



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Escalamiento de un cultivo sumergido para la
producción de enzimas quitosanólíticas de *Lecanicillium
lecanii*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestro en Biotecnología

PRESENTA

I.B.I Yahir Alejandro Cruz Martínez

Matrícula: 2192802281

Comité tutorial

Directora

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Co-Directora

Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica

Dr. Juan Gabriel Viguera Ramírez

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa

Iztapalapa, Ciudad de México, Junio 2021.

Iztapalapa, Ciudad de México, Junio 2021.

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

I. B. I Yahir Alejandro Cruz Martínez

El día 11 de Junio de 2021

Comité tutorial:

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos.

Co-Directora de tesis:

Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica

Asesores:

Dr. Juan Gabriel Vigueras Ramírez

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa

H. Jurado

Presidente: Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Centro de Biotecnología Genómica

Secretario: Dr. Juan Gabriel Vigueras Ramírez

Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa

Vocal: Dra. Alma Guadalupe Villa Lerma

Instituto Tecnológico de Sonora

Vocal: Dr. Jesús Rojas Osnaya

Universidad Autónoma Metropolitana

“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. Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (No. SECTEI / 196/2019).

“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas”

-Albert Einstein

Agradecimientos

Durante el periodo en el que se desarrolló este proyecto de investigación el mundo sufrió una importante e histórica pandemia provocada por el virus SARS-CoV-2. No solo fue complicado lidiar con los problemas que se presentaban día a día en el laboratorio, sino con la incertidumbre que envolvía la simple existencia del virus en la vida fuera del mismo. Agradezco a la Dra. Keiko Shirai por la paciencia, la motivación y la extremada confianza brindada durante este periodo en donde fuimos parte del limitado grupo de personas con la oportunidad de realizar trabajo dentro del laboratorio, de igual forma agradecer por los consejos, tiempo y conocimientos brindados desde la primera vez que coincidimos en una de sus clases. Sin duda, no soy el mismo de hace un par de años, he mejorado mucho, no solo en el ámbito científico del cual confiere este documento, sino que de igual forma lo he hecho como persona; pero en ambos casos se lo atribuyo a la presencia de la Dra. Keiko en mi vida. A la Dra. Zaizy Rocha y al Dr. Jesús Rojas ya que sin los conocimientos cimentados por ellos durante mi estancia de servicio social no hubiese podido llevar acabo de forma correcta y autónoma ninguno de los experimentos realizados, así como el análisis de los datos obtenidos durante los mismos. A la Dra. Patricia por sus propuestas y acertados comentarios sobre el proyecto, por último, pero muy importante, al Dr. Gabriel por su ayuda para poder obtener resultados de interés en el proyecto que yo contemplaba ya perdidos, por sus sabios consejos, por la confianza y por el tiempo invertido.

Por otro lado, agradecer el apoyo de mi compañero y gran amigo el Mtro. Manuel Martínez “Manú”, que siempre me tiendo una mano cuando se requería y que sin él los muestreos de cada domingo hubiesen sido un verdadero dolor de cabeza.

A mi novia y colega la Ing. Jennyfer Hernández por su apoyo incondicional, su tolerancia y paciencia, ya que sin duda el ingresar al posgrado fue un cambio rotundo en nuestras vidas; asimismo darle las gracias por los consejos y la motivación brindada que fueron de suma importancia en esta etapa. Estoy muy orgulloso de ambos por concluir etapa y sé que muchos éxitos más llegarán a nosotros.

Por último, agradecer el apoyo incondicional de mi familia; mi Chiisnky, mi hermana Yadhys y a PCM que, aunque no comprendían mucho de lo que hacía o decía siempre escuchaban mis problemas experimentales, mis datos curiosos y mis presentaciones; y que como siempre en la vida me motivaban a superarme y nunca rendirme por difícil que se pusiera la situación.

Dedicatoria

Esta tesis de maestría va dedicada a mi familia; Rocío, Yadhira, Mauricio y Jennyfer, con una dedicatoria especial para mi querido abuelo Leodegario Martínez, que desde donde quiera que se encuentre sé que me observa y se siente orgulloso.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00288

Matrícula: 2192802281

Escalamiento de un cultivo sumergido para la producción de enzimas quitosanólíticas de *Lecanicillium lecanii*.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 16:00 horas del día 17 del mes de junio del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. CLAUDIA PATRICIA LARRALDE CORONA
DRA. ALMA GUADALUPE VILLA LERMA
DR. JESÚS ROJAS OSNAYA
DR. JUAN GABRIEL VIGUERAS RAMIREZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:


MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

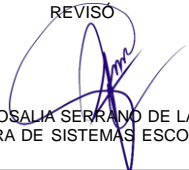
DE: YAHIR ALEJANDRO CRUZ MARTINEZ

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, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.


YAHIR ALEJANDRO CRUZ MARTINEZ
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS


DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICÁLDE

PRESIDENTA


DRA. CLAUDIA PATRICIA LARRALDE
CORONA

VOCAL


DRA. ALMA GUADALUPE VILLA LERMA

VOCAL


DR. JESÚS ROJAS OSNAYA

SECRETARIO


DR. JUAN GABRIEL VIGUERAS RAMIREZ

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	5
1.1. Producción de enzimas por microorganismos	5
1.2. <i>Lecanicillium lecanii</i>	5
1.3. Quitina/Quitosano.....	6
1.4. Enzimas relacionadas con el quitosano	7
1.5. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa " $k_L a$ " como criterio de escalamiento en cultivo sumergido.	11
2. Antecedentes	13
2.1. Quitinasas	13
2.2. Quitosanasas	16
3. Justificación.....	17
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivos	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos específicos	18
6. Metodología	19
6.1. Propagación de microorganismo	20
6.2. Preparación de sustratos	20
6.2.1. Soluciones de quitosano	20
6.3. Actividad quitosanolítica.....	20
6.3.1. Determinación cualitativa.....	20
6.4. Cultivos sumergidos para la producción de quitosanasas.....	20
6.5. Características del biorreactor	21
6.6. Análisis de muestras	22

6.6.1.	Determinación de proteína total	22
6.6.2.	Determinación de la actividad quitosanólítica cuantitativa.....	23
6.6.3.	Determinación de la actividad enzimática con p-Nag.....	23
6.6.4.	Determinación de las condiciones óptimas de actividad quitosanasasa	24
6.6.5.	Determinación del “ $k_L a$ ”:	25
6.6.6.	Densidad y viscosidad	25
6.6.7.	Determinación del N_{Re} , N_P y N_a	26
6.6.8.	Determinación de k_m y V_{max}	27
6.7.	Análisis estadístico	28
6.8.	Rendimiento y productividad	29
7.	Resultados y discusión	30
7.1.	Presencia de actividad quitosanólítica.....	30
7.2.	Cultivos sumergidos en matraz	34
7.2.1.	Crecimiento microbiano.	34
7.2.2.	Azúcares reductores.....	36
7.2.3.	Actividad enzimática	37
7.3.	Cultivos sumergidos en biorreactor.....	39
7.3.1.	Crecimiento microbiano	39
7.3.2.	Azúcares reductores.....	41
7.3.3.	Actividad enzimática	42
7.3.4.	Reología de los medios de cultivo, relaciones geométricas y determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa “ k_{La} ”,.....	44
7.4.	Condiciones de actividad enzimática	47
7.4.1.	Grado acetilación de sustrato y diferente sustrato.	47
7.4.2.	Tiempo de reacción “ T_{Rx} ”	48

7.4.3.	Temperatura.....	48
7.4.4.	pH	49
7.4.5.	Concentración de sustrato.....	51
7.5.	Rendimiento y productividad entre escalas	53
8.	Conclusiones	54
9.	Perspectivas.....	55
10.	Referencias.....	56
	ANEXO A: ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58
	ANEXO B: REACTIVOS, CURVAS PATRÓN Y DIAGRAMAS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	(a) Estructura química del quitosano, (b) Distribución de GlcNAc y GlcN en quitina, (c) quitosano parcialmente desacetilado y (d) quitosano completamente desacetilado. (Recuperado de: Thadathil y col.,2014).	6
Figura 2.	Forma en que las quitinasas actúan sobre la quitina. En color azul se presentan los grupos acetilo.	7
Figura 3.	Tipos de enlace que cada subclase de quitosanasas puede realizar. En color azul se presentan los grupos acetilo.....	9
Figura 4.	Mecanismos de hidrólisis enzimática de enlaces glucosídicos por quitosanasas. (a) Mecanismo de retención y (b) Mecanismo de inversión. (Recuperado de: Thadathil y col.,2014) [Donde Glu: Ácido glutámico y Asp: Ácido aspártico].	10
Figura 5.	Transferencia de un componente en fase gaseosa desde el centro de la burbuja hasta el interior de la célula (Doran y col., 1995).	12
Figura 6.	Esquema de las etapas del proyecto.....	19
Figura 7.	Características del biorreactor (a) Propela Rushton, (b) Geometría y (c) Tapa con baffles, eje con propelas y difusor en “L”.	22
Figura 8.	Diagrama de Lineweaver-Burk, donde la pendiente es el valor de $k_m V_{Max}^{-1}$ y la ordenada al origen es V_{Max}^{-1} . (Recuperado de: Rivera González “Cinética enzimática”)	28

- Figura 9. Comparativo del diámetro promedio de los halos de hidrólisis obtenidos en placa con 10 g L⁻¹ de quitosano con ≠ % GA después de 144 h a 28 °C. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer. 31
- Figura 10. Imágenes de los halos de hidrólisis producidos durante el crecimiento de *L. lecanii* en medio de cultivo suplementado con 10 g L⁻¹ de quitosano con ≠ % GA después de 144 h a 28 °C: (a) 0.03 %, (b) ~5%, (d) 18 y (d) 46.6%..... 31
- Figura 11. Imágenes de los halos de hidrólisis producidos durante el crecimiento de *L. lecanii* en medio de cultivo suplementado con 10 g L⁻¹ de quitosano con GA~5% a 28 °C: (a) 4 días, (b) 12 días y (c) 24 días..... 33
- Figura 12. Comparativo del diámetro promedio de los halos de hidrólisis producidos durante el crecimiento de *L. lecanii* en medio de cultivo suplementado con 10 g L⁻¹ de quitina coloidal o quitosano GA~5% a 28 °C: (a) 4 días, (b) 12 días y (c) 24 días. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer. 33
- Figura 13. Cultivos sumergidos en matraces de 500 mL (Vol. de trabajo: 350 mL) con 5, 10 y 15 g L⁻¹ de quitosano. Condiciones: pH 6, 180 rpm y 25 °C durante 168 h..... 34
- Figura 14. Observaciones al microscopio (40 X) del crecimiento de *L. lecanii* tinción con azul de metileno en diferentes tiempos de cultivo con quitosano GA 5% a 180 rpm y 25 °C: (a) 48 h, (b) 96 h y (c) 144 h. 36
- Figura 15. Cultivos de *L. lecanii* en matraz con quitosano GA~5% durante 168 h a pH 6, 180 rpm y 25 °C con 3 concentraciones de sustrato 5 g L⁻¹(●), 10 g L⁻¹(○) y 15 g L⁻¹ (▼) (a) Crecimiento expresado como proteína total producida, (b) Azúcares reductores presentes en el EC, (c) Actividad quitosanolítica volumétrica y (d) Actividad quitosanolítica específica. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer. 38
- Figura 16. Cultivos de *L. lecanii* en biorreactor con quitosano GA~5% durante 168 h a pH 6, 100 rpm, 1 vvm y 25 °C con 2 concentraciones de sustrato 5 g L⁻¹(●) y 10 gL⁻¹(○): (a) Crecimiento expresado como proteína total producida y % OD, (b) Azúcares reductores presentes en el EC, (c) Actividad quitosanolítica volumétrica y (d) Actividad quitosanolítica específica. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer..... 42
- Figura 17. Cultivos de *L. lecanii* en biorreactor con quitosano GA~5% durante 168 h a pH 6, 100 rpm, 1 vvm y 25 °C con 2 concentraciones 5 g L⁻¹(●) y 10 gL⁻¹(○): (a) Reaireación de biorreactor a 1

vvm y (b) Regresión lineal para la determinación del k_{La} . (5 g L ⁻¹ : m= 0.110, b= -0.174; R ² = 0.976 y 10 g L ⁻¹ : m= 0.094, b= -0.099; R ² = 0.995).....	46
Figura 18. <i>p</i> -nitrofenil- <i>N</i> -acetil- β - <i>D</i> -glucosamina (<i>p</i> -Nag).....	47
Figura 19. Determinaciones de actividad enzimática sobre el EC de 144 h provenientes del cultivo de <i>L. lecanii</i> en biorreactor con 5 g L ⁻¹ de quitosano GA~5% durante 168 h a pH 6, 100 rpm, 1 vvm y 25 °C: (a) Diferentes sustratos [pH 5.5, 15 min a 55 °C], (b) Tiempo de reacción “T _{Rx} ” [GA~5%, pH 5.5, 55 °C], (c) Temperatura [GA~5%, pH 5.5, 15 min] y (d) pH [GA~5%, 15 min a 35 °C]. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer.....	50
Figura 20. Actividad enzimática presente en el EC de 144 h proveniente del cultivo de <i>L. lecanii</i> en biorreactor con 5 g L ⁻¹ de quitosano GA~5% durante 168 h a pH 6, 100 rpm, 1 vvm y 25 °C, con diferentes concentraciones de sustrato (GA~5%): (a) Cinética de M-M y (b) Diagrama de Lineweaver-Burk (m=71.457 y b=29.452; R ² =0.984).	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Quitosanasas microbianas inducidas por quitosano en el medio de cultivo.....	17
Tabla 2-3. Características y dimensiones del biorreactor utilizado para los cultivos sumergidos. ...	21
Tabla 4. Reología y parámetros de interés de los medios de cultivo. (D _a /D _i : Relación diámetro de tanque y diámetro del impulsor, H _L /D _i : Relación altura del líquido y diámetro del impulsor, ρ : densidad, μ : viscosidad dinámica, N _{Re} : Número de Reynolds, N _P : Número de potencia, N _a : Número de aireación, P: Potencia requerida y k_{La} : coeficiente volumétrico de transferencia de masa).....	45
Tabla 5. Rendimientos y productividades de AE, AR y biomasa BM para los cultivos realizados a escala matraz y biorreactor con 5 o 10 g L ⁻¹ de quitosano GA~5%.....	54

Abreviaturas

AE	Actividad enzimática
AR	Azúcares Reductores
COS	Quitooligosacáridos
EC	Extracto crudo
GA	Grado de acetilación
GH	Glicosil hidrolasa
GlcNAc	<i>N</i> -acetil- β -D-glucosamina
GlcN	D-Glucosamina
Hex	β -N-acetilhexosaminidasas
k_{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de masa
k_m	Constante de Michaelis-Menten
M-M	Michaelis-Menten
N_a	Número de aireación
N_p	Número de potencia
N_{Re}	Número de Reynolds
OD	Oxígeno disuelto
rpm	Revoluciones por minuto
SmC	Cultivo sumergido
SSC	Cultivo en estado sólido
T_{Rx}	Tiempo de reacción
V_{Max}	Velocidad máxima
vvm	Volumen de aire por volumen de medio

Resumen

Lecanicillium lecanii es un hongo entomopatógeno capaz de utilizar quitina como única fuente de carbono para producir quitinasas en cultivos sumergidos y sólidos. De acuerdo a la revisión de literatura científica, no existen informes sobre la producción de quitosanas de *L. lecanii*. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de degradación del quitosano de *L. lecanii* mediante la producción de halos de hidrólisis con medio con quitosano como única fuente de carbono con grados de acetilación (GA) de 0.03, 5, 18 y 46.6%. Los halos de hidrólisis más grandes fueron observados con GA de 5%, que se seleccionó para cultivos sumergidos en matraz a 180 rpm, pH 6 y 25°C usando concentraciones de 5, 10 o 15 g L⁻¹ de quitosano. La mayor actividad enzimática se obtuvo a las 144 h y 5 g L⁻¹ (0.078 U mg⁻¹). Posteriormente, los cultivos con 5 y 10 g L⁻¹ se llevaron a cabo en un biorreactor de 3 L a 100 rpm, pH 6, 25° C y 1 vvm. La actividad enzimática se detectó desde las 72 h hasta las 168 h. La mayor actividad quitosanolítica del extracto enzimático crudo (EC) fue detectada a las 144 h en el cultivo con 5 g L⁻¹ (0.210 U mL⁻¹ y 0.152 U mg⁻¹). La productividad de azúcares reductores y actividad enzimática de dicho cultivo fueron 9.38 y 4.18 veces mayores que las obtenidas en matraz. Además, los parámetros característicos de la reología del medio de cultivo se determinaron con números de Reynolds 273.9, potencia 3.1, aireación 0.18. Se demostró que *L. lecanii* es capaz de producir quitosanas induciendo su producción mediante la adición de quitosano como única fuente de carbono en el medio de cultivo, aunque el crecimiento del hongo y la producción de azúcares reductores fue ligeramente menor en los cultivos con 5 g L⁻¹, la actividad enzimática obtenida fue superior, las mejores condiciones para las determinaciones de actividad fueron: quitosano GA~5% a pH 5.5, durante 15 min de reacción a 35 °C utilizando concentraciones ≥0.8% p v⁻¹. Los parámetros cinéticos característicos de la enzima fueron V_{max}= 0.033 μmol min⁻¹ y k_m= 2.43 g L⁻¹.

Abstract

Lecanicillium lecanii is an entomopathogenic fungus able to use chitin as the sole carbon source to produce chitinases in submerged and solid-cultures. There are no reports to the best of our knowledge on *L. lecanii* chitosanase production. Therefore, the aim of this work was the evaluation of *L. lecanii* chitosan degrading capacity by the production of hydrolysis halos with added chitosan media (degrees of acetylation (DA) of 0.03, 5, 18, and 46.6%. The largest diameter of the hydrolysis halo was observed with DA=5, which was selected for further flask-submerged cultures at 180 rpm, pH 6, and 25°C using 5, 10, or 15 g L⁻¹ concentrations of chitosan. The highest enzymatic activity was obtained at 144 h and 5 g L⁻¹ (0.078 U mg⁻¹). Subsequently, cultures with 5 and 10 g L⁻¹ were carried out in a 3 L-bioreactor at 100 rpm, pH 6, 25°C, and 1 vvm. The enzymatic activity was detected from 72 h to 168 h. The highest chitosanalytic activity of the crude enzyme (CE) was detected at 144 h in culture with 5 g L⁻¹ (0.210 U mL⁻¹ & 0.152 U mg⁻¹). The productivity of reducing sugars and enzymatic activity of this culture were 9.38 and 4.18 fold higher than obtained in flask. It was shown that *L. lecanii* is capable of producing chitosanases by inducing its production by adding chitosan as the only carbon source in the culture media, although the growth of the fungus and the production of reducing sugars was slightly lower in the cultures with 5 g L⁻¹, the enzymatic activity obtained was higher, the best conditions for the activity determinations were: chitosan GA ~ 5% at pH 5.5, during 15 min of reaction at 35 ° C using concentrations ≥0.8% p v⁻¹. The characteristic kinetic parameters of the enzyme were V_{max} = 0.033 μmol min⁻¹ and k_m = 2.43 g L⁻¹.

1. Introducción

1.1. Producción de enzimas por microorganismos

Los microorganismos son productores de una gran variedad de enzimas, dicha producción puede llevarse a cabo de dos formas distintas dependiendo de la intensidad con las que se producen, cuando la velocidad de formación es constante e independientemente de las condiciones externas son conocidas como enzimas “constitutivas”, por otro lado, cuando la producción depende de las condiciones externas, en particular de su relación con el medio de cultivo son conocidas como enzimas “adaptativas”, dentro de este grupo se presentan las enzimas “inducidas” las cuales su producción depende de la presencia de sustratos específicos o bien, compuestos que son químicamente similares los cuales son llamados “inductores” y que se utilizan como única fuente de carbono (Madigan y col.,2004). Lo que significa que la producción enzimática puede ser una respuesta inducida por la presencia de sustratos complejos, las enzimas producidas bajo estas condiciones se utilizan como herramienta catalizando la descomposición de los sustratos complejos en compuesto de fácil asimilación. Sin embargo, los microorganismos solo pueden producir estas enzimas a expensas del crecimiento y metabolismo si la disponibilidad de nutrientes fácilmente asimilables es escasa (Asmar y col.,1994; Sinsabaugh y col.,1994).

1.2. *Lecanicillium lecanii*

L. lecanii es un hongo filamentoso aerobio que se ha utilizado como agente de control biológico (uso de organismos antagonistas en la supervivencia de patógenos), dentro de estos agentes de control biológico también se encuentran virus, bacterias, nematodos y protozoarios, además de otros hongos (Cederkvist y col., 2008). 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 en plantas debido a que sigue la vía típica de patogénesis de hongos entomopatógenos (Goettel y col., 2008), por lo tanto, tiene la capacidad de hidrolizar la quitina que forma parte del exoesqueleto de artrópodos y de la pared celular de hongos, debido a la producción de enzimas quitinolíticas. Cabe mencionar que las bacterias y los hongos parecen ser los descomponedores dominantes de quitina, y

juegan un papel esencial en los ciclos biogeoquímicos de carbono y nitrógeno en la naturaleza (Keyhani y Roseman y col., 1999).

