



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

---

IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Contribución al estudio de las actividades enzimáticas involucradas  
en el mecanismo de patogenicidad de *Lecanicillium* (*Verticillium*)  
*lecanii* cultivado en medio sólido

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**  
P R E S E N T A :  
**JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO**  
Químico Farmacéutico Biólogo  
Maestro en Biotecnología

Director de Tesis: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

Enero de 2004 .

# **TESIS DOCTORAL**

**Contribución al estudio de las actividades enzimáticas involucradas en el mecanismo de patogenicidad de *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* cultivado en medio sólido**

**Presenta:**

**M. en B. Juan Esteban Barranco Florido**

**Director:**

**Dr. Gerardo Saucedo Castañeda**

## **COMITÉ TUTORIAL**

**Dra. Raquel Alatorre Rosas**

**Dr. Gustavo Viniegra González**

**Dr. Mariano Gutiérrez Rojas**

## INDICE

	Páginas
Agradecimientos	i
Resumen	iii
Abstract	v
Presentación	1
1. Revisión Bibliográfica	3
1.1 El hongo entomopatógeno <i>Lecanicillium (Verticillium) lecanii</i>	4
1.2 Bioensayos	6
1.3 Mecanismos de patogenicidad	7
1.3.1 Definiciones importantes	7
1.3.2 Patogenicidad y especificidad de hospedero	8
1.3.3 La ruta o vía de entrada característica	9
1.4 Enzimas infectivas	10
1.4.1 Quitinasas	11
1.4.2 Proteasas	15
1.4.3 Lipasas	18
1.5 Crecimiento a baja $A_w$	18
1.6 Fermentación en medio sólido FMS	18
1.6.1 Características de la FMS	19
1.6.2 Productos obtenidos en FMS	21
2. Justificación	27
3. Objetivos	31
3.1 Objetivo General	32
3.2 Objetivos particulares	32
4. Materiales y Métodos	33
4.1 Microorganismo	34
4.2 Medios de cultivo	34
4.2.1 Medio de mantenimiento y conservación	34
4.2.2 Medio para la producción del inóculo	34
4.2.3 Medio de cultivo para el crecimiento a bajas $a_w$	34

4.2.4 Medio para el ensayo semicuantitativo de proteasas.	35
4.2.5 Medio para el ensayo semicuantitativo de quitinasas.	35
4.2.6 Preparación y condiciones del medio de cultivo sólido	36
4.2.6.1 Cultivo en columnas por aireación forzada	36
4.2.6.2 Medio de cultivo para la fermentación Sólida	38
4.2.7 Medio para la fermentación líquida	39
4.3 Preparación del extracto enzimático.	39
4.4 Técnicas analíticas	40
4.4.1 Determinación de la biomasa en cajas Petri	40
4.4.2 Conteo del número de esporas para el inóculo	40
4.4.3 Determinación del pH en la fermentación sólida.	40
4.4.4 Determinación de humedad en la fermentación sólida.	41
4.4.5 Determinación de la actividad de agua ( $a_w$ )	41
4.4.6 Determinación del CO <sub>2</sub> producido.	42
4.4.7 Determinación del contenido de C H y N de la cutícula de <i>S. purpurascens</i>	44
4.4.8 Determinación de azúcares reductores y totales.	45
4.4.9 Proteína total	45
4.4.10 Ensayo semicuantitativo de actividad proteolítica	45
4.4.11 Actividad proteolítica con azocoll	45
4.4.12 Ensayo semicuantitativo de actividad quitinolítica	46
4.4.13 Actividad quitinolítica	46
4.4.14 Actividad celulolítica	47
4.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	47
4.6 Expresión de los resultados	49
4.6.1 Análisis de gases	49
4.6.2 Resultados de las actividades enzimáticas	50
4.6.2.1 Actividad Proteolítica	51
4.6.2.2 Actividad Quitinolítica	51
5. Criterios de selección de cepas de <i>Lecanicillium</i> ( <i>Verticillium</i> ) <i>lecanii</i> para su crecimiento en fermentación en medio sólido	53

5.1 Crecimiento a bajas $a_w$ .	54
5.2 Actividad enzimática semicuantitativa (Halos de hidrólisis)	55
5.3 Estimación del crecimiento por la evolución del $CO_2$ en FMS	58
5.4 Análisis de las actividades enzimáticas en fermentación líquida y en fermentación sólida	60
5.5 Conclusiones	61
6. Cinética de degradación enzimática de la cutícula de <i>Sphenarium purpurascens</i> por <i>Lecanicillium (Verticillium) lecanii</i> en fermentación sólida	63
6.1 Desarrollo del sistema de cultivo sólido	64
6.2 Efecto de la sacarosa en la evolución del $CO_2$ .	66
6.3 Efecto del pH inicial y la sacarosa sobre la tasa producción de $CO_2$ y las actividades enzimáticas	68
6.3.1 Cultivo sólido a pH 6	68
6.3.2 Cultivo sólido a pH 4	71
6.4 Determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento y de las actividades enzimáticas del hongo <i>L. lecanii</i> sobre la cutícula de <i>S. purpurascens</i>	74
6.4.1 Evaluación del crecimiento de <i>Lecanicillium (Verticillium) lecanii</i>	75
6.4.2 Comparación cuantitativa de las actividades enzimáticas de <i>Lecanicillium (Verticillium) lecanii</i>	76
6.5 Cinética del pH, consumo de sacarosa, % de humedad y $a_w$ en el cultivo sólido	77
6.5.1 Cultivo a pH 6	77
6.5.2 Cultivo a pH 4	79
6.6 Interacción del hongo <i>L. lecanii</i> sobre la cutícula de <i>S. purpurascens</i>	80
6.5 Conclusiones	82
7. Caracterización parcial de las enzimas proteolíticas y quitinolíticas	84
7.1 Proceso de extracción del extracto crudo enzimático	85
7.2 Efecto del pH en la actividad de los sistemas enzimáticos de proteasas y quitinasas	86
7.3 Efecto de la temperatura en la estabilidad de las enzimas	

proteolíticas y quitinolíticas	87
7.4 Efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas	88
7.5 Estabilidad de almacenamiento en la actividad proteolítica	90
7.6 Conclusiones	92
Conclusiones Generales	93
Comentario finales	96
Bibliografía	98
Anexos	110

## RESUMEN

En la agricultura sustentable, el control biológico se ha convertido en una parte fundamental para el manejo de plagas. Los hongos entomopatógenos, entre ellos *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii*, se han utilizado para la producción de bioinsecticidas para el control de plagas.

Este trabajo contribuye al estudio de *L. lecanii* (hongo entomopatógeno) cultivado en medio sólido y su relación con las enzimas que están involucradas en la degradación de la cutícula del insecto. Se ha demostrado que el cultivo sólido presenta características microambientales similares a las que se presentan en el proceso de infección natural de los hongos entomopatógenos. Por lo que el cultivo sólido se ha convertido en un área potencial para el estudio de hongos entomopatógenos. En el sistema-modelo se propuso la utilización de cutícula de *Sphenarium purpurascens* como inductor de las enzimas degradadoras de la cutícula en un medio mineral impregnado en bagazo de caña.

En el presente estudio se evaluaron 3 criterios para la selección de cepas para su cultivo en medio sólido: a) Crecimiento a una baja actividad de agua ( $a_w$ ), b) Tasa de producción de  $CO_2$ , como medida indirecta del crecimiento, c) Actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de la cutícula. La medición en línea del  $CO_2$  producido es un parámetro adecuado para llevar a cabo el seguimiento de la fermentación sólida, mientras que las actividades enzimáticas permitirían determinar la virulencia de la cepa.

Una vez seleccionada la cepa de *L. lecanii* ATCC 26854, se estudió la cinética de producción de  $CO_2$  y de las actividades enzimáticas bajo distintas condiciones de cultivo iniciales. Se ensayaron diferentes sustratos a dos valores de pH inicial (4 y 6): sacarosa (1 %), un sustrato complejo (cutícula 6 %) y una mezcla de cutícula (6 %) con sacarosa (1 %). La forma del perfil de la producción de  $CO_2$  depende del tipo de sustrato, en el caso del sustrato complejo (cutícula) se obtiene una banda ancha, mientras que con la presencia de sacarosa la tasa de formación de  $CO_2$  es muy rápida y da lugar a la formación de un pico pronunciado. Al emplear sacarosa y cutícula simultáneamente, la producción de las proteasas y quitinasas es posterior al

pico de consumo rápido de azúcar. Las quitinasas tienen su mayor nivel de expresión a un pH inicial de 4.0. Los niveles de expresión de las proteasas no son dependientes del pH. La producción total de CO<sub>2</sub> fue mayor a pH 6 que a pH 4 por lo que sugiere que esta condición es más favorable para el crecimiento. Las imágenes de microscopía electrónica mostraron la adhesión y formación del apresorio sobre la superficie de la cutícula y su crecimiento sobre el sustrato complejo.

Las actividades enzimáticas de proteasas y quitinasas fueron parcialmente caracterizadas, en función del pH y de la temperatura. Las quitinasas presentaron su mayor actividad a pH 5.0 y las proteasas a pH 8.0. Respecto al efecto de la temperatura, las proteasas fueron más termoestables que las quitinasas. Las energías de activación fueron calculadas por la ecuación de Arrhenius y correspondieron al intervalo de valores típicos en sistemas biológicos.

En su conjunto el sistema de cultivo propuesto contribuye al entendimiento de la fisiología del cultivo de *L. lecanii* en medio sólido y su relación con las enzimas degradadoras de la cutícula. Este trabajo demuestra la factibilidad técnica del cultivo sólido para ser utilizado en la producción de bioinsecticidas de hongos entomopatógenos, utilizando las esporas como partículas infectivas. Asimismo, se abre un área de investigación interesante para el diseño y desarrollo de nuevos bioinsecticidas.

## Abstract

Biological control in pest management is a fundamental part of sustained agriculture. Entomopathogenic fungi as *L. lecanii* have been used for bio-insecticide production in pest control.

This work contributes to the study of *L. lecanii* (entomopathogenic fungus) in a solid substrate culture and its relationship with the enzymes involved in insect cuticle degradation. Solid substrate fermentation (SSF) presents some advantages to the traditional submerged fermentation approach, since it is similar to the natural process of insect infection by fungi, therefore this system can lead us to a better understanding of entomopathogenic fungic processes.

In this study, 3 criteria for selection strains in solid culture were evaluated: a) Growth at low water activity ( $a_w$ ), b) CO<sub>2</sub> production rate, and c) Titres of enzymes involved in host invasion, such as chitinase and protease activities. CO<sub>2</sub> on-line determination allowed monitoring of SSF process, while enzyme activities allowed to asses the virulence of microorganism.

The strain *L. lecanii* ATCC 26854 was selected for further studies of CO<sub>2</sub> production and enzymatics activities. Different substrates were evaluated at initial pH 4 and 6: sucrose (1 %), a complex substrate (cuticle 6 %) and a mixture of cuticle (6 %) with sucrose (1 %). CO<sub>2</sub> production rate was dependent on carbon source, a rapid consumption of sucrose cause a rapid response of CO<sub>2</sub> production rate, in contrast in the presence of cuticle the CO<sub>2</sub> production rate showed a bell shape curve. When a mixture of substrates was used a mixed behavior was observed. Productions of protease and chitinase were higher in medium containing sucrose and cuticle medium and were observed after consumption of sucrose. In contrast, protease and chitinase activities appeared early in fermentation, in the presence of cuticle. Chitinase showed its highest level of activity at pH 4. Protease activities were independent of pH and were delayed in the presence of sucrose.

In extract crude, chitinase and protease enzymatic activities were partially characterized. Highest chitinase and protease activities were found at pH 5 and pH 8, respectively. Thermostability of

protease enzymes was higher than chitinase. Activation energy values calculated by Arrhenius equation corresponded to the typical values enzymes biological systems.

Scanning electronic microscope images showed the formation and adhesion of an appressorium over the cuticle surface and growth on the complex substrate.

In conclusion, this investigation contributes to a better understanding of the physiology of *L. lecanii* and cuticle degrading enzyme production. This research demonstrated the feasibility of solid culture for the production of biopesticides by entomopathogenic fungi, using spores as infective particles. Besides, it opens an interesting research area for the design and development of new biopesticides.

## Presentación

Una de las principales razones de usar agentes microbianos para el control de plagas es la necesidad de restringir el uso de los pesticidas químicos y orientar la agricultura hacia una actividad ecológicamente sustentable. Los bioinsecticidas han sido definidos como “el uso de organismos vivos como agentes para el control de plagas” (Cannon R., 1989), entre los que se encuentra: baculovirus, bacterias, hongos, nemátodos y protozoarios. Los hongos entomopatógenos son agentes para el biocontrol de un amplio rango de insectos. El mecanismo infectivo involucra la adhesión de las esporas a la cutícula del insecto, germinación y penetración del insecto hasta provocar su muerte (Hajek, A.E. y St-Leger J.S., 1994). Su sobrevivencia dependerá de varios factores físicos y biológicos, tales como humedad, temperatura y diversos nutrientes. El conocimiento de tales efectos ayudaría a entender la dinámica poblacional de los hongos bajo la influencia de diferentes factores ambientales y nutricionales.

En este trabajo se pretende contribuir al estudio de las enzimas involucradas en el proceso infectivo que utiliza el hongo entomopatógeno *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* al invadir el insecto blanco. Para ello se propone un sistema-modelo experimental de fermentación sólida que es semejante a las condiciones naturales del proceso infectivo del hongo y que permite estudiar las condiciones nutricionales y ambientales que afectan este proceso.

En el capítulo 1 se presenta una revisión bibliográfica sobre las características morfológicas del hongo *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii*, su mecanismo de patogenicidad que comienza con la adhesión de la espora sobre la superficie del exoesqueleto del insecto y la formación de una estructura denominada apresorio. Posteriormente se muestra que las enzimas que degradan la cutícula, han sido clasificadas por su acción, en tres grupos: proteasas, quitinasas y lipasas. Las más importantes son las proteasas y las quitinasas que actúan despolimerizando la estructura de la cutícula, constituida principalmente por proteínas y una red de polímeros de quitina. Enseguida se describen las características más importantes de la fermentación sólida y las ventajas de su utilización en el desarrollo de bioinsecticidas a partir de hongos entomopatógenos.

El capítulo 2 señala la importancia del trabajo, que reside en la resistencia de los insectos plaga respecto a los insecticidas químicos y la necesidad de buscar alternativas de control biológico, en la que los hongos entomopatógenos formen parte integral de éste. Dentro de la justificación se aborda la importancia de la agrobiotecnología para el siglo XXI y el desarrollo de bioinsecticidas por empresas químicas, así como la importancia de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* para el control de mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). El capítulo 3 y 4 se refieren a los objetivos y metodología empleados respectivamente.

En el capítulo 5 se proponen los criterios de selección de cepas de hongos para su cultivo en un sistema de fermentación sólida. Los criterios seleccionados fueron los siguientes: a) Crecimiento a baja  $a_w$ , b) Formación de halos de hidrólisis de caseína y de quitina en caja Petri, c) La evolución del  $CO_2$  en tiempo real como resultado de la utilización de la cutícula del insecto como fuente de C y N. d) Las actividades enzimáticas de los sistemas proteolíticos y quitinolíticos. En este capítulo también se comparan las actividades enzimáticas en cultivo sólido y líquido.

En el capítulo 6 se estudian algunos de los factores ambientales que afectan la expresión y regulación de las enzimas degradadoras de la cutícula como es el pH inicial y la presencia de sacarosa como fuente alterna de carbono. Asimismo se estudia la cinética de las enzimas proteolíticas y quitinolíticas asociadas a la producción de  $CO_2$ . Finalizando con un análisis de imágenes de microscopía electrónica que muestran el crecimiento del hongo sobre la superficie de la cutícula del insecto y la formación del apresorio.

En el capítulo 7 se fijó el número de pasos necesarios para extraer las enzimas. Posteriormente se caracterizó parcialmente a las enzimas por su estabilidad a diferentes temperaturas y valores de pH. Con utilización de la ecuación de Arrhenius se determinó la energía de activación y  $Q_{10}$ . Finalmente, se estableció la vida media de la actividad de las proteasas en tres condiciones de almacenamiento.

---

---

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

---

## CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo se refiere a las características morfológicas del hongo entomopatógeno *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii*, su clasificación taxonómica, sus condiciones generales de cultivo. Así como el mecanismo de patogenicidad que utilizan los hongos entomopatógenos para infectar al insecto blanco, con énfasis en las enzimas degradadoras de la cutícula, principalmente las proteasas y las quitinasas. Posteriormente se hace una revisión de los conceptos y propiedades de la fermentación sólida, así como con los productos que han sido obtenidos por este sistema, destacando la producción de enzimas y biopesticidas.

### 1.1 El hongo entomopatógeno *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii*

Se conocen 750 especies de hongos que infectan a los insectos (Ledezma, 1995) y se han propuesto el uso de estos hongos como agentes biológicos para el control de insectos. Entre los hongos que infectan a los insectos, se pueden mencionar a los Deuteromicetos u hongos imperfectos, caracterizados por la producción de conidias asexuales, la clase esta constituida por 40 géneros, entre ellos tenemos: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium*.

El género *Verticillium* era un grupo taxonómico heterogéneo que estaba clasificado de acuerdo a caracteres no descritos claramente, causando confusión en la identificación de este género, actualmente se ha reclasificado la mayor parte de las especies como género *Lecanicillium*. Originalmente fueron colocados en el género *Cephalosporium*. Pero Balazy (1973), citado por Tanada y Kaya (1993), al estudiar las especies de *Cephalosporium* concluyó que había dos géneros diferentes. A la especie con fíalides verticilados la denominó *Cephalosporium lecanii*, para posteriormente denominarse *Verticillium*, recientemente se ha clasificado como *Lecanicillium*.

La clasificación taxonómica según Roberts (1989) es como sigue:

División: Ascomycota anamastigomycotina

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Deuteromycetes (:Hyphomycetes)

Género: *Lecanicillium* (Verticillium)

Especie: *V. lecanii*

Entre los sinónimos más comunes para esta especie Zare y Gams en el 2001, citan los siguientes:

<i>Cephalosporium lecanii</i>	Zimmerman, 1899
<i>Acrostalagmus coccidicola</i>	Gueguen, 1904
<i>Cephalosporium coccorum</i>	Petch, 1925
<i>Hirsutella confragosa</i>	Mains, 1949

### Descripción morfológica

Al género *Lecanicillium* (Verticillium) se le conoce como el hongo de halo blanco (“White-halo” fungus), debido a la apariencia del micelio. Las colonias de *Lecanicillium* (Verticillium) *lecanii* sobre agar son blancas o de color amarillo pálido, algodonosa-aterciopelada, reverso descolorido, amarillo u ocre. Con hifas vegetativas hialinas de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de ancho y conidióforos erectos, provistos de ramificaciones verticiladas a todo lo largo. Con fiálides relativamente cortas, 11-20(-30) x 1.3-1.8  $\mu\text{m}$  en forma de lanza dispuestos individualmente o en grupos, productoras de conidios aglutinados en cabezas mucilaginosas, cilíndricos o elipsoidales, con sus extremos redondeados de 2.5-3.53(-4.2) x 1-1.5  $\mu\text{m}$  y clamidosporas ausentes (Zare y Gams 2001).

### Cultivo en laboratorio

El hongo *Lecanicillium* (Verticillium) *lecanii* es cultivado en agar dextrosa Sabourad o dextrosa papa que permite un crecimiento micelial y una buena esporulación. La temperatura óptima para el crecimiento micelial y esporulación es de 25-29  $^{\circ}\text{C}$ . Para una buena preservación por largo tiempo es recomendable almacenar los cultivos en soluciones al 30% de glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pueden utilizarse medios que contengan solo quitina como fuente de carbono/nitrógeno. *Lecanicillium* (Verticillium) *lecanii* produce conidios en medio sólido; contrariamente en medio líquido, adopta una morfología de levadura semifilamentosa formando blastosporas, posiblemente como respuesta a la acumulación de  $\text{CO}_2$  (Hall, 1981).

## Efecto de la temperatura y humedad

El hongo es mesófilo, para germinar requiere temperaturas entre los 20 y 25<sup>0</sup>C, el crecimiento óptimo se logra entre 23 y 24<sup>0</sup>C. La germinación y el crecimiento disminuye excesivamente arriba de los 25<sup>0</sup>C y cesa después de los 30<sup>0</sup>C (Hawker, 1950; Cochrane, 1958; citados por Hall, 1981). También, para germinar requiere altas humedades relativas, posiblemente una ligera capa de agua sea suficiente para que se lleve a cabo este proceso. De éste modo la máxima germinación de esporas y por tanto mayores niveles de infección en los insectos, se obtienen con aspersiones sincronizadas de esporas con altas humedades relativas (Hall, 1981).

### 1.2 Bioensayos

Los bioensayos se basan en la habilidad de la espora para germinar y penetrar la cutícula del insecto. Esporas recién cosechadas de placas de agar usualmente tienen una germinación de más del 90 % y conservan esta característica aun después de 17-24 h a 25<sup>0</sup>C. Estas esporas sobreviven por tiempos cortos en soluciones de tween 80. Las esporas pueden ser activadas mojándose en agua por 44 h, germinando mas rápidamente que cuando se emplean esporas secas.

*Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* fue descrito primeramente como un parásito patógeno de la escama *Saissetia* (*Lecanium*) *coffae* por Nietter en 1861 (citado por Gillespie y Claydon, 1989). Es patógeno para áfidos, escamas y mosquita blanca. Así también ha sido utilizado contra plagas en invernaderos por Rombach y Gillespie en 1988 (citados por Gillespie y Claydon, 1989). *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* ha sido producido comercialmente con los nombre de “Vertalec” para el control de áfidos y de “Mycotal” para el control de la mosquita blanca por Koppert B.V. en Holanda de 1982 a 1986 y actualmente ha surgido un renovado interés comercial para utilizarse en el control de plagas.

Recientemente, Puterka y col. (1994), mostraron la virulencia de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* sobre ninfas de *Cacopsylla pyricola* (Homóptera:Psyllidae), con una mortalidad entre 92.5-99.6 %. Steenberg y Humber (1999) mostraron la potencialidad de las

cepas de *L. lecanii* contra larvas de *Bemisia tabaci* y adultos de *Musca domestica* con una mortalidad del 94.1 y 98 %, respectivamente.

### 1.3 Mecanismos de patogenicidad

Existen numerosas ventajas para usar el hongo entomopatógeno *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* como agente de control biológico. La más importante es la habilidad del hongo para infectar y matar el insecto. Las esporas de los hongos son capaces de germinar y penetrar el exoesqueleto del insecto para causarle la muerte (St-Leger, 1993). Otra ventaja es la estabilidad que presentan las esporas frente a otros microorganismos que suelen utilizarse para el biocontrol. Estos elementos y la expresión de las enzimas degradadoras de la cutícula forman parte del mecanismo de patogenicidad de los hongos entomopatógenos

#### 1.3.1 Definiciones importantes

- a) La patogenicidad de un hongo depende de la transmisibilidad o sea la facilidad con la que puede pasar una cantidad o “dosis” efectiva de esporas, desde una fuente hasta un hospedero.
- b) La infectividad se define como la capacidad de un hongo para vencer las defensas del hospedero y establecerse en él.
- c) La virulencia es la capacidad de un hongo para producir daño a un hospedero. La virulencia a su vez está determinada por dos características intrínsecas del microorganismo como son:

*i*) Invasividad, que es la capacidad del hongo para penetrar a diversos tejidos y órganos del hospedero.

*ii*) Toxigenicidad, que es la capacidad del hongo para sintetizar y liberar sustancias genéricamente denominadas toxinas, las cuales dañan a las células del hospedero o neutralizan sus defensas. Es bien conocido que los hongos producen toxinas durante la micosis y que en muchos casos la muerte del insecto hospedero es debido a estas sustancias tóxicas. West y Briggs (1968) crecieron aislados de *B. bassiana in vitro* y después de 12 a 20 días encontraron compuestos que inyectados en larvas *Galleria mellonella* podían causar parálisis o la muerte en 15 s.

Hamil y col. (1969) encontraron un depsipéptido, denominado beauvericina, demostraron que era tóxico contra *Artemia salina*. Describieron la estructura de la beauvericina e indicaron que es tóxica contra bacterias grampositivas, hongos y larvas de mosquitos. Susuki y col. (1977) identificaron la presencia del ciclodepsipéptido bassianolida del micelio de *B. bassiana* y *L. lecanii*. Cuando una larva en el quinto instar del gusano de seda fue alimentada con una dieta artificial conteniendo 13 ppm de bassianolida, la larva del insecto murió. Filtrados de cultivo de *Beauveria sulfurescens* indican que el hongo secreta varios componentes citotóxicos (Mollier y col. 1994) que presentan dos tipos de actividades; una que inhibe el crecimiento y produce la muerte celular y otra con actividad insecticida en larvas de insectos.

### 1.3.2 Patogenicidad y especificidad de hospedero

Investigaciones sobre patogenicidad y especificidad del hospedero han sido relacionadas con el uso potencial de los hongos entomopatógenos para el control de larvas de escarabajos, áfidos, escarabajos de corteza, larvas de mosca, langostas, termitas, insectos chupadores de plantas y larvas de mosquito. Como regla general las cepas más activas son aisladas de los hospederos blancos (Varela y col., 1996).

La infectividad de la clase Deuteromicetos esta basada en la espora. La espora requiere humedad y una fuente exógena de nutrientes para la germinación. La invasión del hospedero es normalmente a través de la cutícula externa especialmente por los intersegmentos (St-Leger y col., 1991). Durante la germinación de las esporas se produce una variedad de proteasas, quitinasas y lipasas, las cuales permiten al túbulo germinal penetrar la cutícula. Los tubos germinativos cuando se encuentran sobre superficies duran producen protuberancias en los tubos germinales llamados apresorios para adherirse al hospedero, de tal forma que crecen sobre la cutícula favoreciendo la invasión del hospedero. El hongo, al invadir el hemocele, prolifera como blastosporas o cuerpos hifales, ellos circulan a través de la hemolinfa del insecto, germinan y forman hifas aéreas que momifica el hospedero.

La causa de la muerte es poco conocida pero se sabe que los hongos toman los nutrientes necesarios para su desarrollo en el hospedero, el hongo produce en el insecto la destrucción de

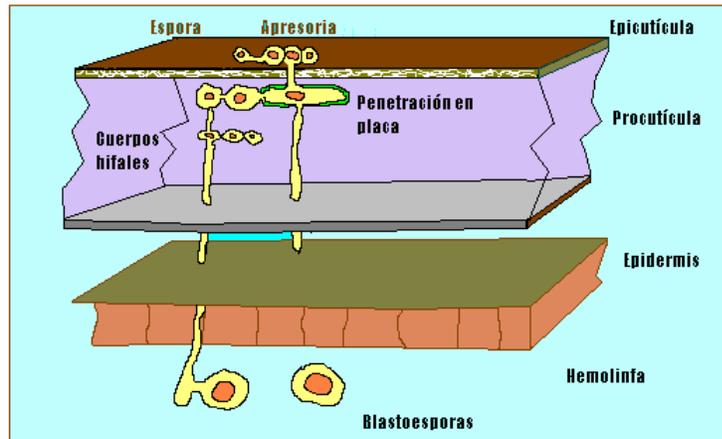
tejidos, la desnutrición y la toxicosis. La presencia de metabolitos tóxicos aceleran la muerte del insecto (St-Leger y col., 1994). Por otra parte, no hay evidencias de que el hongo *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* sea patógeno para reptiles y mamíferos. Eaton y col. (1986) demostraron que la exposición al *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* presenta bajos efectos alérgicos y toxicológicos en personas que manejan el hongo.

