

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIAS Y BIOMASA DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Akanthomyces lecanii* MEDIANTE FERMENTACIÓN SUMERGIDA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente tecnología se desarrolla en el sector de la industria biotecnológica, en particular, en la producción de *Akanthomyces lecanii* como agente biocontrolador o insecticida.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Uno de los principales problemas fitosanitarios en la industria agroindustrial es debido al ácaro *Tetranychus urticae* que causa pérdidas económicas importantes. Generalmente el manejo de esta plaga se realiza con insecticidas de origen químico que han generado resistencia y alteración de poblaciones benéficas de insectos.

Como alternativa sostenible se ha explorado el uso de agentes de control biológico como los hongos entomopatógenos, pero a pesar de los avances logrados en el campo de la biotecnología, y al rápido crecimiento de la industria biológica, la mayoría de los insumos biológicos son producidos de forma empírica generando bajos rendimientos y altos costos de producción que se ven reflejados en altos precios en el mercado, superiores a los de los agroquímicos y, muy a menudo, de una calidad por debajo de la necesaria para un desempeño adecuado en campo.

Uno de los métodos más utilizados por la industria para la producción de hongos entomopatógenos, por ejemplo, es la fermentación en estado sólido, donde generalmente se emplean como sustratos principales al arroz o residuos agrícolas como cascarilla de arroz o cascarilla de maní. Los bajos rendimientos asociados a este tipo de fermentación se deben principalmente a la dificultad para controlar la relación carbono/nitrógeno, la humedad, la actividad del agua, el pH, la temperatura, la aireación, el tamaño de partícula, entre otras, las cuales afectan significativamente tanto el crecimiento de los microorganismos, en especial de los hongos, así como la síntesis de moléculas bioactivas por parte de estos. Además, los sustratos generalmente empleados presentan mayores probabilidades de contaminación cruzada que influyen negativamente en la vida útil y calidad del producto de la fermentación.

Sin embargo, actualmente existen alternativas como la fermentación en estado líquido (fermentación sumergida) que permiten alcanzar una mayor concentración de propágulos en un menor tiempo, conservando la actividad biocontroladora e insecticida de los hongos. Además, el control de las condiciones de producción es relativamente simple, ya que estos sistemas son homogéneos en términos de concentración celular, nutrientes y productos.

Es así como, en el estado del arte, existen diversos desarrollos donde se producen hongos mediante fermentación sumergida. Por ejemplo, el documento estadounidense US2020385669A1 hace referencia a métodos para cultivar hongos para la producción a gran escala de productos basados del cultivo de *Pisolithus tinctorius* mediante fermentación aeróbica sumergida en un medio líquido. El documento europeo EP3758497A1 divulga la producción y uso de hongos entomopatógenos para el control de plagas de artrópodos, en particular, proporciona métodos para producir *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, así como métodos para su uso, como composiciones bioplaguicidas, donde uno de los métodos de fermentación es la fermentación sumergida. Por su parte, el documento europeo EP2211625A1 se refiere a un método de cultivo por fermentación sumergida de *Aspergillus* que tienen el rasgo de producir una o más sustancias que tienen actividad de espinosina. El documento estadounidense US5360607A revela un proceso que incluye la fermentación de una o más especies de hongos eficaces para el control de plagas en un medio de cultivo por fermentación sumergida.

Además, también se han descrito composiciones plaguicidas donde se emplean hongos o productos derivados de estos que han sido producidos mediante fermentación sumergida. El documento europeo EP3200584A1 hace referencia a una composición líquida que comprende al menos un agente de control biológico donde dicho agente de control biológico son esporas de un hongo formador de esporas, donde dicha composición es útil en la protección de plantas. El documento WO2020219386A1 hace referencia a composiciones bioplaguicidas que utilizan hongos entomopatógenos beneficiosos para atacar una o más plagas que causan daño a plantas. Además, el documento estadounidense US2018312880A1 divulga un producto de fermentación obtenido a partir de hongos endofíticos de la familia *Stemphylium solani*, y que tiene actividad biocida simultáneamente contra más de

una categoría de organismos nocivos que afectan a las plantas, y que se seleccionan preferentemente entre insectos-plaga, hongos y nematodos.