1.3.Quitina/Quitosano

La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes en la tierra y está altamente disponible como material de desecho de la industria del camarón. Consiste en una cadena lineal de unidades de *N*-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc) unidas por enlaces glucosídicos β -1,4. Los derivados de la quitina parcial o completamente desacetilados son llamados quitosano, de hecho, la palabra quitosano define una gran familia de biopolímeros con diferentes relaciones GlcN-GlcNAc, que se describen como no tóxicos, biodegradables y biocompatibles (Rinaudo y col., 2015). Generalmente se obtienen mediante la desacetilación artificial de quitina en presencia de álcali o por reacción enzimática mediante el uso de enzimas desacetilasas. Este derivado de la quitina es más bioactivos que la molécula original debido a los grupos amino libres en su estructura y su solubilidad a pH ácido.

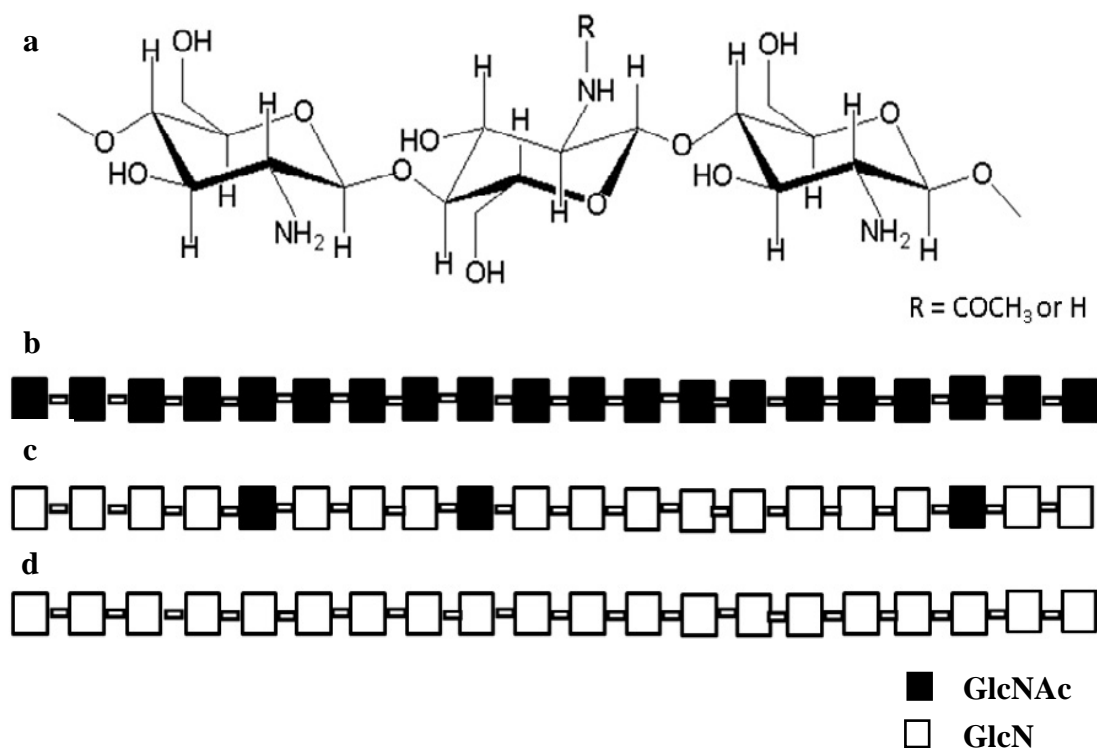


Figura 1. (a) Estructura química del quitosano, (b) Distribución de GlcNAc y GlcN en quitina, (c) quitosano parcialmente desacetilado y (d) quitosano completamente desacetilado. (Recuperado de: Thadathil y col.,2014).

1.4. Enzimas relacionadas con el quitosano

Las quitinasas (EC 3.2.1.14) son enzimas que forman parte de la familia glicosil hidrolasas; que pueden descomponer el polímero de quitina hidrolizando los enlaces glucosídicos β -(1,4) liberando componentes oligo y monoméricos.

La hidrólisis completa de quitina en monómeros de GlcNAc requiere la acción de dos sistemas sinérgicos y consecutivos: Endoquitinasas que producen oligómeros solubles de bajo peso molecular como la quitotriosa, quitotetraosa y la 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, dentro de éstas, se encuentran las quitobiosidasas (EC 3.2.1.29), 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).

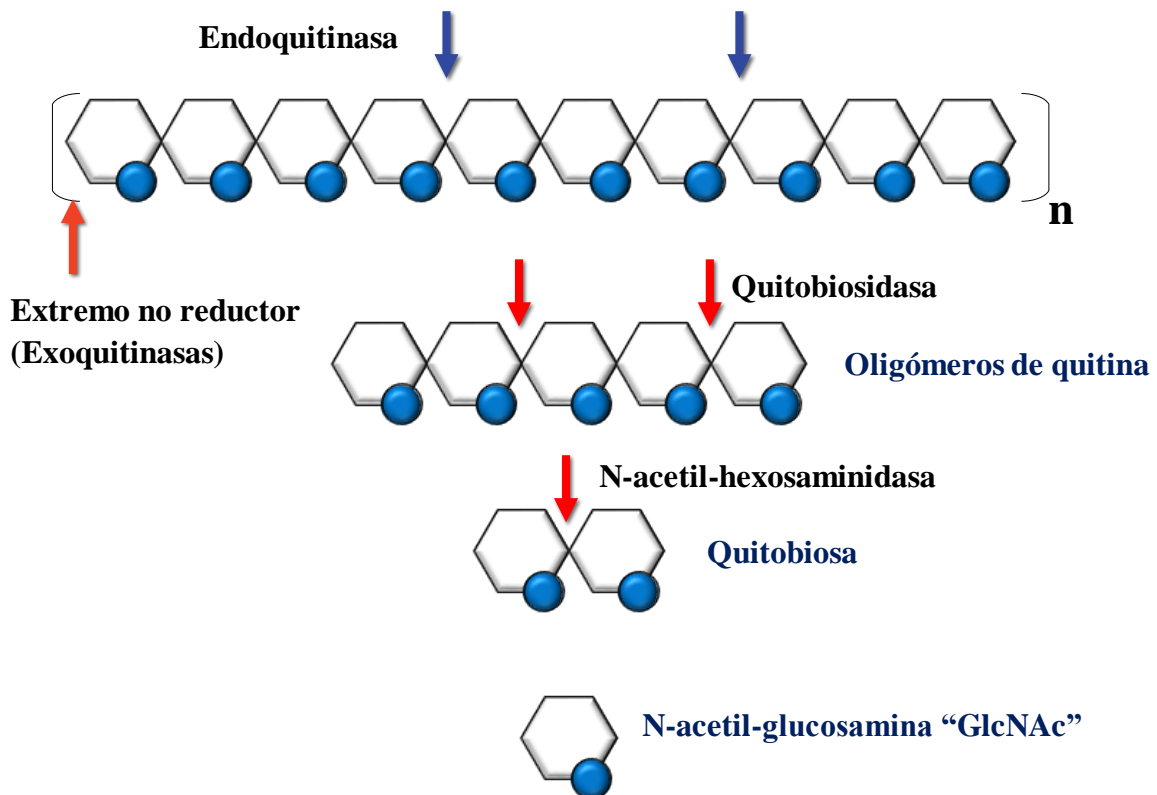


Figura 2. Forma en que las quitinasas actúan sobre la quitina. En color azul se presentan los grupos acetilo.

Las β -N-acetilhexosaminidasas en bacterias se encuentran como un monómero proteico, con una masa molecular de ~150 kDa, mientras que, en hongos, se encuentran en forma de dímero con una masa molecular en el rango de 11-150 kDa (Scigelova y Crout, 1999). Los genes fúngicos de quitinasa están compuestos por cinco dominios, que incluyen el dominio catalítico, el dominio de unión a quitina, el dominio rico en serina / treonina, la región del péptido señal N-terminal y la región de extensión C-terminal (Hamid y col., 2013).

Las quitosanasas (EC 3.2.1.132), al igual que las quitinasas pertenecen a la familia de las GH, hidrolizan los enlaces glucosídicos β -(1,4) entre las unidades GlcNAc y GlcN de quitosano (Zhu y col., 2007). La quitosanasas son producida por microbios y plantas, donde desempeñan un papel importante en la nutrición y la defensa. La quitosanasa se describió por primera vez en 1973 a partir de diferentes microorganismos del suelo. Durante los últimos 40 años, se han publicado varios trabajos de investigación sobre la aparición, producción, purificación y caracterización de quitosanasas de diferentes microorganismos, tales como bacterias, hongos y cianobacterias; así como de plantas. (Somashekar y col., 1996). La mayoría de las quitosanasas se caracterizan por masas moleculares, que van desde 20 a 75 kDa. La clasificación de las quitosanasas se divide en cuatro distintas clases de acuerdo con su especificidad hacia determinado sustrato; todas las quitosanasas pueden romper el enlace entre dos unidades GlcN; las enzimas de la subclase I separan adicionalmente los enlaces GlcNAc-GlcN, se cree que las enzimas de la subclase II separan solo el enlace GlcN-GlcN, mientras que las enzimas de la subclase III cortan adicionalmente los enlaces GlcN-GlcNAc (Fukamizo y col., 1994). Las enzimas de la subclase IV pueden escindir los tres tipos de enlaces, pero como todas las quitosanasas, no escinden los enlaces GlcNAc-GlcNAc (Hirano y col., 2012).

Las quitosanasas también se pueden clasificar en dos categorías principales (endoquitosanasas y exoquitosanasas), de acuerdo con sus sitios de escisión. Las endo quitosanasas (EC 3.2.1.132; creado en 1990, modificado en 2004) cortan al quitosano parcialmente acetilado al azar y producen COS. Las exoquitosanasas generalmente se llaman exo-1,4- β -D-glucosaminidasa (GlcNase, EC 3.2.1.165; creado en 2008), que libera los residuos de GlcN o GlcNAc continuamente del extremo no reductor del sustrato.

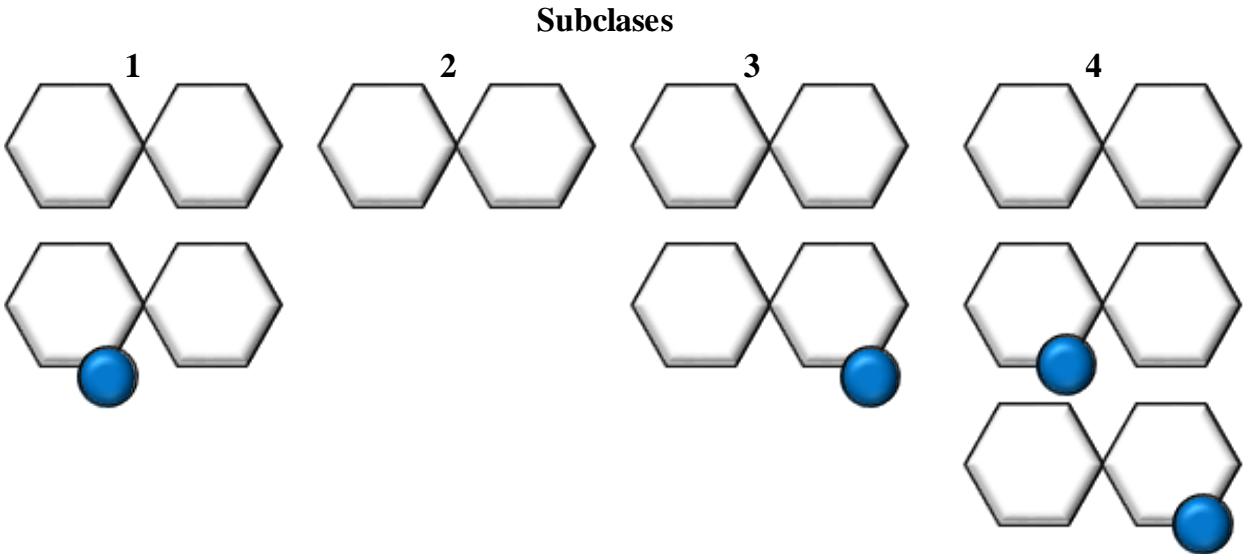


Figura 3. Tipos de enlace que cada subclase de quitosanasas puede realizar. En color azul se presentan los grupos acetilo.

Las quitosanasas pertenecen a cinco familias de las GH: GH-5, GH-8, GH-46, GH-75 y GH-80, clasificadas según sus secuencias de aminoácidos. Entre estas familias, las quitosanasas GH-46, especialmente las de *Bacillus* y *Streptomyces*, se han estudiado ampliamente en términos de sus características catalíticas, mecanismos enzimáticos y estructuras proteicas. Las quitosanasas GH-75 son otra familia importante de quitosanasas; los miembros que pertenecen a esta familia son principalmente de origen fúngico (Wang y col., 2008).

Con base en la configuración anomérica del protón C1 del azúcar final reductor obtenido de los productos enzimáticos, las quitosanasas pueden implicar diferentes tipos de catálisis: ya sea el mecanismo de retención (*Figura 4a*) o el mecanismo de inversión (*Figura. 4b*). Las glicosidasas de retención catalizan la hidrólisis a través de un mecanismo de doble desplazamiento de dos pasos con uno de los dos residuos de aminoácidos esenciales funcionando como un nucleófilo y el otro como un ácido / base general. Por el contrario, las glicosidasas inversoras siguen un mecanismo de desplazamiento único de un solo paso con la ayuda de un ácido general y una base general. La base general polariza una molécula de agua para desarrollar un nucleófilo más fuerte para atacar el carbono anomérico, mientras

que el ácido general protona el oxígeno glucosídico para acelerar la reacción. Las configuraciones inversoras se han verificado experimentalmente para GH-8 y GH-46. También se infiere que GH-80 es una enzima inversora. Sin embargo, la estereoquímica catalítica de la enzima GH-75 sigue siendo desconocida (Fukamizo et al., 2000).

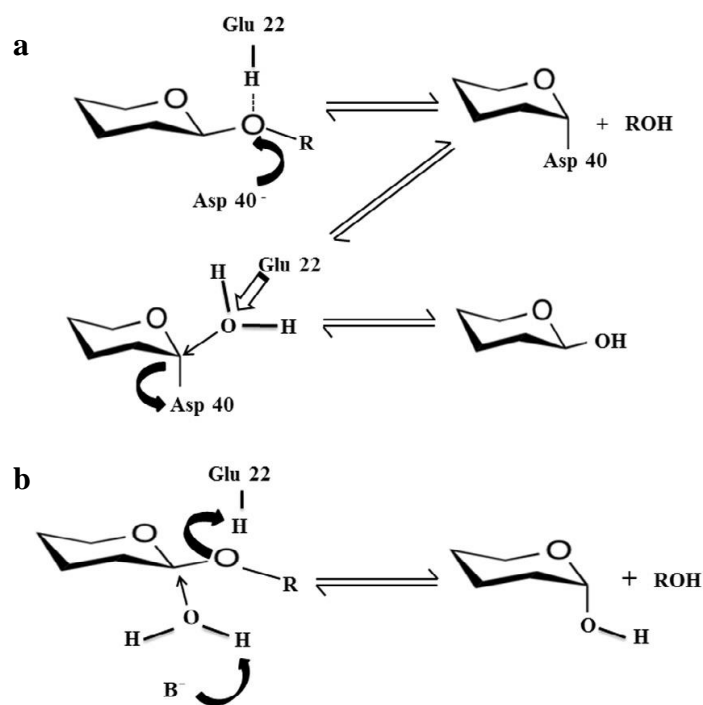


Figura 4. Mecanismos de hidrólisis enzimática de enlaces glucosídicos por quitosanasas. (a) Mecanismo de retención y (b) Mecanismo de inversión. (Recuperado de: Thadathil y col.,2014) [Donde Glu: Ácido glutámico y Asp: Ácido aspártico].

La mayoría de las quitosanasas no pueden actuar sobre el quitosano sólido / cristalino, por lo que el quitosano coloidal, soluble o el glicol quitosano se utilizan generalmente como sustratos para los ensayos de quitosanasas (Somashekar y col., 1996). La actividad de la quitosanasa está influenciada por varios factores, como el grado de acetilación del quitosano “GA”, la viscosidad y concentración de la solución de quitosano, el tipo de ácido utilizado para disolver el quitosano, la cantidad de enzima y otras condiciones de reacción como el pH, la temperatura y la agitación. La actividad de la quitosanasa se puede determinar midiendo la reducción de la viscosidad del sustrato, aunque es un método insensible. La estimación cuantitativa de azúcares reductores “AR” o amino azúcares producidos a partir

de sustratos de quitosano es el método comúnmente utilizado para determinar la mayor parte de la actividad quitosanasa. (Thadathil y col.,2014).

El uso de quitosanasas en la preparación de COS generalmente no requiere la purificación de la enzima, pero se requieren quitosanasas en su forma purificada para estudiar las propiedades bioquímicas, las relaciones de función-estructura y sus aplicaciones biotecnológicas. La purificación de quitosanasas de fuentes microbianas en la mayoría de los casos ha involucrado métodos clásicos de purificación de enzimas. Estos métodos implican la eliminación de biomasa microbiana del caldo de cultivo, precipitación / concentración selectiva por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o disolventes. La quitosanasa concentrada se somete además a cromatografía, comúnmente filtración en gel, intercambio iónico, técnicas de afinidad, etc.

1.5.Coeficiente volumétrico de transferencia de masa “ k_La ” como criterio de escalamiento en cultivo sumergido.

El comportamiento de los cultivos bioquímicos está fuertemente influenciado por una serie de fenómenos de transferencia. Es posible que un determinado cultivo, en especial los aerobios, estén limitados en sus posibilidades de mejorar su rendimiento y productividad, por razones propias de las características de las células además de problemas al satisfacer su alta demanda de transferencia de masa, en especial la de oxígeno. Debido a la baja solubilidad del O_2 en agua (10 ppm a 15°C) y a que los microorganismos son capaces de utilizar solamente el O_2 disuelto, por lo que es necesario ser suministrado continuamente al medio de cultivo. El proceso para lograrlo consta de varias etapas, ya que es necesario transferir O_2 desde la fase gaseosa (normalmente aire) a la fase líquida (medio de cultivo) de modo permanente.

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.

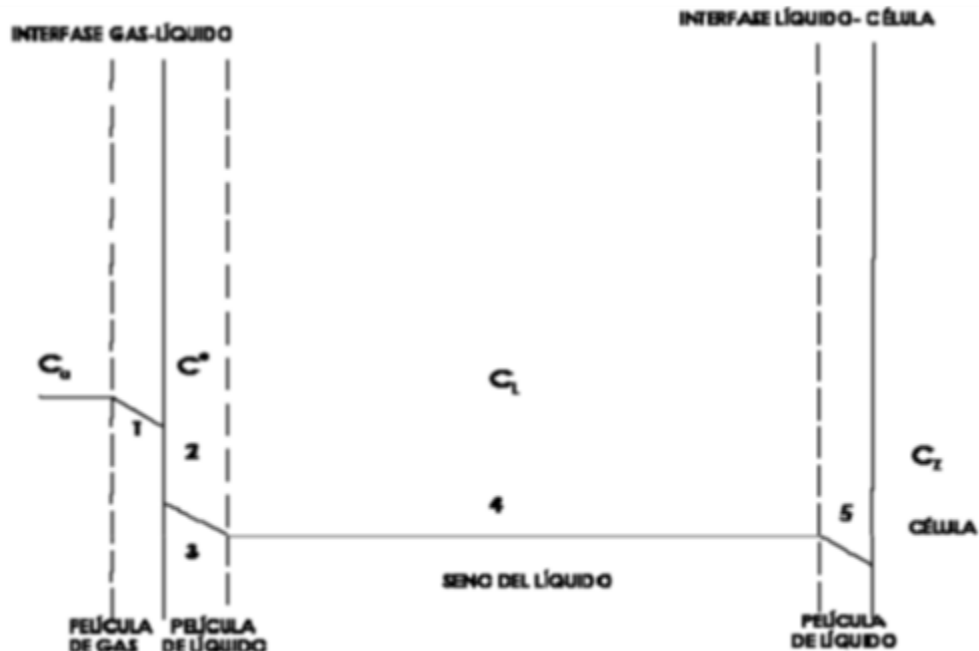


Figura 5. Transferencia de un componente en fase gaseosa desde el centro de la burbuja hasta el interior de la célula (Doran y col., 1995).

El problema del cambio de escala de un proceso es uno de los aspectos de mayor importancia, no sólo en los cultivos bioquímicos sino en la industria en general. Se han escogido varios criterios para efectuar el cambio de escala, todos ellos basados en resultados empíricos (Aiba y col., 1973). Se plantea que para tanques agitados geoméricamente similares, con medio y propiedades físicas constantes, los criterios más utilizados son: potencia por unidad de volumen (PV^{-1}) y el coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$) (Quintero y col., 1993).

El $k_L a$ 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 , $k_L a$ 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, $PO_2 = HC^*$ 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 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 mismo. El $k_L a$ podría mejorarse aumentando la aireación y/o la agitación, pero con limitaciones técnicas y fisiológicas relacionada con la productividad y rendimiento del microorganismo (Fenice y col., 2012).

2. Antecedentes

2.1. Quitinasas

L. lecanii ha sido reportado como productor extracelular de quitinasas en cultivo sumergido y sólido utilizando quitina como inductor (Matsumoto y col., 2004; Marín y col., 2008; Rocha-Pino y col., 2011). Matsumoto y col. (2004) reportaron una alta producción de β -N-acetilhexosaminidasas 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. Por otro lado, se sabe que 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).

