



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE QUITINASAS, PROTEASAS E
HIDROFOBINAS DE *Lecanicillium lecanii* EN CULTIVOS LÍQUIDO
Y SÓLIDO UTILIZANDO DIVERSAS FUENTES DE CARBONO.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

I.B.I. Zaizy Rocha Pino

COMITÉ TUTORIAL

Directora: Dra. Keiko Shirai Matsumoto¹

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino¹

Asesor: Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura²

¹Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

²Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-Iztapalapa

México D.F. a 17 de diciembre del 2009

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de SEP-CONACYT No. 105628. Asimismo agradezco a la Unión Europea por el financiamiento otorgado a través del proyecto Alfa Polylife para asistir al curso “Biopolymers in materials y life sciences: a course for training of graduate y postgraduate students” realizado en la Universidad de Potsdam, Alemania con duración de 1 mes.

México D.F. a 17 de diciembre del 2009

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE QUITINASAS, PROTEASAS E
HIDROFOBINAS DE *Lecanicillium lecanii* EN CULTIVOS LÍQUIDO Y SÓLIDO
UTILIZANDO DIVERSAS FUENTES DE CARBONO.

que presentó

I.B.I. Zaizy Rocha Pino

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Asesores de tesis:

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura

Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma
Metropolitana Iztapalapa

H. Jurado:

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Secretario: Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura

Vocal: Dra. Raquel Alatorre Rosas

Vocal: Dr. Humberto González Márquez

Vocal: Dr. Gabriel Vigueras Ramírez



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Keiko Shirai por la dirección y apoyo brindado para la realización de éste trabajo, así como por sus conocimientos transmitidos y su confianza depositada en mí, a lo largo de todo este tiempo.

Al Dr. Pablo Damián Matsumura y Dr. Francisco Fernández Perrino, por su asesoramiento, paciencia y apoyo en la realización del trabajo y la revisión de la tesis.

A la Dra. Raquel Alatorre que revisó pacientemente esta tesis.

Al Dr. Gabriel Viguera por su apoyo, consejos, conocimientos transmitidos y su amistad en todo este tiempo.

Al Dr. Humberto González Márquez por su paciente revisión y valiosos comentarios de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio; Neith, Diana, Gustavo, Carmen, Ulises, Facundo, Carolina. A Luis, Dennys y a los amigos de la generación, de la PUU4 y el W. Por compartir sus conocimientos, amistad y compañía que han contribuido a que el trabajo sea más placentero.

Y en especial a mis padres y hermanos por su fuerza, comprensión y apoyo que siempre me han transmitido y simplemente porque son lo más valioso en mi vida.

*Aunque el cielo no se una con el mar,
no impide que se pueda reflejar.*

ÍNDICE

ÍNDICE	II
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Producción, función y clasificación de hidrofobinas de hongos	1
I.2. Producción, función y clasificación de proteasas y quitinasas de hongos	6
II. ANTECEDENTES	9
II.1. Producción de quitinasas de hongos	9
II.1.1. Factores extrínsecos que afectan la producción de quitinasas	9
II.1.2. Producción de quitinasas en cultivos sólidos	10
II.2. Producción de proteasas en el proceso de patogénesis de los hongos entomopatógenos	12
II.3. Producción de hidrofobinas en hongos	13
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVOS	16
V. 1. Objetivo general	16
V. 2. Objetivos particulares	16

VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	17
VI.1.	Microorganismo y preparación de inóculo.	17
VI.2.	Medio de cultivo.	17
VI.3.	Preparación de quitina coloidal.	17
VI.4.	Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de quitinasas y proteasas de <i>L. lecanii</i> en cultivo sumergido.	18
VI.4.1.	Condiciones de cultivo sumergido (SmC)	18
VI.4.2.	Determinación de la biomasa	18
VI.4.3.	Determinación de actividad enzimática del extracto enzimático crudo	19
VI.4.4.	Estimación de parámetros cinéticos de biomasa	20
VI.5.	Efecto del tipo de cultivo sobre el crecimiento y producción de quitinasas y proteasas de <i>L. lecanii</i>	21
VI.5.1.	Condiciones de cultivo sólido (SSC)	21
VI.5.2.	Determinación de la actividad enzimática del extracto enzimático crudo	21
VI.5.3.	Determinación de la producción de CO ₂ en cultivo sumergido y sólido	21
VI.5.4.	Estimación de parámetros cinéticos de producción de CO ₂	22
VI.6.	Efecto del tipo de sustrato y de cultivo sobre el perfil de quitinasas producido por <i>L. lecanii</i>	23
VI.6.1.	Zimogramas de actividad quitinolítica después de la electroforesis de <i>L. lecanii</i>	23
VI.7.	Determinación de hidrofobinas en cultivos SmC y SSC	24
VI.7.1.	Extracción de hidrofobinas	24
VI.7.2.	Análisis de cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase reversa (RP- HPLC)	25

VI.7.3.	Actividad superficial de hidrofobinas sobre sólidos _____	25
VI.7.4.	Determinación de la masa molecular mediante electroforesis SDS-PAGE _____	26
VI.7.1.	Análisis de cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión molecular (SEC- HPLC) _____	26
VI.8.	Análisis estadístico _____	26
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	27
VII.1.	Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de quitinasas y proteasas de <i>L. lecanii</i> en cultivo sumergido. _____	27
VII.2.	Efecto del tipo de cultivo sobre el crecimiento y producción de quitinasas y proteasas de <i>L. lecanii</i> . _____	33
VII.2.1.	Determinación de parámetros cinéticos de producción de CO ₂ de <i>L. lecanii</i> en cultivo SmC y SSC. _____	33
VII.2.2.	Determinación de actividad quitinolítica y proteolítica en cultivo sólido. _____	35
VII.3.	Efecto del tipo de sustrato y de cultivo sobre el perfil de quitinasas producido por <i>L. lecanii</i> . _____	38
VII.1.	Determinación de hidrofobinas en cultivos sumergido y sólido. _____	44
VII.1.1.	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) _____	44
VII.1.2.	Actividad superficial de hidrofobinas _____	45
VII.1.3.	Determinación de la masa molecular de las hidrofobinas _____	47
VII.1.4.	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión molecular (SEC- HPLC) _____	48
VIII.	CONCLUSIONES _____	50
IX.	PERSPECTIVAS _____	51
X.	TRABAJOS PRESENTADOS _____	52

XI. REFERENCIAS _____ ¡Error! Marcador no definido.

ANEXO _____ 61

A1. Curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA) _____ 61

A2. Curva patrón de p-nitrofenol _____ 61

A3. Determinación de la concentración de CO₂ _____ 62

A4. Análisis estadístico de actividad quitinolítica en cultivo SmC y SSC _____ 63

A4. Análisis estadístico de actividad quitinolítica en cultivo SmC y SSC a las
144 h de cultivo _____ 63

A4. Análisis estadístico de actividad quitinolítica en cultivo SmC y SSC a las
72 h de cultivo _____ 64

A5. Análisis estadístico de actividad superficial de hidrofobinas sobre sólidos 65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Parámetros cinéticos del crecimiento de <i>L. lecanii</i> 2149 en cultivo sumergido._____	28
Tabla 2	Parámetros cinéticos de <i>L. lecanii</i> 2149 cultivado en líquido y sólido utilizando quitina coloidal como fuente de carbono después de 144 h de cultivo._____	34
Tabla 3	Actividad N-acetilhexosaminidasa (Nhasa) de <i>L. lecanii</i> 2149 cultivado en líquido y sólido utilizando quitina coloidal como fuente de carbono después de 144 h de cultivo._____	35
Tabla 4	Actividad superficial de hidrofobinas._____	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de la formación de la hifa aérea de hongos filamentosos._____	2
Figura 2	Estructura primaria de hidrofobinas de clase I y clase II._____	4
Figura 3	Interacción de las hidrofobinas con el medio._____	5
Figura 4	Hidrólisis de quitina para su asimilación._____	7
Figura 5	Degradación de quitina mediante endoquitinasas, exoquitinasas y oligosacaridasas._____	8
Figura 6	Determinación del ángulo de contacto._____	25
Figura 7	Actividad de N-acetil hexosaminidasa de <i>L. lecanii</i> 2149 cultivado en medio líquido utilizando fructosa (F), quitina coloidal (Q), fructosa con quitina coloidal (FQ) y sacarosa con quitina coloidal (SaQ) como fuentes de carbono._____	30
Figura 8	Actividad de proteasas ácidas y básicas de <i>L. lecanii</i> 2149 cultivado en medio líquido utilizando como fuentes de carbono: A) fructosa (F), quitina coloidal (Q), B) fructosa con quitina coloidal (FQ) y sacarosa con quitina coloidal (SaQ).__	32
Figura 9	Producción de CO ₂ de <i>L. lecanii</i> 2149 en cultivo SmC y SSC utilizando quitina coloidal como fuente de carbono._____	34
Figura 10	Actividad de N-acetil hexosaminidasa de <i>L. lecanii</i> 2149 en cultivo SSC utilizando quitina coloidal como fuente de carbono._____	36
Figura 11	Actividad de proteasas ácidas y básicas de <i>L. lecanii</i> 2149 en cultivo SSC utilizando quitina coloidal como fuente de carbono._____	37
Figura 12	Electroferograma de las proteínas secretadas al medio de cultivo por <i>L. Lecanii</i> a las 144 h del cultivo en sumergido SmC utilizando fructosa (SmCF), quitina (SmCQ), fructosa	38

	con quitina (SmCFQ) o sacarosa con quitina (SmCSaQ) y en sólido (SSC) utilizando fructosa (SSCF) o quitina coloidal (SSCSQ) como fuentes de carbono._____	
Figura 13	Actividad quitinolítica en SDS-PAGE con glicol quitina (GQ). Extractos enzimáticos de 144h de <i>L. lecanii</i> utilizando fructosa (SmCF), quitina coloidal (SmCQ o SSCQ), fructosa con quitina coloidal (SmCFQ) y sacarosa con quitina coloidal (SmCSAQ) como fuente de carbono: Carril (M) es el marcador de peso molecular. A) Tinción con azul de coomassie, B) Tinción con blanco de calcoflúor._____	40
Figura 14	Actividad quitinolítica en SDS-PAGE de <i>L. lecanii</i> con QP,QT, MuQT, MuQB y MuG como sustrato; extracto enzimático de 144h; 1) SSCQ, 2) SmCQ, 3) SmCFQ, 4) SmCSAQ, con tinción de blanco de calcoflúor._____	41
Figura 15	HPLC-RP de extractos de hidrofobinas de <i>L. lecanii</i> cultivado en SmC y SSC utilizando quitina coloidal o fructosa como fuente de carbono._____	45
Figura 16	Electroferograma SDS-PAGE de extractos de hidrofobinas obtenidos del cultivo SSC de <i>L. lecanii</i> con fructosa (SSCF) o quitina coloidal (SSCQ) como fuentes de carbono._____	48
Figura 17	HPLC-SEC. Extracto de hidrofobina de <i>L. lecanii</i> en medio sólido utilizando quitina coloidal como fuente de carbono.____	49
Figura A1	Curva patrón de BSA._____	61
Figura A2	Curva patrón de p-nitrofenol._____	62
Figura A3	Curva patrón de CO ₂ ._____	63

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

PUF	Espuma de poliuretano
SSC	Cultivo solido estático
SmC	Cultivo sumergido
F	Fructosa
Q	Quitina coloidal
FQ	Fructosa con quitina coloidal
SaQ	Sacarosa con quitina coloidal
SmCF	Cultivo sumergido con fructosa
SmCQ	Cultivo sumergido con quitina coloidal
SmCFQ	Cultivo sumergido con fructosa y quitina coloidal
SmCSaQ	Cultivo sumergido con sacarosa y quitina coloidal
SSCF	Cultivo solido estático con fructosa
SSCQ	Cultivo solido estático con quitina
GQ	glicol quitina
QP	penta-N-acetilquitopentaosa
QT	tetra-N-acetilquitotetraosa
MuQT	4-metilumbeliferil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriósido
MuQB	4-metilumbeliferil β -D-N,N'-diacetilquitobiósido
MuG	4-metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosamina
Nhasa	N-acetilhexosaminidasa
M _r	Masa molecular relativa
SI	Sustrato inicial

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos producen diversas enzimas durante su proceso de patogénesis, entre ellas proteasas y quitinasas, así como hidrofobinas que permiten su adherencia al huésped, de las cuales se ha reportado que factores extrínsecos afectan su producción (St. Leger y col, 1986 y 1998). Sin embargo, poco se sabe de su producción por hongos como *Lecanicillium lecanii*, el cual es un hongo entomopatógeno utilizado como bioinsecticida en agricultura y horticultura a nivel comercial. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto producido por el tipo de cultivo; en medio sólido (SSC) utilizando poliuretano como soporte, y en cultivo sumergido (SmC), y la fuente de carbono, en la producción quitinolítica, proteolítica y de hidrofobinas por *L. lecanii*. Éste hongo fue cultivado en SSC, y SmC, como fuentes de carbono se utilizaron: fructosa (F), fructosa con quitina (FQ), sacarosa con quitina (SaQ) y quitina (Q). La mayor producción de N-acetilhexosaminidasa (Nhasa) se obtuvo utilizando quitina coloidal como fuente de carbono a las 72 h en ambos cultivos. En SSCQ la producción de Nhasa (17.7 U/g sustrato inicial) fue mayor que en SmCQ (1.3 U/g sustrato inicial).

Se observó que en SmC la producción de proteasas básicas (6.9 U/ μ g de proteína) y ácidas (6.3 U/ μ g de proteína) fue similar en presencia de quitina, mientras que en cultivos con otras fuentes de carbono se favoreció hasta 10 veces más la producción de proteasas ácidas que las básicas. Asimismo, en SSCQ la producción de proteasas (ácidas: 1.6 U/ μ g de proteína y básicas: 1 U/ μ g de proteína) fue hasta 6 veces menor en comparación con el SmCQ, lo que repercutió en los productos del cultivo susceptibles de ser hidrolizados por proteasas.

La producción de hidrofobinas fue 10 veces mayor en SSC que en SmC. Además, el extracto de hidrofobinas de SSCQ mostró mayor actividad y redujo la hidrofobicidad del teflón hasta en 50%, mientras que las hidrofobinas extraídas de

SmCF sólo lo hicieron en un 8 % (sin encontrarse diferencia significativa con el teflón usado como control). En ambos casos, las proteínas mostraron una masa molecular (M_r) de 7 kDa.

Los zimogramas mostraron bandas con actividad quitinolítica de masas moleculares, desde 9 hasta 111 kDa. Se determinó la presencia de endoquitinasas, exoquitinasas y N-acetilhexosaminidasas en la mayoría de los tratamientos. Sólo en el cultivo SmC con la adición de fructosa y quitina coloidal mostraron proteínas con actividad quitobiasa.

Estos resultados proporcionan información de los efectos del tipo de cultivo y fuentes de carbono en la producción de proteasas, quitinasas e hidrofobinas de *L. lecanii*, las cuales son productos de gran importancia debido a sus posibles aplicaciones. Es importante señalar que las hidrofobinas se produjeron en altos niveles en condiciones favorables para la inducción de quitinasas como la quitina coloidal y cultivo sólido, lo que sugiere que podrían estar relacionadas con el mecanismo de la patogénesis de los hongos, por lo que se debe realizar mayor investigación.

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi produce various enzymes during the process of pathogenesis, including proteases and chitinases, as well as allowing hydrophobins its adherence to the host, which has been reported that extrinsic factors affecting its production (St. Leger *et al*, 1986 y 1998). However, there are not studies about their production by fungi such as *Lecanicillium lecanii*, an entomopathogenic fungus which is used as bio-insecticide in agriculture and horticulture on a commercial level. The aim of this study was the evaluation of the effect of culture type; on solid media (SSC) using polyurethane as support, and on media submerged (SmC), and the carbon sources, in the production of chitinolytic enzymes and hydrophobins of *Lecanicillium lecanii*. This fungus was grown on SSC media and SmC, as carbon sources were used: fructose (F), fructose with chitin (CF), sucrose with chitin (SaQ) and chitin (Q). Increased production of N-acetylhexosaminidase (Nhasa) was obtained using colloidal chitin at 72 h in SmC and SSC cultures. The Nhasa production in SSCQ (17.7 U/g initial substrate) was higher than the culture SmCQ (1.3 U/g initial substrate).

The basic (6.9 U/ μ g protein) and acid (6.3 U/ μ g protein) proteases production was similar in presence of chitin, while in cultures with others carbon sources, the acid protease production was 10-fold higher than basic proteases. The protease production (acid: 1.6 U/ μ g protein y basic: 1 U/ μ g protein) was 6-fold lower in solid culture than in SmC, which affects the production of other proteins since might be hydrolyzed by the proteases.

Hydrophobins production was 10-fold higher in SSC cultivation than in SmC. In addition, the extract of hydrophobins of SSCQ showed higher activity on surface due to the reduction up to 50% of the hydrophobicity of teflon, whereas hydrophobins found in SmCF reduces only 8% without significant difference with teflon. The molecular mass (M_r) of these proteins were determined *ca.* 7 kDa.

The zymograms showed bands with chitinolytic activity with molecular mass, from 9 to 111 kDa. We determined the presence of endochitinases, exochitinases and N-acetylhexosaminidase in most treatments. Only SmC culture with added fructose and colloidal chitin showed bands chitobiase activity.

These results provide information of the effects of culture type and carbon sources on production of proteases, chitinases and hydrophobins of *L. lecanii*, which are products of great importance due to their potential applications. It is important to note that hydrophobins were produced at high levels under favorable conditions for the induction of chitinases such as colloidal chitin and solid culture that suggest a relationship that might be related to the fungi mechanism of pathogenesis, thus more research should be performed.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos representan un grupo diverso de microorganismos eucariontes, constituidos por hifas frecuentemente ramificadas, que forman el micelio (Cox y col., 1998). Entre los hongos filamentosos se encuentra el género *Lecanicillium*, clasificado dentro del grupo de los ascomicetos y que agrupa especies micoparásitas y entomopatógenas. *Lecanicillium lecanii* es un hongo filamentoso, entomopatógeno, con capacidad para infectar insectos como la mosquita blanca, pulgones, cochinillas y trips (insectos patógenos de plantas). Por ello ha sido utilizado comercialmente como una alternativa de biocontrol en agricultura y horticultura (Garraway y Evans 1984; Gillespie y Claydon, 1989; Osborne y Landa 1992; Butt y col., 2001).

Los hongos entomopatógenos se desarrollan en ambientes hidrofóbicos, como es el caso de la cutícula de los insectos (constituida principalmente por ceras, proteínas y quitina). Los hongos producen proteínas extracelulares, entre ellas: hidrofobinas, proteasas y quitinasas, como parte del mecanismo efector del antagonismo (St. Leger y col., 1986, 1998).