### 1.3.3 La ruta o vía de entrada característica

La patogénesis es iniciada con la adhesión de un conidio (espora) en la cutícula del insecto (Figura 1.1). La espora se hincha y secreta un moco adhesivo durante el proceso de la pregerminación, así mismo se presentan interacciones hidrofóbicas entre la espora y la superficie de la cutícula. Una infección puede ser abortada si un factor esencial para la fase de adhesión, desarrollo microbiano o patogénesis esta ausente (St-Leger, 1991). La infección puede evitarse por baja humedad (el hongo requiere humedad para la germinación), por una incapacidad para utilizar los nutrientes disponibles sobre la superficie de la cutícula o la ausencia de factores necesarios para reconocimiento del hospedero susceptible o el sitio de la penetración del tubo germinal.

El reconocimiento de un hospedero susceptible puede incluir señales químicas o topográficas. El efecto de una superficie topográfica sobre la formación de la apresorio fue estudiado usando cutícula de *Manduca sexta*. En los pliegues de la cutícula el apresorio se produce después de ocupar extensamente una zona grande de la larva, los pliegues de la cutícula pueden interferir en la adhesión del hongo al no recibir una señal apropiada de inducción sobre la superficie. En cambio, en superficies planas de la cutícula permite la formación del apresorio (St-Leger y col., 1991).

Para algunos sistemas, la falla del hongo en invadir la cutícula del insecto ha sido atribuida a la presencia de compuestos inhibitorios (fenoles, quinonas y lípidos) sobre la superficie de la cutícula (Smith y Grula, 1981). La penetración de la epicutícula puede llevarse a cabo a través de los pliegues de las capas que forman la cutícula (Pekrul y Grula, 1979).



**Figura. 1.1** Proceso de adhesión, penetración e infección del hongo entomopatógeno sobre la cutícula del insecto.

La epicutícula es una multicapa y cada capa tiene sus propias propiedades. En muchos insectos la epicutícula externa de naturaleza lípica es mecánicamente frágil y sería fácil de penetrar. Su fragilidad sugiere que basta que se rompa físicamente, para permitir el paso de las enzimas degradantes de la cutícula. La epicutícula interna consiste en un conjunto polimerizado de lipoproteínas estabilizado por quinonas. Esta composición es responsable de su dureza, pero las enzimas producidas por los hongos entomopatógenos superan este obstáculo.

Una vez que la epicutícula es penetrada, progresa la infección por dos vías, a través de la hifa o por estructuras que se extienden lateralmente produciendo placas penetrantes. Esta expansión lateral puede causar fracturas que favorecen la penetración y facilita la dispersión de las enzimas degradadoras de la cutícula (Brey y col., 1986).

#### **1.4 Enzimas infectivas extracelulares**

La habilidad de los hongos entomopatógenos para producir enzimas infectivas extracelulares que degraden la cutícula, facilita la penetración del hongo en el hospedero. Análisis químicos y estudios por microscopía indican que estas enzimas están involucradas en el

ataque directo del integumento del insecto. Además, tienen un papel importante en la invasión de la hemolinfa, degeneración de tejidos y en la disminución de la respuesta inmune del hospedero.

#### 1.4.1 Quitinasas

La quitina es un polímero de cadenas ramificadas de  $\beta$ -1,4-*N*-acetilglucosamina que es abundante en la naturaleza, se encuentra tanto en microorganismos como en artrópodos y crustáceos. En muchos casos la quitina es modificada para formar enlaces con otros polímeros como glucanos y proteínas (Deshpande, M.V. 1986). La actividad de las enzimas quitinolíticas facilita la penetración de los hongos entomopatógenos a través de la cutícula de los insectos, al ser un componente estructural del exoesqueleto de los insectos.

Diferentes organismos producen una amplia variedad de enzimas hidrolíticas que son específicas de acuerdo a sus propiedades funcionales y su afinidad al sustrato. En bacterias, las quitinasas tienen un papel importante en la nutrición y en el parasitismo, mientras que en los hongos, protozoarios e invertebrados están involucrados en la morfogénesis. Las quitinasas son empleadas en los mecanismos de defensa de plantas y vertebrados. Los baculovirus producen quitinasas como mecanismo patogénico, por lo cual se han utilizado para el control biológico de plagas (Gooday G.W. 1995).

La hidrólisis enzimática de la quitina hasta la obtención de monómeros de *N*-acetilglucosamina es realizada por un sistema quitinolítico, la acción ha sido propuesta que sería sinérgica y consecutiva (Deshpande, M.V. 1986, Shaikh y Deshpande, 1993). Algunos autores han sugerido que la síntesis de las enzimas quitinolíticas es posterior a la producción de las proteasas (St-Leger y col. 1996a), ya que la quitina está eventualmente disponible después de la degradación de las proteínas de la cutícula.

La síntesis de quitinasas es producida por un mecanismo inductor-represor, los inductores más efectivos de las enzimas son los polímeros de *N*-acetilglucosamina. Las actividades enzimáticas más altas se obtienen en un medio conteniendo quitina (St-Leger y col. 1986), la adición de carbohidratos, lípidos y proteínas reprimen la producción de la quitinasa. El peso

molecular de la endoquitinasa fue estimado en 45,000 D por electroforesis en gel de poliacrilamida sodiododecilsulfato SDS-PAGE (Havukkala y col. 1993).

St-Leger y col. (1996a) demostraron que los hongos entomopatógenos producen una mezcla compleja de enzimas quitinolíticas durante su crecimiento sobre cutícula de insecto. La principal endoquitinasa de *M. anisopliae* es secretada dentro de la cutícula del insecto y esta probablemente asociada a la modificación de la procutícula mientras esa barrera es abierta. Al igual que en el caso de las proteasas, existen distintos sitios de genes que codifican para distintos sistemas de quitinasas en este hongo entomopatógeno (St-Leger y col. 1992).

### **Nomenclatura y clasificación de las quitinasas**

La nomenclatura de las enzimas quitinolíticas ha sido confusa. En un principio dos enzimas quitinolíticas fueron reconocidas, que corresponden a la quitinasa y la N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa. La quitinasa corta polímeros de una forma azarosa, mientras que la enzima N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa hidroliza residuos de N-acetil- $\beta$ -glucosamina de las terminales no reducidas de quitobiosa y análogos superiores. Además, la palabra quitinasa podría ser usada para referir a alguna enzima con actividad quitinolítica o referirse solamente a endoquitinasas. Quitobiosidasa también es usado aunque este término es considerado sinónimo de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa

La Tabla 1.1 muestra la clasificación y nomenclatura recomendada por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) de acuerdo a sus mecanismos de acción. En 1978, el comité de nomenclatura retiró la quitobiosa y la incluyó junto con  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.30). Los métodos disponibles para estimar la actividad de N-acetil-glucosaminidasa son limitados debido a la carencia de sustratos adecuados.

Tabla 1.1 Nomenclatura de las enzimas quitinolíticas

Modo de acción	Enzimas quitinolíticas	Clasificación EC
Hidrólisis al azar de la cadena	Quitinasa 1,4- $\beta$ -poli- <i>N</i> -acetilglucosaminidasa	(EC 3.2.1.14)
Hidrólisis del azúcar no reducido terminal L	<sup>a</sup> Anteriormente clasificada como Quitobiosa <sup>b</sup> Posteriormente como $\beta$ - <i>N</i> -Acetilglucosaminidasa	(EC 3.2.1.29); (EC 3.21.30)
Remoción de un monosacárido del extremo no reducido	<sup>c</sup> Clasificación actual $\beta$ - <i>N</i> -Acetilhexosaminidasa	(EC 3.21.52)
Remoción de un disacárido del extremo no reducido	Quitobiohidrolasa (?)	(?)

<sup>a</sup>Recomendación del Comité de Nomenclatura de la IUBMB, 1961 Quitobiosa (Quitobiosa acetilaminadesoxiglucohidrolasa, EC 3.2.1.29)

<sup>b</sup>Recomendación del Comité de Nomenclatura de la IUBMB, 1978 La EC 3.2.1.29 se eliminó y la enzima quitobiosa fue incluida con  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa

<sup>c</sup>Recomendación del Comité de Nomenclatura de la IUBMB, 1992 La EC 3.2.1.30 se eliminó y la enzima  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa fue incluida con  $\beta$ -*N*-acetilhexosaminidasa ( $\beta$ -*N*-D-hexosaminidasa *N*-acetilhexosaaminohidrolasa, EC 3.2.1.52)

Tomado de Patil y col. (2000)

### Clasificación de quitinasas basada en las secuencia de aminoácidos

La clasificación IUB no permite entender las relaciones evolutivas que existe entre las enzimas. Henrissat (1991) hizo una clasificación basada en las secuencias de aminoácidos de las glicosil hidrolasas, él agrupó las quitinasas y *N*-acetilhexosaminidasas en tres familias 18, 19 y 20. Las familias 18 y 19 se refieren a endoquitinasas de diferentes fuentes tales como virus, bacterias, hongos, insectos y plantas. La familia 19 comprende principalmente quitinasas de origen vegetal. Las enzimas *N*-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.30) de *Vibrio harveyi*, la *N*-acetilhexosaminidasa (EC 3.2.1.52) humana y de *Dictyostelium discoideum* son agrupadas en la familia 20. En 1993, Henrissat y Bairoch (1993) estudiaron secuencias adicionales e incluyeron enzimas como endo-*N*-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.96) de especies de *Flavobacterium* en la familia 18.

Con la ayuda de secuencias conocidas de genes de quitinasas, Perrakis y col. (1993) las agruparon en Clases I y II que corresponden a las familias 19 y 18 de las glicosil hidrolasas,

respectivamente. Las plantas producen un gran número de isoenzimas de quitinasas, como una respuesta defensiva contra patógenos.

### **Mecanismo catalítico y la estructura molecular**

Se han encontrado dificultades para establecer directamente por cristalografía de rayos X el modo en que se une el polímero con la enzima debido a la rápida hidrólisis del sustrato (Knowles y col. 1987). Blaak y col. (1993) llevaron a cabo un análisis de las quitinasas de bacterias, hongos y plantas para identificar los dominios. Se ha reportado que las quitinasas de plantas como el tabaco, frijol, remolacha, etc. consisten en un solo dominio catalítico. Kuranda y Robbins (1991) han sugerido que una quitinasa extracelular de levadura contiene cuatro dominios, denominados: 1) secuencia señal, 2) dominio catalítico, 3) una región rica en serina/treonina y 4) un dominio C-terminal que se une a la quitina. La región serina/treonina funciona como sitio aceptor para la O-glicosilación. Las quitinasas de otros dos hongos, *Rhizopus oligosporus*, *R. niveus* y de un parásito *Brugia malayi* muestran la presencia de una región rica en serina/treonina. Watanabe y col. (1993) han reportado seis diferentes quitinasas (A1, A2, B1, B2, C y D) que son secretadas al medio por *B. circulans*. De éstas, la quitinasa A1 fue la más abundantemente producida y muestra una fuerte afinidad a la quitina insoluble, en su estudio se constató que el dominio C-terminal era el dominio de unión con la quitina y el dominio N-terminal contenía el sitio catalítico de la enzima. El tercer dominio era del tipo III de fibronectina. La delección de este dominio disminuye la actividad quitinolítica sobre quitina insoluble.

### **Aplicaciones de las quitinasas en el biocontrol**

En muchas especies de plantas, la invasión de patógenos induce la producción de quitinasas, glucanasas, proteinasas, inhibidores de proteasas, etc. Como los insectos y hongos patógenos contienen quitina, la inducción de quitinasas en plantas es la principal respuesta defensiva. Hadwiger y Beckman (1980) demostraron que extractos de endocarpio de chícharo contienen actividad de quitinasa y quitobiosa.

Varias especies de hongos son agentes potenciales de control de hongos e insectos patógenos de las plantas. Hongos micoparasitarios y entomopatógenos producen quitinasas para invadir y matar a sus hospederos (Mathivanan y col. 1998; Kang y col. 1998). Los controles de plagas tales como coleópteros y áfidos, el tratamiento enzimático antes o simultáneamente junto con el hongo entomopatógeno, ha sido utilizado constantemente (Higuchi y col. 1998). Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* y *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* producen enzimas que degradan la cutícula cuando crecen sobre quitina. El pretratamiento de los insectos con la solución enzimática se ha reportado que sería útil.

#### 1.4.2 Proteasas

El rompimiento proteolítico de los enlaces peptídicos es uno de las mas frecuentes e importantes modificaciones enzimáticas de las proteínas. Los estudios de la proteólisis enzimática ha sido asociada a la digestión de proteínas. Recientemente la atención se ha enfocado al papel regulatorio que juegan en una gran variedad de procesos fisiológicos (Walsh y Wilcox, 1970).

Las proteasas se han clasificado en base a una comparación de los sitios activos, mecanismos de acción y estructura tridimensional (Neurath, 1989). Se han reconocido cuatro clases (mostradas por el primer número) y dentro de estas clases, seis familias han sido establecidas. Cada familia tiene un conjunto de residuos de aminoácidos funcionales arreglados en una particular configuración para formar el sitio activo (Tabla 1.2). Los miembros de cada familia se cree que descienden de un ancestro común por evolución divergente.

Las proteasas del tipo serina incluyen dos distintas familias: Las serina-proteasas de mamíferos y las serina-proteasas de bacterias, ellas difieren en su secuencia de aminoácidos y en la estructura tridimensional. A pesar de tener una geometría en el sitio activo y mecanismo enzimático común. Las diferencias en la especificidad del sustrato puede estar relacionado a los aminoácidos sustituidos en el sitio primario de unión, comúnmente denominado  $P_1$  y en diferencias menores en los sitios secundarios de unión (Neurath, 1989).

Tabla 1.2 Familias de enzimas proteolíticas<sup>a</sup>

Familia	Proteasas representativas	Nomenclatura EC	Sitio activo <sup>b</sup>
1.1 Proteasa del tipo serina I	<b>Quimiotripsina</b> Tripsina Elastasa Kalikreina pancreática	3.4.21.53	Asp <sup>102</sup> , Ser <sup>195</sup> , His <sup>57</sup>
1.2 Proteasa del tipo serina II	<b>Subtilisina</b>	3.4.21.62	Asp <sup>32</sup> , Ser <sup>221</sup> , His <sup>64</sup>
2.1 Proteasas del tipo cisteína	<b>Papaina</b> Actinidina Catepsinas B y H de hígado de rata	3.4.22.2	Cis <sup>25</sup> , His <sup>159</sup> , Asp <sup>158</sup>
3.1 Proteasas del tipo aspártico	<b>Penicilopepsina</b>	3.4.23.20	Asp <sup>33</sup> , Asp <sup>213</sup>
4.1 Metallo-proteasas I	<b>Carboxipeptidasa A de bovino</b>	3.4.17.1	Zn, Glu <sup>270</sup> , Trp <sup>248</sup>
4.2 Metallo-proteasas II	<b>Termolisina</b>	3.4.17.19	Zn, Glu <sup>143</sup> , His <sup>231</sup>

<sup>a</sup> Esta tabla incluye solamente enzimas con secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional conocida.

<sup>b</sup> El número del residuo corresponde a la secuencia de aminoácidos de las enzimas enlistadas en negritas.

Tomado de Neurath (1989)

El integumento externo de los insectos, constituido por proteínas es una barrera efectiva contra muchos microbios. Solamente 700 especies conocidas de hongos entomopatógenos tienen la capacidad de penetrar los hospederos perforando la cutícula. La alta producción de proteasas durante el proceso infeccioso tiene un atractivo interés de estudio. La función principal de estas enzimas es la degradación de la barrera cuticular (St-Leger y col., 1987a). Adicionalmente, otra posible función de las enzimas es el metabolizar las proteínas del hospedero para su nutrición (St-Leger y col., 1988). Finalmente, las enzimas son utilizadas para la destrucción de proteínas antimicóticas del hospedero y la liberación de aminoácidos para la producción de aminas que permitan elevar el pH (St-Leger y col., 1988). Otros efectos pueden ser indirectos, por ejemplo, la activación proteolítica de precursores de las toxinas.

La serina-proteinasa del tipo subtilisina (denominada Pr1) es producida por varias especies de deuteromicetos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii*, *Nomuraea rileyi* y *Aschersonia aleyrodis* (St-Leger y col., 1987c). La Pr1 proporciona el modelo mejor conocido para el estudio de la patogenicidad de los hongos entomopatógenos (St-Leger y col., 1992). La proteinasa Pr1 de *Metarhizium anisopliae*

ha sido ampliamente estudiada para delucidar como ocurre la degradación de la cutícula de forma natural (St-Leger y col. 1996b).

La proteinasa Pr1 tiene actividad enzimática contra sustratos peptídicos de la quimiotripsina y de la elastasa. Esto sugiere que tiene actividad de quimioelastasa (St-Leger y col., 1987c). Así mismo, el enlace esencial de Pr1 de *M. anisopliae* a los grupos cargados negativamente de la cutícula es marcada por la naturaleza básica de la proteasa. Sin embargo, la cutícula también es susceptible a enzimas Pr1 de naturaleza ácida, sugiriendo que las proteasas básicas y ácidas se unen a diferentes regiones de la cutícula, la cual posee una distribución no-uniforme de cargas.

La proteasa Pr1 de *M. anisopliae* presenta cuatro isoformas con valores de *pI* que varían de 9.3 a 10.2. Las isoformas de Pr1 muestran similar especificidad primaria ( $P_1$ ) con el aminoácido aromático fenilalanina. Las isoformas son igualmente efectivas para degradar una mezcla heterogénea de proteínas de cutícula de insecto, sugiriendo que tienen un potencial para la degradación de proteínas no específicas.

En *M. anisopliae* se han distinguido dos principales serina-proteinasas con actividad de tripsina y una de menor actividad. La síntesis de esta proteasa es inducida al crecer el hongo en cutícula de insecto o en BSA. (St-Leger y col. 1988). La proteasa Pr2 (serina-proteinasa del tipo tripsina) es inducida por cualquier proteína cuando el hongo crece en un medio sin nitrógeno, pero esta enzima no es inducida si el medio es escaso en carbono o azufre (Paterson y col., 1993).

La Pr2 presentan varias isoformas, éstas muestran similar preferencia por romper grupos carboxilo de aminoácidos cargados positivamente, preferentemente la arginina es el sitio específico  $P_1$ . Las isoformas Pr2 muestran baja actividad contra proteínas insolubles de la cutícula. Las isoformas de Pr2 son secretadas por dos estructuras infecciosas, por el apresorio sobre la cutícula y por la hifa dentro de la cutícula (St-Leger y col., 1996b).

St-Leger y col. (1994) evidenciaron que hay una familia de genes que codifican para la síntesis de proteasas degradadoras de la cutícula de *M. anisopliae*. Además, identificaron otra

proteínasa de la clase metalo-proteínasa II, inhibida por fosforamidón (*N*-( $\alpha$ -L-ramnopiranosilhidroxifosfinil)-L-leucil-L-triptofano). Indicando que es del tipo termolisina.

### 1.4.3 Lipasas

Es escasa la información sobre las lipasas, solo St-Leger y col. (1987b) detectaron actividad de lipasa/esterasa en esporas, en la cutícula del hospedero y durante todas las etapas de germinación, altos niveles de actividad enzimática están asociados con la formación del apresorio. Existen dificultades para extraer una verdadera lipasa de la cutícula infectada, por lo que es difícil su estudio y no hay distinción entre las lipasas y estererasas.

### 1.5 Crecimiento a baja $a_w$

El crecimiento a baja  $a_w$  es importante para los hongos entomopatógenos, como una característica importante en su virulencia. Matewele y col. (1994) desarrollaron un método para aislar mutantes de *M. anisopliae* y *Paecilomyces farinosus* capaces de germinar y crecer a bajas actividades de agua ( $a_w$ ) y humedades relativas, condiciones en que no se desarrollan las cepas silvestres. La producción de blastosporas en cultivos con baja actividad de agua ( $a_w = 0.969$ ) incrementan la habilidad de estos mutantes para germinar a bajos valores de  $a_w$ . Bajo una humedad relativa de 96-98 %, algunos mutantes son más virulentos contra saltamontes que las cepas silvestres. Demostraron también que existe una correlación entre el crecimiento de los hongos a bajas actividades de agua con el incremento de la concentración endógena de glicerol. Por lo cual han sugerido que los polioles son importantes para permitir su desarrollo en microambientes con baja  $a_w$ .

### 1.6 Fermentación en medio sólido (FMS)

La fermentación sólida ha sido utilizada desde hace 1000 años a.c., pero en los últimos 30 años se ha vuelto a tomar interés, por su potencialidad para desarrollar una amplia variedad de productos y de procesos (Pandey y col., 2000), pero su producción a escala industrial ha sido reducida en occidente. Esto puede atribuirse a la complejidad que presenta el sistema; las

limitaciones en los fenómenos de transferencia a nivel macro y micro que apenas han empezado a ser estudiados.

Los procesos fermentativos se dividen en dos tipos: fermentación sumergida o líquida (FL) y en medio sólido (FMS). La principal diferencia entre ambos sistemas es la presencia de agua libre. Por tanto la fermentación sólida se define como el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas humedecidas, que pueden ser utilizados como sustrato o como soporte, en ausencia o casi ausencia de agua libre entre las partículas. El contenido de agua de las partículas sólidas humedecidas se encuentra entre 12 y 80 % del peso. Este porcentaje depende de la absorción del material sólido, entre los sustratos que se utilizan se pueden emplear desechos agroindustriales como bagazo de caña, virutas de madera y harina (Pandey, 1994). También se pueden emplear soportes inertes como amberlita y poliuretano. El cultivo sólido se ha utilizado para hongos filamentosos, debido a que sus características fisiológicas facilitan su crecimiento.

Otros términos que ha recibido la fermentación en medio sólido son cultivo en estado sólido, fermentación en fase sólida, fermentación en estado sólido, fermentación en sustrato sólido y fermentación en sólidos humedecidos.

### **1.6.1 Características de la FMS**

Entre las características más relevantes que tiene la FMS es el ser un tipo de sistema que presenta: baja actividad de agua de los medios de cultivo, altas concentraciones de sustratos y productos que puede tolerar el microorganismo y una gran heterogeneidad del sistema (Mitchell y Lonsane, 1992). La actividad de agua de los sustratos puede ser menor a 0.99 lo cual favorece el crecimiento de hongos filamentosos capaces de tolerar valores de hasta 0.93. Siendo apropiado este tipo de cultivo para evitar contaminación de bacterias y levaduras que requieren actividades de agua superiores a 0.99.

Los sustratos están más concentrados en la FMS que en la FL. En la última el agua representa del 90 al 99 % de la masa total, mientras que en FMS toma valores del 40 al 85 %. Esto permite que la concentración de sustratos solubles en agua y de productos alcance niveles

que pueden ser inhibitorios en el otro tipo de cultivo (FL). Los sustratos utilizados son en general materiales heterogéneos y complejos que son humedecidos con el medio de cultivo, aunque con frecuencia requieren algún pretratamiento. Este tipo de materiales produce un ambiente muy heterogéneo con espacios entre partículas que permiten el paso de una fase gaseosa continua, restringiendo el crecimiento a la superficie provocando en consecuencia una serie de gradientes de sustratos, productos y pH dentro de las partículas sólidas.

### **Procesos de FMS**

Los procesos que se llevan a cabo en la FMS presentan las mismas etapas que están involucradas en la fermentación sumergida, éstos son los procesos anteriores a la fermentación que consisten en el procesamiento del sustrato e inóculo, la fermentación en sí misma y los procesamientos de los productos de la fermentación y la eliminación de desechos. Aunque existen diferencias en algunos pasos que se llevan a cabo, un proceso típico de la FMS se muestra como sigue, de acuerdo con Mitchell y col. (2000):

1. El sustrato es generalmente de origen agroindustrial y podrían ser granos tales como el arroz, tubérculos tales como la yuca, materiales procesados como las harinas o subproductos o desechos tales como la paja. La fuente de carbono es usualmente una macromolécula, como pueden ser almidón o celulosa, aunque algunos sustratos sólidos contienen cantidades significativas de azúcares solubles.
2. El sustrato requerirá una preparación o pretratamiento tal como cortar o moler para reducir el tamaño de partícula, para hacer mas accesible el interior de las partículas, hidrólisis química para incrementar la susceptibilidad de las macromoléculas para la degradación por las enzimas microbianas durante la fermentación; y la esterilización o pasteurización para eliminar o reducir contaminantes presentes en el sustrato.
3. El microorganismo es usualmente un hongo filamentoso, que requiere condiciones aeróbicas para el crecimiento y formación del producto. Inóculos de esporas son comúnmente utilizados debido a que son fáciles de preparar y son razonablemente estables. Varios pasos de subcultivos serían requeridos para obtener una cantidad suficiente de inóculo.
4. El inóculo es mezclado dentro del sustrato para iniciar la fermentación.

5. El bioreactor puede permitir o no el mezclado y la aireación. Si el aire es adicionado es necesario que sea pretratado antes de entrar al reactor para controlar la temperatura y la humedad relativa, y tratado al salir del bioreactor para evitar una indiscriminada difusión del proceso biológico hacia el medio ambiente. Uno de los principales desafíos en la operación del bioreactor es evitar indeseables aumentos de la temperatura en el lecho del sustrato fermentado debido a la producción del calor metabólico del microorganismo.
6. Al término del proceso el sustrato fermentado puede ser el producto en caso de ser un alimento, pero otros productos podrían ser extraídos y recuperados en los procesos posteriores a la fermentación. Después de la recuperación del producto por lixiviación, los desechos sólidos serían desechados.

### **Fenómenos de transporte que se presentan dentro de los bioreactores de FMS**

Los procesos en microescala que se presentan en el cultivo sólido son característicos de este sistema, debido a la naturaleza particular del sustrato. Esto ocurre en todos los bioreactores y poco se ha hecho respecto a la influencia que tienen los fenómenos a microescala sobre el diseño de los bioreactores. El diseño del bioreactor y las estrategias operacionales básicamente se han basado en el intercambio de gases entre la partícula y la fase gaseosa, para asegurar que el proceso de transporte de gases no sea la limitante. Sin embargo, los procesos que se presentan entre partículas pueden ser influenciados por la forma en que el sustrato es preparado. El tamaño de la partícula puede favorecer los procesos de transferencia (Pandey, 1991). A pesar de ser limitada nuestra capacidad para influir en estos procesos a microescala, es importante comprender su influencia sobre el sistema. El entender como y cuando los procesos a microescala pueden controlar los procesos de ejecución evitaría estériles intentos para mejorar desempeño por manipulación de las variables operacionales del bioreactor.

#### **1.6.2 Productos obtenidos en FMS**

En las últimas décadas se ha utilizado la FMS para la producción de varios productos biológicos tales como enzimas, ácidos orgánicos, etanol, etc. La Tabla 1.3 muestra algunos de los productos y procesos de fermentación en medio sólido.

