

## **Estudio de nuevas alternativas para obtener altas concentraciones de proteasas alcalinas a partir del hongo *Lecanicillium* sp**

Study of new alternatives to obtain of high concentrations of alkaline proteases from fungus *Lecanicillium* sp

MSc. Ana Nelis San Juan Rodríguez<sup>1</sup>

MSc. Eulalia Gómez Santiesteban<sup>1</sup>

MSc. Yusmila Guevara Verdecia<sup>1</sup>

MSc. Daisy Dopico Ramirez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UEB Bioprocesos Cuba 10, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, Cuba

\*Autor para la correspondencia. Correo: daisy.dopico@icidcamy.azcuba.cu

### **RESUMEN**

El desarrollo de procesos biotecnológicos ha permitido obtener productos eficientes y rentables para diferentes aplicaciones en la agricultura, entre ellas el control biológico de plagas. En el presente trabajo se evaluaron diferentes alternativas para incrementar la producción de proteasas alcalinas extracelulares, por el hongo *Lecanicillium* sp. cepa 3166, las que presentan una elevada actividad nematocida. Se evaluó el crecimiento del hongo y la producción de proteasas alcalinas a diferentes valores de pH inicial, demostrándose que el pH es un factor influyente en la inducción de las proteasas alcalinas. Con el objetivo de formular un medio de cultivo se desarrolló un plan factorial 2<sup>3</sup>, lo que evidenció que los factores de mayor significación sobre la producción de proteasas alcalinas fueron la relación C/N y la fuente de nitrógeno, que se favoreció con el uso de la relación C/N=1 y la harina de soya. En las experiencias realizadas en modo discontinuo con incrementos de nutrientes hasta fermentador de 10 litros, se favoreció la producción de proteasas alcalinas y se alcanzó una actividad proteolítica máxima de 0,35 mg mL<sup>-1</sup> y 0,52 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente.

**Palabras Clave:** proteasas alcalinas; *Lecanicillium* spp; control biológico; *Meloidogyne incognita*.

## ABSTRACT

Biotechnological process development has made possible the obtaining of efficient and profitable products for different applications in agriculture, including biologic control of pests. In the present work, different choices were evaluated in order to increase extracellular alkaline proteases production for the fungus *Lecanicillium* sp. strain 3166. These enzymes showed high nematicide activity. The growing rate of microorganism and the enzyme production were evaluated at different starting pH, which proved to have influence on alkaline proteases induction. A 2<sup>3</sup> factorial design was made in order to formulate a culture media, being C/N relation and nitrogen source the most significant factors. The relation C/N=1 and soja bean flour were the most favoured. Experiences in 10 liters fermenter using batch and fed-batch culture showed an improvement in alkaline proteases production. The maxime proteolytic activities were 0,35 mg mL<sup>-1</sup> y 0,52 mg mL<sup>-1</sup> respectively.

**Keywords:** alkaline proteases; *Lecanicillium* sp; biologic control; *Meloidogyne incognita*.

Recibido: 7/07/2018

Aceptado: 15/10/2018

## Introducción

En la actualidad, los microorganismos ofrecen una multitud de aplicaciones en varios campos de la biotecnología. No solamente porque muchos de ellos producen compuestos de interés industrial como las enzimas, sino que además poseen potentes propiedades fisiológicas de interés comercial en la implementación de tecnologías amigables con el medio ambiente.<sup>(1)</sup> Dentro del mercado de las enzimas, las proteasas son el grupo más representado y se encuentran aplicaciones en la industria de detergentes, alimenticia, farmacéutica, textil, entre otras.<sup>(2, 3)</sup>

Una de las aplicaciones que se le presta especial atención es como controladores de fitopatógenos.<sup>(4)</sup> Trabajos previos realizados en la UEB Bioprocesos Cuba 10, han demostrado que la presencia de proteasas alcalinas en el bioproducto NEMACID® son las responsables de su poder nematicida sobre el *Meloidogyne* spp., con una

efectividad entre un 90 y 95%.<sup>(5)</sup> A pesar de la efectividad biológica obtenida con el NEMACID® en el control de nemátodos del género *Meloidogyne* spp., se considera un producto de baja eficiencia, ya que se requiere aplicar dosis altas (60 a 120 kg ha<sup>-1</sup>) en dependencia del grado de infestación del suelo, considerándose que un aumento de las concentraciones de proteasas alcalinas permitiría mejorar la eficiencia del NEMACID®.<sup>(6)</sup>

El objetivo de este trabajo es proponer una alternativa de fermentación, que permita incrementar la concentración de proteasas alcalinas producidas por el hongo *Lecanicillium* sp. cepa 3166, para su empleo en el control de nemátodos.

## **Materiales y Métodos**

### **Microorganismo**

Se utilizó la cepa 3166 del hongo *Lecanicillium* sp. mantenida en el laboratorio de microbiología de la UEB Bioprocesos Cuba 10, ICIDCA. La cepa fue transferida a tubos de cultivo con medio Agar-Papa-Dextrosa e incubada durante 10 días a  $28 \pm 2$  °C para asegurar el crecimiento y esporulación, manteniéndose en refrigeración a 5 °C.

