . Este método es el más confiable para medir K_{La} , además de permitir su determinación con tan sólo una medida y puede aplicarse a los fermentadores durante su operación, sin afectarlos.

1.3.1.1.3 Método de eliminación de oxígeno (gassing out)

Se realiza mediante la eliminación del oxígeno disuelto con nitrógeno, luego se determinan las concentraciones de oxígeno disuelto hasta la saturación a determinadas condiciones. Entre las ventajas y limitaciones están que es un método rápido, puede usarse directamente con el medio de fermentación, se requieren volúmenes grandes de nitrógeno por lo cual no es conveniente a gran escala, debido a que el electrodo de oxígeno es permeable al gas y mide el impulso eléctrico producto de la reacción con el electrolito, proporcional a la presión parcial de oxígeno en la capa límite en la membrana y no concentraciones, hay que considerar el tiempo de respuesta y tiempo muerto del electrodo.

1.3.1.1.4 Método dinámico

Este método utiliza la respuesta transitoria a los cambios de concentración medidos por un electrodo de oxígeno disuelto y se basa en un balance en estado no estacionario para el oxígeno. Inicialmente el fermentador se halla con células consumiendo oxígeno, en un determinado instante se corta el suministro de oxígeno, por lo que la concentración de éste disminuye, hasta un valor no menor que la concentración crítica y posteriormente se inyecta aire con caudal constante, haciendo el seguimiento a la restitución de la concentración de saturación.

Pueden aplicarse métodos transitorios para seguir la respuesta de la concentración de oxígeno disuelto en el sistema después de un cambio de paso de la concentración de oxígeno en la corriente de gas de entrada. Estos métodos tienen la ventaja de que no se requiere la adición de un material extraño y que se mide una sola concentración (Merchuk y col., 1999). El método de eliminación de oxígeno (gassingout) es una buena alternativa

siempre que el sistema de medición esté equipado con un electrodo de tiempo de respuesta rápida.

1.4 Medición de CO₂ como medida indirecta de biomasa

El consumo de oxígeno y la producción de CO₂ son resultado de la respiración microbológica y el metabolismo. Los microorganismos aerobios consumen energía en este proceso para su crecimiento. La aireación en un cultivo es uno de los factores críticos que gobiernan la productividad, la aireación es utilizada durante el cultivo para remover el calor metabólico, suplir el oxígeno a las células, remover gases y productos volátiles de la fermentación. (Saucedo-Castañeda y col., 1994).

Han sido descritos diferentes métodos indirectos de estimación de biomasa que miden metabolitos tales como CO₂, componentes fúngicos como ergosterol, ácidos nucleicos, nitrógeno y quitina (Roche y col. 1993). Las mediciones del consumo de O₂ o la evolución de producción del CO₂, son utilizadas frecuentemente como una estimación indirecta de biomasa, estos datos son importantes para el escalamiento del proceso de fermentación (Saucedo-Castañeda y col., 1994). De modo que es necesario un sistema simple y eficiente para el monitoreo de CO₂ en el cultivo como un prerrequisito para la optimización y escalamiento del proceso.

2 ANTECEDENTES

2.1 Producción de quitinasas

L. lecanii ha sido reportado como productor de quitinasas en cultivo sumergido y sólido (Matsumoto y col., 2004; Marín y col., 2008; Rocha-Pino y col., 2011). La producción de quitinasas se ha realizado tanto en cultivo sólido como en cultivo sumergido, autores como Matsumoto y col. (2004) mencionan una alta producción en cultivo sólido en comparación al cultivo sumergido, sin embargo, el cultivo en medio sólido presenta problemas en el escalamiento del proceso, así como en el control de pH y temperatura (Hölker y col., 2004). Por otro lado, la tecnología de cultivo sumergido es ampliamente utilizada a nivel industrial, cerca del 90% de las enzimas producidas industrialmente se producen en cultivo sumergido, empleando condiciones optimizadas y microorganismos manipulados genéticamente (Hölker y col., 2004).

La producción de quitinasas está influenciada por el pH, método de cultivo y el tipo de fuente de carbono. St. Leger y col., (1998) reportaron que la expresión de las quitinasas está directamente ligada con factores ambientales como el pH. Rocha-Pino y col. en 2011 produjeron quitinasas en cultivo sólido y sumergido; obtuvieron el extracto enzimático crudo del cultivo en medio sólido que presentó actividades de exoquitinasas (32 y 51 kDa), endoquitinasas (26 kDa), β -N-acetilhexosaminidasas (61, 80, 96 y 111 kDa). Los cultivos sumergidos produjeron exoquitinasas (32 y 45 kDa), endoquitinasas (10 y 26 kDa) y quitinasa (61, 96 y 111 kDa). La actividad de β -N-acetilhexosaminidasas determinada en cultivo de sustrato sólido con quitina añadida fue de aprox. ($7.58 \pm 0.57 \text{ U mg}^{-1}$) más alto que el cultivo sumergido ($2.73 \pm 0.57 \text{ U mg}^{-1}$); encontrando que, el tipo de sistema influyó en la producción de enzimas quitinolíticas, lo cual puede ser atribuido a las diferencias de difusión de oxígeno y transferencia de masa.

Matsumoto y col., (2004) estudiaron el efecto de utilizar una fuente de carbono compleja como la quitina cruda con la cual se incrementó la producción de las enzimas quitinolíticas, sin embargo, además de la fuente de carbono, el contenido de proteína residual en quitina cruda fue significativa para la expresión de estas enzimas. Existe una influencia de la

concentración de proteína residual sobre la producción de enzimas quitinolíticas en cultivo sumergido, tal como lo reportaron Rojas-Osnaya y col. en 2015, utilizando como sustrato quitina coloidal con tres porcentajes diferentes de proteína residual, 6, 10 y 14%. Con 14% de proteína se obtuvieron actividades de 0.027 y 22.79 U mg⁻¹ de proteína para Nhasa y Endoquitinasa (Endo) respectivamente. La producción mayor de Nhasa se obtuvo al utilizar quitina coloidal con 10% de proteína residual obteniendo 0.115 U mg⁻¹ de proteína, mientras que para la quitina coloidal con 6% de proteína no se detectó actividad quitinolítica.

En cuanto a la edad de cultivo, Matsumoto y col., (2004) reportan actividades de Nhasa de 162.5 y 838 U mg⁻¹ de proteína cuando se inocula el biorreactor con esporas y micelio, respectivamente. Este aumento de actividad fue explicado a una mejor adaptación del microorganismo a la quitina empleada durante el pre-cultivo. Por lo que, en el cultivo en medio sólido, la fase de adaptación para la producción de las enzimas fue acortada permitiendo una rápida asimilación de la quitina empleada como única fuente de carbono.

Carrasco-Navarro y col. (2011), utilizaron una suspensión de esporas como control para la producción de Nhasas de *L. lecanii* inmovilizado en espuma de poliuretano obteniendo 11.2 U L⁻¹ para actividad volumétrica y 0.028 U mg⁻¹ de proteína para actividad específica. Por su parte, Villa-Lerma y col., (2013), estudiaron la producción de Nhasa en condiciones similares de agitación (102 rpm) y de temperatura (25°C), con resultados de 29.34 U L⁻¹ y 0.6 U mg⁻¹ de proteína. Este aumento significativo en la actividad de Nhasa fue explicado a los cambios de pH realizados durante el cultivo.

En un trabajo posterior Villa-Lerma y col., (2015) encontraron que *L. lecanii* produce proteasas durante el cultivo sumergido, las cuales podrían hidrolizar a las quitinasas en etapas posteriores durante su aplicación, por lo que recomiendan eliminarlas mediante purificación parcial del extracto enzimático. Reportaron que las actividades específicas de ambas enzimas quitinolíticas se incrementaron al variar el pH (5-8) y se produjeron menos proteasas, comparado con los cultivos a pH fijo de 6, los tiempos de producción máxima de

proteasas se ven retrasados cuando el pH es variable encontrándose a las 120 h mientras que para el caso de los cultivos a pH fijo el pico de producción se encontró a las 96 h.

Las enzimas con actividad Endo hidrolizan las cadenas de quitina para liberar quitin oligómeros, tales como los dímeros que funcionan como sustrato de las Nhasas. Ramirez-Coutiño y col., (2009) reportan la producción de Endo y Nhasa utilizando a *Verticillium fungicola*, donde el descenso de la enzima Endo se presentó entre las 36 y 72h y su máxima producción fue determinada a las 96 h de cultivo. Adicionalmente, Rojas-Osnaya y col., en 2015 reportan el sinergismo de estas enzimas, ya que se observa que la mayor producción volumétrica de Nhasa (96 h) se obtiene cuando existe un descenso de la actividad Endo.

2.2 Criterios de escalamiento

Banerjee (1993), midió el K_{La} para diferentes niveles de agitación (100-600 rpm), aireación (0.25-1.5 vvm) y concentración de masa celular en un reactor de tanque agitado con un volumen de trabajo de 4.5 L para la producción de rifamicina oxidasa extracelular utilizando el hongo *Curvularia lunata*, encontrando que con 400-500 rpm y 0.75-1 vvm fueron las condiciones con las que se optimizó el proceso de producción enzimática.

Silva y col., (2002) ajustaron la agitación y la aireación en un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, los valores de K_{La} evaluados fueron de 15-230 h^{-1} , alcanzando la máxima productividad enzimática ($31.8 U L^{-1} \cdot h^{-1}$) y celular ($0.69 g L^{-1} \cdot h^{-1}$) en una región óptima de K_{La} con valores de 60-135 h^{-1} . Los autores reportan que ambos eventos están acoplados y dependen del oxígeno disuelto en el sistema.

Liu y col., (2003) reportaron que el pH y la agitación es más significativo sobre la producción de quitinasas de *Verticillium lecanii* (actualmente *L. lecanii*) en un reactor de tanque agitado de 5 L, obtuvieron la máxima actividad a $18.2 mU mL^{-1}$ con 0.6 vvm y 150 rpm. El estudio reveló que la agitación y aireación podrían afectar la concentración de oxígeno disuelto y en consecuencia el crecimiento y producción enzimática del hongo.

Fenice y col., (2012), indican en su estudio sobre los efectos de la agitación y aireación sobre enzimas quitinolíticas producidas por el hongo antártico *Lecanicillium muscarium*, que los mecanismos de síntesis de enzimas quitinolíticas son mucho más sensibles a la velocidad de agitación que el crecimiento celular. El aumento de agitación y aireación condujo a un aumento de K_{La} , siendo la agitación mucho más efectiva que la aireación, el K_{La} medido a la aireación más baja y la agitación más alta fue mucho más alta (54 h^{-1}) que en condiciones opuestas (30 h^{-1}), la actividad enzimática más alta se alcanzó a 1vvm y 300 rpm .

Gómez Sánchez y col., (2012). Modificaron el K_{La} ($120\text{-}300 \text{ rpm}$ y $0\text{-}5 \text{ vvm}$) en un cultivo sumergido de *Aspergillus flavipes* para evaluar la sensibilidad de la producción de exo-polygalacturonase, cambiando la relación entre el tamaño del envase, volumen del medio y la velocidad de agitación, encontrando una fuerte correlación entre la concentración de biomasa, la actividad exo-poligalacturonasa y la cinética del microorganismo con el K_{La} en el sistema. Reportan que la producción de enzimas por fermentación fúngica es estrictamente aerobia, cuando la tasa de transferencia de oxígeno es mayor que la tasa de absorción de oxígeno es posible mejorar la actividad enzimática del microorganismo, por tanto, comprender la influencia de la condición de transferencia de oxígeno en la cinética de producción es de vital importancia para diseñar, optimizar y traducir bioprocesos a escala industrial.

Michelin y col., (2013) Analizaron por medio del K_{La} (en un intervalo de $0.1\text{-}0.5 \text{ vvm}$, 300 y 400 rpm) una fermentación discontinua del hongo *Aspergillus niger* van Tieghem en condiciones similares para un reactor de tanque agitado y un air-lift para optimizar y comparar las actividades de la xilanasas extracelular y la β -xylosidasa; Observaron valores de K_{La} más altos para el reactor de tanque agitado que para el air-lift, especialmente para las tasas de aireación probadas a 400 rpm . Los autores asocian los bajos valores de K_{La} en el air-lift con su diseño compuesto por una agrandada zona superior cuya función principal es la liberación de gas, sin embargo, esto promueve la sedimentación dentro del biorreactor. Observaron los niveles más altos de xilanasas (9000 U L^{-1}) en el reactor de tanque agitado con un valor de K_{La} de 30 h^{-1} , mientras que la producción de β -xylosidasa reportada fue

similar en ambos biorreactores. Sin embargo, cuando comparan la actividad enzimática para el mismo valor de K_{La} (12 h^{-1}), las producciones de xilanasa y β -xylosidasa fueron más altas en el air-lift. Los autores asocian este comportamiento a que la transferencia de oxígeno en un caldo de hongos filamentosos da lugar a fenómenos de interacciones complejas, donde varios factores influyen en la transferencia de oxígeno, como el diseño del biorreactor y el estrés de corte (en el reactor de tanque agitado). El K_{La} es un parámetro importante para comparar un cultivo aeróbico en los biorreactores, ya que estos presentan diferentes configuraciones y K_{La} se ve afectado por el diseño del biorreactor.

3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe un gran interés por investigar a fondo la producción de enzimas, y microorganismos con potencial aplicación industrial. Tal es el caso de las quitinasas debido a su potencial uso biotecnológico y comercial en aplicaciones biomédicas para el tratamiento de la artritis, o en la obtención de oligosacáridos con alto grado de acetilación que presentan actividad antitumoral (Rocha-Pino y col., 2014), antibacterial, así como efectos inmunoestimulantes (Villa-Lerma y col., 2015). Sin embargo, los precios aun no son lo suficientemente bajos para poderlas aplicar a nivel industrial y en el mercado hoy en día solo existe una Nhasa de origen fúngico, la cual pertenece a *Trichoderma viride*.

Se han llevado a cabo estudios en cultivo en medio sólido para la producción de quitinasas de *L. lecanii*, sin embargo, este tipo de cultivo presenta algunos problemas en el control de pH, temperatura, procesos de purificación, así como en escalamiento del proceso (Hölker y col., 2004). La actividad y estabilidad de la preparación enzimática y su coste son los factores más importantes por considerar para las aplicaciones de quitinasas, de ahí la necesidad de estudiar posibles productores e inductores económicos. De manera que es necesario el estudio global de microorganismos seleccionados para la implementación de procesos biosintéticos que permitan la obtención de preparaciones económicamente viables a gran escala que sean eficientes para aplicaciones comerciales. Hasta ahora, ningún proceso, utilizando hongos y / o sus enzimas, se ha estudiado en detalle con vistas a la ampliación industrial. En este contexto, la fijación de las mejores condiciones de bioprosesamiento es muy importante y, en particular, la comprensión del efecto de la agitación y aireación en la producción microbianas se reconoce generalmente como un paso clave obligatorio para la escala hasta el nivel industrial (Fenice y col., 2012).

En este trabajo se utilizó el hongo entomopatógeno *L. lecanii* en cultivo sumergido para el proceso de producción de quitinasas, debido a las ventajas que presenta para facilitar el escalamiento, control de sus parámetros operacionales como pH, temperatura, requerimientos nutricionales, así como la fácil recuperación de sus productos (Villa-Lerma y col., 2015, Demir y col., 2011).

4 HIPÓTESIS

La variación de la agitación y aireación en el cultivo sumergido aumentará la producción quitinolítica de *L. lecanii*. El K_{La} y Re son criterios de escalamiento de un bioproceso para producir enzimas quitinolíticas del hongo *L. lecanii*.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el criterio de escalamiento del cultivo sumergido de *L. lecanii* para aumentar la producción de quitinasas.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar experimentalmente el K_{La} y Re en el sistema.
- Determinar la actividad quitinolítica y productividad del cultivo sumergido.
- Purificar parcialmente las quitinasas presentes en el extracto crudo enzimático.

6 METODOLOGÍA

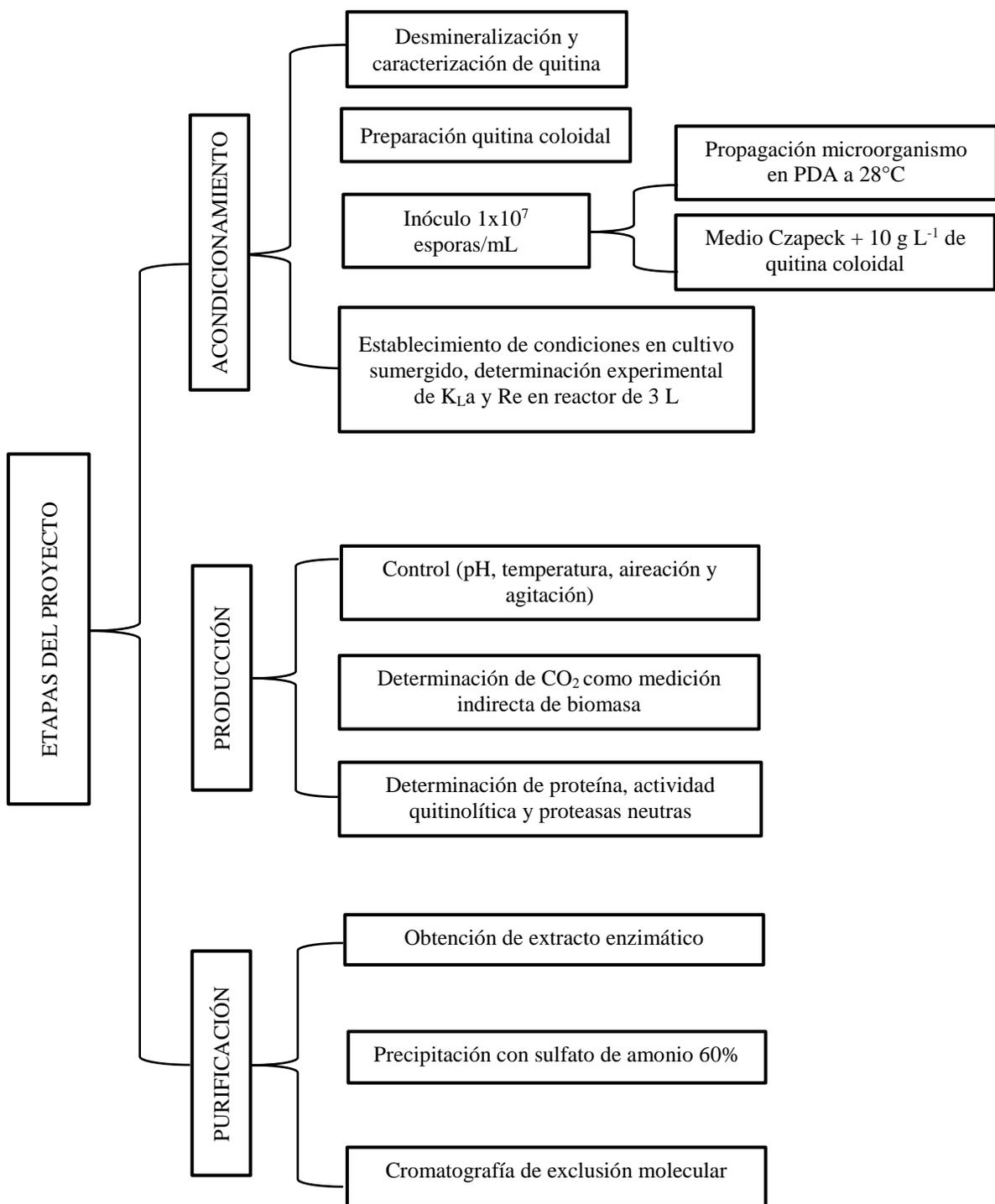


Figura 4 . Esquema del diseño experimental.