Matsumoto y col (2004) demostraron que utilizando desechos de camarón provenientes de un proceso de ensilado como sustrato inductor se observaba una mayor producción de β -N-acetilhexosaminidasas provenientes de *Verticillium lecanii* ATCC 26854 (nombre antiguo de *Lecanicillium lecanii*) en cultivo sumergido y sólido, con respecto a cultivos suplementados con sacarosa como única fuente de carbono. También observaron que el rendimiento en la

producción de β -N-acetilhexosaminidasas fue inferior en cultivo sumergido (SmC) comparado con el cultivo en estado sólido (SSC); aunque en este último se obtuvo un extracto enzimático más concentrado también se observaron trazas del soporte y del proceso de ensilado lo que se informa interfiere con el proceso de purificación de dichas enzimas, por último, se informó que el uso de micelio pre-cultivado de *L.lecanii* mejora los rendimientos de producción de enzimas debido a que la etapa de adaptación se reduce significativamente. Por otro lado, Rocha Pino y col (2011) identificaron la presencia de actividad de diferentes enzimas quitinolíticas provenientes de *Lecanicillium lecanii* ATCC 2149 utilizando un medio compuesto por sales minerales y suplementado con fructosa ó quitina coloidal como inductor, tanto en SmC como en SSC (Espuma de poliuretano), debido a la ausencia de actividad quitinolítica en los cultivos suplementados con fructuosa llevaron a cabo zimogramas sobre el extracto crudo semi purificado proveniente de los cultivos inducidos con quitina coloidal en donde encontraron la presencia de exoquitinasas de peso molecular 31 y 51 kDa respectivamente, endoquitinasa de 26 kDa y Hex de 61,80,96 y 111 kDa para el SSC; en cuanto al SmC determinaron la presencia de exoquitinasas de peso molecular 32 y 45 kDa, respectivamente, endoquitinasas de 10 y 26 kDa así como Hex de 61,96 y 111 kDa. En última instancia se informó que la actividad reportada por Hex del cultivo en estado sólido (7.58 U mg⁻¹) triplicó la actividad observada en las obtenidas en cultivo sumergido (2.73 U mg⁻¹). Teniendo como conclusión que el tipo de sistema influye en la producción de enzimas quitinolíticas, lo cual puede ser atribuido a las diferencias de difusión de oxígeno y transferencia de masa.

Por su parte, Villa-Lerma y col., (2013), estudiaron la producción de Hex de *L. lecanii* ATCC 26854 en medio Czapeck suplementado con quitina coloidal en condiciones de agitación (102 rpm) y 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 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.

Se ha informado que 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 Hex y Endoquitinasa (Endo) respectivamente. La mayor producción de Hex 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. Adicionalmente, Rojas-Osnaya y col., en 2015 reportan el sinergismo observado de las enzimas quitinolíticas producidas por *L. lecanii*, ya que se reportaron que la mayor producción volumétrica de Hex (96 h) se obtiene cuando existe un descenso de la actividad Endo.

Por último, y como antecedente directo a este proyecto Escobar-Sánchez y col (2018) determinó las condiciones y el criterio de escalamiento para el proceso de producción de enzimas quitinolíticas de *L.lecanii* en un biorreactor de 3 L (volumen de trabajo 53%) determinando el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_La) y el número de Reynolds (N_{Re}) utilizando diferentes velocidades de agitación así como volúmenes de aire suministrados al cultivo, pues deseaba conocer el comportamiento del cultivo en el tiempo (cambio de viscosidad) así como la relación de dichas variaciones con la productividad quitinolítica.

Al realizar diferentes tratamientos utilizando quitina coloidal con 4.8% de proteína residual, observó que la mayor productividad fue en condiciones de 100 rpm de agitación y 1vvm de aireación obteniéndose una actividad Hex 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 N_{Re} de 38.1.

Como criterio de escalamiento al comparar las curvas de productividad obtenidas a diferentes condiciones de agitación y aireación respecto a los criterios k_La y N_{Re} , se observa que k_La

es un criterio más relevante ya que se logró determinar que la variación del $k_L a$ influye sobre la productividad, en donde existe una región efectiva de escalamiento que va de los 5-20 h⁻¹, sin embargo, con N_{Re} observó que al variar el nivel de agitación y aireación para los tratamientos el N_{Re} se mantiene constante concluyendo que no tiene efecto directo sobre la productividad. Cabe mencionar que se sugiere utilizar quitina coloidal con 10-12% de proteína residual pues se observan mejoras en la productividad quitinolítica.

2.2. Quitosanasas

Hasta el momento no se tienen antecedentes directos sobre la producción, y por consecuencia de la caracterización de enzimas quitosanólíticas provenientes de *Lecanicillium lecanii*, pero como se muestra en la tabla 1 se ha reportado la producción de dichas enzimas por diferentes tipos de microorganismos; principalmente bacterias y hongos, los cuales fueron inducidos con diferentes formas de quitosano los cuales se encontraban inmersos en cada uno de los medios de cultivo. Recientemente, da Silva y col., (2012) reportaron la producción y optimización de una quitosanasas extracelular por el hongo *Trichoderma koningi* bajo SSC, el rendimiento máximo de la quitosanasas fue de 4,84 U g⁻¹ de sustrato seco y se logró utilizando una mezcla de 3,0 g de salvado de trigo y 1,5 g de quitosano como sustrato sólido. Por otro lado, se debe destacar que Fernandes de Assis y col (2010) reportaron presencia de actividad quitosanólíticas en el extracto crudo obtenido mediante cultivo sumergido utilizando el hongo *Metarhizium anisopliae* en un medio mineral suplementado con extracto de levadura (0.5%), peptona (0.2%) e inducido por la presencia de quitosano (0.2%), obteniendo una actividad específica máxima de 2.5 U L⁻¹ a las 48 h de cultivo. Cabe mencionar que dichos microorganismos al igual que *L. lecanii* pertenecen a la clasificación de hongos entomopatógenos, lo que da un panorama positivo a que si se modifica el medio de cultivo utilizado con éxito para la producción de enzimas quitinolíticas de *L. lecanii* (Rojas-Osnaya y col., 2015) con la adición de quitosano como inductor se observe la presencia de actividad quitosanólítica de igual forma.

Tabla 1. Quitosanasas microbianas inducidas por quitosano en el medio de cultivo.

Organismo	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Peso molecular (kDa)	Referencia
<i>Bacillus licheniformis</i> MB-2	6.1-7	70	75	(Ekowati y col.,2006)
<i>Paenicabillus</i> sp.1794	4.8	80-85	40	(Zitouni y col.,2013)
<i>Mucor circinelloides</i>	5.5-6	37	42	(Struszczyk y col.,2009)
<i>Aspergillus</i> QD-2	5.6	55-60	ND	(Zhang y col.,2012)
<i>Grogronella</i> sp. JG	5.6	55-60	28	(Wang y col.,2008)
<i>Serratia marcescens</i>	5	50	21	(Wang y col.,2008)
<i>Anabaena fertilissima</i>	7.5	27	ND	(Gupta y col.,2012)
<i>Streptomyces reseolus</i>	5	50	41	(Jiang y col.,2012)
<i>Bacillus cereus</i> D-11	6	60	41	(Gao y col.,2008)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> TKU024	6	50	27	(Wang y col.,2011)
<i>Straphylococcus capitis</i>	7	30	35	(Sun y col.,2018)

3. Justificación

La producción de quitosanasas ha llamado la atención de los investigadores por su aplicación en la producción de oligómeros de quitosano que presentan mejor bioactividad que el biopolímero (actividad antitumoral, antioxidante, antibacterial, así como efectos inmunoestimulantes).

Se ha trabajado arduamente por intentar reducir los costos de producción; en este trabajo se utilizó como sustrato inductor quitosano proveniente de quitina obtenida biológicamente de residuos de camarón, lo cual le confiere una ventaja tanto en costos como en la etapa de escalamiento.

El uso del hongo *L. lecanii* en cultivo sumergido para la producción de quitosanasas presenta ventajas, principalmente en el control de sus parámetros operacionales como pH, temperatura, agitación, aireación y requerimientos nutricionales.

No existen datos reportados sobre la producción de quitosanasas provenientes de *L. lecanii*, lo que le confiere un enfoque llamativo a este estudio puesto ya que actualmente en el mercado comercial solo existen quitosanasas producidas por bacterias como *Streptomyces griseus* y *Streptomyces* sp.

4. Hipótesis

Lecanicillium lecanii tiene la capacidad de hidrolizar quitosano y utilizarlo como inductor para la producción de quitosanasas manteniendo o aumentando su productividad de matraz a biorreactor.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

- Estudiar un proceso de producción de enzimas quitosanólíticas de *Lecanicillium lecanii* en placa y en cultivo sumergido.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto del GA del quitosano que favorezca la producción de quitosanasas.
- Estudiar el efecto de la concentración del quitosano como única fuente de carbono en la actividad enzimática.
- Producir las quitosanasas comparando su crecimiento, actividad enzimática, rendimientos y productividades de *L. lecanii* durante el escalamiento.
- Comparar los valores estimados de los coeficientes volumétricos de transferencia de masa " $k_L a$ " obtenidos en los cultivos con quitosano.
- Determinar los parámetros cinéticos de actividad quitosanasasa de los extractos crudos enzimáticos con sustratos con diferente % GA, temperatura, pH, y concentración de sustrato.

6. Metodología

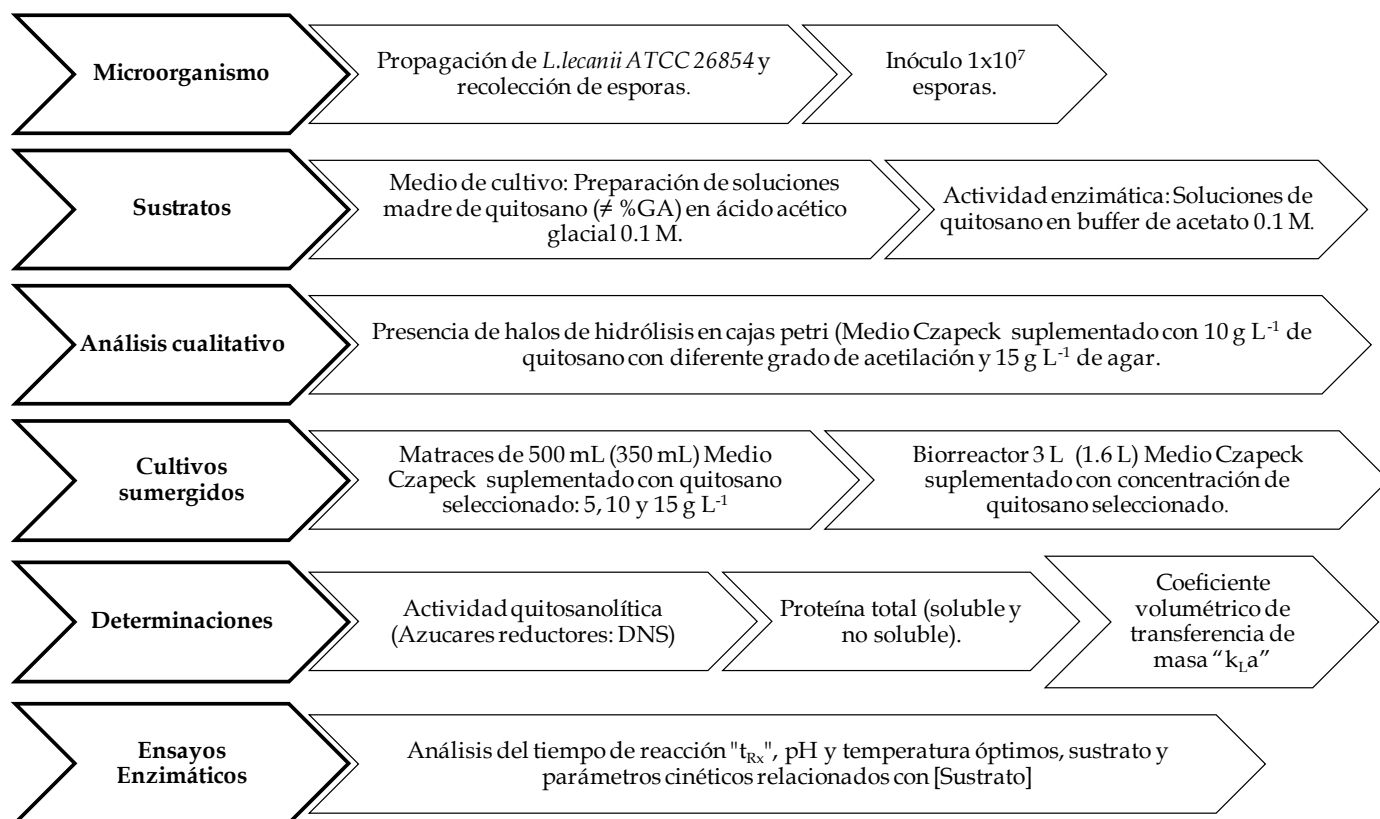


Figura 6. Esquema general de las etapas del proyecto

6.1. Propagación de microorganismo

La cepa *L. lecanii* ATCC 26854 se propagó en agar papa dextrosa (PDA) a 28°C durante 7 días. La preparación del inóculo se realizó a partir de la agitación mecánica de los cultivos esporulados en PDA (7 días) con una solución de Tween 80 (0.01% p v⁻¹) con una concentración final de 1x10⁷ esporas mL⁻¹, que se determinó 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.

6.2. Preparación de sustratos

6.2.1. Soluciones de quitosano

Cada uno de los quitosanos a trabajar (grado acetilación: 0.03, ~5, 18 y 46.26%) se disolvieron en una solución de ácido acético glacial 0.1 M y se dejaron en agitación hasta que se logró la apariencia característica esperada (apariencia y consistencia similar a miel).

6.3. Actividad quitosanólítica

6.3.1. Determinación cualitativa

La actividad quitosanólítica cualitativa se determinó mediante la producción y medición de halos de hidrólisis observados por el crecimiento de *Lecanicillium lecanii* en cajas petri con medio de cultivo Czapeck suplementados con 10 g L⁻¹ de quitosano en solución con los diferentes grados de acetilación, junto con 15 g L⁻¹ de agar. El pH se ajustó a 6, el control fue con sacarosa. Ya que solidificó el medio, se realizaron pozos en las placas y se inocularon 15 µL de solución de esporas con 10⁷ esporas por mL y se incubaron a 28°C durante 144 h (Saksirirat y Hoppe,1991; Fenice y col.,1996).

6.4. Cultivos sumergidos para la producción de quitosanasas.

Se utilizó la suspensión de esporas de *L. lecanii* ATCC 26854 como inóculo (10⁷ esporas mL⁻¹) para cada uno de los cultivos sumergidos a realizados. En primera instancia se emplearon matraces Erlenmeyer de 500 mL utilizando medio Czapeck suplementado con 5 y 10 g L⁻¹

de quitosano previamente seleccionado en el análisis cualitativo, las condiciones de los cultivos fueron: 180 rpm, pH 6 y 25° C durante 168 h. Posteriormente con la concentración de quitosano seleccionada (presencia de mayor actividad quitosanólítica) se realizaron cultivos en un biorreactor de 3 L (Applikon BV, Holanda) donde se evaluó el efecto de un flujo constante de aireación (1 vvm) en el crecimiento del microorganismo así como en su productividad enzimática manteniendo constante agitación de 100 rpm, pH 6 y 25°C, durante 168 h (Tabla 2). Para los cultivos sumergidos llevados a cabo en biorreactor se realizó la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa “ $k_L a$ ” a las 168 h del proceso, asimismo las determinaciones de densidad y viscosidad del medio de cultivo (t_0 y t_{168}) y por último se calculó el número de aireación (N_a), número de Reynolds (N_{Re}), número de potencia (N_p), D_a/D_i , H_L/D_i y la Potencia (P).

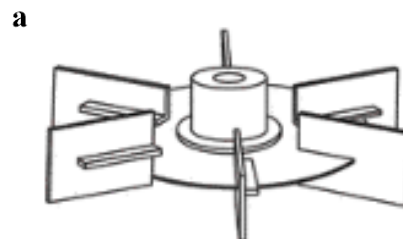
La composición del medio Czapeck en g L⁻¹ fue: NaNO₃ (3.73), K₂HPO₄ (3.0), MgSO₄ (0.5), FeSO₄ (0.096), KCl (0.5), el pH de los cultivos fue ajustado a 6 mediante la adición de HCl (0.1 N) o NaOH (0.1 N). Se realizaron muestreos cada 24 horas los cuales fueron centrifugados (10,000 rpm a 4 °C por 15 min) para la obtención del extracto crudo (EC), sobre éste se realizó la determinación de proteína soluble, azúcares reductores y la actividad quitosanólítica. El pellet obtenido fue tratado para la determinación de proteína no soluble siguiendo el procedimiento mencionado en el punto 6.6.2.

6.5. Características del biorreactor

Para el desarrollo de este escalamiento se trabajó en matraces de 500 mL y en un biorreactor de 3 L (Applikon BV, Holanda) con las siguientes características:

Tabla 2-3. Características y dimensiones del biorreactor utilizado para los cultivos sumergidos.

Vol. Nominal	Impulsor	Baffles	Difusor aire
3.1 L	Rushton	3	Forma "L"



Dimensiones	Abreviación	Biorreactor 3L
		[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 total	H_t	240

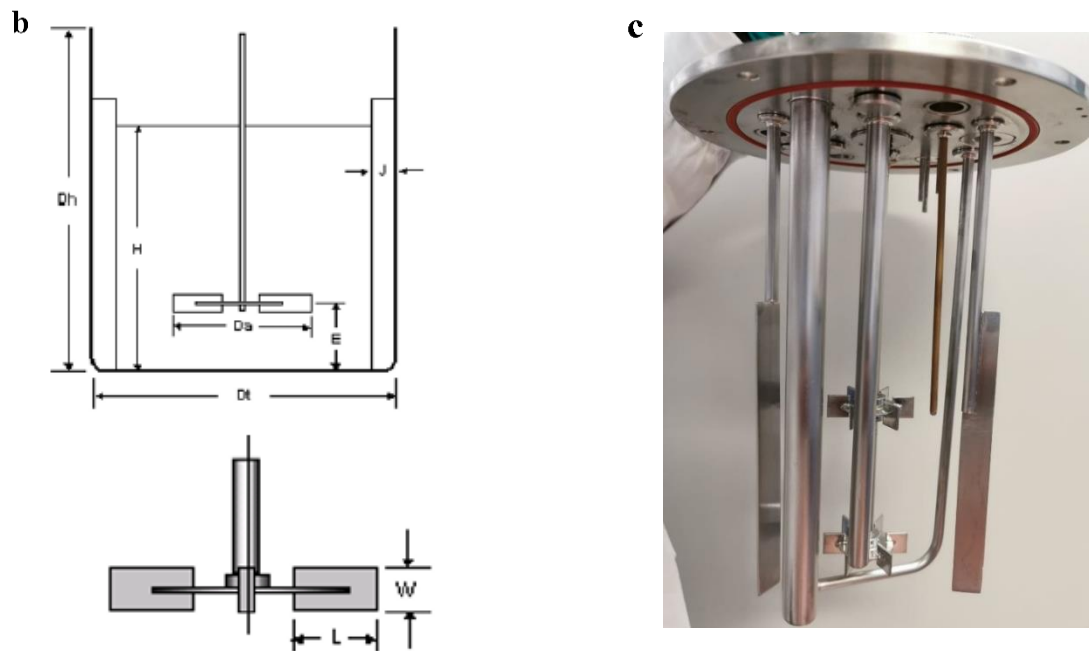


Figura 7. Características del biorreactor (a) Propela Rushton, (b) Geometría y (c) Tapa con baffles, eje con propelas y difusor en “L”.

6.6. Análisis de muestras

6.6.1. Determinación de proteína total

- Soluble: La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry-Peterson (1977) ; una mezcla conformada por 0.5 mL de reactivo Lowry A y 0.5 ml de extracto

crudo previamente tratado por digestión con 1 mL de NaOH 1 N en baño maría por 20 min (1 mL de EC + 1 mL NaOH), se mezclaron y se incubaron por 25 min a 25 °C, posteriormente se añadió 0.25 mL reactivo B (Fenol-Folin Ciocalteu) en proporción 1:1 con agua desionizada, se agitó y se llevó a incubación por 30 min a 25 °C y posteriormente se midió la absorbancia a 750 nm.

- No soluble: El pellet recuperado del centrifugado de cada muestreo se trató con ácido fosfórico 0.1 M, se tomaron 2 g de material húmedo y se adicionaron 5 mL de ácido fosfórico (0.1 M), se llevaron a agitación vigorosa en Vortex y se colocaron en baño maría por 7 min (ebullición). Se llevó a cabo una segunda centrifugación a 10,000 rpm por 15 min a 4 °C y al sobrenadante se le realizó la determinación de proteína por el método de Lowry-Peterson (1977).