### **Efecto del pH inicial en el crecimiento y actividad enzimática por el hongo *Lecanicillium* spp.**

Se evaluó la influencia del pH del medio sobre el crecimiento del hongo y la producción de proteasas alcalinas utilizando el medio de cultivo complejo establecido en el procedimiento propuesto en la producción de este hongo por.<sup>(7)</sup> Los medios fueron ajustados a pH = 7,5; 8,0; 8,5 y 9,0 utilizando NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup> o HCl 2 mol.L<sup>-1</sup> según corresponda. Las experiencias se llevaron a cabo en erlenmeyers invaginados de 500 mL de capacidad con 100 mL de volumen de trabajo que fueron colocados en una Zaranda GFL 3033 a temperatura entre 28-30 °C a 200 rpm durante 72 horas de incubación. La relación de inóculo fue del 10 % para un conteo inicial de 10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup>. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

### **Diseño de un medio de cultivo para la producción de proteasas alcalinas por el hongo *Lecanicillium* spp.**

Con el objetivo de formular un medio de cultivo y evaluar la producción de proteasas alcalinas por el hongo *Lecanicillium* spp. se desarrolló un plan factorial 2<sup>3</sup>. Para el diseño del plan se tuvieron en cuenta resultados obtenidos en estudios realizados

sobre la producción de proteasas alcalinas por diferentes cepas de hongos del género *Paecilomyces*.<sup>(8)</sup> En la tabla 1 se especifican los factores analizados con los niveles evaluados.

**Tabla 1-** Niveles y codificación de las variables independientes.

Codificación	Factores	Niveles de las variables	
		-1	1
X1	Relación C/N	1	3
X2	Fuente de nitrógeno	harina de soya	bactopeptona
X3	Fuente de carbono	Sacarosa	Almidón

Los medios de cultivos presentaron la siguiente composición constante en (g L<sup>-1</sup>): MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5), Fe SO<sub>4</sub> (0,01), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,66), KCl (0,5) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1) y de acuerdo al diseño realizado presentaron la siguiente composición (tabla 2):

**Tabla 2-** Composición de los medios según relación C/N

Medio	Sustrato	Concentración (g L <sup>-1</sup> )	Relación C/N
1	Sacarosa	5	1
	Harina de Soya	28,6	
2	Sacarosa	5	3
	Harina de Soya	14,3	
3	Sacarosa	5	1
	Bactopeptona	14	
4	Sacarosa	5	3
	Bactopeptona	7	
5	Almidón	5	1
	Harina de Soya	28,6	
6	Almidón	5	3
	Harina de Soya	14,3	
7	Almidón	5	1
	Bactopeptona	14	
8	Almidón	5	3
	Bactopeptona	7	

De acuerdo al diseño, se estudiaron los efectos de los factores en 8 experimentos. El diseño fue ejecutado en 2 bloques. Los experimentos se realizaron de forma aleatoria. Como variables de respuestas fueron evaluadas la actividad proteolítica, la viabilidad, la producción de biomasa y el pH final. Los datos fueron procesados por el programa Statgraphics plus y los resultados fueron analizados por varianza.

### **Evaluación de los modos de operación discontinuos y con incremento en la producción de proteasas alcalinas en fermentador de 10 litros.**

Los experimentos se realizaron en un fermentador Biolafitte de 10 litros de volumen total con 7 litros de volumen efectivo con operación discontinua y con incremento o cultivo por lote alimentado. El medio fue seleccionado de acuerdo a los resultados obtenidos en el diseño factorial desarrollado anteriormente y teniendo en cuenta la disponibilidad de las materias primas, seleccionando el medio número 3.

Para los cultivos discontinuos se fijaron los parámetros de agitación y aireación de acuerdo al procedimiento tecnológico para la producción del hongo *Lecanicillium* spp. <sup>(9,7)</sup> Las condiciones de operación fueron las siguientes:

Aireación: 0,7 vvm

Agitación: 300 rpm, para el modo de lotes incrementados se aumentó a 400 rpm después del segundo incremento.

pH: el pH inicial fue ajustado a 8,5 utilizando NaOH 2 mol L<sup>-1</sup> y durante la fermentación se ajustó cuando estuvo por debajo de 5,0

Temperatura: 28 ± 2 °C

Densidad de inóculo: 10%, a una concentración inicial de 10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup>

Los cultivos por lote alimentado se realizaron mediante 2 incrementos en la fase de crecimiento exponencial, específicamente a las horas 16 y 24 de cultivo, debido a que las concentraciones de aminoácidos aportados por la bactopectona pudieran actuar como represores de la síntesis de proteasas. Se propuso evaluar la siguiente estrategia: preparar el medio inicial a una concentración de 7 g.L<sup>-1</sup> de bactopectona, el primer incremento 5 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 5 g.L<sup>-1</sup> de bactopectona y el segundo incremento con 5 g.L<sup>-1</sup> de bactopectona.

## **Resultados y Discusión**

## Evaluación de diferentes condiciones del medio de cultivo sobre la producción de proteasas alcalinas por el hongo *Lecanicillium* spp.

Debido a la importante participación de las proteasas alcalinas en la efectividad del NEMACID<sup>®</sup> sobre el control de nemátodos fitopatógenos formadores de agallas *Meloidogyne* sp. se procedió a estudiar diferentes alternativas en la producción de estas enzimas.