6.1 Preparación de quitina coloidal

La quitina se disolvió en HCl concentrado (37%), a 0°C con agitación continua, dentro de una campana de extracción hasta obtener una pasta con consistencia de jarabe, posteriormente se mezcló con agua helada (4 °C) para precipitar la quitina, a continuación, fue centrifugada a 10,000 rpm durante 15 minutos (Sorvall Legend XTR, rotor F14–6x250 LE). La pasta obtenida se neutralizó mediante lavados con agua destilada y NaOH 0.1 M alternados con centrifugación después de cada lavado.

6.2 Microorganismo

L. lecanii ATCC 26854 fue propagado en agar papa dextrosa (PDA) a 4°C. La preparación del inóculo se realizó a partir de la agitación mecánica de los cultivos esporulados en PDA (5 días) con una solución de Tween 80 (0.01% p v⁻¹) con una concentración final de 1x10⁷ esporas mL⁻¹, que fue determinada mediante conteo directo en una cámara de Neubauer, de acuerdo con la ecuación 2.

$$N = nFD \quad (2)$$

Donde N es el número de esporas mL⁻¹ de suspensión inicial, n es el promedio del número de esporas contadas en la cámara, F representa el factor de la cámara empleada (25 x 10⁴) y D es la dilución empleada para el conteo.

6.3 Características del biorreactor utilizado

Para el desarrollo del trabajo se utilizó un biorreactor de 3 L (Applikon BV, Holanda) de tanque agitado, con agitador de dos propelas tipo Rushton, difusor de aire en L y tres baffles desmontables, cuyos parámetros geométricos aparecen en la Tabla 1 y Figura 5.

Tabla 1. Dimensiones del reactor de tanque agitado utilizado para el cultivo sumergido.

Dimensiones		Valor (mm)
Diámetro agitador	D_a	45
Diámetro del tanque	D_t	128
Altura impulsor	E	35
Ancho hoja del impulsor	L	12
Alto hoja del impulsor	W	12
Ancho baffles	J	15
Altura líquido	H	125 (1.6 L)
Altura total	D_h	240

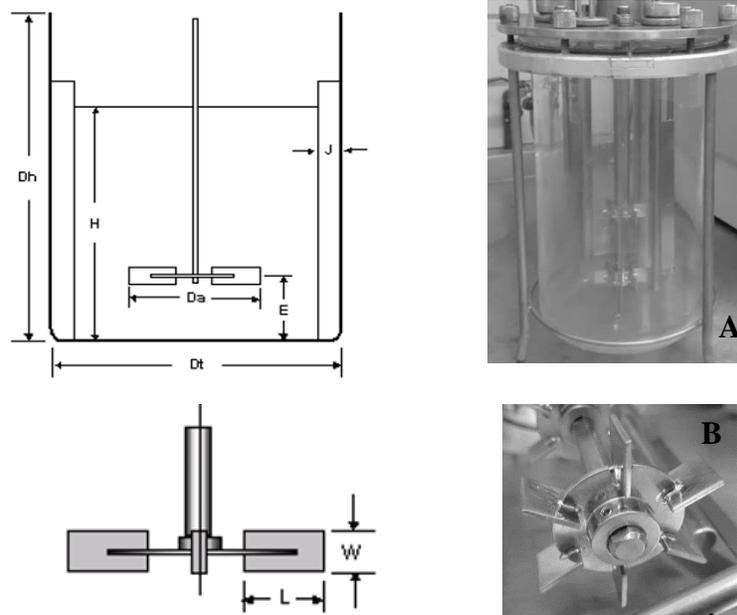


Figura 5 .Características del biorreactor, A: Biorreactor de tanque agitado, jarra de 3L, B: Propela tipo Rushton.

6.4 Cultivo sumergido y condiciones de operación

Se utilizó la suspensión de esporas que sirvió como inóculo (10^7 esporas mL^{-1}) en un biorreactor de 3 L (Applikon BV, Holanda) a $25\text{ }^\circ\text{C}$ durante 120 h, usando medio de Czapeck con la siguiente composición en g/L: NaNO_3 (3.73), K_2HPO_4 (3.0), MgSO_4 (0.5),

FeSO₄ (0.096), KCl (0.5) suplementado con 10 g L⁻¹ de quitina coloidal con 4.8 % (p p⁻¹) de contenido de proteína residual, el pH se mantuvo en 6 durante todo el cultivo. El control de pH se realizó con la ayuda de HCl y NaOH 0.1N y se realizaron muestreos cada 24 horas para la determinación de proteína soluble en los sobrenadantes, actividades Nhasa y Endo, y actividad proteolítica neutra.

6.5 Determinación experimental del K_{LA} y Re

La evaluación de la transferencia de oxígeno se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Raffo-Duran en 2014 para el biorreactor de 3 L, bajo condiciones de agitación y aireación controladas a temperatura constante de 25°C, a un volumen de trabajo de 1.6 L, con medio de cultivo y microorganismo, utilizando como medio de control agua desionizada y medio sin microorganismo. Fue aplicado un diseño factorial completo 3² sin repeticiones y aleatorio, para investigar el efecto de las variables independientes velocidad de agitación y el flujo de aire sobre el K_{LA} y el Re. La matriz puede ser observada en la Tabla 2.

Tabla 2. Matriz de diseño factorial 3² empleado en las determinaciones del K_{LA} y Re.

Tratamiento	Velocidad de Agitación (min ⁻¹)	Flujo de Aire (vvm)
1	100	1
2	100	2
3	100	3
4	200	1
5	200	2
6	200	3
7	400	1
8	400	2
9	400	3

6.6 Determinación del K_{La}

La determinación del K_{La} parte del balance de oxígeno en fase líquida de acuerdo con la ecuación 3:

$$\left(\frac{dC}{dt}\right) = OTR = K_{La}(C^* - C_L) \quad (3)$$

Dónde: OTR representa la tasa de transferencia de oxígeno, $\frac{dC}{dt}$ es el término acumulativo de la ecuación de balance de oxígeno ($\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$), C_L es la concentración de oxígeno en la fase líquida (mmol L^{-1}), C^* es la concentración de oxígeno en la fase líquida en el equilibrio (mmol L^{-1}) y K_{La} es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1}). El porcentaje de saturación del oxígeno empleando aire se representa por la ecuación 4 (Doran 1995):

$$OD = \left(\frac{C_L}{C^*}\right) \cdot 100 \quad (4)$$

De la ecuación 3 tras integrar y reagrupar se obtiene en la ecuación 5:

$$\ln\left(\frac{C^*}{C^* - C_L}\right) = K_{La} t \quad (5)$$

Como el sensor de oxígeno lo que mide es % OD, esta ecuación se coloca en función de dicho parámetro teniendo en cuenta la ecuación 5 se obtiene la ecuación 6:

$$\ln\left[\frac{1}{1 - \left(\frac{OD}{100}\right)}\right] = K_{La} t \quad (6)$$

Donde la ordenada es $\ln \left[\frac{1}{1 - \left(\frac{OD}{100} \right)} \right]$, la abscisa es el tiempo, y la pendiente es K_{La}

ajustando una recta a los datos de $\ln \left[\frac{C^*}{1 - \left(\frac{OD}{100} \right)} \right]$ vs t.

Para determinar experimentalmente K_{La} se empleó el método estático de barrido con nitrógeno y reoxigenación; Antes de cada medición se procedió a eliminar el oxígeno disuelto en el cultivo mediante burbujeo de nitrógeno hasta verificar que la concentración de oxígeno es cero ($C_L = 0$).

Las mediciones fueron realizadas hasta alcanzar un 80% de la concentración de equilibrio en la fase líquida. Para cada tratamiento, se realizó la medición de la velocidad de saturación del medio líquido cada 20 segundos.

Los resultados fueron analizados estadísticamente por medio de una prueba de ANOVA, así como una comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey-Kramer para determinar si hubo o no diferencia significativa entre los tiempos de toma de muestra para los tratamientos. Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico NCSS, 2007.

6.7 Determinación del Re

Se determinó la viscosidad (μ) y densidad (ρ) del medio de cultivo sumergido para cada tratamiento (ver Tabla 2).

La densidad se calculó utilizando la técnica del picnómetro teniendo en cuenta la ecuación 7:

$$\rho = \left[\frac{(m_{\text{picnómetro}} + \text{medio}) - m_{\text{pinómetro}}}{(m_{\text{picnómetro}} + \text{agua}) - m_{\text{picnómetro}}} \right] \cdot \rho_{\text{agua}} \quad (7)$$

La viscosidad se determinó experimentalmente utilizando un viscosímetro Brookfield, posteriormente se procedió a calcular el número de Reynolds para cada tratamiento de acuerdo con la ecuación 8:

$$\text{Re} = \left(\frac{nDi^2\rho}{\mu} \right) \quad (8)$$

$n = \text{velocidad rotacional (min}^{-1}\text{)}$
 $Di = \text{diámetro del impulsor (m)}$
 $\rho = \text{densidad (g/cm}^3\text{)}$
 $\mu = \text{viscosidad (gm /cm s)}$

6.8 Determinación de la actividad Endo

La actividad Endo se determinó empleando como sustrato 0.5 mL de una suspensión de quitina coloidal al 1% (p v⁻¹) en solución amortiguadora de fosfatos 5 mM a pH 6.7. Las muestras y testigos se adicionaron con proporciones iguales de sustrato, la mezcla fue incubada a 30°C por 24 horas bajo agitación a 180 rpm. Al finalizar la reacción, se les añadió 5 mL de agua destilada y se agitaron vigorosamente, para leer su absorbencia a una longitud de onda de 510 nm. La actividad fue calculada como el porcentaje de la reducción en la turbiedad relativa a una suspensión similar que contiene agua en lugar del extracto enzimático. “Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir la turbiedad de una suspensión de quitina en un 5%” (Tronsmo y col., 1996).

6.9 Determinación de la actividad Nhasa

Las determinaciones de actividad Nhasa, se llevaron a cabo utilizando *p*-nitrofenil- β -*N*-acetilglucosamina como sustrato. 200 μ L de extracto enzimático crudo fueron adicionados

a 200 μL de amortiguador de citrato/fosfato 0.2 M pH 5.6 y fueron agregados 200 μL de *p*-nitrofenil- β -*N*-acetilglucosamina (1 mg mL^{-1}). Se incubó a 37 °C por una hora con agitación a 180 rpm. Al término de la incubación fue adicionado 1 mL de NaOH 0.02M y medida la absorbencia a 400 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, EUA).

La concentración de *p*-nitrofenol se determinó utilizando una curva patrón (Anexo 12.1), una vez obtenido el valor de la muestra, esta se expresó como $\mu\text{mol/mL}$ y posteriormente se utilizó la definición: “Una unidad enzimática es la cantidad de enzima que libera 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto” (Tronsmo y Harman, 1993). Se reportó la actividad Nhasa volumétrica como U mL^{-1} de medio de extracto crudo, la específica como U mg^{-1} de proteína.

6.10 Determinación de proteasas neutras

La actividad proteolítica fue determinada mezclando 75 μL del extracto enzimático con 500 μL de sustrato siendo este una suspensión de caseína al 1% (p v^{-1}) en un amortiguador de fosfatos 50mM, pH 7. La mezcla fue incubada por 1 hora a 30°C con agitación de 180 rpm, se adicionó 1mL de ácido tricloroacético al 5% para detener la reacción y se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm, por último, se determinó la absorbencia a 280 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que aumenta 0.001 unidades de absorbencia por minuto al sustrato con respecto a un testigo (Kunitz, 1947).

6.11 Determinación de proteína soluble por el método de Lowry-Peterson

Para la cinética del cultivo sumergido, la determinación de proteína se realizó por el método de Lowry modificado por Peterson (1977), empleando seroalbúmina bovina como proteína estándar (Anexo 12.2). El método consiste en la adición de 1 mL de reactivo de Lowry A a 1 mL de muestra previamente centrifugada (8,000 rpm por 5 minutos), se mezclaron y se incubaron por 10 min a 25°C, posteriormente se añadieron 0.5 mL de reactivo B (Fenol- Folin Ciocalteu en proporción 1:1 con agua desionizada), se agitó e incubó por 30 min a 25°C, se determinó la absorbencia a 750 nm.

6.12 Determinación de proteína soluble por el método de Bradford

La determinación de proteína durante la purificación se realizó de acuerdo con la metodología descrita (Bio-Rad, Protein Assay, bulletin 9004), que se basa en el trabajo reportado por Bradford, (1976), empleando el microensayo, para lo cual 160 μL de muestra se mezclaron con 40 μL del reactivo de Bradford concentrado (Bio-Rad, número de catálogo 500-0006), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbencia a 595 nm. La concentración de proteína se obtuvo mediante una curva patrón utilizando seroalbúmina bovina como estándar (Anexo 12.3).

6.13 Purificación parcial

Las proteínas en el extracto crudo enzimático se precipitaron con la adición de sulfato de amonio, adicionando lo suficiente de la sal para llevar el extracto al 60% de saturación, se dejó toda la noche equilibrándose a 4 °C, posteriormente el extracto se centrifugó a 10,000 rpm durante 45 min (Sorvall Legend XTR, rotor F14–6x250 LE), la fracción precipitada se solubilizó en amortiguador 0.05M Tris-HCl, 0.15 M NaCl pH 7.8.

6.14 Cromatografía de exclusión molecular

La fracción precipitada con sulfato de amonio se inyectó en una columna de exclusión molecular Hi-Prep 26/60 Sephacryl S-100 HR (GE Healthcare, EUA), la elución se llevó a cabo aplicando un flujo isocrático de solución amortiguadora de 0.05M Tris-HCl- 0.15 M NaCl pH 7.8, a un flujo de 1.3 mL min⁻¹. El fraccionamiento fue realizado en un equipo FPLC (ÄKTA Pure - GE).

6.15 Microscopía electrónica de barrido

Se obtuvieron muestras del cultivo sumergido a las 120 h para los tratamientos 1,2,4,5 y 9, se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 min (Sorvall Legend XTR, rotor F14–6x250 LE), la biomasa obtenida se preparó por inmersión en glutaraldehído al 5% (v v⁻¹) a 4 °C durante 24 h y se trataron posteriormente con OsO₄ al 1% (v v⁻¹) durante 2 h. Posteriormente, las

muestras se deshidrataron en una serie graduada de alcohol, fueron secadas con CO₂ y se cubrieron con carbón y oro para ser examinadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un JEOL JSM-5900 LV (Japón).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización químico proximal de quitina cruda utilizada para la producción quitinolítica de *L. lecanii* en el cultivo sumergido

Se corrió un primer experimento utilizando quitina cruda no desmineralizada que fue obtenida mediante fermentación láctica de un lote de 250 kg de desperdicio de camarón (PP-2), utilizando el tratamiento 1 (100 rpm de agitación y 1vvm de aireación), el propósito de dicho experimento fue probar si había producción enzimática utilizando la quitina sin desmineralizar, como se muestra en la Tabla 3 no se obtuvo actividad enzimática por lo que se procedió a realizar una desmineralización de la quitina cruda para que el hongo tuviera a mayor disponibilidad el sustrato. En la Tabla 3 se muestran también los resultados del químico proximal de la quitina cruda utilizada.

Tabla 3. Caracterización químico proximal de quitina cruda y actividad Nhasa.

MUESTRA PP-2	CENIZAS (%)	HUMEDAD (%)	GRASAS (%)	PROTEÍNA RESIDUAL (%)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA Nhasa (U mg ⁻¹ Proteína)
Sin desmineralizar	16.4±0.27	8.1±0.25	2.17±0.06	11.7± 0.76	0
Desmineralizada	0.74±0.18	4.3±0.25	1.0±0.05	4.8±1.47	0.54±0.0195

Se realizaron ensayos con la quitina antes de ser desmineralizada y no se observó actividad quitinolítica, esto pudo ser debido a que el hongo no tenía disponible el sustrato por el alto contenido de minerales (16.4%), el hecho de que no se detecte actividad quitinolítica antes de que la quitina fuera desmineralizada puede ser debido a la poca biodisponibilidad que existía de la cadena de quitina para ser escindida internamente por las enzimas con actividad Endo que hidrolizan la cadena de quitina para liberar quitin oligómeros, tales como los dímeros que funcionan como sustrato de las Nhasas. Al desmineralizar la quitina se disminuyó significativamente el porcentaje de cenizas con lo cual se eliminaron minerales presentes en la quitina cruda, esto podría incrementar la biodisponibilidad de esta para la actividad quitinolítica. Después de desmineralizar la quitina, se obtuvo una actividad Nhasa de 0.54 ±0.0195 U mg⁻¹ proteína (Figura 6), sin embargo, en el proceso de

desmineralización se perdió más de la mitad de la proteína residual inicial (11.7%) presente en la quitina cruda quedando 4.8%, se ha reportado la influencia de la concentración de proteína residual en la quitina sobre la producción de enzimas quitinolíticas en cultivo sumergido; Rojas-Osnaya (2015) reporta que el contenido de proteína residual en quitina cruda fue significativo para la producción de las enzimas quitinolíticas en cultivo sumergido, el autor utilizó quitinas con tres porcentajes diferentes de proteína residual, 6, 10 y 14%, obteniendo la mayor producción de Nhasa de $0.11 \pm 0.140 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína al utilizar la quitina con 10% , mientras que con 14% fue de $0.027 \pm 0.0013 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína y con 6% no se detectó actividad a las 144 h de cultivo. Carrasco-Navarro (2011) reportaron actividades de Nhasa de 0.25 U/mg de proteína. Por su parte Villa-Lerma y col., (2013), estudiaron la producción de Nhasa en condiciones similares de agitación (102 rpm) y de temperatura (25 °C), con resultados de 0.61 U mg^{-1} de proteína. Este aumento significativo en la actividad Nhasa fue explicado a los cambios de pH realizados durante el cultivo.

En este trabajo con un menor porcentaje de proteína residual en la quitina (4.8%) que lo reportado anteriormente, se obtuvo una mayor actividad específica Nhasa ($0.54 \pm 0.0195 \text{ U mg}^{-1}$ proteína).