Se ha encontrado que los hongos en el género *Lecanicillium* (anteriormente clasificados como la especie única *Verticillium lecanii*) y recientemente agrupado y nombrado como *Akanthomyces lecanii* (Zimm.) (Kepler et al., 2017) son importantes patógenos de insectos y algunos se han desarrollado como bioplaguicidas comerciales. En este sentido, Martha L. Chaparro et al. Divulgan un medio de cultivo basado en el mijo perla como sustrato para producir conidios de *Akanthomyces lecanii* con fines de biopesticidas empleando la fermentación en estado sólido (SSF) en bolsas de polipropileno (véase Martha L. Chaparro, Poldy J. Sanabria, Ana M. Jiménez, Martha I. Gómez, Eddy J. Bautista, Leyanis Mesa. “A circular economy approach for producing a fungal-based biopesticide employing pearl millet as a substrate and its economic evaluation”, disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100869>) y Retno Dyah Puspitarini et al. investigaron la bioeficacia de la aplicación individual y combinada del extracto de semilla de *Jatropha curcas* (JcSE) (Euphorbiaceae) y el hongo entomopatógeno *Akanthomyces lecanii* (Cordycipitaceae) sobre la mortalidad y la tasa de oviposición del ácaro rojo de los cítricos (véase Retno Dyah Puspitarini, Ito Fernando, Yosua Pangihutan Pardamean Alextio Sianturi. “Compatibility of *Jatropha curcas* seed extract and entomopathogenic fungus *Akanthomyces lecanii* against the citrus red mite *Panonychus citri*”, disponible en: <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1993134>)

No obstante, en el estado del arte no se ha proporcionado un método para producción de *Akanthomyces lecanii* mediante fermentación sumergida donde se emplea un medio de cultivo con solo dos componentes que son de bajo costo y ampliamente disponibles en el mercado y donde se han establecido las condiciones óptimas para su producción con la finalidad de maximizar la concentración de conidias y la biomasa. La invención permite disminuir el tiempo de producción e incrementar el rendimiento, además, es un proceso que promueve una producción agroindustrial sostenible y amigable con el medio ambiente al no usar bolsas de propileno que se usan generalmente en la fermentación de hongos en estado sólido.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el porcentaje de inmovilidad de ácaros (*Tetranychus urticae*) aplicando extracto del hongo *Akanthomyces lecanii* en diferentes concentraciones.

La gráfica se analizó por medio de una ANOVA ($P < 0,05$). Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según el test de comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se basa en un procedimiento para la producción de *Akanthomyces lecanii* y la optimización de nutrientes para formular un medio de cultivo líquido que garantice concentraciones máximas de conidias. Asimismo, se han estandarizado las condiciones de operación de un biorreactor (aproximadamente 200 L) de tanque agitado que permitan mantener las concentraciones obtenidas en escala de laboratorio.

El hongo *Akanthomyces lecanii* (*Lecanicillium lecanii*) cepa LUA026 utilizado para la presente invención fue proporcionado por el grupo de investigación FITOBIOL (Fitopatología y Biotecnología de Hongos) de la Universidad de Antioquia. *Akanthomyces lecanii* es un importante patógeno de insectos a partir del cual se puede desarrollar bioplaguicidas. Este hongo sigue la ruta típica de la patogénesis de hongos mitospóricos entomopatógenos que comprende la adherencia de conidios a la cutícula del huésped, la germinación de conidios, la penetración de la cutícula, la producción de blastosporas dentro del hemocoele, la ramificación de los micelios e invasión de los tejidos que causa la muerte del huésped y, finalmente, la producción de conidios en la superficie del cadáver (Askary et al., 1999).

