

## PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA CRY POR FERMENTACIÓN DE *Bacillus thuringiensis* A ALTA CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES INICIALES.

Jessica Batalla-Mayoral, Joel Alba-Flores, Karín Navarro-Martínez y Fermín Pérez-Guevara.

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Depto. Biotecnología y Bioingeniería, Av. IPN. 2508, San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, México D.F. Tel.: 50613800 ext 4385 Fax 50613313. E-mail: fermin@cinvestav.mx

*Palabras clave:* *Bacillus thuringiensis*, proteína Cry, concentración de sólidos totales iniciales

**Introducción.** *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) es ampliamente usado para el control biológico de plagas agrícolas. La proteína Cry y las esporas producidas por fermentación de *B.t.* trabajan en sinergia aumentando el porcentaje de mortalidad de las plagas. Para su producción se han reportado medios con glucosa de 5 a 68.5 g L<sup>-1</sup> y concentraciones de sólidos totales iniciales (CSTi) desde 6.38 hasta 150 g L<sup>-1</sup>. Se ha reportado que la cantidad final de proteína Cry y esporas es proporcional a la CSTi (1). El crecimiento óptimo y la formación de la proteína Cry y esporas están asociados a una alta velocidad específica de consumo de oxígeno, para lo cual se requiere mínimo 20% de saturación durante la fermentación (1).

El presente trabajo contribuye a demostrar la factibilidad de incrementar la producción de proteína Cry y esporas a una alta CSTi por cultivo sumergido de *B.t.* en lote.

**Metodología.** Un disco de papel filtro con esporas de *B.t.* fue colocado en medio Rowe (2) e incubado a 30 °C y 200 rpm durante 12 h, transferido a medio basal de harina de soya (2) al 5% (v/v) e incubado bajo las mismas condiciones. El fermentador de 5L (Bioflo 3000, New Brunswick Scientific, U.S.A.) conteniendo el medio de fermentación (CSTi 180 g L<sup>-1</sup>: 83 g L<sup>-1</sup> de glucosa y 66.34 g L<sup>-1</sup> de harina de soya) fue inoculado al 5% (v/v) con el subcultivo basal de harina de soya. Las condiciones de operación: 30°C, 600 rpm, pH=7.4 y 1vvm de aireación. El oxígeno se mantuvo por arriba del 20% con pulsos de oxígeno puro. Se dio por terminada la fermentación cuando se alcanzó el 90% de esporulación. Se muestreo cada 2 horas, para determinar la concentración de bacilos y esporas, utilizando cámara de Neubauer. La proteína Cry final se cuantifico con electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Durante la fermentación se controló el pH utilizando NaOH 2M y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.67M.

**Resultados y discusión.** En las primeras horas de las fermentaciones el oxígeno disuelto se mantuvo con la agitación y aireación, a partir de las 4 horas de cultivo se aplicaron pulsos de oxígeno. Las fermentaciones consumieron mayor cantidad de oxígeno en la etapa de crecimiento, posteriormente disminuyó su consumo finalmente, en la etapa de esporulación, fue necesario administrar cantidades mayores de oxígeno debido al incremento en la viscosidad del medio por la lisis de los

bacilos y propiedades funcionales de algunas proteínas presentes en el cultivo.

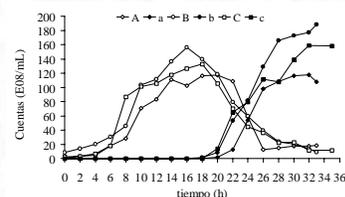


Fig 1. Cinéticas de propagación de *B.t.* en cultivo sumergido a alta CSTi, bacilos (A, B y C) y esporas (a, b, y c).

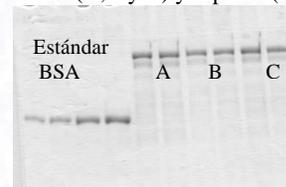


Fig 2. Determinación de proteína Cry de *B.t.* HD-73 por SDS-PAGE para cada una de las fermentaciones (A, B y C), utilizando BSA como estándar.

Se observó un consumo de 166 mL  $\pm$  36 de NaOH 2N durante las primeras 6 horas de la fermentación marcando la etapa de crecimiento exponencial. Las concentraciones de esporas reportadas, fluctúan entre 3.9-100 E08 mL<sup>-1</sup>. En nuestro trabajo alcanzamos 150 x10<sup>8</sup> esporas mL<sup>-1</sup> (Fig 1). La proteína Cry reportada se encuentra entre 0.1g L<sup>-1</sup> y 1g L<sup>-1</sup>. El promedio de la concentración de proteína Cry para todas las fermentaciones fue de 1.26 g/L  $\pm$  0.35 (Fig 2).

**Conclusiones.** Se logró satisfactoriamente realizar fermentaciones de *B.t.* a 180 g L<sup>-1</sup> de CSTi. Fue necesario utilizar pulsos de oxígeno puro para mantener el oxígeno disuelto requerido. La concentración final de esporas fue 50% mayor que las reportadas hasta hoy en la literatura y de proteína Cry ligeramente mayor (25%).

**Agradecimiento.** Al financiamiento recibido por el CINVESTAV, proyecto SEP-CONACYT 2003-43127 y la beca otorgada por CONACYT (No.191709).

### Bibliografía.

- Rowe, G y Argyrios M. (2003). Specific oxygen uptake rate variations during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* subspecies kurstaki HD-1. *Biotechnol. Prog.* Vol (19): 1439-1443.
- Farrera, R, Pérez-Guevara, F, y de la Torre, M. (1998). Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol (49): 758-765.