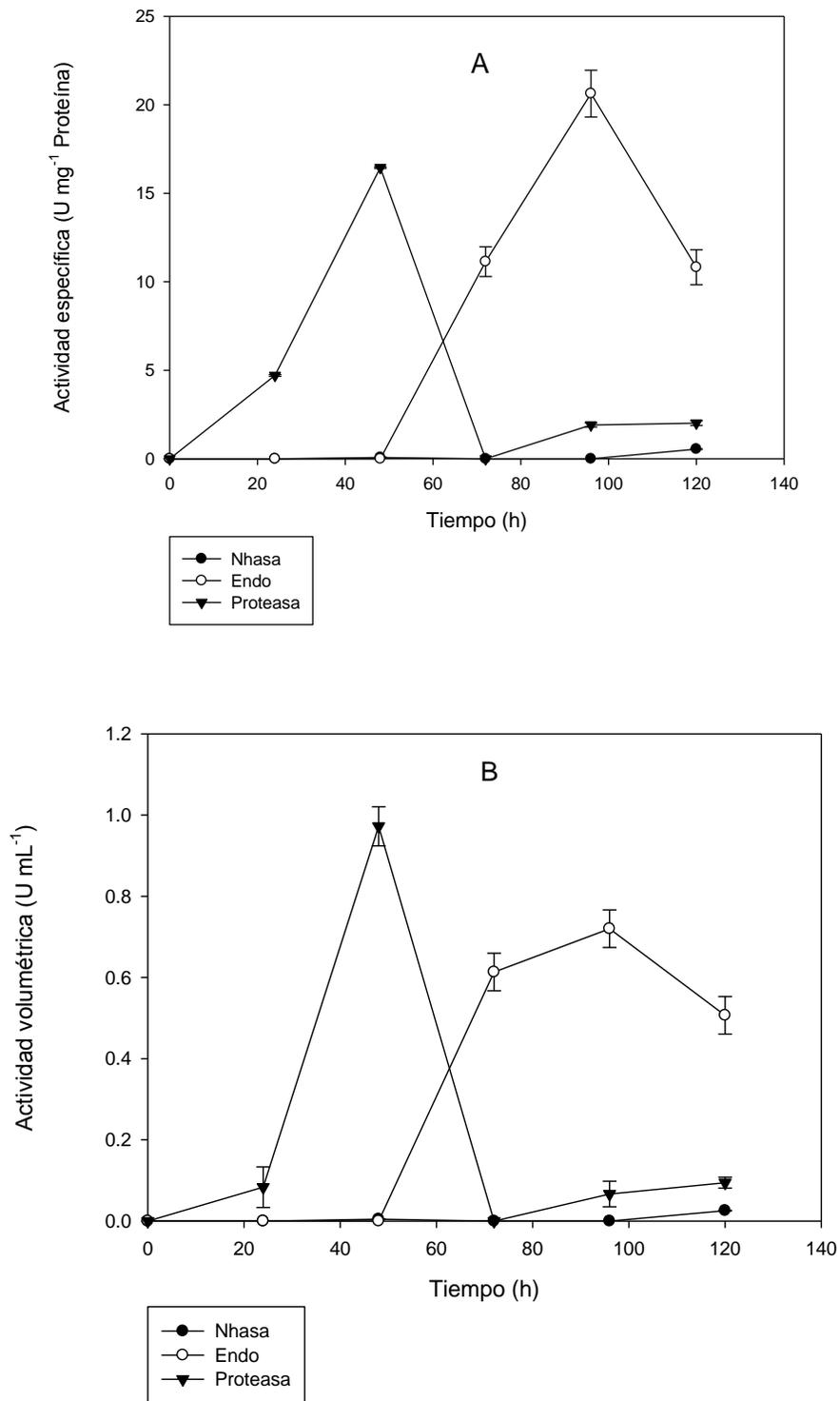


Figura 6. A: Actividad específica del cultivo T1, B: Actividad volumétrica del cultivo T1.

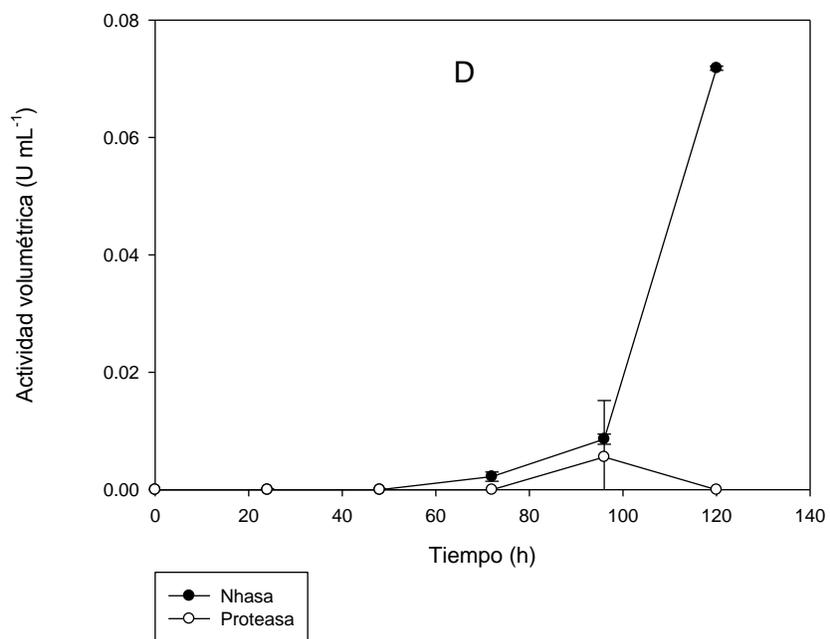
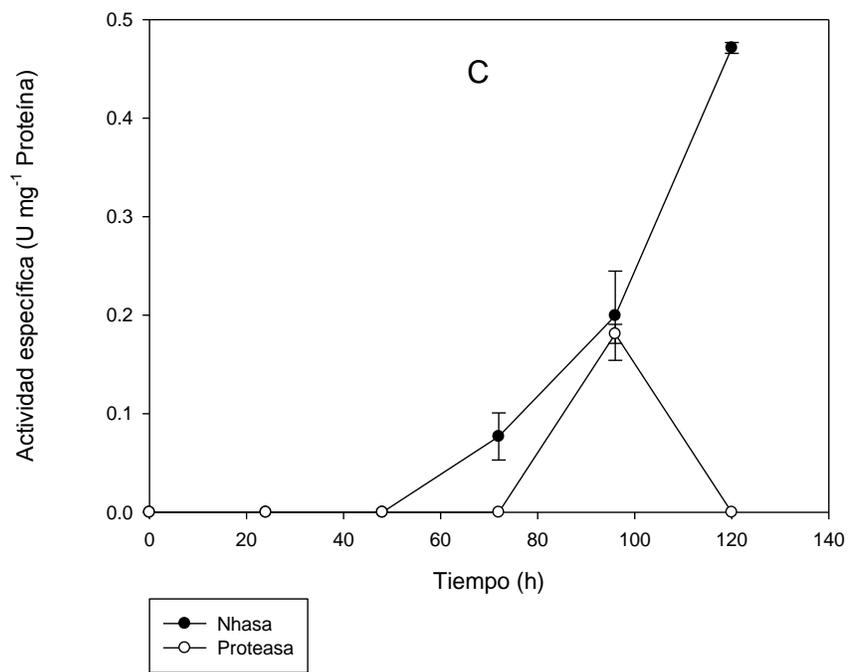


Figura 7. C: Actividad específica del cultivo T2, D: Actividad volumétrica del cultivo T2.

7.2 Actividad Nhasa en el cultivo sumergido de *L. lecanii* para los diferentes tratamientos empleando quitina coloidal con 4.8% de proteína

La máxima actividad específica Nhasa para los diferentes tratamientos se alcanzó a las 120 h del cultivo, el tratamiento 1 con 100 rpm y 1vvm presento actividad Nhasa, Endo y proteasa como se puede observar en la Figura 6, el tratamiento 2 presentó actividad Nhasa y proteasa como se observa en la Figura 7, y los tratamientos 3,4,5,7 y 8 únicamente presentaron actividad Nhasa como se puede ver en la Figura 8 que muestra la actividad específica y la Figura 9 que reporta la actividad volumétrica. En el gráfico de la figura 6 se observa que la actividad enzimática Endo aumenta al disminuir la actividad proteasa, alcanzando un máximo de actividad a las 96 h, posterior a ello la actividad Nhasa aumenta hasta las 120 h de cultivo cuando disminuye la actividad Endo. El tratamiento 9 no presentó ningún tipo de actividad. El tratamiento 1 fue con el que se obtuvo la máxima actividad Nhasa con un valor de 0.54 ± 0.0195 U mg^{-1} proteína (ver Tabla 4).

El comportamiento que describe la actividad enzimática del cultivo en el tratamiento 1 puede deberse al sinergismo que existe entre la producción de Nhasas y Endo, ya que está reportado que esta aumenta al disminuir la actividad Endo, se observa un máximo de producción endo a las 96 h con una actividad específica de 22 U mg^{-1} de proteína y es después de este tiempo, a las 120 h cuando comienza a aumentar la actividad Nhasa. Ramirez-Coutiño y col., (2009) reportan la producción de Endo y Nhasa utilizando a *Verticillium fungicola*, donde el descenso de la enzima Endo se presentó entre las 36 y 72h y su máxima producción fue determinada a las 96 h de cultivo. Por otra parte, se observa que de las 0 a las 48 h prácticamente no hay actividad quitinolítica pero si actividad proteolítica neutra (ver Figura 6), esto podría ser debido a que para la producción de proteasas neutras el hongo utiliza la proteína residual presente en el medio y cuando esta se agota comienza el metabolismo de producción de quitinasas aprovechando el nitrógeno presente en el medio de cultivo, se cree que la actividad proteolítica neutra podría estar degradando a las enzimas quitinolíticas de acuerdo con lo reportado por Villa-Lerma y col., (2015).

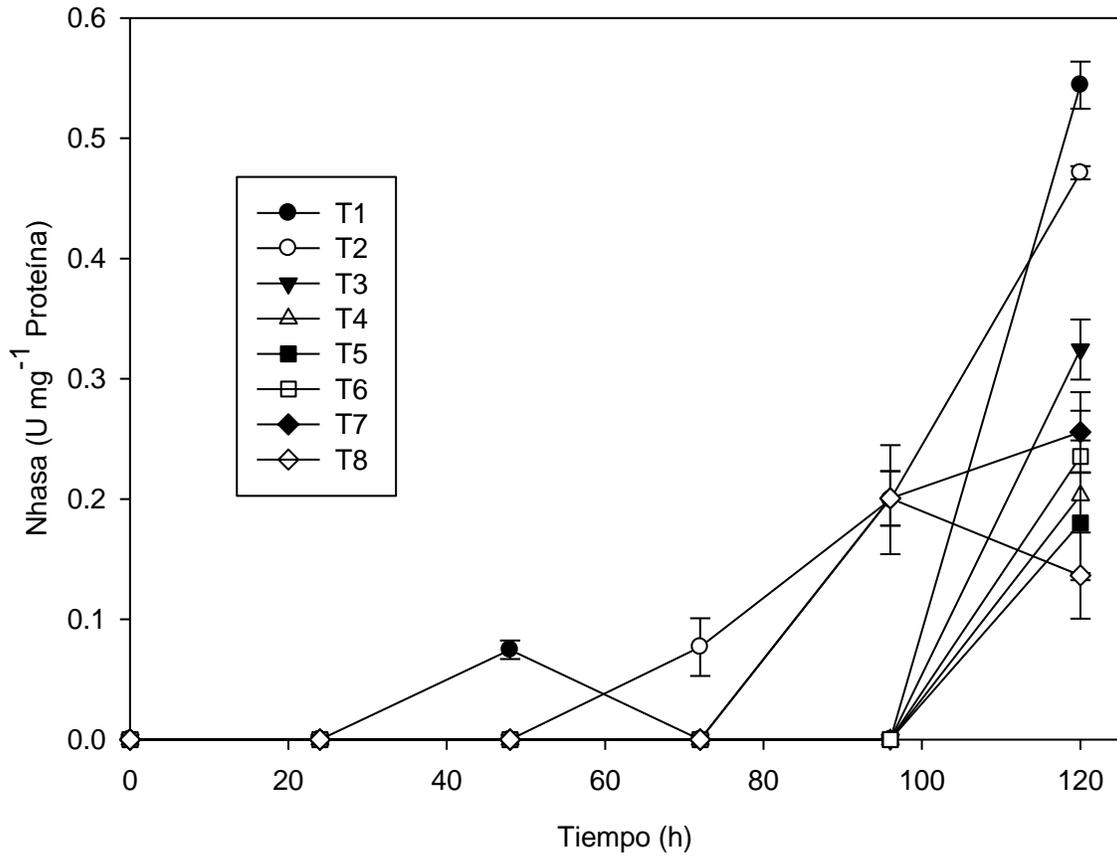


Figura 8. Actividad específica Nhasa en los tratamientos con variación en el nivel de agitación y aireación durante las 120 h del cultivo sumergido.

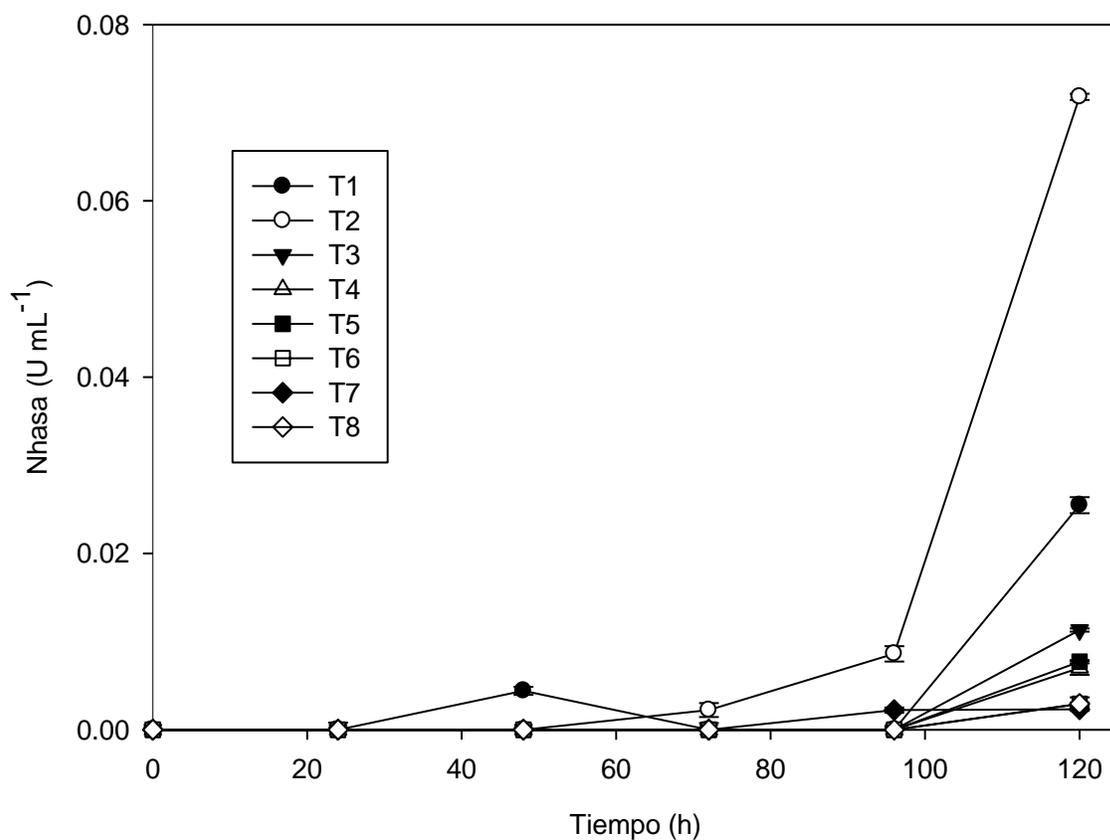


Figura 9. Actividad volumétrica Nhasa en los tratamientos con variación en el nivel de agitación y aireación durante las 120 h del cultivo sumergido.

Tabla 4. Actividad Nhasa de los tratamientos a las 120 h del cultivo.

Tratamiento	rpm	vvm	Actividad específica Nhasa (U mg ⁻¹ proteína)	Actividad volumétrica Nhasa (U mL ⁻¹)
1	100	1	0.54±0.0195	0.025±0.001
2	100	2	0.47±0.0055	0.072±0.0003
3	100	3	0.32±0.024	0.011±0.0002
4	200	1	0.2±0.07	0.007±0.0008
5	200	2	0.18±0.04	0.008±0.0002
6	200	3	0.23±0.013	0.003±0.0002
7	400	1	0.26±0.033	0.0023±0.0002
8	400	2	0.14±0.035	0.003±0.0005
9	400	3	0	0

7.3 Medición del oxígeno disuelto en el cultivo sumergido para determinación experimental de K_{La}

Con el objetivo de conocer si existe diferencia significativa de realizar la medición de OD en cada tiempo del cultivo, se analizaron los resultados de OD del tratamiento 1 y el tratamiento 2 cuando se alcanza el máximo de saturación de OD para los diferentes tiempos de toma de muestra (0, 24, 48, 72, 96 y 120 h). Se corrió un ANOVA de un solo factor, en dónde la variable de respuesta fue el OD y el factor fue el tiempo. El análisis estadístico se realizó con el programa NCSS, 2007 (Anexo 12.5).

El resultado de ANOVA arroja que con un valor de significancia <0.0001 , mucho menor que 0.05 rechazamos la hipótesis nula, osea que sí existe diferencia significativa de realizar la medición de OD en al menos uno de los tiempos del cultivo para este tratamiento. Por lo cual se decidió realizar una prueba post hoc, que es una prueba de comparación múltiple para determinar que medias difieren entre los tiempos de toma de muestra; se corrió la prueba de Tukey-Kramer y se muestran los resultados de esta prueba en el gráfico de la Figura 10, en el cual se puede observar que los únicos tiempos que no difieren entre ellos son 24 y 48. Por lo que se presenta en el gráfico de la Figura 11 el oxígeno disuelto medido a cada tiempo para el tratamiento 1.

Para el tratamiento 2 el resultado de ANOVA (Anexo 12.5) arroja que con un valor de significancia de 0.32 mucho mayor que 0.05 aceptamos la hipótesis nula de que no existe diferencia significativa de realizar la medición de OD en los diferentes tiempos del cultivo. Por lo que se decidió realizar las mediciones de OD a las 120 h del cultivo sumergido para los posteriores tratamientos. En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos de OD para los diferentes tratamientos a las 120 h del cultivo y se compara con el T1 que tiene un comportamiento más lento para alcanzar la saturación de oxígeno que los demás tratamientos.

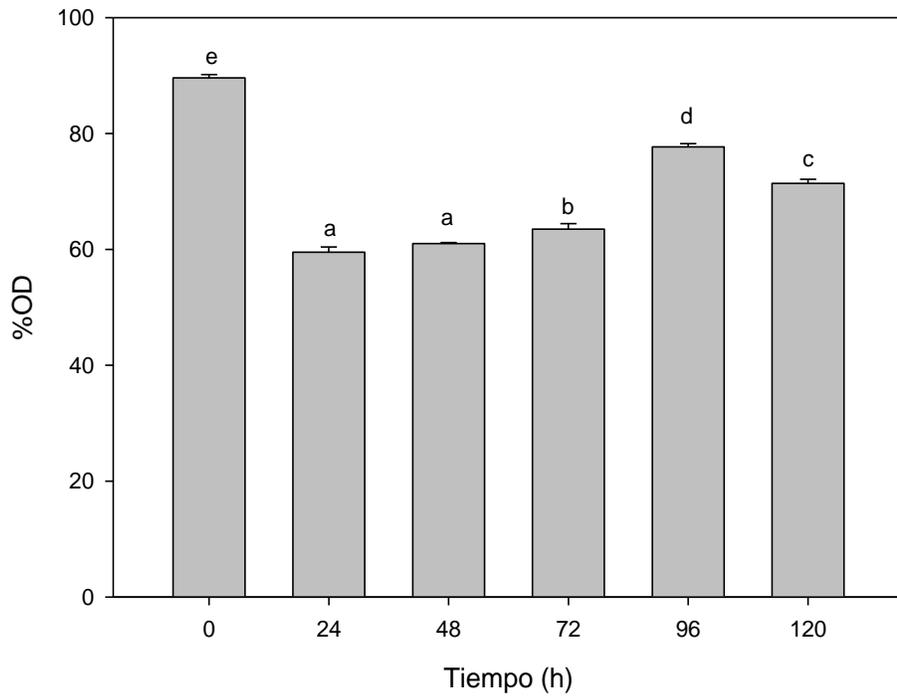


Figura 10. Efecto de realizar la medición de %OD en los diferentes tiempos del T1 (100rpm y 1vvm). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.