Tabla 1.3 Productos o procesos recientes obtenidos por FMS

Producto o proceso	Organismo	Sustrato	Referencias
Enzimas			
Glucoamilasa	<i>Aspergillus niger</i>	Desechos de Té	Selvakumar y col. (1998)
Lipasa	<i>Penicillium restrictum</i>	Desechos de aceite de babassu	Gombert y col. (1999)
$\alpha$ -Galactosidasa	<i>Humicola sp.</i>	Harina de Soya + salvado de trigo	Kotwal y col. (1998)
Celulasas	<i>Bacillus subtilis</i>	Desechos del tallo de plátano	Krishna (1999)
Pectinasas	<i>Aspergillus niger</i>	Salvado de soya y de trigo	Castilho y col. (2000)
Xilanasas	<i>Bacillus sp</i>	Salvado de trigo	Gessesse y Mamo (1999)
Enzimas lignolíticas	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Mazorca de maíz	Couto y col. (1999)
Biopesticidas			
Bioherbicida	<i>Trichoderma virens</i>	Composta de estiércol de pollo	Hutchinson (1999)
Bioinsecticida	<i>Coniothyrium minitans</i>	Cáñamo impregnado	Weber y col. (1999)
Bioremediación	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Bagazo de caña	Rodríguez-Vázquez y col. (1999)
Bioremediación	Varios	Turba+ orgánicos volatiles	Wu y col. (1998)
Biofiltro			
Alimentación			
Alimento fermentado	<i>Aspergillus oryzae</i>	Cáscara de frutas	Sardjono y col. (1998)
Remoción de cafeína	<i>Aspergillus tamarii</i>	Bagazo de caña	Hakil y col. (1999)
Deslignificación	<i>White rot fungi</i>	Paja de trigo	Dorado y col. (1999)
Remoción de ácido pítico	<i>Lentinula edodes</i>	Salvado de trigo	DiLena y col. (1997)
Aromas			
Compuestos aromáticos	<i>Bjerkandera adusta</i>	Salvado de trigo	Lapadatescu y Bonnarme (1999)
Pirazinas	<i>Bacillus subtilis</i>	Semillas de soya	Larroche y col. (1999)
Ácidos orgánicos			
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Vaina de algarroba	Roukas (1999)
Aminoácidos	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Cáscara de semilla	Bau y col. (1994)
Antibióticos			
Tetraciclina	<i>Streptomyces iridifaciensis</i>	Residuo de papa	Mial (1975)
Moléculas orgánicas			
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sorgo o papa	Sree y col. (1999)
Metano	<i>Consortio natural</i>	Basura sólida municipal	Rodríguez-Iglesias y col. (1998)
Polímeros			
Goma Xantana	<i>Xanthomonas campestris</i>	Semillas de malta impregnados	Stredansky y col. (1999)

Tomado de Mitchell y col. 2000.

## Producción de enzimas por FMS

La FMS presenta un enorme potencial para la producción de enzimas (Pandey y col., 1999), y puede tener un especial interés en aquellos procesos donde el extracto enzimático crudo sería usado directamente como fuente de enzimas. En procesos aplicados a la industria alimentaria y fermentativa, las enzimas microbianas tienen un papel importante en biotransformaciones. Sin embargo, la selección de una cepa adecuada, los costos de producción y el proceso de escalamiento debe tomarse en cuenta para seleccionar el tipo de cultivo.

## Producción de bioinsecticidas

Para la agricultura se han diseñado bioinsecticidas que sean compatibles con el medio ambiente. El uso de hongos entomopatógenos y micoparasitarios para el control biológico de plagas ha recibido un incrementado su atención. Se cree que tanto las células como sus componentes biológicos activos son igualmente efectivos. Deshpande (1999) revisó la producción de bioinsecticidas por FMS y FL.

La identificación de una cepa con actividad de pesticida es el primer paso en el desarrollo de propágulos infectivos como conidios y blastosporas. Es importante entender los aspectos moleculares de la interacción hongo-insecto o de hongo-hongo, el papel de las enzimas hidrolíticas, especialmente las quitinasas en el proceso infectivo y el posible uso de inhibidores de las síntesis de quitina que serían las áreas primordiales de investigación para producir hongos más infectivos. Se han hecho varios intentos para producir hongos entomopatógenos en FMS. Soccol y col. (1997) desarrollaron un proceso de FMS basado en la producción de esporas de *Beauveria bassiana* utilizando como sustratos desechos agroindustriales para el control biológico de plagas del plátano, azúcar de caña, soya y café. Desgranges y col. (1993) también usaron la FMS para producir *B. Bassiana* para emplearse en contra de barrenador del maíz. Utilizaron microgránulos de arcilla humedecidos con un medio óptimo de nutrientes. El bioinsecticida fue producido en un reactor piloto de 1600 l de capacidad. El bioproducto mostró una eficiencia de campo del 80 %. *Colletotrichum truncatum* es otro patógeno de plantas que puede utilizarse como bioherbicida contra la difícil maleza *Sesbania exaltata*. Lopez-Llorca y Carbonell (1998)

produjeron esporas de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* utilizando como sustrato mesocarpio de almendra alcanzando una producción de  $5.3 \times 10^7$  conidias  $g^{-1}$ . Recientemente de Vrije y col. (2001) han producido esporas de *Coniothyrium minitans* en FMS como fungicida contra el fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* y ya se encuentra en la etapa de aplicación y comercialización.

Algunas de las ventajas que ofrece la fermentación sólida es que los productos obtenidos son superiores a los producidos en fermentación sumergida. Por ejemplo las enzimas producidas por FS son mas termoestables que en FL (Pandey y col., 1999). En el caso de la producción de esporas fúngicas en bioinsecticidas, la esporulación es mayor en las obtenidas por FS (Dorta y Arcas, 1998). En otros casos, los sustratos utilizados son de bajo costo o de desechos agroindustriales y esto es apropiado para países en desarrollo con baja tecnología y mano de obra barata.

### **Estimación de biomasa**

La producción de biomasa es de crucial importancia en los procesos de FMS, aún si la biomasa no es propiamente el producto final. Los procesos de consumo de nutrientes, consumo de oxígeno, evolución de  $CO_2$ , liberación del calor metabólico y la formación del producto están íntimamente relacionados con los procesos de crecimiento y por lo tanto son esenciales para caracterizar la evolución del cultivo. Desafortunadamente las mediciones de biomasa en línea son todavía difíciles de determinar, a pesar de esto se ha desarrollado procesos de monitoreo de  $CO_2$  y de  $O_2$  en los gases de salida, que puede proporcionarnos una adecuada información sobre el estado fisiológico del cultivo en fermentación sólida (Saucedo-Castañeda y col. 1992). Se estimó una tasa respiratoria ( $\mu_r$ ) que permite determinar indirectamente el crecimiento, especialmente si el coeficiente de mantenimiento es mucho menor que la velocidad de crecimiento. El monitoreo de  $CO_2$  es útil para relacionarlo con las actividades enzimáticas producidas por los hongos entomopatógenos durante su crecimiento sobre la cutícula del insecto.

Desgranges y col. (1991a) al estudiar el crecimiento de *Beauveria bassiana* en fermentación en estado sólido, evaluaron tres constituyentes de la biomasa tales como la

glucosamina, azúcares totales y ergosterol. Encontrando que la glucosamina podía ser considerado como un buen indicador de biomasa, con la condición de que el medio tuviera los mismos constituyentes pero no necesariamente la misma proporción de C/N. El ergosterol varía durante las diferentes fases del crecimiento, pero para un proceso determinado podía ser un buen indicador de la esporulación. Posteriormente, Desgranges y col. (1991b) emplearon dos métodos para medir la biomasa en línea. En el primer método utilizaron el infrarrojo para estimar los componentes celulares (glucosamina y ergosterol) y los residuos del medio (sacarosa y nitrógeno) directamente del medio sólido. Y el segundo con la medición de la tasa de formación de CO<sub>2</sub> durante el cultivo. La correlación obtenida entre la concentración de CO<sub>2</sub> y la medición de glucosamina fue satisfactoria. Dubey y col., (1998) desarrollaron un método novedoso que se basa en una reacción de ELISA para determinar el crecimiento de *A. niger* en un cultivo sólido, este método permitió estimar la biomasa del hongo con una sensibilidad de 1.5 a 12 µg de biomasa.

Para los bio-reactores de cultivos sólidos la simplificación del modelo es común al usar ecuaciones empíricas que no dependen de las concentraciones de los nutrientes, ni del oxígeno.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (1.1)$$

Estas aproximaciones empíricas están basadas en la ecuación logística (1.1), la cual describe los perfiles de biomasa que se originan en muchos sistemas de FMS, con los periodos de aceleración y desaceleración del crecimiento. La desaceleración del crecimiento cuando X se aproxima a X<sub>max</sub> podría ser debido a las limitaciones de nutrientes, acumulación de productos inhibitorios al crecimiento o por las máximas densidades de empaquetamiento basada en las limitaciones estéricas (Laukevics y col. 1985). Aunque en la práctica el valor de X<sub>max</sub> es simplemente tomado directamente de los perfiles experimentales de biomasa. Cabe señalar que µ<sub>max</sub> es además determinado empíricamente. Sin embargo, con la suposición de que cada bifurcación de las hifas del hongo dan una idéntica hifa hija la cual se prolonga a la misma tasa como la hifa madre, estos parámetros macroscópicos pueden ser relacionados con los parámetros

microscópicos tales como las frecuencias de ramificación de las hifas y las tasas de extensión de las hifas.

Sin embargo sus desventajas serían que el modelo falla para describir datos bajo diferentes condiciones de cultivo donde el factor limitante del crecimiento sería diferente. Además, los valores de los parámetros cinéticos obtenidos no tienen significado biológico, aunque serían útiles para comparar valores (por ejemplo  $\mu_{\max}$  o  $X_{\max}$  en la ecuación logística) para diferentes fermentaciones.

Armes y col. (1996) modelaron la producción de  $\alpha$ -amilasa y proteasas de *Bacillus licheniformis* en un sistema de FMS. Mostraron que los perfiles de producción de las dos enzimas podrían ser descritos por la ecuación logística. Hakil y col. (1999) determinaron los parámetros cinéticos de *Aspergillus tamarii* en la degradación de la cafeína en cultivo sólido utilizando la ecuación logística. También utilizaron la ecuación logística Mitchell y von Meien (2000) al desarrollar un modelo matemático para la operación del bio-reactor Zymotis. Diversas aproximaciones han sido llevadas a cabo para modelar la producción de un metabolito, enzimas extracelulares y metabolitos secundarios (Mitchell y col. 2000). Además, los valores de los parámetros cinéticos obtenidos no tienen significado biológico, aunque serían útiles para comparar valores (por ejemplo  $\mu_{\max}$  o  $X_{\max}$  en la ecuación logística) para diferentes fermentaciones. El método de Gompertz no se ha aplicado en sistemas de cultivo sólido, sin embargo ha descrito curvas de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* con un mejor ajuste que la ecuación logística (Zwietering y col., 1990)

---

---

JUSTIFICACIÓN

---

---

## CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN

El aumento poblacional exige un incremento de la producción de alimentos para satisfacer sus requerimientos nutricionales. Esta demanda obliga a desarrollar y mejorar los sistemas agrícolas, con una mayor resistencia a los cambios climáticos y al control de plagas. En un principio, el control de plagas se llevó a cabo con la utilización de insecticidas químicos, que tuvieron su auge a partir del descubrimiento del DDT, al cual se le debe el control del paludismo en la India. Pero a partir de 1947, disminuyó la eficiencia de los tratamientos ya que aparecieron los primeros fenómenos de resistencia en los insectos (Poirié y Pasteur, 1991).

Los fenómenos de resistencia fueron subestimados durante mucho tiempo ya que el número de productos potencialmente disponibles parecía ilimitado y los primeros insecticidas eran muy baratos. Aumentar la dosis y la frecuencia de los tratamientos para hacer frente a la resistencia de los insectos fue la tónica a seguir, en una época que no existía preocupación sobre los problemas medioambientales. De esta forma, la resistencia a toda una gama de insecticidas se presentó en muchas especies de insectos y ácaros. La FAO ha contabilizado más de quinientas especies de artrópodos que presentan resistencias a diversos productos.

Recientemente, el combate a las plagas se ha orientado hacia un estricto manejo ecológico, que implica el conocimiento de los aspectos biológicos, físicos y químicos involucrados. En esta nueva práctica están integrados los organismos y productos para el control biológico, las plantas resistentes y los pesticidas químicos de espectro reducido (Lorence, 1996).

La selección del bioinsecticida depende de diversos factores como: su producción, sus mecanismos de acción, aspectos económicos y su forma de aplicación (Bouguerra, 1990). Es deseable que en la producción del bioinsecticida se utilicen sustratos baratos, se cuente con una tecnología sencilla y de alta productividad. Debido a que la producción de baculovirus queda restringida por su tecnología especializada. La producción de hongos resulta ser la mas adecuada.

En el caso de los hongos entomopatógenos su crecimiento se ha realizado por cultivo sólido, empleando sustratos baratos como los desechos agroindustriales (Hussey, N.W. y Tinsley, T.W., 1981).

Los hongos entomopatógenos son utilizados debido a su capacidad para infectar plagas de coleópteros y lepidópteros, en particular a los áfidos y dípteros, esto ha incrementado su potencialidad para ser usado como control biológico. Sin embargo, el control biológico es un fenómeno complejo; un profundo conocimiento de los procesos de interacción entre el hongo y el insecto en sus diferentes estados específicos son necesarios para desarrollar la estrategia adecuada. Las investigaciones bioquímicas y moleculares de las interacciones hospedero-entomopatógeno, son claves para incrementar la patogenicidad del hongo y conocer las condiciones necesarias para desarrollar epizootias sobre las plagas de insectos (Gillespie, A.T. y Claydon, N., 1989).

Por otra parte, en la Tabla 2.1 se muestran las proyecciones sobre las ventas de productos biotecnológicos a nivel mundial hacia el 2006. Los productos agrobiotecnológicos tienen un gran potencial y una fuerte posición en el volumen de ventas (Tengerdy y Szakács 1998).

Tabla 2.1 Proyección de ventas de productos biotecnológicos (millones de dólares sobre 1996)

Sector	Año base (1996)	Predicción (2006)	Porcentaje de crecimiento anual (1996-2006)
Terapéuticos humanos	7555	25545	13
Diagnóstico humanos	1760	4050	9
Agricultura	<b>285</b>	<b>1740</b>	<b>20</b>
Especialidades	275	1600	19
Diagnóstico en gral.	225	465	8
Total	10100	33400	12

Fuente: Consulting Resources, USA, reported in Genetic Engineering News, December 1995, p. 6, tomado de Tengerdy y Szakács (1998)

Actualmente, la agrobiotecnología ha tenido una rápida expansión en la aplicación de bioinsecticidas y bioherbicidas que pueden reemplazar total o parcialmente los insecticidas químicos. La Tabla 2.2 muestra algunos agentes de control que están usándose comercialmente o en avanzado estado de experimentación. El desarrollo de micoinsecticidas es promisorio a nivel nacional y mundial.

Tabla 2.2 Biopesticidas comerciales

Tipo	Marca comercial	Microorganismo	Productor
Herbicida	Casst	<i>Alternaria cassiae</i>	Mycogen
Herbicida	Collego	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ecogen
Herbicida	MYX-1200	<i>Fusarium lateritium</i>	Abbott
Fungicida	T-95	<i>Trichoderma harzianum</i>	W.R. Grace
Insecticida	Bio1020	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Bayer
Insecticida	ABG-6178	<i>Beauveria bassiana</i>	Abbott

Tomado de Tengerdy y Szakács (1998)

El hongo entomopatógeno *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* es un candidato viable para el combate de áfidos y de la mosquita blanca que ocasionan pérdidas en muchos cultivos y en los invernaderos. Así como su habilidad de parasitar hongos fitopatógenos, por lo que es potencialmente adecuado para su uso como control biológico. Por lo que se propone un sistema modelo de cultivo sólido que proporcione un control más sistemático de la producción y que permita estudiar el mecanismo de patogenicidad relacionado con las actividades enzimáticas.

---

---

## OBJETIVOS

---

---

## CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

- Diseñar y desarrollar un sistema-modelo para el estudio de las actividades enzimáticas involucradas dentro del mecanismo de patogenicidad del hongo *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* en fermentación en estado sólido.

### 3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Seleccionar cepas de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* para su cultivo en fermentación en estado sólido considerando criterios como el crecimiento en baja  $A_w$ , halos de hidrólisis de caseína y de quitina, actividades proteolíticas y quitinolíticas y crecimiento medido por  $CO_2$ .
- 3.2.2. Establecer las condiciones de cultivo en fermentación en estado sólido para el crecimiento del hongo *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* sobre cutícula de *Sphenarium purpurascens*.
- 3.2.3. Estudiar el efecto de la adición de una fuente de carbono fácilmente asimilable al sistema-modelo y evaluar el efecto del pH inicial en el cultivo.
- 3.2.4. Caracterizar parcialmente las actividades enzimáticas de proteasas y quitinasas inducidas por la cutícula del insecto en fermentación en estado sólido.

---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

---

## CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Microorganismo

Se emplearon cuatro cepas de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii*: ATCC 26854, ATCC 46578, una del cepario de la Universidad de las Américas (UDLA), donada por el Dr. A. Trigos y otra del cepario del Colegio de Posgraduados (COLEP), donada por la Dra. R. Alatorre.

### 4.2 Medios de cultivo

#### 4.2.1 Medio de mantenimiento y conservación

El hongo entomopatógeno se hizo crecer en un medio de papa dextrosa (PDA) en cajas Petri incubadas a 25 °C. Se cultivaron durante 7 días, las esporas fueron cosechadas en una solución al 0.05% (v/v) de Tween 80. Las cepas fueron sembradas en el mismo medio cada 3 meses y conservadas a -20°C en glicerol al 20% v/v para periodos mas largos (Smith, 1974).

#### 4.2.2 Medio para la producción del inóculo

El inóculo fue producido en tubos inclinados de PDA incubados durante 7 días a 25°C. De los tubos se les agregó una solución de Tween 80 al 0.05 % (v/v) para obtener una suspensión de esporas. De esta suspensión se utilizó 0.5 ml de inóculo para 30 ml de PDA en matraces erlenmeyer de 250 ml, que se incubaron durante 7 días a 25°C. Las esporas se cosecharon con 100 ml de Tween 80 al 0.1 % (v/v) utilizando un agitador magnético que separó a las esporas del micelio en el primer matraz erlenmeyer, el contenido se transfirió al siguiente matraz erlenmeyer y así sucesivamente hasta obtener una suspensión concentrada de esporas.

#### 4.2.3 Medio de cultivo para el crecimiento a bajas $a_w$

Las cepas fueron cultivadas a diferentes valores de actividades de agua ( $a_w$ ) en cajas Petri en un medio consistente en sacarosa 2%, peptona de caseína 0.5 % y agar bacteriológico 1.5%.

Para disminuir la  $a_w$  se empleó etilenglicol ( 62.07 PM ) de acuerdo a lo propuesto por Acuña-Argüelles (1994) a diferentes concentraciones (5, 10, 15 y 20 % v/v) obteniéndose  $a_w$  de 0.997, 0.978, 0.957 y 0.933, respectivamente.

#### **4.2.4 Medio para el ensayo semicuantitativo de proteasas**

El medio se preparó mezclando 9 g de leche descremada reconstituída (Sveltes) (disueltos en 10 ml de agua destilada) con 90 ml de agar bacteriológico (1.5%), obteniéndose un agar con una concentración de leche al 9 %. Posteriormente se vació en las placas una delgada capa de 3 mm de medio más denso mezclando 10 ml de agar al 2.5 % con 4.5 g de leche descremada en 5 ml de agua destilada (obteniendo un agar con una concentración de leche al 30 %) para definir claramente el halo en el agar.

#### **4.2.5 Medio para el ensayo semicuantitativo de quitinasas**

El sustrato utilizado fue quitina coloidal al 2.4 %, esta fue disuelta en agar bacteriológico al 2 %. Posteriormente, se colocó una delgada capa de aproximadamente 3 mm de agar bacteriológico al 2 % para la definición del halo.

#### **Preparación de la quitina coloidal**

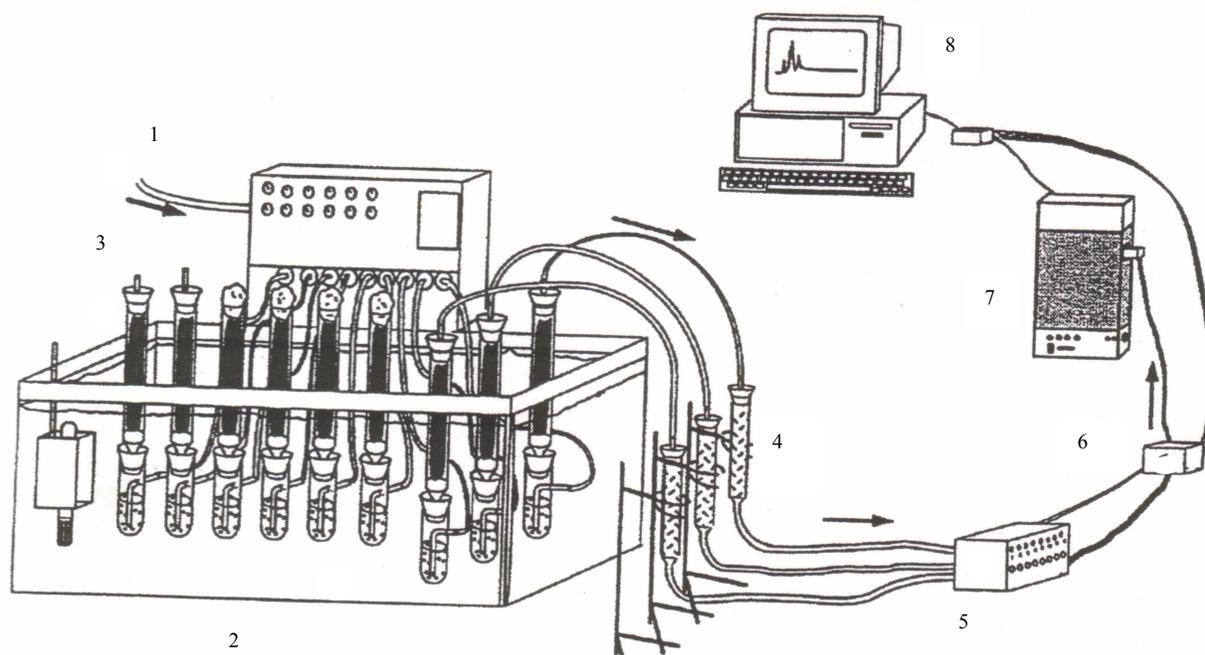
A una muestra de 20 g de quitina de camarón en polvo (tamizado a través de una malla de 42) se le agregó lentamente 800 ml de ácido clorhídrico concentrado a una temperatura de 4 °C con una agitación vigorosa. Después que se alcanzó una dispersión homogénea de la quitina, la mezcla fue calentada suavemente hasta 37 °C con agitación moderada. La viscosidad de la mezcla se incrementó rápidamente y posteriormente empezó a decrecer. Cuando la viscosidad decreció, la apariencia de la mezcla comenzó a ser clara. En esta etapa la mezcla fue filtrada a través de una fibra de vidrio y el filtrado se vertió en 8 litros de agua desionizada a una temperatura de 4 °C en agitación. En pocos minutos, la solución comenzó a enturbiarse debido a la reprecipitación de la quitina. Después de 30 minutos, la agitación fue interrumpida y entonces la suspensión se conservó toda la noche a 5°C. El sobrenadante fue decantado y el precipitado se

filtró por vacío a través de un papel filtro Whatman No. 2. El residuo fue lavado con agua hasta que tuviera un pH neutro la solución. Al residuo se le agregó 500 ml de agua desionizada y se resuspendió con una agitación vigorosa para obtener la solución de quitina coloidal. El contenido de quitina en la solución fue determinado por secado de la muestra al vacío. La solución de quitina coloidal permaneció estable almacenada en frascos ámbar a 5<sup>0</sup>C (Shimahara y Takiguchi, 1988).

#### 4.2.6 Preparación y condiciones del medio de cultivo sólido

##### 4.2.6.1 Cultivo en columnas por aireación forzada

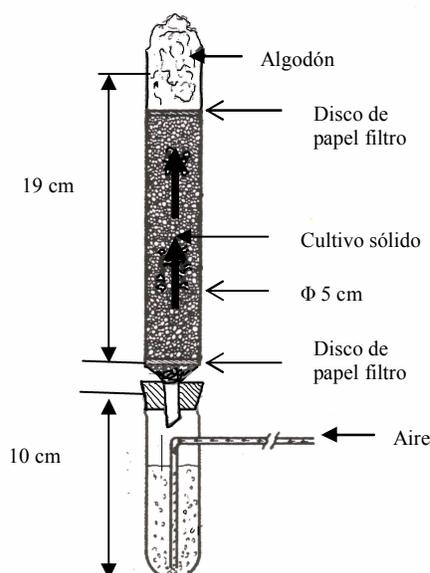
Para estudiar el mecanismo de patogenicidad de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* en el cultivo sólido, se utilizó el dispositivo de fermentación sólido descrito por diferentes autores (Roussos 1985, Saucedo-Castañeda, 1991; Trejo Hernández, 1992). El dispositivo se presenta esquematizado en la Figura 4.1.



1. Entrada del aire   2. Baño de agua   3. Columnas de fermentación   4. Columnas de silicagel  
5. Colector de muestras   6. Control de inyección automatizado   7. Cromatógrafo de gases   8. Computadora

**Figura 4.1** Equipo para el análisis automatizado de CO<sub>2</sub> del cultivo sólido

Los reactores estaban constituidos por columnas de vidrio de 19 cm de altura x 5 cm de diámetro (Figura 4.2) como soporte se empleó bagazo de caña impregnado con el medio de cultivo. El volumen de empaque fue de 140 cm<sup>3</sup>, con una densidad de 0.25 g/cm<sup>3</sup>. Las columnas estaban montadas en tubos que funcionaban como humidificadores, para mantener la humedad adecuada. La temperatura de las columnas se controló en un baño de agua a 25 °C. El flujo de aire fue controlado manualmente a través de un flujómetro digital ADM 2500 (J&W Scientific). Las válvulas permitieron ajustar adecuadamente el flujo del aire deseado. Para nuestros estudios, las columnas se alimentaron con aire húmedo por la entrada inferior con un flujo de aireación constante de 0.43 l de aire por kg de peso húmedo por minuto (vkgm). Los gases fueron colectados en línea a la salida del fermentador para su análisis.



**Figura 4.2** Esquema de la columna de aireación forzada

El sistema de análisis de gases estaba constituido por un cromatógrafo de gases dotado de un detector de conductividad térmica acoplado a una computadora. El programa de integración de cromatogramas CHROMA de la sociedad BIOSYSTEMES permitió el cálculo de los resultados. Este dispositivo permitió seguir en línea la evolución de los gases durante la fermentación (Saucedo Castañeda, 1991; Trejo Hernández, 1992; Perraud-Gaime, 1995)

#### 4.2.6.2 Medio de cultivo para la fermentación sólida

El medio de cultivo sólido contenía: 6 de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.2 de  $\text{MgSO}_4$ , 1 de  $\text{NaCl}$ , 15 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.028 de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.032 de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $\text{g l}^{-1}$ ). Para la inducción de proteasas y quitinasas se utilizó cutícula de *Sphenarium purpurascens* ( $60 \text{ g l}^{-1}$ ). El soporte y el medio de cultivo se esterilizaron por separado en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  durante 15 minutos, las columnas se empacaron en condiciones asépticas, con una humedad inicial de 75 %, pH 6, inoculando con una concentración de esporas de  $1 \times 10^7$  esporas por gramo de bagazo. Las columnas contenían 35 g de materia húmeda (M.H.) y se incubaron durante 7 días en un baño de agua a  $25^\circ\text{C}$ .

#### Tratamiento del bagazo

El bagazo, residuo agroindustrial de la caña de azúcar, está compuesto de 38 % de celulosa, 34 % de hemicelulosa, 11 % de lignina. El bagazo de caña provino del ingenio “Emiliano Zapata” de Zacatepec, Morelos. Al bagazo de caña se le eliminaron los azúcares solubles realizando tres lavados con agua hirviendo, posteriormente fue tamizado entre mallas de 20 y 30 y se secó a temperatura ambiente (Deschamps y col., 1985).

#### Tratamiento de la cutícula

Se utilizó cutícula de *S. purpurascens* adultos correspondientes al último instar, obtenidos de la sierra norte de Puebla. La preparación de la cutícula consistió primeramente en retirar antenas, extremidades y cabeza del insecto. Para retirar el tejido blando y obtener la cutícula, el tórax y abdomen fue seccionado y tratado con una solución 0.1N de NaOH durante 30 minutos, se lavó dos veces con agua destilada y enseguida fue tratado con una solución 0.2 N de HCl otros 30 minutos y nuevamente se lavó con agua destilada. El material se dejó secar a temperatura ambiente y se quitó cuidadosamente el resto del tejido blando, hasta obtener solo la cutícula, posteriormente la cutícula se molió y tamizó en una malla 32.