I.1. Producción, función y clasificación de hidrofobinas de hongos

Dentro de los procesos claves para el desarrollo de los hongos y sus procesos infectivos, la formación de hifas aéreas, es un proceso en el que se da la secreción de moléculas surfactantes que disminuyen la tensión superficial, afectada por la fuerza cohesiva entre las moléculas del agua en la superficie de los ambientes acuosos. Estas moléculas surfactantes son proteínas conocidas como hidrofobinas y son excretadas para formar una capa o rodlet alrededor de las hifas, confiriendo hidrofobicidad a la superficie del hongo. En sistemas

líquidos, las hidrofobinas disminuyen la tensión del agua, capacitando a las hifas para crecer en aire y en sistemas sólido-agua (Figura 1), confieren hidrofobicidad a las hifas evitando su desecación y median la adhesión de las hifas a la superficie del huésped, ya sea en plantas o a la cutícula de insectos (Talbot y col., 1996; Tucker y Talbot, 2001), tal es el caso de *Schizophyllum commune*, del cual se ha reportado que cepas de este hongo con la delección del gen que codifica para la hidrofobina SC3, pierden la capacidad de formar hifas aéreas (Wösten y col., 1993). Además, las hidrofobinas son componentes estructurales que recubren a los cuerpos fructíferos, como se ha descrito en *Agaricus bisporus* (Lugones y col., 1998).

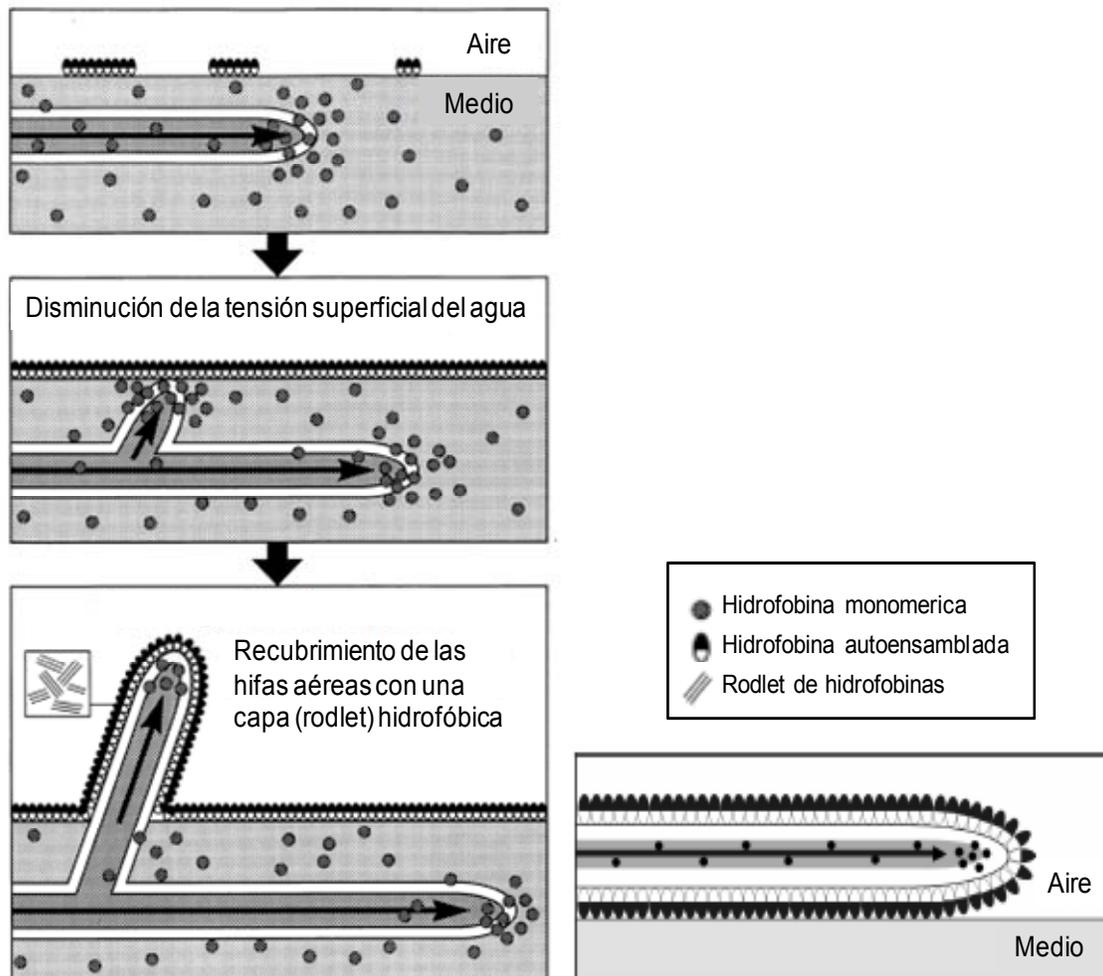


Figura 1. Modelo de la formación de la hifa aérea de hongos filamentosos (Wösten y Willey, 2000).

Las hidrofobinas son proteínas pequeñas, de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, caracterizados por la presencia de ocho regiones conservadas de cisteínas que forman cuatro puentes disulfuro (Zangi y col, 2002). Las hidrofobinas se clasifican en:

- Clase I. Tienen la capacidad de formar interfases hidrofílicas e hidrofóbicas, es decir, son proteínas anfipáticas que forman capas de 10 nm de espesor y pueden ser disueltas con el tratamiento de los ácidos trifluoroacético o fórmico. Forman películas de proteínas muy estables, insolubles en dodecil sulfato de sodio, resistiendo incluso lavados a 100 °C (Schuren y Wessels, 1990). Un ejemplo de esta clase es la hidrofobina SC3, del basidiomiceto *S. commune*, que reduce la tensión superficial del agua desde 72 a 24 mJ/ m² (Calonje y col., 2002).
- Clase II. Forman películas, solubles en 2% de dodecil sulfato de sodio o etanol al 60%. Un ejemplo de este tipo es la hidrofobina cerato-ulmin (CU) de *Ophiostoma ulmi* (Richards y col., 1993; Bowden y col, 1994).

Las hidrofobinas de clase I y clase II también difieren en su disposición de aminoácidos, es decir, mientras que entre las hidrofobinas de clase I, los loops (bucle) formados por los puentes disulfuro varían en el número y tipo de aminoácidos, en el caso de las hidrofobinas de clase II, los loops son más conservados (Wösten y de Votch, 2000) (Figura 2).

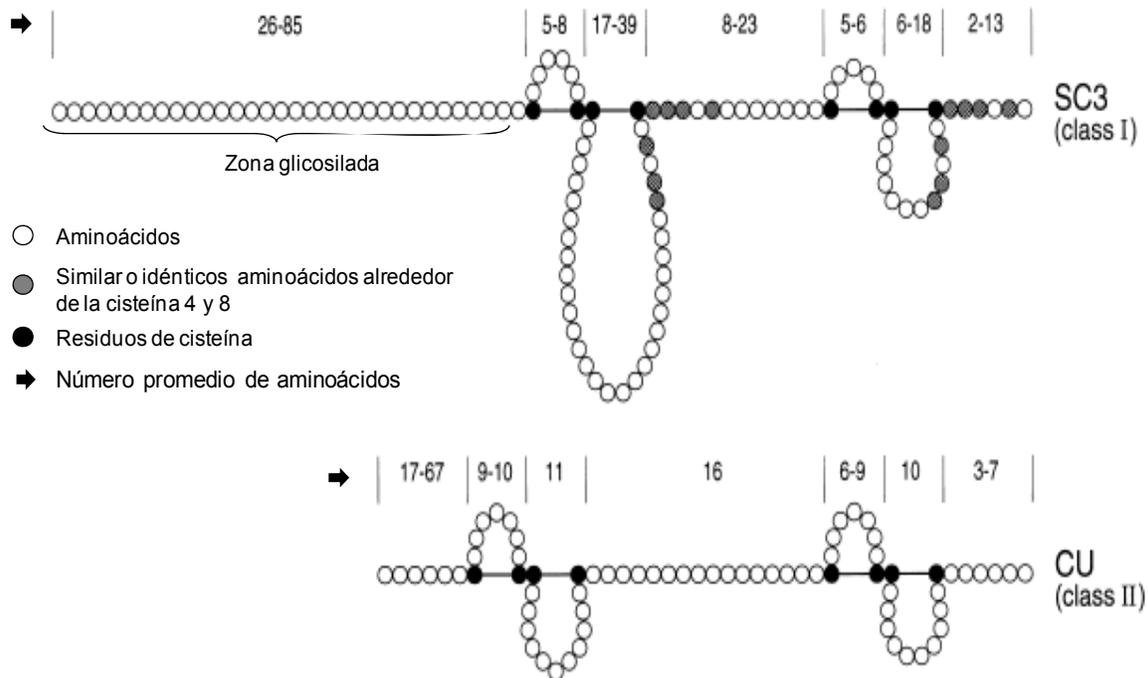


Figura 2. Estructura primaria de hidrofobinas de clase I y clase II.
(Wösten y de Votch, 2000).

Las hidrofobinas se autoensamblan en interfases hidrofílicas-hidrofóbicas como una membrana anfipática, conocida como rodlet (pellet), con arreglo en paralelo alrededor de las esporas o del micelio. Los rodlets de la hidrofobinas SC3 y SC4, de *S. commune*, de la clase I, son similares a los formados por proteínas amiloides. Se ha reportado que la cadena glicosilada de las hidrofobinas promueve la formación de la estructura en α -hélice y ésta, a su vez, parece ser típica en las hidrofobinas de clase I y ser inducida durante su ensamblaje sobre un sólido hidrofóbico. Por ello se ha relacionado con la alta insolubilidad del ensamblaje y la adhesión del hongo a sustratos hidrofóbicos, como la cutícula de insectos. Por ejemplo la hidrofobina SC3, en presencia de una interfase aire-agua muestra una mayor proporción de estructura β - laminar (65%) que de α -hélice (16%). Esta configuración proporciona mayor estabilidad en comparación a su forma soluble donde, su estructura presenta un 23% de α -hélice y un 41% β - laminar (Wösten y col., 1994; de Vocht y col., 1998).

El arreglo de las hidrofobinas en una interfase hidrofílica-hidrofóbica disminuye la tensión superficial, logrando estabilizar gotas de aceite en agua. En sólidos, su característica anfipática, cambia la interacción del líquido con la superficie, convirtiendo la superficie de hidrofóbica a hidrofílica y viceversa (Figura 3). La interacción entre un líquido y una superficie sólida se determina mediante el ángulo de contacto (θ) de una gota de agua colocada sobre la superficie de un sólido. Un ángulo de contacto de 90° o mayor, caracteriza a una superficie como no-humectable (hidrofóbica), y uno menor de 90° como humectable (hidrofílica), (Wösten y col., 1994; Wösten y Wessels, 1997; Wösten y de Vocht, 2000; Scholtmeijer y col., 2001; Wösten y col., 2001; Lumsdon y col., 2005; Wang y col., 2005).

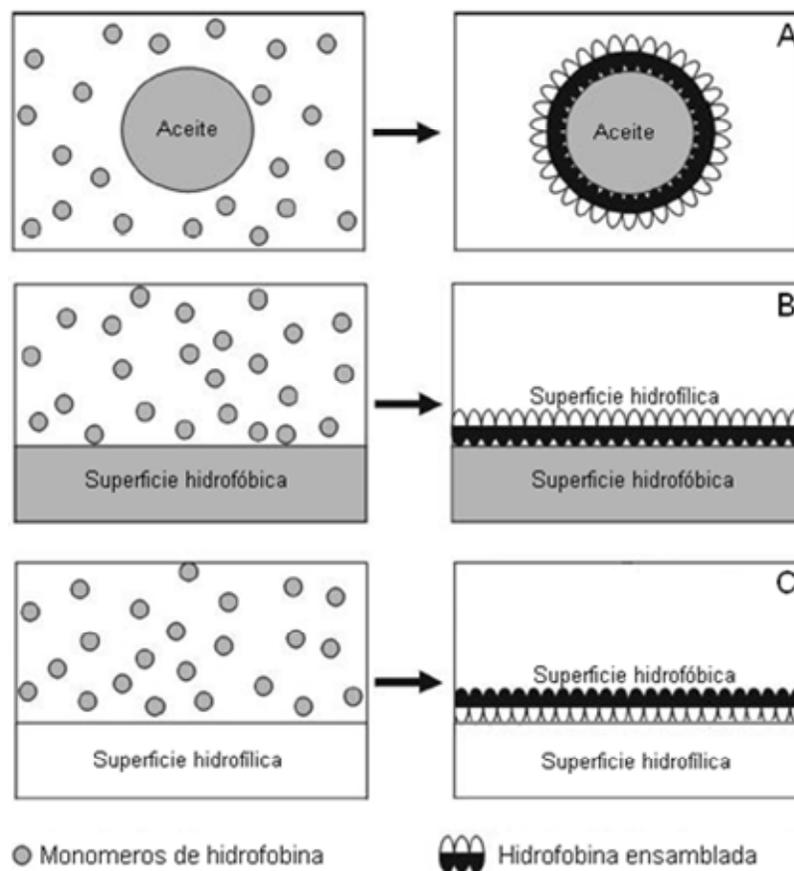


Figura 3. Interacción de las hidrofobinas con el medio: A) gota de aceite, B) superficie hidrofílica, C) superficie hidrofóbica (Wösten, 2001).

I.2. Producción, función y clasificación de proteasas y quitinasas de hongos

Una vez que los hongos están capacitados para desarrollarse en los ambientes hidrofóbicos, excretan grandes cantidades de enzimas hidrolíticas que degradan los sustratos poliméricos (p. ej., celulosa, quitina, almidón y proteínas) hasta compuestos más simples que sirvan como nutrientes. Entre esas enzimas se incluyen las proteasas, que pueden ser de tipo subtilisinas, tripsinas, metaloproteasas y peptidasas (St. Leger y col., 1986; Bidochka y Kachatourians 1988; St. Leger y col., 1998).

Otro tipo de enzimas que excretan los hongos para degradar sustratos poliméricos para que sirvan como nutrientes, son las quitinasas. Las enzimas quitinolíticas, en particular, degradan quitina y están estrechamente reguladas por sus productos de degradación (Deshpye, 1986; St. Leger y col., 1986; St. Leger y col., 1987) por lo que en hongos entomopatógenos, son sólo requeridas por períodos cortos durante la penetración de las hifas a la cutícula del huésped.

La quitina es, el segundo biopolímero de mayor abundancia en la naturaleza (el primero es la celulosa). La quitina se encuentra formada por unidades de N-acetilglucosamina (2-acetamida, 2-desoxi- β -D-glucosa) enlazadas por uniones β (1-4). La quitina y sus derivados como el quitosano y los quitooligómeros, tienen numerosas aplicaciones en la industria de los alimentos, la farmacia, los cosméticos, las pinturas y los textiles. Las ventajas de su uso residen en ser materiales naturales, no tóxicos, biocompatibles y biodegradables (Shirai y col., 1996).

La hidrólisis de la quitina es realizada por un complejo de enzimas y transportadores que colaboran para que la quitina sea asimilada por el hongo (Figura 4) (Howard y col., 2003).

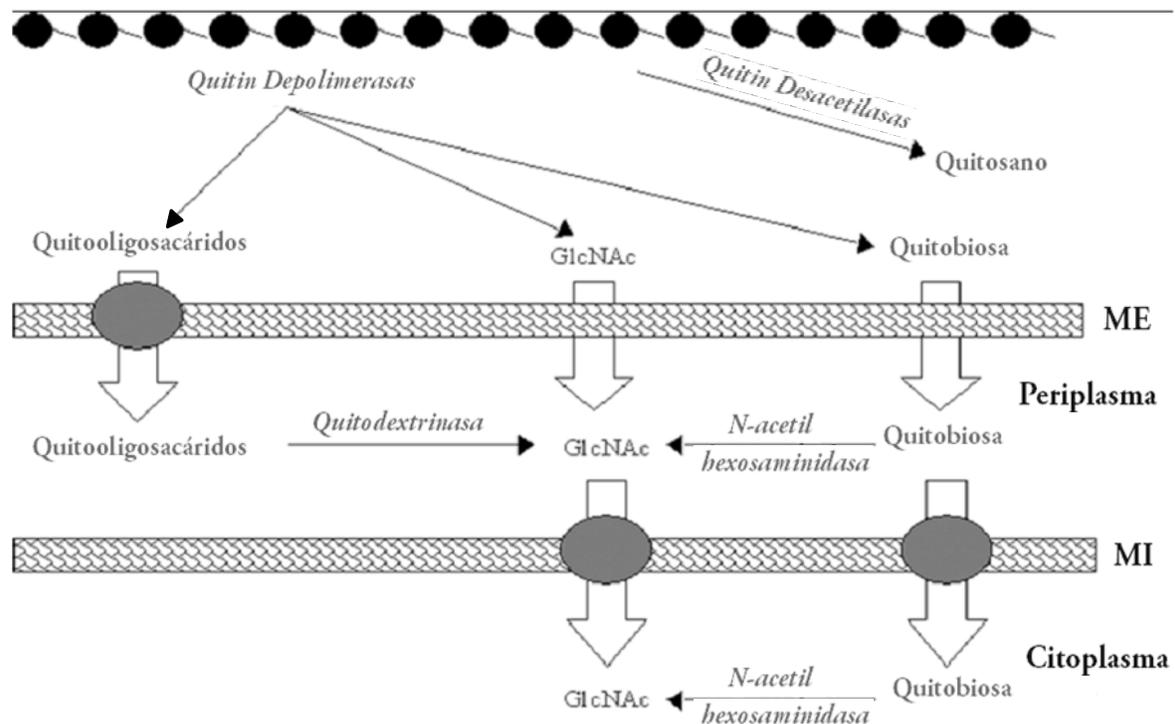


Figura 4. Hidrólisis y transporte de quitina para su asimilación. Cadena de quitina (•••), membrana externa (ME), membrana interna (MI) (Howard y col., 2003).

Las quitinasas se agrupan en:

- Endoquitinasas (EC 3.2.1.14), las cuales cortan aleatoriamente enlaces internos de la cadena de quitina, produciendo oligómeros de N-acetilglucosamina.
- Exoquitinasas (EC 3.2.1.14), que cortan enlaces no reducidos al final de la cadena de quitina, liberando diacetilquitobiosa sin producir N-acetilglucosamina.

- c) Quitobiasas (EC 3.2.1.30), catalizan la progresiva liberación de dímeros de N-acetilglucosamina, es decir, diacetilquitobiosa, mediante la hidrólisis los enlaces no reducidos al final de la cadena del oligómero, sin producir monosacáridos u oligosacáridos.
- d) N- β -acetilglucosaminidasa ó N- β -acetilhexosaminidasa (EC 3.2.1.52), que corta el enlace no reducido de la quitina, aunque con preferencia utiliza como sustrato a la quitobiosa y puede actuar sobre quitotriosa o quitotetraosa.

En la Figura 5 se puede observar claramente la acción de cada tipo de quitinasa (Horsch y col., 1997; Duo-Chuan, 2006).