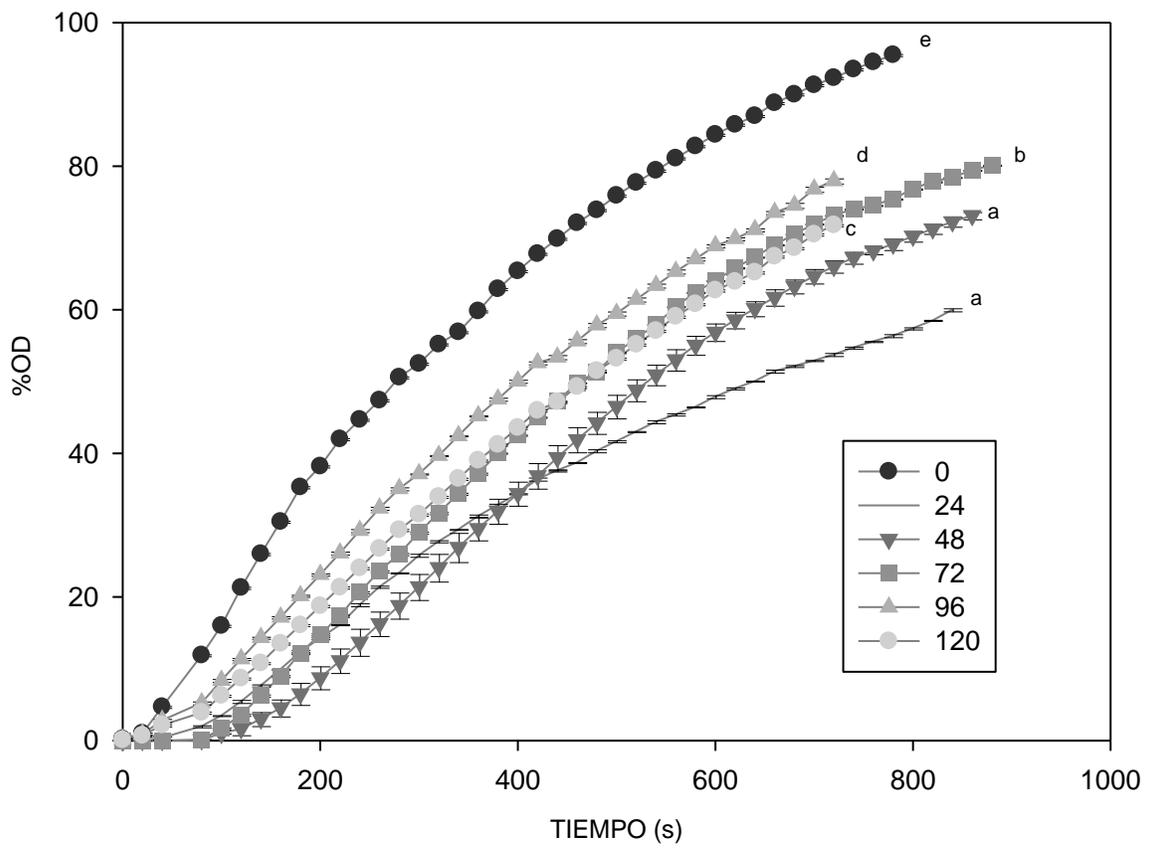


Figura 11. Oxígeno disuelto medido durante el cultivo sumergido en los diferentes tiempos para el tratamiento 1 (100 rpm y 1vvm). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.

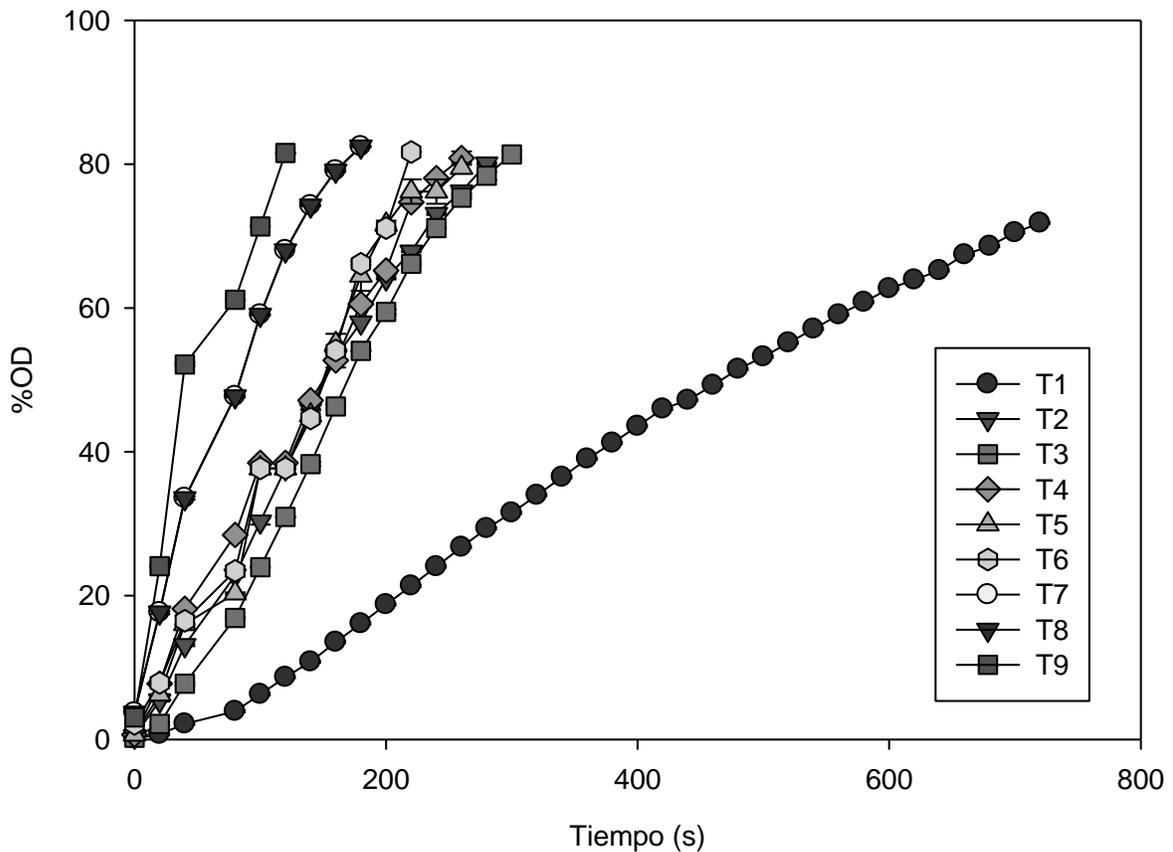


Figura 12. Oxígeno disuelto medido en el cultivo sumergido a las 120 h para los diferentes tratamientos.

Se observa en el gráfico de la Figura 12 el comportamiento del oxígeno disuelto durante el cultivo, conforme fueron aumentando la agitación y aireación el tiempo en el que se alcanzó el 80% de saturación fue disminuyendo, por ejemplo, en el tratamiento 1 con 100 rpm y 1vvm se alcanza este valor de saturación a los 700 s y en el tratamiento 8 con 400 rpm y 2 vvm se alcanza este valor alrededor de los 200 s, esto es debido a que el oxígeno se distribuye de mejor manera en el sistema al aumentar el número de agitación y aireación. De las curvas que se muestran en el gráfico de la Figura 12, se obtuvo de acuerdo con la metodología (Raffo-Duran, 2014) las pendientes correspondientes al K_{La} de cada tratamiento, los parámetros se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. K_{La} en los tratamientos a las 120 h de cultivo.

Tratamiento	Agitación (rpm)	Aireación (vvm)	K_{La} (h^{-1})
1	100	1	5.8±0.25
2	100	2	20.7±0.25
3	100	3	20.7±1.8
4	200	1	23.94±0.25
5	200	2	25.74±0.8
6	200	3	33.3±1.3
7	400	1	32.04±1.01
8	400	2	39.6±0.5
9	400	3	64.08±0.5

Se observa que el aumento de agitación y aireación condujo a un aumento de K_{La} , 64.08 h^{-1} ±0.5 el máximo valor alcanzado, siendo la condición más efectiva con 400 rpm y 3 vvm en el tratamiento 9 para mejorar la transferencia de oxígeno en el sistema, pero no para favorecer la producción de Nhasas, esto se demuestra y discute en el texto más adelante.

7.4 Determinación del número de Reynolds en el cultivo sumergido.

Un factor que influye en la transferencia de oxígeno y tiene una gran importancia en la productividad de un proceso de fermentación es la viscosidad del cultivo, esto es una consecuencia de la concentración de biomasa y morfología celular, que causa cambios en las características del cultivo y afecta las propiedades hidrodinámicas del biorreactor, incluyendo actuaciones de mezcla y transferencia de masa (Michelin 2013). La viscosidad del caldo de cultivo se midió durante las 120 h en los diferentes tratamientos, detectándose que ésta prácticamente no varía en el sistema, como puede verse en la Tabla 6; de acuerdo con el Re calculado a partir de estas viscosidades el tipo de fluido que comporta el cultivo

sumergido es newtoniano con un valor de viscosidad relativa promedio de $5 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a una temperatura constante de 25° C y régimen laminar en un intervalo de Re de 38-152. Se sabe que el crecimiento de hongos en forma de pellets proporciona una buena transferencia de masa y oxígeno, minimiza los efectos adversos en el rendimiento del reactor, y no aumenta la viscosidad en el reactor, en general, el aumento de la viscosidad del medio se evidencia más en el crecimiento filamentoso que el crecimiento en forma de pellets (Michelin 2013).

Tabla 6. Re y viscosidad en los tratamientos a las 120 h del cultivo.

Tratamiento	Agitación (rpm)	Aireación (vvm)	Viscosidad ($\text{g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Re
1	100	1	$5.35 \times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-5}$	38.1 ± 0.96
2	100	2	$5.35 \times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-5}$	38.06 ± 0.5
3	100	3	$5.2 \times 10^{-3} \pm 2.6 \times 10^{-4}$	39.23 ± 2
4	200	1	$5.3 \times 10^{-3} \pm 5.7 \times 10^{-5}$	76.36 ± 0.82
5	200	2	$5.43 \times 10^{-3} \pm 5.8 \times 10^{-5}$	74.96 ± 0.80
6	200	3	$5.27 \times 10^{-3} \pm 5.8 \times 10^{-5}$	77.33 ± 0.85
7	400	1	$5.43 \times 10^{-3} \pm 5.8 \times 10^{-5}$	152.41 ± 9.7
8	400	2	$5.3 \times 10^{-3} \pm 0$	153.83 ± 4.85
9	400	3	$5.3 \times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-5}$	152.25 ± 2.01

7.5 Determinación del criterio de escalamiento, curvas de productividad con K_{La} y número de Reynolds en el cultivo sumergido.

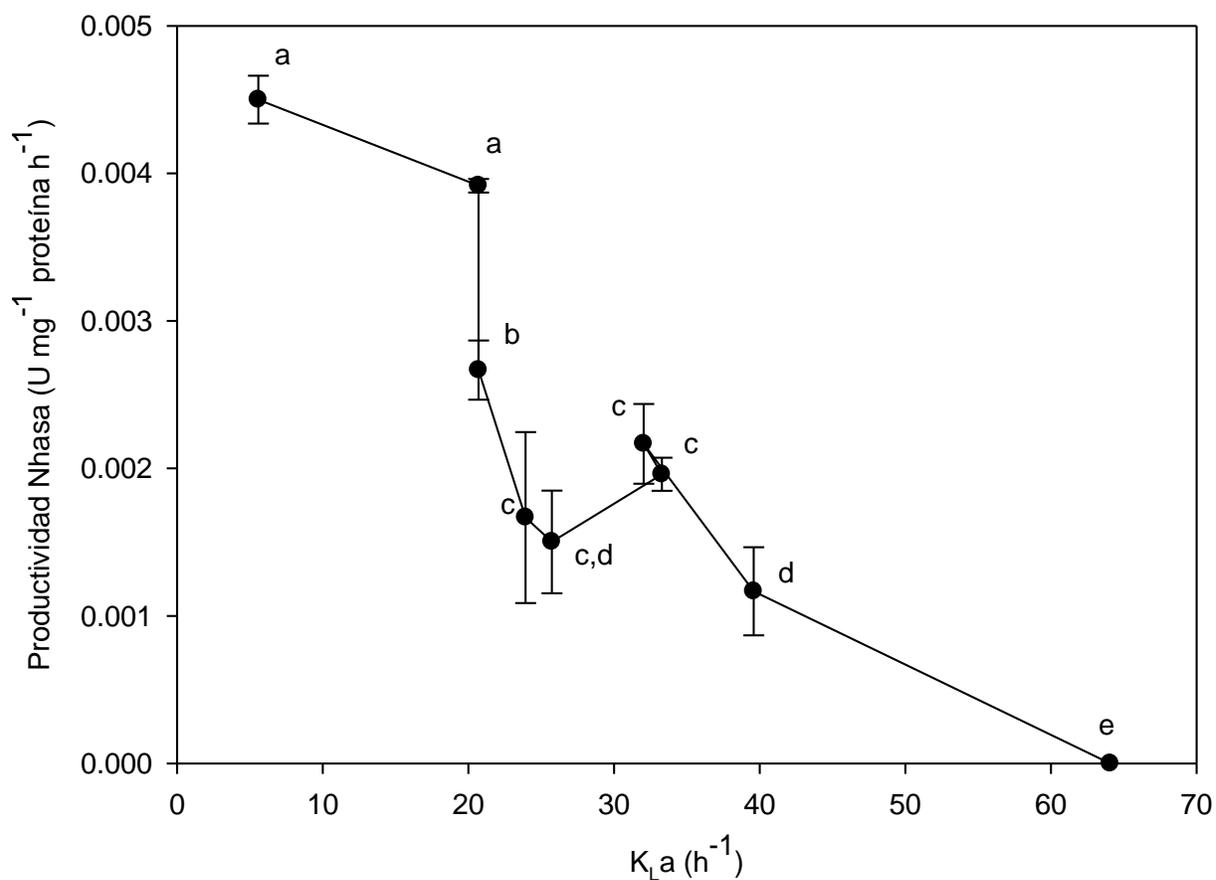


Figura 13. Curva de productividad Nhasa con K_{La} . Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.

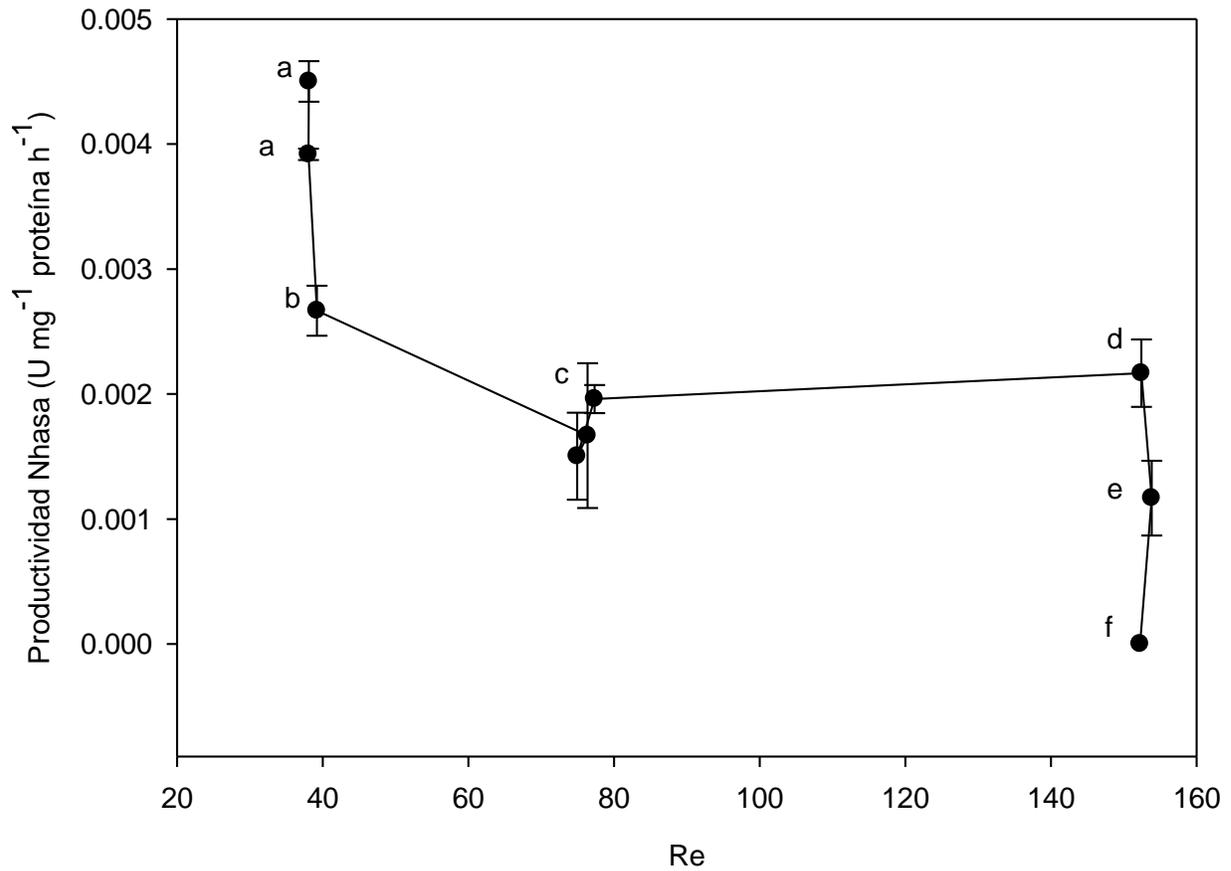


Figura 14. Curva de productividad Nhasa con número de Re. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.

Tabla 7. Productividad Nhasa en los tratamientos con K_{La} y Re.