6.6.2. Determinación de la actividad quitosanólítica cuantitativa

Se determinó en el EC del cultivo sumergido mediante la cuantificación de los azúcares reductores generados por la hidrólisis del quitosano. En este caso, 150 µL del extracto se mezclaron con 150 µL de solución de quitosano GA~5% (1% p v⁻¹) solubilizada en buffer de acetato (0.1 M) a pH 5.5. La reacción se llevó a cabo durante 15 minutos a 55 ° C. Para terminar la reacción, se añadieron 300 µL de ácido dinitrosalicílico y se colocó a baño maría durante 10 minutos, luego se dejó enfriar en baño de hielo y se añadió 2.4 mL de agua destilada, posteriormente se midió la absorbancia a 575 nm (Miller y col.,1959). La cuantificación de los azúcares reductores se realizó mediante una curva estándar con GlcN, se utilizará la definición: *“Una unidad (U) de quitosanasas se define como la cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 µmol de azúcar reducido equivalente a la quitosano D-glucosamina / min.”*

6.6.3. Determinación de la actividad enzimática con p-Nag

La presencia de actividad quitosanasas en los extractos enzimáticos también se determinó usando *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -*D*-glucosamina (*p*-Nag) (Sigma Aldrich, EUA) como sustrato; se colocaron 200 µl del extracto enzimático, 200 µl de amortiguador de citratos fosfatos 0.2 M pH 5.5, posteriormente se agregaron 200 µl del sustrato *p*-Nag a una concentración de 1.0 mg ml⁻¹, se incubaron a 37°C durante una hora con agitación (180 rpm).

La reacción se finalizó agregando 1 ml de NaOH 0.02 M a las muestras y por último se midieron las absorbancias en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Spectronic Genesis 6, EUA) a 400 nm, para realizar la estimación del *p*-nitrofenol liberado se llevó a cabo una curva patrón.” *Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por ml de enzima por minuto bajo las condiciones específicas* “(Tronsmo y Harman, 1993).

6.6.4. Determinación de las condiciones óptimas de actividad quitosanasa

- Tiempo de reacción: Se determinó en el EC con mayor AE del SmC en biorreactor con 10 g L⁻¹, mediante la cuantificación de los azúcares reductores generados por la hidrólisis de quitosano. En este caso, 150 μL del EC se mezclaron con 150 μL de solución de quitosano GA~5% (1% p v⁻¹) en buffer de acetato (0.1 M) a pH 5.5. La reacción se llevó a cabo durante 10, 15, 30, 45 y 60 minutos a 55 ° C. Y se continuó con los pasos mencionados en el punto 6.6.3.

Las siguientes determinaciones se realizaron con el EC con mayor AE del SmC en biorreactor con 5 g L⁻¹, mediante la cuantificación de los azúcares reductores generados por la hidrólisis de quitosano.

- Temperatura Óptima: En este caso, 150 μL del extracto se mezclaron con 150 μL de solución de quitosano GA~5% (1% p v⁻¹) en buffer de acetato (0.1 M) a pH 5.5. La reacción se llevó a cabo durante 15 minutos a 25, 35, 45, 55 y 70 ° C. Y se continuó con los pasos mencionados en el punto 6.6.3.
- pH Óptimo: En este caso, 150 μL del extracto se mezclaron con 150 μL de solución de quitosano GA~5% (1% p v⁻¹) en buffer de acetato (0.1 M) a pH 4, 5, 5.5, 6 y 7. La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 35 °C. Y se continuó con los pasos mencionados en el punto 6.6.3.
- Sustrato: En este caso, 150 μL del extracto se mezclaron con 150 μL de solución de quitosano GA: ~5, 7.8 y 15 % (1% p v⁻¹) en buffer de acetato (0.1 M) a pH 5.5. La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 35 °C. Y se continuó con los pasos mencionados en el punto 6.6.3. La actividad quitosanasa del EC también se determinó

utilizando *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -*D*-glucosamina (*p*-Nag) como sustrato, siguiendo la metodología mencionada en el punto 6.6.4.

- **Concentración de sustrato:** En este caso, 150 μ L del extracto se mezclaron con 150 μ L de solución de quitosano GA: ~5 (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.3, 1.7 y 2% p v⁻¹) en buffer de acetato (0.1 M) a pH 5.5. La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 35 °C. Y se continuó con los pasos mencionados en el punto 6.6.3. Por último, se determinaron los parámetros cinéticos característicos de la enzima (k_m y V_{Max}).

6.6.5. Determinación del “ $k_L a$ ”:

Se llevó a cabo el método de eliminación de oxígeno (*Gassing out*) para el cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de masa, utilizando nitrógeno para desplazar al oxígeno presente. Posteriormente se volvió a inyectar el mismo caudal de aire y se registró el % OD cada 20 segundos llegando hasta el % de saturación del proceso.

La determinación del $K_L a$ parte del balance de oxígeno en fase líquida de acuerdo con la siguiente ecuación: $\frac{dC}{dt} = OTR = K_L a (C^* - C_L)$ Dónde: OTR representa la tasa de transferencia de oxígeno, $\frac{dC}{dt}$ es el término acumulativo de la ecuación de balance de oxígeno ($mmol * h^{-1} * L^{-1}$), 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 $K_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1}). El porcentaje de saturación del oxígeno empleando aire se representa por la siguiente ecuación (Doran y col.,1995): $OD = \frac{C_L}{C^*} * 100$ tras integrar y reagrupar se obtiene la siguiente ecuación: $ln\left(\frac{C^*}{C^* - C_L}\right) = K_L a * t$; como el sensor de oxígeno lo que mide es % OD, esta ecuación se coloca en función de dicho parámetro teniendo en cuenta la ecuación anterior se obtiene la siguiente ecuación: $ln\left[\frac{1}{1 - \left(\frac{OD}{100}\right)}\right] = K_L a * t$ Donde la ordenada es $ln\left[\frac{1}{1 - \left(\frac{OD}{100}\right)}\right]$, la abscisa es el tiempo y la pendiente es $K_L a$.

6.6.6. Densidad y viscosidad

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

$$\rho = \left[\frac{m_{\text{picnómetro+medio}} - m_{\text{picnómetro}}}{m_{\text{picnómetro+agua}} - m_{\text{picnómetro}}} \right] * \rho_{\text{agua}}$$

La viscosidad se determinó experimentalmente utilizando un viscosímetro Brookfield, posteriormente se procedió a calcular el número de Reynolds y el número de potencia para cada tratamiento (inicial y final).

6.6.7. Determinación del N_{Re} , N_P y N_a

El número de Reynolds (N_{Re}) es un número adimensional que sirve para caracterizar el comportamiento de un fluido, y se define como la relación entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas presentes en el mismo, se encarga de describir el movimiento característico del líquido en un tanque de agitación y está en función de la velocidad generada por el impulsor y su diámetro; así como por la viscosidad dinámica y la densidad del líquido. (Oldshue J.Y. y col., 1983).

$$N_{Re} = \frac{\rho N D^2}{\mu}$$

De donde:

ρ = Densidad del fluido [kg m^{-3}]

N = Velocidad del impulsor [rps]

D^2 = Diámetro del impulsor [m]

μ = Viscosidad dinámica del fluido [$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$]

El número de potencia (N_P) es un número adimensional que describe la relación entre el consumo de potencia generado por el impulsor, la densidad del líquido, la velocidad de rotación del impulsor y su diámetro; es la razón de fuerzas de resistencia implicadas en la agitación y las fuerzas inerciales por unidad de volumen de fluido; es decir, el esfuerzo necesario del impulsor para contrarrestar la fricción generada entre el fluido en movimiento y las paredes del tanque, así como en el fondo del tanque y la resistencia misma producida por los deflectores (Oldshue J.Y. y col., 1983).

El número de potencia se obtiene desarrollando la siguiente formula:

$$N_P = \frac{P}{\rho N^3 D^2}$$

De donde:

P= Potencia de agitación del impulsor (watts)

ρ = Densidad del fluido [kg m^{-3}]

N= Velocidad del impulsor [rps]

D= Diámetro del impulsor [m]

La mayoría de los procesos fermentativos discontinuos necesitan de un sistema de agitación. La potencia consumida para la agitación está afectada por la aireación. Cuando se dispersa el gas en el tanque, las burbujas se van hacia regiones de baja presión entonces se forman áreas llenas de gas, que se llaman cavidades cerca de las hojas del impulsor. Para estimar la potencia en un sistema aireado se hace uso de un módulo adimensional llamado número de aireación (N_a). Este módulo se define como la relación entre la velocidad superficial del gas y la velocidad tangencial en el extremo del impulsor. El valor de N_a indica el grado de dispersión de las burbujas alrededor del rodete o impulsor. (Oldshue J.Y. y col., 1983).

$$N_a = \frac{F_g}{ND_i^3}$$

De donde:

F_g = Velocidad volumétrica del aire [$\text{m}^3 \text{seg}^{-1}$]

N= Velocidad del impulsor [rps]

D= Diámetro del impulsor [m]

6.6.8. Determinación de k_m y V_{max}

La ecuación de Michaelis-Menten que rige la cinética enzimática indica que:

$$V_0 = \frac{V_{Max}[S]}{k_m + [S]}$$

donde V_0 es la velocidad a la que transcurre la reacción; V_{Max} es la velocidad máxima del sistema, $[S]$ es la concentración de sustrato y k_m es la llamada constante de Michaelis-Menten, diferente para cada par enzima-sustrato y que equivale a la concentración de sustrato con la que la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima del sistema. Dicha ecuación demuestra que la adición sucesiva de sustrato al medio de reacción provoca un incremento de la velocidad de reacción enzimática hasta un cierto punto en el que la enzima se satura y la adición posterior de sustrato ya no afecta a la velocidad.

El diagrama de Lineweaver-Burk (figura 8) se emplea como herramienta gráfica para calcular los parámetros cinéticos de una enzima Michaeliana. Su utilidad consiste en que el recíproco de la cinética de Michaelis-Menten es fácilmente representable y que de él se obtiene información de interés.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{k_m}{V_{Max}} [S] + \frac{1}{V_{Max}}$$

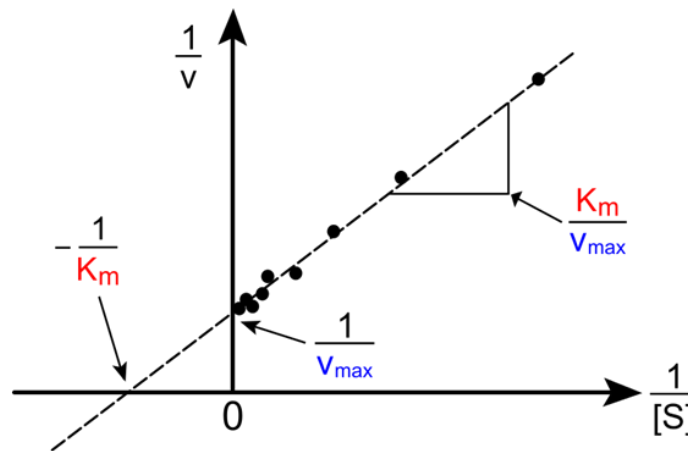


Figura 8. Diagrama de Lineweaver-Burk, donde la pendiente es el valor de $k_m V_{Max}^{-1}$ y la ordenada al origen es V_{Max}^{-1} . (Recuperado de: Wikipedia “Diagrama de Lineweaver-Burk”).

6.7. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente por medio de regresiones lineales, pruebas t-student, ANOVA, así como por comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer para

determinar si existió o no diferencia significativa entre cada tratamiento de concentración y escala. Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS 2013.

6.8. Rendimiento y productividad

Los valores de rendimiento y productividad se calcularon mediante el uso de las siguientes expresiones:

$$Y_{P/X} = \frac{P_f - P_i}{X_f - X_i}$$

Donde:

P_f : Producto final (168 h) ([U mL⁻¹] o concentración de azúcares reductores [mg mL⁻¹])

P_i : Producto inicial (0 h) ([U mL⁻¹] o concentración de azúcares reductores [mg mL⁻¹])

X_f : Concentración de proteína total final (168 h) [mg mL⁻¹]

X_i : Concentración de proteína total inicial (0 h) [mg mL⁻¹]

$$R_{batch} = Productividad = \frac{\theta_{Max} - \theta_i}{t_1 - t_2}$$

Donde:

θ_{Max} : Valor máximo de proteína total [mg mL⁻¹], azúcares reductores [mg mL⁻¹] o actividad volumétrica [U mL⁻¹].

θ_i : Valor inicial de proteína total [mg mL⁻¹], azúcares reductores [mg mL⁻¹] o actividad volumétrica [U mL⁻¹].

t_1 : Tiempo [h] donde se da el valor máximo “ θ_{Max} ”.

t_2 : Tiempo [h] donde se da el valor inicial “ θ_i ”.

7. Resultados y discusión

7.1. Presencia de actividad quitosanólítica

El objetivo de la primera etapa de este proyecto fue identificar si el hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* tenía la capacidad de degradar quitosano, por ello se utilizaron quitosanos que tenían como característica diferencial el GA presente en cada uno (0.03, ~5, 18, y 46.6%) pasadas las 144 h de incubación se observó y midió el diámetro de los halos de hidrolisis formados en cada placa, los resultados se muestran a continuación (*Figura 9*) en donde se observa que con cada uno de los quitosanos utilizados se encontró la presencia de crecimiento micelar así como los respectivos halos de hidrolisis, con excepción de las placas con GA 46.6% en donde no se observó crecimiento y por ende la ausencia de halo, lo cual se infiere sucedió por la forma de solubilización utilizada (ácido acético glacial 0.1 M) la cual fue insuficiente para este quitosano; debido a que por su alto grado de acetilación (cercano al rango donde se considera quitina >50%) no logró estar soluble y disponible para su aprovechamiento por el microorganismo, se puede observar de igual manera que el quitosano con GA~5% fue el que presentó un diámetro promedio superior a los demás con 3.17 ± 0.15 cm, seguido del quitosano con GA 18% con diámetro promedio de 2.5 ± 0.1 cm y por último el quitosano con GA 0.03% con 2.3 ± 0.1 cm, posteriormente se realizó el análisis de varianza (ANOVA) donde con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H_0 (al menos una media difiere de las demás) por lo que existe un efecto del grado de acetilación del quitosano sobre el diámetro del halo obtenido, también se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer obteniendo 3 grupos diferentes los cuales se muestran en la *figura 9* y siendo el quitosano con GA~5 % el que presentó la mayor media. Con los resultados estadísticos obtenidos se puede observar que *Lecanicillium lecanii* tiene la capacidad de producir la maquinaria enzimática para degradar quitosano solubilizado en medio ácido, preferentemente aquellos que tienen un GA <18 %, lo que permite la producción de quitosanasas en cultivo sumergido utilizando como inductor el quitosano que presentó mayor media en el diámetro del halo de hidrolisis obtenido, el cual fue el quitosano con GA~5 %.

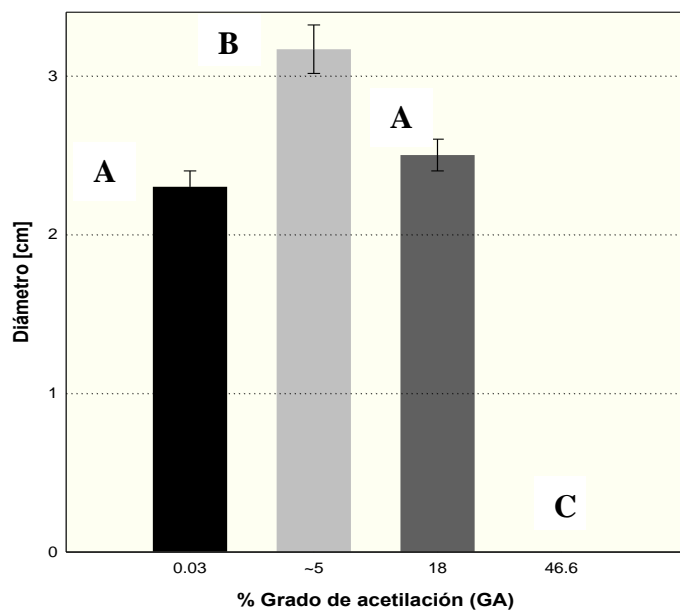


Figura 9. Comparativo del diámetro promedio de los halos de hidrólisis obtenidos en placa con 10 g L⁻¹ de quitosano con ≠ % GA después de 144 h a 28 °C. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer.

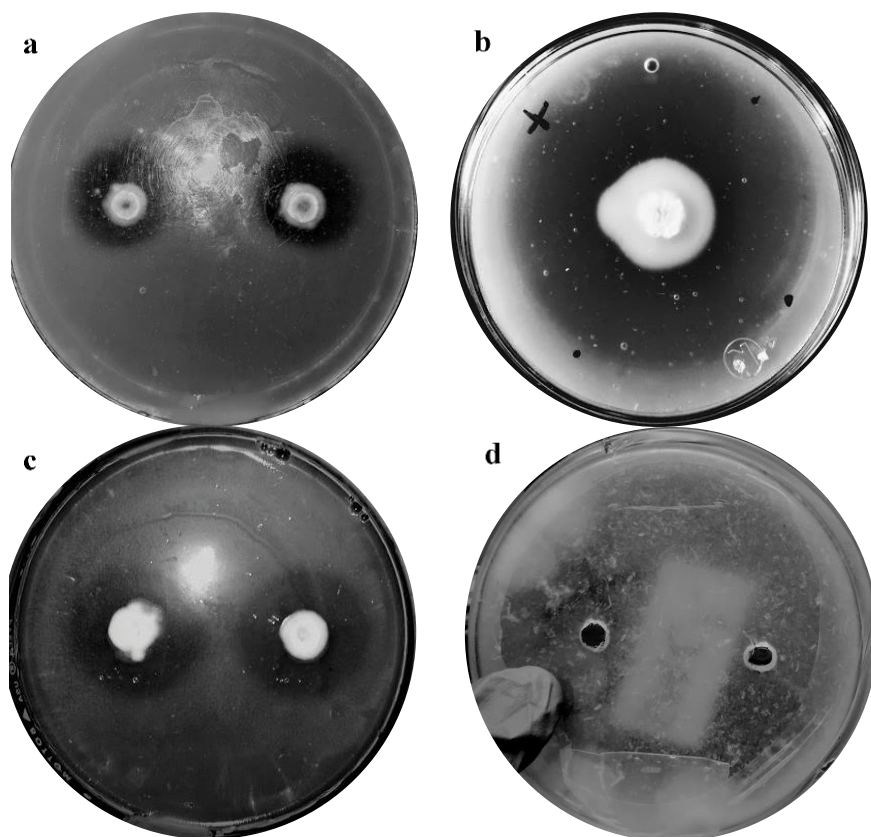


Figura 10. Imágenes de los halos de hidrólisis producidos durante el crecimiento de *L. lecanii* en medio de cultivo suplementado con 10 g L⁻¹ de quitosano con ≠ % GA después de 144 h a 28 °C: (a) 0.03 %, (b) ~5%, (c) 18 y (d) 46.6%.

Por último, en cuanto a la etapa de análisis cualitativo se llevó a cabo un comparativo con los resultados obtenidos por Matsumoto y col., en el 2004 en donde se utilizó la misma cepa de *L. lecanii* para observar la presencia de halos de hidrólisis en placas donde se había incorporado quitina coloidal al medio de cultivo como única fuente de carbono.

Los diámetros obtenidos se registraron a los 4, 12 y 24 días por ello se realizaron placas utilizando quitosano GA~5% registrando los diámetros obtenidos en los mismos tiempos (*figura 11*), el comparativo con los resultados obtenidos de ambos experimentos se presentan en la *figura 12*.

Como se puede observar, transcurridos los primeros 4 días de incubación el diámetro promedio obtenido en las placas con quitina coloidal fue 1.14 veces mayor que las placas con quitosano, posteriormente a los 12 días de incubación se observó que las placas con quitosano tuvieron un mayor incremento en el diámetro de los halos, ya que el diámetro promedio fue 1.52 veces mayor que el de las placas con quitina coloidal y por último, el diámetro promedio de las placas con quitosano a los 24 días de incubación fue 1.35 veces mayor que el de las placas con quitina coloidal.

Posteriormente se realizaron 3 análisis de varianza donde con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H_0 en cada uno de los casos (una media difiere de las demás) por lo que existe diferencia significativa entre el diámetro promedio obtenido en cada tiempo con su similar de diferente sustrato, de hecho, los diámetros promedios obtenidos con quitosano fueron mayores que los obtenidos con quitina coloidal, exceptuando los registrados a los 4 días donde fueron mayores y lo cual se pudo deber al uso de esporas más jóvenes en dicho experimento, las cuales presentaron un tiempo de adaptación más corto.

De este comparativo solo se puede asegurar que *L. lecanii* presenta buena capacidad para hidrolizar los enlaces presentes en quitina y quitosano (GlcN-GlcN y GlcNAc-GlcNAc, y sus diferentes combinaciones), pero; por la diferencia en el diámetro promedio de los halos obtenidos se puede inferir que tiene preferencia por el quitosano y en particular por aquellos que tienen bajo % GA como se mencionó en el punto anterior.