**Figura 4.3** Cutícula de *S. Purpurascens* como inductor de proteasas y quitinasas para el sistema de fermentación sólida

#### 4.2.7 Medio para la fermentación líquida

El cultivo líquido (FL) se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 40 ml del medio que contenía en g l<sup>-1</sup>: 20 de cutícula de *S. purpurascens*, 3 de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.6 de MgSO<sub>4</sub>, 0.5 de NaCl, 10 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0.028 de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 0.032 de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O. Las condiciones del cultivo fueron: un inóculo de 1 x 10<sup>7</sup> esp ml<sup>-1</sup>, agitación de 100 rpm, temperatura de 25 °C y pH 6.

#### 4.3 Preparación del extracto enzimático

Al término de la fermentación en el cultivo sólido, el contenido total de la columna se mezcló con agua destilada 1:1 (p/v) y se prensó a 1500 psig con una prensa hidráulica ERKCO (Aeroquip Mexicana, S.A.). El extracto enzimático se filtró por una membrana Millipore de 0.45 μm, almacenándose en refrigeración a 4 °C para su posterior análisis. Para el cultivo líquido, se centrifugó a 10000 rpm en 10 minutos y el sobrenadante se filtró por una membrana Millipore de 0.45 μm y se conservó como el caso anterior.

## 4.4 Técnicas analíticas

### 4.4.1 Determinación de la biomasa en cajas Petri

La medición de la biomasa producida a diferentes  $a_w$  se determinó por gravimetría y se expresó respecto a la superficie de crecimiento, fundiendo el agar en agua destilada hirviendo y filtrando por un papel filtro Whatman No. 41, previamente tarado. El papel filtro con la biomasa se secó en una estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. El diámetro del micelio se midió a partir del centro de la caja Petri hacia los cuatro puntos de un eje de coordenadas utilizando un calibrador Vernier.

### 4.4.2 conteo del número de esporas para el inóculo

El conteo se realizó en una cámara de Neubauer con una dilución adecuada para tener entre 25 y 50 esporas por cuadro. El número de conidioesporas obtenido fue calculado utilizando la fórmula siguiente:

$$N = \frac{n \times 10^5 \times F \times 100}{2.5}$$

$N$  = número de conidias  $\text{ml}^{-1}$

$n$  = promedio de conidias por celda

$F$  = factor de dilución = inverso de la dilución

Fueron resuspendidas en agua destilada y refrigeradas, posteriormente se utilizó como inóculo a una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ .

### 4.4.3 Determinación del pH en la fermentación sólida

El pH se realizó con un potenciómetro digital Knick muni de un electrodo combinado previamente calibrado con soluciones amortiguadoras (Schott-Geräte) de pH 4.7 y 10 a  $25^{\circ}\text{C}$ . La medición se hizo en una suspensión de 2 g de muestra en 18 ml de agua destilada después de agitarse durante 20 minutos.

#### 4.4.4 Determinación de humedad en la fermentación sólida

El peso seco de las muestras fue evaluado por diferencia de peso por gravimetría. Una muestra de 2 g fue pesada en una balanza de precisión Sartorius R160 D. La muestra fue secada por 24 h a 65 °C. Una vez seca se colocó en un desecador que contiene silicagel. Los resultados se expresaron por cantidad de sólido en 100 g de muestra húmeda o cantidad de agua en 100 g de materia húmeda y se indicó como porcentaje de materia seca o porcentaje de humedad, respectivamente.

#### 4.4.5 Determinación de la actividad de agua ( $a_w$ )

La  $a_w$  se obtuvo tomando una cantidad de muestra de aproximadamente 2 g para ser medido a través de un equipo AQUALAB cx-2 (LABSEN SCIENTIFIC Co), previamente calibrado.

#### Medición de la actividad de agua.

La actividad de agua de un producto puede ser determinada a partir de la humedad relativa del aire, cuando el aire y la muestra están en equilibrio. Por lo que, la muestra debe ser colocada en un espacio cerrado donde el equilibrio pueda ser alcanzado. Una vez que esto ocurre, la actividad de agua de la muestra y la humedad relativa del aire serían iguales. La medición al alcanzar el equilibrio es llamada humedad relativa en equilibrio o HRE. El Aqualab se basó en la tecnología de punto de rocío por condensación sobre un espejo enfriado. La principal ventaja del método de punto de rocío por condensación sobre un espejo es la exactitud, velocidad, fácil uso y precisión. El rango del Aqualab fue de 0.030 a 1.00 de  $a_w$  con una resolución de  $\pm 0.001 a_w$  y una exactitud de  $\pm 0.003 a_w$ . La medición del tiempo fue menor de 5 minutos.

### **Punto de rocío por condensación sobre un espejo**

En el AquaLab, la muestra fue equilibrada dentro del espacio de una cámara sellada que contiene un espejo, un control óptico, un ventilador interno y un control de temperatura superficial de las muestras mediante infrarrojo. En el equilibrio, la humedad relativa del aire en la cámara fue la misma con la actividad de agua de la muestra. Un Control interno termoelectrico (Peltier) controló la temperatura del espejo. Un sensor de reflexión que detectó el punto exacto en la cual apareció la primera condensación. Un rayo de luz infrarroja que fue dirigido sobre el espejo y reflejó hacia un fotodetector, el cual detectó el cambio en la reflectancia cuando la condensación ocurre sobre el espejo. Una termocupla sujeta al espejo midió exactamente la temperatura del punto de rocío. El ventilador interno se utilizó para la circulación del aire, el cual redujo el tiempo de equilibrio del vapor y controló la conductancia de la capa unida a la superficie del espejo. Adicionalmente, un sensor termopila (termómetro infrarrojo) midió la temperatura superficial de la muestra. Ambas temperatura la del punto de rocío y de la muestra fueron entonces usadas para determinar la actividad de agua. Durante la medición de la actividad de agua, el AquaLab repetidamente determinó la temperatura del punto de rocío hasta el equilibrio de vapor fue alcanzado.

#### **4.4.6 Determinación del CO<sub>2</sub> producido**

La actividad respiratoria fue evaluada por la medición de CO<sub>2</sub> producido en un cromatógrafo de gases (GOW-MAC INSTRUMENT Co, Serie 580), según lo descrito por Saucedo-Castañeda y col. (1992).

#### **Análisis de CO<sub>2</sub>**

Un cromatógrafo GOW MAC serie 580 dotado de una columna concéntrica ALLTECH CTR I . La columna externa fue empacada de un soporte que funciona como tamiz molecular de 5 Å, mientras que la columna central fue empacada de Poropak, polímero poroso que no retiene el paso de los gases.

Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron las siguientes:

Detector	Conductividad térmica 40-45 °C
Inyector	44 °C
Temperatura de horno	40-45 °C
Fase móvil	Helio
Flujo del eluyente	30 ml/min
Tensión del detector	150 mA

Cada gas presentó una conductividad térmica diferente, por tanto fue necesario establecer una curva de calibración antes de proceder al análisis de la medición de los gases (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>).

Esta columna permite separar los compuestos señalados en la Tabla 4.1

Tabla 4.1 Separación de los componentes por la columna ALLTECH

Compuesto	Separación	Tiempo de retención
Aire	Porapak	0.38
Dióxido de carbono	Porapak	0.80
Oxígeno y Nitrógeno	Tamiz molecular 1.50	2.20

La integración y el cálculo de los porcentajes de los diferentes gases fueron realizados por el programa CHROMA. Los flujos de aire de las columnas fueron medidos automáticamente utilizando un flujómetro digital ADM 2000 controlado por un programa FLUJO desarrollado por el Ingeniero Miguel Cadena Chárraga, del Departamento de Ingeniería Eléctrica de la UAM-I. El programa CHROMA funcionó en conjunción con el programa FLUJO. Este sistema permitió obtener al mismo tiempo los valores de porcentajes de los diferentes gases y el flujo del aire. Se pudo por tanto conocer la evolución de la producción del CO<sub>2</sub> al integrarse con los datos del flujo de aire al pasar por las columnas de fermentación.

#### 4.4.7 Determinación del contenido de C H y N de la cutícula de *S. purpurascens*

Una muestra de 0.5 g de materia seca se pulverizó y secó a 60<sup>0</sup>C durante 48 horas. Se tomaron muestras entre 1.5 y 2.5 mg para la determinación de C, H y N en un equipo Perkin Elmer CHNS/O modelo 2400.

##### **Analizador CHNS-O**

El Analizador CHNS-O es un analizador elemental para la determinación simultánea de la cantidad (%) de carbono, hidrógeno, nitrógeno, azufre y oxígeno contenido en materiales orgánicos, inorgánicos y poliméricos. En sustancias de diferente naturaleza y origen por ejemplo: muestras sólidas, líquidas y gaseosas. La técnica utilizada se basó en la combustión dinámica fulgurante

##### **Principios de operación**

La muestra pesada en miligramos cubierta en una cápsula de estaño fue colocada en un tubo de cuarzo a 1020 °C con un flujo constante de helio (gas acarreador). Unos pocos segundos antes de que la muestra se colocara dentro del tubo de combustión, el flujo fue enriquecido con una cantidad exacta de oxígeno de alta pureza para alcanzar una fuerte oxidación ambiental la cual garantiza una completa combustión/oxidación aún en sustancias térmicamente resistentes. La combustión de la mezcla gaseosa fue manejada por medio de una zona de oxidación catalizada ( $WO_3$ ), con una subsecuente área de cobre la cual redujo el óxido de nitrógeno y el anhídrido sulfúrico ( $SO_3$ ) eventualmente formados durante la combustión hasta que se obtuvo una reducción catalizada a nitrógeno elemental y anhídrido sulfuroso ( $SO_2$ ). Los resultantes cuatro componentes de la mezcla de combustión fueron registrados con un detector de conductividad térmica en la secuencia  $N_2$   $CO_2$   $H_2O$  y  $SO_2$ . En el caso del oxígeno que fue analizado separadamente, la muestra sufrió una pirólisis en una corriente de helio la cual aseguró una conversión cuantitativa del oxígeno orgánico del monóxido de carbono que fue separado sobre una columna empacada de GC con un tamiz molecular.

#### **4.4.8 Determinación de azúcares reductores y totales**

La determinación de azúcares reductores fue realizada por el método del DNS (Miller, 1959). El poder reductor de los azúcares permite reducir el ácido 3-5 dinitrosalicílico en ácido 3-amino-nitrosalicílico en un medio básico. El producto de la reacción presentó una coloración anaranjada con un máximo de absorción a 575 nm.

La determinación de azúcares totales fue realizada por el método modificado de fenol-sulfúrico (Rao y Pattabiraman, 1989), consistió en la reacción del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con el fenol para la cuantificación de hexosas, pentosas y polímeros. Los sacáridos con grupos funcionales aldehídos o cetonas son deshidratados a derivados furfuranos con el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado el cual se condensa con el fenol para formar un complejo colorido que presentó un máximo de absorción a 485 nm.

#### **4.4.9 Proteína total**

La determinación de proteína fue realizada por el método modificado de Lowry (Shakir y col., 1994), utilizando como estándar albúmina serina de bovino (BSA).

#### **4.4.10 Ensayo semicuantitativo de actividad proteolítica**

La determinación de la actividad proteolítica consistente en la formación de halos de hidrólisis de caseína se realizó de acuerdo a lo propuesto por Harrigan y McCance (1976). Se preparó una suspensión de  $1 \times 10^4$  conidias ml<sup>-1</sup> para cada cepa, inoculándose 50 µl en el centro de las cajas Petri. Se midieron los radios de los halos de actividad enzimática durante 9 días de cultivo y la tasa de formación de los halos se determinó por la pendiente del aumento del radio en el tiempo.

#### **4.4.11 Actividad proteolítica con azocoll**

La actividad proteolítica se determinó por el método del azocoll (Chavira y col., 1984). Una cantidad de 10 mg de azocoll fue suspendido en 1 ml de amortiguador glicina-NaOH 0.2 M (pH

8.5), se agregó 3.9 ml de agua y 0.1 ml de extracto enzimático en un matraz Erlenmeyer de 25 ml. Se incubó en agitación (180 rpm) a 37 °C por 30 min. Una unidad enzimática (U.E.) se definió como el cambio de 0.1 unidades de absorbancia por  $\text{min}^{-1}$  ( $\text{g de cutícula}^{-1}$   $\text{ml}^{-1}$ ) del medio de cultivo y fue leído a una D.O. de 520 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se tomaron lecturas de 0 y 30 min.

#### 4.4.12 Ensayo semicuantitativo de actividad quitinolítica

Para la selección de cepas productoras de quitinasa se usó la técnica de formación de halos en placas de agar de acuerdo al procedimiento de Hankin y Anagnostakis (1975). El sustrato utilizado fue quitina coloidal, las placas fueron colocadas a 4 °C en la oscuridad durante 2 semanas previo al ensayo y esto resaltó el efecto de la formación del halo, de acuerdo a Jackson y col. (1985). Se preparó una suspensión de  $1 \times 10^4$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  para cada cepa, inoculándose 50  $\mu\text{l}$  en el centro de las cajas Petri. Se midieron los radios de los halos de actividad enzimática durante 9 días de cultivo y la velocidad de formación de los halos se determinó por la pendiente, del incremento del radio del halo de aclaramiento respecto al tiempo.

#### 4.4.13 Actividad quitinolítica

Para la actividad quitinolítica se modificó el método de Coudron y col. (1984), en lugar de quitibiosa, se utilizó como sustrato *p*-nitrofenol N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (Sigma Chemical Co). Para el ensayo enzimático se tomaron 50  $\mu\text{l}$  del extracto enzimático, se agregaron 150  $\mu\text{l}$  de agua y 200  $\mu\text{l}$  de amortiguador de citrato-fosfato 0.2 M (pH 5.6) y 200  $\mu\text{l}$  de 1.0  $\text{mg ml}^{-1}$  del sustrato. La reacción fue incubada durante 1 h a 37 °C con una agitación de 180 rpm. Se detuvo la reacción al agregar 1 ml de NaOH 0.02 M. La curva estándar se obtuvo por diluciones de *p*-nitrofenol. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar un  $\text{mmol de } p\text{-nitrofenol min}^{-1}$  ( $\text{g de cutícula}^{-1}$   $\text{ml}^{-1}$ ) del medio de cultivo bajo condiciones específicas a una D.O. de 400 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, el blanco contenía 200  $\mu\text{l}$  de agua, 200  $\mu\text{l}$  de amortiguador y 200  $\mu\text{l}$  del sustrato, se tomaron lecturas intermedias de 0 a 1 h.

#### 4.4.14 Actividad celulolítica

Para determinar la actividad celulolítica se modificó el método propuesto por Riou y col. (1991). Donde una alícuota de 20  $\mu\text{l}$  del extracto fueron disueltos en 1 ml de carboximetilcelulosa ( $2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) con 1 ml de amortiguador de acetatos 0.2 M (pH 6), la reacción se incubó a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 min. La liberación de azúcares reductores se determinó por el método de 3-5 dinitrosalicílico DNS (Miller, 1959). La reacción se detuvo al agregar 3 ml del reactivo de DNS. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir un  $\mu\text{mol}$  de glucosa  $\text{min}^{-1}$  ( $\text{g cutícula}^{-1}$ )  $\text{ml}^{-1}$  del medio de cultivo a una absorbancia de 528 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

#### 4.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La microscopía electrónica de barrido es un método reciente que permitió la observación de la estructura superficial de una muestra. En la MEB un haz de electrones bombardeó al espécimen. Con estos electrones se escanea la superficie de la muestra provocando que electrones secundarios y otras partículas sean liberados con varios ángulos produciendo una imagen tridimensional de la muestra. La imagen estaba compuesta de líneas similares a las emitidas en un televisor, que son transferidas a un tubo de rayos catódicos. Las imágenes producidas por MEB presentaban una excelente resolución.

#### Obtención de las muestras

La MEB permitió observar la penetración del hongo sobre la cutícula y confirmar si el hongo crece sobre la cutícula. En la MEB, se tomaron muestras de 3 mm de espesor. Las muestras seleccionadas se tomaron por duplicado a las 24 y 96 horas del cultivo sólido. Las muestras del cultivo sólido fueron fijadas con la técnica de glutaraldehído y osmio, deshidratadas y recubiertas como describió Sarhy-Bagnon y col. (2000).

### **Fijación con glutaraldehído**

Para evitar toda deformación de la estructura de la muestra por la deshidratación posterior, fue necesario preservar las células estabilizando la estructura de sus proteínas. El glutaraldehído es un reactivo bifuncional que posee la propiedad de penetrar fácilmente el material y preservar las estructuras proteicas.

El material biológico, de un tamaño máximo de 4 x 4 mm fue colocado en un frasco de vidrio. El fijador fue agregado en una proporción de 20 volúmenes de la muestra (2 a 3 ml). La composición del fijador fue la siguiente: glutaraldehído 3 a 6 % en una solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M a pH 7.2. La temperatura de fijación fue de 4 °C. El tiempo de fijación establecido fue de 6 a 12 horas. Las muestras fueron posteriormente lavadas 4 o 5 veces con la solución amortiguadora.

### **Fijación con el osmio**

La segunda fijación se realizó con una preparación de osmio al 2 % en una solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M a pH 7.2. El osmio es un fijador de lípidos. El fijador fue agregado a la muestra a razón de 10 a 20 veces al volumen de la muestra (2 a 4 ml). El tiempo de fijación fue de ½ a 2 horas a 4 °C. Posteriormente, la muestra fue lavada tres veces con la solución amortiguadora.

### **Deshidratación**

Las muestras fueron transferidas a una serie de baños de alcohol con las siguientes concentraciones: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 % y finalmente en alcohol absoluto. En cada concentración se realizaron tres lavados de 10 minutos. Después, la muestra fue introducida dentro de un aparato de deshidratación por el método del punto crítico. La deshidratación consistió en reemplazar el alcohol por CO<sub>2</sub> líquido y llevar el CO<sub>2</sub> al punto crítico (36.1 °C, 1070 lb/pg<sup>2</sup>) el cual fue transformado en gas. El CO<sub>2</sub> fue eliminado muy lentamente y reemplazado por el aire. Todos los espacios de la muestra ocupados por el líquido fueron así reemplazados por el vacío. La forma y la estructura de la muestra fueron conservadas de esta manera.

## **Montaje**

Una vez seca, la muestra fue montada sobre un soporte de aluminio específico compatible para la evaporadora de carbono y oro para su observación en el microscopio de barrido.

## **Recubrimiento de carbono y de oro**

El objetivo de recubrir la muestra con una capa de carbono y de oro fue permitir la conductibilidad y la recuperación de los electrones secundarios, retrodispersos y otras emisiones cuando las muestras fueron sometidas a un flujo de electrones del MEB. El recubrimiento se realizó bajo una atmósfera de argón. La muestra recubierta fue conservada en un desecador de vidrio para su observación en MEB.

## **Observaciones**

El microscopio electrónico de barrido utilizado fue del tipo: CARL ZEISS DSM 940A. Los análisis se realizaron gracias a la colaboración de la Dra. Patricia Castillo Ocampo de la UAM Iztapalapa.

Fue recomendable comenzar la observación de la muestra con un voltaje de 4/5 kV e ir aumentando el voltaje lentamente para obtener una mejor resolución. En el MEB, en cada observación, la muestra fue sometida a un flujo de electrones que modificarían su estructura. Por lo que fue necesario iniciar con un bajo voltaje para no tener el riesgo de perder la muestra. Las fotos obtenidas fueron digitalizadas y tratadas por un programa de tratamiento de imágenes.

## **4.6 Expresión de los resultados**

### **4.6.1 Análisis de gases**

El análisis de los gases de salida de las columnas de fermentación y la expresión automática de los resultados obtenidos por el programa CHROMA permitió obtener una medida en línea del contenido de CO<sub>2</sub> y de O<sub>2</sub> (expresado en fracción volumétrica). La tasa instantánea (derivada) de la producción o del consumo de gases fue calculada considerando el flujo medido por el flujómetro digital dirigido por el programa FLUJO. Las diferencias resultantes permitieron

determinar la producción o el consumo global de los gases (integración). Los resultados fueron expresados en base a la materia seca inicial de acuerdo con la ecuación:

$$\frac{dCO_2}{dt} \text{ o } \frac{dO_2}{dt} = \frac{(CO_2 \text{ o } O_2) \times \text{Flujo} \times 60 \times a \times b}{\text{Peso inicial} \times \% \text{ MSI}}$$

donde:

$dCO_2/dt$  o  $dO_2/dt$  = contenido del gas en el aire (mg  $CO_2$  / h g MSI )

Flujo = flujo del aire (ml/min)

a = factor para pasar de ml de gas a moles, con la fórmula:

$$a = \frac{P}{R \times T} = \frac{0.7697368}{0.08206 \times (T + 273)}$$

T = temperatura de trabajo (°C)

b = peso molecular de  $CO_2$  o de  $O_2$

Peso inicial = peso húmedo del contenido de la columna ( g )

% MSI = materia seca inicial ( % )

La acumulación o el consumo total de los gases fueron calculados al integrar los datos de la tasa de consumo por la regla del trapecio.

#### 4.6.2 Resultados de las actividades enzimáticas

Para la determinación de las actividades enzimáticas en FMS y que permitieron tener una base de comparación con la FL, los resultados se expresaron respecto a la cantidad de cutícula utilizada y el volumen del medio empleado en los dos sistemas de cultivo.

##### 4.6.2.1 Actividad proteolítica

Para la determinación de la actividad proteolítica en el cultivo sólido se utilizó la ecuación:

$$U.E. = \frac{\text{abs} \times \Delta \text{abs} \times D \times d \times V_1}{T \times \text{cutícula} \times V_2} = \text{cambio } 0.1 \text{ unidades de abs min}^{-1} \text{ g cutícula}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ medio}$$

donde:

$abs$  = absorbancia a una D.O. de 520 nm.

$\Delta abs$  = cambio de absorbancia de 0.1.

$D$  = dilución de la muestra reactiva (1:50).

$d$  = dilución de la MH en agua (aprox. 1:1.742).

$V_1$  = volumen del extracto crudo después del prensado (aprox. 40.7 ml).

$T$  = tiempo de incubación (30 min).

cutícula = cantidad utilizada para la columna (1.575 g).

$V_2$  = volumen del medio utilizado (26 ml).

Para la determinación de la actividad proteolítica en el cultivo líquido se utilizó la ecuación:

$$U.E. = \frac{abs \times \Delta abs \times D \times V_1}{T \times cutícula \times V_2} = \text{cambio 01 unidades de } abs \text{ min}^{-1} \text{ g cutícula}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ medio}$$

donde:

$abs$  = absorbancia a una D.O. de 520 nm.

$\Delta abs$  = Cambio de absorbancia de 0.1.

$D$  = dilución de la muestra reactiva (1:50).

$V_1$  = volumen del sobrenadante (40 ml)

$T$  = tiempo de incubación (30 min).

cutícula = cantidad utilizada en el cultivo (0.8 g).

$V_2$  = volumen del medio utilizado (40 ml).

#### 4.6.2.2 Actividad quitinolítica

Para el cultivo sólido la actividad quitinolítica se determinó como se muestra:

$$U.E. = \frac{\text{concentración p - nitrofenol} \times D \times d \times V_1}{T \times PM \times cutícula \times V_2} = \text{mmol p - nitrofenol min}^{-1} \text{ g de cutícula}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ medio}$$

donde:

p-nitrofenol = concentración equivalente de p-nitrofenol de la curva estándar (mg).

D = dilución de la mezcla reactiva (1:32)

d = dilución de la MH en agua (aprox. 1:1.742).

V<sub>1</sub> = volumen del extracto crudo después del prensado (aprox. 40.7 ml).

T = tiempo de incubación (60 min).

PM = peso molecular del p-nitrofenol (139.1 mg / mmol)

cutícula = cantidad utilizada para la columna (1.575 g).

V<sub>2</sub> = volumen del medio utilizado (26 ml).

Para el cultivo líquido la actividad quitinolítica se determinó como se muestra:

$$U.E. = \frac{\text{concentración p - nitrofenol} \times D \times V_1}{T \times PM \times \text{cutícula} \times V_2} = \text{mmol p - nitrofenol min}^{-1} \text{ g de cutícula}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ medio}$$

donde:

p-nitrofenol = concentración equivalente de p-nitrofenol de la curva estándar (mg).

D = dilución de la mezcla reactiva (1:32).

V<sub>1</sub> = volumen del extracto crudo después del prensado (aprox. 40.7 ml).

T = tiempo de incubación (60 min).

PM = peso molecular del p-nitrofenol (139.1 mg/mmol)

cutícula = Cantidad utilizada para el cultivo (0.8 g).

V<sub>2</sub> = volumen del medio utilizado (40 ml).

---

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE CEPAS DE  
*Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* PARA SU  
CRECIMIENTO EN FERMENTACIÓN EN  
MEDIO SÓLIDO

---

## CAPÍTULO 5. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE CEPAS DE *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* PARA SU CRECIMIENTO EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

En este capítulo se establecen los criterios para seleccionar cepas de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* para su cultivo en el sistema de fermentación sólida propuesto. Los criterios propuestos fueron los siguientes: a) Crecimiento a baja  $a_w$ , basado en el hecho que la fermentación sólida es un sistema que por definición no contiene agua libre y que el desarrollo del microorganismo depende de su adaptabilidad a un sistema de baja  $a_w$ . b) Formación de halos de hidrólisis de caseína y de quitina en caja Petri, como un indicador de cepas que presentan altas actividades hidrolíticas orientadas a la degradación de caseína y de quitina coloidal. c) Producción de  $CO_2$  como medida de la actividad metabólica del hongo resultado de consumir la cutícula del insecto como fuente de C y N. d) Las actividades enzimáticas de los sistemas proteolíticos y quitinolíticos que se obtienen a partir de la inducción de las enzimas degradadoras de la cutícula. Al término de este capítulo se hace una comparación de las actividades enzimáticas de cada cepa al utilizar los tipos de fermentación sólida y líquida.

### 5.1 Crecimiento a bajas $a_w$

Es importante evaluar la capacidad de los hongos empleados en el control biológico, para crecer a bajas  $a_w$ , pues sus conidios pueden ser inefectivos si son incapaces de germinar cuando la disponibilidad de agua es baja (Jackson y col., 1985). Por tanto, resulta interesante estudiar el efecto de la  $a_w$  en el crecimiento. En la Tabla 5.1 se muestra el efecto de la  $a_w$  en la producción de biomasa de las cuatro cepas estudiadas. A una  $a_w$  de 0.997, la biomasa producida en las cuatro cepas de *L. lecanii* en caja Petri no presentan diferencia significativa, alcanzando valores cercanos a  $2.5 \text{ mg cm}^{-2}$ , después de 10 días de crecimiento. Sin embargo al disminuir la  $a_w$  a valores de 0.978, empieza a diferenciarse la biomasa generada por los hongos, manteniéndose los niveles de biomasa formada para las dos cepas ATCC, pero en el caso de las cepas UDLA y COLEP la biomasa formada disminuyó en 78 y 67 %, respectivamente. Para una  $a_w$  de 0.957, presentan diferencias significativas en la biomasa formada, las cepas UDLA y ATCC 26854 alcanzaron una biomasa del orden de  $1 \text{ mg cm}^{-2}$ , mientras que la cepa ATCC 46578 y COLEP

apenas alcanzaron una biomasa superior a  $0.5 \text{ mg cm}^{-2}$ . Todas las cepas detuvieron su crecimiento en los cuatro días restantes. Ninguna cepa creció con una  $a_w$  de 0.93.

Tabla 5.1 Efecto de la  $a_w$  sobre la producción de biomasa [ $\text{mg cm}^{-2}$ ] de las cuatro cepas de *V. lecanii* cultivadas en caja Petri después de 10 días de cultivo.