En un primer estudio se evaluó el crecimiento del hongo *Lecanicillium* sp. utilizando diferentes valores de pH inicial, como uno de los factores ambientales de mayor incidencia en la producción de proteasas alcalinas, los resultados se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3-** Influencia del pH sobre el crecimiento y la producción de proteasas alcalinas por el hongo *Lecanicillium* spp

pH inicial	Conteo de viables (UFC.mL <sup>-1</sup> (±SD))	pH final (±SD)	Act. Prot (mg.mL <sup>-1</sup> ± SD)	MSG (g.L <sup>-1</sup> ± SD)	Yx/s (±SD)
7,5	3,4.10 <sup>8</sup> ± 0,5.10 <sup>7</sup> (a)	5,31 ± 0,10 (a)	0,105 ± 0,005 (a)	6,36 ± 0,15 (a)	0,43 ± 0,01 (a)
8,0	4,1.10 <sup>8</sup> ± 1,0.10 <sup>7</sup> (b)	5,70 ± 0,05 (b)	0,123 ± 0,003 (b)	6,14 ± 0,02 (b)	0,40 ± 0,01 (a)
8,5	3,9.10 <sup>8</sup> ± 1,5.10 <sup>7</sup> (b)	6,24 ± 0,21 (c)	0,148 ± 0,002 (c)	5,49 ± 0,10 (c)	0,35 ± 0,03 (b)
9,0	1,2.10 <sup>8</sup> ± 2,0.10 <sup>7</sup> (c)	6,17 ± 0,17 (c)	0,151 ± 0,004 (c)	4,1 ± 0,09 (d)	0,27 ± 0,02 (c)

SD: Desviación estándar

Act. Prot: actividad proteolítica

MSG: materia seca gravimétrica

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas para un 95% de confianza.

Letras diferentes indican que hay diferencias significativas para un 95% de confianza.

El análisis de varianza por ANOVA arrojó, de forma general, que las condiciones de pH inicial afectan significativamente los cultivos de *Lecanicillium* sp. no obstante, el conteo de viables se mantiene en el orden de titulación de 10<sup>8</sup> esporas totales mL<sup>-1</sup>, similares a los obtenidos bajo las condiciones de pH= 6,5, pH óptimo reportado para el crecimiento de este hongo. En cuanto a la producción de biomasa, se observa una disminución de

la MSG con el aumento del pH, similar comportamiento presenta el rendimiento biomasa/sustrato, sin embargo, la actividad proteolítica de los filtrados aumenta con el incremento del pH inicial del cultivo, estos resultados evidencian que las condiciones de pH evaluadas inclinan el proceso de fermentación a la formación de producto y no a la producción de biomasa, por tanto, el pH es considerado un factor ambiental que influye en la producción de las proteasas alcalinas por el hongo *Lecanicillium* sp. Comportamientos similares han sido obtenidos utilizando diferentes microorganismos.<sup>(10, 11, 12)</sup>

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se propuso establecer un pH inicial de 8,5 en las experiencias posteriores, ya que bajo estas condiciones se logra incrementar la actividad enzimática con un buen crecimiento del hongo. Es importante destacar que, aunque en este trabajo no es objetivo alcanzar altos niveles de crecimiento del hongo *Lecanicillium* sp, se considera necesario mantener una buena producción del mismo ya que constituye el principio activo del VERTICID®, utilizado eficientemente en el control biológico.

En la figura 1 se muestra la influencia del pH inicial de los cultivos con la cinética de actividad enzimática de los filtrados de *Lecanicillium* sp. durante 72 horas de fermentación. Como se puede observar en la figura, la mayor actividad proteolítica se obtiene en el intervalo de tiempo entre 32 y 48 horas de fermentación, mostrándose cinéticas similares para todos los casos, el aumento en la actividad enzimática se sugiere como consecuencia de una mayor producción de proteasas alcalinas. Comportamientos similares fueron obtenidos por otros autores<sup>(8)</sup> con otros géneros de hongos entomopatógenos, utilizando también medios con melaza de caña, con la diferencia que, bajo estas condiciones de pH inicial, se logra la máxima producción enzimática seis horas antes, incrementándose la productividad del proceso en un 33%.

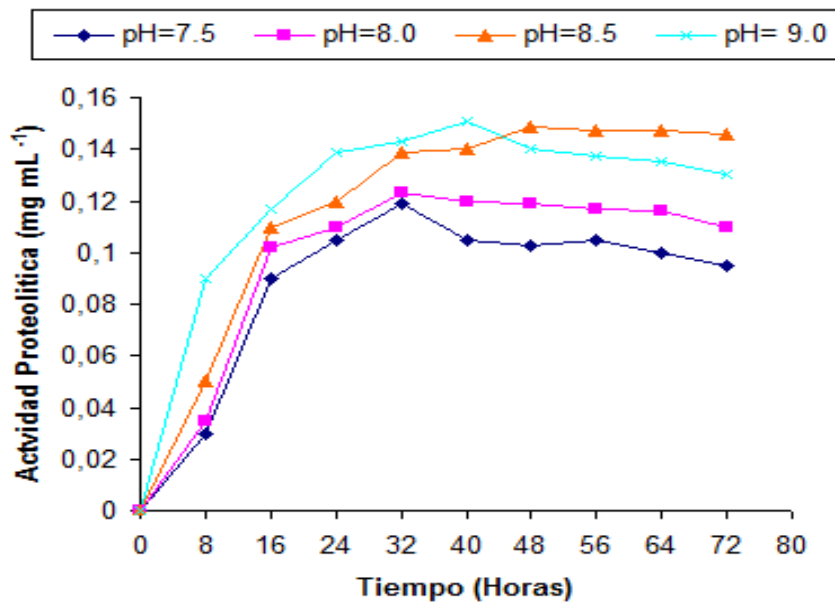


Fig. 1- Efecto del pH inicial sobre la actividad enzimática del hongo *Lecanicillium* sp. en medio con melaza de caña.