El procedimiento para la producción de *Akanthomyces lecanii* inicia con la preparación del pre-inóculo en una caja de Petri que contiene 15 mL de Agar Papa Dextrosa (PDA) donde se coloca una alícuota de *Akanthomyces lecanii* conservado en crioviales con agua estéril y se incuba a temperatura ambiente durante 10 días. Posteriormente, se toma un disco de agar colonizado de 5 mm de diámetro y se introduce en tubo cónico de 50 mL conteniendo 10 mL de agua estéril, se agita en vórtex durante 1 minuto y se realiza el conteo de conidias en cámara de Neubauer. Finalmente, se ajusta la concentración a 1×10^6 Conidios/mL adicionando la cantidad necesaria de agua estéril.

Para la preparación del inóculo, esta se realiza en un matraz bafleado de 125 mL donde se adiciona 25 mL de medio de cultivo optimizado que comprende aproximadamente 30 - 40 g/L de almidón de papa y aproximadamente 1-3 g/L de

extracto de malta, el pH se ajusta a 5,5 usando NaOH o HCl en una concentración de 0,1M y se coloca un tapón de algodón o guata. Luego, el medio se esteriliza a 121°C y 15 psi durante 20 min. Cuando el medio se encuentra a temperatura ambiente, se le adiciona 250 µL de pre-inóculo y se incuba en agitador orbital a 27°C y 130 rpm por 5 días.

Después de 5 días de fermentación, se realiza el recuento de conidios en una cámara de Neubauer. El recuento se realiza sumando el total de conidias presentes en los 25 cuadrantes centrales de la cámara. A cada submuestra se le realiza tres veces este procedimiento para un total de seis lecturas. La concentración de conidios se calcula multiplicando el promedio del número de conidios obtenido por el inverso de la dilución empleada para el conteo (si la dilución empleada fue 10^{-3} el inverso es 10^3) y por el inverso del factor de la cámara (10^4). Antes de hacer la lectura se debe agitar la muestra para homogenizar y tomar 10 µL con micropipeta, el volumen se deposita de manera que el líquido entre por capilaridad sin que se formen burbujas en la cámara. Así en cada compartimiento de la cámara se depositarán 10 µL de la dilución que facilite en conteo de 10 a 50 conidios por cuadrante.

Para la producción de *Akanthomyces lecanii* en un biorreactor de tanque agitado a escala piloto, el biorreactor es de una capacidad de aproximadamente de 200 L con un tanque contenedor en acero inoxidable de un calibre de aproximadamente 3,5mm, aproximadamente 0,6 m de diámetro, aproximadamente 0,712 m de altura, con chaqueta para calentamiento calibre 2,5mm para 38 L de agua a 60 psi, con calentamiento por recirculación de agua o vapor y aislamiento térmico en acero inoxidable y lana mineral de roca a aproximadamente 180-200 °C. El biorreactor que tiene un sistema de homogeneización tipo propela plana de disco, control eléctrico de temperatura y variación de velocidad, eje removible descarga por gravedad en salida inferior acondicionada para presión. Además, el biorreactor está dotado de un sistema de generación de vapor (caldera) para esterilización *in situ*, sistema de regulación de flujo de aire (rotámetro) y puertos para la adición de HCl (1M), NaOH (1M) y antiespumante es caso de requerirse. El equipo se acopla a una línea de flujo de aire comprimido el cuál se esteriliza con filtros de membrana hidrófoba (poros de 0.2 µm) antes de su ingreso al sistema de fermentación.

La fermentación sumergida de *Akanthomyces lecanii* a escala piloto comprende adicionar aproximadamente 120 L de medio de cultivo optimizado que comprende

aproximadamente 30 - 40 g/L de almidón de papa y aproximadamente 1-3 g/L de extracto de malta esterilizado por adición de vapor a 121°C y 15 psi durante 20 min. Cuando se alcanza la temperatura ambiente, se adicionan aproximadamente entre 0,5 – 1,5% de inóculo respecto de la cantidad de medio de cultivo. Las condiciones establecidas para llevar a cabo la fermentación se encuentran en la Tabla 1. Mediante este proceso de fermentación se obtiene una concentración final de entre aproximadamente 1×10^8 – 1×10^{10} conidias/mL.