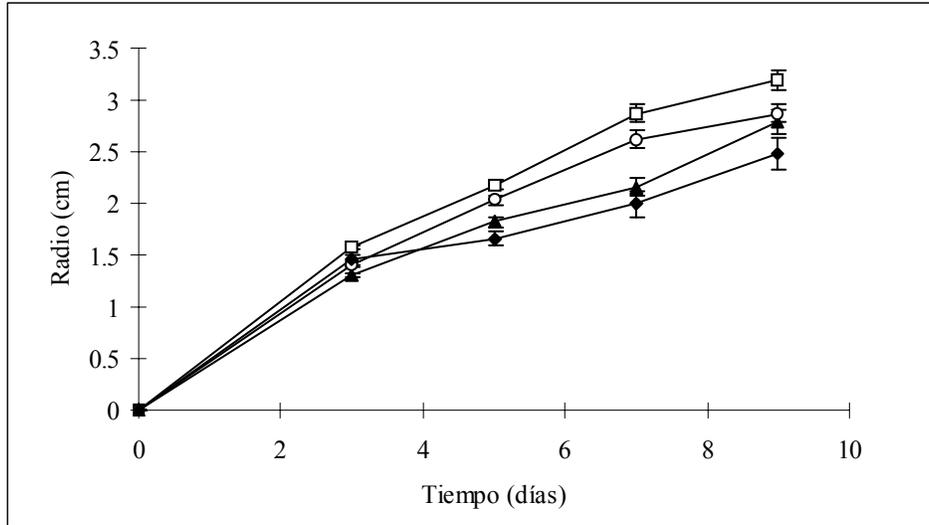
CEPAS				
$a_w$	ATCC 26854	ATCC 46578	UDLA	COLEP
0.997	$2.42 \pm 0.14$	$2.51 \pm 0.13$	$2.48 \pm 0.1$	$2.54 \pm 0.1$
0.978	$2.48 \pm 0.07$	$2.48 \pm 0.12$	$1.94 \pm 0.19$	$1.68 \pm 0.14$
0.957	$0.97 \pm 0.04$	$0.48 \pm 0.1$	$1.02 \pm 0.06$	$0.502 \pm 0.08$
0.93	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. No se detectó crecimiento

El crecimiento de *L. lecanii* decrece progresivamente al disminuir la  $a_w$  a valores menores de 0.957. Estos resultados son similares a lo reportado por Gillespie y Crawford (1986) para *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. farinosus* al reducir la disponibilidad de agua a valores menores 0.970 de  $a_w$ . La  $a_w$  es un criterio de evaluación para el cultivo sólido debido a que simula un microambiente con bajo contenido de agua (Raimbault y Alazard 1980). Siendo las cepas ATCC 26854 y UDLA las que presentaron la mejor producción de biomasa a bajas  $a_w$ .

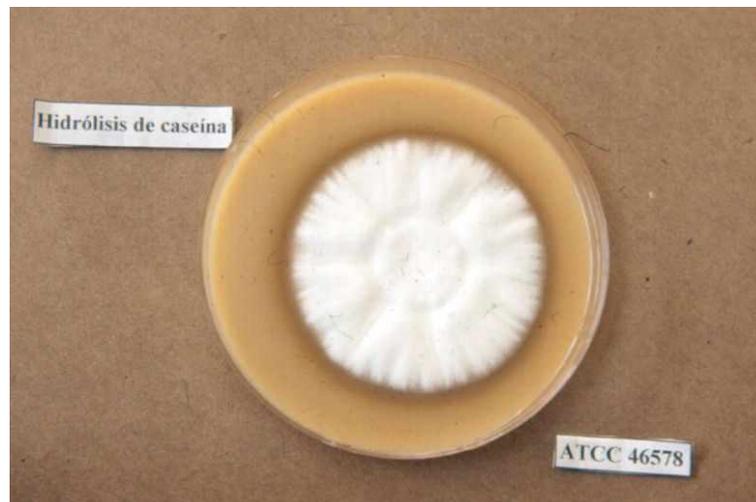
## 5.2 Actividad enzimática semicuantitativa (Halos de hidrólisis)

Las altas actividades proteolíticas y quitinolíticas son características de las cepas infectivas, así se desarrolló una prueba semicuantitativa de dichas actividades enzimáticas en las cepas de hongos entomopatógenos estudiadas. Dichas actividades se determinaron por la tasa de formación de halos, técnica usada generalmente para seleccionar cepas infectivas.

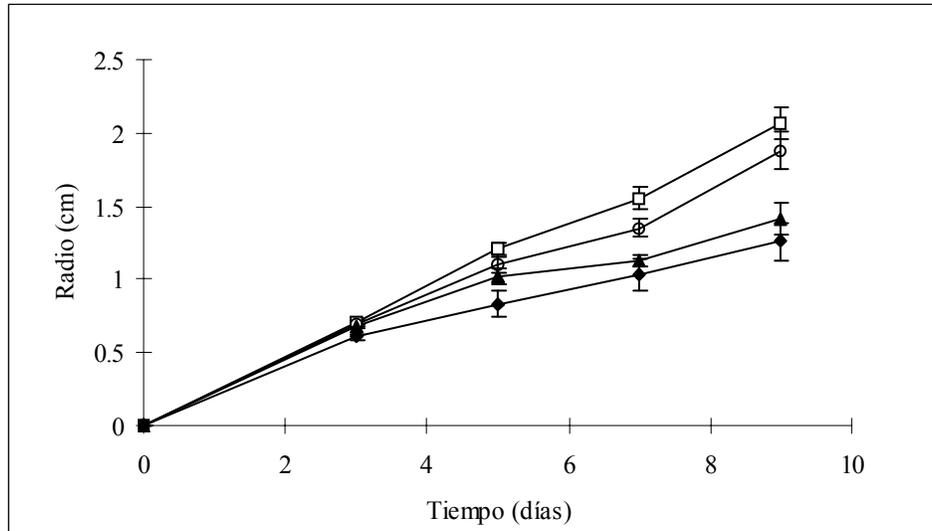


**Figura 5.1** Formación de halos de caseína de diferentes cepas de *L. lecanii*, durante un cultivo en caja Petri. (■) UDLA; (○) ATCC 26854; (▲) ATCC 46578, (◆) COLEP.

La Figura 5.1 muestra las cinéticas de formación de halos debido a la actividad proteolítica en el medio que contiene caseína durante un crecimiento de 9 días en caja Petri. Las cepas UDLA y ATCC 26854 presentaron los mayores halos de actividad enzimática con una tasa de formación de los halos de 0.35 y 0.32 cm día<sup>-1</sup>, respectivamente. Mientras que la cepa ATCC 46578 tuvo una tasa de formación de halos de 0.29 cm día<sup>-1</sup> y por último la cepa COLEP presentó la tasa de formación de halos mas baja de 0.25 cm día<sup>-1</sup>. La Figura 5.2 muestra el halo de hidrólisis de caseína debido a la actividad proteolítica.

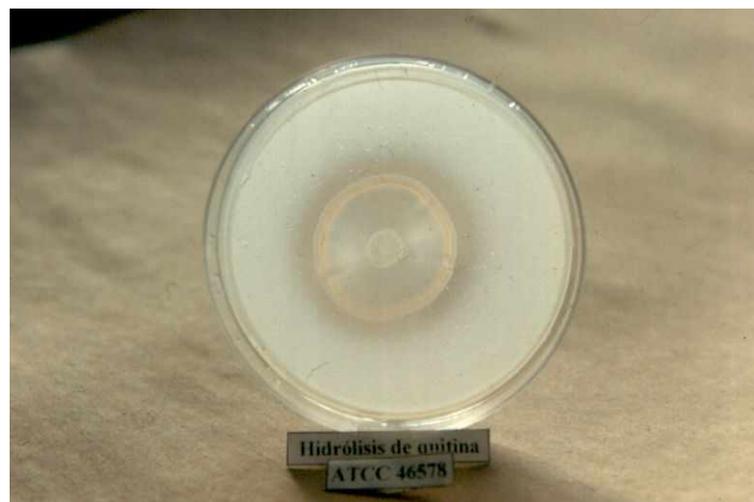


**Figura 5.2** Formación del halo de caseína de la cepa de *L. lecanii* ATCC 46578.



**Figura 5.3** Formación de halos de quitina de diferentes cepas de *L. lecanii*, durante un cultivo en caja Petri. (■) UDLA; (○) ATCC 26854; (▲) ATCC 46578, (◆) COLEP.

La Figura 5.3 presenta las cinéticas de formación de halos de la actividad quitinolítica, que son comparativamente menores a los obtenidos en los halos de caseína, debido a que el medio que contiene quitina coloidal es pobre en nutrientes. Igualmente, las cepas UDLA y ATCC 26854 presentan las mejores tasa de formación de halos de  $0.22$  y  $0.20 \text{ cm día}^{-1}$ , respectivamente. Para la cepa ATCC 46578 la tasa fue de  $0.15 \text{ cm día}^{-1}$  y para la cepa COLEP fue de  $0.13 \text{ cm día}^{-1}$ . Debido a que la expresión de altas actividades quitinolíticas esta asociada a la virulencia de las cepas (Jackson y col., 1985), aparentemente si se emplearan estas determinaciones de actividades enzimáticas para evaluar una cepa, la cepa UDLA tendría las mejores características.

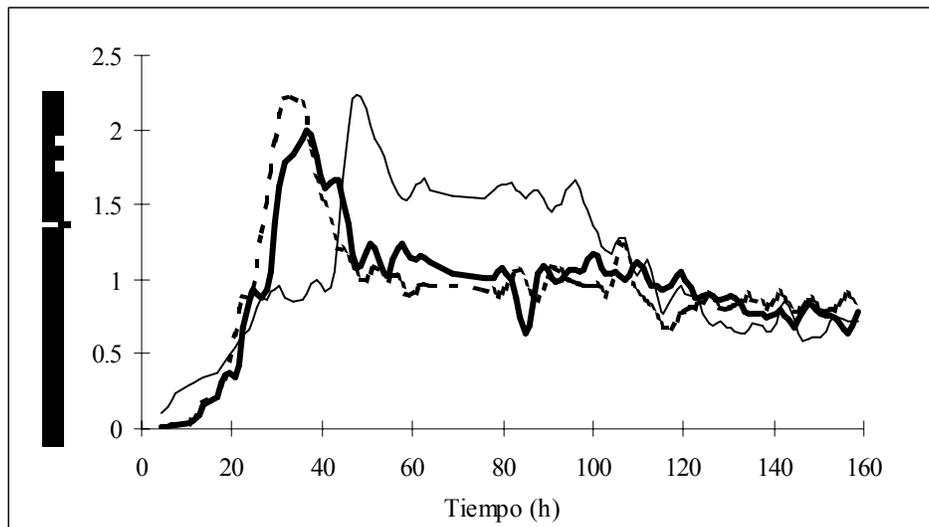


**Figura 5.4** Formación del halo de hidrólisis de quitina de la cepa de *L. lecanii* ATCC 46578.

La Figura 5.4 muestra los halos de hidrólisis de quitina ensayados en caja Petri. Por tanto se continuó estudiando las cepas UDLA, ATCC 26854 y 46578. En cuanto a la cepa COLEP, obtenida de un aislado de Tabasco, Mex. tuvo los halos de actividad enzimática menores y un menor crecimiento a bajas  $a_w$ . Además, en un ensayo preliminar de crecimiento en Agar utilizando como sustrato cutícula de *S. purpurascens* en caja Petri, no se observó germinación, ni crecimiento de la cepa COLEP, por lo que fue descartada para estudios posteriores.

### 5.3 Estimación del crecimiento por la evolución del CO<sub>2</sub> en FMS

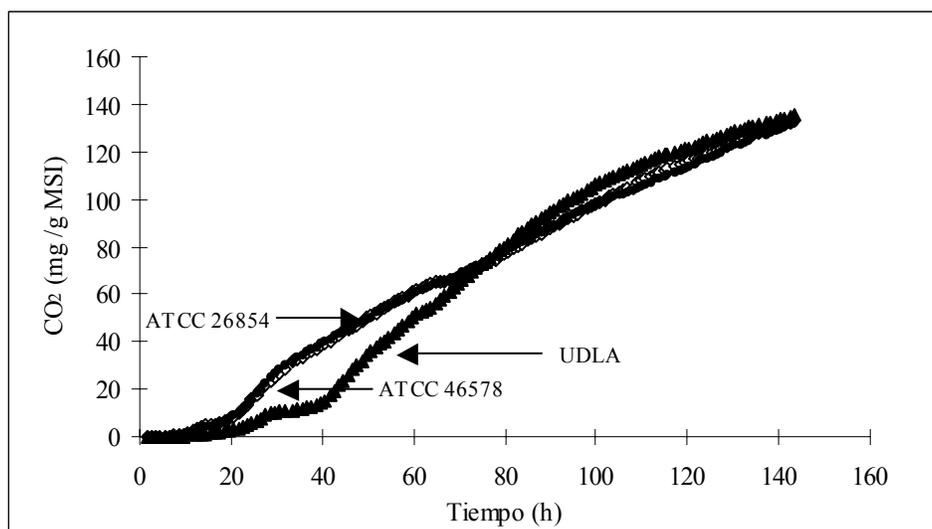
Una manera de conocer el estado fisiológico de un cultivo sólido, es a través del monitoreo en línea del CO<sub>2</sub> producido, que permite identificar las diferentes fases del crecimiento. La Figura 5.5 muestra los perfiles de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> de las tres cepas con mayor potencial infectivo sobre un medio que contiene como única fuente de carbono cutícula de *S. purpurascens*, saltamontes común.



**Figura 5.5** Evolución de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> de tres cepas de *L. lecanii* cultivadas sobre cutícula de *S. purpurascens*. ATCC 26854, ( - - - ); ATCC 46578: ( — ); UDLA, ( — ).

La cepa ATCC 26854 alcanzó una tasa máxima de producción de 2.3 mg de CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> (g MSI)<sup>-1</sup>, a las 30 horas de cultivo, mientras que la cepa ATCC 46578 fue 18 % menor con una tasa máxima de producción de 1.9 mg de CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> (g MSI)<sup>-1</sup> a las 35 horas de cultivo. En el caso de la cepa UDLA alcanzó valores de 2.3 mg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> (g MSI)<sup>-1</sup> semejantes a la cepa 26854, pero hasta las 46 horas de cultivo. Se observa que al término del cultivo los niveles de la tasa de producción

para las tres cepas se mantienen constantes alrededor de  $0.9 \text{ mg CO}_2 \text{ h}^{-1} (\text{g MSI})^{-1}$ . La producción de  $\text{CO}_2$ , permite suponer que el hongo utilizó la cutícula como fuente de carbono. No se detectó actividad celulolítica y el bagazo de caña simplemente sirvió de soporte. Proponemos que el  $\text{CO}_2$  producido sea un criterio adecuado para seleccionar la cepa con mayor virulencia que degrade la cutícula en el menor tiempo, ya que factores ambientales como la luz ultravioleta y la baja humedad relativa afectan a los conidios disminuyendo su viabilidad. Por lo tanto, la cepa ATCC 26854 resultó la que presentó la mayor tasa de producción en el tiempo mas corto, aunque la cepa UDLA tuvo similar producción de  $\text{CO}_2$  su máxima tasa se alcanzó 16 horas después, observándose una meseta posiblemente debido a la dificultad de degradar la cutícula. En cuanto a la cepa ATCC 46578 la producción de  $\text{CO}_2$  fue comparativamente menor. Al comparar la producción total de  $\text{CO}_2$  debido al consumo de la cutícula como fuente de carbono, después de 6 días de cultivo, se observó que la producción que alcanzó fue aproximadamente de  $133 \text{ mg CO}_2 (\text{g MSI})^{-1}$  para todas las cepas sin existir diferencia significativa. Aunque la diferencia fue visible entre las 20 y 65 horas de cultivo, como se muestra en la Figura 5.6.



**Figura 5.6** Producción acumulada de  $\text{CO}_2$  de tres cepas de *L. lecanii* cultivadas sobre cutícula de *S. purpurascens*. ATCC 26854, (●); ATCC 46578: (◇); UDLA, (▲).

Los perfiles de producción de  $\text{CO}_2$  correspondientes a las cepas ATCC 26854 y 46578 aparentemente son similares y no es observable las diferencias que se muestran en las tasas de producción de  $\text{CO}_2$ , como se demostró en la Figura 5.5. Respecto al perfil correspondiente a la cepa UDLA en las primeras horas del cultivo se presentó una menor producción de  $\text{CO}_2$  y a partir

de las 75 horas se observó un aumento en el CO<sub>2</sub> producido hasta llegar a ser similar a las otras cepas. Cabe mencionar que a pesar de que *S. purpurascens* no es un hospedero habitual de *L. lecanii*, las esporas se adhirieron y germinaron debido posiblemente a las interacciones hidrofóbicas no específicas (Jeffs y Khachatourians 1997) y posiblemente esto sea la causa del retardo del crecimiento de la cepa UDLA. Finalmente, la cepa que presentó el mejor crecimiento aparente en el cultivo sólido fue la cepa ATCC 26854.

Las diferencias mostradas respecto a la actividad enzimáticas entre las cepas ATCC 26854 y UDLA, podrían explicar los perfiles observados en la Figura 5.5 y 5.6. Las microfibrillas de quitina están localizadas dentro de una estructura proteica, haciendo que sea esencial la presencia de proteasas para permitir la completa degradación de la quitina (Jackson y col., 1985). Aún cuando la cepa UDLA presentó una actividad quitinolítica alta, la degradación de la cutícula de *S. purpurascens* fue más lenta.

#### **5.4 Análisis de las actividades enzimáticas en fermentación líquida y en fermentación sólida**

Un criterio de selección en el presente estudio estaría basado en altas actividades proteolíticas y quitinolíticas, pero la producción de las enzimas difiere en cada cepa de acuerdo al tipo de fermentación que se utilice, siendo los principales la fermentación líquida (FL) y la fermentación sólida (FS), y por tanto consideramos necesario hacer la comparación de las actividades enzimáticas de los dos sistemas de cultivo para identificar la cepa mejor adaptada al cultivo sólido.

La Tabla 5.2 muestra las actividades enzimáticas para las tres cepas de *L. lecanii* en los dos sistemas de cultivo. En todos los casos la actividad proteolítica fue mas baja en FL. Estas actividades comparativamente a la FS fueron 66, 35 y 92 % mas bajas para la actividad proteolítica en las cepas ATCC 26854, ATCC 46578 y UDLA, respectivamente. Para la actividad quitinolítica, las actividades en FL fueron 40 y 23 % mas bajas respecto a la FS en las cepas ATCC 26854 y UDLA, respectivamente. La cepa ATCC 46578 presentó los niveles más altos de las actividades enzimáticas al probarse en FL, principalmente referente a la actividad quitinolítica que se incrementó tres veces más que en FS.

Tabla 5.2 Actividades enzimáticas obtenidas en FS y FL para las cepas de *L. lecanii* después de 4 días de cultivo.

Cepas	Actividades enzimáticas (U.E.)			
	Fermentación sólida		Fermentación líquida	
	Proteolítica <sup>a</sup>	Quitinolítica <sup>b</sup>	Proteolítica <sup>a</sup>	Quitinolítica <sup>b</sup>
ATCC 26854	33.9 ± 2.4	37.4 ± 1.7	11.5 ± 0.7	22.2 ± 3.7
ATCC 46578	17.8 ± 2.2	13.5 ± 1.1	11.5 ± 0.2	47.4 ± 2.3
UDLA	14.9 ± 0.1	46.2 ± 1.1	1.2 ± 0.14	35.3 ± 1.8

<sup>a</sup> (U.E.) El cambio de 0.1 de absorbancia por  $\text{min}^{-1} (\text{g cutícula})^{-1} (\text{ml medio de cultivo})^{-1}$

<sup>b</sup> (U.E.)  $\text{mmol de p-nitrophenol min}^{-1} (\text{g cutícula})^{-1} (\text{ml medio de cultivo})^{-1}$

La adaptabilidad de cada cepa respecto al sistema de cultivo, podría explicar las diferencias mostradas en las actividades enzimáticas para las cepas 26854 y 46578.

Respecto a los resultados que nos interesan tocantes a la FS, la cepa ATCC 26854 presentó los valores de actividad proteolítica más alta, ésta fue cerca del doble de la obtenida en las otras cepas. Acerca de la actividad quitinolítica, la cepa UDLA presentó los valores mas altos de actividad enzimática siendo 1.2 y 3.4 veces superior en relación a las cepas ATCC 26854 y 46578, respectivamente. El pH final del cultivo se incrementó en todos los casos como resultado de la actividad proteolítica con la liberación de grupos aminos. Al final del cultivo sólido, los valores de proteína total fueron similares en todas las cepas siendo alrededor de  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ . Los valores de  $a_w$  al final de la fermentación fueron cercanos a 0.99 para todas las cepas.

## 5.5 Conclusiones

Los presentes resultados indican diferentes niveles de actividad proteolítica en cada cepa cuando se realizaron los ensayos de hidrólisis de caseína o de hidrólisis del azocoll en el cultivo sólido. La cepa UDLA presentó la tasa de formación de halos de caseína más alta, pero la mas baja actividad proteolítica al degradar la cutícula *S. purpurascens* en el cultivo sólido. Siendo la caseína y la cutícula químicamente diferentes en su estructura, la utilización de sustratos complejos tales como la cutícula del chapulín estaría simulando un ambiente mas cercano al sistema natural de infección que utiliza el hongo y el modelo experimental propuesto sería

adecuado para seleccionar cepas mas infectivas. Por tanto, la cepa ATCC 26854 presentó la mayor actividad proteolítica y una actividad quitinolítica ligeramente menor a la presentada por la cepa UDLA. La cepa ATCC 26854 presentó la mejor adaptación al cultivo sólido, como se mostró por la tasa de producción de CO<sub>2</sub>.

Cuando se consideran simultáneamente los siguientes criterios: crecimiento a baja  $a_w$ , producción de CO<sub>2</sub> y actividades enzimáticas, la mejor cepa adaptada para expresar los sistemas enzimáticos de proteasas y quitinasas en FS sería la ATCC 26854. Por otra parte, en FL la cepa que mostraría los mejores títulos en ambas actividades sería la ATCC 46578. En cuanto a la cepa UDLA, se observó una buena actividad quitinolítica y una pobre actividad proteolítica en FS. Es importante señalar que ambas actividades deben estar presentes para seleccionar a una cepa virulenta. La comparación entre los dos tipos de fermentación y los criterios de selección señalados anteriormente permitirían la identificación de la cepa que potencialmente sea la mas adecuada para la FS (Shankaranand y col., 1992). Así la cepa ATCC 26854 fue seleccionada para los estudios posteriores relacionados con el mecanismo de patogenicidad del hongo entomopatógeno.

---

CINÉTICA DE DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE  
LA CUTÍCULA DE *Sphenarium purpurascens* POR  
*Lecanicillium* (Verticillium) *lecanii* EN  
FERMENTACIÓN SÓLIDA

---

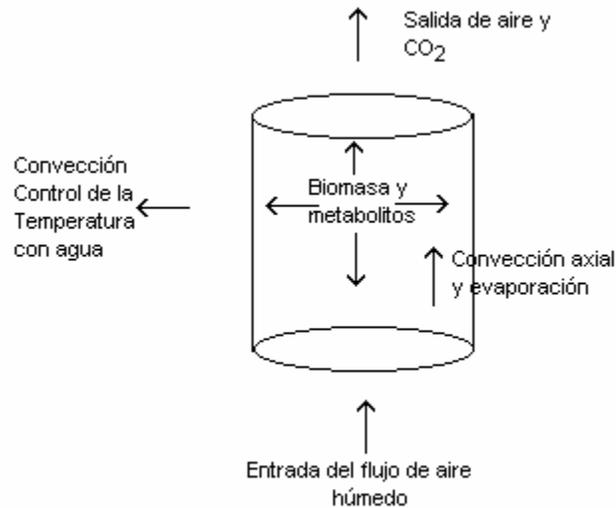
## **CAPÍTULO 6. CINÉTICA DE LA DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LA CUTÍCULA DE *Sphenarium purpurascens* POR *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* EN FERMENTACIÓN SÓLIDA**

Los hongos entomopatógenos producen un conjunto de enzimas extracelulares que se utilizan para degradar la cutícula del insecto, así es importante estudiar el momento en que se expresan dichas enzimas en cultivo sólido. En este capítulo se relacionan las actividades de ambos sistemas enzimáticos proteasas y quitinasas con la producción de CO<sub>2</sub> en el transcurso de la fermentación como resultado de la utilización de la cutícula. Por otra parte, se pone de manifiesto el efecto que tiene la presencia de una fuente de carbono de fácil asimilación en la regulación y expresión de ambos sistemas enzimáticos. En los hongos entomopatógenos la regulación de los genes es compleja y usualmente involucra una combinación de procesos de inducción por el sustrato y de represión por carbono y nitrógeno (St. Leger, 1993). En el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* se ha demostrado que la expresión de las actividades enzimáticas depende de las condiciones ambientales como el pH. Por lo que en este trabajo se estudió la expresión de los dos sistemas enzimáticos en *L. lecanii*, y la producción de CO<sub>2</sub>, bajo dos diferentes condiciones de pH inicial y la presencia de sacarosa. Se obtienen los parámetros cinéticos del crecimiento del hongo y de las actividades enzimáticas para cada una de las condiciones estudiadas. Dentro del capítulo se muestran las cinéticas correspondientes al consumo de sacarosa, al pH, a la *a<sub>w</sub>* y al porcentaje de humedad en el transcurso de la fermentación.

### **6.1 Desarrollo del sistema de cultivo sólido**

Para el estudio de parte del proceso infectivo del hongo entomopatógeno *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii*, se propuso un sistema de cultivo sólido que consistió en una columna con aireación forzada, con entrada de un flujo de aire en condiciones controladas de humedad y temperatura; dentro de la columna se produjeron biomasa y metabolitos, entre ellos las enzimas estudiadas que fueron inducidas al crecer el hongo sobre la cutícula.

La generación de calor metabólico se disipará por transferencia de calor radial y axial (Sangsurasak P y Mitchell D.A., 1998). La temperatura fue controlada con un baño de agua, la medición del CO<sub>2</sub> producido por el microorganismo, permitió medir de manera indirecta el crecimiento del hongo entomopatógeno sobre la cutícula de *S. purpurascens*, como se muestra en la Figura 6.1.



**Figura 6.1** Diagrama de la columna de aireación forzada, representada por un cilindro.

El crecimiento del hongo entomopatógeno sobre el sustrato complejo (cutícula) se evaluó por el CO<sub>2</sub> y las actividades enzimáticas. En el modelo experimental se incluyó cutícula como inductor de enzimas, y una solución de sales minerales impregnada en bagazo de caña.

Dentro del sistema propuesto se asumió que:

- El CO<sub>2</sub> medido correspondió a la actividad metabólica del hongo, por tanto se consideró que la tasa del CO<sub>2</sub> producido es una medida indirecta de la biomasa formada.
- Los parámetros cinéticos del crecimiento del hongo fueron ajustados a partir de la integración de los valores experimentales de  $dCO_2/dt$ , utilizándose la ecuación de Gompertz:

En forma diferencial:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \mu_{CO_2} \ln \left( \frac{CO_{2\max}}{CO_2} \right) \quad (6.1)$$

En forma integrada

$$CO_2 = CO_{2\max} \exp \left[ -b \exp(-\mu t) \right] \quad (6.2)$$

- La tasa de las actividades enzimáticas de proteasas y quitinasas fueron descritas empíricamente por la ecuación de Gompertz

Usando la forma integral

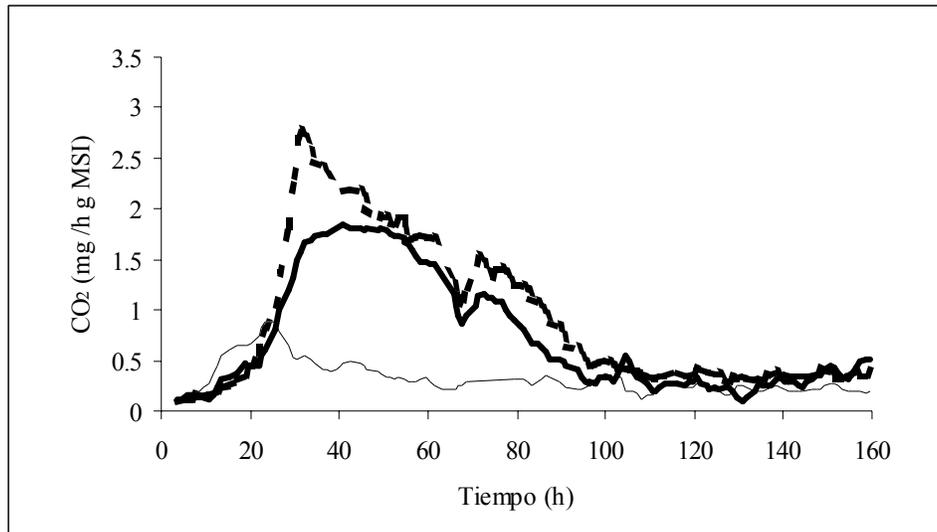
$$e = \exp \left[ (-b \exp(-k t)) \right] \quad (6.3)$$

- El ajuste del modelo se llevó a cabo por el método de los mínimos cuadrados resuelto por el algoritmo de Newton de Solver en Excel 2000 y calculado con un intervalo de confianza del 95 %.
- La regresión fue evaluada con el coeficiente de regresión  $r^2$  con una prueba de diferencia absoluta promedio.