### Diseño de un medio de cultivo para la producción de proteasas alcalinas por el hongo *Lecanicillium* sp.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos de las variables evaluadas en los experimentos realizados en el diseño factorial  $2^3$ .

Tabla 4. Resultados obtenidos aplicando el diseño factorial  $2^3$

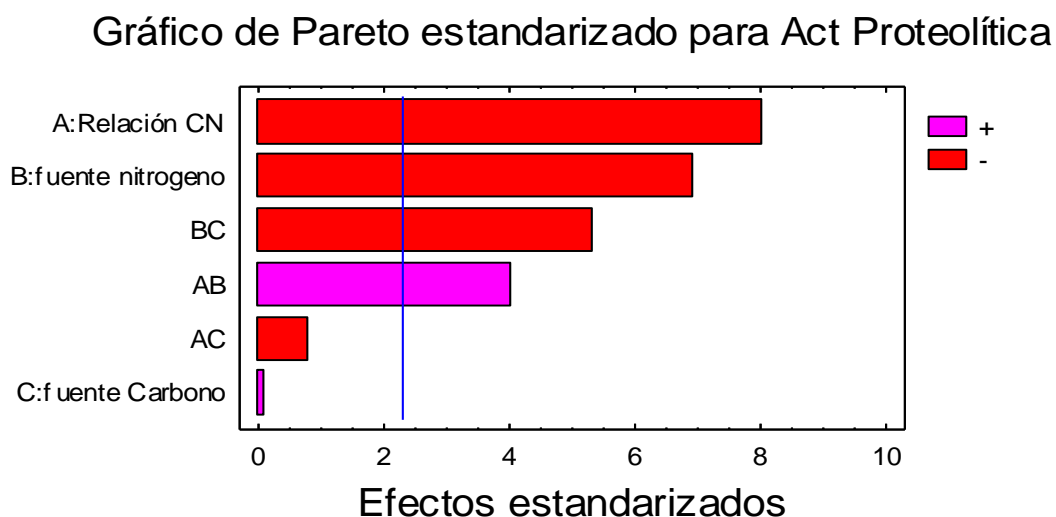
Medio	pH final	Conteo de viables (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Act. Proteolítica (mg.mL <sup>-1</sup> )	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	8,0	3,60.10 <sup>8</sup>	0,185	-1	-1	-1
2	7,65	5,30.10 <sup>8</sup>	0,13	1	-1	-1
3	7,6	5,50.10 <sup>8</sup>	0,17	-1	1	-1
4	7,5	7,20.10 <sup>8</sup>	0,128	1	1	-1
5	8,4	2,00.10 <sup>8</sup>	0,24	-1	-1	1
6	7,1	3,85.10 <sup>9</sup>	0,145	1	-1	1
7	7,39	4,20.10 <sup>8</sup>	0,123	-1	1	1
8	7,2	2,70.10 <sup>9</sup>	0,108	1	1	1

Teniendo en cuenta que el objetivo perseguido en el diseño del plan factorial es obtener altas concentraciones de actividad proteolítica, se puede apreciar en la tabla que los mejores resultados se obtienen en la corrida No. 5, cuando se utiliza una



relación C/N=1, almidón como fuente de carbono y harina de soya como fuente de nitrógeno, lográndose una actividad proteolítica de 0,24 mg mL<sup>-1</sup>.

Para la variable respuesta Actividad Proteolítica como parámetro de mayor interés en el estudio, se construyó el gráfico de Pareto el cual se muestra en la figura 2, apreciándose el orden de significación de los factores analizados.



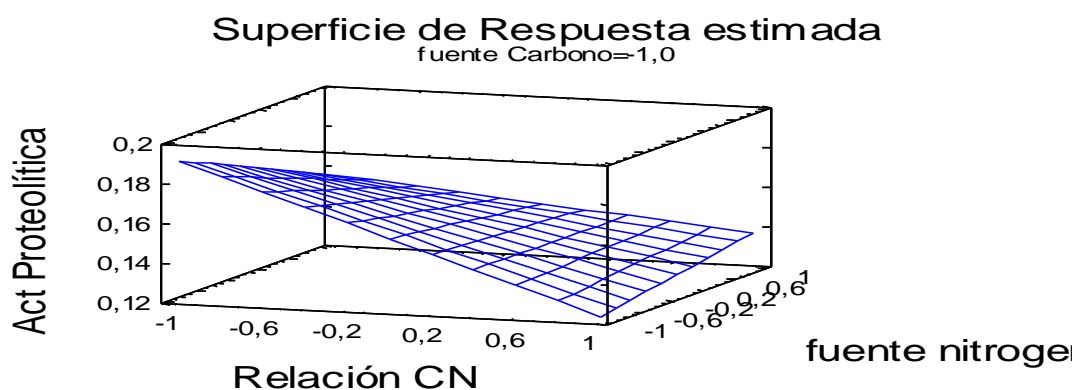
**Fig. 2-** Niveles de significación de las variables independientes y sus interacciones sobre la actividad proteolítica producida por el hongo.