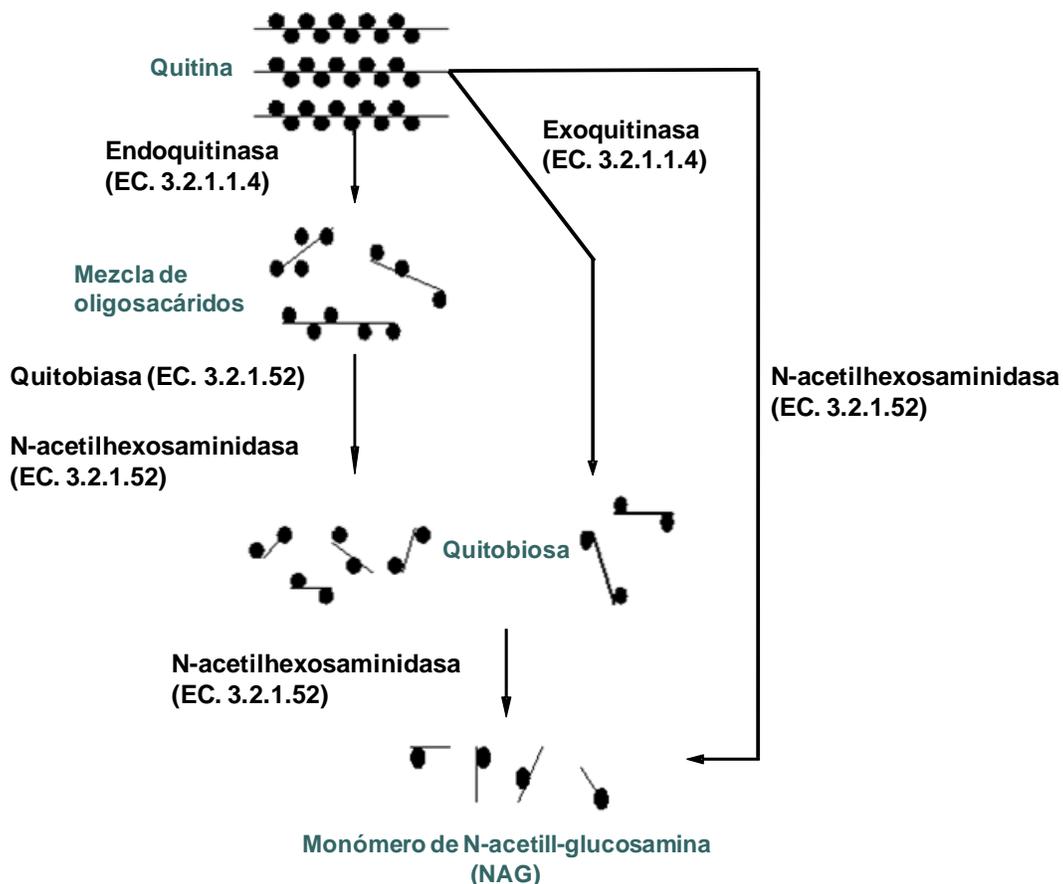


Figura 5. Degradación de quitina mediante endoquitinasas, exoquitinasas y oligosacaridasas. N-acetil-D-glucosamina (NAG); grupo acetilo (•).

(Horsch y col., 1997).

II. ANTECEDENTES

II.1. Producción de quitinasas de hongos

II.1.1. Factores extrínsecos que afectan la producción de quitinasas

Se ha mostrado que factores extrínsecos como la humedad, la actividad de agua, los gases (CO₂, O₂), el pH, la concentración, tipo de nutrientes, y el tipo de cultivo afectan la fisiología, así como la producción de los metabolitos de los hongos. Existen reportes en los que la actividad quitinolítica y proteolítica se incrementa en presencia de polímeros como la quitina, la pared celular de *Agaricus bisporus* ó la cutícula de insectos, los cuales pueden actuar como fuentes de carbono y nitrógeno induciendo la actividad enzimática (St. Leger y col., 1986; Iglesias y col., 2002; Barranco-Florido y col., 2002; Iglesias y col., 2002; Quijano-Govantes y col., 2004). Fuentes de carbono como la glucosa, e incluso la N-acetil-β-D-glucosamina, pueden actuar como represores catabólicos de las quitinasas, que en el caso particular de la N-acetil-β-D-glucosamina es debido a un mecanismo de inducción-represión del hongo (St. Leger y col., 1986; Bidochka y Khachatourians, 1988; Donzelli y Harman 2001; Barreto y col., 2004). En *Metarhizium anisopliae*, la represión por N-acetil-β-D-glucosamina se ejerce sobre la expresión del gen *chit1* que codifica para una endoquitinasa (Bchit1), la cual a su vez está asociada con el gen *brlA*, un importante regulador en la conidiogénesis. Se ha descrito un gen homólogo a *bchit1* en *Trichoderma harzianum* (Fang y col., 2005; Emri y col., 2006).

Como se mencionó, el pH también es un factor importante en la regulación de la producción de enzimas. St. Leger y col. (1998) reportaron que las hidrofobinas y quitinasas son expresadas en niveles altos en intervalos de pH neutros a básicos, que corresponden a los del sitio de infección. Esto es debido a la presencia de genes regulados por el pH ambiental y según lasa un patrón temporal de enzimas requeridas para el desarrollo y proceso infectivo de los hongos.

Una aireación adecuada en conjunto con la agitación, contribuye a incrementa la solubilidad del oxígeno en un medio líquido. Liu y col. (2003) probaron diferentes velocidades de agitación (75, 150, 225 y 300 rpm), siendo 150 rpm la agitación con la que se obtiene mayor actividad quitinolítica volumétrica en un reactor batch de 5 litros con aireación de 0.6 vvm (18.2 mU/mL), mientras que en un reactor air-lift de 30 litros la mayor producción se obtuvo con aireación de 0.9 vvm (19.9 mU/mL).

II.1.2. Producción de quitinasas en cultivos sólidos

En los últimos años hay un gran interés en mejorar la producción a nivel industrial de proteínas y enzimas con potencial comercial, como es el caso de las quitinasas e hidrofobinas, las cuales pueden tener aplicaciones en farmacéutica, biotecnología, biocontrol y bioremediación (Askolin y col., 2001; Howard y col., 2003). Los cultivos sólidos (SSC) ofrecen ciertos beneficios para la producción de enzimas y proteínas, con respecto a los cultivos líquidos (SmC). Entre los beneficios, se menciona que se pueden obtener productos con alta estabilidad y alta eficiencia biosintética, (es decir, altos valores de conversión del sustrato a producto), debido a que presenta mejor difusión del oxígeno, sin la necesidad de grandes gastos de energía y con menor susceptibilidad al estrés osmótico. Esto es debido a que el crecimiento del microorganismo en los sistemas sólidos se presenta en forma de agregados (sistema heterogéneo) y, por ello, es posible encontrar gradientes de concentración (Viniestra y col., 2003). Entre las restricciones de SSC se puede mencionar que, al ser un sistema heterogéneo en comparación con al cultivo SmC, es difícil controlar variables como la temperatura y el pH (Raimbault, 1998).

Se ha estudiado el uso de diferentes soportes para realizar los cultivos SSC; los naturales, como el bagazo de caña, tienen la desventaja de tener exceso de

nutrientes, baja porosidad o estructuras inadecuadas para la difusión del oxígeno, de nutrientes o para la remoción del calor. Además causan problemas para la separación de la biomasa y favorecen la contaminación del producto, lo que conlleva a dificultades en su purificación (Matsumoto y col., 2004; Hölker y col., 2004). El uso de soportes inertes, como la agrolita y la espuma de poliuretano (PUF), ofrecen ciertas ventajas, como: alta porosidad, baja densidad y relativamente alta absorción de agua, de tal manera que dichas estructuras favorecen el crecimiento del microorganismo, la determinación directa de la biomasa, la extracción de productos limpios y una buena aireación y remoción del calor. El PUF presenta una estructura en forma de nido de abeja, por lo que la superficie de intercambio gaseoso puede ser hasta 400 veces mayor que en la interfase aire-líquido presente en un sistema SmC. Con este tipo de soporte, el crecimiento en SSC se presenta en forma de capas delgadas de agregados celulares, con una superficie de intercambio gaseoso grande, lo que influye a la vez en los procesos de difusión de gases, sustrato y productos (Zhu y col., 1994; Auria y col., 1995; Viniegra y col., 2003; Marin-Cervantes y col., 2008).

En los cultivos SSC, la actividad de agua (A_w) es de suma importancia para el desarrollo de los microorganismos, ya que un valor adecuado evita el alargamiento de la fase de adaptación (fase lag) y la disminución de la velocidad de crecimiento. Estudios como el de Barranco-Florido y col. (2002) y Marin-Cervantes y col. (2008) son importantes, pues indican que *L. lecanii* requiere de valores de a_w entre 0.978 y 0.997.

Existen diversos estudios de producción de enzimas quitinolíticas de *L. lecanii* en SSC, utilizando diversos soportes. Entre ellos: Barranco-Florido y col. (2002) reportaron que *L. lecanii* incrementó la producción de quitinasas (1.3 a 1.7 veces) y proteasas (3 a 12 veces) en SSC en comparación con SmC, diferencias que se justifican por una mejor adaptación de las cepas estudiadas al cultivo en medio sólido. La mayor producción de CO_2 se observó en la cepa ATCC 26854 (2.3 mg CO_2 / g de masa seca inicial • h) a las 36 h de cultivo, utilizando cutícula de

Sphenarium purpurascens como sustrato e inductor de proteasas y quitinasas. Matsumoto y col. (2004) reportaron el crecimiento de *L. lecanii* en SSC con bagazo de caña como soporte, con incremento del 40% en la actividad Nhasa con respecto al SmC. En este caso, se utilizaron desechos de camarón como sustrato e inductor de la producción de quitinasas. Marin-Cervantes y col. (2008) reportaron que la forma y tamaño de la espuma de poliuretano (PUF) afectó a la producción quitinolítica de *L. lecanii*, mencionando que el crecimiento fue disperso a lo largo del PUF, pero con agregados densos en las orillas del mismo y con una alta producción de quitinasas (Nhasa ca. 5000 mU/g PUF; endoquitinasa ca.1200 U/g PUF) en poliuretano cortado (ca. 0.5 x 0.5 x 0.5 cm). Asimismo, los autores mencionaron la presencia de represión de la actividad enzimática en presencia de glucosa. Por otro lado, Shi y col. (2009) reportaron la optimización de la producción de esporas de *L. lecanii* en SSC utilizando bagazo de caña como soporte. La producción de esporas fue determinada después de las 72 h de cultivo (25 °C, 97% de humedad) obteniendo la máxima producción de 1×10^{10} esporas/g de bagazo de caña seco.

II.2. Producción de proteasas en el proceso de patogénesis de los hongos entomopatógenos

La acción de las proteasas es fundamental durante el proceso de patogénesis de hongos entomopatógenos, ya que rompen los enlaces entre la quitina y las proteínas, liberándola. Las proteasas son reprimidas mediante un sistema de regulación de inducción-represión que ajusta la tasa de degradación de cutícula de insectos. Ejemplo de esto es la represión de proteasas observada en *Beauveria bassiana*, hasta del 81%, en presencia de concentraciones mayores de 2 g/L de acetilglucosamina (Bidochka y Kachatourians, 1988). Esta represión también puede observarse en *Metarhizium anisopliae* en presencia de glucosa o alanina (St. Leger y col., 1988). St. Leger y col. (1996) reportaron que en hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* ME-1, *M. flavoviride* ARSEF 324 y *Beauveria bassiana* ARSEF 252, las quitinasas se expresan en sitios de

degradación proteolítica en la cutícula de insectos, razón por la que concluyen que la producción de quitinasas depende de la accesibilidad de sustrato.

II.3. Producción de hidrofobinas en hongos

Las hidrofobinas han sido un grupo de proteínas ampliamente estudiadas desde principios de los años 90, la razón de esto es; su peculiar característica anfipática que le permite actuar como surfactante (Wösten y col., 1994; Wessels 1999; Linder y col., 2001). Entre los primeros estudios acerca del análisis estructural, caracterización y clasificación de las hidrofobinas, se encuentran en trabajos como los de Schuren y Wessels, (1990), Wösten y de Vocht, (2000) y Hakanpää y col. (2003).

Un reporte en que se evidencia la asociación de las hidrofobinas con el desarrollo del hongo es el de Wösten y col. (1993), quienes observan que la eliminación del gen de la hidrofobina SC3 de *S. commune* produce la disminución de la adhesión de las hifas al teflón. Por su parte Lugones y col. (1998) reportaron que al incubar *S. commune* en un medio líquido contenido en vasos de precipitados, el hongo formó hifas aéreas adheridas a las paredes del vaso, por encima de la superficie del medio. Al eliminar el gen para la hidrofobina SC3, no se formaron hifas aéreas en el medio líquido o se formaron de manera muy escasa. Este mismo efecto en las hifas aéreas se observó al eliminar el gen para la hidrofobina HFBI (hidrofobina de clase II) de *Trichoderma reesei* (Wösten y col., 1999).

La producción de hidrofobinas es regulada por diversos factores como los que se mencionan a continuación: En *B. bassiana* se observó que la presencia de hidrofobinas en la pared celular de conidios varió según las estructuras formada con relación al tipo de cultivo en que se desarrolla. Se determinó que hay mayor presencia de hidrofobinas en conidios aéreos (cultivo superficial), que en blastosporas y conidios sumergidos (cultivo sumergido). Se encontraron

diferencias en la adhesión de estas estructuras a superficies polares, hidrofóbicas e hidrofílicas, diferencias que pueden repercutir en la especificidad de los hongos entomopatógenos a su huésped (Holder y Keyhani, 2005). Por su parte, St. Leger y col. (1998), reportaron que el pH influye en la expresión de genes que codifican proteínas como las hidrofobinas, proteasas y quitinasas. En *Metarhizium anisopliae*, estas proteínas fueron expresadas a pH de 5 a 8, valores que corresponden a los del sitio de infección en la cutícula de insectos. Ying y Feng (2004) correlacionaron la producción de hidrofobinas clase I con el tipo de sustrato y concentración, observando que, en concentraciones menores de 4% (p/v) de glucosa, sacarosa y almidón, se produjeron más hidrofobinas. Con ello mostraron que la termotolerancia de las conidiesporas de *Beauveria bassiana* está determinada por el contenido de estas hidrofobinas. Asimismo, se han reportado diferencias, utilizando compuestos de polaridades opuestas, entre las hidrofobinas producidas por *Rhinoctadiella similis* incubada sobre un biofiltro. Si se utilizaba n-hexano como fuente de carbono la hidrofobina obtenida del micelio presentó un peso molecular de 15 kDa, mientras que al utilizar etanol como fuente de carbono la hidrofobina presentó un tamaño de 8.5 kDa (Vigueras y col., 2009).

Poco se sabe de la producción de hidrofobinas en *L. Lecanii*. Al respecto Marin-Cervantes (2006) realizó la amplificación, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (asociada a transcripción reversa, RT-PCR) en *L. lecanii*, encontrando la expresión de un ARNm de ~400 pb, tamaño parecido al que se obtendría con los cebadores para amplificar el amplificado del gen codificante para la SC3 de (~412 pb). Esto indicaría que, probablemente esta sea una hidrofobina similar a la SC3 (clase I) en *Lecanicillium lecanii* 2149.

III. JUSTIFICACIÓN

Existe un gran interés en investigar la sobreproducción, purificación y, caracterización de hidrofobinas, quitinasas y proteasas, debido a sus diversas aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas, además de ser elementos esenciales durante el proceso de patogénesis de hongos entomopatógenos. Sin embargo, hay pocos estudios sobre la producción de las hidrofobinas en el sistema de cultivo sólido-aire de hongos entomopatógenos (como es el caso de *Lecanicillium lecanii*), sistema en el que un ambiente hidrofóbico como la cutícula de los insectos promueve la infección por parte del hongo.

Por otro lado, aunque se sabe que la producción de proteínas y enzimas está determinada por factores extrínsecos, poco se sabe de la relación que guarda la producción de hidrofobinas con las quitinasas bajo condiciones de inducción y represión de las quitinasas.

Tomando en cuenta estos antecedentes, éste trabajo de investigación propone determinar la actividad quitinolítica y la producción de hidrofobinas de *L. lecanii* en un sistema sólido-aire.

IV. HIPÓTESIS

Un sistema sólido - aire y la presencia de quitina ejercerá un efecto inductor sobre la producción y actividad de quitinasas, proteasas, así como de hidrofobinas producidas por *L. lecanii* en comparación con lo que ocurra en un sistema líquido – aire y el uso de otras fuentes de carbono.

V. OBJETIVOS

V. 1. Objetivo general

Determinar el efecto producido por la fuente de carbono y tipo de cultivo sobre la actividad quitinolítica, proteolítica y la producción de hidrofobinas de *L. lecanii*

V. 2. Objetivos particulares

- Determinar el efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción y tipo de actividad quitinolítica y proteolítica de *L. lecanii* en cultivo líquido.
- Determinar el efecto del tipo de cultivo de la actividad quitinolítica y proteolítica de *L. lecanii*, utilizando quitina coloidal como inductor
- Determinar el efecto del tipo de cultivo y fuente de carbono sobre la producción y actividad superficial de las hidrofobinas de *L. lecanii*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Microorganismo y preparación de inóculo.

Para la realización de este estudio se utilizó la cepa de *L. lecanii* 2149, de la Colección de recursos genéticos (Genetic Resource Collection). El hongo, fue cultivado en agar de papa y dextrosa para la producción de esporas, a 25 °C durante 4 días. La suspensión de esporas fue preparada por agitación con una solución de agua estéril y 0.1% (p/v) de Tween 80 y ajustó la densidad hasta una concentración de 10⁸ esporas/mL (Bidochka y Khachatourians, 1988).

VI.2. Medio de cultivo.

Se utilizó medio mineral con el siguiente contenido en (g/L): K₂HPO₄ (2.8), MgSO₄• 7H₂O (1.38), CaSO₄• 2H₂O (0.48), FeSO₄• 7H₂O (0.22), (NH₄)₂SO₄ (7.5) CaCl₂ (0.48), NaH₂PO₄• 7H₂O (1.67), adicionado con extracto de levadura 1 g/L. Las fuentes de carbono fueron (g/L): quitina coloidal (36); fructosa (22); quitina coloidal (10) con fructosa (10); y quitina coloidal (10) con sacarosa (10). El pH se ajustó a 6 con añadiendo HCl 1 M (Marin-Cervantes y col., 2008).

VI.3. Preparación de quitina coloidal.

La quitina coloidal se preparó a partir de quitina cruda obtenida por fermentación láctica con ca. 14% de proteínas (Matsumoto y col., 2004). La pasta obtenida se neutralizó con lavados con agua destilada y se conservó en refrigeración (2 °C) con 0.02% (p/v) de azida de sodio, hasta su posterior utilización (Pegg, 1988).

VI.4. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de quitinasas y proteasas de *L. lecanii* en cultivo sumergido.

VI.4.1. Condiciones de cultivo sumergido (SmC)

Los cultivos sumergidos fueron realizados en matraces con medio de cultivo mineral (sección VI. 2) y esterilizaron, posteriormente fueron inoculados con 5×10^7 esporas/g de sustrato e incubados a 25 °C, con agitación de 180 rpm. Se tomaron muestras por duplicado cada 24 horas durante 7 días (Marin-Cervantes y col., 2008). Posteriormente, la muestra fue centrifugada a $14000 \times g$ durante 15 min a 4 °C. Las esporas y micelio fueron separados por filtración en papel (Whatman No. 40) y el sobrenadante fue utilizado como extracto enzimático crudo para los ensayos de actividad enzimática y cuantificación de proteínas.

VI.4.2. Determinación de la biomasa

La biomasa para los tratamientos en cultivo sumergido fue determinada mediante la cuantificación de la proteína total, la cual es la suma de la proteína soluble y la no soluble.

VI. 4. 2. 1. Determinación de proteína soluble. Se tomó una alícuota de 160 μ L de extracto enzimático junto con 40 μ L del reactivo de Bradford (1976) y se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se calculó como equivalentes de seroalbúmina bovina (BSA) mediante una curva patrón (anexo A1).