## 6.2 Efecto de la sacarosa en la evolución del CO<sub>2</sub>

Una vez seleccionada la cepa que presentó la mejor adaptación al cultivo sólido se estudió el efecto que tiene la adición de una fuente de carbono fácilmente asimilable al medio de cultivo propuesto para el crecimiento del hongo.

Los resultados se muestran en la Figura 6.2 con los perfiles de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> de la cepa ATCC 26854 durante un cultivo de 7 días. Se evaluaron tres medios de cultivo que contenían; cutícula (6%), cutícula (6%) adicionada de sacarosa (1%) y sacarosa (1%) como control.



**Figura 6.2.** Evolución de la tasa de producción de  $\text{CO}_2$  de la cepa ATCC 26854 de *L. lecanii* cultivado en tres tipos de medios: Cutícula 6 % ( ——— ); Cutícula 6 % y sacarosa 1 %: ( - - - - ); Sacarosa 1 %, como control ( ——— ).

El perfil de evolución del  $\text{CO}_2$  del medio que contiene sacarosa alcanzó una máxima tasa de producción de  $\text{CO}_2$  de  $0.9 \text{ mg h}^{-1} (\text{g MSI})^{-1}$  a las 20 horas de cultivo, mientras, que el medio con cutícula produjo un perfil con niveles de  $1.8 \text{ mg CO}_2 \text{ h}^{-1} (\text{g MSI})^{-1}$  a las 42 horas de cultivo. El medio que contiene cutícula y que se le adicionó sacarosa produjo un perfil que alcanzó  $2.7 \text{ mg CO}_2 \text{ h}^{-1} (\text{g MSI})^{-1}$  a las 36 horas. La adición de sacarosa incrementó aproximadamente un 50 % la tasa de producción de  $\text{CO}_2$  en un menor tiempo de cultivo respecto al medio que contenía solo cutícula. El perfil de  $\text{CO}_2$  correspondiente al medio con cutícula muestra una meseta en el intervalo de 34 a 58 horas de cultivo, alcanzando su máxima producción después de las 40 horas de cultivo. A partir de las 50 horas los perfiles de los dos medios son similares. El perfil de  $\text{CO}_2$  correspondiente al medio con sacarosa cae rápidamente después de las 24 horas y al no detectarse actividad celulolítica se confirmó que el hongo no utilizó el bagazo de caña como fuente de carbono, lo que apoya la idea de que solo tiene la función de ser soporte para su crecimiento dentro del cultivo sólido. Resultados similares obtuvieron St Leger y col (1997) al no detectar actividad celulolítica en *L. lecanii* al crecerlo en un cultivo líquido. La esporulación comienza aproximadamente a partir de las 96 horas de cultivo y alcanza su máximo a los 10 días, en ambos casos, semejantes a los resultados que obtuvieron Dorta y Arcas (1998) con *M. anisopliae*.

Los perfiles de las tasas de producción de CO<sub>2</sub> en el cultivo sólido, en los casos en que se usa o no sacarosa, muestran diferencias cuando se utilizan sustratos de fácil asimilación y complejos. Cabe señalar que el CO<sub>2</sub> producido midió indirectamente la biomasa formada y en la etapa del crecimiento exponencial la adición de sacarosa acelera la tasa de crecimiento, esto se ve reflejado en el pico de CO<sub>2</sub> generado, en cambio en el sustrato complejo la habilidad del hongo para utilizarlo es más difícil, lo que se ve reflejado en el bajo perfil de CO<sub>2</sub>. En ambos casos se observaron que los perfiles presentaron tres fases, una inicial con el aumento de la tasa de producción de CO<sub>2</sub>, que podríamos suponer una asociación del crecimiento con la respiración, una intermedia con la desaceleración de la tasa de CO<sub>2</sub> y una final con la que la tasa de producción de CO<sub>2</sub> se produce asociado al mantenimiento.

### **6.3 Efecto del pH inicial y la sacarosa sobre la tasa de producción de CO<sub>2</sub> y las actividades enzimáticas**

El pH ambiental es determinante en la producción de las enzimas que secreta *M. anisopliae* para degradar la cutícula (St Leger y col., 1998). En este trabajo se estimó pertinente estudiar el efecto del pH y la presencia de otra fuente de carbono sobre la expresión de la actividad proteolítica y quitinolítica del hongo *L. lecanii*. Las condiciones estudiadas en el medio de cultivo fueron: medio con cutícula (6%) adicionado o no de sacarosa (1%) ensayadas a pH inicial de 4 y 6.

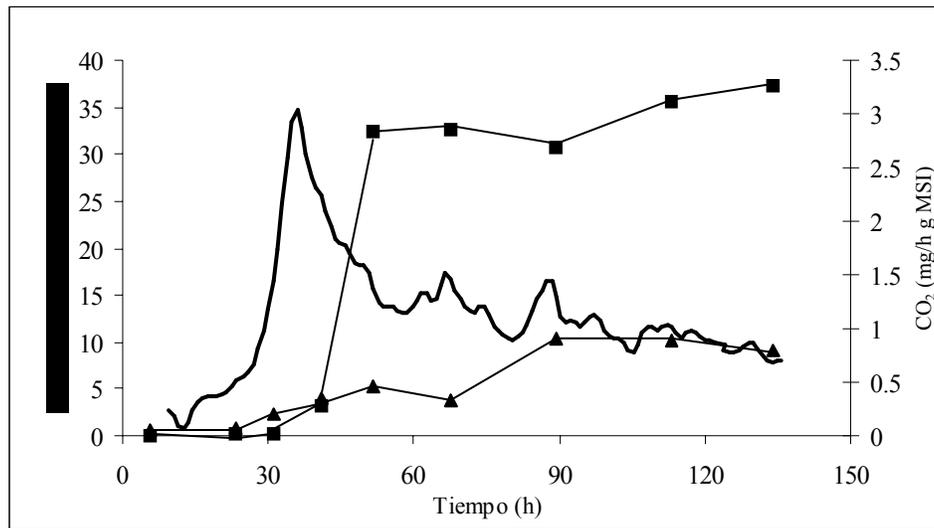
#### **6.3.1 Cultivo sólido a pH 6**

##### **Cultivo con cutícula y sacarosa**

Los resultados de la Figura 6.3 corresponden a un pH inicial de 6, donde se muestran los perfiles de tasa de producción de CO<sub>2</sub> junto con las actividades proteolíticas y quitinolíticas del medio de cultivo que contiene cutícula y sacarosa. La máxima tasa producción de CO<sub>2</sub> se presenta a las 35 horas, que corresponde a 3 mg de CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> (g MSI)<sup>-1</sup>. La actividad proteolítica se detectó a partir de las 31 horas y alcanzó su nivel máximo de actividad aproximadamente a las 51 horas de cultivo. La actividad enzimática se mantuvo en valores cercanos a las 35 U.E. durante el

resto del cultivo. Respecto a la actividad quitinolítica, la actividad se detectó a partir de las 23 horas del cultivo, se observó que la actividad se incrementó en forma desfasada del perfil de CO<sub>2</sub>, alcanzando su máxima actividad de 104 U.E. a las 90 horas de cultivo.

Cabe indicar que la actividad quitinasa se observa durante el resto del cultivo, a pesar de la presencia de las proteasas esta es una característica deseable, debido a que la acción conjunta de ambos tipos de enzimas para degradar la cutícula. El perfil de la actividad proteolítica se presenta desfasada del perfil correspondiente a la tasa de producción de CO<sub>2</sub>. Esto es debido al posible efecto de la sal de amonio y a la presencia de la sacarosa que ocasiona que el hongo no utilice a la cutícula como nutriente en una primera etapa y afecte el tiempo en que se exprese la actividad proteolítica.

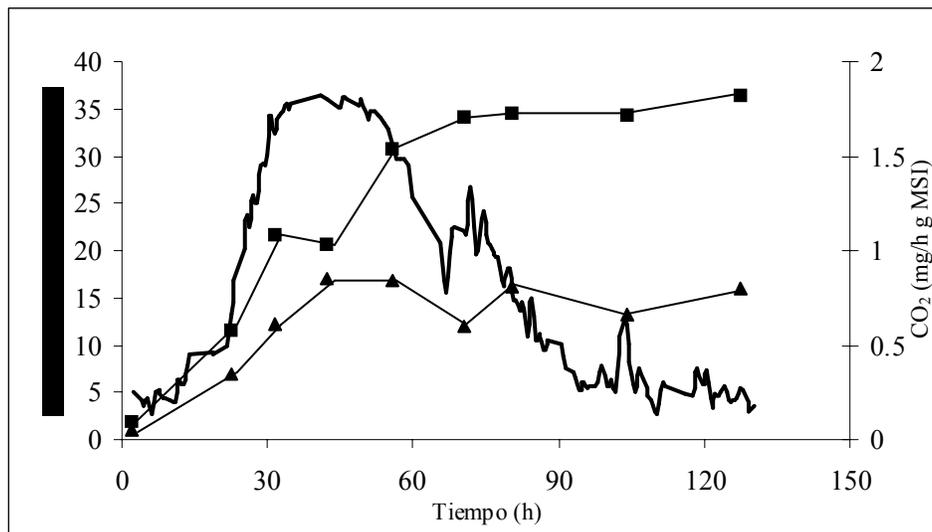


**Figura 6.3** Evolución del CO<sub>2</sub> y las actividades enzimáticas de *L. lecanii* ATCC 26854 a un pH inicial de 6, en un medio que contiene cutícula 6 % y sacarosa 1 %: Tasa de producción de CO<sub>2</sub> ( — ); actividad proteolítica ( ■ ); actividad quitinolítica/10 ( ▲ ).

### Cultivo con cutícula

Al utilizar un medio de cultivo que contiene cutícula de *S. purpurascens* como única fuente de carbono, como se muestra en la Figura 6.4. La tasa de producción de CO<sub>2</sub> disminuye un 60 % respecto al anterior, alcanzando una tasa de 1.8 mg de CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> (g MSI)<sup>-1</sup> a las 37 horas de cultivo.

Se observa que el perfil correspondiente a la tasa de producción de CO<sub>2</sub> se encuentra asociado al incremento de las dos actividades enzimáticas. Se detectó actividad proteolítica desde las 22 horas del cultivo, alcanzándose su máxima actividad enzimática a las 55 horas de cultivo. Posteriormente la actividad proteolítica fue constante durante el resto del cultivo con valores cercanos a 35 U.E., semejante a los obtenidos en el medio de cultivo que contiene cutícula y sacarosa. Aunque la diferencia fue respecto al tiempo de fermentación en que se detectó la actividad proteolítica, pues en el medio que contiene cutícula se presentó 9 horas antes, que en el caso anterior, debido posiblemente a que la presencia de glucosamina reguló la expresión de la proteasas extracelulares (Bidochka y Khachatourians, 1988).



**Figura 6.4** Evolución del CO<sub>2</sub> y las actividades enzimáticas de *L. lecanii* ATCC 26854 a un pH inicial de 6, en un medio que contiene cutícula 6 %: Tasa de producción de CO<sub>2</sub> ( — ); actividad proteolítica ( ■ ); actividad quitinolítica/10 ( ▲ ).

Es interesante observar que el hongo utiliza a la cutícula como única fuente de carbono, como se muestra en la Figura 6.4. Desde los primeros tiempos de fermentación se detecta actividad quitinolítica y su máxima expresión de actividad fue de 169 U.E. a las 43 horas de cultivo; y que correspondió también a la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub>. Manteniéndose la actividad quitinolítica durante el resto del cultivo. La actividad quitinolítica fue 1.6 veces mayor a la obtenida en el medio de cultivo de cutícula y sacarosa. La cutícula del insecto fue la principal fuente de carbono y de nitrógeno del hongo y la producción de CO<sub>2</sub> corresponde al consumo de la

cutícula por el hongo, esto nos permite suponer que el momento del inicio del proceso infectivo con la consecuente producción de las enzimas correspondería a las primeras 24 horas, semejante al reportado por St. Leger y col. (1987b) para *M. anisopliae*.

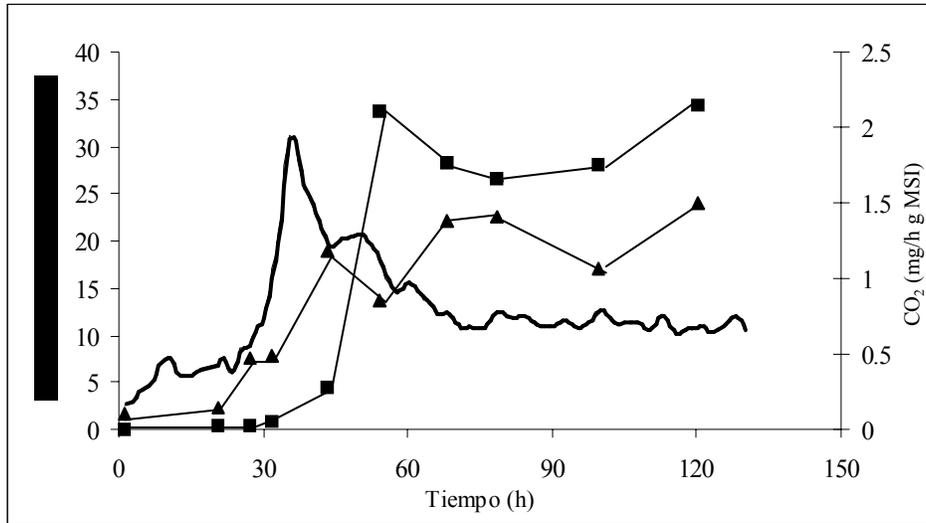
Podemos establecer que la adición de otra fuente de carbono como la sacarosa incrementa la producción de CO<sub>2</sub>, lo que indirectamente muestra una mayor producción de biomasa. Sin embargo es posible que haya tenido un efecto represor en la expresión de las enzimas quitinolíticas que son utilizadas para degradar a la cutícula, ya que la expresión de las enzimas quitinolíticas involucradas en la degradación de la quitina hasta *N*-acetilglucosamina se detectan en un tiempo posterior en el cultivo, esto es importante considerar en las formulaciones de bioinsecticidas.

### 6.3.2 Cultivo sólido a pH 4

#### Cultivo con cutícula y sacarosa

Cuando se empleó un pH inicial de 4 en el cultivo, se observan diferencias respecto a los patrones de CO<sub>2</sub> anteriormente mostrados a pH 6. La Figura 6.5 muestra el perfil de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> de un cultivo con cutícula y sacarosa, en donde alcanzó su máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> de 2 mg h<sup>-1</sup> (g MSI)<sup>-1</sup> a las 36 horas de cultivo. Aunque semejante a lo mostrado en la Figura 6.3 se observó una disminución en la tasa de producción de CO<sub>2</sub> en aproximadamente un 33 %, como resultado de una menor actividad fisiológica y posiblemente debido a un pH que no es el adecuado para el desarrollo de *L. lecanii*.

Sin embargo, la expresión de la actividad proteolítica no fue afectada por el cambio del pH inicial del cultivo, detectándose actividad enzimática a las 30 horas del cultivo. Teniendo su máxima expresión de actividad de 35 U.E. aproximadamente a las 55 horas, la actividad se mantuvo constante durante el resto del cultivo. Es importante señalar que la expresión de la actividad proteolítica se encontró desfasada respecto al perfil de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> semejante al observado en los perfiles del mismo cultivo pero con pH inicial de 6.



**Figura 6.5** Evolución del CO<sub>2</sub> y las actividades enzimáticas de *L. lecanii* ATCC 26854 a un pH inicial de 4, en un medio de cutícula 6 % y sacarosa 1 %: Tasa de producción de CO<sub>2</sub> ( — ); actividad proteolítica ( ■ ); actividad quitinolítica/10 ( ▲ ).

Respecto a la actividad quitinolítica, se detectó actividad quitinolítica a partir de las 23 horas de cultivo alcanzando valores aproximados de 220 U.E. a las 68 horas de cultivo, casi 2.2 veces mas que los obtenidos en las mismas condiciones de cultivo a pH 6. Además estos resultados son 31 % mayores a los obtenidos en el medio que contiene solo cutícula a pH 6. Los valores máximos de expresión se alcanzan en tiempos más cortos del cultivo.

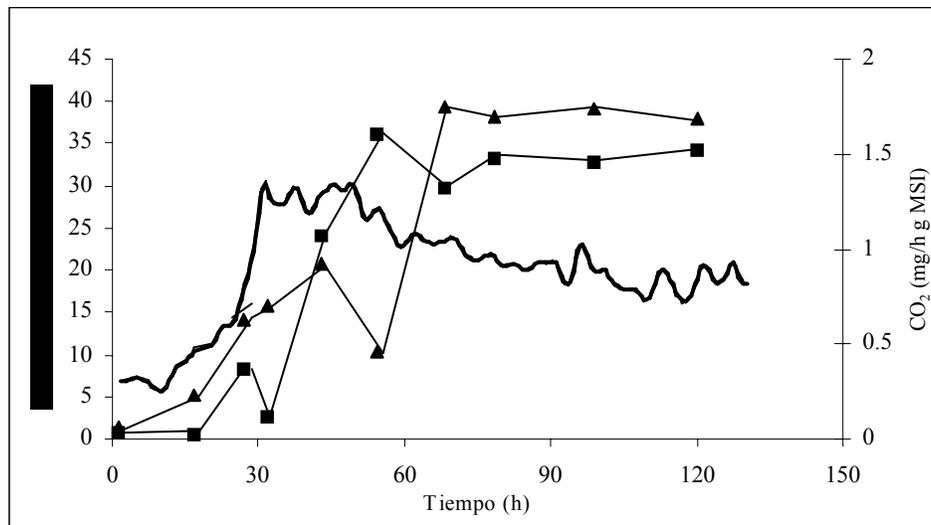
### Cultivo con cutícula

Para estudiar el efecto del pH inicial de 4 en el medio de cultivo que contiene cutícula como única fuente de carbono, la Figura 6.6 muestra los perfiles de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> y de las actividades enzimáticas. La máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> es de 1.33 mg h<sup>-1</sup> (g MSI)<sup>-1</sup> a las 37 horas, resultando 25 % menor al obtenido a un pH inicial de 6 presentando una meseta que corresponde a los tiempos de cultivo entre las 36 y 50 horas de cultivo, así también se observa disminución de la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> menos pronunciado que en los casos anteriores

A través del perfil de CO<sub>2</sub> producido podemos inferir que el proceso de degradación de la cutícula resultó más lento. Sin embargo, la actividad proteolítica se comienza a detectar a partir

de las 26 horas, teniendo su máxima expresión de 35 U.E. a las 54 horas de cultivo. Aparentemente, la tasa de producción de CO<sub>2</sub> es menor cuando se degrada un sustrato complejo y en condiciones menos favorables para el cultivo del hongo. Sin embargo, la expresión de las actividades proteolíticas fue semejante a las obtenidas en las otras condiciones de cultivo.

Es interesante observar que la actividad quitinolítica se detectó desde las 19 horas de cultivo. La actividad quitinolítica alcanzó su máxima expresión enzimática de 393 U.E. a las 68 horas del cultivo y se mantuvo constante en el transcurso del cultivo. Estos resultados de actividad quitinolítica fueron 3.9, 2.3 y 1.8 veces mayores a los anteriormente obtenidos en las otras condiciones de cultivo. El sistema modelo experimental permitió acelerar la expresión de la actividad quitinolítica comparada con los resultados reportados por Siqueira Pinto y col. (1997) quienes detectaron actividad de quitinasa en *Metarhizium anisopliae* después de 48 horas de cultivo y la máxima actividad después de 144 horas en cultivo líquido, además demostraron que la glucosa actúa como represor de la expresión de las quitinasas en cultivo líquido y que aparentemente la sacarosa presenta semejante represión en nuestros estudios.



**Figura 6.6** Evolución del CO<sub>2</sub> y las actividades enzimáticas de *L. lecanii* ATCC 26854 a un pH inicial de 4, en un medio de cutícula 6 %: Tasa de producción de CO<sub>2</sub> ( — ); actividad proteolítica ( ■ ); actividad quitinolítica/10 ( ▲ ).

Tocante a las actividades proteolíticas se observó que los valores máximos de actividad fueron similares en todos los casos y las condiciones que se estudiaron no afectaron a las

proteasas. En cambio se presentaron diferencias en los valores máximos de las quitinasas, así como en sus tiempos de expresión.

El pH inicial del cultivo aparentemente afecta la expresión de la actividad quitinolítica, como se observó en el caso de *Aspergillus nidulans* (Caddick y col., 1986), para la secreción de fosfatasas. Por otra parte, cabe destacar que la actividad quitinolítica de los hongos entomopatógenos es importante para su patogenicidad, debido a que las microfibrillas de quitina constituyen el 30 % de la cutícula de los insectos y potencialmente representarían una barrera para la invasión del hongo sobre el hospedero.

La penetración de la cutícula en condiciones adversas ha permitido sobrevivir al hongo dentro del hospedero durante su proceso coevolutivo y aparentemente se ha mostrado que condiciones difíciles de crecimiento aumenta la expresión enzimática para poder infectar a los insectos (Bidochka y Khachatourians, 1994). St-Leger y col. (1998) mostraron en sus estudios que el pH ambiental afecta los niveles de expresión de las proteasas y quitinasas de *Metarhizium anisopliae*. En sus estudios las proteasas denominadas Pr1a y Pr1b son expresadas mayoritariamente a pH 8.0 y la Pr2 y carboxipeptidasa a pH 5.0 y pH 3.0, respectivamente. En cambio las quitinasas son expresadas mayoritariamente a pH 5. Por lo que respecta a nuestros resultados, podemos concluir que la expresión y regulación de las proteasas y quitinasas de *V. lecanii* es afectada por el pH ambiental, semejantes a lo que ocurre con *M. anisopliae*.

#### **6.4 Determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento y de las actividades enzimáticas del hongo *L. lecanii* sobre la cutícula de *S. purpurascens***

Para llevar a cabo una comparación cuantitativa de los resultados experimentales obtenidos para las cuatro diferentes condiciones de cultivo se utilizó la ecuación de Gompertz (Zwietering M.H. y col. 1990) con la que se estimaron los parámetros cinéticos del sistema de cultivo propuesto, tanto para el CO<sub>2</sub> producido, como para las actividades enzimáticas.

### 6.4.1 Evaluación del crecimiento de *Lecanicillium (Verticillium) lecanii*

La evolución del CO<sub>2</sub> de *L. lecanii*, estimada a partir de la producción de CO<sub>2</sub>, fue ajustada por la ecuación de Gompertz. En el sistema experimental usado se obtuvieron los datos experimentales de la concentración de CO<sub>2</sub> (%) en una corriente de gas (ml/min), de tal forma que se obtienen las tasas instantáneas de formación de CO<sub>2</sub> en función del tiempo. De esta forma se ajustan los datos experimentales a la ecuación diferencial directamente (Levenspiel, 1987)

La ecuación de Gompertz fue usada por ser asimétrica en el punto de inflexión; esta característica permite describir con exactitud la cinética de producción de CO<sub>2</sub> (Saucedo-Castañeda y col. 1991). A pesar que se ha demostrado que es adecuada para describir curvas de crecimiento (Zwietering M.H. y col. 1990), no hay referencias bibliográficas que describan cinéticas de crecimiento en cultivos sólidos utilizando la ecuación de Gompertz.

Tabla 6.1 Parámetros ajustados de los datos experimentales, a diferentes condiciones de *L. lecanii* en cultivo sólido.

Parámetros	Condiciones de cultivo			
	Cutícula y sacarosa pH 6	Cutícula pH 6	Cutícula y sacarosa pH 4	Cutícula pH 4
CO <sub>2</sub> max ( mg / g MSI)	106.6	97.1	77.09	88.52
μ (h <sup>-1</sup> )	0.041	0.047	0.039	0.033
CO <sub>2</sub> ( mg t = 0 )	0.545	0.11	0.35	0.04
B	6.78	7.51	5.73	5.28
Coefficiente de Correlación	0.994	0.998	0.997	0.998

La Tabla 6.1 presenta los parámetros cinéticos del crecimiento del hongo *L. lecanii* de cada condición estudiada. En los resultados se observa que el pH inicial afecta la tasa específica de crecimiento, un pH inicial de 6 favorece el crecimiento de *L. lecanii* respecto al pH inicial de 4, aparentemente no hubo efecto de la sacarosa en la tasa específica de crecimiento en relación a cada condición de pH inicial. Sin embargo, la producción de CO<sub>2</sub> es mayor cuando se utiliza sacarosa a pH 6 inicial, mientras que y en un ambiente con mayor acidez la respuesta es contraria,

debido posiblemente a la mayor actividad quitinolítica, mostrada anteriormente en el apartado 6.3.2.

### 6.6.3 Comparación cuantitativa de las actividades enzimáticas de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii*

Las actividades enzimáticas fueron ajustadas de la ecuación de Gompertz (6.4) que simuló la expresión de las enzimas en el transcurso de la fermentación. El modelo permitió obtener los perfiles de las tasas de actividad de las enzimas en las diferentes condiciones de cultivo.

Tabla 6.2. Valores de los parámetros ajustados de los datos experimentales obtenidos por la ecuación de Gompertz a diferentes condiciones de cultivo, para las actividades enzimáticas.

Condiciones de cultivo	$e_{\max}$	K	Coefficiente de correlación	Desviación media de la actividad (U.E.) <sup>a</sup>
Actividad quitinolítica				
Cutícula y sacarosa pH 6	111.3	0.0447	0.968	0.271
Cutícula pH 6	160.15	0.17	0.952	0.3707
Cutícula y sacarosa pH 4	213.27	0.073	0.891	0.3622
Cutícula pH 4	380.45	0.062	0.96	0.4310
Actividad proteolítica				
Cutícula y sacarosa pH 6	31.9	1.103	0.988	0.0955
Cutícula pH 6	35.27	0.067	0.992	0.0782
Cutícula y sacarosa pH 4	29.1	0.477	0.986	0.1478
Cutícula pH 4	31.66	0.464	0.943	0.1389

<sup>a</sup> Determinada por  $\left[ \sum (U.E.i_{\text{obs}} - U.E.i_{\text{cal}})^2 \right]^{1/2} / n$

La Tabla 6.2 muestra los parámetros cinéticos obtenidos a partir de este modelo. En todos los casos los coeficientes de correlación de las regresiones fueron superiores a 0.94, exceptuando en el caso de la actividad quitinolítica de la condición de cultivo de cutícula y sacarosa a un pH inicial de 4, que debido a la dispersión de los datos experimentales. Los valores calculados de  $e_{\max}$  para las actividades quitinolíticas obtenidos por el modelo no difieren mas del 6 % de los valores experimentales, mientras que los valores calculados de  $e_{\max}$  para las actividades

proteolíticas a pH inicial de 6 las diferencias fueron menores a 4 % respecto a los experimentales y a pH inicial de 4 las diferencias respecto a los experimentales fueron cercanas al 15 %. A pesar que su desviación media de los datos calculados y observados fue menor respecto a las actividades quitinolíticas.