El gráfico indica que la relación C/N y la fuente de nitrógeno son los factores que mayor nivel de significación tienen sobre la producción de la enzima, estos resultados corroboran los obtenidos en estudios realizados con diferentes microorganismos en la producción de proteasas alcalinas.<sup>(13,14,15,16)</sup> Otros autores obtuvieron las mejores concentraciones utilizando similar relación C/N con diferentes cepas de *Bacillus*.<sup>(17, 18)</sup> Por otro lado, se puede observar que también son significativas, pero en un menor grado las interacciones fuente de nitrógeno y fuente de carbono, y la relación C/N y fuente de nitrógeno. En estudios realizados con cinco aislados de *Lecanicillium* sp, se plantea la ausencia de represión en la biosíntesis de enzimas proteolíticas por el uso de diferentes fuentes hidrocarbonadas.<sup>(19)</sup> Además, del gráfico se infiere, que la producción de enzimas proteolíticas se favorece con la utilización de la Relación C/N=1 y el uso de harina de soya como fuente de nitrógeno de acuerdo al diseño desarrollado. Se muestra que la actividad enzimática presenta tendencia al incremento

cuando se emplea la relación C/N=3 con bactopectona como fuente de nitrógeno en el medio.

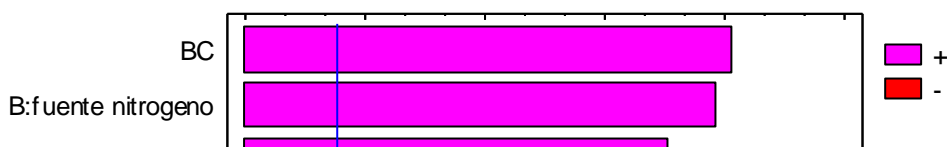
En la figura 3 se muestra el estimado de la superficie de respuesta del modelo. Se puede observar que la respuesta aumenta a medida que disminuye la relación C/N, obteniéndose un pico bien pronunciado hacia esta respuesta y un comportamiento más ligero hacia el uso de diferentes fuentes de nitrógeno, siendo estos factores los que más influyen en la actividad proteolítica.

Para el conteo de viables el análisis de Pareto muestra (figura 4) el nivel de significación de los factores evaluados. Se observa que la fuente de nitrógeno, la fuente de carbono y la interacción entre ellos, son los factores de mayor significación sobre el conteo de viables y en un menor grado de significación la interacción relación C/N y fuente de carbono. De acuerdo al diseño utilizado, el conteo de viables se incrementa con la utilización de bactopectona como fuente de nitrógeno y de almidón como fuente de carbono en los cultivos del hongo *Lecanicillium* sp. Se observa, además, que la relación C/N utilizada en el diseño no es significativa para la viabilidad del microorganismo.



**Fig. 3-** Efecto de los parámetros evaluados sobre la superficie de respuesta para la actividad proteolítica producida por el hongo *Lecanicillium* spp.

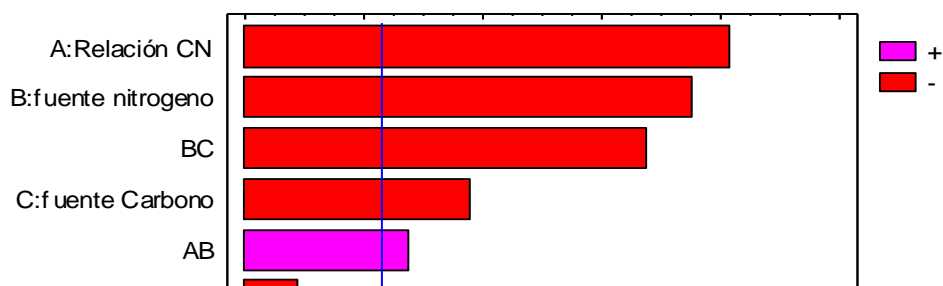
### Gráfico de Pareto estandarizado para Viabilidad



**Fig. 4-** Niveles de significación de las variables independientes y las interacciones sobre viabilidad del hongo *Lecanicillium* sp.

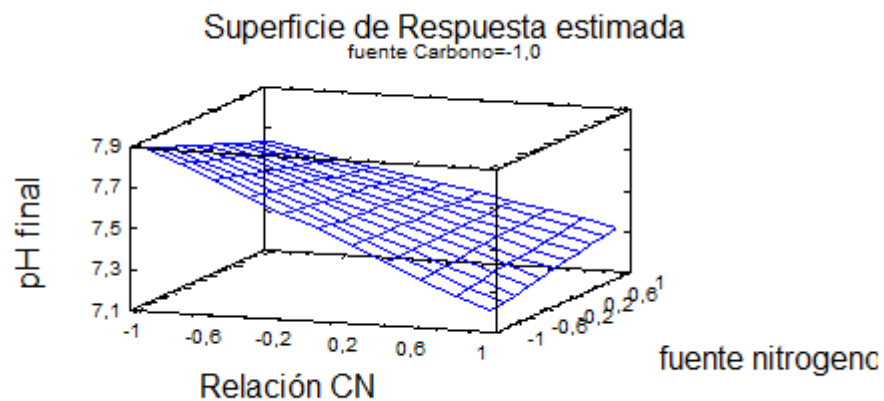
El gráfico de Pareto presentado en la figura 5 muestra los niveles de significación de los factores evaluados sobre el pH final de los cultivos. Se puede observar en el gráfico que todos los factores evaluados resultan significativos sobre el pH final de los cultivos, no resultando significativa la interacción relación C/N con la fuente de carbono. El efecto de los factores estudiados presenta un orden de significación sobre el pH final de los cultivos muy similar al observado para la actividad proteolítica, lo cual pudiera evidenciar una relación directa entre estas variables de respuesta. Además, se observa similar tendencia en el gráfico de respuesta de la figura 6 .