VI. 4. 2. 2. Determinación de proteína no soluble. Una vez centrifugada la muestra y habiendo separado el extracto enzimático, se tomaron 0.2 g del precipitado obtenido de la biomasa y se adicionaron 5 mL de ácido fosfórico 0.15 mM y agitó vigorosamente. Posteriormente, la mezcla se incubó en un baño de ebullición

durante 7 minutos, esta mezcla fue centrifugada a $14000 \times g$ durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al sobrenadante se le cuantificó la cantidad de proteína con el reactivo de Bradford (1976). La concentración de proteína se calculó como equivalentes de Seroalbúmina bovina (BSA) mediante una curva patrón (anexo A1).

VI.4.3. Determinación de actividad enzimática del extracto enzimático crudo

VI. 4. 3. 1. *N*-acetil hexosaminidasas: Se determinó a partir de la liberación de p-nitrofenol, usando como mezcla 20 μL de extracto enzimático, 20 μL de buffer de citrato/fosfato (0.2 M, pH 5.6) y 20 μL de p-nitrofenil-N-acetilglucosamina (pNAG). La mezcla se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación de 180 rpm durante una hora. Al término de la incubación se adicionó 1 mL de NaOH 0.02 M, y se midió su absorbancia a 400 nm. La concentración de p-nitrofenol se determinó con una curva patrón (anexo A2), considerando a una unidad enzimática como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por minuto (Tronsmo y Harman, 1993).

VI. 4. 3. 2. *Proteasas ácidas:* 75 μL del extracto enzimático se mezclaron con 500 μL de una solución de hemoglobina bovina al 2% (p/v) (usada como sustrato) en buffer universal 0.05 M (ácido acético; ácido bórico; ácido fosfórico) a pH 5 y. La mezcla se incubó con el extracto enzimático durante 10 min a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Asimismo, se preparó un testigo, al cual se le añadió extracto enzimático crudo pero no se le permitió reaccionar parando la reacción con 1 mL de ácido tricloroacético al 5% (p/v). La absorbancia se midió a 280 nm. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que aumenta 0.001 unidades de absorbancia/min al sustrato con respecto a su testigo correspondiente (Anson, 1938).

VI. 4. 3. 3. *Proteasas básicas:* 75 μL del extracto enzimático se mezclaron con 500 μL de una solución de caseína 1% p/v en buffer de fosfatos 50 mM, pH 7 (la cual

fue utilizada como sustrato). La mezcla se incubó a 30 °C durante 1 hora, y posteriormente se adicionó 1 mL de ácido tricloroacético al 5% (p/v). Asimismo, se preparó un testigo, los 75 µL de extracto enzimático fueron adicionados después del ácido tricloroacético. La absorbancia dese midió a 280 nm. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que aumenta 0.001 unidades de absorbancia/min al sustrato con respecto a su testigo (Kunitz, 1946).

La actividad N-acetilhexosaminidasa (Nhasa) y proteolítica fue reportada como actividad específica, definida como: unidades de actividad por µg de proteína soluble (U/µg de proteína)

VI.4.4. Estimación de parámetros cinéticos de biomasa

Para la estimación de la tasa de crecimiento se utilizaron los datos de concentración de proteína total de los cultivos sumergidos (sección VI.4. 2). El ajuste de los datos se realizó con el modelo logístico reflejado en la ecuación 1:

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + \left[\left(\frac{X_{\max}}{X_0} \right) - 1 \right] e^{-\mu t}} \quad (1)$$

donde

X = Biomasa alcanzada en un tiempo dado (g/L)

X_{\max} = Biomasa máxima alcanzada (g/L)

X_0 = Biomasa inicial (g/L)

μ = Tasa de crecimiento (horas⁻¹)

t = Tiempo (horas)

Los ajustes se realizaron con el programa estadístico STATISTICA 7.0 (Stat Soft, Inc USA., EUA).

VI.5. Efecto del tipo de cultivo sobre el crecimiento y producción de quitinasas y proteasas de *L. lecanii*.

VI.5.1. Condiciones de cultivo sólido (SSC)

Los cultivos en medio sólido (SSC) se realizaron en columnas de vidrio empacadas con espuma de poliuretano (PUF), utilizado como soporte inerte. Las condiciones de cultivo fueron: PUF cortado en cubos de ca 0.125 cm³. Una vez inoculado, el medio de cultivo, se colocó en el soporte, en una relación 1:15 (p/v), con flujo de aire húmedo de aproximadamente 0.1 cm³/min y se incubó a 25 °C. Se tomaron muestras por duplicado cada 24 horas durante 7 días. Todo el material fue previamente esterilizado a 121 °C durante 15 min (Marin-Cervantes y col., 2008).

VI.5.2. Determinación de la actividad enzimática del extracto enzimático crudo

El extracto enzimático fue separado del poliuretano mediante presión, después el líquido fue centrifugado a 14000 × g a 4 °C durante 15 min. Las esporas y micelio fueron separados por filtración en papel (Whatman No. 40) y el sobrenadante se utilizó como extracto enzimático crudo para los ensayos de proteína soluble mediante el método de Bradford, (1976) y para la determinación de la actividad quitinolítica y proteolítica, según la sección VI. 4. 2. 1 y VI. 4. 3, respectivamente.

VI.5.3. Determinación de la producción de CO₂ en cultivo sumergido y sólido

En los sistemas donde se utilizó quitina coloidal como única fuente de carbono (SmC y SSC), se determinó la producción de CO₂ mediante cromatografía de gases, con el software HPCORE (Agilent Technologies, EUA). Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

Detector de Conductividad Térmica (TCD)

Columna: Columna empacada poropack Q 80/100 (6' x 1/8" SS)

Gas acarreador: Helio

Flujo: 0.5 mL/min

Temperatura de columna: 125 °C

Temperatura de inyector: 110 °C

Temperatura de detector: 160 °C

La concentración de CO₂ se determinó con una curva patrón de CO₂, según la Norma Oficial Mexicana: NOM-059-STPS-1993. (Procedimiento 029: Determinación de Dióxido de Carbono en Aire-Método de Cromatografía de Gases (anexo A3).

VI.5.4. Estimación de parámetros cinéticos de producción de CO₂

Para la estimación de la tasa de crecimiento del hongo se utilizaron los datos de producción de CO₂. El ajuste de los datos se realizó con el modelo logístico, usando la ecuación descrita anteriormente (ecuación 1).

donde

P = Biomasa alcanzada en un tiempo dado (g/cm³)

P_{max} = Biomasa máxima alcanzada (g/cm³)

P_0 = Biomasa inicial (g/cm³)

μ = Tasa de crecimiento (horas⁻¹)

t = Tiempo (horas)

VI.6. Efecto del tipo de sustrato y de cultivo sobre el perfil de quitinasas producido por *L. lecanii*.

VI.6.1. Zimogramas de actividad quitinolítica después de la electroforesis de *L. lecanii*

Los geles realizados para determinar la actividad quitinolítica se realizaron bajo condiciones oxidativas. Los extractos crudos enzimáticos fueron liofilizados y disueltos en amortiguador de muestra (125 mM Tris/HCl pH 6.8 con 2% (p/v) de SDS y 5% (v/v) β -mercaptoetanol) para obtener soluciones de 2 μ g de proteína/ μ L y se cargaron en el gel 20 μ g de proteína/pozo de cada muestra. El gel de separación de acrilamida se realizó al 12%, según el protocolo descrito para el método de electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970), y se adicionó 0.01% (p/v) de cada uno de los siguientes sustratos: glicol quitina (GQ), penta-N-acetilquitopentaosa (QP), tetra-N-acetilquitotetraosa (QT), 4-metilumbeliferil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriósido (MuQT), 4-metilumbeliferil β -D-N,N'-diacetilquitobiósido (MuQB) o 4-metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosamina (MuG). El gel de concentración fue al 5% (Laemmli, 1970). El amortiguador de corrimiento se preparó según el protocolo descrito para el método SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Las condiciones eléctricas de la electroforesis fueron 150 V constantes durante 1 h, a temperatura ambiente. El gel se lavó durante 15 minutos en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6 y 1% (v/v) Tritón x100, después se adicionó amortiguador nuevo e incubó durante 24 h a 37 °C. A continuación se tiñó con azul de Coomassie o blanco de calcoflúor. La tinción de azul de Coomassie fue preparada con 0.025% (p/v) de azul de Coomassie G250 en una solución, 25% (v/v) isopropanol y 10% (v/v) ácido acético y se dejó un tiempo de 10 minutos con el gel; La tinción con blanco de calcoflúor fue preparada con 0.01% (p/v) de blanco de calcoflúor en amortiguador Tris/HCl 500 mM, pH 8.9, se dejó un tiempo de 5 minutos con el gel y se lavó con agua durante 1 h (Trudel y Asselin, 1989; Liao y Lin 2008). Se utilizaron como estándares, proteínas de masa molecular conocido de amplio rango (BioRad, EUA). Las bandas fueron digitalizadas en un

transiluminador con el programa Gel-Doc 100 (BioRad) y analizadas por densitometría con el programa ImageJ (versión 2.1).

VI.7. Determinación de hidrofobinas en cultivos sumergido y sólido

VI.7.1. Extracción de hidrofobinas

Las hidrofobinas se extrajeron del micelio producido en el cultivo siguiendo el método de Ying y Feng (2004), con modificaciones. Para ello, se realizó una extracción con SDS al 2% (p/v) en Tris-HCl 100 mM pH 9.0, durante 2 h a temperatura ambiente, seguida por centrifugación a $7000 \times g$ a 4 °C durante 10 minutos. El precipitado fue resuspendido en ácido fórmico concentrado y sonicado en tina de sonicación con agua fría durante 30 segundos, posteriormente fue colocado en agua con hielo durante 5 segundos, éste proceso se realizó tres veces, la solución se centrifugó a $7000 \times g$ a 4 °C durante 10 minutos. Al sobrenadante se adicionó agua desionizada en relación 1:1 (v/v), posteriormente se adición NaOH al 45% (p/v) (frio) en una relación 1:1 (v/v), la solución se almacenó en refrigeración durante 24 h. Se centrifugó a $7000 \times g$ a 4 °C durante 10 minutos y la pastilla fue resuspendida en agua desionizada para extraer las hidrofobinas por electroburbujeo a 300 mA durante 1h. Se colectó la espuma formada y se centrifugó a $12000 \times g$ a 4 °C durante 5 minutos, la pastilla se solubilizó en ácido trifluoroacético concentrado y el ácido fue evaporado con una corriente de aire. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (1976).

VI.7.2. Análisis de cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión molecular (SEC- HPLC)

Las muestras de proteína fueron analizadas utilizando una columna de 5 μm BIO-SILECT 250 SEC (30 cm \times 7.8 mm ID) (Bio-Rad). La fase móvil consistió de NaH_2PO_4 0.05 M, Na_2HPO_4 0.05 M, y NaCl 0.15 M en agua, pH 6.8. Las muestras fueron eluidas bajo condiciones isocráticas, con flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a 280 nm.

VI.7.3. Actividad superficial de hidrofobinas sobre sólidos

La actividad superficial de las hidrofobinas se evaluó sobre una superficie hidrofóbica de politetrafluoroetileno (PTFE ó teflón). El teflón se colocó sobre una superficie plana y enjuagó con agua desionizada seguido por etanol y seguido por agua y se dejó secando durante 16 horas. Sobre la superficie del teflón se colocaron 200 μL de una solución de hidrofobinas (50 μg proteína/mL) y se dejó secar durante 16 h. Se lavó con SDS al 2% (p/v) en agua, a 90 $^\circ\text{C}$ durante 1 minuto, se realizaron tres enjuagues con agua destilada y se dejó secar durante 16 h. La hidrofobicidad se determinó midiendo el ángulo de contacto de una gota de agua (1 μL) sobre la superficie muestra, las imágenes fueron tomadas con un microscopio con procesador de imágenes y el ángulo de contacto fue determinado con el programa ImageJ (versión 2.1) (Van der Mei y col., 1993). Un ejemplo de la medición se presenta en la Figura 6.

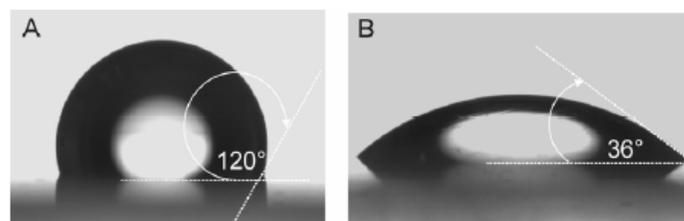


Figura 6. Determinación del ángulo de contacto.

VI.7.4. Determinación de la masa molecular mediante electroforesis SDS-PAGE

La masa de las hidrofobinas se determinó bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), de acuerdo al método descrito por Laemmli, (1970). El gel de concentración fue al 5% y el de separación al 17%, desarrollándose a 175 V durante 1 hora. Se utilizaron proteínas de M_r conocido como estándares. Las bandas se digitalizaron (Gel-Doc 100), y se analizaron por densitometría con el programa ImageJ (versión 2.1).

VI.7.1. Análisis de cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase reversa (RP- HPLC)

Las muestras de hidrofobina fueron analizadas con una columna de 5 μm Supelcosil LC 304 (25cm x25 cm x 4.6mm6 mm ID). La fase móvil consistió en ácido trifluoroacético al 0.1% (p/v) en agua (solvente A) y ácido trifluoroacético al 0.1 % (p/v) en acetonitrilo (solvente B). La elución se llevó a cabo con el siguiente gradiente de acetonitrilo (A-B): 0-40% en 15 min; 40-80% en 20 min; 80-90% en 2 min y 90% en 3 min. El gradiente fue retornado a 20-80% en 5 min, el flujo fue de 1 mL/min y la detección se realizó a 280nm.

VI.8. Análisis estadístico

Se utilizó el programa SPSS versión 8.0 (SPSS, Inc., USAEUA, 1997) considerando biomasa, actividades enzimáticas y actividad superficial como variables dependientes, y la fuente de carbono y el sistema de cultivo como las fuentes de variación independientes. Las medias fueron comparadas con mediante la prueba múltiple de Tukey Kramer ($P < 0.05$).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de quitinasas y proteasas de *L. lecanii* en cultivo sumergido.

Factores, como la fuente de carbono, influyen directamente en el crecimiento, producción de metabolitos y secreción de proteínas de microorganismos, como los hongos entomopatógenos (Barreto y col., 2004). Con el fin de determinar el efecto producido por las fuentes de carbono sobre el crecimiento de *L. lecanii*, la cepa 2149 fue cultivada en medio mineral líquido utilizando fructosa, quitina, fructosa con quitina o sacarosa con quitina como fuentes de carbono, en una relación C/N de 5.5 (Marin-Cervantes y col., 2008). La biomasa obtenida en el medio líquido fue determinada de forma indirecta mediante la concentración de proteína total y no por peso seco, ya que, la quitina coloidal utilizada como fuente de carbono es insoluble y esto produce errores gravimétricos.

En éste estudio, se encontró que el mejor crecimiento de *L. lecanii* en medios sumergidos se presentó en medios sumergidos con fructosa (SmCF) y fructosa con quitina coloidal (SmCFQ), con 0.49 y 0.31 g/L de proteína, respectivamente. La fructosa es un sustrato de fácil asimilación, lo que explicaría dicho comportamiento. El cultivo SmCFQ mostró comportamiento diaúxico, debido a que la quitina es insoluble y más compleja, por tanto, el hongo la utiliza como una segunda fuente de carbono. Se realizó un primer ajuste del crecimiento hasta las 72 h de la cinética correspondiente a la etapa 1, del cual se obtuvo una tasa de crecimiento (μ) de 0.5 h^{-1} superando por más de diez veces la μ del segundo ajuste (etapa 2), que fue de 0.04 h^{-1} , dicho ajuste se realizó desde las 72 h hasta el final de la cinética, tal diferencia se debe a que durante la primera etapa el hongo utiliza principalmente como fuente de carbono a la fructosa por ser de fácil

asimilación, mientras que en la segunda etapa asimila a la quitina coloidal (Tabla 1).

Debido a que la quitina es un sustrato complejo, insoluble en agua, y que, además debe ser hidrolizada hasta quitoooligómeros para poder ser introducida al interior de la célula, antes de ser asimilada (Howard y col., 2003), el cultivo donde se utilizó quitina (SmCQ) como única fuente de carbono mostró el menor crecimiento (0.088 g/L de proteína total) con un comportamiento estable, es decir, una fase estacionaria prolongada, este valor fue hasta 5 veces menor que en el caso de los cultivos como en los que se adicionó fructosa (0.49 g /L) (Tabla 1).

El cultivo sumergido de *L. lecanii* con sacarosa y quitina (SmCSaQ), mostró máximo crecimiento a las 72 h (X_{\max} = 0.28 g/L), posteriormente se observó un descenso que se puede atribuir a un efecto de represión catabólica por parte de la sacarosa (St. Leger y col, 1986).

Tabla 1. Parámetros cinéticos del crecimiento de *L. lecanii* 2149 en cultivo sumergido

Fuente de carbono	X_0 (g/L)	X_{\max} (g/L)	μ (h^{-1})	R^2
Fructosa	0.008624	0.491037	0.060939	0.9461
Fructosa y quitina (etapa 1)	0.022095	0.181128	0.529493	0.9294
Fructosa y quitina (etapa 2)	0.022737	0.311421	0.040464	0.8857
Sacarosa y quitina	0.036782	0.281639	0.0628	0.9388
Quitina	0.001916	0.088061	0.226406	0.9605

X_{\max} = Biomasa máxima alcanzada (g/L), X_0 = Biomasa inicial (g/L), μ = Tasa de crecimiento (h^{-1}).

R^2 = Coeficiente de determinación. Etapa 1 = ajuste de 0 a 72 h del cultivo. Etapa 2 = ajuste de 72 a 120 h del cultivo.

Se ha reportado que la quitina induce la producción de enzimas quitinolíticas extracelulares, entre ellas la N-acetilhexosaminidasa (Nhasa) (Matsumoto y col., 2004; Marin-Cervantes y col., 2008). Por ello, el cultivo con quitina coloidal (SmCQ) como única fuente de carbono presentó la mayor actividad específica de

Nhasa que fue mas de 4.5 veces mayor, en comparación con la producida en el medio con fructosa (Figura 7).

Por otra parte, las quitinasas también son producidas por el hongo con el fin de regular el contenido de quitina en su pared celular, contribuyendo así al desarrollo de las hifas (Sahai y Manocha, 1993), debido a esto, los resultados muestran que *L. lecanii* produce Nhasa, aún en cultivos adicionados con fructosa como única fuente de carbono, principalmente en las primeras horas de su crecimiento. En el cultivo sumergido con fructosa (SmCF) se observó que la producción máxima de Nhasa fue de 0.87 mU/ μ g de proteína, a las 24 h (Figura 7).

Por su parte la producción de Nhasa en el cultivo adicionado con fructosa y quitina muestra un comportamiento similar al observado en el crecimiento (Tabla 1), es decir, con dos fases de producción, donde en la primera etapa que corresponde al mayor crecimiento del hongo se observa también la mayor producción de Nhasa (0.13 mU/ μ g de proteína) hasta las 48 h, asimismo se aprecia una segunda fase donde, la actividad incrementa hasta 0.1 mU/ μ g de proteína, tal diferencia en la producción es atribuible al cambio del metabolismo del hongo que realiza para asimilar cada una de las fuentes de carbono presentes.

En forma similar, la presencia de sacarosa reprimió la actividad Nhasa hasta un 61% con respecto al cultivo con quitina como única fuente de carbono (72 h), posteriormente, se presentó un incremento paulatino de la actividad, al respecto St. Leger y col. (1986) reportaron un efecto similar en la producción de quitinasas de *Metarhizium anisopliae* utilizando sacarosa como única fuente de carbono, tal efecto lo atribuyen a la autólisis del hongo observada después del día 5, lo cual explicaría tal efecto.