Agitación (rpm)	Aireación (vvm)	K_{La} (h ⁻¹)	Re	Productividad (U mg ⁻¹ proteína h ⁻¹)	Actividad específica Nhasa (U mg ⁻¹ proteína)	Actividad volumétrica Nhasa (U mL ⁻¹)
100	1	5.58±0.25	38.1±0.96	0.0045±1.6 ×10 ⁻³	0.54±0.0195	0.025±9.15 ×10 ⁻⁴
100	2	20.7±0.25	38.06±0.5	0.004± 4.6 ×10 ⁻³	0.47±0.0055	0.072±3.46 ×10 ⁻⁴
100	3	20.7±1.8	39.23±2.05	0.0027±2 ×10 ⁻³	0.32±0.024	0.011±1.73 ×10 ⁻⁴
200	1	23.94±0.25	76.36±0.82	0.0017±5.8 ×10 ⁻⁴	0.2±0.07	0.007±0.0008
200	2	25.74±0.8	74.96±0.80	0.0015±3.4 ×10 ⁻⁴	0.18±0.04	0.008±0.0002
200	3	33.3±1.3	77.33±0.85	0.0020±1.1 ×10 ⁻⁴	0.23±0.013	0.003±0.0002
400	1	32.04±1.01	152.41±9.7	0.0021±2.7 ×10 ⁻⁴	0.26±0.033	0.0023±1.73 ×10 ⁻⁴
400	2	39.6±0.5	153.83±4.85	0.0011±3 ×10 ⁻³	0.14±0.035	0.003±7.73 ×10 ⁻⁴
400	3	64.08±0.5	152.25±2.01	0	0	0

En la Figura 13 y Tabla 7 se muestran los resultados de productividad con los diferentes tratamientos al aumentar el K_{La} , se observa que al aumentar el nivel de agitación y aireación más allá de 100 rpm y 3vvm, no se mejora la productividad, al contrario, ésta va disminuyendo, obteniéndose la máxima actividad Nhasa específica y volumétrica de $0.54 \pm 0.02 \text{ U mg}^{-1}$ proteína y $0.025 \pm 9.15\text{E-}04 \text{ U mL}^{-1}$ respectivamente, con 100 rpm y 1 vvm. Liu y col., en 2003 reportaron que las quitinasas producidas por *V. lecanii* en un reactor de tanque agitado 5 L, se obtuvo la máxima actividad quitinolítica de 0.018 U mL^{-1} con 0.6 vvm y 150 rpm. El estudio reveló que la agitación y aireación podrían afectar el oxígeno disuelto en el cultivo y la producción. En este trabajo se obtuvo una mayor actividad quitinolítica que el reportado por Liu bajo condiciones de trabajo similares.

Por otra parte, Fenice y col., en 2012 reportan que en quitinasas producidas por *L. muscarium* en un reactor de tanque agitado de 2 L, el aumento de agitación y aireación condujo a un aumento de K_{La} (54 h^{-1}), siendo la agitación más efectiva, con 1vvm y 300 rpm se alcanzó la máxima actividad quitinolítica de $0.38 \pm 0.008 \text{ U L}^{-1}$. En nuestro caso bajo condiciones similares de 1vvm y 400 rpm se alcanza una actividad Nhasa específica de $0.26 \pm 0.033 \text{ U mg}^{-1}$ proteína y volumétrica de $0.0023 \pm 1.73\text{E-}04 \text{ U mL}^{-1}$, aumentando la agitación y aireación más allá de estas condiciones si se mejora el K_{La} , pero no así la actividad quitinolítica.

En la Figura 14 se muestra la curva de productividad obtenida con los diferentes tratamientos y Re , se observa que la productividad cambia con un Re constante, por lo que este no es el criterio más relevante para realizar un escalamiento en este tipo de cultivo.

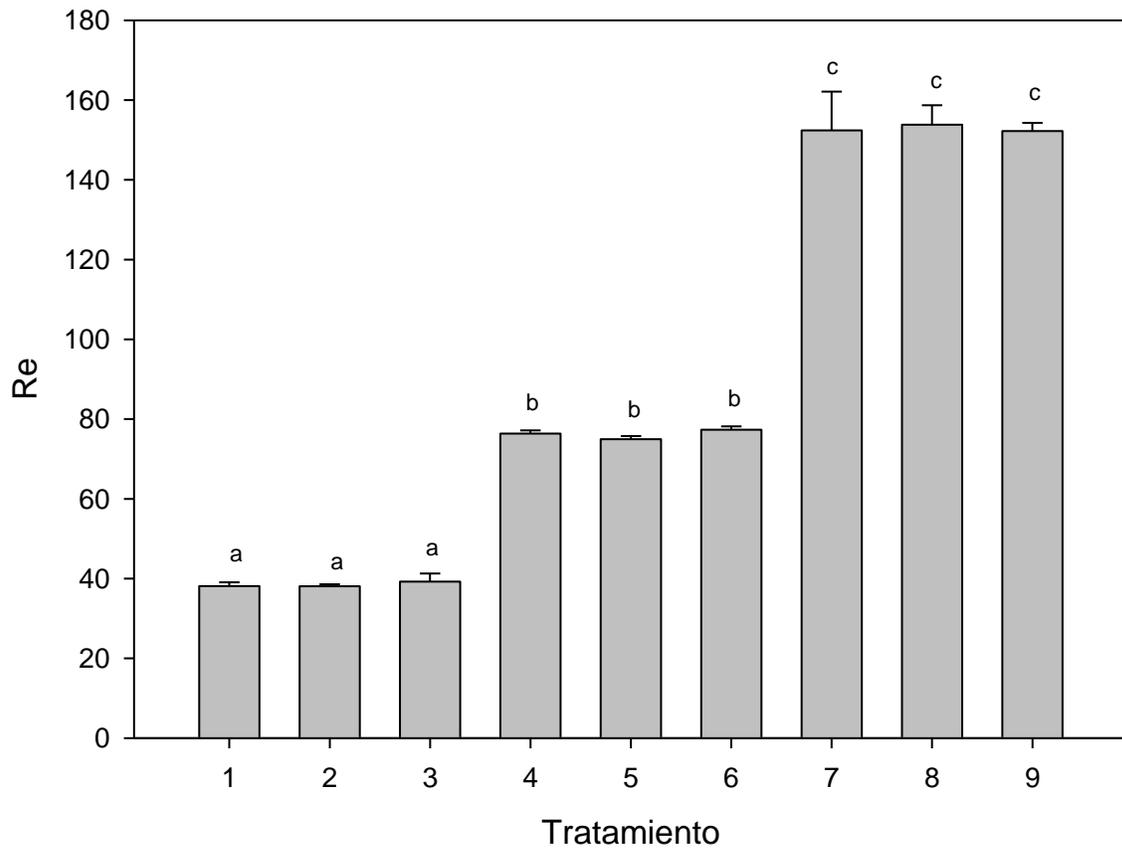


Figura 15. Efecto del nivel de agitación y aireación sobre el Re en el cultivo sumergido. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.

En la Figura 15 se puede observar que no existe diferencia significativa en el número de Re cuando se mantiene el mismo nivel de agitación en el tratamiento, este fenómeno es debido a que la viscosidad se mantiene constante en el cultivo.

7.6 Efecto de la combinación agitación-aireación sobre el criterio de escalamiento K_{La}

Con el objetivo de conocer el efecto de las variables independientes velocidad de agitación y el flujo de aire, así como la interacción entre ellas, es decir el efecto de los tratamientos sobre el K_{La} , fue realizado un ANOVA factorial mediante el programa NCSS, 2007 (Anexo 12.6). Tanto para los factores agitación y aireación como para la interacción de estos en el tratamiento con valores de significancia <0.0001 , menores a 0.05 podemos rechazar la hipótesis nula, o sea que sí existe diferencia significativa en el K_{La} debido a la agitación, la aireación y el tratamiento como puede observarse en la Figura 16, siendo igual de significativas ambas variables sobre el tratamiento.

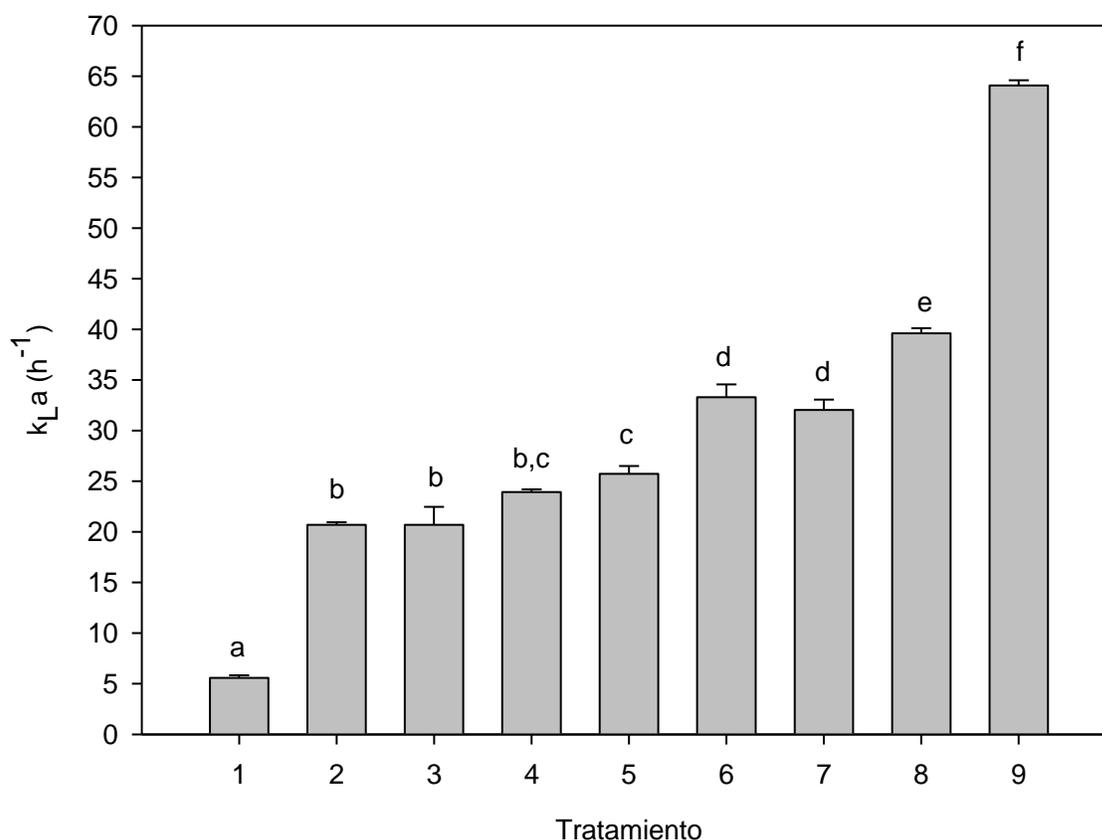


Figura 16. Efecto del nivel de agitación y aireación sobre el K_{La} en el cultivo sumergido. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.

7.7 CO₂ como medición indirecta de biomasa

Se realizó la medición de CO₂ en el cultivo sumergido para los diferentes tratamientos utilizando como fuente de carbono la quitina coloidal con 4.8% de proteína residual hasta las 120 h del cultivo y a partir de estos resultados y la curva de correlación de CO₂ con biomasa se realizó la medición indirecta de la biomasa presente en cada tratamiento (ver Anexo 12.4 en dónde se describe el experimento que anteriormente se realizó con el grupo de trabajo para poder obtener esta cinética).

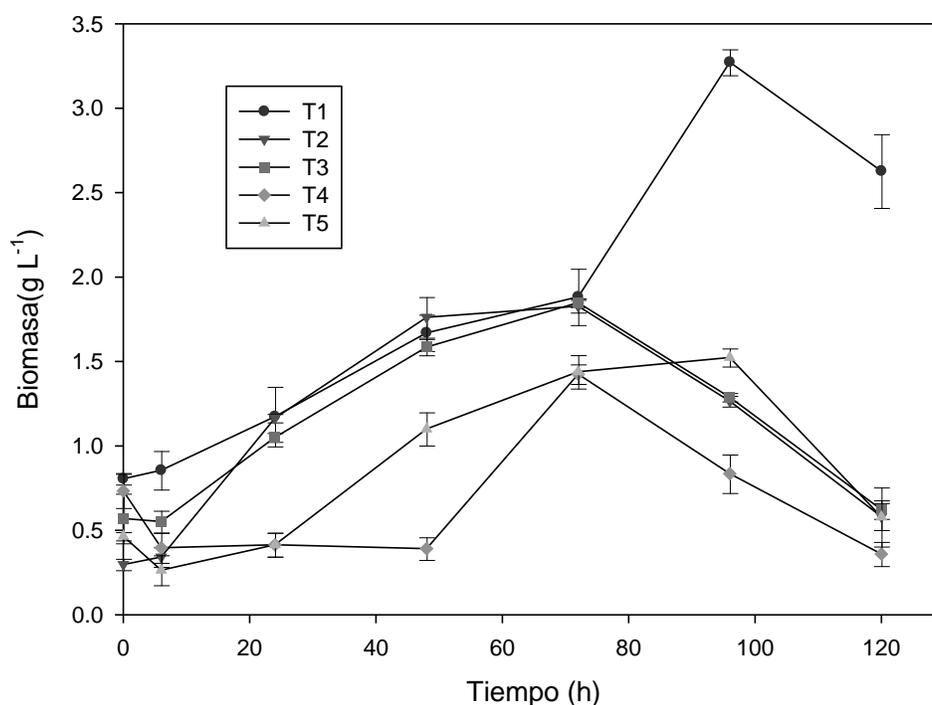


Figura 17. Cinética de crecimiento de *L. lecanii* en los diferentes tratamientos a lo largo del cultivo.

La máxima biomasa se alcanzó con el T1(100rpm y 1vvm) a las 120 h de cultivo sumergido con un valor de $3.27 \pm 0.08 \text{ g L}^{-1}$ como se muestra en la Figura 17.

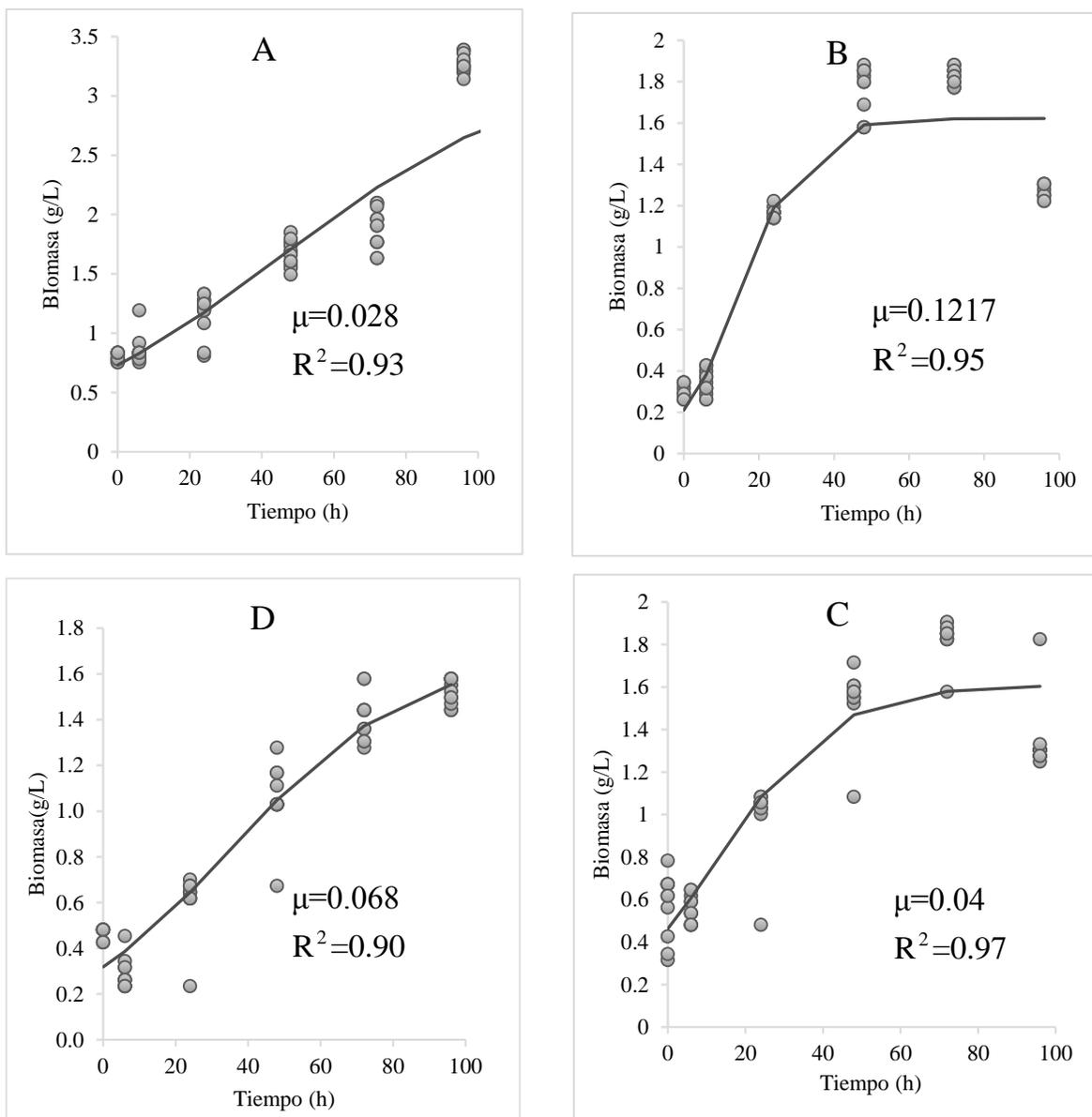


Figura 18. Cinéticas de crecimiento de *L. lecanii*. Resultados de biomasa ajustados a modelo logístico: A) T1, B) T2, C) T3 y D) T5.

Los resultados de biomasa fueron ajustados mediante el método logístico Velhursts-Pearl aplicado por Aguilar-Zarate y col. (2014) para la estimación de crecimiento microbiano, se muestran en la Figura 18. La tasa máxima de crecimiento (μ) fue calculada en los tratamientos, obteniéndose valores de 0.028, 0.12, 0.068 y 0.04 h^{-1} con los tratamientos 1-5 respectivamente.

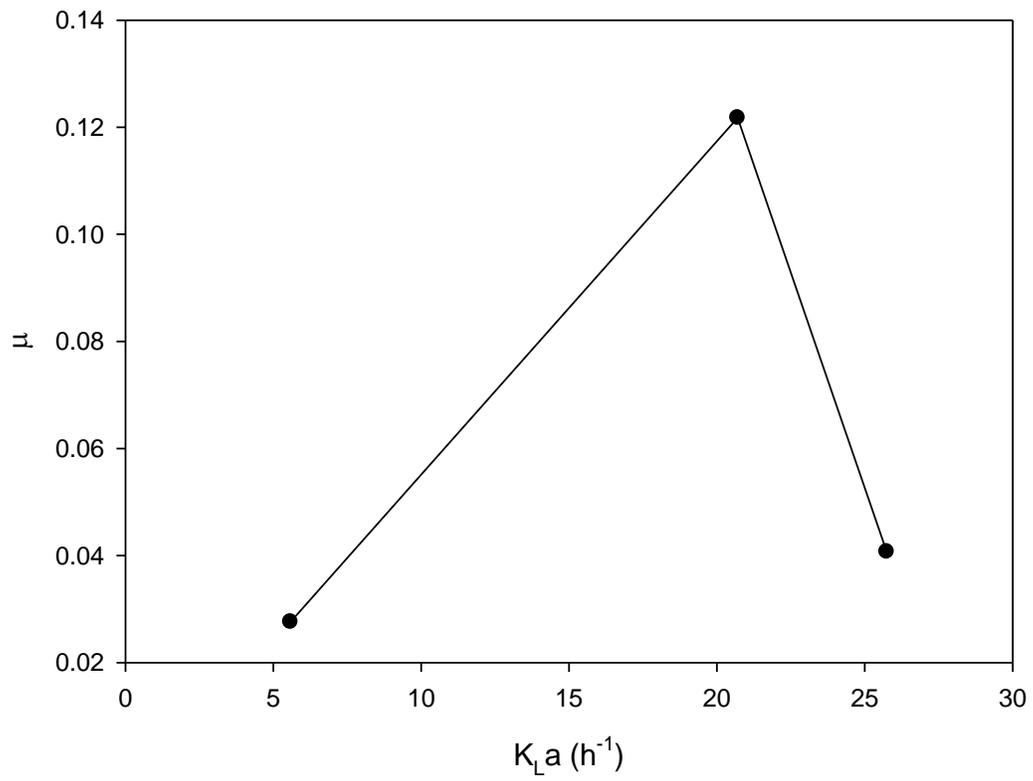


Figura 19. Efecto del $K_L a$ sobre el crecimiento del hongo en el cultivo sumergido.