Gráfico de Pareto estandarizado para pH final



**Fig. 5-** Niveles de significación de los factores evaluados sobre el pH final de los cultivos del hongo *Lecanicillium* spp.

Del gráfico se interpreta también que el empleo de una relación C/N = 1, el uso harina de soya como fuente de nitrógeno y sacarosa como fuente de carbono, así como la combinación de bactopectona como fuente de nitrógeno y la relación de C/N = 3 favorece el incremento del pH final de los cultivos del hongo *Lecanicillium* spp.



**Fig. 6-** Efecto de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y relación C/N sobre la superficie de respuesta para el pH final de los cultivos del hongo *Lecanicillium* spp.

De forma general, el análisis estadístico del plan factorial evidenció que los factores de mayor significación sobre la actividad proteolítica, como expresión de la producción de proteasas alcalinas por el hongo *Lecanicillium* sp, fueron la relación C/N y la fuente de nitrógeno, estos mismos factores favorecen el incremento del pH final del cultivo, lo cual sugiere que existe una correspondencia de la presencia de proteasas alcalinas con valores alcalinos de pH. Es importante destacar que con el uso de este medio (No. 5) el pH presenta muy poca variación durante el proceso de fermentación, manteniéndose en el intervalo de valores alcalinos.

En cuanto al conteo de viables, el obtenido con el medio No.5 se considera bajo, evidenciándose que los factores estudiados han favorecido la producción de enzimas y no el crecimiento del hongo. Las observaciones directas del cultivo (imágenes no mostradas) demostraron que bajo estas condiciones se favorece la formación de micelios y no la formación de esporas (blastosporas y conidios), comportamiento que debe estar asociado al polimorfismo que presenta este hongo en diferentes condiciones de cultivo, lo cual pudiera tener influencia sobre la producción de estas enzimas, como ha sido reportado con el hongo *B. bassiana*, lográndose la mayor producción de proteasas extracelulares en medio semilíquido, cuando es favorecido el crecimiento en forma de micelio.<sup>(13)</sup> En contraste, con el hongo *Fusarium* sp. 5-128 se obtuvieron los mejores resultados cuando las condiciones del medio fueron propicias para la formación de esporas.<sup>(11)</sup>

El estudio realizado ha permitido evaluar las potencialidades que presenta la cepa 3166 de *Lecanicillium* spp. para la producción de proteasas alcalinas, utilizando un medio de cultivo sintético. Sin embargo, se considera necesario evaluar alternativas que permitan obtener formulaciones de medios de cultivo de mayor disponibilidad industrial, teniendo en cuenta estos aspectos y los resultados obtenidos con medio utilizando sacarosa como fuente de carbono, se seleccionó el medio No. 3 para los estudios a nivel de fermentador.

### **Evaluación de los modos de operación discontinuo e incrementado en la producción de proteasas alcalinas en un fermentador de 10 litros.**

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos utilizando el medio constituido por sacarosa como fuente de carbono, bactopectona como fuente de nitrógeno, utilizando una relación C/N=1. Se puede observar, que las condiciones de operación establecidas de agitación y aireación a nivel de fermentador favorecieron la producción de proteasas alcalinas, obteniéndose en el cultivo discontinuo una actividad proteolítica máxima de  $0,35 \text{ mg.mL}^{-1}$ , lo cual supera lo obtenido en condiciones de zaranda. Esto pudiera estar asociado a que en el biorreactor se tiene una mejor transferencia de oxígeno facilitando un mejor crecimiento del hongo.

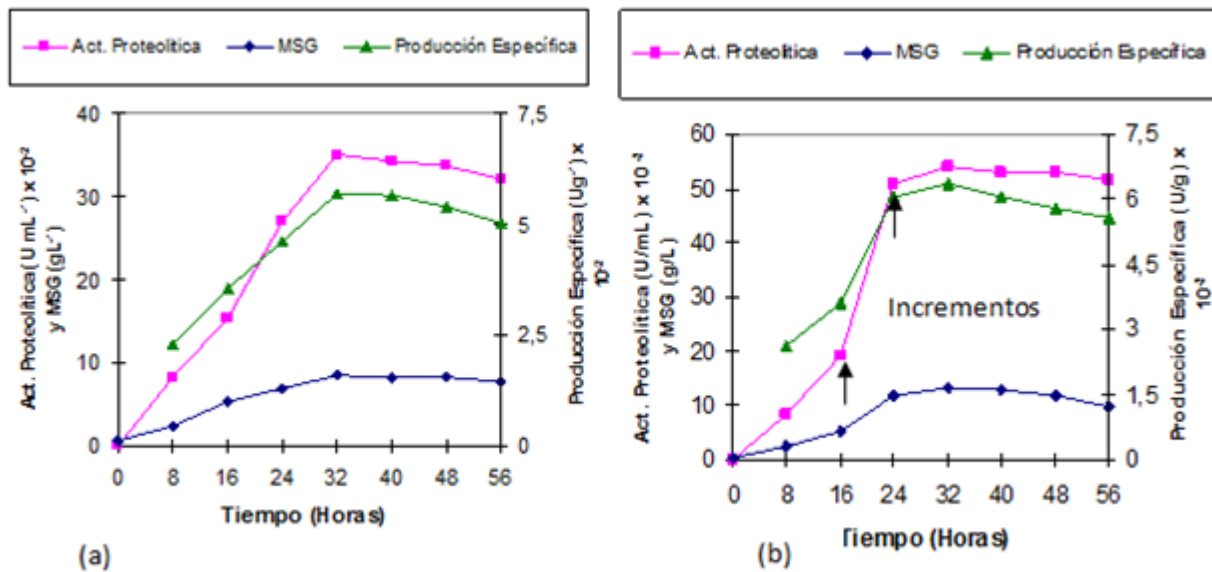
Estos resultados se comparan con las experiencias realizadas con *P. lilacinus* y *P. fumosoroseus*,<sup>(8)</sup> así como con *Bacillus subtilis*.<sup>(20)</sup> La cinética obtenida se muestra en la figura 7 (a), mostrando que bajo estas condiciones se alcanza la mayor producción de proteasas alcalinas a las 32 horas de cultivo, al final de la etapa logarítmica del