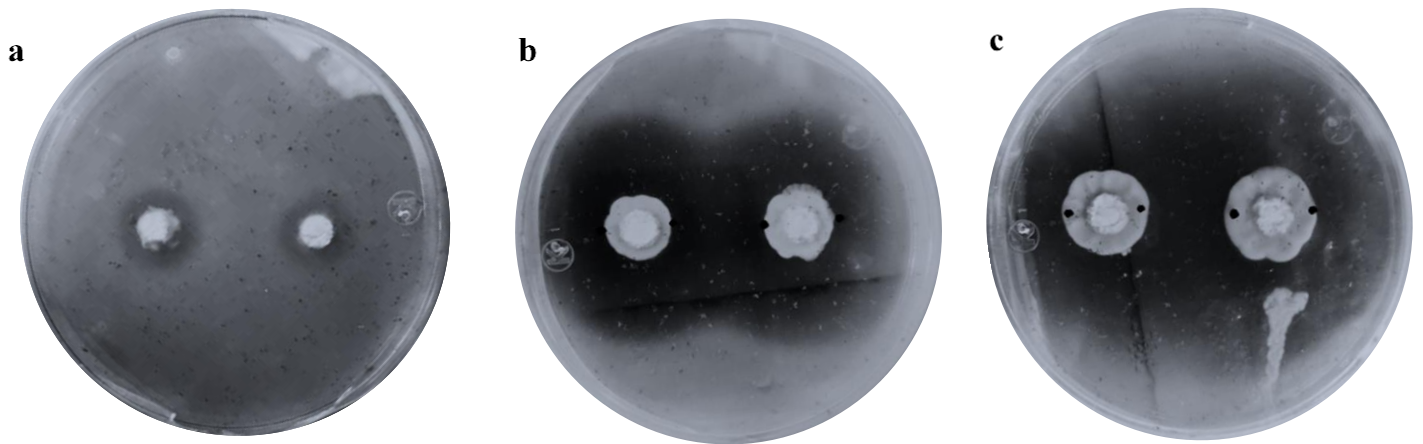


Figura 11. Imágenes de los halos de hidrólisis producidos durante el crecimiento de *L. lecanii* en medio de cultivo suplementado con 10 g L^{-1} de quitosano con GA~5% a $28 \text{ }^\circ\text{C}$: (a) 4 días, (b) 12 días y (c) 24 días.

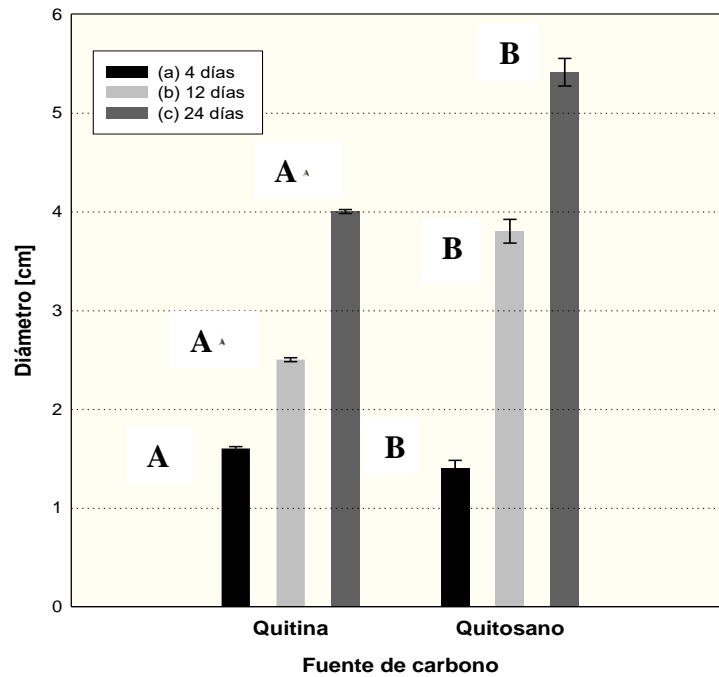


Figura 12. Comparativo del diámetro promedio de los halos de hidrólisis producidos durante el crecimiento de *L. lecanii* en medio de cultivo suplementado con 10 g L^{-1} de quitina coloidal o quitosano GA~5% a $28 \text{ }^\circ\text{C}$: (a) 4 días, (b) 12 días y (c) 24 días. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer.

7.2. Cultivos sumergidos en matraz

La composición del medio de cultivo es uno de los factores que favorecen o limitan la producción de enzimática, específicamente aquellas provenientes de microorganismos y que son extracelulares. La optimización del medio es importante, no solo para maximizar los rendimientos y la productividad, sino también para minimizar los costos de producción (Ghaem y col., 2010).

Para la siguiente etapa del proyecto se realizaron cultivos sumergidos en matraces de 500 ml con un volumen de trabajo de 350 ml (70%) utilizando dos diferentes concentraciones de sustrato: 5, 10 y 15 g L⁻¹ del quitosano con GA~5% que fue previamente seleccionado en los ensayos cualitativos (*figura 13*), el propósito de esta etapa fue identificar con cual de dichas concentraciones se presentaba mejor crecimiento del hongo y mayor productividad enzimática en los EC a través del tiempo con las condiciones especificadas.



Figura 13. Cultivos sumergidos en matraces de 500 mL (Vol. de trabajo: 350 mL) con 5, 10 y 15 g L⁻¹ de quitosano. Condiciones: pH 6, 180 rpm y 25 °C durante 168 h.

7.2.1. Crecimiento microbiano.

El crecimiento de *L. lecanii* se corroboró de manera preliminar mediante observaciones al microscopio (cultivo con 10 g L⁻¹), donde se identificó una mayor cantidad de hifas conforme transcurría el tiempo de cultivo (*figura 14*). Posteriormente el crecimiento de *L. lecanii* se

determinó indirectamente mediante la cantidad de proteína presente en los EC. En la *figura 15a* se muestra la cinética de crecimiento del hongo en los cultivos, se puede observar que presentó una fase lag muy similar con cada una de las concentraciones utilizadas, teniendo la máxima concentración de proteína en el cultivo con 10 g L⁻¹ (0.894 ± 0.021 mg mL⁻¹) a las 120 h seguido por el cultivo con 5 g L⁻¹ (0.665 ± 0.022 mg mL⁻¹) a las 96 h y por ultimo 15 g L⁻¹ (0.523 ± 0.012 mg mL⁻¹) a las 144 h. Podemos observar que la cantidad promedio máxima de proteína en el cultivo con 10 g L⁻¹ fue 1.35 y 1.70 veces mayor que su símil del cultivo con 5 y 15 g L⁻¹ respectivamente; ya que esta determinación es una medida indirecta del crecimiento del hongo, se puede inferir que el crecimiento fue mayor en el cultivo con 10 g L⁻¹. Se realizó un ANOVA donde con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H₀ (al menos una media difiere del resto) por lo que se puede decir que existe un efecto de la concentración de quitosano en la cantidad de proteína obtenida; o bien, que existe un efecto de la concentración de sustrato en el crecimiento de *L.lecanii* a escala matraz. También se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer obteniendo 2 grupos. Cabe mencionar que, aunque los valores aproximados calculados para la relación C/N de cada cultivo fueron menores a 5 (favoreciendo los procesos desasimilativos), por dichas relaciones se esperaba un mayor crecimiento del hongo en el cultivo con 15 g L⁻¹ pero se observó que no logró crecer ni producir los productos de interés de manera óptima, esto pudo ser debido a que a una baja permeabilidad del oxígeno presente en el espacio de cabeza sobre el medio de cultivo lo cual se le atribuye a la viscosidad del cultivo (40.6 cP) que fue mayor que la observada en los otros cultivos (18.8 y 29.8 respectivamente). Se debe destacar que dicha viscosidad se midió para todos los cultivos en dos diferentes tiempos (0 y 168 h) con el fin de observar si existía un cambio propio del crecimiento del hongo o bien, del consumo de quitosano por parte del mismo. Como se mencionó anteriormente el cultivo con 15 g L⁻¹ presentó mayor viscosidad inicial (40.6 cP) en comparación con el de 5 y 10 g L⁻¹ (18.8 y 29.8 cP), el valor de la diferencia entre la inicial y la final fue de 40.6 a 40.3 (0.3), de 18.78 a 18 (0.8) en el cultivo con 5 g L⁻¹ y de 29.8 a 29.2 (0.6) con 10 g L⁻¹ como se puede observar en el cultivo con 5 g L⁻¹ se presentó el mayor cambio en la viscosidad, lo importante de este punto es analizar el hecho de que *L.lecanii* tuvo la capacidad de hidrolizar ligeramente el quitosano presente en el medio de cultivo, libreando productos con mejor solubilidad o que afectan en menor proporción la viscosidad del medio.

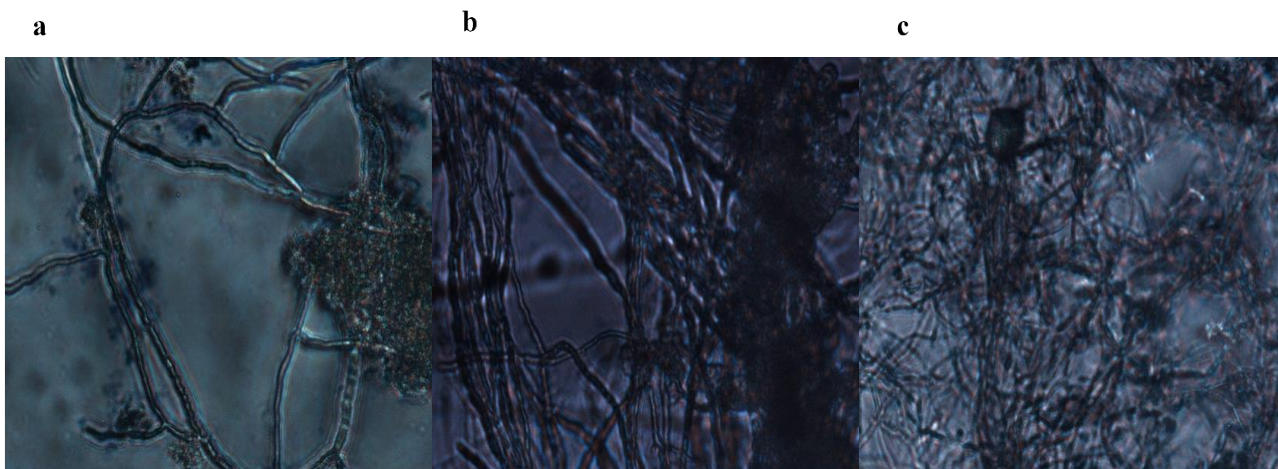


Figura 14. Observaciones al microscopio (40 X) del crecimiento de *L. lecanii* tinción con azul de metileno en diferentes tiempos de cultivo con quitosano GA 5% a 180 rpm y 25 °C: (a) 48 h, (b) 96 h y (c) 144 h.

7.2.2. Azúcares reductores

Por otro lado, se determinó la concentración de azúcares reductores presentes en cada EC, teniendo en consideración que la concentración de los mismos fue nula en el tiempo 0, la cinética se muestra en la *figura 15b* y como se puede observar la presencia de AR se comenzó a percibir a partir de 72 h de cultivo en todos los casos, el máximo de concentración de AR obtenidos para el cultivo con 5 g L⁻¹ se dio a las 120, a las 144 h con 10 g L⁻¹ y a las 96 h con 15 g L⁻¹, obteniendo valores de 0.058 ± 0.005 , 0.066 ± 0.008 y 0.037 ± 0.005 mg mL⁻¹ respectivamente. La medida de la cantidad de AR en los EC da una idea de la capacidad de *L. lecanii* para hidrolizar el quitosano presente en el medio de cultivo, pues está directamente relacionado con la producción de COS que presentan en su gran mayoría extremos reductores o bien, la obtención de los monómeros GlcN y GlcNAc que al igual que todos los monosacáridos son reductores. Por último, es importante hacer notar que la concentración promedio de AR en el punto máximo del cultivo con 10 g L⁻¹ fue 1.13 y 1.78 veces mayor que su similar con 5 y 15 g L⁻¹ respectivamente. Se realizó un ANOVA donde con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H₀ (al menos una media difiere del resto) por lo que se puede decir que existe un efecto de la concentración de quitosano en la obtención de AR. También se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer obteniendo 2 grupos.

7.2.3. Actividad enzimática

Las cinéticas obtenidas se presentan en las *figuras 15c-d*, en donde se observa que a partir de 72 h de cultivo se comenzó a notar la presencia de AE en los EC teniendo picos de máxima actividad a las 96 h para el cultivo con 15 g L⁻¹ y 144 h en los cultivos con 5 y 10 g L⁻¹; siendo con 5 g L⁻¹ en el que se presentaron las AE promedio mayores. En cuanto a los resultados obtenidos de actividad volumétrica (*figura 15c*) para el tratamiento con 5 g L⁻¹, el máximo de actividad fue de 0.050 ± 0.004 U mL⁻¹ y de 0.045 ± 0.006 , 0.016 ± 0.005 U mL⁻¹ para los cultivos con 10 y 15 g L⁻¹ respectivamente. Se puede observar que la AE volumétrica promedio máximo del cultivo con 5 g L⁻¹ fue 1.11 veces mayor respecto a 10 g L⁻¹ pero 3.12 veces mayor a 15 g L⁻¹. Posteriormente se realizó un ANOVA donde con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H₀ (al menos una media difiere del resto) por lo que se puede decir que existe un efecto de la concentración de quitosano en la presencia de actividad volumétrica en los EC a escala matraz. También se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer obteniendo 2 grupos.

Respecto a la actividad enzimática específica (*figura 15d*), se observa que el pico de máxima AE se dio de igual forma a las 96 h para el cultivo con 15 g L⁻¹ y 144 h en los cultivos con 5 y 10 g L⁻¹, con un pico de mayor prominencia en el cultivo con 5 g L⁻¹, el cual presentó una actividad máxima promedio de 0.078 ± 0.008 U mg⁻¹ en dicho punto, a diferencia de los cultivos con 10 y 15 g L⁻¹ que presentaron una actividad promedio de 0.058 ± 0.007 y 0.047 ± 0.01 U mg⁻¹ respectivamente. Se puede observar que la AE específica con 5 g L⁻¹ fue 1.34 y 1.65 veces mayor que la obtenida con 10 y 15 g L⁻¹ respectivamente. Dicha diferencia se le atribuye a directamente a la cantidad de proteína soluble presente en cada uno de los EC de los cultivos con 10 y 15 g L⁻¹, en el primero de los casos se presentó mayor crecimiento del hongo por ende mayor cantidad de proteína soluble y en el segundo caso debido a que, aunque la actividad volumétrica era baja, la específica se incrementó por la baja cantidad de la proteína propia del pobre crecimiento del hongo en dicho cultivo. De igual se realizó un ANOVA donde con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H₀ (al menos una media difiere del resto) por lo que se puede decir que existe un efecto de la concentración de quitosano en la presencia de actividad específica en los EC a escala matraz. También se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer obteniendo 2 grupos.

Ya que no existió diferencia significativa de ninguno de los parámetros determinados entre los cultivos con 5 y 10 g L⁻¹, se consideró continuar con las mismas dos concentraciones para los cultivos sumergidos en el biorreactor de 3 L para además de determinar el efecto de la concentración de sustrato, poder analizar el efecto que tiene el mantener constante un caudal de aire sobre el crecimiento del hongo y la productividad enzimática de los cultivos en las mismas condiciones.

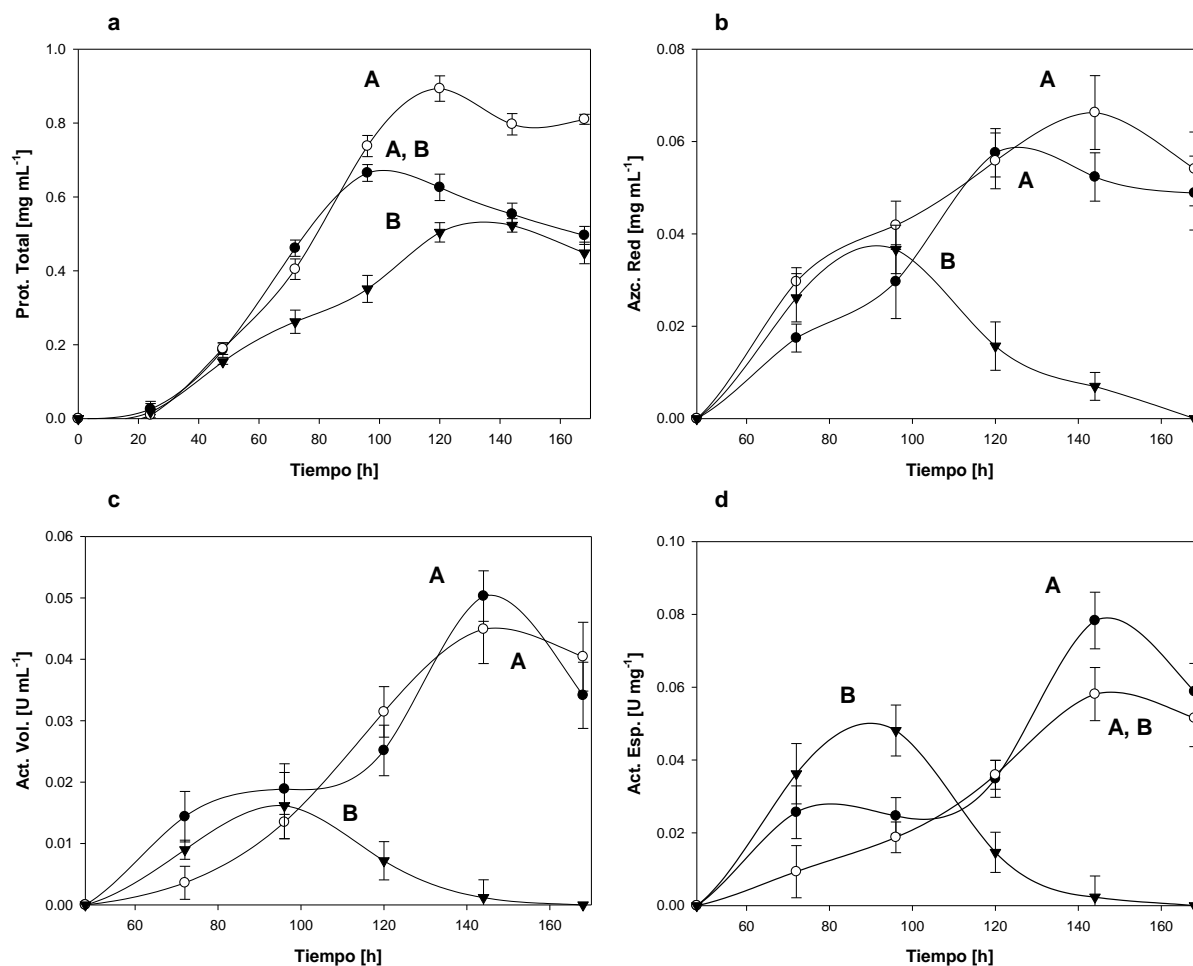


Figura 15. Cultivos de *L. lecanii* en matraz con quitosano GA~5% durante 168 h a pH 6, 180 rpm y 25 °C con 3 concentraciones de sustrato 5 g L⁻¹(●), 10 g L⁻¹(○) y 15 g L⁻¹(▼) (a) Crecimiento expresado como proteína total producida, (b) Azúcares reductores presentes en el EC, (c) Actividad quitosanólítica volumétrica y (d) Actividad quitosanólítica específica. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer.

7.3. Cultivos sumergidos en biorreactor.

Para la siguiente etapa del proyecto se realizaron cultivos sumergidos en biorreactor con volumen de trabajo de 1.6 L (53.3% del volumen total) utilizando las mismas dos concentraciones: 5 y 10 g L⁻¹ del quitosano con GA~5% ya que, aunque en la escala matraz el cultivo con 5 g L⁻¹ presentó los valores promedio más altos en los análisis realizados, no existió diferencia significativa entre las productividad enzimática y crecimiento microbiano entre estas concentraciones. Por ello el propósito de esta etapa fue el mismo que se buscó en la escala matraz, pero de igual forma observar el efecto del cambio de escala y, por ende, el efecto que tiene mantener un caudal de aire constante en el biorreactor a través del tiempo en condiciones controladas de pH 6, 100 rpm, 25 °C y 1 vvm.

7.3.1. Crecimiento microbiano

El crecimiento del hongo se determinó de igual forma, indirectamente mediante la cantidad de proteína presente en los EC. En la *figura 16a* se muestra la cinética de crecimiento de *L. lecanii* en los cultivos, se puede observar que la fase lag (0-48 h) de ambos cultivos fue muy parecida ya que desde las 24 h se presentó un ligero cambio en la concentración de proteína, un valor de 0.057 ± 0.006 mg mL⁻¹ para el cultivo con 5 g L⁻¹ y 0.024 ± 0.002 mg mL⁻¹ para el cultivo con 10 g L⁻¹. La máxima concentración promedio de proteína en el cultivo con 5 g L⁻¹ fue 1.63 ± 0.003 mg mL⁻¹ a las 120 h, y 2.34 ± 0.002 mg mL⁻¹ a las 168 h para el cultivo con 10 g L⁻¹. Podemos observar que la cantidad promedio máxima de proteína en el cultivo con 10 g L⁻¹ fue 1.44 veces mayor respecto al cultivo con 5 g L⁻¹, ya que esta determinación es una medida indirecta del crecimiento del microorganismo, se puede inferir que el crecimiento del hongo fue mucho mayor en el cultivo con 10 g L⁻¹, además de que en el cultivo con 5 g L⁻¹ se observó un decrecimiento en la concentración de proteína posterior al punto promedio máximo, esto se le atribuye a la fase de muerte microbiana, este fenómeno no se observó en el cultivo con 10 g L⁻¹ donde el punto promedio máximo se encontraba dentro de la fase estacionaria la cual se había alcanzado desde las 120 h. Se realizó un ANOVA donde con un nivel de significancia de 0.05 se acepta H₀ (las medias son iguales) por lo que se puede decir que no existe un efecto de la concentración de quitosano en la

cantidad de proteína obtenida; o bien, no existe efecto de la concentración de sustrato en el crecimiento del hongo, no por lo menos para el comportamiento de la cinética global.