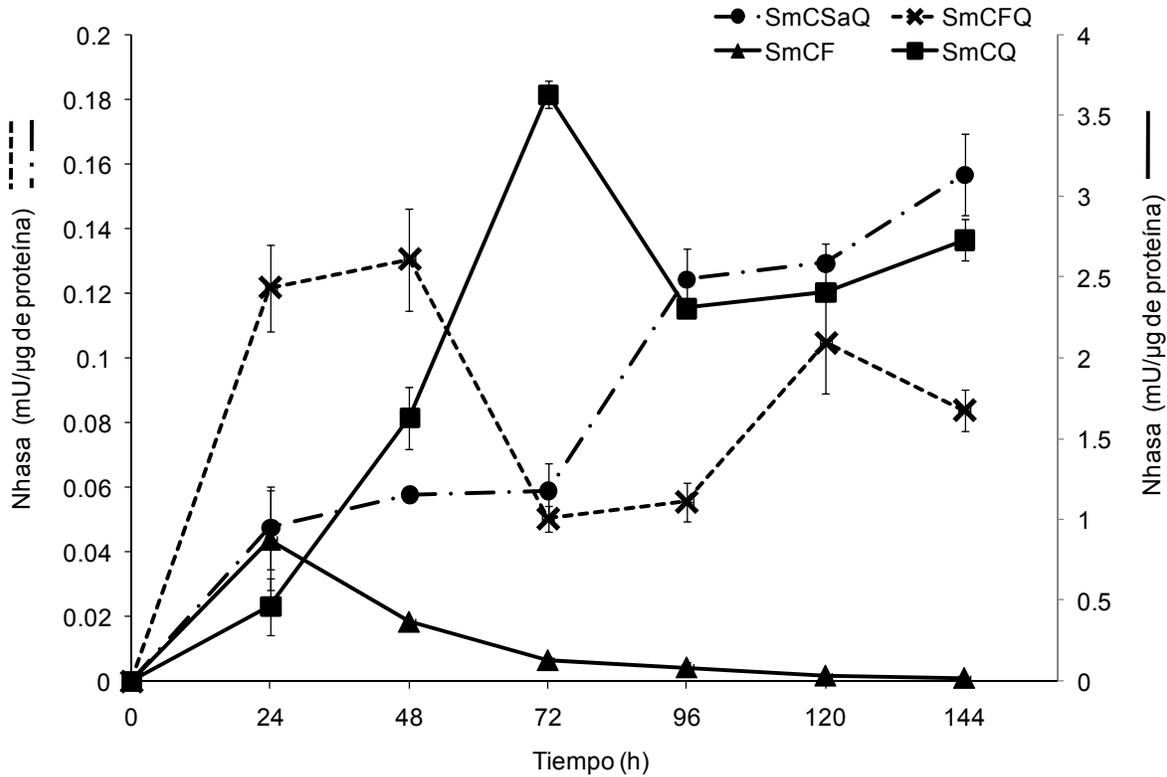


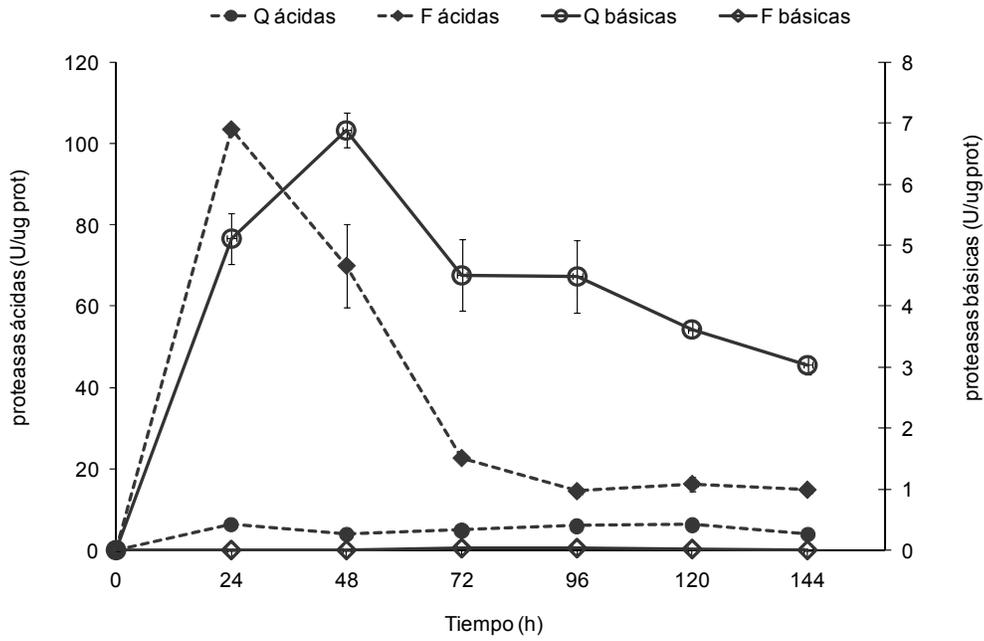
Figura 7. Actividad de N-acetil hexosaminidasa de *L. lecanii* 2149 cultivado en medio líquido utilizando fructosa (F), quitina coloidal (Q), fructosa con quitina coloidal (FQ) y sacarosa con quitina coloidal (SaQ) como fuentes de carbono. Promedio de 6 observaciones independientes.

Las proteasas son enzimas producidas por hongos entomopatógenos como parte del mecanismo de patogénesis, liberando a la quitina de la cutícula de insectos de proteínas y facilitando su hidrólisis (St. Leger y col., 1986). Se ha reportado la estrecha relación que existe entre la actividad quitinolítica y proteolítica, por ello, al igual que las enzimas quitinolíticas, las proteasas también están reguladas por factores como el tipo de sustrato (Bidochka y col., 1988; St. Leger y col., 1988; Alvares y col., 2004; Shakeri y Foster, 2007). Con el fin de conocer más esta relación, en *L. lecanii*, se determinó la actividad de proteasas ácidas y básicas (Figura 8). Se observó que la producción de proteasas fue determinada por el crecimiento, de tal forma que en el cultivo con fructosa como única fuente de carbono se obtuvo el mayor crecimiento (0.49 g/L de proteína), así como la mayor

producción de proteasas ácidas, que fue de 103 U/μg de proteína a las 24 h del cultivo.

Se ha reportado que otro factor que afecta la producción de proteasas es el pH, (St. Leger y col., 1998), ya que en los cultivos con F, FQ y SaQ se observó que la producción de proteasas ácidas fue hasta 10 veces mayor en comparación a la producción de proteasas básicas. El pH del medio fue de 6 (Figura 8 A y B), lo que explicaría este comportamiento. En contraste, en el medio adicionado con quitina coloidal como única fuente de carbono no mostró diferencia entre la producción de proteasas básicas y ácidas, debido a que las diversas proteasas son requeridas para romper los enlaces entre la quitina y las proteínas (Figura 8 A).

A)



B)

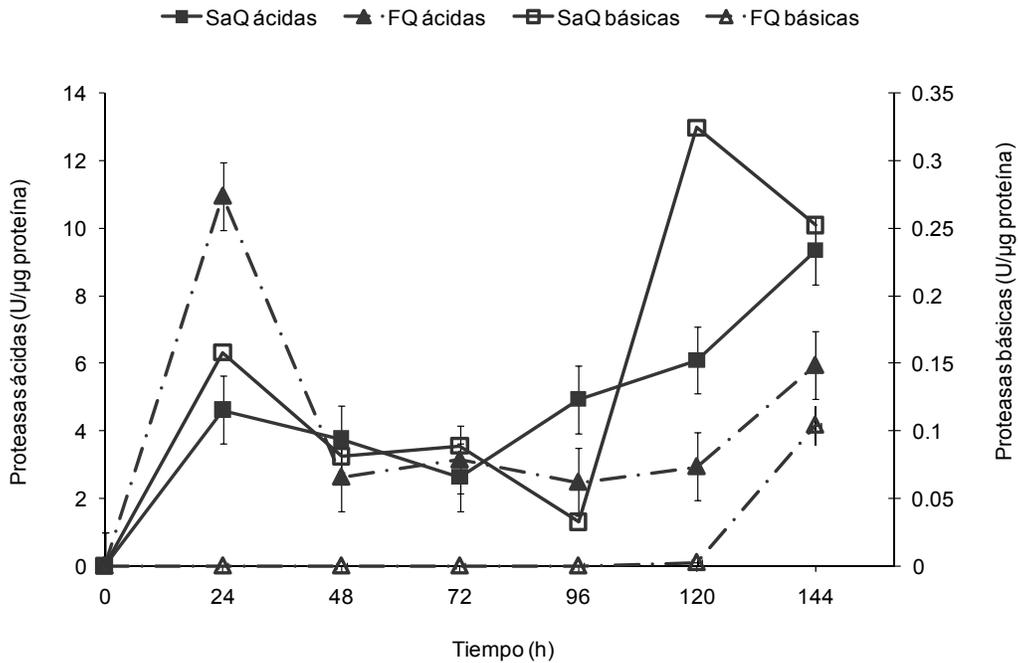


Figura 8. Actividad de proteasas ácidas y básicas de *L. lecanii* 2149 cultivado en medio líquido utilizando como fuentes de carbono: A) fructosa (F), quitina coloidal (Q) y B) fructosa con quitina coloidal (FQ) y sacarosa con quitina coloidal (SaQ).

Promedio de 6 observaciones independientes.

VII.2. Efecto del tipo de cultivo sobre el crecimiento y producción de quitinasas y proteasas de *L. lecanii*.

VII.2.1. Determinación de parámetros cinéticos de producción de CO₂ de *L. lecanii* en cultivo SmC y SSC.

Los resultados anteriores mostraron que la mayor producción quitinolítica se obtuvo utilizando quitina coloidal como única fuente de carbono, ya que ésta actúa como inductor. Por otro lado, se sabe que los cultivos en sólido tienen ventajas en la producción quitinolítica (Matsumoto y col., 2004; Marin-Cervantes y col., 2008), por lo que en esta sección se analizó el efecto del tipo de cultivo sobre el crecimiento y la actividad enzimática de *L. lecanii*, utilizando quitina coloidal como única fuente de carbono.

Para comparar el crecimiento entre un sistema líquido y sólido, y tomando en cuenta las dificultades que produce la insolubilidad del sustrato (quitina coloidal), se determinó la producción de CO₂ en ambos sistemas. En la Figura 9, se observa la producción de CO₂ de los cultivos sólido y líquido: la producción máxima fue de 1.8 y 2.3 g/m³, respectivamente. El cultivo sólido alcanza su producción máxima de CO₂ a las 24 horas antes que en el cultivo sumergido, lo que produce que el cultivo sólido tenga una tasa de crecimiento mayor ($\mu = 0.053 \text{ h}^{-1}$) que la del cultivo sumergido ($\mu = 0.034 \text{ h}^{-1}$) (Tabla 2).

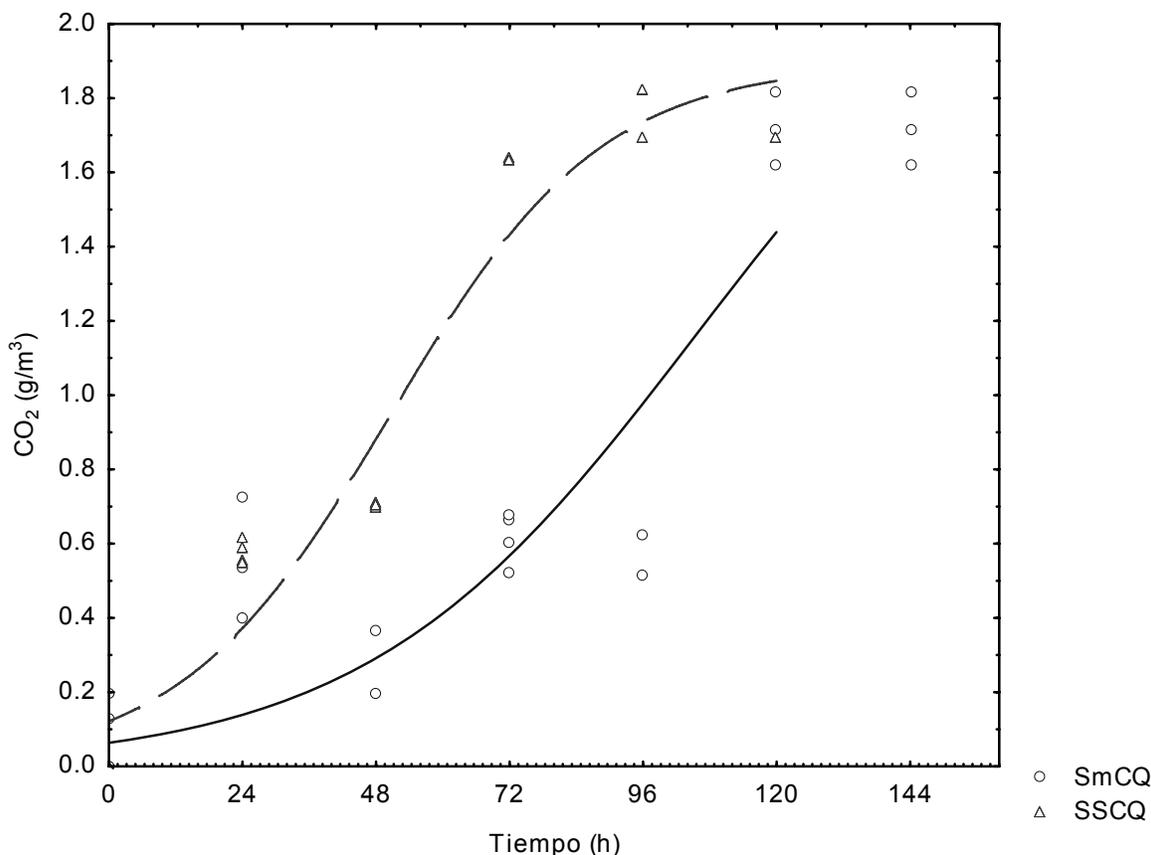


Figura 9. Producción de CO₂ de *L. lecanii* 2149 en cultivo SmC y SSC utilizando quitina coloidal como fuente de carbono. Promedio de 6 observaciones independientes.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de *L. lecanii* 2149 cultivado en líquido y sólido utilizando quitina coloidal como fuente de carbono después de 144 h de cultivo.

Cultivo	P ₀ (g/m ³)	P _{max} (g/m ³)	μ (h ⁻¹)	R ²
Sumergido	0.06376	2.3049	0.033899	0.9082
Sólido	0.12184	1.89366	0.052898	0.9304

P_{max} = Producción de CO₂ máxima alcanzada (g/m³), P₀ = Producción de CO₂ inicial (g/m³), μ = Tasa de crecimiento (h⁻¹).
 R² = Coeficiente de determinación.

Por otra parte, la actividad Nhasa (Tabla 3) fue más de 400 veces mayor en el medio sólido que en el líquido, debido a la importancia que tiene una buena

aireación y por tanto la difusión de oxígeno para la producción quitinolítica (Liu y col., 2003).

Tabla 3. Actividad N-acetilhexosaminidasa (Nhasa) de *L. lecanii* 2149 cultivado en líquido y sólido utilizando quitina coloidal como fuente de carbono después de 144 h de cultivo.

Cultivo	Nhasa (U/g proteína soluble)	Nhasa (U/g SI)
Sumergido	18.8 ± 0.59	1.3 ± 0.008 ^a
Sólido	8016 ± 420	17.74 ± 1.53 ^b

SI- Sustrato Inicial. Promedio de 6 observaciones independientes y error estándar

En cultivos sólidos, los microorganismos tienen mayor contacto con el sustrato y existe una mejor difusión de oxígeno, a diferencia de lo que ocurre en el cultivo sumergido, donde el crecimiento del micelio incrementa la viscosidad del medio, disminuyendo la difusión de oxígeno, lo que repercute en la asimilación de nutrientes y, por lo tanto, en la excreción de enzimas hidrolíticas y en el crecimiento (Raimbault, 1998; Viniegra y col., 2003). El cultivo sólido utilizando PUF como soporte alcanzó la máxima producción de CO₂ y en menos tiempo (96 h) que en el cultivo sumergido (120 h) (Figura 9 y Tabla 2).

VII.2.2. Determinación de actividad quitinolítica y proteolítica en cultivo sólido.

Hasta el momento se ha observado cómo el cultivo sólido y la presencia de quitina favorecen la actividad quitinolítica. Con el fin de determinar el comportamiento de la actividad proteolítica y quitinolítica se realizó la cinética de *L. lecanii* en cultivo sólido con quitina como fuente de carbono.

Los resultados obtenidos mostraron que la actividad quitinolítica disminuyó después de las 72 h, hasta un 24% a las 144 h del cultivo (Figura 10 y Figura 7),

sin importar el tipo de cultivo. La producción de Nhasa en SSCQ mostró un valor máximo de 10 mU/μg de proteína a las 72 h (Figura 10), casi 3 veces mayor a la producción del cultivo SmCQ, en el que la máxima producción se obtiene de igual forma a las 72 h pero con valores de 3.63 U/μg de proteína, estos valores fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$), lo que evidenció la ventaja del uso de sistema de cultivo sólido utilizando PUF como soporte para la producción de enzimas quitinolíticas sobre uno líquido (Marin-Cervantes y col., 2008), además, de que el sistema sólido evita el uso de grandes cantidades de medio de cultivo, con la obtención de extractos crudos enzimáticos más concentrados.

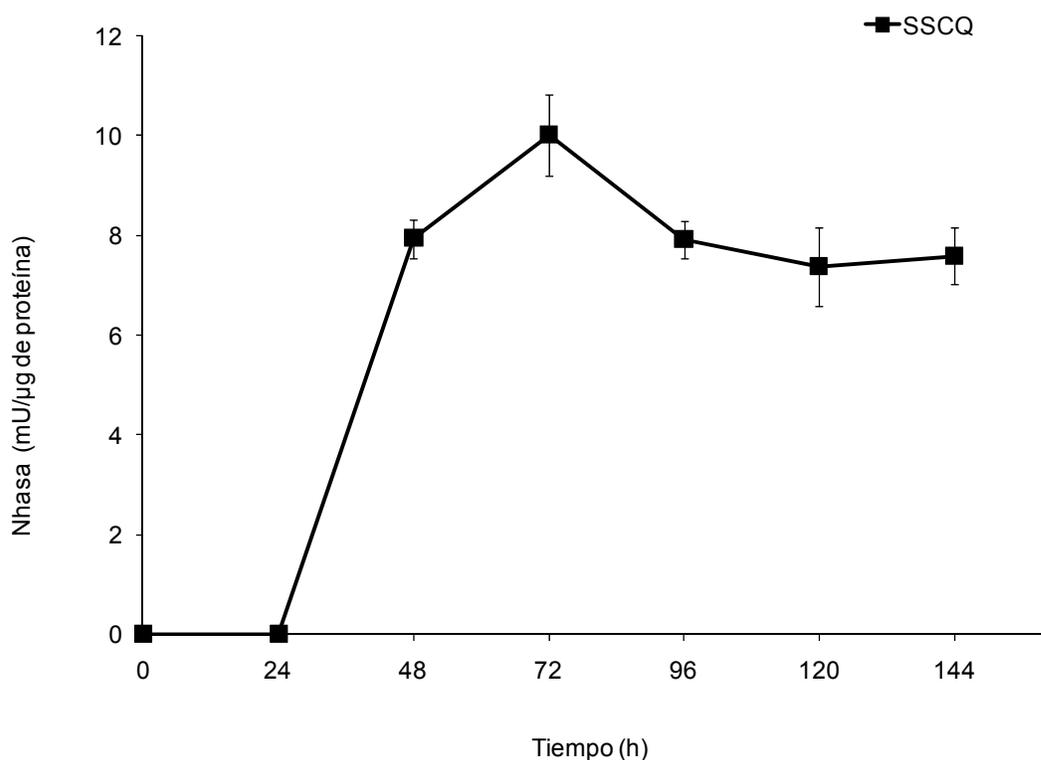


Figura 10. Actividad de N-acetil hexosaminidasa de *L. lecanii* 2149 en cultivo SSC utilizando quitina coloidal como fuente de carbono. Promedio de 6 observaciones independientes.