crecimiento microbiano, durante esta fase exponencial ocurre la mayor producción específica, disminuyendo ligeramente en la fase estacionaria, resultados que ratifican lo reportado para el hongo *Metarhizium anisoplae*, utilizando caseína y glucosa como fuentes de carbono.<sup>(21)</sup>

**Tabla 5-** Resultados obtenidos en fermentador de 10 L

Parámetro	Cultivo Discontinuo	Cultivo Incrementado
Máxima Actividad Proteolítica (mg mL <sup>-1</sup> )	0,35	0,52
Producción Específica mg g <sup>-1</sup>	0,04	0,06
Conteo de Viables (UFC mL <sup>-1</sup> )	4,2 x 10 <sup>8</sup>	8,7 x 10 <sup>8</sup>
Productividad Volumétrica Específica (mg mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,012	0,022
Rendimiento Biomasa/sustrato Y(x/s)	0,32	0,36

Las experiencias con cultivos incrementado se realizaron con dos incrementos utilizando niveles de agitación variables, evaluándose una agitación de 300 min<sup>-1</sup> y 400 min<sup>-1</sup> después del segundo incremento, debido a que las condiciones de estudio propician cambios de las características reológicas del sistema durante la fermentación, los resultados mostrados en la tabla 6 evidencian que los niveles de agitación utilizados no producen efectos cortantes importantes sobre el hongo, obteniéndose un conteo de viables de 8,7.10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.



**Fig. 7-** Cinéticas de producción de proteasas alcalinas y crecimiento del hongo en fermentador de 10 Litros. (a) Cultivo discontinuo y (b) Cultivo incrementado.

Los niveles de agitación variables fueron establecidos también en el procedimiento de producción de este hongo para la obtención de VERTICID®, lográndose resultados satisfactorios.<sup>(7,9)</sup> Con la estrategia de incremento establecida se logra aumentar la productividad del sistema en un 45%, incrementándose la actividad proteolítica hasta valores de 0,52 mg.mL<sup>-1</sup> en 24 horas de cultivo. Los resultados alcanzados se consideran muy atractivos cuando se comparan con lo reportado en cultivo incrementado con *Bacillus sphaericus*, el cual es un superproductor de proteasa alcalina extracelular, obteniéndose similar resultado en la actividad proteolítica.<sup>(22)</sup> Por otro lado, el rendimiento biomasa/sustrato  $Y(x/s)$  no varía significativamente, demostrándose que la estrategia al utilizar el modo de operación incrementado sigue favoreciendo la producción de enzima y no la producción de biomasa.

La cinética obtenida utilizando el cultivo incrementado se muestra en la figura 7(b), observándose un pico bien definido en la actividad proteolítica después de la primera alimentación, encontrándose en plena fase logarítmica de crecimiento, manteniéndose la mayor producción específica en esta fase, después del segundo incremento se observa un ligero aumento en la producción, encontrándose el cultivo en fase de crecimiento estacionario.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que la cepa de *Lecanicillium* sp. 3166, posee gran habilidad para la producción de proteasas alcalinas extracelulares, lográndose incrementar la concentración de enzimas hasta  $0,24 \text{ mg.mL}^{-1}$ , en zaranda utilizando un pH inicial del cultivo igual a 8,5, una relación C/N=1, almidón como fuente de carbono y harina de soya como fuente de nitrógeno.

Se propone como alternativa de fermentación un nuevo procedimiento que permite obtener actividad proteolítica en el orden de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , en un fermentador de 10 L, utilizando las siguientes condiciones: Medio de cultivo con sacarosa y bactopectona; Modo de operación realizando dos incrementos, el primero con  $5 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa/ $5 \text{ g L}^{-1}$  de bactopectona y el segundo con  $5 \text{ g L}^{-1}$  de bactopectona; Aireación:  $0,7 \text{ vvm}$ ; Temperatura:  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Con esta alternativa se incrementa 1,3 veces la concentración de proteasas alcalinas respecto a la que tiene el producto NEMACID®.