Por otro lado, se registró el % OD con un sensor polarográfico cada 24 h a partir de la inoculación del medio de cultivo, como se observa en la *figura 16a* ambos cultivos presentaron un porcentaje arriba del 100% (calibración del sensor en agua saturada a 25 °C) en el tiempo 0 h (106.8% y 113.2% respectivamente), esto se le puede atribuir a la viscosidad aparente de los cultivos (ver Tabla 4) debido a la presencia de quitosano, pues se puede inferir que la presión ejercida por él mismo sobre el oxígeno aumente y por consecuencia su solubilidad; o bien que debido a la viscosidad se presente mayor retención de las burbujas en el medio. También se puede observar que el punto más bajo de OD en el cultivo con 5 g L⁻¹ fue de 10.7% a las 120 h y de 21.8% a las 144 h en el cultivo con 10 g L⁻¹, cabe mencionar que dichos puntos fueron donde se presentaron las mayores concentraciones de proteína en los medios de cultivo, es decir, que los puntos donde se observó el mayor crecimiento microbiano fue donde se presentaron los menores % OD esto fue debido a la alta demanda de oxígeno requerida por el hongo, de igual forma se observa que al entrar en la fase estacionaria de ambos cultivos los % OD regresaron a valores similares registrados a las 72 h de cultivo.

Por último, es importante recalcar que el crecimiento de *L. lecanii* en el biorreactor fue superior al crecimiento obtenido en los matraces, de hecho, en el caso del cultivo con 5 g L⁻¹ la concentración máxima promedio (1.63 ± 0.003 mg mL⁻¹) obtenida a las 120 h fue 2.45 veces mayor que su similar en matraz (0.665 ± 0.022 mg mL⁻¹) a las 96 h, por otro el cultivo con 10 g L⁻¹ la concentración máxima promedio (2.34 ± 0.002 mg mL⁻¹) obtenida a las 168 h fue 2.61 veces mayor que su similar en matraz (0.894 ± 0.021 mg mL⁻¹) a las 120 h.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada concentración a diferente escala, donde en ambos casos, con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H₀ (al menos una media difiere del resto) por lo que se puede decir que existe un efecto del cambio de escala en la cantidad de proteína obtenida; o bien, que existe un efecto de mantener un caudal constante de aire en el cultivo sobre el crecimiento del hongo.

7.3.2. Azúcares reductores

Por otro lado, se determinó la concentración de azúcares reductores presentes en cada EC, teniendo en consideración que la concentración de los mismos fue nula en el tiempo 0, la cinética se muestra en la *figura 16b* y como se puede observar la presencia de AR se comenzó a percibir a partir de 72 h de cultivo en ambos casos y el máximo de concentración de AR para ambos cultivos se dio al final del proceso (168 h) con valores de $0.544 \pm 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$ para el cultivo con 5 g L^{-1} y de $0.788 \pm 0.02 \text{ mg mL}^{-1}$ para el cultivo con 10 g L^{-1} . La medida de la cantidad de AR en los EC da una idea de la capacidad del microorganismo para hidrolizar el quitosano presente en el medio de cultivo, pues está directamente relacionado con la liberación de COS que presentarían en su gran mayoría extremos reductores o bien, la obtención de los monómeros GlcN y GlcNAc que al igual que todos los monosacáridos son reductores. Por último, es importante hacer notar que la concentración promedio de AR en el punto máximo del cultivo con 10 g L^{-1} fue 1.44 veces mayor respecto con 5 g L^{-1} . De igual forma, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) donde con un nivel de significancia de 0.05 se acepta H_0 (las medias son iguales) por lo que se puede decir que en el biorreactor tampoco existe un efecto de la concentración de quitosano en la producción de AR, lo que nos quiere decir que con ambas concentraciones el hongo tiene la capacidad de utilizarlo como única fuente de carbono para su crecimiento y producción.

Por último, es importante mencionar que la producción de AR en el biorreactor fue superior a la producción obtenida en los matraces, de hecho, en el caso del cultivo con 5 g L^{-1} la concentración máxima promedio ($0.544 \pm 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$) obtenida a las 168 h fue 9.37 veces mayor que el matraz ($0.058 \pm 0.005 \text{ mg mL}^{-1}$) a las 120 h, por otro el cultivo con 10 g L^{-1} la concentración máxima promedio ($0.788 \pm 0.02 \text{ mg mL}^{-1}$) obtenida a las 168 h fue 11.93 veces mayor que el matraz ($0.066 \pm 0.008 \text{ mg mL}^{-1}$) a las 120 h.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada concentración a diferente escala, donde en ambos casos, con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H_0 (al menos una media difiere del resto) por lo que se puede decir que existe un efecto del cambio de escala en la cantidad AR liberados; o bien, que existe un efecto de mantener un caudal constante de aire en la hidrólisis de quitosano realizado por *L. lecanii*.

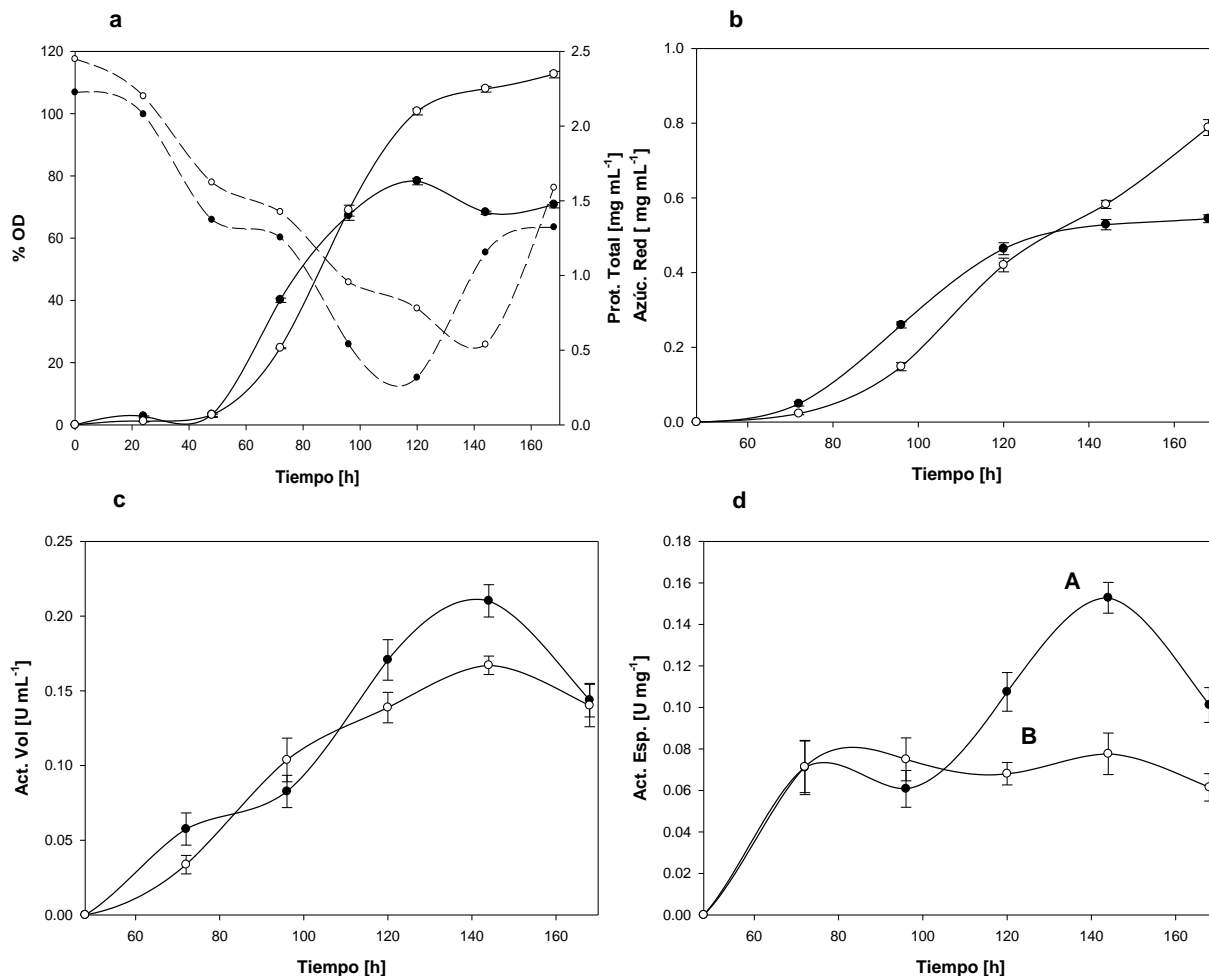


Figura 16. Cultivos de *L. lecanii* en biorreactor con quitosano GA~5% durante 168 h a pH 6, 100 rpm, 1 vvm y 25 °C con 2 concentraciones de sustrato 5 g L⁻¹(●) y 10 g L⁻¹(○): (a) Crecimiento expresado como proteína total producida y % OD, (b) Azúcares reductores presentes en el EC, (c) Actividad quitosanólítica volumétrica y (d) Actividad quitosanólítica específica. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer.

7.3.3. Actividad enzimática

Las cinéticas obtenidas se presentan en la *figura 16c-d*, en donde se observa a partir de 72 h de cultivo se comenzó a notar la presencia de AE en los EC, teniendo picos de máxima actividad a las 144 h para ambos cultivos y siendo con 5 g L⁻¹ en el que se presentaron las AE promedio mayores. En cuanto a los resultados obtenidos de actividad volumétrica (*figura 16c*) para el tratamiento con 5 g L⁻¹ el máximo de actividad fue de 0.210 ± 0.01 U mL⁻¹ y de 0.167 ± 0.006 U mL⁻¹ para el cultivo con 10 g L⁻¹.

Se puede observar que la AE volumétrica promedio máximo del cultivo con 5 g L⁻¹ fue solo 1.25 veces mayor que su similar con 10 g L⁻¹. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) donde con un nivel de significancia de 0.05 se acepta H₀ (las medias son iguales) por lo que se puede decir que no existe efecto de la concentración de quitosano en el medio de cultivo sobre la presencia de actividad volumétrica a escala biorreactor.

Por otro lado, la actividad volumétrica presente en el biorreactor fue superior a la producción obtenida en los matraces, de hecho, en el caso del cultivo con 5 g L⁻¹ la actividad promedio máxima (0.210 ± 0.01 U mL⁻¹) fue 4.2 veces mayor que en matraz (0.050 ± 0.004 U mL⁻¹) y en el cultivo con 10 g L⁻¹ la actividad promedio máxima (0.167 ± 0.006 U mL⁻¹) fue 3.71 veces mayor que en matraz (0.045 ± 0.006 U mL⁻¹), cabe mencionar que las actividades volumétricas promedio máximas de cada uno de los cultivos se dieron a las 144 h. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada concentración a diferente escala, donde en ambos casos con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H₀ (al menos una media difiere del resto) por lo que se puede decir que existe un efecto del cambio de escala en la presencia de actividad volumétrica en los EC; o bien, que existe un efecto de mantener un caudal constante de aire sobre el biorreactor en la productividad enzimática del *L. lecanii*. Respecto a la actividad enzimática específica (*figura 16d*), se observa que el pico de máxima AE se dio de igual forma a las 144 h para ambos cultivos, con un pico de mayor prominencia en el cultivo con 5 g L⁻¹, el cual presentó una actividad promedio de 0.152 ± 0.007 U mg⁻¹ en dicho punto, a diferencia del cultivo de 10 g L⁻¹ que presentó una actividad promedio de 0.078 ± 0.003 U mg⁻¹. En este caso se observa una mayor diferencia entre ambas actividades en comparación con la volumétrica ya que la AE específica con 5 g L⁻¹ fue 1.95 veces mayor (casi el doble) que la obtenida con 10 g L⁻¹. Dicha diferencia se le atribuye al mayor crecimiento microbiano y por ende a la mayor cantidad de proteína soluble presente en cada uno de los EC's en el cultivo de 10 g L⁻¹. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) donde con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H₀ (al menos una media difiere del resto) por lo que se puede decir que existe efecto de la concentración de quitosano en el medio de cultivo sobre la presencia de actividad específica a escala biorreactor.

Por otro lado, la actividad específica presente en el biorreactor fue superior a la producción obtenida en los matraces, de hecho, en el caso del cultivo con 5 g L⁻¹ la actividad promedio

máxima ($0.152 \pm 0.007 \text{ U mg}^{-1}$) fue 1.95 veces mayor que s en matraz ($0.078 \pm 0.07 \text{ U mg}^{-1}$) y en el cultivo con 10 g L^{-1} la actividad promedio máxima ($0.078 \pm 0.003 \text{ U mg}^{-1}$) fue solo 1.34 veces mayor que en matraz ($0.058 \pm 0.007 \text{ U mg}^{-1}$), cabe mencionar que las actividades específicas promedio máximas de cada uno de los cultivos se dieron a las 144 h, también se debe observar que la actividad promedio máxima obtenida en el cultivo en matraz con 5 g L^{-1} presentó aproximadamente la misma actividad que el biorreactor con 10 g L^{-1} . Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada concentración a diferente escala, donde en ambos casos con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H_0 (al menos una media difiere del resto) por lo que se puede decir que existe un efecto del cambio de escala en la presencia de actividad específica en los EC; o bien, que existe un efecto de mantener un caudal constante de aire sobre el biorreactor en la productividad enzimática de *L. lecanii*. Por último, es de importancia hacer notar que la enzima producida presentó mejor actividad (0.210 U mL^{-1}) que la quitosanasas de *Metarhizium anisopliae* reportada por Deassis y col.,2010 (0.0025 U mL^{-1}) en matraz Erlenmeyer con volumen de 90 mL con 0.2 % de quitosano, así como la quitosanasas de *Serratia marcescens TKU011* reportada por Wang y col.,2008 (0.024 U mL^{-1}) en matraz Erlenmeyer con volumen de 50 mL con 2% de polvo de pluma de calamar; pero mucho menor actividad específica (0.152 U mg^{-1}) que la quitosanasas comercial de *Streptomyces griseus* (50 U mg^{-1}).

7.3.4. Reología de los medios de cultivo, relaciones geométricas y determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa “ $k_L a$ ”,

En la tabla 4 se muestran los valores obtenidos de densidad (ρ) y viscosidad aparente (μ) de cada cultivo, para el caso de la viscosidad se midió en el tiempo inicial (0 h) y en el tiempo final (168 h) a 100 rpm, con el fin de observar si existía un cambio propio del crecimiento microbiano o bien, del consumo de quitosano por parte del hongo. Como se observa la densidad se mantuvo prácticamente igual a través del tiempo en ambos cultivos, por otro lado el cultivo con 10 g L^{-1} presentó mayor viscosidad inicial (29.6 cP) en comparación con el de 5 g L^{-1} (18.7 cP), pero el valor de la diferencia entre la inicial y la final fue menor pues paso de 29.6 a 24.7 (4.9) y de 18.7 a 12.4 (6.3) en el cultivo con 5 g L^{-1} , lo importante de este punto es analizar el hecho de que *L.lecanii* tuvo la capacidad de hidrolizar el quitosano presente en el medio de cultivo libereando productos con mejor solubilidad o que afectan en

mucha menor proporción la viscosidad del medio. Cabe mencionar que la viscosidad aparente registrada para ambos cultivos se le atribuye a la concentración de quitosano en el medio, por ello cuando se tenía mayor concentración de quitosano mayor era la viscosidad. Por otro lado, el medio de cultivo se puede considerar como pseudoplástico (materiales que ven reducida su viscosidad al aumentar la velocidad de deformación) ya que se sabe que de esta forma se comportan los polímeros o polímeros que se encuentran en solución (Doran y col.,1995), pero harían falta muchos más experimentos y análisis para poder corroborar lo anterior, por ello en este trabajo se planteó como viscosidad aparente. Como se puede observar en la tabla 4 los valores de N_{Re} denotan que ambos cultivos se mantuvieron en flujo laminar, además de que los valores N_P no fueron muy diferentes debido a que además del tipo de turbina utilizada, depende directamente de los valores de N_{Re} que tampoco lo fueron (ver gráfico “A” de anexos). El N_P era requerido para poder obtener la potencia requerida por ambos cultivos, pues despejando “P” de la ecuación de N_P (ver punto 6.6.7.) se vuelve dependiente también de la densidad del medio y como el cultivo con 10 g L^{-1} presentó mayor densidad y mayor N_P la potencia requerida por este medio de cultivo fue ligeramente mayor (1.04 veces) que la requerida en el otro cultivo. Por último, el valor de N_a fue el mismo para ambos cultivos ya que este valor es independiente del valor del N_{Re} , y solo depende directamente de la agitación, del diámetro de impulsor y del caudal de aire utilizado, el cual fue el mismo para ambos cultivos. De igual forma se determinaron las relaciones geométricas (D_a/D_i y H_L/D_i) pertenecientes al volumen de trabajo de 1.6 L mismas que podrían ser consideradas si es que se desea llevar el proceso a una escala mayor.

Tabla 4. Reología y parámetros de interés de los medios de cultivo. (D_a/D_i : Relación diámetro de tanque y diámetro del impulsor, H_L/D_i : Relación altura del líquido y diámetro del impulsor, ρ : densidad, μ : viscosidad dinámica, N_{Re} : Número de Reynolds, N_P : Número de potencia, N_a : Número de aireación, P: Potencia requerida y k_{La} : coeficiente volumétrico de transferencia de masa).

[g L ⁻¹]	D_a/D_i	H_L/D_i	ρ 0 h [kg m ⁻³]	ρ 168 h [kg m ⁻³]	μ 0 h [cP]	μ 168 h [cP]	N_{Re} 0 h	N_{Re} 168 h	N_P 0 h	N_P 168 h	P [mW]	N_a	k_{La}
5	2.84	2.75	1005.60	1005.58	18.7	12.4	181.64	273.93	3.0	3.1	1.54	0.176	6.58
10			1008.20	1008.16	29.6	24.7	114.75	137.52	2.9	3	1.59		5.65

En cuanto a la determinación del k_{LA} , inicialmente fue requerido desplazar todo el oxígeno presente en los medios de cultivo para posteriormente reairearlos, registrando los valores de % OD cada 20 segundos (figura 17a) después de realizar ajustes de linealización, se realizó una regresión lineal en donde el valor de la pendiente representa el k_{LA} en $[\text{min}^{-1}]$ por lo que se convirtió a $[\text{h}^{-1}]$ (figura 17b), como observamos los valores son ligeramente diferentes entre sí, en cultivos realizados previamente a las mismas condiciones (pH 6, 100 rpm, 1 vvm y 25 °C) utilizando quitina coloidal como fuente de carbono se obtuvieron valores de k_{LA} de 5.97 h^{-1} , se debe destacar todos los resultados descritos quedaron dentro del intervalo de k_{LA} de $5\text{-}20 \text{ h}^{-1}$ reportado por Escobar y col.,2018 en donde se trabajó con cultivos sumergidos utilizando quitina coloidal variando la agitación y la aireación en el medio de cultivo. Cabe mencionar que, aunque el tiempo en el que se realizó la determinación fue diferente al utilizado actualmente (120 y 168 h respectivamente) las cinéticas de crecimiento del hongo con quitina coloidal difieren con las de quitosano en cuanto al tiempo donde se presentan los puntos máximos de crecimiento, por ello se puede inferir que, aunque las determinaciones no se realizaron en los mismos tiempos, si se realizaron en las mismas etapas de crecimiento de *L.lecanii* en los respectivos medios de cultivo.

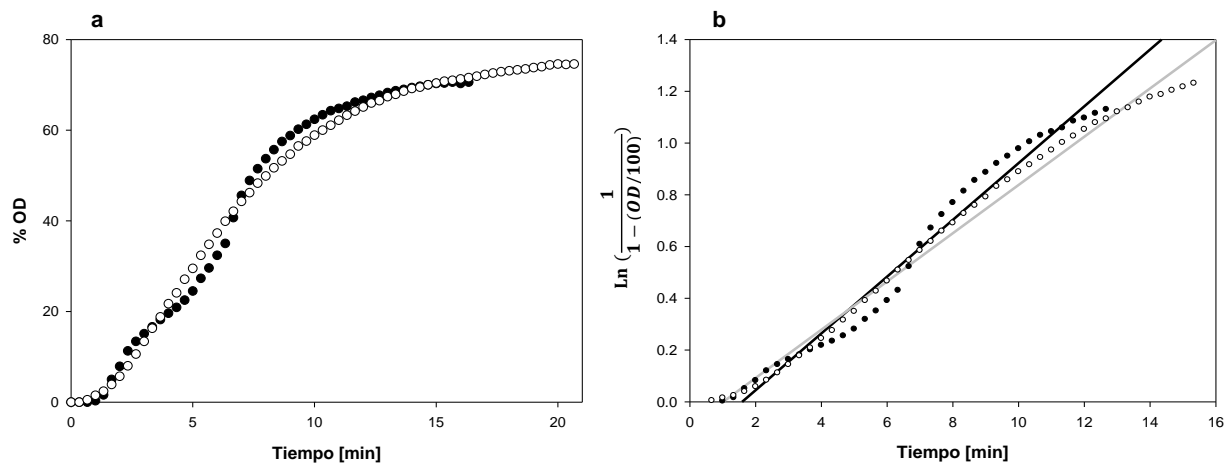


Figura 17. Cultivos de *L. lecanii* en biorreactor con quitosano GA~5% durante 168 h a pH 6, 100 rpm, 1 vvm y 25 °C con 2 concentraciones 5 g L⁻¹(●) y 10 g L⁻¹(○): (a) Reaireación de biorreactor a 1 vvm y (b) Regresión lineal para la determinación del k_{LA} . (5 g L⁻¹: m= 0.110, b= -0.174; R²= 0.976 y 10 g L⁻¹: m= 0.094, b= -0.099; R²= 0.995).