El modelo de Gompertz es un tipo de función de crecimiento sigmoideal que se ha empleado para las cinéticas de producción de metabolitos, Saucedo-Castañeda y col., (1990) la utilizaron para la cinética de producción de ácido láctico y en nuestro estudio fue aplicada a las cinéticas del CO<sub>2</sub> producido y las actividades enzimáticas dentro del cultivo sólido.

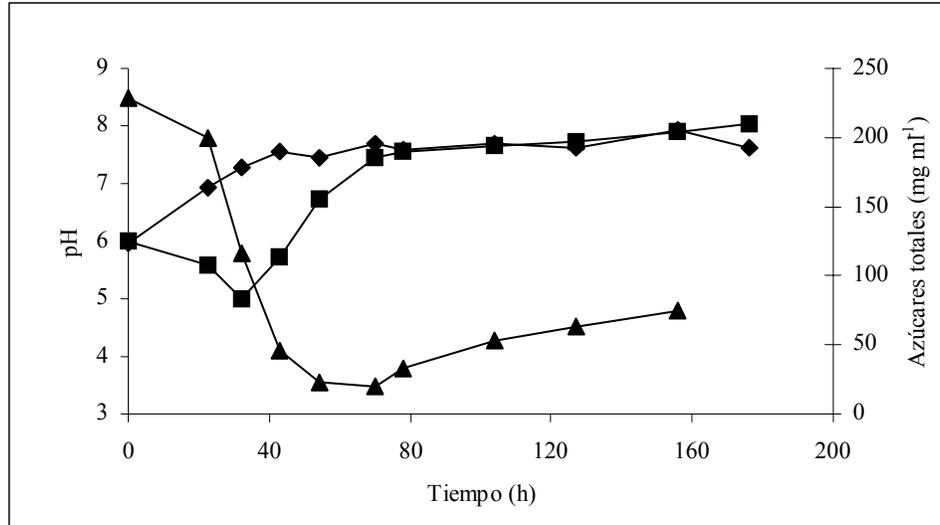
Dadas a las características que presenta la fermentación sólida, donde los procesos de transporte están limitados por la difusión y la disponibilidad de la superficie de contacto, el modelo no estructurado de Gompertz permitió obtener resultados favorables. Se asume que la  $\mu$  sería independiente de la concentración del sustrato dado que la cutícula es un sustrato complejo y su concentración sería mucho mas alta que la constante de saturación ( $K_s$ ) de la ecuación de Monod (Saucedo-Castañeda y col., 1990). Por otra parte el CO<sub>2</sub> max correspondería a la densidad máxima de biomasa empacada en la columna.

El ajuste utilizado es simple y podría ser una primera aproximación para evaluar cuantitativamente la fisiología de *L. lecanii* en los procesos infectivos y emplearse para el desarrollo de bioinsecticidas.

## **6.5 Cinética del pH, consumo de sacarosa, humedad y $a_w$ en el cultivo sólido**

### **6.5.1 Cultivos a pH 6**

En el transcurso de la fermentación se presentan cambios en el pH y en la concentración de sacarosa, estos resultados son mostrados en la Figura 6.7, correspondiente a las dos condiciones de cultivo establecidas para el pH inicial de 6.



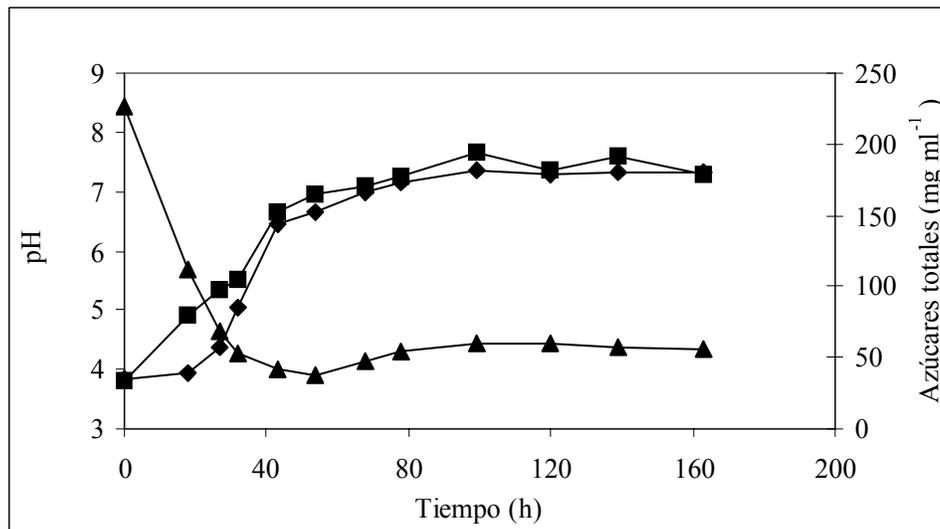
**Figura 6.7.** Cinética de pH y de consumo de sacarosa del cultivo sólido con un pH inicial de 6. Medio de cultivo con cutícula (◆); medio de cultivo con cutícula y sacarosa (■); consumo de sacarosa (▲).

Para el perfil correspondiente al medio de cultivo con cutícula y sacarosa durante las primeras 40 horas de cultivo, el pH disminuyó hasta 5, para posteriormente incrementarse hasta pH 8. Esto debido a que el hongo consumió inicialmente la sacarosa que la cutícula, llegando a niveles bajos a las 60 horas de cultivo. Posteriormente la concentración se incremento levemente debido a la aparición de hexosaminas, como resultado de la actividad quitinolítica.

En ambas condiciones el pH del medio de cultivo se incrementa hasta llegar a niveles cercanos a pH de 8, siendo semejantes a los obtenidos por Malathi y Chakraborty (1991) al producir una proteasa alcalina por cultivo sólido, pero a diferencia de nuestros resultados, la actividad de la proteasa alcalina decae después de las 120 horas. Asimismo se observa el aumento del pH desde el inicio del cultivo que contiene cutícula únicamente y que llega niveles de pH de 7.6. El pH se incrementó como resultado tanto de la actividad proteolítica como de la actividad quitinolítica. Se asume que la aparición de grupos  $\text{NH}_4^+$  fue resultado de la utilización de la glucosalina como fuente de carbono y la liberación del grupo amino, primero dentro de la célula y posteriormente expulsado al exterior. Este proceso se presenta en el transcurso de la infección del hongo que permite alcalinizar la hemolinfa como elemento complementario del mecanismo de patogenicidad del hongo.

### 6.5.2 Cultivo a pH 4

Respecto a las condiciones establecidas a un pH inicial de 4 en el cultivo sólido, la Figura 6.8 muestra los perfiles obtenidos del pH y concentración de sacarosa. Se observa que el perfil correspondiente a la concentración de sacarosa disminuyó en los primeros tiempos del cultivo, semejante al observado al pH inicial de 6, hasta alcanzar la menor concentración aproximadamente a las 50 horas de cultivo. Aparentemente el consumo de sacarosa fue mas rápido en estas condiciones. El perfil del pH correspondiente al medio con cutícula y sacarosa mantiene el pH a 4 hasta las 20 horas del cultivo, incrementándose posteriormente hasta alcanzar un pH de 7.3, a las 100 horas de cultivo. El perfil de pH del medio de cutícula incrementa el pH hasta alcanzar de 7.5 a las 100 horas de cultivo. Consideramos que el hongo utiliza la sacarosa como fuente de carbono antes que el sustrato complejo y que esto incide en los patrones de tasa de producción de CO<sub>2</sub> y en la actividad quitinolítica.



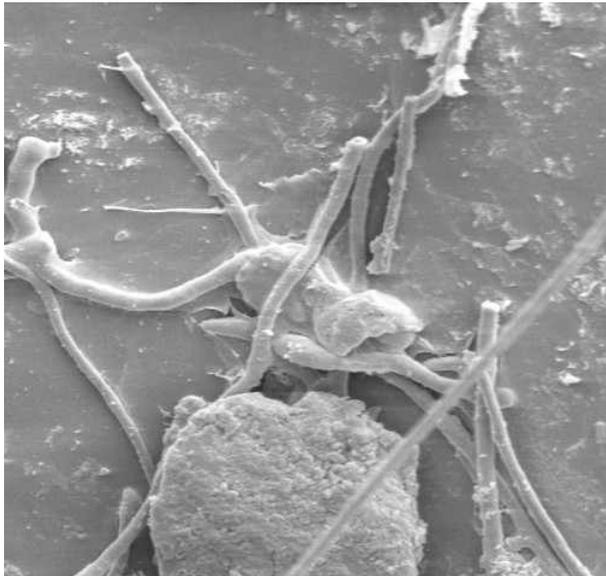
**Figura 6.8.** Cinética de pH y de consumo de sacarosa del cultivo sólido con un pH inicial de 4. Medio de cultivo con cutícula (◆); medio de cultivo con cutícula y sacarosa (■); consumo de sacarosa (▲).

Como un comportamiento típico en el sistema de cultivo propuesto (en columnas de vidrio con un flujo de aire humedecido) los niveles de humedad se mantienen dentro del intervalo aproximado de 78 y 73.5 % y la  $a_w$  en un intervalo de 0.998 a 0.986 durante el transcurso de la fermentación de 11 días.

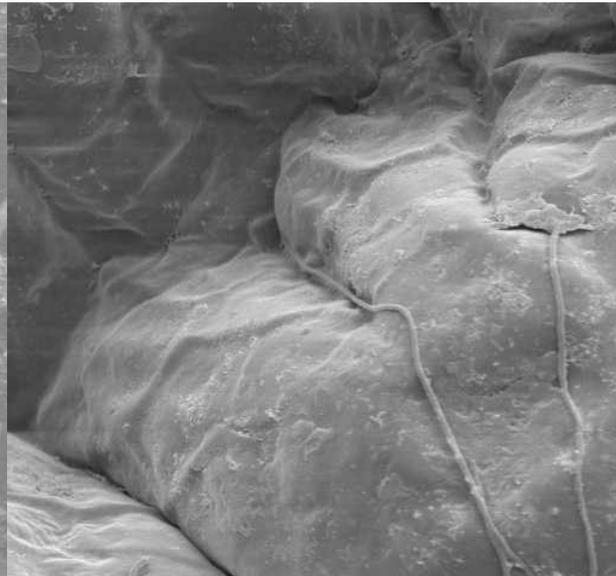
## 6.6 Interacción del hongo *L. lecanii* con la cutícula de *S. purpurascens*

La actividad enzimática inducida por la cutícula de *S. purpurascens* esta ligada al proceso de adhesión y germinación de la espora sobre la superficie de la cutícula, la colonización del hongo sobre el insecto implica que la espora interactúe a través de hidrofobinas que actúan como sensores para reconocer superficies hidrofóbicas exclusivas de las cutículas de los insectos (St-Leger y col., 1998; Bidochka y col., 1995). La utilización de la microscopia electrónica de barrido (MEB) permitió observar la interacción de la espora de *L. lecanii* con la superficie de la cutícula de *S. purpurascens*

En la Figura 6.9 se observa la formación del apresorio y de los tubos germinales sobre la superficie de la cutícula. Este hecho permite demostrar que el modelo de cultivo sólido propuesto es semejante al proceso natural de infección que presentan los hongos entomopatógenos. La germinación y crecimiento del hongo sucede sobre la superficie de la cutícula (Hajek y St-Leger, 1994). La colonización implica el proceso inicial de penetración de los tubos germinales sobre la cutícula, el proceso es facilitado al penetrar los tubos por las membranas intersegmentales que se producen al formarse las capas de cutícula.



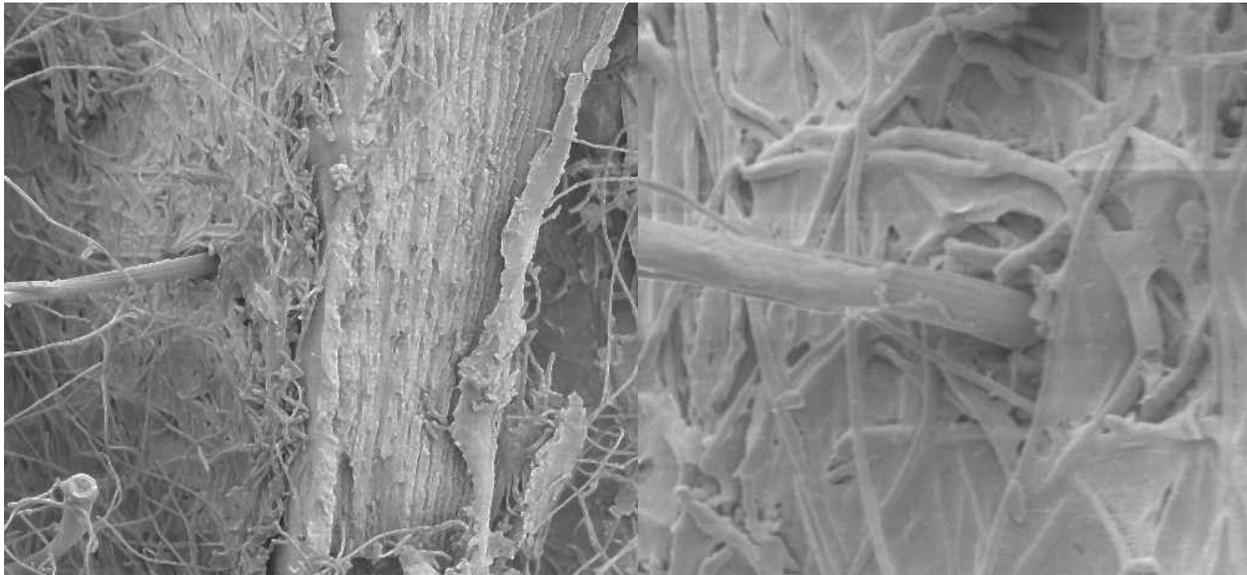
**Figura 6.9** Formación del apresorio sobre la cutícula de *S. purpurascens* a las 24 horas del cultivo sólido (4kV).



**Figura 6.10** Penetración del hongo en las membranas intersegmentales de la cutícula a las 24 horas de cultivo (4kV).

La Figura 6.10 muestra un tubo germinal del hongo que penetra la cutícula en los espacios intersegmentales, además se observa la formación de una estructura mucilaginosa que mantiene el tubo germinal adherido sobre la superficie de la cutícula (Boucias y col. 1988), este evento ocurre a las 24 horas de iniciado el cultivo sólido. Las hifas de *L. lecanii* colonizan extensivamente la superficie de la cutícula, semejante a lo observado por Askary y col (1999). Sin embargo, ellos no detectan la formación del apresorio.

A las 48 horas el micelio invade totalmente la superficie de la cutícula, tanto por la parte externa (epicutícula) como en la parte interna (epidermis). La Figura 6.11 presenta un corte transversal de la cutícula en la que se observa la estructura de la red de quitina que forma parte de la procutícula, se estimó que el micelio fue más abundante en la superficie exterior. Al hacer un acercamiento con la MEB sobre la superficie externa de la cutícula (Fig. 6.12), se observa que la superficie esta completamente cubierta por el micelio, semejante al que se aprecia en los cadáveres de los insectos infectados por el hongo (Hall 1981).



**Figura 6.11** Corte transversal de la cutícula donde se observa la invasión del hongo sobre la superficie a las 48 horas del cultivo (4 kV)

**Figura 6.12** Ampliación de la figura 6.11 muestra la invasión del micelio sobre la superficie de la cutícula (4 kV)

Las imágenes de microscopía electrónica son consistentes con los eventos que caracterizan las infecciones de hongos entomopatógenos (Charnley, 1989). Los eventos de adhesión e

invasión del micelio del hongo, junto con las actividades quitinolíticas detectadas desde el inicio del cultivo sustentan el modelo de infección propuesto.

## 6.7 Conclusiones

Se estudió el efecto del pH inicial y la presencia de sacarosa, en la producción de CO<sub>2</sub> y las actividades enzimáticas durante el cultivo sólido. La adición de sacarosa aumenta la tasa de producción de CO<sub>2</sub> (33 %) y es consumida antes de la cutícula.

La tasa de producción de CO<sub>2</sub> a pH inicial de 6 es mayor que a pH 4. La actividad respiratoria fue 46 % superior a condiciones de pH 6, estas condiciones de cultivo son aparentemente las más adecuadas para el crecimiento del hongo. El pH inicial y la presencia de sacarosa no tienen efecto significativo en la expresión de las actividades proteolíticas para las cuatro condiciones estudiadas.

La presencia de la sacarosa afecta la actividad quitinolítica y debe considerarse al desarrollar un bioinsecticida. Su presencia retarda la expresión de la actividad quitinolítica. Es importante resaltar que las condiciones de pH inicial de 4 provoca una menor tasa de producción de CO<sub>2</sub>, pero la actividad quitinolítica se incrementa hasta cuatro veces más. La detección de la actividad quitinolítica desde el inicio confirma el papel que tienen estas enzimas en el proceso de degradación de la cutícula (Askary y col., 1999). La sacarosa es consumida inicialmente y alcanza sus niveles mínimos a las 60 horas de cultivo aproximadamente.

Debido a la actividad proteolítica el pH de la fermentación se incrementa hasta llegar a niveles de pH de 8, como resultado probablemente de la aparición de grupos NH<sub>4</sub><sup>1+</sup> en el medio, aunque al agregar la sacarosa disminuye (pH 6) o se mantiene (pH 4), para posteriormente incrementarse a los niveles mencionados. La alcalinización tendría dos efectos, uno que correspondería a la mayor actividad de la enzima proteolítica principal, semejante a la Pr1 de *M. anisopliae* y otro sobre la hemolinfa para ocasionar la muerte del insecto.

El sistema de fermentación sólida fue adecuado para mantener los niveles de humedad entre 75 y 78 %, debido al flujo de aire húmedo y la capacidad de retención de agua que presenta el bagazo de caña. La  $a_w$  se mantiene en los niveles correspondientes de 0.986 y 0.996. A través del ajuste que proporcionó el modelo de Gompertz se hizo la comparación cuantitativa de las condiciones ensayadas, tanto para la formación de  $CO_2$  como la aparición de las actividades enzimáticas. Los valores de  $\mu$  son mayores a pH 6 que a 4 lo cual sugiere que esta condición es más favorable para el crecimiento de *L. lecanii*, además que los niveles de producción de  $CO_2$  total también fueron superiores. La comparación cuantitativa de las condiciones ensayadas es una primera aproximación para evaluar el sistema modelo propuesto.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido apoyaron los resultados experimentales al mostrar la formación del apresorio, la formación de los tubos germinales y la invasión del micelio del hongo sobre las partículas de cutícula. Con las imágenes podemos afirmar que el sistema fue semejante al proceso natural y abre un campo de estudio para la comprensión de las interacciones microambientales y nutricionales del proceso infectivo del hongo *L. lecanii* a partir del modelo de cultivo sólido propuesto.

---

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS  
ENZIMAS PROTEOLÍTICAS Y  
QUITINOLÍTICAS

---

## **CAPÍTULO 7. CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS Y QUITINOLÍTICAS**

En este capítulo se presenta, inicialmente el método de recuperación del extracto crudo enzimático del cultivo sólido. Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización parcial de las actividades proteolíticas y quitinolíticas del extracto crudo respecto al pH. Se estudió el efecto de la temperatura en la estabilidad de las enzimas y en la actividad enzimática. Se determinó la energía de activación de las enzimas del extracto crudo por la ecuación de Arrhenius. Finalmente se determinó el efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad proteolítica durante tres meses.

### **7.1 Proceso de extracción del extracto crudo enzimático**

Aunque los procesos de extracción de un cultivo sólido no han recibido la atención debida, este es un proceso crucial para la separación del producto del material sólido fermentado y que se debe tomar en cuenta para la recuperación de extractos enzimáticos o de esporas de hongos entomopatógenos susceptibles de ser empleados como bioinsecticidas. Es importante considerar dos aspectos: el volumen del producto extraído del fermentado sólido y la concentración de la actividad del producto después de la extracción.

En nuestro caso el proceso de extracción utilizado fue por el método de compresión directa que permitió obtener la mayor cantidad del extracto crudo con actividad enzimática del cultivo utilizando una mínima cantidad de agua agregada. En nuestros resultados se observó que la mayor cantidad del extracto crudo enzimático se puede obtener después de tres extracciones. En las tres extracciones obtuvimos más del 90 % de actividad quitinolítica y el 94 % de la actividad proteolítica, como se observa en la Figura 7.1

Roussos y col. (1992) que propusieron esta metodología recuperaron un 85-95 % después de dos extracciones, que fueron similares a los obtenidos por nosotros. A pesar de ser un método de extracción que permite recuperar la totalidad de la enzima producida no se ha generalizado su utilización en muchos de los casos en que se producen enzimas por FS, pero que resultó adecuado para el sistema establecido.

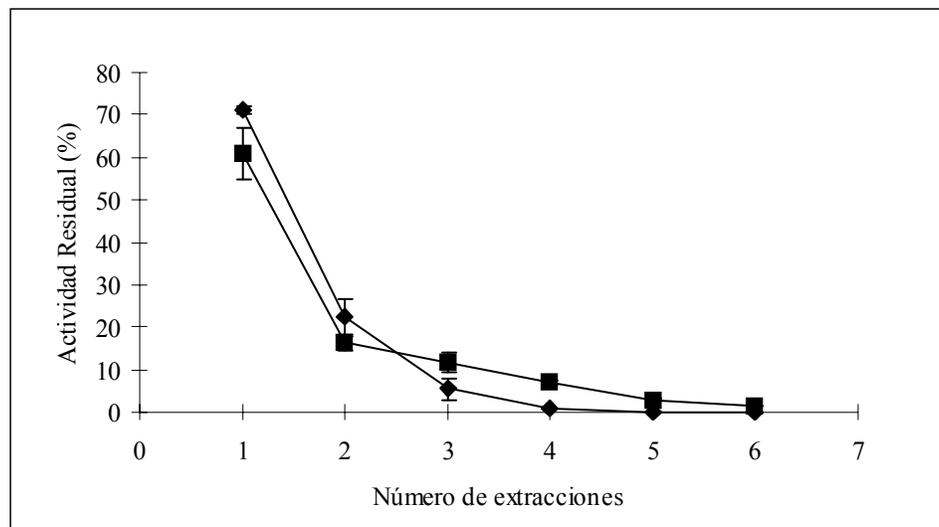


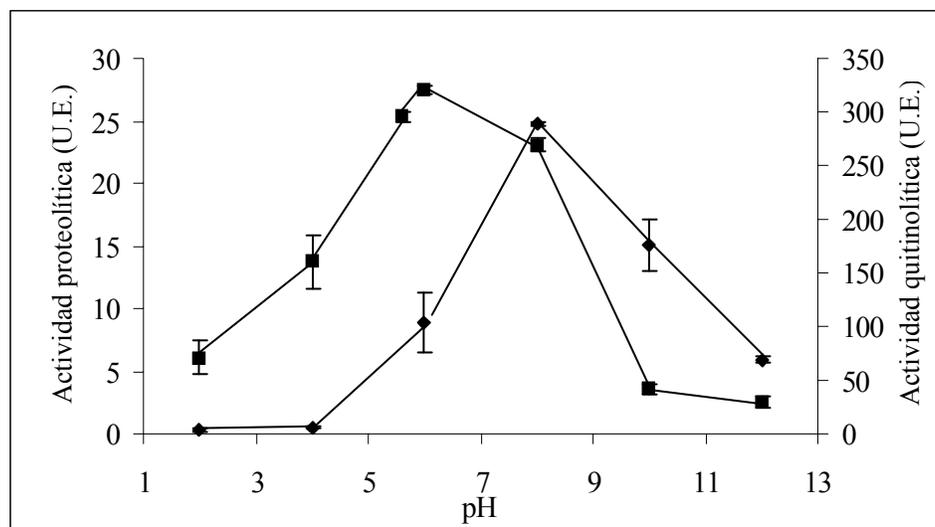
Figura 7.1 Número de extracciones realizadas para la obtención de la totalidad del extracto crudo enzimático. (■) Actividad quitinolítica; (◆) Actividad proteolítica.

## 7.2 Efecto del pH en la actividad de los sistemas enzimáticos de proteasas y quitinasas

En la Figura 7.2 se muestran el efecto del pH sobre la actividad enzimática. Se observa que la máxima actividad quitinolítica se obtuvo con un pH 6.0, estos resultados difieren a los reportados por Coudron y col. (1984) y Siquiera Pinto y col (1991), donde obtuvieron la máxima actividad quitinolítica a un pH de 5.0 con el hongo entomopatógeno *M. anisopliae*, estos resultados nos muestran que las enzimas quitinolíticas tienen su máxima actividad a pH ácido. Por otra parte, la máxima actividad proteolítica obtenida en nuestros experimentos corresponde a un pH 8.0. St-Leger y col (1994) reportaron en sus estudios que un pH de 9.0 correspondía a la máxima actividad proteolítica para el filtrado crudo del cultivo líquido de *M. anisopliae*, aunque la enzima proteolítica principal denominada Pr1 tiene la máxima actividad a un pH de 8.0.

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro sistema de cultivo sólido podríamos inferir que durante el proceso de penetración del hongo sobre la cutícula es importante la expresión inicial de la actividad quitinolítica para degradar y utilizar como fuente de carbono la cutícula, como lo han expresado otros autores y que se observó en nuestros resultados. En cambio, la finalidad de las proteasas es el degradar la matriz proteica de la cutícula y del tejido

del insecto hasta provocar su muerte, cabe indicar que en el transcurso de la fermentación el pH alcanzado correspondió a 8.0, que es el pH adecuado para la actividad proteolítica.



**Figura 7.2.** Perfiles de máxima actividad enzimática respecto al pH. Actividad Proteolítica (♦); Actividad quitinolítica (■)

Respecto a la actividad quitinolítica es importante señalar que el pH inicial afecta su expresión, por lo que se debe valorar la importancia del pH ambiental en su expresión como lo demostró St-Leger y col. (1998) en la infección con *M. anisopliae* sobre *Manduca sexta*. Malathi y Chakraborty (1991) obtuvieron una proteasa alcalina a partir de una fermentación sólida de *Aspergillus flavus* que presenta una alta actividad enzimática a pH de 8.0 y cuya actividad decrece al incrementarse la alcalinidad en forma similar a nuestros resultados.

### 7.3 Efecto de la temperatura en la estabilidad de las enzimas proteolíticas y quitinolíticas

Para determinar la temperatura en que se debilitan los enlaces hidrofóbicos, iónicos y electrostáticos que ocasionan la alteración de la estructura terciaria y cuaternaria de las enzimas, se incubaron las muestras de enzima a diferentes temperaturas y se midieron después las actividades enzimáticas. La Fig. 7.3 muestra el efecto de la temperatura en las enzimas obtenidas del cultivo sólido. Las enzimas proteolíticas muestran una mayor estabilidad en un intervalo de temperatura de 35 a 65 °C y pierden su actividad a temperaturas mayores a 70 °C. Respecto a las

enzimas quitinolíticas, éstas son menos termoestables pues su intervalo de máxima actividad fue de 35 a 40 °C, y partir de los 45 °C comienza a decaer y se desnaturaliza a los 70 °C. Respecto a los resultados obtenidos, las proteasas son enzimas que aparentemente son más termoestables y esa estabilidad es importante para continuar el proceso infectivo del hongo dentro del insecto. En cambio las enzimas quitinolíticas son utilizadas inicialmente para la degradación de la cutícula y su función deja de ser importante para el hongo después que penetrar al insecto.

