

ESCALAMIENTO DE UN CULTIVO SUMERGIDO DE PRODUCCIÓN DE β -N-ACETILHEXOSAMINIDASAS DE *Lecanicillium lecanii*

Yahir Cruz Martínez^a, Jesus Rojas Osnaya^a, Zaizy Rocha Pino^a, Neith Pacheco López^b & Keiko Shirai^a,
^aUniversidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Bioprocesos de subproductos agroindustriales y de alimentos. Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina, C.P. 09340. Iztapalapa, Ciudad de México, México. ^bCentro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) Unidad Sureste, Mérida 97070, México. yahircruz95@gmail.com, smk@xanum.uam.mx

Escalamiento, Quitinasas, K_La

Introducción. *Lecanicillium lecanii* es una alternativa a pesticidas funcionando como agente de control biológico. Las quitinasas juegan un papel determinante en el proceso de entomopatogénesis al ser un grupo de enzimas capaces de hidrolizar la quitina liberando oligómeros de diversos tamaños y su monómero, la *N*-acetil glucosamina. Al trabajar con biorreactores para el cultivo de microorganismos aerobios con altas demandas de oxígeno, una de las principales limitaciones está asociada a la transferencia de este nutriente (1). La geometría y comportamiento de un biorreactor son características que deben analizarse para llevar a cabo el escalamiento de un proceso (2). En este trabajo se realizó el escalamiento de un proceso de producción de enzimas quitinolíticas en un biorreactor de 3 L a uno de 140 L (Applikon BV, Holanda) utilizando el parámetro K_La (3) como criterio de escalamiento y manteniendo parámetros geométricos similares.

Metodología. Propagación de *L. lecanii* en agar papa dextrosa a 28° C (5 días) y recolección de esporas con Tween 80 (0.01% p/v). Preparación de quitina coloidal con HCl (37% v/v) a 0° C. Preparación y esterilización de medio Czapeck suplementado con quitina coloidal con 12% (p/p) de contenido de proteína cruda. Inoculación de biorreactores con muestreos cada 24 h. Obtención del extracto crudo enzimático por centrifugación, en el sobrenadante se determinó la actividad β -*N*-acetilhexosaminidasa (Nhasa) con *p*-nitrofenil- β -*N*-acetilglucosamina como sustrato y proteína soluble por el método *Lowry-Peterson*. En el pellet, biomasa fue tratada con ácido fosfórico 0.1 M y se le determinó proteína por el método *Lowry-Peterson*. La proteína total, sobrenadante y pellet, fue empleada para estimar el crecimiento fúngico. El K_La fue estimado mediante el método "Gassing out" (3) las condiciones fueron 25 °C, 1 vvm, pH 6 durante 144 h de cultivo (4).

Resultados. En la tabla 1 se presenta una comparación de parámetros geométricos para cada uno de los biorreactores utilizados.

Tabla 1. Comparación de parámetros geométricos nominales y utilizados en el proceso de producción de quitinasas con *L. lecanii*

Biorreactor	NOMINAL						UTILIZADO		
	Altura[m]	Diámetro interno [m]	Volumen total [L]	Volumen trabajo [L]	Volumen mínimo [L]	Ht/Dt	Hi/Dt	Volumen trabajo [L]	Hi/Dt
3 L	0.24	0.128	3.1	2.7	0.5	1.9	1.5	1.7	1.03
140 L	1.158	0.395	140	100	20	3	2.2	50	1.03

Los resultados obtenidos de K_La fueron de 5.97 h⁻¹ y 13.5 h⁻¹ para los biorreactores a escala de 3 L y 140 L, respectivamente. Estos valores de K_La se encuentran en el intervalo óptimo reportado de 5-20 h⁻¹ (4). Existió diferencia significativa ($p < 0.05$ Tukey-Kramer) entre las escalas probadas en proteína total, actividad volumétrica y actividad específica Nhasa (Fig. 1).

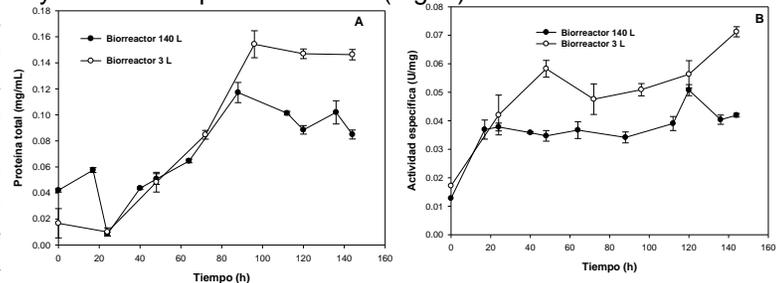


Figura 1. Producción de proteína total (A) y actividad específica Nhasa (B) en biorreactores empleados para el escalamiento de 3 L a 140 L. "Una unidad enzimática es la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto"(5)

En cuanto a la productividad se determinó de 0.49 mU mg⁻¹h⁻¹ \pm 1.24 \times 10⁻⁵ para el biorreactor de 3 L y de 0.43 mU mg⁻¹h⁻¹ \pm 1.65 \times 10⁻⁵ para el de 140 L en los tiempos en que se determinó la máxima actividad enzimática que fueron de 144 h y 120 h para el de 3 L y 140 L, respectivamente.

Conclusiones. Este estudio mostró que el K_La es un factor significativo que influye en el escalamiento de la producción de Nhasa de *L. lecanii*. Asimismo, se determinó que el incremento en el K_La permite alcanzar la máxima productividad Nhasa en menor tiempo de cultivo.

Agradecimientos. Los autores agradecen el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto No. 237292) para la realización de este trabajo.

Bibliografía.

- García-Ochoa F. (2010). *Biochem Eng J.* 49(3):289-307
- Cascaval D., Oniscu C., Turnea M. (2004). *Biochem Eng J.* 20(1): 85-94
- M.Doran Pauline. (1995). "Bioprocess Engineering Principles" Academic Press Limited. 199-227.
- Escobar Sánchez M. (2018). "Determinación del criterio de escalamiento en un cultivo sumergido para la producción de quitinasas de *Lecanicillium lecanii*". Tesis de maestría en Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana 5.
- Tronsmo, A., Harman, GE. (1993). *Anal Biochem.* 208, 74-79.