7.4. Condiciones de actividad enzimática

Hasta ahora todas las pruebas de AE llevadas a cabo utilizaron como sustrato 1% de quitosano GA~5% en buffer de acetato 0.1 M a pH 5.5 durante 15 minutos de reacción a 55 °C. Dicho sustrato y parámetros fueron utilizados por una combinación de técnicas reportadas en bibliografía (Deassis y col.,2010, Xiao'e Chen y col.,2004 y Sinha y col.,2016), pues debido a que no existen reportes sobre la producción de quitosanasas de *L.lecanii* se buscó el mejor ajuste de dichas determinaciones a la naturaleza de la enzima (quitosanasa proveniente de un hongo entomopatógeno). Las condiciones de AE utilizadas fueron suficientes para cuantificar la actividad durante las cinéticas de cultivo en ambas escalas, pero era necesario analizar si eran las óptimas, por ello se realizaron ensayos enzimáticos variando el % GA del sustrato, el tiempo de reacción "T_{Rx}", el pH del buffer y la temperatura de reacción. Asimismo, encontradas las condiciones óptimas de AE se realizaron ensayos variando la concentración de sustrato, con el fin de observar si la enzima seguía la cinética tradicional de las enzimas de Michaelis-Menten y con ello determinar sus parámetros cinéticos.

7.4.1. Grado acetilación de sustrato y diferente sustrato.

El propósito de este punto fue observar si la enzima tenía capacidad de hidrolizar quitosano con diferente GA, así como observar si tenía la capacidad de hidrolizar el enlace presente en el compuesto *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -*D*-glucosamina (*p*-Nag) (figura 18) mismo que es utilizado para cuantificar la actividad Hex, aunque este no es totalmente específico de la misma ya que de igual forma una quitosanasa de la clase I o IV podrían realizar la escisión de este enlace (ver figura 3).

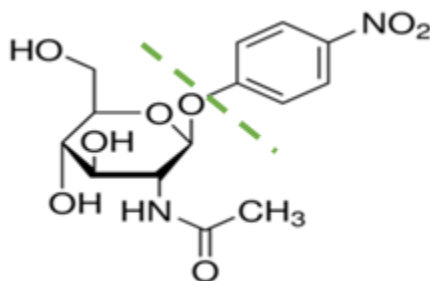


Figura 18. *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -*D*-glucosamina (*p*-Nag)

Las determinaciones se realizaron como se reporta en el punto 6.6.5. como podemos observar en la *figura 19a*, la enzima tuvo la capacidad de hidrolizar cada uno de los sustratos teniendo una mayor AE específica con el quitosano GA~5% ($0.148 \pm 0.01 \text{ U mg}^{-1}$) seguido del p-Nag ($0.111 \pm 0.002 \text{ U mg}^{-1}$). Posteriormente se realizó el ANOVA donde con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H_0 (al menos una media difiere de las demás) por lo que existe un efecto del grado de acetilación del quitosano sobre la presencia de actividad específica, también se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer obteniendo 3 grupos diferentes. Por lo que en este ensayo se pudo definir el quitosano con GA~5% como el sustrato para seguir realizando las determinaciones de AE, además de que se dio una idea de la naturaleza de la enzima producida, pues se observa que presentó buena afinidad por el sustrato p-Nag por lo que se podría tratar de una quitosanasasa de clase I o IV (Fukamizo y col.,1994), harían falta realizar más ensayos sobre sustratos realmente específicos como algún dímero o trímero de GlcN-GlcN o bien, GlcNAc-GlcNAc para definirla de manera correcta.

7.4.2. Tiempo de reacción “ T_{Rx} ”

Para la determinación del tiempo de reacción con la AE mas alta se siguió la metodología descrita en el punto 6.6.5, se puede observar en la *figura 19b* que se presentó un máximo de actividad a los 30 min de reacción ($0.167 \pm 0.012 \text{ U mL}^{-1}$) seguido por 15 min ($0.159 \pm 0.018 \text{ U mL}^{-1}$). De igual forma se observa que pasados los 45 min de reacción la actividad decae. Posteriormente se realizó el análisis de varianza (ANOVA) donde con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H_0 (al menos una media difiere de las demás) por lo que existe un efecto del tiempo de reacción sobre la presencia de actividad volumétrica, también se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer obteniendo 3 grupos diferentes. Debido a que no existe diferencia significativa entre las actividades volumétricas obtenidas a los 15, 30 y 45 minutos, se consideró seguir utilizando 15 min de reacción para fines prácticos.

7.4.3. Temperatura

Para la determinación de la temperatura con la AE mas alta se siguió la metodología descrita en el punto 6.6.5, se puede observar en la *figura 19c* que se presentó un máximo de actividad

a los 35 °C (0.195 ± 0.007 U mg⁻¹) seguido por 45°C (0.189 ± 0.01 U mg⁻¹). De igual forma se observa que pasados los 45 °C la actividad decae, pero se debe destacar que sigue presentando, por lo que la enzima es termoestable entre los rangos de temperatura utilizados de 25 hasta 70°C, lo cual podría deberse al tamaño, estructura o polaridad, pero aún se desconocen. Posteriormente se realizó el ANOVA donde con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó Ho (al menos una media difiere de las demás) por lo que existe un efecto de la temperatura sobre la actividad específica, también se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer obteniendo 3 grupos diferentes. Debido a que no existe diferencia significativa entre las actividades específicas obtenidas con 35 y 45° C, se decidió continuar las determinaciones posteriores con 35°C, cabe destacar que la actividad con la que se realizaron las cinéticas de actividad para los cultivos en ambas escalas fue de 55 °C misma que fue 1.32 veces menor que la obtenida con 35 °C en el mismo EC de 144 h, la temperatura donde se obtuvo la actividad promedio más altas fue muy similar a las temperaturas óptimas de enzimas de otros hongos como *Mucor circinelloides* y *Gongronella sp* (Tabla 1).

7.4.4. pH

Para la determinación del pH con la AE mas alta se siguió la metodología descrita en el punto 6.6.5, se puede observar en la *figura 19d* que se presentó un máximo de actividad a pH 5.5 (0.198 ± 0.01 U mg⁻¹) seguido por pH 6 (0.182 ± 0.05 U mg⁻¹). De igual forma se observa que con pH 4 no se tuvo actividad, por lo que se puede decir que la enzima es estable en pH's > 4 en el rango trabajado de 5 a 7. Se necesitarían realizar más análisis con pH más alcalinos para observar donde se desnaturaliza la enzima, aunque cabe mencionar que a pH alcalinos el quitosano no se podría solubilizar por lo que se necesitaría la ayuda de otro sustrato. Posteriormente se realizó el análisis de varianza (ANOVA) donde con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó Ho (al menos una media difiere de las demás) por lo que existe un efecto del pH sobre la actividad específica, también se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer obteniendo 4 grupos diferentes. Debido a que no existe diferencia significativa entre las actividades específicas obtenidas con pH 5.5 y 6, se decidió continuar utilizando el pH 5.5 para fines prácticos, ya que a este pH se tiene la ventaja de que el quitosano esté totalmente soluble en el buffer. El pH donde se obtuvo la

actividad enzimática promedio más altas fue igual o muy cercano a los pH óptimos de enzimas de otros hongos como *Mucor circinelloides* y *Gongronella sp* (Tabla 1).

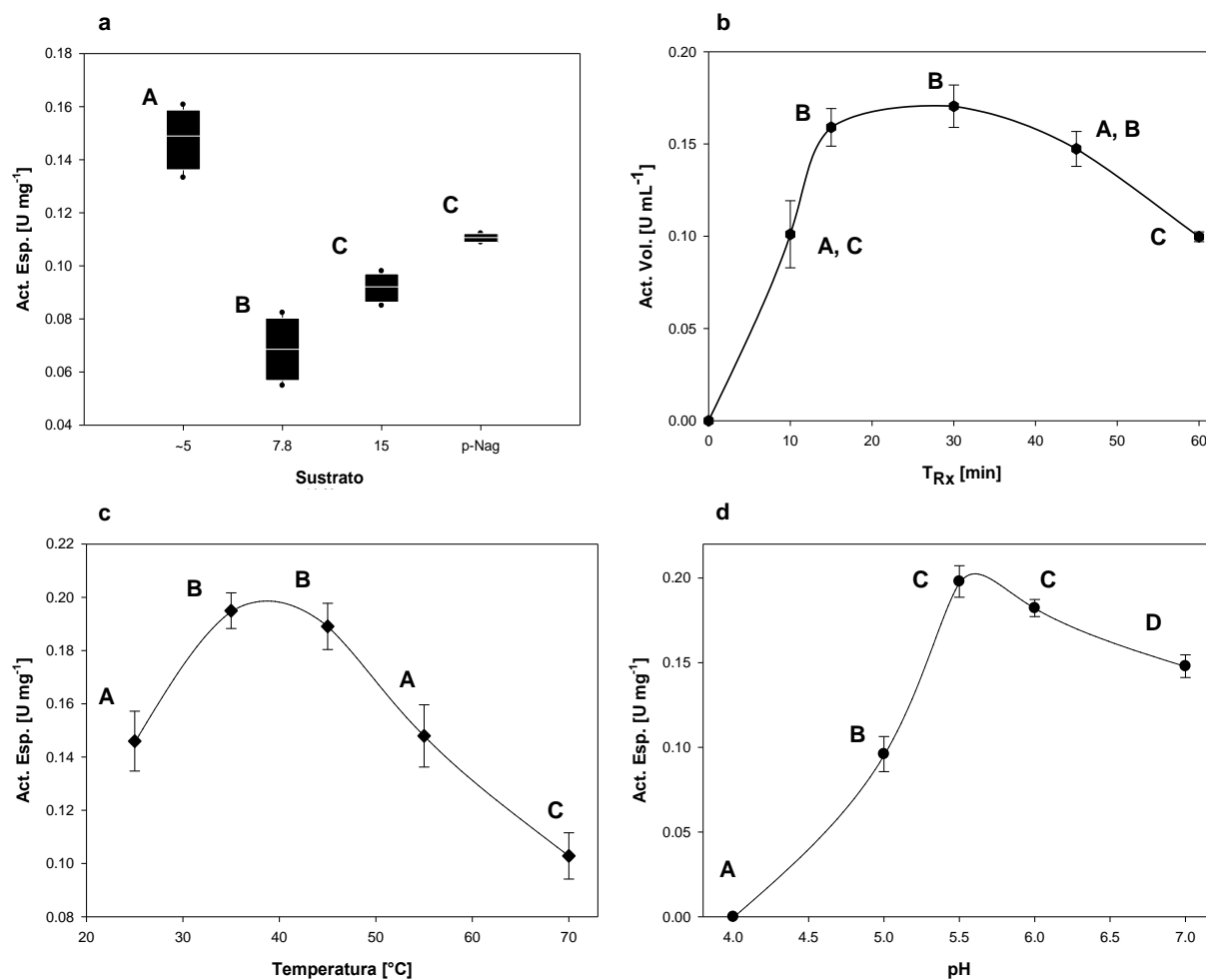


Figura 19. Determinaciones de actividad enzimática sobre el EC de 144 h provenientes del cultivo de *L. lecanii* en biorreactor con 5 g L⁻¹ de quitosano GA~5% durante 168 h a pH 6, 100 rpm, 1 vvm y 25 °C: (a) Diferentes sustratos [pH 5.5, 15 min a 55 °C], (b) Tiempo de reacción “T_{Rx}” [GA~5%, pH 5.5, 55 °C], (c) Temperatura [GA~5%, pH 5.5, 15 min] y (d) pH [GA~5%, 15 min a 35 °C]. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer.

7.4.5. Concentración de sustrato

Se realizó el análisis enzimático variando la concentración de sustrato, como se observa en la *figura 20a* la enzima sigue el comportamiento tradicional de la cinética de enzimas de Michaelis-Menten pues al ir incrementando la concentración de sustrato incrementa la velocidad de liberación de producto hasta un punto donde la velocidad se vuelve de orden 0 o bien, se llega al estado estacionario. El máximo valor promedio de velocidad se dio con 8 g L⁻¹ (0.0299 ± 0.0014 μmol de GlcN min⁻¹) seguido del valor obtenido con 10 g L⁻¹ (0.0295 ± 0.0016 μmol de GlcN min⁻¹) como se observa la fase estacionaria comienza desde 8 g L⁻¹ Por último se llevó a cabo la linealización de los datos (ver punto 6.6.8.) obtenidos mediante el método de Lineweaver-Burk (*figura 20b*) (R²= 0.984) con el propósito de obtener los valores de la constante de afinidad (k_m = 2.33 g L⁻¹) y la velocidad máxima (V_{max} = 0.033 μmol de GlcN min⁻¹) que son característicos de la quitosanasa producida por *L.lecanii* en cultivo sumergido utilizando como sustrato quitosano GA~5% en buffer de acetato pH 5.5 en las condiciones establecidas de 15 min de R_x a 35 °C.

Posteriormente se realizó el análisis de varianza (ANOVA) donde con un nivel de significancia de 0.05 se rechazó H₀ (al menos una media difiere de las demás) por lo que existe un efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de liberación de producto, también se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer obteniendo 4 grupos diferentes. Debido a que no existe diferencia significativa entre las velocidades obtenidas a partir de 8 g L⁻¹ se decidió seleccionar dicha concentración como la óptima para realizar los ensayos de actividad con quitosano GA~5%.

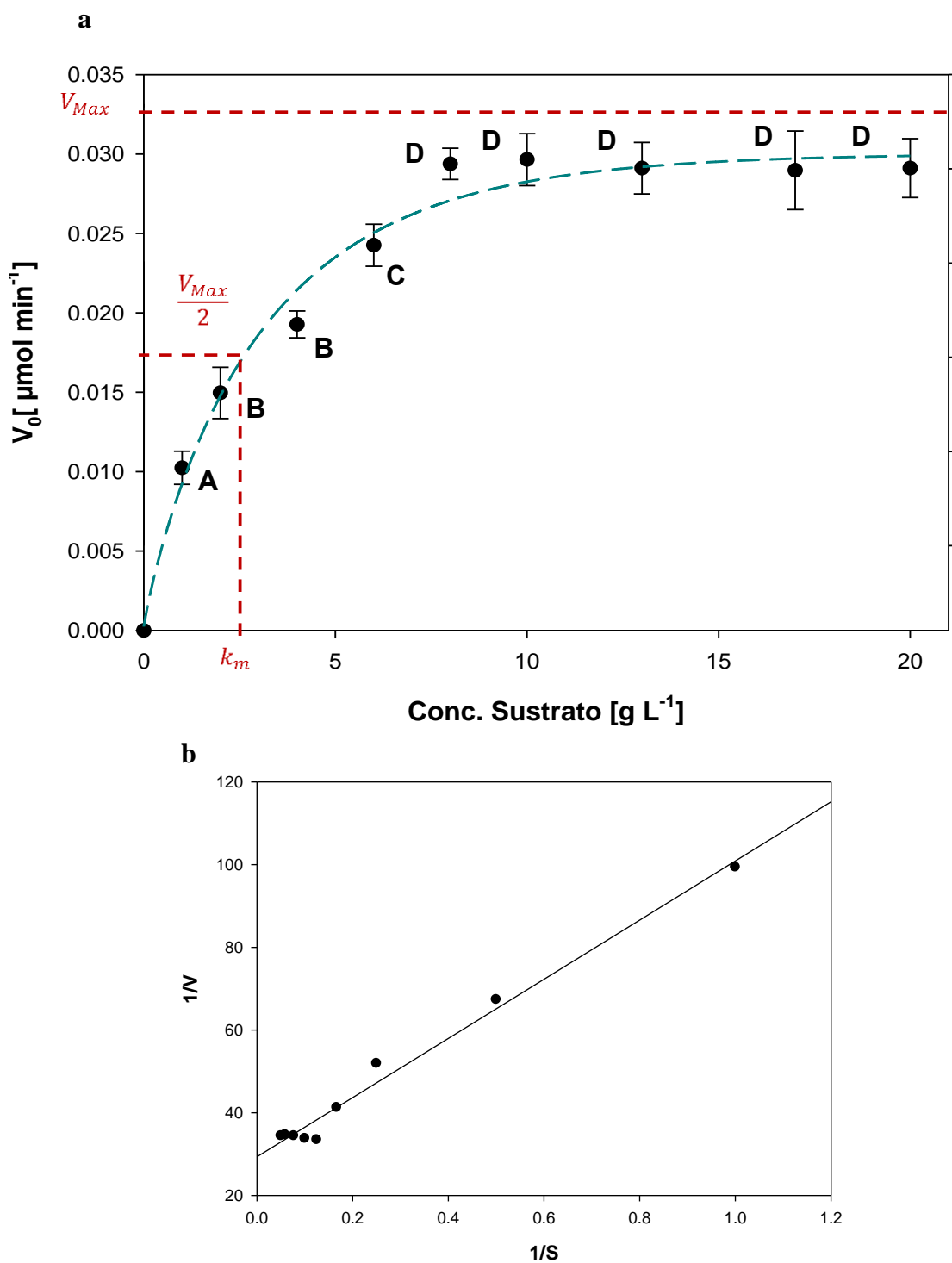


Figura 20. Actividad enzimática presente en el EC de 144 h proveniente del cultivo de *L. lecanii* en biorreactor con 5 g L^{-1} de quitosano GA~5% durante 168 h a pH 6, 100 rpm, 1 vvm y $25 \text{ }^\circ\text{C}$, con diferentes concentraciones de sustrato (GA~5%): (a) Cinética de M-M y (b) Diagrama de Lineweaver-Burk ($m=71.457$ y $b=29.452$; $R^2=0.984$).

7.5. Rendimiento y productividad entre escalas

A continuación, en la tabla 5 se muestran los rendimientos y productividades obtenidos en los cultivos realizados en matraz y biorreactor con ambas concentraciones de sustrato o fuente de carbono, como se puede observar el cultivo en biorreactor con 5 g L^{-1} fue el que presentó mayor rendimiento en cuanto a la AE siendo 1.70 veces mayor que el del cultivo en matraz, por otro lado, el rendimiento de AE en el cultivo con 10 g L^{-1} fue 1.49 veces mayor respectivamente. En cuanto al rendimiento de liberación de AR los comportamientos fueron muy similares en ambas escalas con las diferentes concentraciones. Pero el rendimiento de AR obtenido con 10 g L^{-1} en biorreactor fue 4.54 veces mayor que con matraz y 3.82 veces mayor para el cultivo en biorreactor con 5 g L^{-1} .

La productividad de biomasa obtenida para los cultivos con 10 g L^{-1} fue superior a la obtenida con 5 g L^{-1} en ambas escalas, por otro lado el cultivo con 10 g L^{-1} presentó la productividad de AR más alta siendo 11.93 veces mayor que la concentración en matraz y solo 1.44 veces mayor que 5 g L^{-1} , al mismo tiempo la productividad de AR del cultivo con 5 g L^{-1} fue 9.38 veces mayor que su similar en matraz, estos valores hacen notar que el hongo presentó mayor capacidad hidrolítica en el biorreactor con ambas concentraciones en comparación a los cultivos en matraz, logrando escindir en mayor cantidad los enlaces presentes en el quitosano, liberando productos como COS o los monómeros característicos (GlcNAc y GlcN principalmente). Por último y como parámetro de mayor importancia, la productividad de AE obtenida en biorreactor con 5 g L^{-1} fue la más alta siendo 4.18 veces mayor que en matraz y 1.25 veces mayor que su similar en biorreactor con 10 g L^{-1} , al mismo tiempo la productividad de AE del cultivo con 10 g L^{-1} fue 3.71 veces mayor que en matraz. Con estos resultados se podría seleccionar 5 g L^{-1} como la concentración para futuros experimentos, ya que presentó los mayores rendimientos y productividades de AE, además de presentar buenos rendimientos y productividades de AR, manteniendo una productividad de biomasa que no afectó en gran medida el valor de la actividad específica de la enzima producida.

Tabla 5. Rendimientos y productividades de AE, AR y biomasa BM para los cultivos realizados a escala matraz y biorreactor con 5 o 10 g L⁻¹ de quitosano GA~5%.

Escala	Concentración [g L ⁻¹]	Y _{P/X} (AE)	Y _{P/X} (AR)	Productividad BM [mg mL ⁻¹ h ⁻¹]	Productividad AR [mg mL ⁻¹ h ⁻¹]	Productividad AE [U mL ⁻¹ h ⁻¹]
Matraz	5	0.0756	0.087	5.54 x 10 ⁻³	6.04 x 10 ⁻⁴	5.21 x 10 ⁻⁴
	10	0.0503	0.074	7.45 x 10 ⁻³	6.88 x 10 ⁻⁴	4.69 x 10 ⁻⁴
Biorreactor	5	0.1288	0.333	1.36 x 10 ⁻²	5.67 x 10 ⁻³	2.18 x 10 ⁻³
	10	0.0753	0.336	1.96 x 10 ⁻²	8.21 x 10 ⁻³	1.74 x 10 ⁻³

8. Conclusiones

Se demostró que *L. lecanii* es capaz de producir quitosanas induciendo su producción mediante la adición de quitosano como única fuente de carbono en el medio de cultivo. La concentración de quitosano en el medio de cultivo tiene un efecto en el crecimiento del hongo, así como en la producción de azúcares reductores y de la enzima de interés.