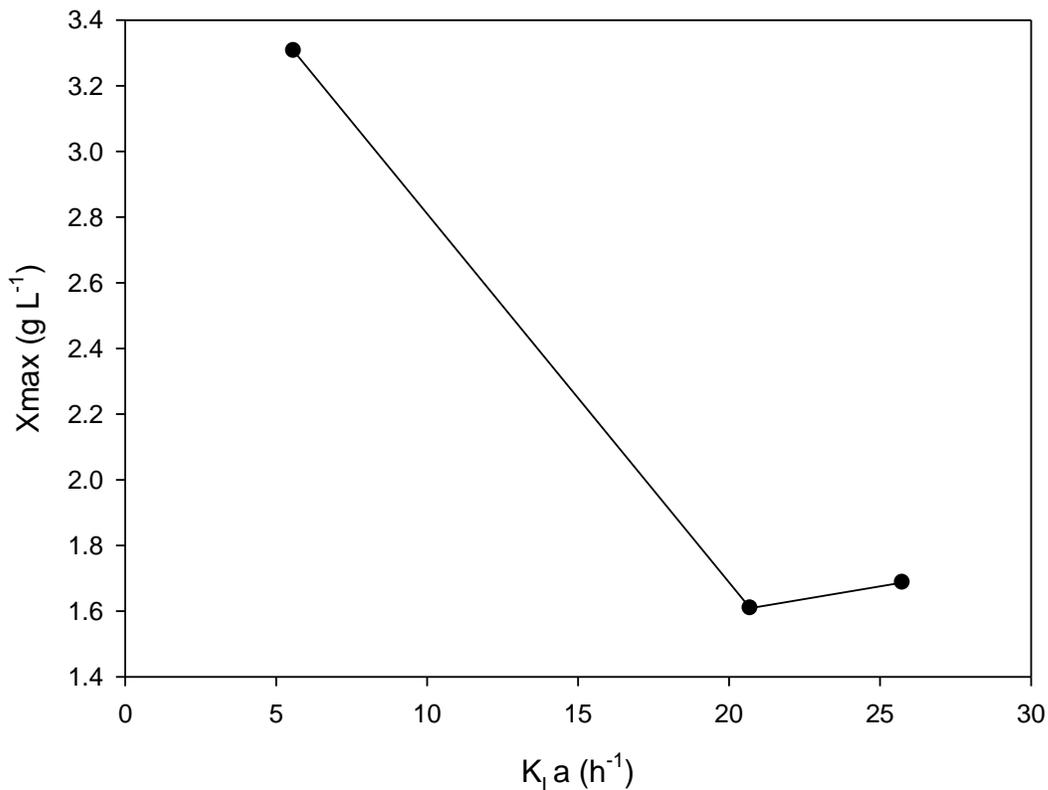


Figura 20. Correlación entre la biomasa máxima con el K_{La} .

Autores como Banerjee (1993); Silva y col., (2002) reportan regiones óptimas de K_{La} encontrando una fuerte correlación entre la productividad enzimática y concentración de biomasa, en nuestro caso a pesar de que el K_{La} aumenta en el sistema, éste no se correlaciona con la producción de biomasa como puede observarse en las Figuras 19 y 20; esto lo atribuimos a que en el sistema están implicados otros factores como el aumento de la velocidad de agitación en el biorreactor que induce la fragmentación de microorganismos miceliales debido a que son sensibles a la velocidad de disipación de energía dada por los impulsores y en consecuencia la morfología es predominantemente pequeños gránulos y micelios libres (Heydarian et al., 2000; Rocha-Valadez et al. 2006). Los granulados grandes son más eficientes para producir enzimas que los pequeños gránulos, este tipo de gránulos se formaron en nuestro tratamiento con menor agitación y aireación (100 rpm y 1 vvm) en la Figura 23 pueden observarse, Se sabe que el crecimiento de hongos en forma de pellets proporciona una buena transferencia de masa y oxígeno, minimiza los efectos adversos en el rendimiento del reactor, y no aumenta la viscosidad en el reactor como fue en nuestro

caso que la viscosidad prácticamente no cambió en los tratamientos, en general, el aumento de la viscosidad del medio se evidencia más en el crecimiento filamentosos que el crecimiento en forma de pellets (Michelin 2013).

7.8 Actividad Nhasa en el cultivo sumergido de *L. lecanii* para el T1 empleando quitina coloidal con 12 % de proteína

Posterior a la construcción de las curvas de productividad para los tratamientos, se decidió probar una quitina con mayor porcentaje de proteína residual, para el tratamiento 1 (100 rpm y 1vvm) que fue con el que se alcanzó la mayor productividad ($0.0045 \pm 1.6E-03$ U mg^{-1} proteína h), esto con el objetivo de realizar el escalamiento con una quitina que contenga mayor porcentaje de proteína residual y por ende poder obtener mayor actividad quitinolítica; en la Tabla 8 se reporta el químico proximal de esta muestra de quitina.

Tabla 8. Caracterización químico proximal de quitina cruda

MUESTRA	CENIZAS (%)	HUMEDAD (%)	PROTEÍNA RESIDUAL (%)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA Nhasa (U mg^{-1} Proteína)
Quitina PP3	11.9±0.32	8.7±0.25	12.3±0.16	2± 0.0087

En la Figura 21 se grafica la actividad específica y volumétrica del cultivo utilizando esta quitina, con la cual se alcanzó una mayor actividad específica para el tratamiento 1 que con la quitina coloidal previamente utilizada con 4.8 % de proteína residual, esta actividad específica fue de 1.15 ± 0.03 U mg^{-1} Proteína.

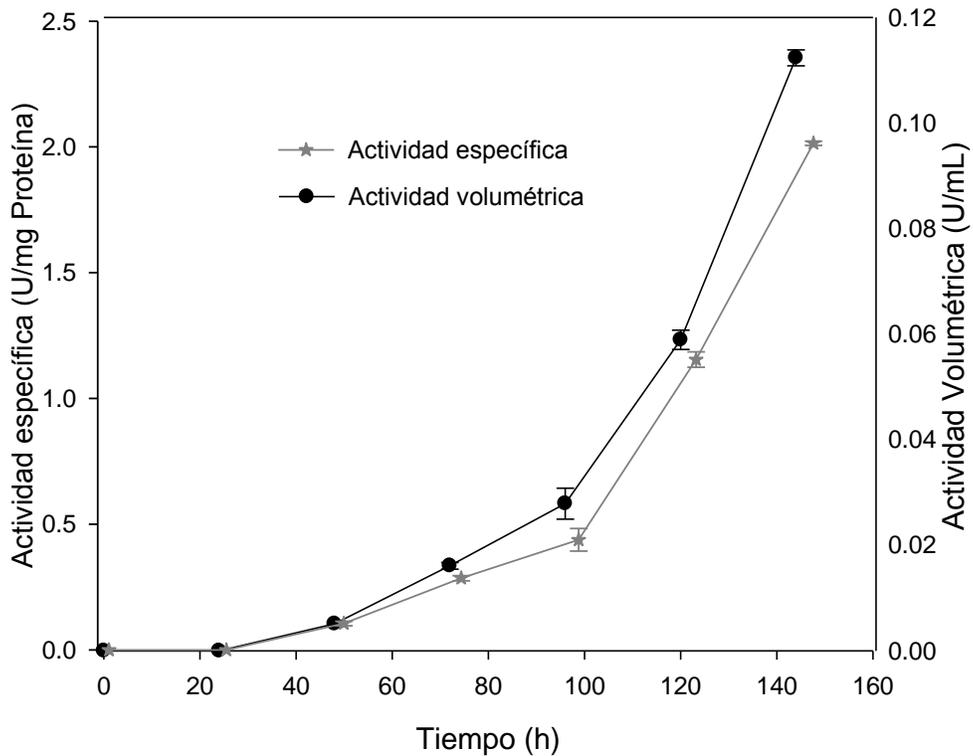


Figura 21. Actividad Nhasa específica y volumétrica del T1 utilizando quitina coloidal con 12% proteína residual.

Del extracto crudo enzimático obtenido de este cultivo sumergido se llevó a cabo una purificación parcial de las Nhasas, registrándose en cada paso de la purificación la actividad enzimática, el factor de purificación y el rendimiento enzimático para conocer la eficiencia de cada paso de purificación. Se decidió llevar el extracto crudo enzimático al 60% de saturación con sulfato de amonio ya que Rojas-Osnaya (2015), Taylor y col. (2002), reportan que la fracción precipitada del 40-60% de saturación muestra la mayor actividad Nhasa, además Rojas-Osnaya (2015) reporta que no existe diferencia significativa con respecto a la fracción que precipito del 60-80%. Se decidió, por tanto, revisando lo reportado anteriormente trabajar con 60% de saturación de sulfato de amonio ya que disminuir la cantidad de sal utilizada durante la purificación va a repercutir en los costos y será significativo cuando se necesite escalar el proceso. En la Tabla 9 se muestran los

resultados de esta purificación parcial de la fracción precipitada al 60% de saturación con sulfato de amonio. Antes de realizar la purificación, en el extracto enzimático obtenido del cultivo sumergido a las 144 h se contaba con una concentración de proteína de 89.24 mg y una actividad total de 179.75 U, teniendo así una actividad específica de 2.01 U mg⁻¹, en el paso de precipitación con sulfato de amonio hubo una recuperación del 70% de la enzima con un factor de purificación de 27.58 y una actividad específica de 55.55 U mg⁻¹, autores como Taylor y col. (2002) obtienen un factor de purificación de 1.25 durante la purificación de Nhasa de *Stachybotrys elegans*, estos autores también utilizan la precipitación con sulfato de amonio como primer paso de purificación; Rojas-Osnaya y col. (2015) tienen una recuperación del 50.9% con un factor de purificación de 1.35. En la etapa de cromatografía de exclusión molecular se recuperó el 1.02% de la enzima, esto se puede atribuir al alto volumen (50 mL) del buffer en el que fue resuspendido el precipitado, la actividad específica quedó en 2.30 U mg⁻¹ y un factor de purificación de 1.14, Rojas-Osnaya y col. (2015) logran un factor de purificación de en este paso de 2.55.

Tabla 9. Purificación parcial de la Nhasa de *L. lecanii* en cultivo sumergido T1 utilizando quitina coloidal con 12% proteína residual.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)	Actividad específica (U mg⁻¹)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1600	89.24	179.75	2.01	1	100
Precipitación 60% de saturación	50	72.39	125.46	55.55	27.58	70
Exclusión molecular (Fracciones 18-20)	15	3.23	5.48	2.30	1.14	3.05

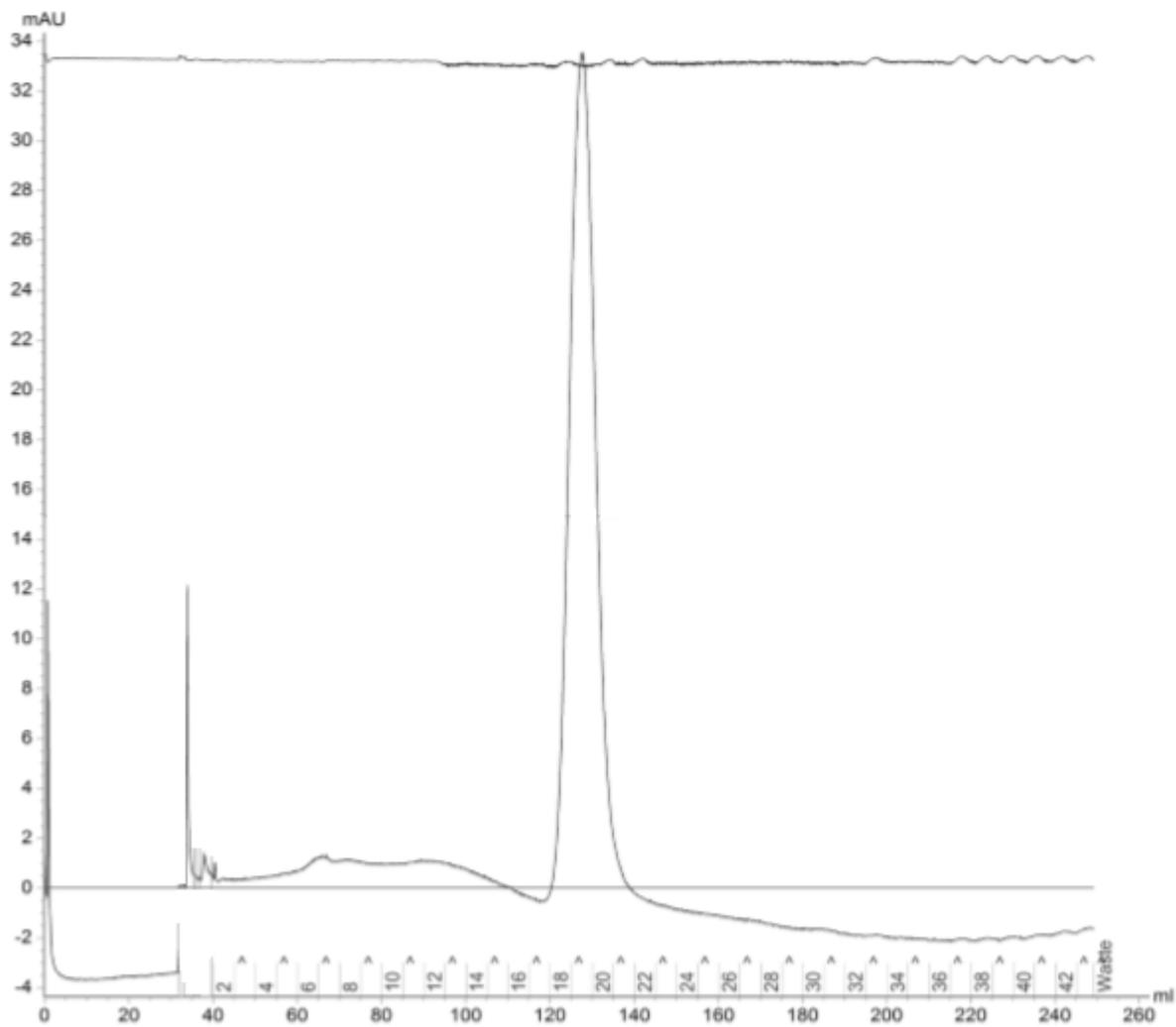
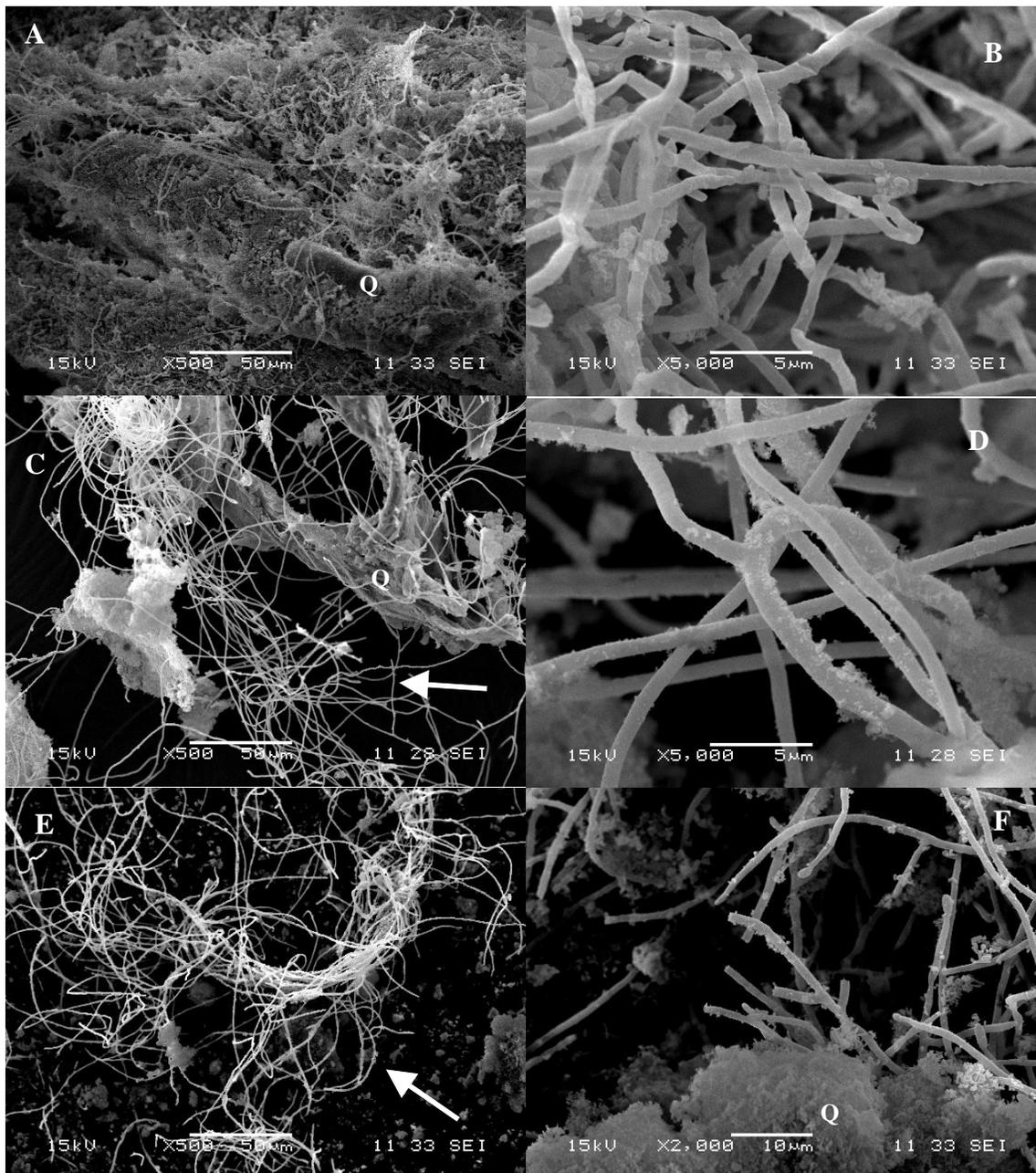


Figura 22. Cromatograma de exclusión molecular.

En la figura 22 se muestra la purificación mediante el cromatograma de exclusión molecular del extracto crudo enzimático concentrado con sulfato de amonio a un porcentaje de saturación del 60%. Las fracciones 18-20 presentaron actividad Nhasa de 1, 0.3 y 0.9 U mg^{-1} Proteína respectivamente.

7.9 Efecto de la aireación y agitación sobre la morfología del hongo

Las observaciones de la microscopía electrónica de barrido del crecimiento fúngico hasta las 120 h de cultivo sumergido para los tratamientos se muestran en la siguiente Figura 23.