Tabla 1. Condiciones de Fermentación

Condiciones de Fermentación	
pH inicial	5,5
Temperatura (°C)	27
Agitación (rpm)	180 – 220
Aireación (vvm)	0,8 – 1, 2
Tiempo de fermentación (días)	5

En una modalidad preferida de la invención, el medio cultivo usado en el proceso de fermentación sumergida de *Akanthomyces lecanii* comprende aproximadamente 35 g/L de almidón de papa y aproximadamente 2 g/L de extracto de malta.

En una modalidad preferida de la invención, la concentración de inóculo usada en el proceso de fermentación sumergida de *Akanthomyces lecanii* es de aproximadamente 1% respecto de la cantidad de medio de cultivo.

En una modalidad preferida de la invención, la agitación usada en el proceso de fermentación sumergida de *Akanthomyces lecanii* es de aproximadamente 200 rpm.

En una modalidad preferida de la invención, la aireación usada en el proceso de fermentación sumergida de *Akanthomyces lecanii* es de aproximadamente 1 vvm.

En otra modalidad de la invención se proporciona una composición que comprende un extracto de *Akanthomyces lecanii* obtenido por el procedimiento de la invención. Preferentemente, dicha composición tiene actividad biocida contra insectos y/o ácaros. Muy preferentemente, la composición es útil contra *Tetranychus urticae*.

Ejemplo 1: Evaluación *in vitro* del extracto crudo de *Akanthomyces lecanii* sobre *Tetranychus urticae*.

Materiales y Métodos

Para la obtención de extractos metabólicos del hongo *Akanthomyces lecanii* se puso en fermentación líquida con el medio de cultivo que consiste en 35 g/L de almidón de papa y 2 g/L de extracto de malta, para ello se preparó el inóculo del hongo a una concentración de 1×10^8 Conidias/mL y se agregó un volumen de 2 mL (1%) en 200 mL de medio de cultivo en *erlenmeyer* bafleados de 500 mL. Se incubaron a 27°C y 130 rpm por 5 días.

Después de los 5 días de Fermentación se le aplicó una extracción líquido-líquido empleando acetato de etilo. Se realizaron dos extracciones con el solvente en una proporción 2:1 solvente:fermento. La fase orgánica fue recuperada y filtrada con papel filtro en el cual se le adicionó sulfato de sodio para eliminar el agua remanente. Posteriormente, se eliminó el solvente mediante un evaporador rotativo hasta obtener el extracto crudo. El extracto se resuspendió en metanol y se llevaron a concentraciones de 100%, 90%, 70%, 50%, 25%, 10%. Cada concentración y control con 5 repeticiones y 10 ácaros por unidad experimental (Caja de Petri). Se probó con estadios adultos de los ácaros mediante una prueba de patogenicidad (Saksirirat & Hoppe, 1991).

Análisis Estadístico

Se realizó ANOVA con un nivel de significancia del 5%, y una prueba de comparación múltiple para determinar diferencias entre los tratamientos. Todos los análisis se hicieron por medio del software estadístico R (R Core Team, 2014).

Resultados

Se tomó el día 3 para evaluación del porcentaje de inmovilidad de ácaros luego de aplicar las distintas concentraciones del extracto. Se evidencio que las mayores concentraciones del 100% y el 90% efectuaron un promedio del 81% de ácaros inmóviles, seguidos de los tratamientos del 70% y el 50%. Los menores efectos, fueron causados por las concentraciones de 10% y 25%. Así mismo, el control con agua fue estadísticamente diferente de los demás tratamientos excepto con el del 25%.

Dichos resultados son la materia prima para dilucidar los posibles metabolitos se encuentran en el medio de cultivo que tengan alguna relación con la inmovilidad de *Tetranychus urticae*. Se aprecia que a mayor concentración del extracto mayor

afectación se dio sobre los ácaros, siendo de mayor a menor el índice de inmovilidad (100%, 90%, 70%, 50%, 10%, 25% y el control con agua) (véase Figura 1).