La productividad de crecimiento del hongo, de azúcares reductores y de actividad enzimática fue superior a escala biorreactor, lo que fue provocado por el flujo constante de aire inyectado al reactor, el cual satisfacía la demanda de transferencia de oxígeno requerida por el hongo; así como por el control de pH durante todo el tiempo de cultivo.

El incremento en la producción de azúcares reductores en los cultivos en biorreactor se reflejó en la disminución del valor de la viscosidad aparente. ($\mu_{168} < \mu_0$). Los valores determinados de N_p , N_a y P oscilaron muy poco debido a que aún con cambios en la viscosidad no se tuvo un efecto importante en los valores obtenidos de N_{Re} del cual dependen la mayoría de ellos. Los valores obtenidos de k_{La} fueron similares a los reportados en cultivos con quitina coloidal, por lo que parece ser que la viscosidad es un parámetro que no afecta directamente el valor del k_{La} ; o no al grado en que afectan cambios en la agitación y aireación principalmente.

Aunque el crecimiento del hongo y la producción de azúcares reductores fue ligeramente menor en los cultivos con 5 g L⁻¹, la actividad enzimática obtenida fue superior. Siendo el cultivo en biorreactor en donde se presentaron las productividades enzimáticas más altas (EC de 144 h).

Las mejores condiciones para las determinaciones de actividad quitosanasa fueron: quitosano GA~5% a pH 5.5, durante 15 min de reacción a 35 °C utilizando concentraciones $\geq 0.8\%$ p v⁻¹. Por último, la enzima producida siguió el modelo cinético de MM obteniendo parámetros de $V_{\max} = 0.033 \mu\text{mol min}^{-1}$ y $k_m = 2.43 \text{ g L}^{-1}$.

Cabe mencionar que los cultivos en biorreactor presentaron el inconveniente de formación de espuma justo al inicio del proceso (inicio de aireación) lo cual se le confirió a la presencia de ácidos grasos saponificables en la quitina con la que se obtuvo el quitosano utilizado (GA~5%), dicho problema no se logró evitar, pero la alternativa utilizada fue inocular el medio de cultivo posterior al tiempo de espumación (aproximadamente 24 h).

9. Perspectivas

Como se sabe, este proyecto fue el primer estudio sobre la producción de quitosanasas de *L. lecanii* ya que hasta el momento no se existían reportes sobre la producción de las mismas. Con base en esto existen varias ideas o perspectivas:

- Se podrían realizar cultivos en biorreactor con menor cantidad de quitosano (manteniendo C/N menores a 5) para observar si los rendimientos y productividades disminuyen, aumentan o bien, se mantienen.
- Se podrían cambiar los pH iniciales de los cultivos comparando la productividad y rendimiento cuando el pH está controlado y cuando no lo está.
- Se podrían realizar ensayos con diferentes tratamientos de agitación y aireación para observar el efecto sobre el k_{La} y posteriormente sobre la productividad.
- Utilizar otro quitosano de características similares al utilizado en este proyecto, pero previamente desengrasado para observar si la hipótesis propuesta para la presencia de espuma se debe aceptar.
- En cuanto a los análisis enzimáticos se deben de realizar pruebas de actividad con sustratos más específicos como dímeros y trímeros de GlcN para corroborar la clase de la o las quitosanasas producidas.
- Realizar etapas de purificación de la enzima como precipitación con sulfato de amonio y cromatografía para conocer las características de la misma, como lo es el peso molecular, pI, entre otros.

10. Referencias

- 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.
- 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).
- Doran M. (1995) Principios de ingeniería de los bioprocesos. Ed. Acirbia, S.A Zaragoza.
- Escobar Sánchez, Shirai K. (2018) Determinación del criterio de escalamiento en un cultivo sumergido para la producción de quitinasas de *Lecanicillium lecanii* Universidad Autónoma Metropolitana (tesis de maestría).
- Fernandes de Assis, Araujo K, Pagnocelli B. 2010. Chitooligosaccharides enzymatic production by *Metarhizium anisopliae*. *Bioprocess Biosyst Eng* (2010) 33:893–899. DOI 10.1007/s00449-010-0412-z
- Fukamizo T, Ohkawa T, Ikeda Y, Goto S. 1994. Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1205:183–188.
- Gao, X. A., Ju, W. T., Jung, W. J., and Park, R. D. (2008). Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11. *Carbohydr. Polym.* 72, 513–520. doi:10.1016/j.carbpol.2007.09.025.
- Gupta, V., Prasanna, R., Srivastava, A. K., and Sharma, J. (2012). Purification and characterization of a novel antifungal endo-type chitosanase from *Anabaena fertilissima*. *Ann. Microbiol.* 62, 1089–1098. doi:10.1007/s13213-011-0350-2.
- 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 laboratory scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 64, 175-186.
- Jiang, X., Chen, D., Chen, L., Yang, G., and Zou, S. (2012). Purification, characterization, and action mode of a chitosanase from *Streptomyces roseolus* induced by chitin. *Carbohydr. Res.* 355, 40–44. doi:10.1016/j.carres.2012.05.002.
- Kim S-K, Rajapakse N (2005) Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review. *Carbohydr Polym* 62(4):357368
- Lineweaver, H y Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants". *Journal of the American Chemical Society*, 56 (3): 658-666.
- 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.
- Nidheesh T., Puthanveetil S. (2014). Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review. *Food Chemistry* 150. 392–399
- Nielsen J., Villadsen J., Lidén G. (2002). *Bioreaction Engineering Principles.* 3a. Ed. New York: Springer. 10: 459-490.
- Quintero R. (1993). Escalamiento de fermentaciones. En *Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones.* Ed. Alhambra Mexicana. pp. 97-113. Ciudad de México.
- 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., 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).
- Rocha-Pino Z., Viguera G., Shirai K. (2011). Production and activities of chitinases and hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 34, 681-686.
- 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).
- Sinha S, Chand S, Tripathi P (2014). Production, purification and characterization of a new chitosanase enzyme and improvement of chitosan pentamer and hexamer yield in an enzyme membrane reactor. *Biocatalysis and biotransformation*, 2014; 32(4): 208–213.
- Sinha S, Chand S, Tripathi P (2016) Enzymatic production of glucosamine and chitooligosaccharides using newly isolated exo-bdglucosaminidase having transglycosylation activity. *3 Biotech* 6(1):13. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-03305>
- Struszczyk, K., Szczesna-Antczak, M., Walczak, M., Pomianowska, E., and Antczak, T. (2009). Isolation and purification of *Mucor circinelloides* intracellular chitosanolytic enzymes. *Carbohydr. Polym.* 78, 16–24. doi:10.1016/j.carbpol.2009.04.010.
- Sun, H., Cao, R., Li, L., Zhao, L., and Liu, Q. (2018). Cloning, purification and characterization of a novel GH46 family chitosanase, Csn-CAP, from *Staphylococcus capitis*. *Process Biochem.* 75, 146–151. doi:10.1016/j.procbio.2018.09.021.
- 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.
- Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G. (2011). Gas–Liquid Mass Transfer. In *Bioreaction Engineering Principles* (pp. 459-519).
- 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).
- 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.
- Wang, J., Zhou, W., Yuan, H., and Wang, Y. (2008a). Characterization of a novel fungal chitosanase Csn2 from *Gongronella* sp. JG. *Carbohydr. Res.* 343, 2583–2588. doi:10.1016/j.carres.2008.08.004.
- Wang, S. L., Peng, J. H., Liang, T. W., and Liu, K. C. (2008b). Purification and characterization of a chitosanase from *Serratia marcescens* TKU011. *Carbohydr. Res.* 343, 1316–1323. doi:10.1016/j.carres.2008.03.030.
- Wang, S. L., Tseng, W. N., and Liang, T. W. (2011). Biodegradation of shellfish wastes and production of chitosanases by a squid pen-assimilating bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* TKU024. *Biodegradation* 22, 939–948. doi:10.1007/s10532-011-9453-5.
- Xia W, Liu P (2010) Characterization and mechanism of chitosan hydrolysis by non-specific enzymes. In: Ito R, Matsuo Y (eds.). *Handbook of carbohydrate polymers: development, properties and applications* (Polymer Science and Technology). Nova Science Publishers, Hauppauge, 85–126
- Zhang, H., Sang, Q., and Zhang, W. (2012). Statistical optimization of chitosanase production by *Aspergillus* sp. QD-2 in submerged fermentation. *Ann. Microbiol.* 62, 193–201. doi:10.1007/s13213-011-0246-1.
- Zitouni, M., Fortin, M., Scheerle, R. K., Letzel, T., Matteau, D., Rodrigue, S., et al. (2013). Biochemical and molecular characterization of a thermostable chitosanase produced by the strain *Paenibacillus* sp. 1794 newly isolated from compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5801–5813. doi:10.1007/s0025

ANEXO A: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Diámetro de halos de hidrolisis

ANOVA

Diametro

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	17.103	3	5.701	526.231	.000
Dentro de grupos	.087	8	.011		
Total	17.189	11			

GA	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
46.60	3	.000000		
.03	3		2.300000	
18.00	3		2.500000	
5.00	3			3.166667

- t-test diferencia de diámetro con diferente sustrato.

✓ 4 días

Equal Variance Test

Statistic	DF1	DF2	F-Value	Prob Level	Reject Hypothesis of Equal Variance at the 5.0% Significance Level?
Variance Ratio	5	11	16.000	0.0002	Yes

✓ 12 días

Equal Variance Test

Statistic	DF1	DF2	F-Value	Prob Level	Reject Hypothesis of Equal Variance at the 5.0% Significance Level?
Variance Ratio	5	11	36.000	0.0000	Yes

✓ 24 días

Equal Variance Test

Statistic	DF1	DF2	F-Value	Prob Level	Reject Hypothesis of Equal Variance at the 5.0% Significance Level?
Variance Ratio	5	11	49.000	0.0000	Yes

- Proteína total cultivos en matraz

ANOVA

ProtTot

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.536	2	.268	4.186	.020
Dentro de grupos	3.844	60	.064		
Total	4.381	62			

Conc	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
15.00	21	.322810	
5.00	21	.430619	.430619
10.00	21		.548762
Sig.		.358	.292

- Azúcares reductores EC's matraz

ANOVA

AzRed

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.009	2	.004	19.049	.000
Dentro de grupos	.009	42	.000		
Total	.018	44			

Conc	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
15.00	15	.017000	
5.00	15		.041267
10.00	15		.049467
Sig.		1.000	.302

- U mL⁻¹ matraz

ANOVA

UmL

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.004	2	.002	12.932	.000
Dentro de grupos	.007	42	.000		
Total	.012	44			

Conc	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
15.00	15	.006667	
10.00	15		.026800
5.00	15		.028600
Sig.		1.000	.925

- U mg⁻¹ matraz

ANOVA

Umg

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.004	2	.002	4.990	.011
Dentro de grupos	.019	42	.000		
Total	.023	44			

Conc	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
15.00	15	.020272	
10.00	15	.034727	.034727
5.00	15		.044459
Sig.		.158	.424

- Proteína total biorreactor

ANOVA

ProtTot

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.706	1	.706	1.036	.315
Dentro de grupos	27.275	40	.682		
Total	27.981	41			

- AR biorreactor

ANOVA

AR

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.004	1	.004	.068	.797
Dentro de grupos	1.712	28	.061		
Total	1.716	29			

- U mL⁻¹ biorreactor

ANOVA

UmL

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.002	1	.002	.677	.418
Dentro de grupos	.081	28	.003		
Total	.083	29			

- U mg-1 biorreactor

ANOVA

Umg

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.006	1	.006	9.290	.005
Dentro de grupos	.018	28	.001		
Total	.024	29			

- Diferentes sustratos

ANOVA

Umg

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.014	3	.005	52.148	.000
Dentro de grupos	.001	11	.000		
Total	.014	14			

Sustrato	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
7.00	4	.06850		
15.00	4		.09175	
20.00	3		.11067	
5.00	4			.14800
Sig.		1.000	.075	1.000

- T_{Rx}

ANOVA

UmL

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.013	4	.003	16.304	.000
Dentro de grupos	.003	15	.000		
Total	.016	19			

TRx	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
60.00	4	.100250		
10.00	4	.117500	.117500	
45.00	4		.147500	.147500
15.00	4			.159250
30.00	4			.167000
Sig.		.444	.057	.330

- Temperatura

ANOVA

UmL

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.042	4	.011	61.098	.000
Dentro de grupos	.003	15	.000		
Total	.045	19			

Temperatura	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
65	4	.14150		
25	4		.20075	
55	4		.20325	
45	4			.26000
35	4			.26825
Sig.		1.000	.999	.898

- pH

ANOVA

UmL

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.194	4	.048	474.004	.000
Dentro de grupos	.002	15	.000		
Total	.195	19			

pH	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	4
4.0	4	.00000			
5.0	4		.13200		
7.0	4			.20350	
6.0	4				.25075
5.5	4				.27225
Sig.		1.000	1.000	1.000	.058

- Concentración de sustrato

ANOVA

U

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.001	8	.000	64.039	.000
Dentro de grupos	.000	18	.000		
Total	.001	26			

Conc	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
1.00	3	.0102333			
2.00	3		.0149667		
4.00	3		.0192667		
6.00	3			.0242667	
17.00	3				.0289667
13.00	3				.0291000
20.00	3				.0291000
10.00	3				.0296333
8.00	3				.0299000
Sig.		1.000	.075	1.000	.998

- Error de los estimados, k_{La} de 5 g L^{-1}

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
1	(Constante)	-.174	.023		-7.745	.000
	Min	.110	.003	.988	37.322	.000

a. Variable dependiente: Ln

- Error de los estimados, k_{LA} de 10 g L^{-1}

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
1 (Constante)	-.099	.012		-8.232	.000
Min	.094	.001	.996	69.428	.000

a. Variable dependiente: Ln

- Error de los estimados, regresión Lineweaver-Burk

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
1 (Constante)	29.363	1.339		21.931	.000
S	71.556	3.422	.992	20.911	.000

a. Variable dependiente: V

ANEXO B: REACTIVOS, CURVAS PATRÓN Y DIAGRAMAS

- **Metodología para determinación de proteína de Lowry Peterson**

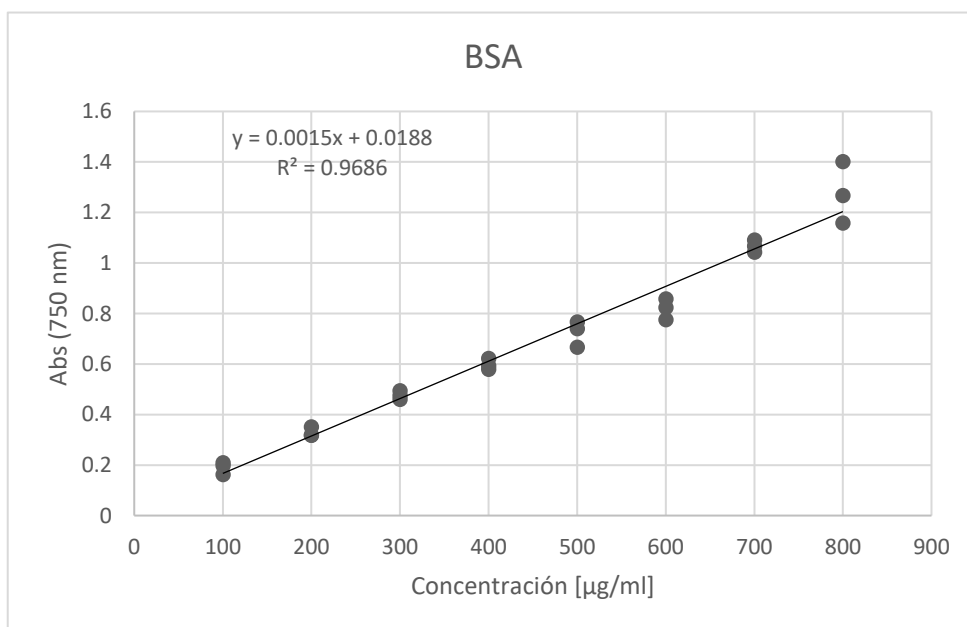
Reactivo A

- 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 1 L.

Reactivo B

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

- **Curva patrón de seroalbumina bovina para cuantificación de proteína.**

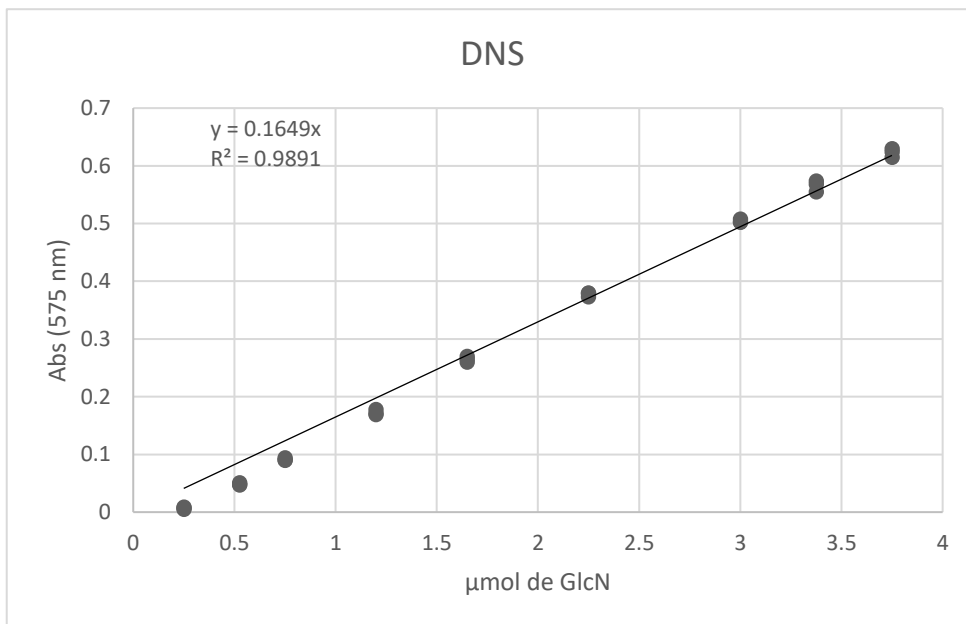


- **Metodología para determinación de azúcares reductores.**

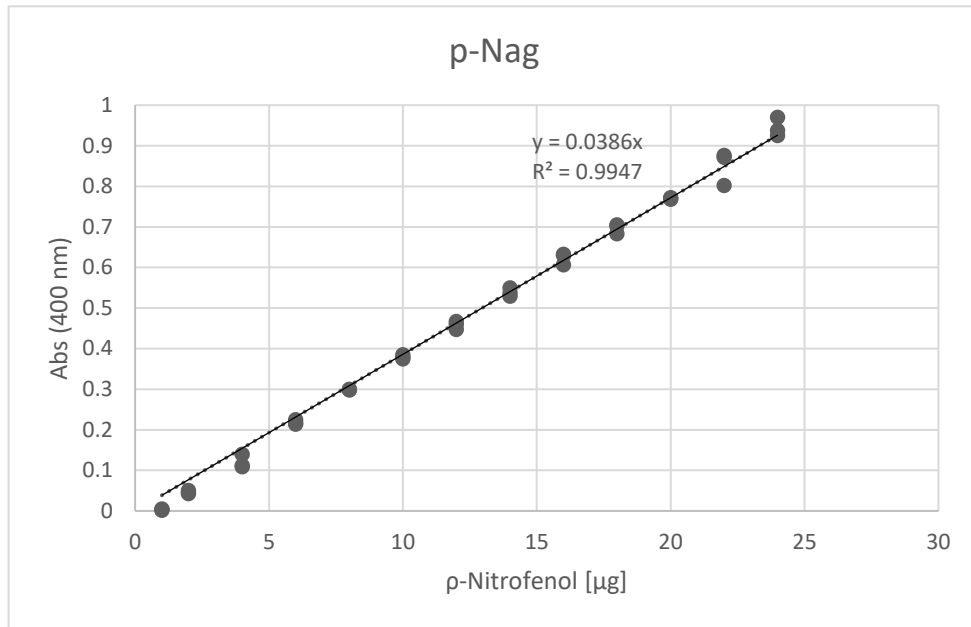
Reactivo DNS

- A. Disolver 10 g de ácido 2,3-dinitrosalicílico (DNS) en 900 ml de una solución de NaOH al 1 %. Mezclar hasta disolver.
- B. Adicionar 1 g de sulfito de sodio anhidro y 2 g de fenol. Mezclar hasta disolver.
- C. Aforar a 1000 ml con la misma solución de NaOH.
- D. Guardar esta solución en un frasco ámbar en la oscuridad.

- **Curva patrón de D-glucosamina para la determinación de azúcares reductores por la técnica DNS.**



- Curva patrón de *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -*D*-glucosamina (*p*-Nag).



- Número de Reynolds vs Número de potencia para diferentes impulsores.