En la Figura 11 se observa cómo la actividad de las proteasas incrementa conforme al tiempo en conjunto con la actividad Nhasa (Figura 10). Esto es lógico, porque durante los procesos de infección las proteasas liberan la quitina para poder ser asimilada. La Figura 11 también muestra como las proteasas básicas y ácidas tienen un comportamiento inverso, en el momento de mayor actividad quitinolítica (a partir de las 72 horas), revelando así que las proteasa básicas tienen mayor participación en dicho momento.

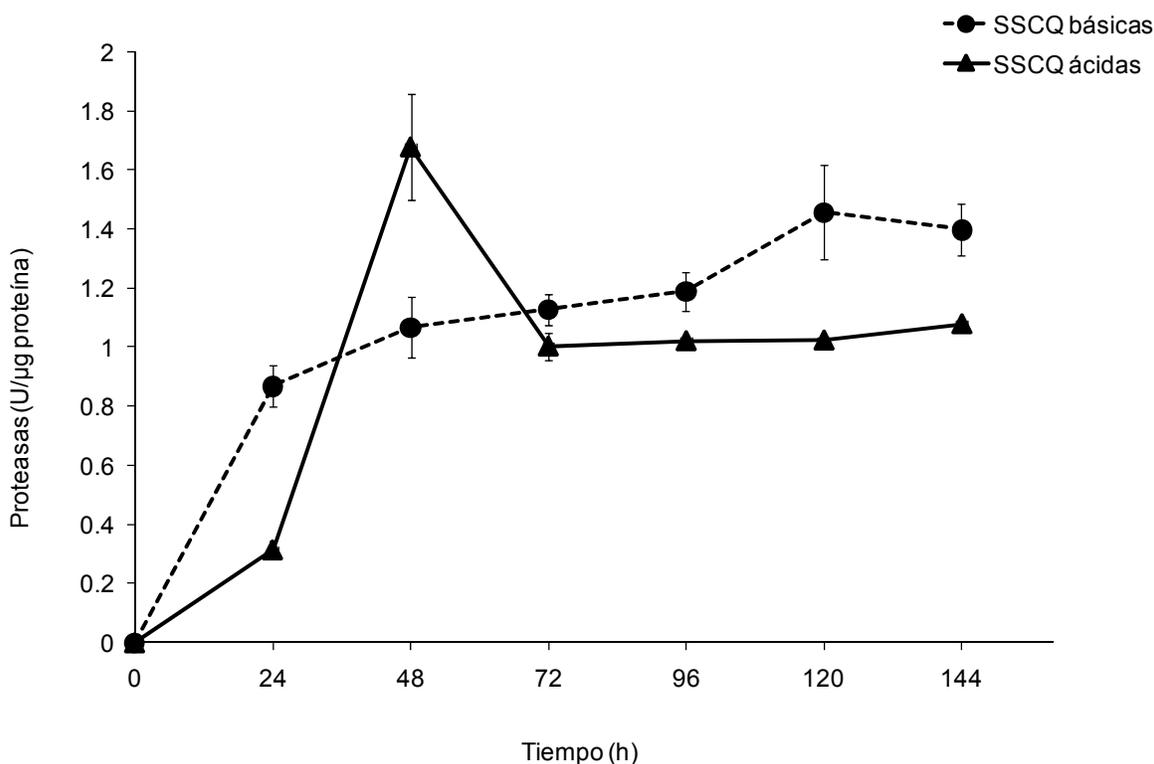


Figura 11. Actividad de proteasas ácidas y básicas de *L. lecanii* 2149 en cultivo sólido SSC utilizando quitina coloidal como fuente de carbono. Promedio de 6 observaciones independientes.

VII.3. Efecto del tipo de sustrato y de cultivo sobre el perfil de quitinasas producido por *L. lecanii*.

A lo largo de este trabajo se han observado los efectos de inducción y represión de la actividad enzimática (quitinasas y proteasas) de *L. lecanii*, mediadas por el medio de cultivo y factores ambientales. Sin embargo, la producción de quitinasas también es modificada por los productos de la degradación de la quitina (Desphande, 1986). Es importante resaltar que las diferentes enzimas quitinolíticas pueden tener diferentes aplicaciones industriales, por lo que sería relevante saber con más detalle qué enzimas se favorecen con determinado sustrato o tipo de cultivo. Para conocer más de estas características, se realizó un análisis por electroforesis SDS-PAGE, con el fin de determinar la masa molecular relativa (M_r) de las bandas proteínicas de los cultivos realizados en este trabajo.

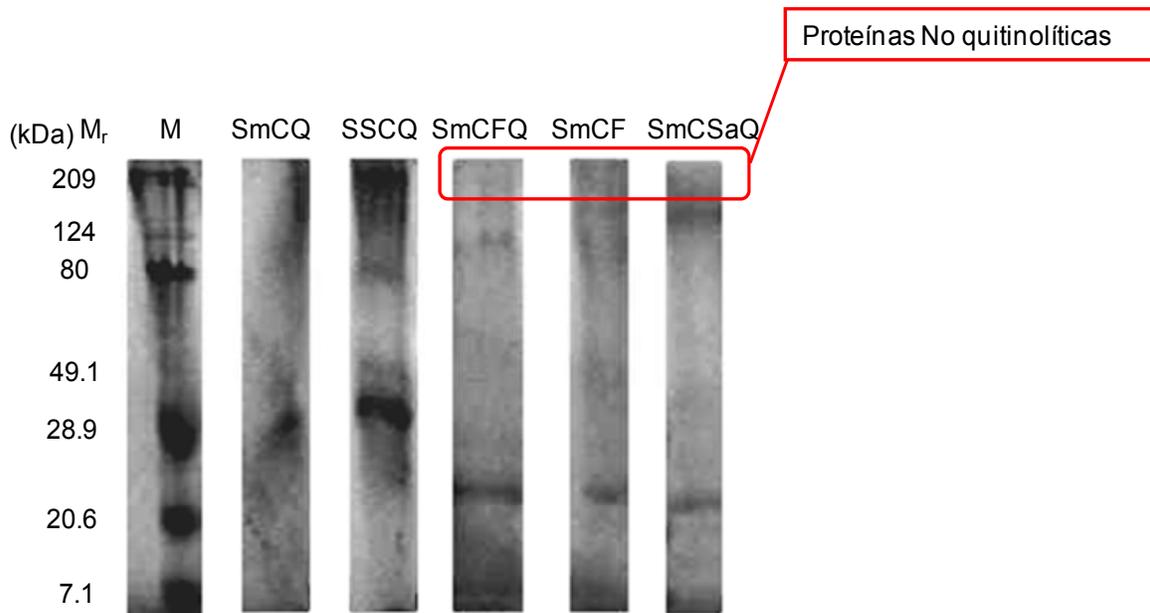


Figura 12. Electroferograma de las proteínas secretadas al medio de cultivo por *L. Lecanii* a las 144 h del cultivo en sumergido SmC utilizando fructosa (SmCF), quitina (SmCQ), fructosa con quitina (SmCFQ) o sacarosa con quitina (SmCSaQ) y en sólido (SSC) utilizando fructosa (SSCF) o quitina coloidal (SSCSQ) como fuentes de carbono.

La Figura 12 muestra bandas proteicas con M_r entre los 108 y 8 kDa. Liu y col. (2003) y Barranco y col. (2009) reportaron quitinasas de *L. lecanii* con M_r entre los 30 y 58 kDa, como bandas principales.

Paralelamente, se realizaron zimogramas a partir de SDS-PAGE adicionados con glicol quitina (GQ), lo que permite ver sólo las proteínas con actividad quitinolítica y determinar las M_r de las enzimas (Figura 13 A y B). Al comparar los resultados del electroferograma (Figura 12) con el zimograma (Figura 13) se observa que, en los cultivos sumergidos con fructosa y sacarosa, se observan, principalmente bandas de entre los 70 y 100 kDa, que no se observan en los geles de actividad (Figura 13). Esto indica que esas bandas no presentan actividad quitinolítica. Por su parte, los cultivos con quitina coloidal (tanto en cultivo sumergido como en sólido) (Figura 12) mostraron bandas entre los 20 y 100 kDa, las cuales corresponden a las observadas en los zimogramas (Figura 13).

Con los resultados de los geles con y sin glicol quitina (Figura 12 y 13, se corroboró que no hay una distorsión en las masas moleculares de las bandas observadas, puesto que no difieren entre ellos. Trudel y Asselin (1989) y Liao y col. (2008), reportaron que la tinción con azul de Coomassie es una opción efectiva para determinar las bandas con actividad quitinolítica en geles de electroforesis, y así sustituir la tinción con blanco de calcoflúor, sin embargo, en este trabajo se observaron ciertas diferencias entre estas dos opciones: la tinción con blanco de calcoflúor (Figura 13 B) evidenció bandas que no fueron detectadas con el método modificado de azul de Coomassie de Trudel y Asselin, (1989) (Figura 13 A). Cabe poner como ejemplo los geles correspondientes a los cultivos adicionados con fructosa o sacarosa, donde se observaron bandas entre los 9 y 45 kDa (Figura 13 B). La diferencia en la detección de dichas bandas reside en que la tinción de azul de Coomassie se une a las cargas positivas de la proteína (Tal y col., 1985), mientras que el blanco de calcoflúor se une a la quitina, dejando ver las zonas hidrolizadas del gel. Esto implicaría que al no detectarse con el azul

de Coomassie, las quitinasas expresadas tengan cargas negativas, al respecto, Pérez y col. (2002) reportaron endoquitinasas con cargas negativas producidas por *Trichoderma harzianum*, utilizando quitina de cangrejo como fuente de carbono.

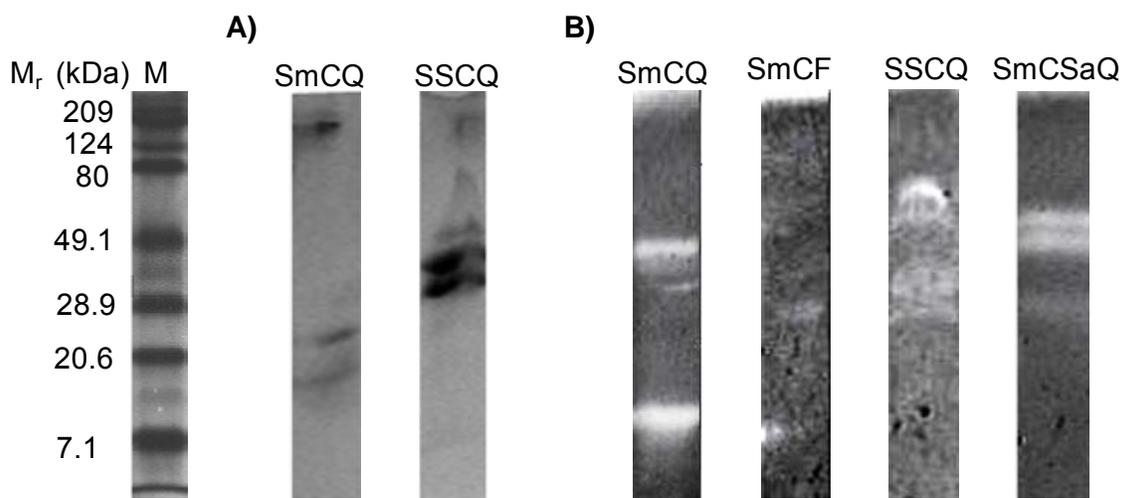


Figura 13. Actividad quitinolítica en SDS-PAGE con glicol quitina (GQ). Extractos enzimáticos de 144h de *L. lecanii* en cultivos sumergido (SmC) ó sólido (SSC) utilizando fructosa (SmCF), quitina coloidal (SmCQ o SSCQ) y sacarosa con quitina coloidal (SmCSaQ) como fuente de carbono: A) Tinción con azul de Coomassie, B) Tinción con blanco de calcoflúor.

La Figura 13 muestra un patrón de enzimas con actividad quitinolítica entre los 25 y 108 kDa, tanto en medio líquido como en sólido. Fueron detectadas bandas en SmCF, con pesos moleculares entre los 25 y 71 kDa. Por su parte, el medio adicionado con sacarosa y quitina (SmCSaQ) también mostró bandas bien definidas correspondiendo al aumento de la actividad quitinolítica a las 144 h (Figura 7). Las M_r observadas son similares a las reportadas por Liu y col. (2003) de quitinasas de *L. lecanii* cultivado en reactor agitado, por su parte, Barranco y col. (2009) reportaron quitinasas con actividad quitinolítica con masas moleculares de 70, 58, 45 y 31 kDa producidas por *L. lecanii* en cultivo sólido.

Con el fin de investigar el tipo y número de quitinasas producidas por *L. lecanii* según las condiciones de crecimiento analizadas en este trabajo, y con base en los resultados SDS-PAGE, se realizó un análisis mediante electroforesis SDS-PAGE adicionado con diferentes oligosacáridos (Figura 14), para lo cual se tomo en cuenta su acción sobre sustratos. Las quitinasas de tipo endoquitinasa cortan los enlaces internos de la cadena de quitina y se ha reportado que se pueden identificar con la digestión de tetrámeros de N-acetilglucosamina, actuando sobre el 4-metilumbeliferil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriósido (MuQT). Las quitobiosidasas tienen preferencia por el 4-metilumbeliferil β -D-N,N'-diacetilquitobiósido (MuQB). La Nhasa que muestra preferencia por el 4-metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosamina (MuG) (Haran y col., 1995), además de deducir su actividad, con base al esquema de acción de las quitinasas de Horch y col. (1997) (Figura 5).

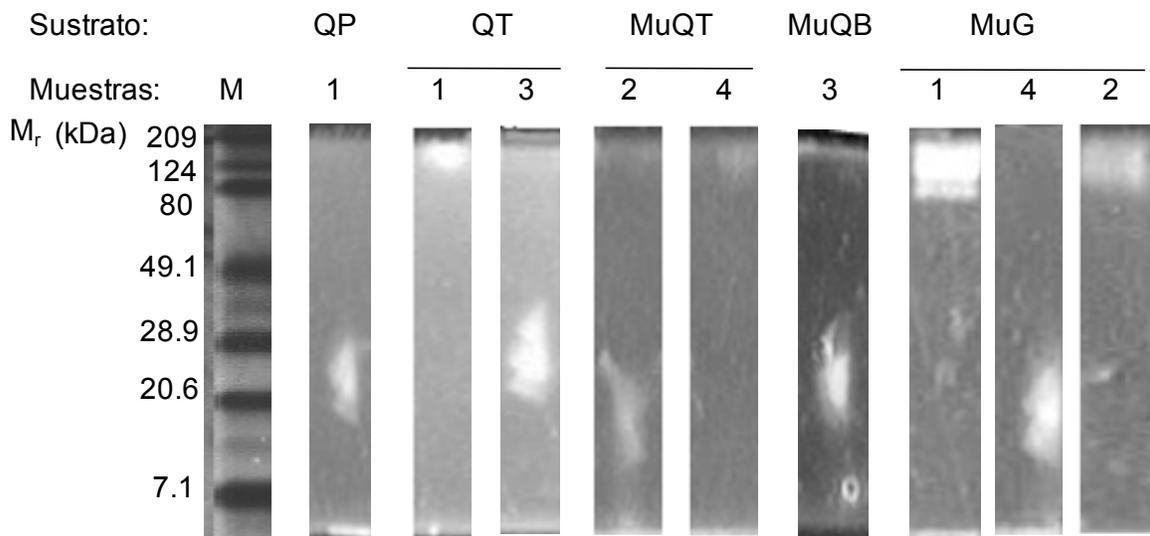


Figura 14. Actividad quitinolítica en SDS-PAGE de *L. lecanii* con penta-N-acetilquitopentaosa (QP), tetra-N-acetilquitotetraosa (QT), 4-metilumbeliferil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriósido (MuQT), 4-metilumbeliferil β -D-N,N'-diacetilquitobiósido (MuQB) ó 4-metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosamina (MuG) como sustrato. Los extractos enzimáticos de 144h; 1) cultivo solido con quitina, SSCQ, 2) cultivo sumergido con quitina, SmCQ, 3) cultivo sumergido con fructosa y quitina, SmCFQ, 4) cultivo sumergido con sacarosa y quitina, SmCSaQ con tinción de blanco de calcoflúor. (M) marcador de masa molecular.

El cultivo sólido con quitina coloidal mostró el mayor número de bandas con actividad quitinolítica, las cuales fueron: actividad de exoquitinasas se observa en la Figura 13 con bandas de 31, 38 y 49 kDa, ya que sólo mostraron actividad sobre la glicol quitina, y no sobre el MuQT. La actividad endoquitinasa se observó en el gel adicionado con quitopentosa (QP) con bandas entre los 15 y 21 kDa, ya que actúa en el enlace interno dando como resultado un dímero y un trímero y que recordando la teoría las exoquitinasas sólo producen dímeros. La actividad de N-acetilhexosaminidasa (Nhasa) fue evidenciada por la banda entre los 111 y 113 kDa (que, si fuera una sola proteína, tendría la característica de actuar sobre la quitotetraosa (QT) y la metil-umbeliferil-glucosamina (MuG), mientras que proteínas evidenciadas como bandas de 60, 80 y 96 kDa sólo actuaron sobre el MuG, el cual es el principal sustrato de la Nhasa (Figura 14).

El cultivo líquido con quitina, a diferencia del cultivo sólido, sólo mostró dos bandas con actividad exoquitinasa, aunque con masas moleculares similares, las cuales fueron de 31 y 45 kDa (Figura 13). Endoquitinasas, de 10 y 21 kDa que, actuaron sobre la metil-umbeliferil-quitotriosa, y la actividad Nhasa se evidenció con bandas de 60, 90 y 107 kDa en el gel con MuG (Figura 14). Estos resultados nos indican que entre el cultivo líquido y sólido sólo hay una disminución en la producción quitinolítica, sin haber cambios drásticos en el tipo de enzimas producidas y en sus masas moleculares. Las masas moleculares observadas coinciden con las de quitinasas de *M. anisopliae* reportadas por Krieger de Moraes y col. (2003), quienes identificaron bandas de 31 kDa con actividad exoquitinasa y endoquitinasa, utilizando quitina como fuente de carbono para el crecimiento del hongo, y Barreto y col. (2004) quienes también reportaron una endoquitinasa de 42 kDa.