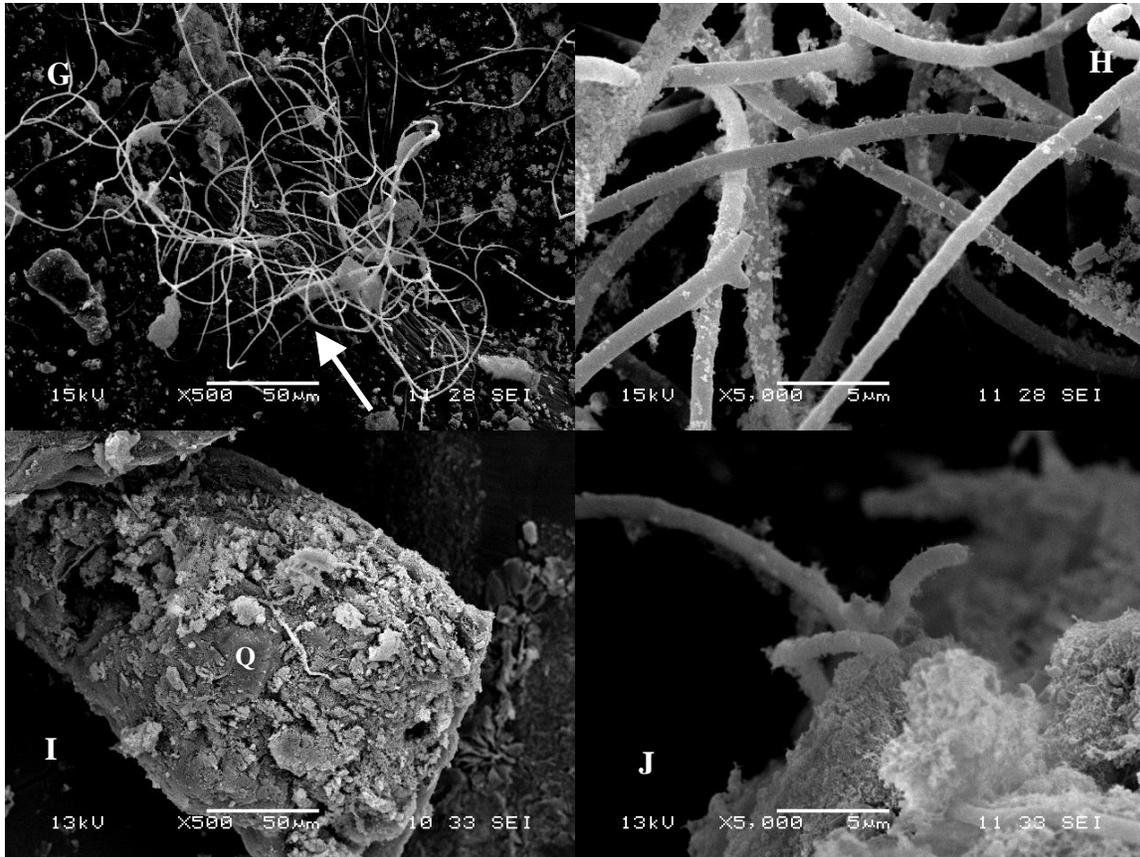


Figura 23. SEM del cultivo sumergido hasta las 120 h para los diferentes tratamientos: A) T1 a x500, B) T1 a x5,000, C) T2 a x500, D) T2 a x5,000, E) T4 a x500, F) T4 a x2,000, G) T5 a x500, H) T5 a x5,000, I) T9 a x500, J) T9 a x5,000, Quitina y sales (Q);

En el tratamiento 1 (Figura 23 A), se observa la formación de agregados celulares o "pellets, son aglomerados de mayor tamaño conformados por quitina sales y micelio; Conforme fue aumentando la agitación y aireación debido al tratamiento los micelios se observaron más dispersos a través de la quitina y sales. En los tratamientos 4 y 5 (figura 23 F y H) se comienzan a observar algunas zonas con corte en el micelio. En el tratamiento 9 con el cual se utilizó el mayor nivel de agitación y aireación con 400 rpm y 3 vvm se observan mayormente micelios libres (se muestran señalados con flechas blancas en la Figura 23), estando ausente prácticamente en la mayor parte de las zonas observadas (figura 23 I y J). Es bien sabido que el aumento de la velocidad de agitación en el biorreactor induce la fragmentación de microorganismos miceliales debido a que son sensibles a la velocidad de disipación de energía dada por los impulsores y en consecuencia la morfología es

predominantemente pequeños gránulos y micelios libres (Heydarian et al., 2000; Rocha-Valadez et al. 2006).

8 CONCLUSIONES

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno mejora en el sistema conforme se aumenta el nivel de agitación y de aireación sin embargo la producción no aumenta, sino que va disminuyendo, esto puede ser debido a daños en la morfología del hongo y en consecuencia cambios en el metabolismo celular.

Como criterio de escalamiento al comparar las curvas de productividad obtenidas con K_{LA} y Re , se observa que K_{LA} es un criterio más relevante ya que debido al comportamiento que presentó su curva, se logró determinar que la variación del K_{LA} influye sobre la productividad, en donde existe una región efectiva de escalamiento que va de los 5-20 h^{-1} , sin embargo con Re se observa que al variar el nivel de agitación y aireación para los tratamientos el Re se mantiene constante mientras que la productividad si cambia independientemente de Re .

Se observa con dichos comportamientos que la hidrodinamia del reactor en el rango de variación de 100-400 rpm de agitación y 1-3vvm de aireación es menos relevante sobre la productividad del proceso, en cambio la transferencia de oxígeno es predominante.

A pesar de que el K_{LA} aumenta en el sistema, éste no se correlacionó con la producción de biomasa. La tasa de crecimiento más alta fue alcanzada con las condiciones del tratamiento 2 con un valor de 0.12 h^{-1} .

El costo estimado de producción utilizando este sistema es de \$557 por un lote con volumen de 1 L, lo cual nos da un costo por unidad enzimática de \$15.5, por lo que escalar la producción de este proceso es rentable.

9 PERSPECTIVAS

En el estudio realizado se logró determinar que el criterio de escalamiento para poder aumentar el tamaño de la producción de quitinasas fue el K_{La} . Para un trabajo futuro se propone probar el criterio de escalamiento K_{La} en un biorreactor de escala piloto, en el rango de $5-20 \text{ h}^{-1}$, utilizando la quitina coloidal con 12% de proteína residual.

Se podría probar menor nivel de agitación y aireación para evaluar la producción de Nhasa por debajo de 100 rpm y 1 vvm, ya que podría ser más sencillo el escalamiento del proceso con estas condiciones.

Convendría que, en el escalamiento durante la etapa de purificación con la sal, se sustituya el sulfato de amonio por una sal menos costosa, como por ejemplo sulfato de potasio, ya que el uso del sulfato de amonio durante la purificación representa el 30% del costo total del sistema propuesto.

10 TRABAJOS PRESENTADOS

- Presentación oral: “Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) de un cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii* para la producción de quitinasas” en el Simposio internacional Environmental *Metarhizium* Biotechnology en Guanajuato, Guanajuato (2017).
- Presentación oral: “Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) y número de Reynolds (Re) como criterio de escalamiento para la producción de β -N-acetilhexosaminidasa de *Lecanicillium lecanii*” en 10th International Conference on Fiber and Polymer Biotechnology en Balneário Camboriú, Brasil (2018).

11 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Zarate, P., Cruz-Hernandez, M.A., Montañez, J.C., Belmares-Cerda, R.E., Aguilar, C.N., (2014). Enhancement of tannase production by *Lactobacillus plantarum* CIR1: Validation in gas-lift bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37.
- Aiba, Humprey, A. E., Millis, N. F. (1973). *Biochemical Engineering*. 2a. Ed. Academic Press. Nueva York, EEUUA.
- Arakawa, T., Prestrelski, S. J., Kenney, W. C., and Carpenter, J. F. (2001). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 46, 307-326.
- Banerjee U. C. (1993). Effect of stirrer speed, aeration rate and cell mass concentration on volumetric oxygen transfer coefficients (K_{La}) in the cultivation of *curvularia lunata* in a batch reactor. *Biotechnology techniques* .7 No.10, 733-73.
- Bhushan B. (2000). Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus sp.* BG-11. *Journal of Applied Microbiology*. 88, 729–918.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*., 72, 248- 254.
- Buera M.P., Rossi S., Moreno S., Chirife J. (1999). DCS confirmation that vitrification is not necessary for stabilization of the restriction enzyme EcoRI with saccharides. *Biotechnol. Prog.*, 15, 577-580.
- Carpenter J. F., Crowe J. H. (1989). An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochem.*, 28, 3916-3922.
- Carrasco-Navarro U., Alatorre-Rosas R., Gonzalez-Marquez H., Shirai K. (2011). Producción y purificación de β -N-acetilhexosaminidasa en cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en espuma de poliuretano. Universidad Autónoma Metropolitana (tesis de maestría).
- Cederkvist F.H., Parmer M.P., Vårum K.M., Eijsink V.G.H. (2008). Inhibition of a family 18 chitinase by chitooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*; 74, 41–49.

- Cooper C.M., Fernstrom G.A., Miller S.A. (1994). Gas-liquid contactors. Performance of Agitated; 504–509.
- Demir A., Aytar P., Gedikli S., Çabuk A., Arısoy M. (2011). Laccase Production with Submerged and Solid State Fermentation: Benefit and Cost Analysis. *J. Biol. & Chem.* 39, 305–313.
- Doran P. (1995). *Bioprocess Engineering*. Sydney, Elsevier Science & Technology Books.
- Duo-Chuan L. 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*. 161, 345–360.
- Fenice M., Barghini P., Selbmann L., Federici F. (2012). Combined effects of agitation and aeration on the chitinolytic enzymes production by the Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003. *Microb. Cell Factories* 11:1-12.
- Fick A.(1885) Ueber Diffusion. *Annalen der Physik*, 170(1), 59-86.
- Gómez Sánchez, C. E., Martínez- Trujillo, A., Aguilar Osorio, G. (2012). Oxygen transfer coefficient and the kinetic parameters of exo- polygalacturonase production by *Aspergillus flavipes* FP- 500 in shake flasks and bioreactor. *Letters in applied microbiology*, 55(6), 444-452.
- Goettel M. (2008). Potential of *Lecanicillium spp.* For management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98, 256–261.
- Henrissat B., Davies G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*. 7, 637-644.
- Hölker U., Höfer M., Lenz J. (2004). Biotechnological advantages of laboratoryscale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64, 175-186.
- Kim Y. S., Jones L. S., Dong A., Kendrick B. S., Chang B. S., Manning M. C., Randolph T. W., Carpenter J. F. (2003). Effects of sucrose on conformational equilibria and fluctuations within the native-state ensemble of proteins. *Protein Sci.*, 12, 1252-1261.
- Kirk O., Vedel-Borchert T., Crone-Fuglsang C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 13, 345–351.
- Kunitz M. (1947). Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and of soybean trypsin-inhibitor. *Journal of General Physiology*. 30, 291-310.

- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Liu B., Kao P., Tzeng Y., Feng K. (2003). Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*.
- Marín-Cervantes M., Matsumoto Y., Ramírez-Coutiño L., Rocha-Pino Z., Viniegra G., Shirai K. (2008). Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases *Process Biochemistry*. 43, 24-32.
- Matsumoto Y., Saucedo G., Revah S., Shirai K. (2001). Producción de quitinasas en fermentación en medio sólido y líquido utilizando quitina de desechos de camarón. Universidad Autónoma Metropolitana (tesis de maestría).
- Matsumoto Y., Saucedo G., Revah S., Shirai K. (2004). Production of β -Nacetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry*. 39, 665-671.
- Merchuk J.C., Gluz M. (1999). Bioreactors, air-lift reactors. In: Flickinger MC and Drew SW (eds.) *Encyclopedia of Bioprocess Technology Fermentation Biocatalysis and Bioseparation*, vol. 1–5, pp. 109–142. New York, NY: Wiley.
- Michelin, M., de Oliveira Mota, A. M., de Moraes, M. D. L. T., da Silva, D. P., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2013). Influence of volumetric oxygen transfer coefficient (K_{La}) on xylanases batch production by *Aspergillus niger* van Tieghem in stirred tank and internal-loop airlift bioreactors. *Biochemical engineering journal*, 80, 19-26.
- Nielsen J., Villadsen J., Lidén G. (2002). *Bioreaction Engineering Principles*. 3a. Ed. New York: Springer. 10: 459-490.
- Pérez, O. (2000). Monografía. Escalado de un reactor tipo tanque agitado. Instituto Superior Politécnico “José Antonio Echeverría”. Facultad de Ingeniería Química. Ciudad de La Habana, Cuba.
- Peterson G.L. (1977). A simplification of the protein assay which is more generally applicable. *Analytical Chemistry*. 83, 346-353.

- Pirt, S.J., (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications.
- Prestrelski S. J., Arakawa T., Carpenter J. E. (1993). Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. Structural studies using infrared spectroscopy. Arch. Biochem. Biophys., 303,465-473.
- Quintero R. (1993). Escalamiento de fermentaciones. En Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones. Ed. Alhambra Mexicana. Pp. 97-113. Ciudad de México.
- Raffo-Duran J., Figueredo-Cardero A., Dustet-Mendoza J.C. (2014). Características de la hidrodinámica de un biorreactor industrial tipo tanque agitado. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 13, No. 3, 823-839.
- Ramirez-Coutiño L., Espinosa-Marquez J., Peter M., Shirai K. (2009). The effect of pH on the production of chitinolytic enzymes of *Verticillium fungicola* in submerged cultures. Bioresearch Technology. 101, 9236-9240.
- Rocha-Pino Z., Marín-Cervantes M., Martínez-Archundia M., Soriano Blancas E., Revah S., Shirai K. (2011). Morphological changes, chitinolytic enzymes and hydrophobin like proteins as responses of *Lecanicillium lecanii* during growth with hydrocarbon. Bioprocess Biosyst Eng., 36, 531–539.
- Rocha-Pino Z., Viguera G., Shirai K. (2011). Production and activities of chitinases and hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. Bioprocess Biosyst Eng., 34, 681-686.
- Rocha-Pino Z., Viguera G., Fernández-Perrino F.J., Shirai K. (2014). Estudio de la producción y actividad de proteínas tipo hidrofobinas y quitinasas de *Lecanicillium lecanii* en cultivos en sustrato sólido y sumergido. Universidad Autónoma Metropolitana (tesis de doctorado).
- Rojas-Osnaya J., Gonzalez-Marquez H., Rocha-Pino Z., Shirai K. (2015). Estudio de la actividad de transglicosilación de las quitinasas producidas por *Lecanicillium lecanii*. Universidad Autónoma Metropolitana (tesis de maestría).
- Santagapita P. R. (2010). Estabilidad de enzimas en medios de distinta movilidad molecular. Impacto de interacciones con azúcares y biopolímeros y de la

encapsulación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. (tesis de doctorado).

- Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernández M. R. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*. 29, 13–24.
- Scigelova M., Crout D. (1999). Microbial β -N-acetylhexosaminidases and their biotechnological applications. *Enzyme and Microbial Technology*. 25, 3-14.
- Silva, D. P., Pessoa Jr, A., Roberto, I. C., Vitolo, M. (2002). Effect of k L a on the Production of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* Grown by Fermentation Process. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. 98, 205-213.
- Slade L., Levine H. A. (1991). Food polymer science approach to structure-property relationships in aqueous food systems: non-equilibrium behavior of carbohydrate-water systems. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 302, 29-101.
- Slámová K., Bojarová P., Petrásková B., Křen V. (2010). β -N-acetylhexosaminidase: What's in a name...?. *Biotechnology Advances*. 28, 682-693.
- Srirangsan, P., Kawai K., Hamada-Sato N., Watanabe M., Suzuki T. (2010). Improvement in the remaining activity of freeze-dried xanthine oxidase with the addition of a disaccharide-polymer mixture. *Food Chem.*, 119 (1), 209-213.
- St. Leger R., Joshi L., Roberts D. (1998). Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarrhizium anisopliae*. *Applied Environmental Microbiology*. 64(2), 709-713.
- Taira T., Fujiwara M., Denhart N., Hayashi H., Onaga S., Ohnuma T., Letzel T., Sakuda S., Fukamizo T. (2010). Transglycosylation reaction catalyzed by a class V chitinase from cycad, *Cycas 54evolute*: A study involving site-directed mutagenesis, HPLC, and real-time ESI-MS. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1804, 668–675.
- Taylor G, Jabaji-hare S, Charest P. M, Wajahatullah K. 2002. “Purification and characterization of an extracellular exochitinase, β -N- 62 acetylhexosaminidase, from the fungal mycoparasite *Stachybotrys elegans*”. *Canadian Journal of Microbiology*. 48: 311319.

- Tronsmo A., Harman G.E. (1993). Detection and quantification of N-acetyl β -D glucosaminidase, chitobioside, and endochitinase in solutions and on gels. *Anal Biochem* 208, 74–79.
- Tronsmo A., Hjelrord L., Klemsdal S. S., Varum K. M. Nordtveit H. R y Harman G. E. (1996). *Chitin Enzymology*. 2, 235-244.
- Villa-Lerma G., Gonzalez-Marquez H., Gimeno M., Lopez-Luna A., Barzana E., Shirai K. (2013). Ultrasonication and steam-explosion a chitin pretreatments for chitin oligosaccharide production by chitinases of *Lecanicillium lecanii*. *Bioresearch Technology*. 140, 794-798.
- Villa-Lerma G., Gimeno M., Gonzalez-Marquez H., Shirai K. (2015). Modificación estructural de quitina mediante métodos físicos y químicos para su hidrólisis enzimática mediante quitinasas de *Lecanicillium lecanii*. Universidad Autónoma Metropolitana (tesis de doctorado).
- Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G. (2011). Gas–Liquid Mass Transfer. In *Bioreaction Engineering Principles* (pp. 459-519).
- Vu V., Hong S., Kim K. (2007). Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 104(6), 498-505.
- Wang S., Ye X., Chen J., Rao P. (2012). A novel chitinase isolated from *Vicia faba* and its antifungal activity. *Food Research International*. 45, 116–122.
- Yamamoto K., Moo-Lee K., Kumagai H., Tochikura T. (1985). Purification and Characterization of β -N-Acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicum*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 49, 611-619.
- Yoon J. (2005). Enzymatic synthesis of chitooligosaccharides in organic cosolvents. *Enzyme and Microbial Technology*. 37, 663–668.
- Yongmoon H., Byung-Seok J., Sang-Bong L., Yeowon S., Jee-Won J., Jue-Hee L., (2007). Effects of Sugar Additives on Protein Stability of Recombinant Human Serum Albumin during Lyophilization and Storage. *Arch. Pharm. Res.*, 30, 1124-1131.
- Zakariassen H., Klemetsen L., Sakuda S., Vaaje-Kolstad G., Vårum K.M., Sørli M., Eijsink V.G.H. (2010). Effect of enzyme processivity on the efficacy of a competitive chitinase inhibitor. *Carbohydrate Polymers*. 82, 779–785.