## Referencias Bibliográficas

1. MOUBASHER, Abdel-Aal; ISMAIL, Mady A.; HUSSEIN, Nemmat A.; GOUDA, Hassan A. "Enzyme producing capabilities of some extremophilic fungal strains isolated from different habitats of Wadi El-Natron, Egypt. Part 1: Protease, lipase and phosphatase". *European Journal of Biological Research*. 2016, vol 6, Nº 2, p. 92-102.
2. FULLANA, Natalia. "Producción y caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura". En línea; Trabajo presentado para optar por el título máster en ciencias biológicas, Universidad de Montevideo, Facultad de ciencias, agosto 2014. <https://www.colibri.udelar.edu.uy>. Consulta 9 de mayo de 2017;.
3. TIWARI, Onkar Nath; DEVI, Thiyam Bidyababy; DEVI, Kangjam Sarabati; OINAM, Gunapati; AVIJEET, Oinam "Isolation and optimization of alkaline protease producing Bacteria from undisturbed soil of NE-region of India falling under Indo-Burma biodiversity hotspots". *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 2015, vol 3, Nº 04, p. 25-31.



4. CARBALLO, Manuel "Control biológico de insectos mediante hongos entomopatógenos. En Manuel Carballo y Falguny Guharay Editions. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Cap III. Serie técnica. Manual Técnico CATIE No 53. Managua. p. 34-58, 2004.
5. GÓMEZ, Santiesteban Eulalia. "Procedimiento de obtención de un nematocida a partir de los efluentes de la fermentación del hongo *Verticillium lecanii*". Patente Cubana PC 2009, Certificado No: 23385.
6. GUEVARA VERDECIA, Yusmila. "Potencialidades del NEMACID para el manejo de *Meloidogyne incognita* (kofoid y white) chitwood en hortalizas". Tesis de Maestría. Universidad Agraria de la Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez", Facultad de Agronomía. Cuba, 2009.
7. ÁLVAREZ, Rosa María "Tecnología de producción de un formulado para el control de la mosca blanca". En: Memorias del VII Congreso Internacional sobre Azúcar y derivados de la Caña. Ciudad de la Habana, Cuba, 2002. ISBN 959-7165-11-2
8. ÁLVAREZ, Rosa María; GÓMEZ, Eulalia; SAN JUAN, Ana Nelis; LEMES, Teresita. "Influencia de la fuente nitrogenada para la producción de proteasas alcalinas por el hongo *Paecilomyces lilacinus*". *Revista ICIDCA*. 2000, vol XXXIV, N° 3, p. 34-38.
9. SAN JUAN, Ana Nelis; ÁLVAREZ, Rosa María; GÓMEZ, Eulalia "Crecimiento del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* en cultivo sumergido". *Revista ICIDCA*. 2000, vol XXXIV, N° 3, p. 39-42.
10. PRAKASHAM, Shetty "Alkaline protease production by an isolated *Bacillus circulans* under solid state fermentation using agroindustrial waste: Process parameters optimization". *Biotechnology Progress*. 2005, vol. 21, N° 5, p. 1380 -1388.
11. TSUNETOMO, Asai. "Kinetic study on the production of alkaline protease by *Fusarium sp*". *Journal of Fermentation Technology*. 2005, vol 56, N° 2, p. 84-90.
12. MADHAVI, Yadav Mangalarapu. "Alkaline protease production by isolated *Bacillus sp*. In submerged and solid state fermentation". *Journal of Bio Innovation*. 2013, vol 2, N° 4, p. 161-167.
13. BIDOCHKA, Michael; KHACHATOURIANS, George "Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*". *Applied and Environmental Microbiology*. 1987, vol 53, N° 7, p. 1679-1684.
14. ADINARAYANA, Kunamneni; ELLAIAH, P. "Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease from a newly

isolated *Bacillus subtilis* PE-11". *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2002, vol 5, N° 3, p. 281-287.

15. BARBOSA, Claudio Camargo; MONTEIRO, Antonio Carlos; BARCELOS, Antonia; TADEU, Gener "Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais". *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2002, vol 37, N° 6, p. 821-829.

16. SÁEZ, Alex Armando Vega. "Proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus sp.* Alcalofílico". *Ingeniería y Ciencia*. 2006, vol 2, N° 3, p. 29-38.

17. GIRALDO, Catalina; SÁEZ, Alex Armando; MONTOYA, Olga Inés "Aplicación de la metodología ZERI en la producción de proteasas alcalinas de *Bacillus spp*". *Revista Universidad EAFIT*. 2003, vol 39, N° 132, p. 57-64.

18. ESCOBAR, Jenny; PARDO, Milena; BUITRAGO, Gustavo; LÓPEZ, Luis A. "Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*". *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2004, vol VI, N° 2, p. 43-53.

19. BYE, Natasha; CHARNLEY, Keith "Regulation of cuticle-degrading subtilisin proteases from the entomopathogenic fungi, *Lecanicillium spp*: implications for host specificity". *Archives of Microbiology*. 2008, vol 189, N° 1, p. 81-92.

20. ADINARAYANA, Kunamneni; ELLAIAH, Poluri. "Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique". *AAPS PharmSciTech*. 2005, vol 6, N° 3, p. E391-E397.

21. BRAGA, Gilberto; DESTÉFANO, Ricardo; MESSIAS, Claudio L. "Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures". *Revista de Microbiología*. 1999, vol 30, N° 2, p. 107-113.

22. SINGH, Jasvir; VOHRA, R.M.; SAHOO, D. K. "Enhanced production of alkaline proteases by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture". *Process Biochemistry*. 2004, vol 39, N° 9, p. 1093-1101.

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.