En el caso del cultivo SmC adicionado con fructosa como única fuente de carbono se observaron bandas con actividad quitinolítica con pesos moleculares de 25 y 32 kDa (Figura 13), sin embargo, no se puede llegar a una conclusión

determinante sobre el tipo de actividad que realiza específicamente, ya que sólo mostraron actividad sobre la glicol quitina. Esta actividad quitinolítica fue la única observada, debido a que el extracto utilizado en este análisis corresponde a las 144 h de la cinética y en este tiempo la actividad Nhasa fue casi nula (Figura 7).

Por su parte, el cultivo en medio líquido con fructosa y quitina mostró actividad exoquitinasa en bandas de 17, 21 y 27 kDa, ya que mostró actividad en el gel adicionado con quitotriósido del cual da como resultado, únicamente dímeros. La actividad quitobiasa se observó con una banda de 19 kDa la cual actuó únicamente sobre el 4-metilumbeliferil β -D-N,N'-diacetilquitobiósido (Figura 14).

En el cultivo líquido con sacarosa y quitina también se observó la actividad exoquitinasa con 3 bandas, de 27, 44 y 54 kDa en el gel con glicol quitina (Figura 14), una endoquitinasa de 105 kDa ya que mostró actividad sobre el MuQT (Figura 14) y, debido a que a las 144 h, se incrementó la actividad Nhasa, esto se refleja en los geles con bandas intensas y bien definidas de 9 y 15 kDa, y que mostraron actividad en geles con 4-metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosamina (Figura 14). El peso molecular de las bandas con actividad Nhasa difieren de las observadas en los cultivos con quitina como única fuente de carbono, lo que marca una diferencia en el tipo de enzimas encontradas en un proceso de inducción y uno de represión ejercido por la fuente de carbono.

VII.1. Determinación de hidrofobinas en cultivos sumergido y sólido.

VII.1.1. Cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase reversa (HPLC- RP)

Con base en los resultados anteriores se encontró que la utilización de quitina coloidal como fuente de carbono y el cultivo en sólido, promueven la actividad quitinolítica, en comparación con los otros cultivos probados. Sin embargo, las quitinasas son excretadas junto con otro tipo de enzimas, como las proteasas, como parte del proceso natural de la patogénesis del hongo. Otro tipo de proteínas que se excretan durante este proceso son las hidrofobinas, las cuales ayudan a la adherencia del hongo a su huésped, lo que implica que estas proteínas se encuentren asociadas con el crecimiento y patogénesis del hongo (St. Leger y col., 1998; Wösten y Willey, 2000; Linder y col., 2001). Con el fin de conocer más acerca de la producción de hidrofobinas bajo condiciones de inducción y represión de quitinasas, se realizó la determinación de las hidrofobinas producidas en cultivo sumergido y sólido utilizando quitina coloidal o fructosa como fuente de carbono.

El tipo de cultivo, así como el tipo de sustrato, afectó la producción de hidrofobinas, de tal forma que en el cultivo sólido se incrementó la producción en comparación con el cultivo sumergido. El análisis mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) en fase reversa (RP) realizado a los extractos de hidrofobinas permitió observar diferencias tanto en la concentración así como en el número de picos, según la fuente de carbono utilizada (Figura 15). De esta forma, en el cultivo sólido con quitina coloidal se observaron mayor número de picos (compuestos con absorbancia a 280 nm, presuntamente proteínas) que eluyeron de acuerdo al gradiente de polaridad de la fase móvil y de mayor

magnitud, en comparación con los observados en el cultivo sumergido con quitina coloidal, donde sólo se observan dos picos definidos (al igual que concurre en los cultivos con fructosa).

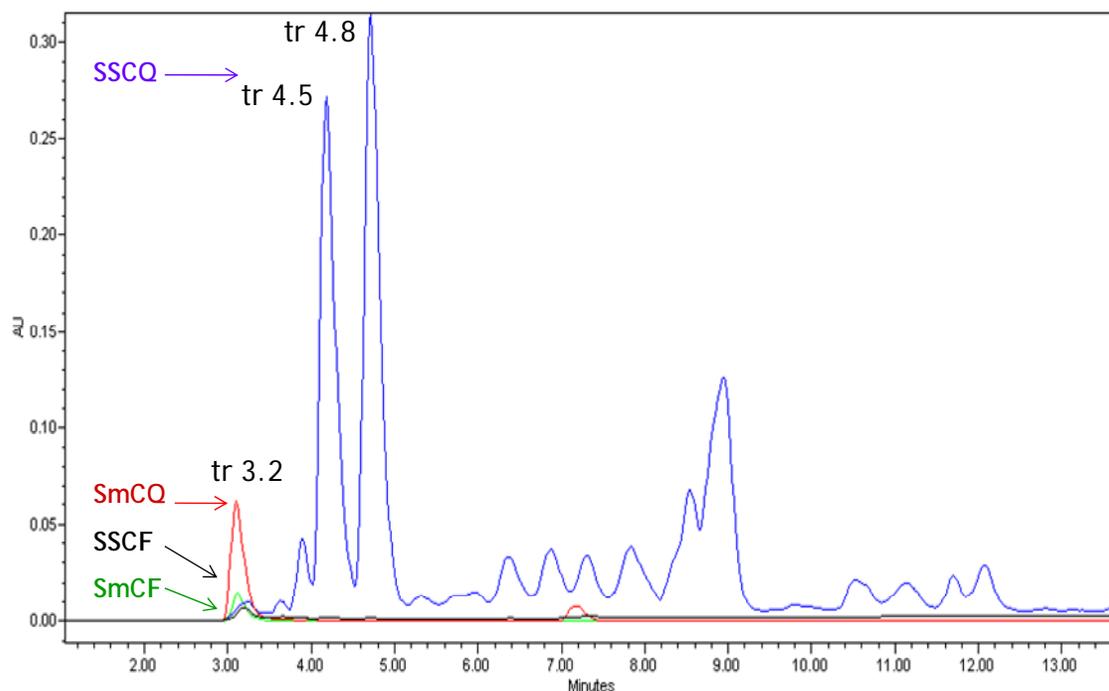


Figura 15. Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC-RP) de extractos de hidrofobinas de *L. lecanii* de cultivos sumergido (SmC) y sólido (SSC) utilizando quitina coloidal (SmCQ ó SSCQ) o fructosa (SmCF ó SSCF) como fuente de carbono.

VII.1.2. Actividad superficial de hidrofobinas

El análisis de actividad superficial de las hidrofobinas se realizó con las soluciones obtenidas de los cultivos sólidos, debido a que en este tipo de cultivo se obtuvo una mayor concentración de estas proteínas (posiblemente como respuesta para una mejor adaptación del hongo al medio). Se utilizó tanto quitina coloidal como fructosa como fuente de carbono durante el crecimiento, con el fin de conocer si

las hidrofobinas (al igual que las quitinasas) son reprimidas o inducidas por la fuente de carbono.

La presencia de hidrofobinas extraídas del cultivo sólido con quitina coloidal presentó un efecto significativo ($p < 0.05$) en la prueba de actividad superficial. El ángulo de contacto del teflón con las hidrofobinas del cultivo SSCQ disminuyó ca. del 50 %, mientras que en el caso de las hidrofobinas del cultivo con fructosa (SSCF) no se observó un cambio significativo en el cambio del ángulo de contacto (Tabla 4). Este resultado, así como el análisis en HPLC-RP, indica que las hidrofobinas producidas en el medio con fructosa tienen diferencias en su configuración con respecto a las obtenidas por SSCQ, o incluso que se esté produciendo más de una hidrofobina. Esto implicaría que la fuente de carbono estaría afectando a la producción de hidrofobinas; al respecto, Yin y Feng (2004) reportaron que las hidrofobinas producidas por *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* en cultivo con almidón como fuente de carbono influyeron menos en la termotolerancia de las esporas de dichos hongos, a diferencia de las producidas en cultivos adicionados con glucosa o sacarosa.

Tabla 4. Actividad superficial de hidrofobinas

Superficie	Muestra	Ángulo de contacto
Vidrio	Agua destilada	25.96 ± 2.61^a
Teflón	Agua destilada	124.60 ± 3.57^b
Teflón-muestra	Sólido-Fructosa (SSCF)	114.61 ± 1.67^b
	Sólido-Quitina (SSCQ)	63.11 ± 3.09^c

Al teflón se adicionó un alícuota de 200 μL , con concentración de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de proteína en ambos casos. Promedio de 6 observaciones independientes y error estándar

VII.1.3. Determinación de la masa molecular de las hidrofobinas

Los análisis anteriores indican ciertas diferencias en las hidrofobinas producidas al utilizar diferentes fuentes de carbono, a lo que habría que añadir reportes previos en los que se describen diferencias en la masa molecular de las hidrofobinas producidas al utilizar fuentes de carbono con diferente polaridad (Vigueras y col., 2009). Con el fin de ver si en nuestro caso se observaba un comportamiento similar, se realizó el análisis de masa molecular (M_r) de las hidrofobinas producidas en los distintos sistemas de cultivo mediante electroforesis SDS-PAGE. Este análisis mostró bandas definidas de aproximadamente 7.6 kDa, tanto en los cultivos adicionados con quitina como con fructosa (Figura 16), lo que no parecería explicar la diferencia observada en la actividad superficial. Sin embargo, en el caso del cultivo con quitina se observó la presencia de otra banda de alrededor de los 50 kDa y otras alrededor de los 100 kDa, las cuales podrían contribuir al efecto de la hidrofobicidad y las diferencias de los picos en el cromatograma HPLC-RP. Las masas moleculares obtenidas se encuentra dentro de los reportados para otras hidrofobinas, Calonje y col. (2002) reportaron que *Verticillium fungicola* cultivado en líquido con medio mínimo sin agitación produce una hidrofobina de M_r de 7 kDa.

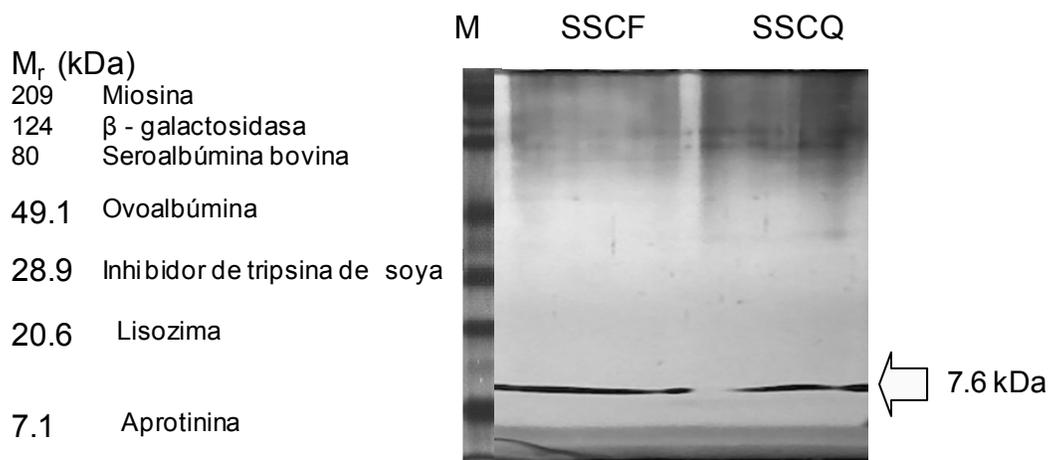


Figura 16. Electroferograma SDS-PAGE de extractos de hidrofobinas obtenidos del cultivos sólidos (SSC) de *L. lecanii* con fructosa (SSCF) o quitina coloidal (SSCQ) como fuente de carbono: Carril (M) marcadores de masa molecular M_r .

VII.1.4. Cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión molecular (HPLC- SEC)

En el caso del análisis de HPLC de exclusión molecular, también se evidenció la presencia de otras proteínas presentes en el extracto SSCQ con diversos picos de masa molecular diferentes, sin embargo, con base en la determinación de masa molecular de la hidrofobina mediante electroforesis es posible que el pico de la hidrofobina expresada en SSCQ se encuentre entre los picos de tiempo de retención (t_r) de 9.8 y 10.2 (Figura 15), correspondiendo a una masa molecular de entre 1.35 y 17 kDa (Figura 17). Por otra parte, no se observó la presencia de proteínas con el peso molecular de 50 y 100 kDa o superior, como se observó en la electroforesis, lo que permitiría descartarla como una banda específica.

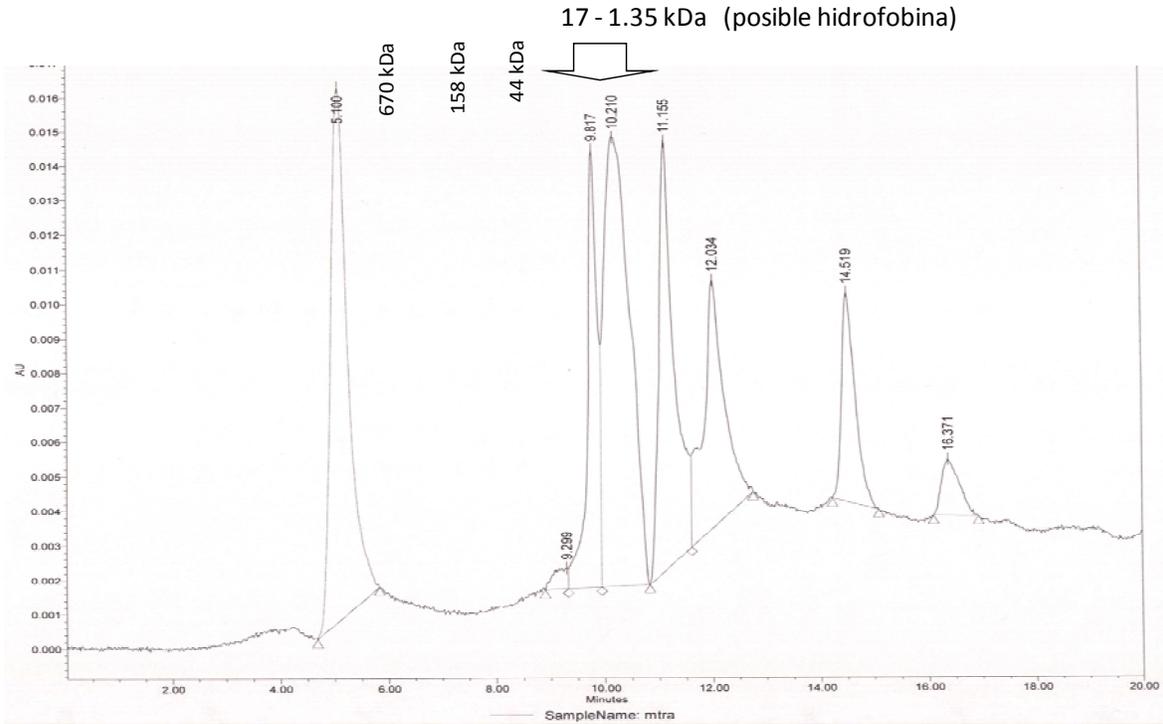


Figura 17. Cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión molecular (HPLC-SEC) del extracto de hidrofobina de *L. lecanii* en medio sólido utilizando quitina coloidal como fuente de carbono

VIII. CONCLUSIONES

El cultivo en sólido con quitina coloidal favoreció la producción quitinolítica y la producción de hidrofobinas, las cuales mostraron actividad hidrofóbica sobre superficies a diferencia de las obtenidas en los cultivos suplementados con fructosa. Esto corrobora que las proteasas, quitinasas o proteínas como las hidrofobinas son producidas en niveles altos según sean requeridas para el desarrollo del hongo.

Los patrones cinéticos y zimogramas expusieron claramente la participación de las quitinasas según el tipo y fuente de carbono utilizado, además de mostrar más de una banda para cada enzima (aún en el mismo cultivo). Sus M_r oscilaron entre los 9 y los 111 kDa.

Las diferencias entre las técnicas de tinción en los zimogramas de quitinasas revelan la presencia de endoquitinasas con carga negativa producidas en los cultivos adicionados con sacarosa y quitina.

La producción de proteasas fue expresada de forma constitutiva y reprimida en presencia de dos fuentes de carbono (en SmC: FQ y SaQ). La producción en presencia de quitina mostró un comportamiento similar a la actividad quitinolítica.

La fuente de carbono y el tipo de cultivo afectaron a la producción y la actividad superficial de las hidrofobinas, mostrando que el cultivo sólido con quitina redujo hasta un 50 % la hidrofobicidad del teflón.

IX. PERSPECTIVAS

Los resultados de represión mostraron diferencias en el comportamiento cinético de la actividad proteolítica, quitinolítica y de hidrofobinas en presencia de diferentes tipos de cultivo y de las fuentes de carbono empleadas. Por ello, es importante mencionar ciertos aspectos que se podrían profundizar para mejorar nuestro conocimiento sobre dichos metabolitos con el fin de incrementar su producción o actividad.

En cuanto a la actividad quitinolítica, una diferencia encontrada fue el peso molecular de las bandas observadas mediante electroforesis, por lo que se recomienda hacer un mejor análisis de las enzimas, realizando un análisis de los pesos moleculares de quitinasas intracelulares y la correspondiente comparación, con el fin de evidenciar si las diferencias son debidas a los efectos de represión catabólica o si las formas observadas son realmente producto de lisis celular. Asimismo, sería interesante profundizar en el análisis de la actividad quitinolítica, purificando alguna (s) de las quitinasas y realizando análisis de caracterización y nivel de actividad con el fin de producir quitoooligómeros específicos.

Debido a las diferencias de actividad superficial observadas en los cultivos con inductor y represor de quitinasas, sería conveniente también hacer más estudios de las hidrofobinas producidas en los cultivos con inductor quitinolítico, ya sea a nivel proteómico o genómico.

X. TRABAJOS PRESENTADOS

Presentación de trabajos en eventos especializados:

- a. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB), intitulado: DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POR *Lecanicillium lecanii* Y EFECTO SOBRE SU MORFOLOGÍA Y ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA, el cual fue aceptado en la modalidad de cartel. 21 al 26 de junio 2009. Acapulco, México.

- b. IV Simposio Iberoamericano de Quitina (SIAQ) intitulado: SUBMERGED Y SOLID SUBSTRATE FERMENTATIONS FOR PRODUCTION OF CHITINASES FROM *Verticillium*, el cual fue presentado como Conferencia plenaria. 5 al 10 de mayo 2007. Natal Brasil.

XI. REFERENCIAS

1. Alvares CR., Arruda W., Tomazzoni BJ., Vanusa da Silva M., Monteiro de Barros N., de Azevedo L., Schrank A. y Henning VM. 2005. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Curr. Microbiol.* 50: 257-261.
2. Anson ML. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-89.
3. Askolin S., Nakari-Setälä T. y Tenkanen M. 2001. Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 124-130.
4. Auria R., Hernández S., Raimbault M. y Revah S. 1995. Ion exchange resin: a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Tech.* 4: 391-396.
5. Barbosa CC., Monteiro AC., Correia ACB. y Pereira GT. 2002. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília.* 37(6): 821-829.
6. Barranco-Flrido JE., Alatorre R., Gutiérrez M., Viniegra G. y Saucedo G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii*. *Enz. Microbiol. Technol.* 30: 10910-915.
7. Barranco FE., Bustamante CP., Mayorga-Reyes L., González CR., Martínez CP. y Azaola A. 2009. β -N-acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* ATCC 26854 by solid-state fermentation utilizing shrimp shell. *Interciencia.* 34(5): 356-360.
8. Barreto CC., Staats CC., Schrank A. y Vainstein MH. 2004. Distribution of Chitinases in the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Curr. Microbiol.* 48: 102-107.
9. Bidochka MJ. y Kachaturians G. 1988. N-acetyl-D-glucosamine mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(11): 2699-2704.