12 ANEXOS

12.1 Curva de *p*-Nitrofenol para determinación de actividad Nhasa

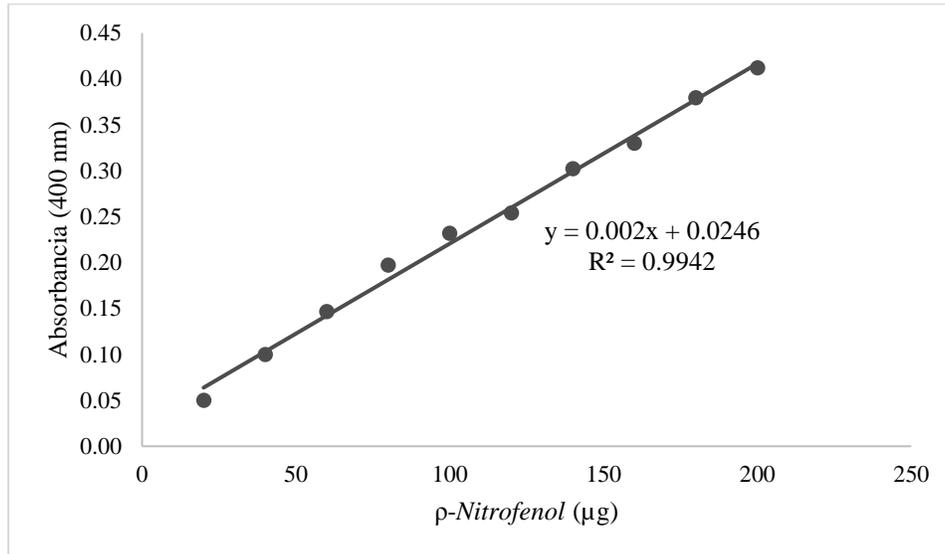


Figura 24. Curva patrón de *p*-Nitrofenol para determinación de actividad Nhasa (Tronsmo y Harman, 1993).

12.2 Metodología para determinación de proteína de Lowry Peterson y curva patrón de seroalbúmina

Reactivo A

- A) Solución de carbonato de sodio tartrato de potasio: Se disolvieron 25 g de carbonato de sodio, 0.25 g de sulfato de cobre pentahidratado, 0.5 g de tartrato de sodio y potasio en 250 ml de agua destilada.
- B) Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS): 25g de SDS fueron disueltos en 250 ml de agua destilada.
- C) Solución de hidróxido de sodio: Se disolvieron 8g de NaOH en 250 ml de agua destilada. Se mezclan las soluciones A, B y C aforándose con agua destilada a 1L.

Reactivo B

Se diluyeron 1:1 el reactivo fenol Folin-Ciocalteu con agua destilada, este debe prepararse en el momento del análisis.

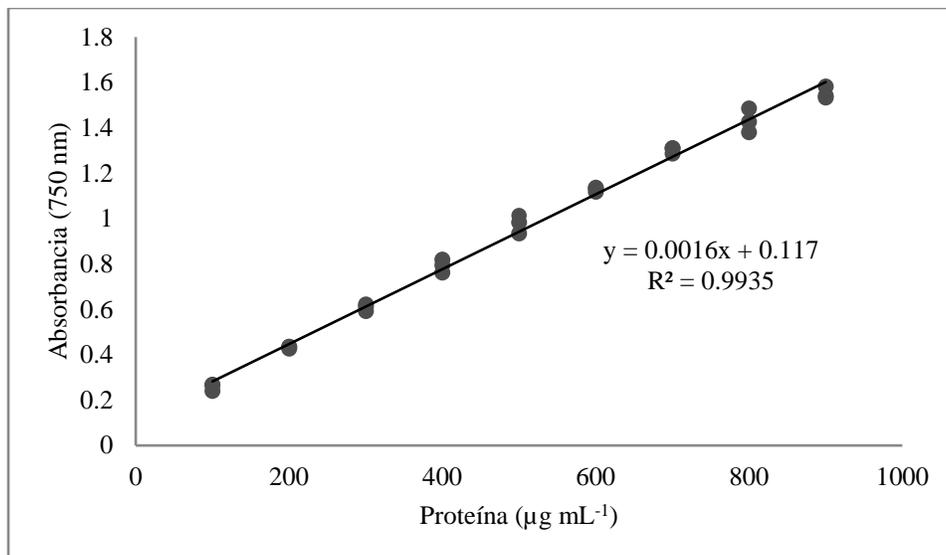


Figura 25. Curva patrón para la determinación de proteína por Lowry-Peterson (Peterson, 1977).

12.3 Curva patrón para determinación de proteína por Bradford

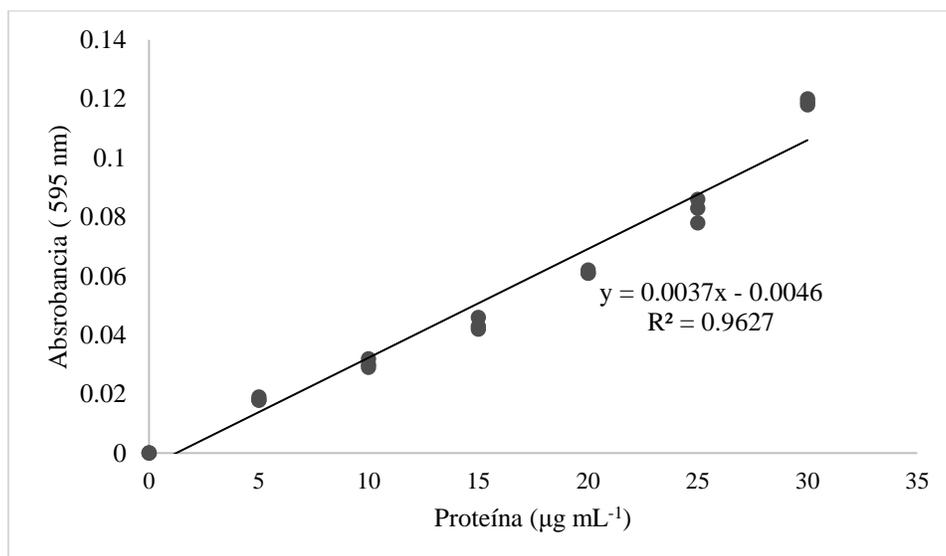


Figura 26. Curva patrón para la determinación de proteína por microensayo (Bradford, 1976).

12.4 Determinación de CO₂ como medición indirecta de biomasa

La producción de CO₂ en el cultivo fue monitoreada utilizando un sensor K33-ICB controlado mediante el software Gaslab® para la configuración, registro de datos y análisis de los datos en tiempo real del gas de salida del cultivo al sensor. El flujo de aire fue analizado en el sensor mediante un infrarrojo no dispersivo para CO₂. Las características del sensor se presentan en la siguiente Tabla 11.

Tabla 10. Características del sensor utilizado para monitoreo del CO₂.

Sensor ID	K33-ICB
Gas	CO ₂
Principio de medición	Infrarrojo no dispersivo (NDIR)
Rango de medición	0-300,000 ppm (0-30%)
Tiempo de respuesta	<20s, muestreo: 0.2 L / min de flujo de gas
Precisión	± 100 ppm Vol. ± 1% del valor medido
Resolución	0.001% / 10 ppm
Repetibilidad	± 100 ppm volumen ± 1% del valor medido

En la Figura 27 se observa como arroja los resultados el software Gaslab® en un gráfico del tiempo contra la concentración de CO₂, y en la Figura 28 se muestra como quedó montado el proceso del cultivo sumergido conectado al monitoreo automatizado de CO₂ utilizando el sensor.

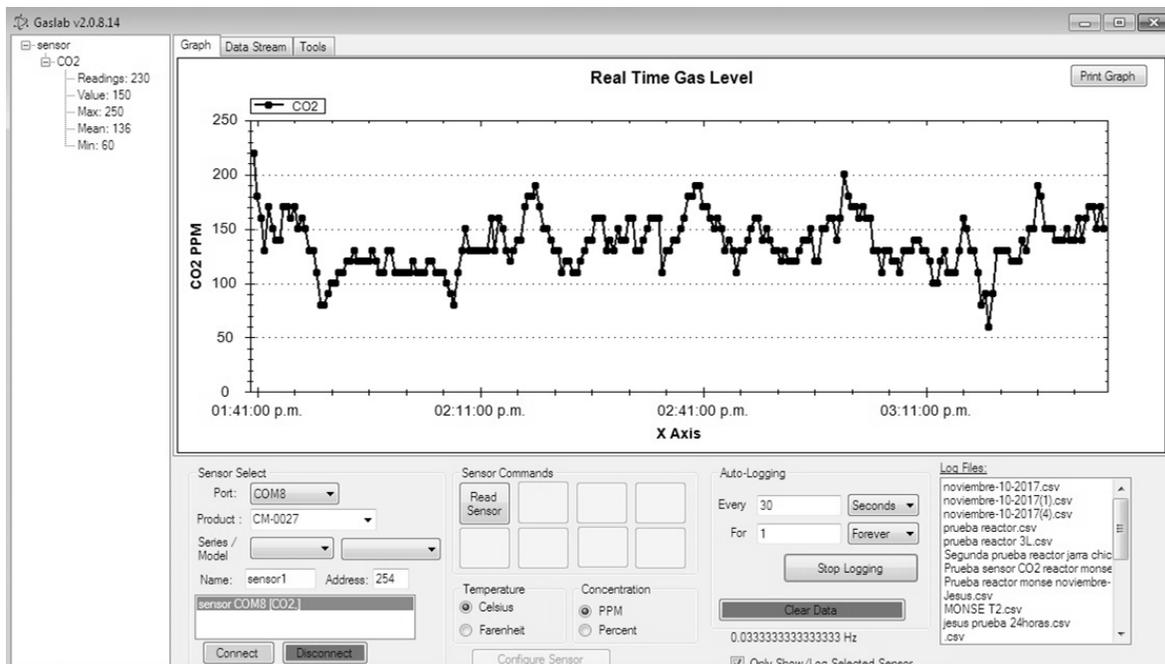


Figura 27. Captura de pantalla de la producción de CO₂ del software Gaslab®.

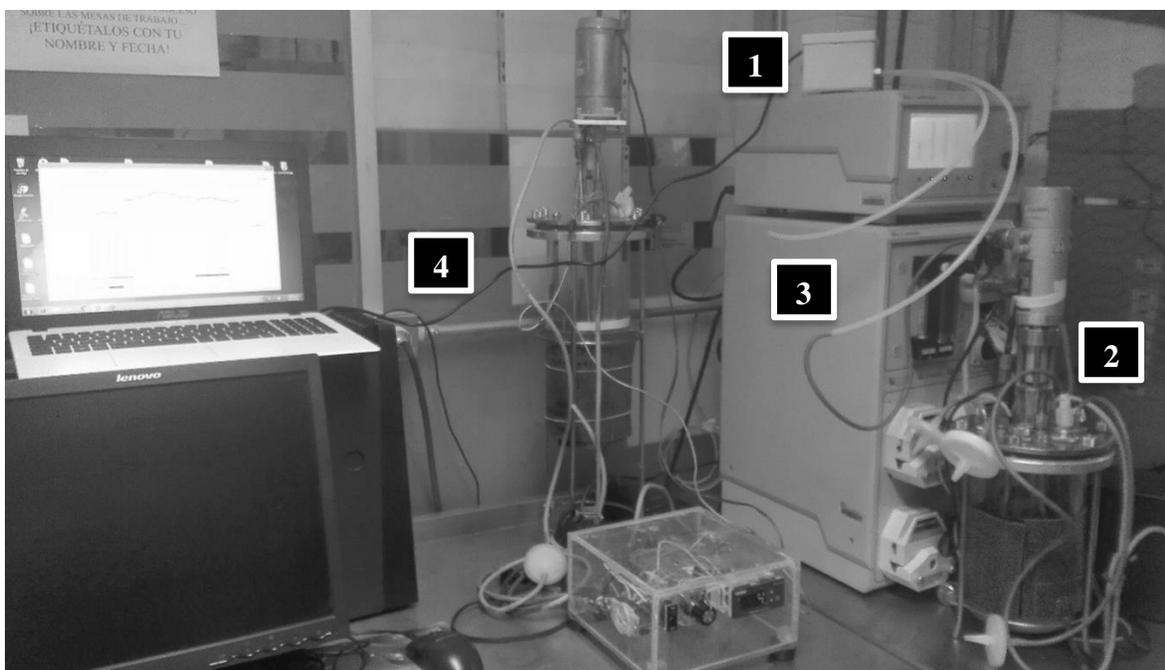


Figura 28. Sistema en línea del monitoreo automatizado de CO₂: 1) Caja del sensor K33-ICB, 2) Reactor 3 L, 3) Manguera de flujo de aire de salida del reactor al sensor, 4) cable USB que conecta sensor a computadora.

Utilizando una curva de correlación de CO₂ con biomasa (Figura 29) de un experimento que realizó el equipo de trabajo con las condiciones del tratamiento 1(100 rpm y 1 vvm), utilizando como fuente de carbono 10 g L⁻¹ de sacarosa en lugar de quitina coloidal, se realizó la medición indirecta de la biomasa presente en cada tratamiento hasta las 120 h y la producción de CO₂ de todo el proceso fue modelada como X (mg CO₂ g⁻¹ de biomasa) mediante el método logístico Velhursts-Pearl aplicado por Aguilar-Zarate y col. (2014) para la estimación de crecimiento microbiano, quedando la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{dx}{dt}\right) = \mu \left[1 - \frac{X}{X_{\max}}\right] \cdot X \quad (9)$$

En donde μ es la máxima tasa específica de crecimiento y X_{\max} es el valor de equilibrio para X donde $\frac{dX}{dt}=0$, la solución para la ecuación 9 está dada por:

$$x(t) = \left[\frac{X_{\max}}{1 - \left(\frac{X_{\max} - X_0}{X_0}\right) \cdot e^{(-\mu t)}} \right] \quad (10)$$

X_0 se refiere a el valor de X cuando $t=0$. La ecuación 10 es usada generalmente para datos experimentales cuando la ecuación 9 es propuesta. Los valores mínimos del cuadrado del error son encontrados como una función de los parámetros de X_0 , X_{\max} , y μ .

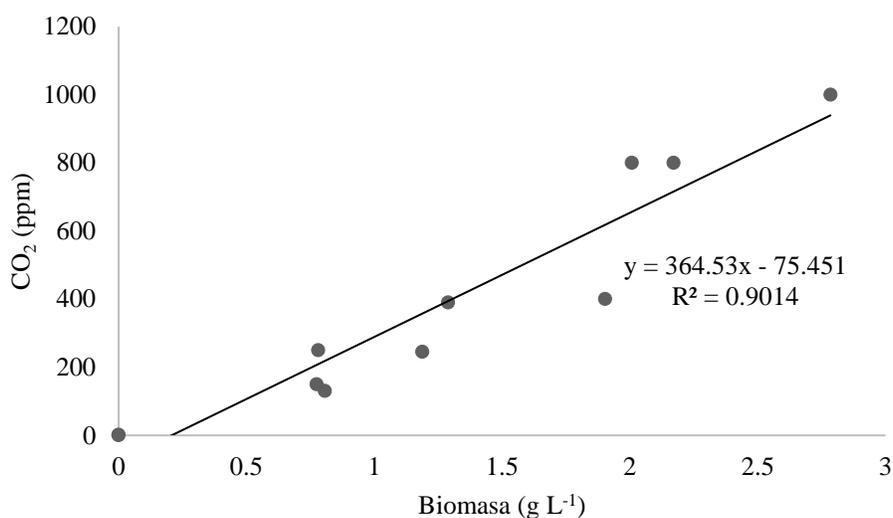


Figura 29. Curva de correlación construida utilizando como fuente de carbono sacarosa y condiciones del tratamiento 1.

12.5 ANOVA en la determinación de oxígeno disuelto

Tabla 11. ANOVA de oxígeno disuelto.

	Supuestos	Probabilidad	Decisión con alfa=0.05
	Normalidad de residuales		Se Acepta
	Igualdad de Varianzas		Se Acepta
Término	Suma de cuadrados	Estadístico F	Significancia con alfa=0.05
Tiempo	2025.62	841.09	<0.0001
OD	5.78		

Tabla 12. Prueba post hoc de Tukey-Kramer para OD en el tratamiento 1.

Tiempo	Número de repeticiones	Desvest	Subconjuntos para alfa=0.05				
			a	b	c	d	e
24	3	0.90	59.5				
48	3	0.17	61				
72	3	0.95		63.5			
120	3	0.7			71.4		
96	3	0.55				77.7	
0	3	0.58					89.6

12.6 ANOVA en la determinación de K_{La}

Tabla 13. Reporte del ANOVA del efecto de los factores agitación, aireación y tratamiento sobre el K_{La} .

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Significancia con alfa=0.05
Agitación	2	2656.066	1328.033	1676.81	2.7E-12
Aireación	2	1071.87	535.5936	676.25	1.5E-10
Tratamiento	4	454.2912	113.5728	143.40	3.8E-8
Error	9	7.128	0.792		
Total	17	4188.672			

12.7 Muestra liofilizada de quitinasas

Logo 1: Casa abierta al tiempo, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Logo 2: Planta Piloto 10 - Laboratorio S-157, BIOPOLIMEROS

LEQUITIN

Descripción del producto: β -N-acetilglucosaminidasas y proteasas neutras de *Lecanicillium lecanii*. Las β -N-acetilglucosaminidasas son quitinasas que hidrolizan el dímero (quitobiosa), trímero (quitintriosa), tetrámero (quitintetraosa), pentámero (quitinpentaosa) y los extremos no reductores de la quitina. Las β -N-acetilhexosaminidasas presentan la clasificación EC 3.2.1.52

Presentación	Polvo liofilizado
Solubilidad	Solución amortiguadora de citrato/fosfato 0.2 M pH 5.6: 100 mg/mL, suspensión (con partículas). Solución amortiguadora de Tris-HCl 0.05 M y NaCl 0.15 M pH 7.8: 100 mg/mL, suspensión (con partículas).
pH óptimo	6 para β -N-acetilglucosaminidasas
pH desnaturalización	9 para β -N-acetilglucosaminidasas
Temperatura óptima	37 °C para β -N-acetilglucosaminidasas
Temperatura desnaturalización	57 °C para β -N-acetilglucosaminidasas
Especificación	Actividad β -N-acetilglucosaminidasa 2.1 U/g Actividad enzimática Proteasa 1.5 U/g
Almacenaje	-20 °C

Figura 30. Etiqueta de una muestra liofilizada.

La Figura 30 muestra una etiqueta elaborada a partir de la caracterización de una muestra liofilizada que fue enviada a una empresa interesada en la transferencia de tecnología y en el proceso de producción de Nhasas en cultivo sumergido.



DETERMINACIÓN DEL CRITERIO DE ESCALAMIENTO EN UN CULTIVO SUMERGIDO PARA LA PRODUCCIÓN DE QUITINASAS DE *LECANICILLIUM LECANII*

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 30 del mes de julio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS
MTRO. JESÚS ROJAS OSNAYA
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
DRA. ZAIZY ROCHA PINO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

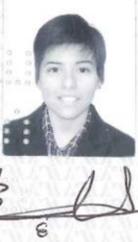
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MONSERRAT ESCOBAR SANCHEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

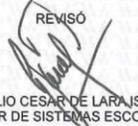
- APROBAR -

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



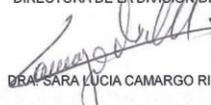
MONSERRAT ESCOBAR SANCHEZ
ALUMNA

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA JASASI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



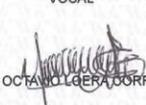
DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS

VOCAL



MTRO. JESÚS ROJAS OSNAYA

VOCAL



DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

SECRETARIA



DRA. ZAIZY ROCHA PINO