10. Bowden CG., Hintz WE., Jeng R., Hubbes M. y Horgen PA. 1994. Isolation y characterization of the cerato-ulmin toxin gene of the Dutch elm disease pathogen, *Ophiostoma ulmi*. *Curr. Genet.* 25: 323-329.
11. Bradford MM. 1976. A rapid y sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
12. Butt TM., Jackson C. y Magan N. 2001. Introduction fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: *Fungi as Biological Agents*. CAB International, Nueva York. pp. 1-8.
13. Calonje M., Bernardo D., Novaes-Ledieu M. y García MC. 2002. Properties of a hydrophobin isolated from the mycoparasitic fungus *Verticillium fungicola*. *Can. J. Microbiol.* 48: 1030-1034.
14. Cox PW., Paul GC. y Thomas CR. 1998. Image analysis of the morphology of filamentous microorganisms. *Microbiol.* 144: 817-827.
15. Deshpye MV. 1986. Enzymatic degradation of chitin and its biological Applications. *J. Sci. Ind. Res.* 45: 273-281.
16. de Vocht ML., Scholtmeijer K., van der Vegte EW., de Vries OMH., Sonveaux N., Wösten HAB., Ruyschaert JM., Hadziioannou G., Wessels JGH. y Robillard GT. 1998. Structural characterization of the hydrophobin SC3, as a monomer and after self-assembly at hydrophobic/hydrophilic interfaces. *Biophys. J.* 74(4): 2059-2068.
17. Donzelli BGG. y Harman GE. 2001. Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5643-5447.
18. Duo-Chuan L. 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia.* 161: 345-360.
19. Emri T., Molnár Z., Veres T., Pusztahelyi T., Dudás G. y Pócsi I. 2006. Glucose-mediated repression of autolysis and conidiogenesis in *Emericella nidulans*. *Mycol. Res.* 110: 1172-1178.
20. Fang W., Leng B., Xiao Y., Jin K., Ma J., Fan Y., Feng J., Yang X., Zhang Y. y Pei Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its

application to improve fungal strain virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 363-370.

21. Garraway MO. y Evans RC. 1984. Vitamins and growth factors. In: *Fungal Nutrition y Physiology*. New York: John Willey, pp.171-212.

22. Gillespie AT, y Claydon N. 1989. The uses of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pestic. Sci.* 27: 203-15.

23. Hakanpää J., Paananen A., Askolin S., Nakari-Setälä T., Parkkinen T., Penttilä M., Linder MB. y Rouvinen J. 2003. Atomic resolution structure of the HFBII hydrophobin, a self-assembling amphiphile. *J. Biol. Chem.* 279 (1): 534-539.

24. Haran S., Schickler H., Oppenheim A. y Chet I. 1995. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* 99: 441-446.

25. Holder DJ. y Keyhani NO. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9): 5260-5266.

26. Holker U., Hofer M. y Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 175-186.

27. Horsch M., Mayer C., Sennhauser U. y Rast D. 1997. β -N-acetylhexosaminidase: a target for the design of antifungal agents. 76(1-3): 187-218.

28. Howard MB., Ekborg NA., Weiner RM. y Hutcheson SW. 2003. Detection and characterization of chitinases y other chitin-modifying enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 627-635.

29. Iglesias AM., Paniagua PN., Larralde CCP. y Shirai K. 2002. "Elicitors of fungal cell wall degrading enzymes production by *Verticillium fungicola* and its interaction with phytopathogenic fungi". VIII Simposio Latinoamericano de Polímeros, VI Congreso Iberoamericano de Polímeros, II Simposio Iberoamericano de Quitina, XV Congreso Nacional de Polímeros. Acapulco, Guerrero México. 10-15 de Noviembre 2002.

-
30. Krieger de Moraes C., Schrank A. y Vainstein MH. 2003. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen y acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.* 46: 205-210.
31. Kunitz M. 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310.
32. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
33. Liao CY. y Lin CS. 2008. A modified Coomassie brilliant blue G 250 staining method for the detection of chitinase activity and molecular weight after polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biosci. Bioeng.* 106(1): 111-113.
34. Liu BL., Kao PM., Tzeng YM. y Feng KC. 2003. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 33(4): 410-415.
35. Linder M., Selber K., Nakari-Setälä T., Qiao M., Kula M-R. y Penttilä M. 2001. The hydrophobins HFBI y HFBI from *Trichoderma reesei* showing efficient interactions with nonionic surfactants in aqueous two-phase systems. *Biomacromolecules.* 2: 511-517.
36. Lugones LG., Wösten HAB. y Wessels JGH. 1998. A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiol.-SGM.* 144: 2345-2353.
37. Lumsdon SO., Green J., Stieglitz B. 2005. Adsorption of hydrophobin proteins at hydrophobic and hydrophilic interfaces. *Biointerfaces.* 44: 172-178.
38. Marin-Cervantes MC. 2006. Evaluación de actividad quitinolítica de cepas de *Lecanicillium* en medios hidrófobos utilizando compuestos orgánicos volátiles. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
39. Marin-Cervantes MC., Matsumoto Y., Ramírez-Coutiño L., Rocha-Pino Z., Viniegra G. y 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. *Proc. Biochem.* 43: 24-32.
40. Matsumoto Y., Saucedo G., Revah S. y Shirai K. 2004. Production of beta-N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged

fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Proc. Biochem.* 39(6): 665-6714.

41. Osborne L. y Landa Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomology.* 75: 456-471.

42. Pegg GF. 1988. Chitinase from tomato *Lycopersicon esculentum*. *Methods Enzymol.* 161: 484-487.

43. Pérez LM., Besoain X., Reyes M., Pardo G. y Montealegre J. 2002. The expression of extracellular fungal cell wall hydrolytic enzymes in different *Trichoderma harzianum* isolates correlates with their ability to control *Pyrenochaeta lycopersici*. *Biol. Res.* 35(3-4): 401-410.

44. Quijano-Govantes G., Ramírez-Coutiño L., Paniagua N., Larralde-Corona CP., y Shirai K. 2004. Evaluation of pH of culture on the chitinolytic and proteolytic activities of *Verticillium fungicola* using shrimp waste silage. *Advances in Chitin Science*, volume VII. Boucher I, Jamieson K y Retnakaran A (eds.) Montreal. pp 222-225.

45. Rimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic. J. Biotechnol.* 1(3): 1-15.

46. Richards WC., Sticklen MB. y Sherald JL. 1993. Cerato-ulmin: a unique wilt toxin of instrumental significance in the development of Dutch elm disease. *Dutch Elm Disease Research, cellular y molecular approaches.* 89-151.

47. Sahai AS. y Manocha MS. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis in host-parasite interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 11: 317-338.

48. Scholtmeijer K., Wessels J. y Wösten H. 2001. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 1-8.

49. Schuren FHJ. y Wessels JGH. 1990. Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating type genes. *Gene.* 90: 199-205.

50. Shakeri J. y Foster HA. 2007. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 961-968.

-
51. Shi Y., Xu X. y Zhu Y. 2009. Optimization of *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 921-927.
52. Shirai K., Guerrero LI. y Hall GM. 1996. La quitina: ocurrencia, propiedades y aplicaciones. *Ciencia.* 47(4): 317-328.
53. St. Leger RJ., Cooper RM. y Charnley AK. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* 132: 1509-1517.
54. St. Leger RJ., Charnley AK., y Cooper RM. 1987. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 253(1): 221-232.
55. St. Leger RJ., Joshi L., Bidochka MJ., Rizzo NW. y Roberts DW. 1996. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Myuca sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3): 907-912.
56. St. Leger RJ, Joshi I. y Roberts D., 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2): 709-713.
57. Tal M., Silberstein A. y Nusser E. 1985 Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *J. Biol. Chem.* 260: 9976-9980.
58. Talbot NJ., Kershaw MJ., Wakley GE., de Vries OMH., Wessels JGH. y Hamer JE. 1996. MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell.* 8: 985-999.
59. Tucker SL. y Talbot NJ. 2001. Surface attachment and prepenetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:385-417.
60. Tronsmo A. y Harman GE. 1993. Detection and quantification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, y endochitinase in solutions and on gels. *Anal. Biochem.* 208: 74-9.

-
61. Trudel J. y Asselin A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178: 362-366.
62. Van der Mei HC., de Vries J. y Busscher HJ. 1993. Hydrophobic y electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4305-4312.
63. Viguera G., Arriaga S., Shirai K., Morales M., y Revah S. 2009. Hydrophobic response of the fungus *Rhinochrysiella similis* in the biofiltration with volatile organic compounds with different polarity. *Biotechnol. Lett.* 31: 1203-1209.
64. Viniegra G., Favela E., Aguilar CN., Romero-Gómez SJ., Díaz-Godínez G. y Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.* 13: 157-167.
65. Wang X., Shi FX., Wosten HAB., Hektor H., Poolman B. y Robillard GT. 2005. The SC3 hydrophobin self-assembles into a membrane with distinct mass transfer properties. *Biophys. J.* 88: 3434-3443.
66. Wessels JGH. 1999. Fungi in their own right. *Fungal Gen. Biol.* 27: 134-145.
67. Wösten HAB., de Vries OMH. y Wessels JGH. 1993. Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *The Plant Cell.* 5: 1567-1574.
68. Wösten HAB., de Vries OMH., Van der Mei HC., Busscher HJ. y Wessels JGH. 1994. Atomic composition of the hydrophobic and hydrophilic membrane sides of self-assembled SC3p hydrophobin. *J. Bacteriol.* 176(22): 7085-7086.
69. Wösten HAB. y de Vocht ML. 2000. Hydrophobins, the fungal coat unraveled. *Biochim. Biophys Acta* 1469: 79-86.
70. Wösten HAB. y Wessels JGH. 1997. Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. *Mycoscience.* 38: 363-374.
71. Wösten H., van Wetter M., Lugones L., van der Mei H., Busscher H. y Wessels J. 1999. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr. Biol.* 9: 85-88.
72. Wösten HAB. y Willey J. 2000. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiol.* 146: 767-773.

-
73. Wösten H. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Ann. Rev. Microbiol.* 55: 625-646.
74. Ying SH. y Feng MG. 2004. Relationship between thermotolerance y hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *J. Appl. Microbiol.* 97: 323-331.
75. Zangi R., de Vocht ML., Robillard GT., y Mark AE., 2002. Molecular dynamics study of the folding of hydrophobin SC3 at a hydrophilic/hydrophobic interface. *Biophys. J.* 83(7): 112-124.
76. Zhu X., Suidan MT., Pruden A., Yang C, Alonso C., Kim BJ. y Kim BR. 2004. Effect of substrate Henry's constant on biofilters performance. *J. Air Waste Manage Assoc.* 54: 409 - 418.

ANEXO

A1. Curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA)

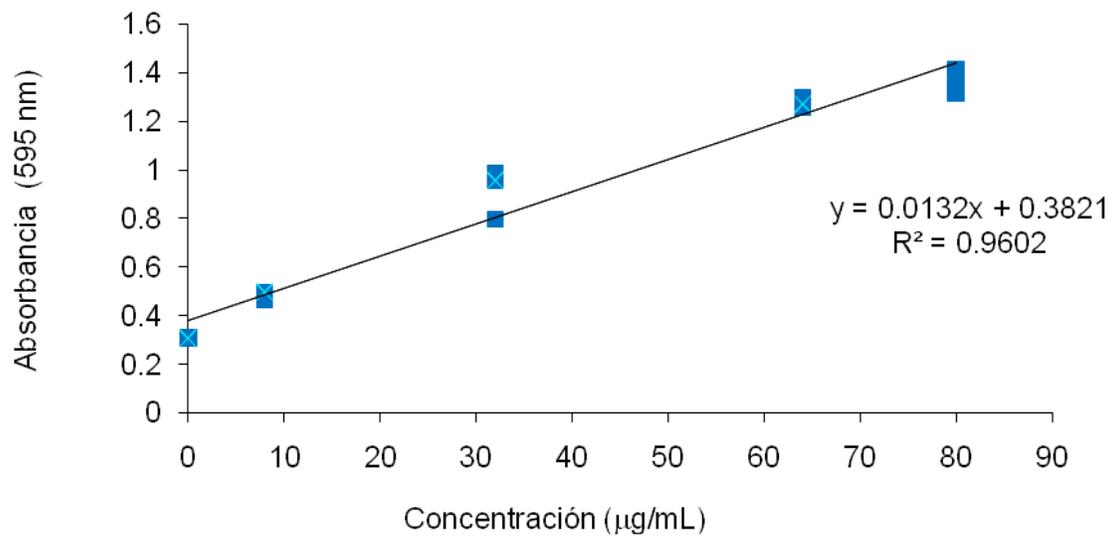


Figura A1. Curva patrón de BSA (Bradford, 1976).

A2. Curva patrón de p-nitrofenol

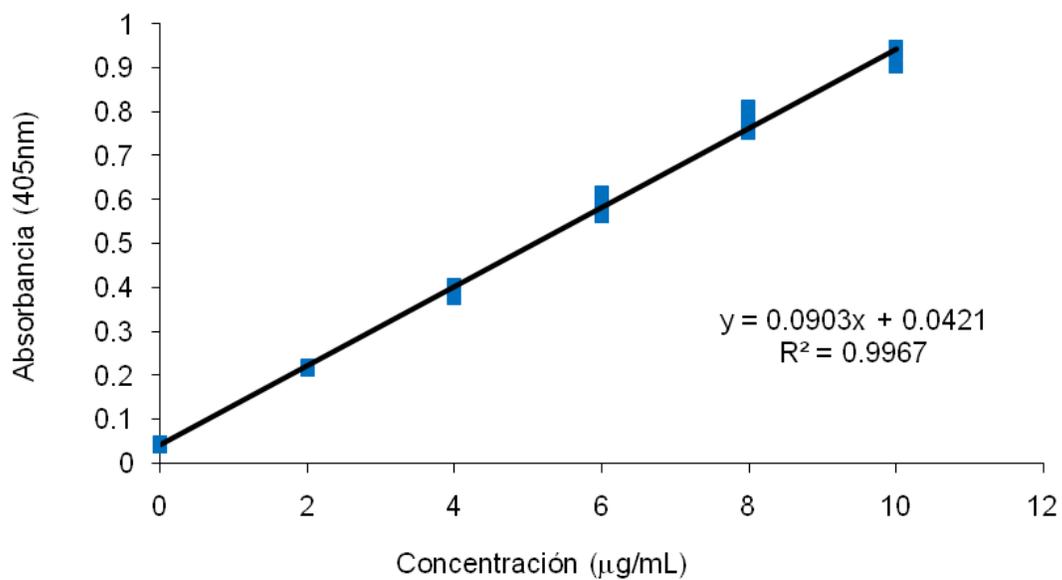


Figura A2. Curva patrón de p-nitrofenol (Tronsmo y Harman, 1993).

A3. Determinación de la concentración de CO₂

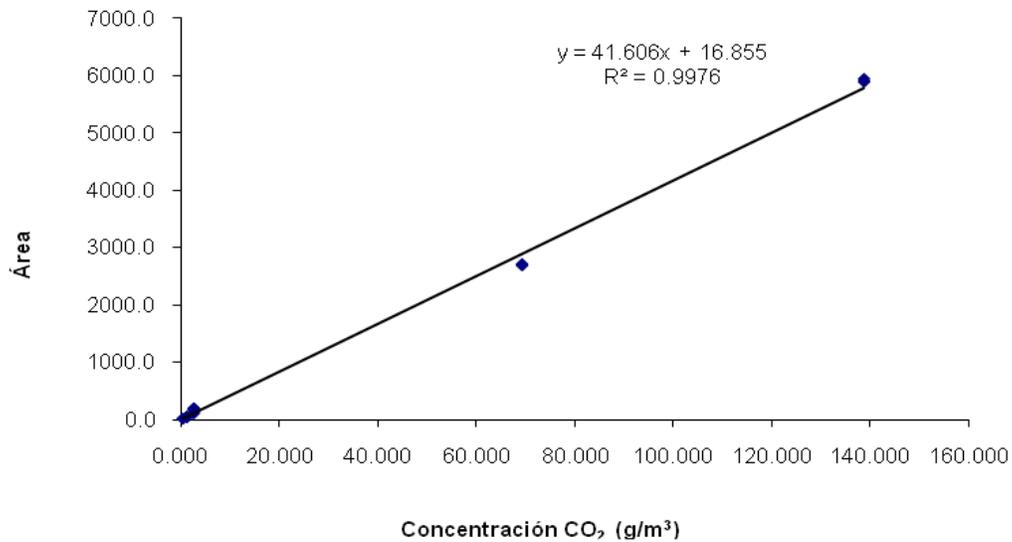


Figura A3. Curva patrón de CO₂.

$$C_{CO_2} = \left(\frac{A_{CO_2}}{A_{total}} \right) F_c$$

donde $F_c = 1200.540 \text{ g/m}^3$

C_{CO_2} = Concentración de CO₂ (g/m³)

A_{CO_2} = Área de CO₂

A_{total} = Área CO₂ + Área N₂

F_c = Factor de corrección

Según la Norma Oficial Mexicana: NOM-059-STPS-1993

Procedimiento 029: Determinación de dióxido de carbono en aire- Método de cromatografía de gases

A4. Análisis estadístico de actividad quitinolítica en cultivo SmC y SSC

A4. Análisis estadístico de actividad quitinolítica en cultivo SmC y SSC a las 144 h de cultivo

ANOVA

	Grados de libertad	Media de Cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia (alpha = 0.05)
Entre grupos	1	811.3643	114.63	0.000001*	1.000000
Dentro de grupos	10	7.078193			
Total	12				

*Term significant at alpha = 0.05

Comparación de medias múltiple Tukey-Kramer

Tratamiento	Lecturas	Media: Nhasa (U/g SI)	Grupos diferentes
SmCQ	6	1.29	SSCQ
SSCQ	6	17.74	SmCQ

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=15 MSE=40.80477 Critical Value=4.3670

A4. Análisis estadístico de actividad quitinolítica en cultivo SmC y SSC a las 72 h de cultivo

ANOVA

	Grados de libertad	Media de Cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia (alpha = 0.05)
Entre grupos	1	122.076	49.24	0.000346*	0.9999991
Dentro de grupos	10	2.479162			
Total	12				

*Term significant at alpha = 0.05

Comparación de medias múltiple Tukey-Kramer

Tratamiento	Lecturas	Media: Nhasa (U/g SI)	Grupos diferentes
SmCQ	6	3.631	SSCQ
SSCQ	6	10.010	SmCQ

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=15 MSE=40.80477 Critical Value=4.3670

A5. Análisis estadístico de actividad superficial de hidrofobinas sobre sólidos

ANOVA

	Grados de libertad	Media de Cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia (alpha = 0.05)
Entre grupos	4	7997.65	196.0	0.000000*	1.000000
Dentro de grupos	15	40.80477			
Total	20				

*Term significant at alpha = 0.05

Comparación de medias múltiple Tukey-Kramer

Tratamiento	Lecturas	Media: Ángulo de contacto (°)	Grupos diferentes
Vidrio	4	25.97	T-SQ , T-SF, T
T- Sólido Quitina (T-SQ)	4	60.07	Vidrio, T-SF, T
T- Sólido Fructosa (T-SF)	4	114.61	Vidrio, T-SQ
Teflón	4	124.61	Vidrio, T-SQ

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=15 MSE=40.80477 Critical Value=4.3670