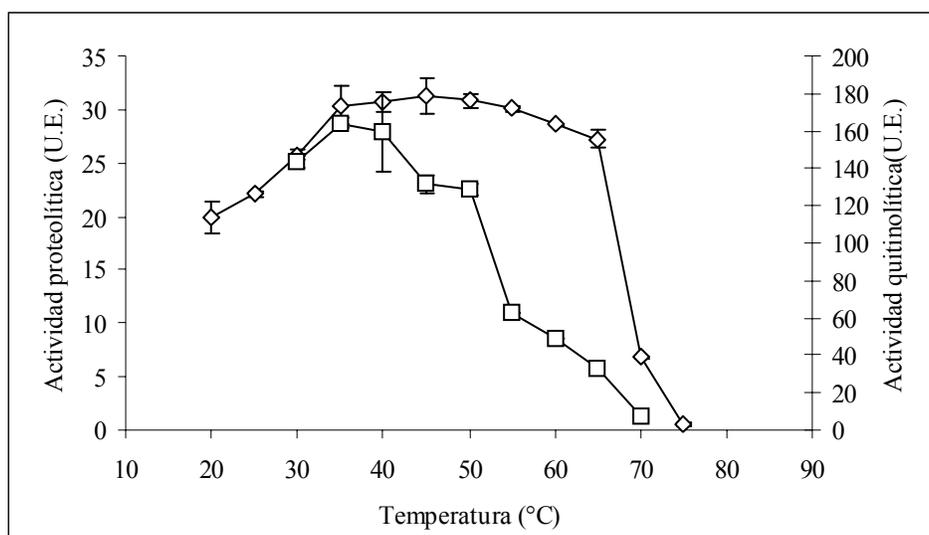


Figura 7.3 Efecto de la temperatura en la actividad del extracto crudo: actividad proteolítica (◇) y en la actividad quitinolítica (□)

#### 7.4 Efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas

Cuando se aumenta la temperatura, la velocidad de una reacción catalizada por una enzima se incrementa y después desciende, esto es porque ocurren dos fenómenos. El primero, al incrementar la temperatura aumenta la velocidad de reacción, como sucede en toda reacción química y el segundo ocurre por desactivación de la enzima se inactiva por desnaturalización. Las velocidades de reacción de ambos sistemas enzimáticos se muestran en la Figura 7.4 en donde se observa que en el caso de las enzimas proteolíticas la velocidad de reacción se incrementa hasta alcanzar una velocidad máxima aproximadamente a los 60 °C, mientras que las enzimas quitinolíticas su velocidad máxima de actividad se alcanzó a los 50 °C.

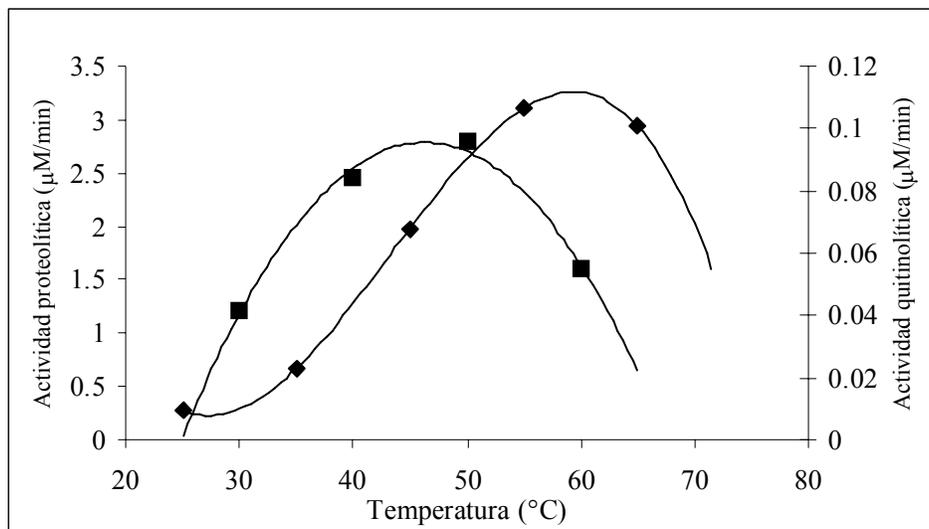


Figura 7.4 Velocidades de reacción de las enzimas del extracto enzimático. Actividad quitinolítica (■); Actividad proteolítica (◆).

Los resultados de la velocidad de reacción de las enzimas son coincidentes a los obtenidos para la termoestabilidad de las enzimas. La Tabla 7.1 muestra los parámetros determinados por la ecuación de Arrhenius. La energía de activación, definida como la mínima energía que deben adquirir las moléculas para poder reaccionar, para los dos sistemas fueron similares a las reportadas para enzimas purificadas cuyo intervalo se encuentra entre los 12 000 y 16 000 cal mol<sup>-1</sup>. El Q<sub>10</sub> que es el factor en que se incrementa la velocidad de reacción al incrementar la temperatura 10 °C, corresponde a valores semejantes para los dos sistemas y corresponden a valores típicos de sistemas biológicos.

Tabla 7.1. Parámetros de las reacciones enzimáticas determinados por la ecuación de Arrhenius para los dos sistemas enzimáticos.

	Quitinolítica	Proteolítica
$E_A$ (cal mol <sup>-1</sup> )	16461	16101
Q <sub>10</sub> <sup>a</sup>	2.36	2.03
V <sub>max</sub> (μM/min)	0.0957 (50 °C)	3.108 (55 °C)

<sup>a</sup> Corresponde al intervalo de 30 a 40 °C

Respecto a las velocidades de reacción, las enzimas proteolíticas presentan una mayor velocidad de reacción respecto a la quitinasas, lo cual es importante para desarrollar el proceso infeccioso sobre el insecto y esto sería debido a su estabilidad a mayores temperaturas.

## 7.5 Estabilidad de almacenamiento en la actividad proteolítica

La fermentación sólida puede emplearse potencialmente para la producción de enzimas, especialmente cuando el interés se orienta hacia el uso del extracto crudo como fungicida o insecticida, así como una fuente de producción de enzimas. Debido a que permite reducir costos de producción respecto a la fermentación sumergida (Tengerdy, 1998). Existe una extensa información bibliográfica sobre las ventajas que ofrece la producción de enzimas por fermentación sólida respecto a la líquida, entre ellas es la simplicidad del equipo, el bajo contenido de humedad y el que las enzimas presentan propiedades fisicoquímicas de ser altamente estables (Pandey y col., 2000). Por lo que se determinó conveniente estudiar la estabilidad por almacenamiento a tres temperaturas del extracto crudo obtenido del cultivo sólido.

La Figura 7.5 muestra la actividad proteolítica relativa al mantenerse los extractos crudos a temperatura ambiente con tres amortiguadores y con agua destilada; la vida media de la enzima, considerando el 50 % de actividad fue de 42 días y se reduce a 38 días con el amortiguador de glicina-NaOH

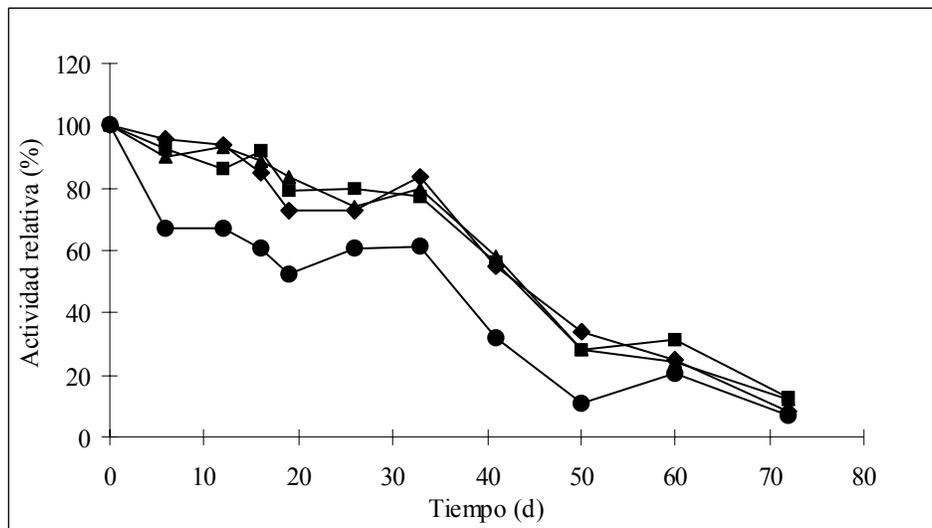


Figura 7.5 Estabilidad de almacenamiento a temperatura ambiente de proteasas. ( ◆ ), Agua destilada, ( ■ ) amortiguador de fosfatos, ( ▲ ) amortiguador de acetatos, ( ● ) Amortiguador glicina-NaOH.

En cambio, si el extracto crudo se conserva en refrigeración (4 °C) o en congelación (-4 °C), la actividad proteolítica se mantiene estable en un periodo mayor de 70 días, como se muestra en las Figuras 7.6 y 7.7.

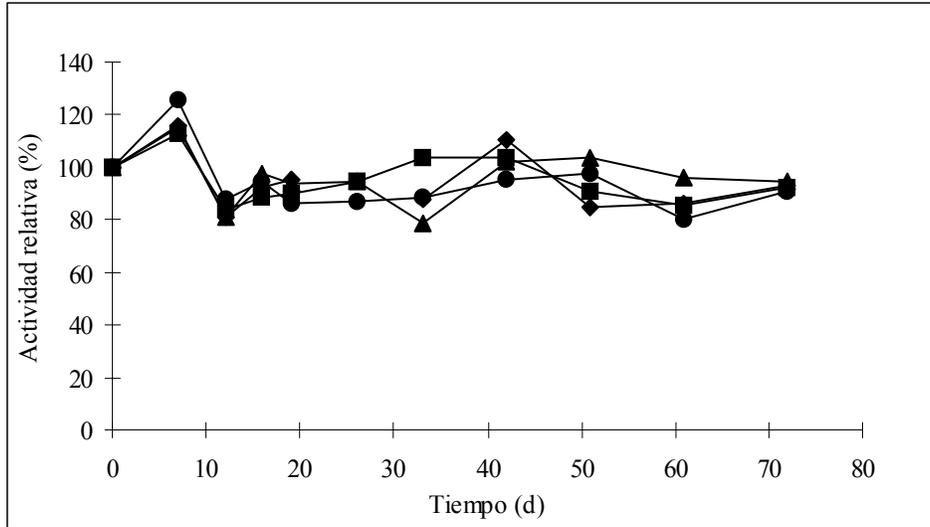


Figura 7.6 Estabilidad de almacenamiento a temperatura de 4 °C de proteasas. ( ◆ ), Agua destilada, ( ■ ) amortiguador de fosfatos, ( ▲ ) amortiguador de acetatos, ( ● ) Amortiguador glicina-NaOH.

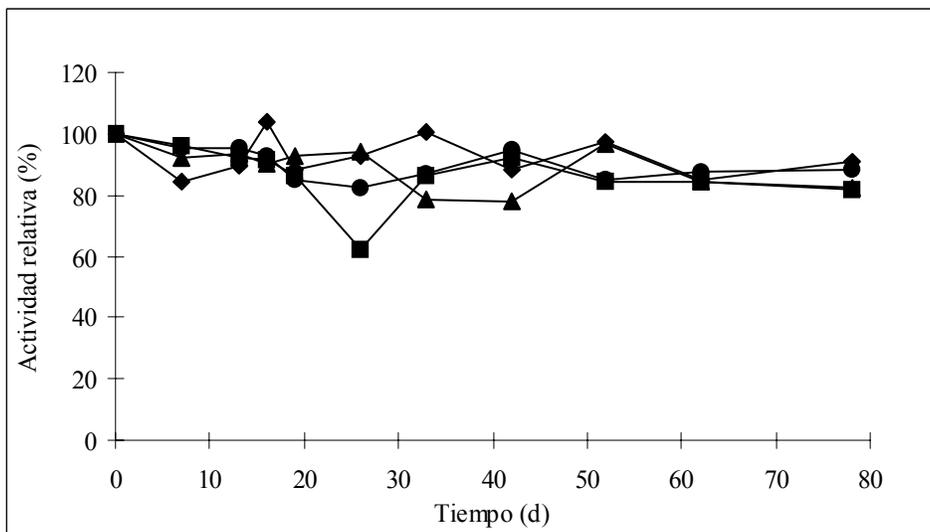


Figura 7.7 Estabilidad de almacenamiento a temperatura de -4 °C de proteasas. ( ◆ ), Agua destilada, ( ■ ) amortiguador de fosfatos, ( ▲ ) amortiguador de acetatos, ( ● ) Amortiguador glicina-NaOH.

Desde el punto de vista biológico, la etapa crucial de infección de los hongos entomopatógenos es que las enzimas sintetizadas por éstos logren degradar la cutícula del insecto en condiciones adversas, por lo que deben ser altamente estables. El proceso infeccioso que se presenta desde la adhesión de la espora hasta la muerte del insecto dura aproximadamente 6 días,

la estabilidad encontrada en el extracto enzimático es suficiente para cubrir el proceso infectivo (Wraight y col., 1998).

## 7.6 Conclusiones

El método de extracción utilizado permite obtener más del 90 % de la actividad de las proteasas y quitinasas que corresponden al extracto crudo del cultivo sólido, después de tres extracciones.

El pH de mayor actividad enzimática para ambos sistemas fueron diferentes, las quitinasas resultaron ser de naturaleza ácida con un pH de mayor actividad de 6.0 y las proteasas fueron de carácter básico con un pH de mayor actividad de 8.0. Respecto al efecto de la temperatura las quitinasas comenzaron a desnaturalizar a los 50 °C y las proteasas se desnaturalizaron hasta una temperatura de 65 °C, resultando ser más termoestables que las quitinasas.

Respecto a los resultados de la energía de activación para ambos sistemas enzimáticos, fueron semejantes a los reportados para otras enzimas y el  $Q_{10}$  fue de alrededor de 2. En relación a su estabilidad de almacenamiento la actividad proteolítica puede prolongarse más de 80 días, por lo que se sugiere que se pueden utilizar para el desarrollo de bioinsecticidas en la que se empleen los conidios y el extracto crudo del cultivo sólido. En concordancia con la termoestabilidad, la velocidad de reacción de las proteasas es mayor a las quitinasas.

---

## CONCLUSIONES GENERALES

---

## CONCLUSIONES

- Se desarrollo un sistema-modelo de fermentación sólida que permite estudiar las interacciones de las variables nutricionales y ambientales en el proceso infectivo de los hongos entomopatógenos.
- La selección de cepas de hongos entomopatógenos, debe considerar simultáneamente los siguientes criterios: crecimiento a baja  $a_w$ , producción de  $CO_2$  y altas actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de la cutícula.
- La utilización del sustrato complejo como la cutícula de *S. purpurascens* permitió inducir las actividades proteolíticas y quitinolíticas. La tasa de producción de  $CO_2$  presentó perfiles diferentes en función de la utilización de sustratos complejos o simples.
- La actividad proteolítica es independiente del pH inicial del cultivo y su expresión es afectada en menor grado por la presencia de sacarosa. Mientras que la actividad quitinolítica presenta su mayor expresión a pH 4 y ésta es afectada por la presencia de sacarosa.
- La producción total de  $CO_2$  es mayor a pH 6 que a 4, lo cual sugiere que esta condición es más favorable para el crecimiento de *L. lecanii*. La comparación cuantitativa de las condiciones ensayadas es una primera aproximación para evaluar el sistema modelo propuesto.
- Las actividades enzimáticas de proteasas y quitinasas fueron parcialmente caracterizadas, estudiando el efecto del pH y de la temperatura. Las quitinasas presentaron su mayor actividad a pH 5.0 y las proteasas a pH 8.0. Respecto al efecto de la temperatura, las proteasas fueron más termoestables que las quitinasas. Las energías de activación, calculadas por la ecuación de Arrhenius, correspondieron a valores típicos de sistemas biológicos.
- En su conjunto el sistema de cultivo propuesto contribuye al entendimiento de la fisiología del cultivo de *L. lecanii* en medio sólido y su relación con las enzimas degradadoras de la

cutícula. Este trabajo demuestra la factibilidad técnica del cultivo sólido para ser utilizado en la producción de bioinsecticidas de hongos entomopatógenos, utilizando las esporas como partículas infectivas contra insectos donde el extracto crudo enzimático tendría dos funciones: fungicida e insecticida. Asimismo, se abre un área de investigación para el diseño y desarrollo de nuevos bioinsecticidas.

---

PERSPECTIVAS

---

## **PERSPECTIVAS**

- Este trabajo abre un campo prometedor para el desarrollo de bioinsecticidas a partir de sustratos agroindustriales y marinos, y sería interesante:
- Estudiar la posibilidad de que el sistema pueda emplearse como bioinsecticida y que utilice tanto los conidios, como los extractos enzimáticos.
- Continuar con estudios a futuro que permitan escalar el sistema hasta la producción a nivel planta piloto, así como complementar la caracterización de las enzimas obtenidas.
- Establecer una metodología sencilla que permita obtener cepas con mayor capacidad de virulencia para su aplicación en campo y con menos problemas de contaminación.
-

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

**BIBLIOGRAFIA**

- Acuña-Argüelles, M., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G. and Favela-Torres E. (1994). Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. *Biotechnology Letters*. **16**, 23-28.
- Armes, M.V., Charyulu, NCLN., Chand, N. and Lonsane, B.K. (1996). *Bioprocess Engineering*. **15**, 289.
- Askary, H., Benhamou, N. And Brodier, J. (1999). Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **74**, 1-13.
- Bau, H., Villaume, C., Lin, C.F., Evrard, J., Quemener B., Nicolas, J.P. and Mejean, L.J. (1994). *Sci Food Agric*. **65**, 315.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. (1988). N-acetyl-D-glucosamin-mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**, 2699-2704.
- Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. (1994). Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*. **64**, 26-32.
- Bidochka, M.J., St-Leger, R.J., Joshi, L. and Roberts, D.W. (1995). The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. *Mycology Research*. **99**, 403-406.
- Blaak, H., Schnellmann, J., Walter, S., Henrissat, B. and Schrempf, H. (1993). Characteristics of an exochitinase from *Streptomyces olivaceoviridis*, its corresponding gene, putative protein domains and relationship to other chitinases. *European Journal Biochemistry*. **214**, 659-669.
- Boucias, D., Pendland, J.C. and Latge, J.P. (1988). Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**, 1795-1805.
- Bouguerra, M.L. (1990). Los bioplaguicidas en ayuda de los cultivos. *Mundo Científico*. **10** 1252.
- Brey, P.T., Latgé, J-P and Prevost, M.C. (1986). Intergumental penetration of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by *Conidiobolus obscurus*. *Journal Invertebrate Pathology*. **48** 34-41.
- Caddick, M.X., Brownlee, A.G. and Arst, H.N. (1986). Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*. **203** 346-353.
- Castilho, L.R., Medronho, R.A. and Alves, T.L.M. (2000). *Bioresearch Technology* **71** 45.
- Cannon, R. (1989). Microbial insecticides: the opening of a new era?. *Shell Agriculture*. **5**, 13-15.

- Charnley, A. (1989). Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. In the *biotechnology of fungi for improving plant growth*. J.M. Whipps and R.D. Lumsden, Eds. Cambridge Univ. Press, London. Pp 85-125.
- Chavira, R., Burnett, T.J. and Hageman, J.H. (1984). Assaying proteinases with azocoll *Analytical Biochemistry*. **136**, 446-450.
- Coudron, T. A., Kroha, M.J. and Ignoffo, C.M. (1984). Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. *Comprehensive Biochemistry Physiology*. **79B**, 339-348.
- Couto, S.R., Longo, M.A., Cameselle, C. and Sanroman, A. (1999). *Acta Biotechnology*. **19**, 17.
- de Vrije, T., Antoine, N. Buitelaar, R.M., Bruckner, S., Dissevelt, M., Durand, A., Gerlagh, M., Jones E.E., Lüth, P., Oostra, J., Ravensberg, W.J., Renaud, R., Rinzema, A., Weber, F.J. and Whipps, J.M. (2001). The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid state fermentation, application and marketing. *Applied Microbiology Biotechnology*. **56**, 58-68.
- Deschamps, F., Giuliano, C., Asther, M., Huet, M.C. and Roussos, S. (1985). Cellulase production by *Trichoderma hazarium* in static and mixed solid state fermentation reactors under non-aseptic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. **27**, 1385-1397.
- Desgranges, C., Vergoignan, C., Georges, M. and Durand, A. (1991a). Biomass estimation in solid state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*. **35**, 200-205.
- Desgranges, C., Vergoignan, C., Georges, M. and Durand, A. (1991b). Biomass estimation in solid state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*. **35**, 206-209.
- Desgranges, C, Vergoignan, C., Lereec, A, Riba, G., and Durand, A. (1993). Use of solid state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of European cornborer. *Biotechnology Advances*. **11**, 577-587.
- Deshpande, M.V. (1986). Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *Journal Sciences Industrial Research*. **45** 273-281.
- Deshpande, M.V. (1999). Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges". *Crit Rev Microbiol*. **25** 229-243.
- DiLena, G., Patroni, E. and Quaglia, G.B. (1997). Improving the nutritional value of wheat bran by a white-rot fungus. *International Journal of Food Science Technology* **32**, 513-519.
- Dorado, J., Almendros, G., Camarero, S., Martínez, A.T. and Hatakka, A. (1999). Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*. **25**, 605-612.
- Dorta, B. and Arcas J. (1998). Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, **23**, 501-505.

- Dubey, A.K., Suresh, C., Umesh Kumar, S. and Karanth, N.G. (1998). An enzyme-linked immunosorbent assay for the estimation of fungal biomass during solid-state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*. **50**, 299-302.
- Eaton, K.K., Hennessy, T.J., Snodin, D.J. and McNulty, D.W. (1986). *Verticillium lecanii*, allergological and toxicological studies on work exposed personnel. *Annual Occupation Hyg.* **30**, 209-217.
- Gessesse, A. and Mamo, G. (1999). High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. By using solid-state fermentation. *Enzyme Microbial Technology*. **25**, 68-72.
- Gillespie, A.T. and Claydon, N. (1989). The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Sciences*. **27**, 203-215.
- Gillespie, A.T. and Crawford, E. (1986). Effect of water activity on conidial germination and mycelial growth of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces spp.* and *Verticillium lecanii*. In *Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology*. Edit. R. A. Samson, J.M. Vlak & D. Peters, Wageningen: Society of Invertebrate Pathology, p. 254.
- Gombert, A.K., Pinto, A.L., Castilho, L.R. and Freire, D.M.G. (1999). Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*. **33**, 85-90.
- Gooday, G.W. (1995). Diversity of roles for chitinases in nature. In: *Chitin and Chitosan*. Zakaria MB, Wan Muda W.M. Abdullah M.P., editors. Malaysia: Penerbit Universiti Kebangsaan, p. 191-202.
- Gupta, S.C., Leathers, T.D., El-Sayed, G.N. and Ignoffo, C.M. (1991). Production of degradative enzymes by *Metarhizium anisopliae* during growth on defined media and insect cuticle. *Experimental Mycology*. **15**, 310-315.
- Hadwinger, L.A. and Beckman, J.M. (1980). Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiology*. **66**, 205-211.
- Hajek, A.E. and St-Leger, R.J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insects hosts. *Annual Reviews Entomology*. **39**, 293-322.
- Hakil, M., Voisinet, F., Viniegra-González, G. and Augur, C. (1999). Caffeine degradation in solid state fermentation by *Aspergillus tamaritii*: effects of additional nitrogen sources. *Process Biochemistry*. **35**, 103-109.
- Hall, R.A. (1981). The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In *Microbial Control of Pest and Plant Diseases*. Edited by H.D. Burges. De. Academic Press., England pp 483-498.
- Hall, R.A., Peterkin, D.D., Ali, B. and Lopez, V.F. (1994). Influence of culture age on rate of conidiospore germination in four deuteromycetous entomogenous fungi. *Mycology Research*. **98**, 763-768.

- Hamil, R.L., Higgins, C.E., Boaz, H.E. and Gorman, M. (1969). The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Letters*. **49**, 4255-4258.
- Hankin, L. and Anagnostakis, S.L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. **119**, 597-607.
- Harrigan, W.F. and McCance, M.E. (1976). Biochemical tests for bacteria. In *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Rev. Edit. Academic Press pp. 67-68.
- Havukkala, I., Mitamura, C., Hara, S., Hirayae, K., Nishizawa, Y. and Hibi, T. (1993). Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. *Journal of Invertebrate Pathology*. **61**, 97-102.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.. *Biochemistry Journal*. **280**, 309-316.
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemistry Journal*. **293**, 781-788.
- Higuchi, T., Okubo, K., Saiga, T. and Senda, S. (1998). Enzymatic treatment in control of insect pests with entomopathogenic fungi. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 10067613 A2 10 Mar 1998 Heisei. (CA 1998;128:Patent 254077).
- Hutchison, C.M. (1999). *Trichoderma virens*-inoculated composted chicken manure for biological weed control. *Biological Control*. **16**, 217-222.
- Hussey, N.W. and Tinsley, T.W. (1981). Impressions of insect pathology in the People's Republic of China. In *Microbial Control of Pest and Plant Diseases (1970-1980)* H.D. Burges, De. Academic Press, New York. Pp 785-795.
- Jackson, C.W., Heale, J.B. and Hall, R.A. (1985). Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Annals of Applied Biology*. **106**, :39-48.
- Jeffs, L.L.B. and Khachatourians, G.G. (1997). Estimation of spore hydrophobicity for members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Tolypocladium* by salt-mediated aggregation and sedimentation. *Canadian Journal of Microbiology*. **43**, 23-28.
- Kang, S.C., Park, S. and Lee, D. (1998). Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. **165**, 267-271.
- Knowles, J., Lehtovaara, P. and Teeri, T. (1987). Cellulase families and their genes. *Trends Biotechnology*. **5**, 255-261.
- Kotwal, S.M., Gote, M.M., Sainkar, S.R., Khan, M.I. and Khire, J.M. (1998). Production of  $\alpha$ -galactoside by thermophilic fungus *Humicola* sp. In solid-state fermentation and its application in soyamilk hydrolysis. *Process Biochemistry*. **33**, 337-343.

- Krishna, C. (1999). *Bioresarch Technology* **69**, 231.
- Kuranda, M.J. and Robbins, P.W. (1991). Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Biology Chemistry*. **266**, 19758-19767.
- Lapadatescu, C. and Bonnarne, P. (1999). Production of aryl metabolites in solid-state fermentation of the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Biotechnology Letters*. **21**, 763-769.
- Larroche, C., Besson, I. and Gros, J.B. (1999). High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soybeans. *Process Biochemistry*. **34**, 667-674.
- Levenspiel O. (1987). Ingeniería de las reacciones químicas. Ediciones REPLA s.a. México, D.F. pp. 45-79
- Li, D.P. and Holdom, D.G. (1995). Effects of nutrients on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*. **65**, 253-260.
- Lopez-Llorca, L.V. and Carbonell, T. (1998). Use of almond mesocarp for production of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Canadian Journal Microbiology*. **44**, 886-895.
- Lorence, A. (1996). Biopesticidas. *Cuadernos de vigilancia biotecnológica*. No. 1
- Malathi, S. and Chakraborty, R. (1991). Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**, 712-716.
- Matewele, P., Trinci, A.P.J. and Gillespie, A.T. (1994). Mutants of entomopathogenic fungi that germinate and grow at reduced water activities and reduce relative humidities are more virulent to *Nephotettix virescens* (green leafhopper) than the parental strains. *Mycology Research*. **98**, 1329-1333.
- Mathivanan, N., Kabilan, V. and Murugesan, K. (1998). Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamyosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. *Canadian Journal Microbiology*. **44**, 646-651.
- Mial, L.M. (1975). Historical development of the fungal fermentation industry. In: *The filamentous fungi*, vol 1. Smith JE, Berry DR, Kristiansen B (eds). Edward Arnold, London. p 104.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. **31**, 426-428.
- Mitchell, D.A. and Lonsane, B.K. (1992). Definition, characteristics and potencial. In *Solid Sustrate Cultivation*. Doelle H.W., Mitchell D.A. y Rolz C.E. Eds. Elsevier Science Published LTD, England. pp. 1-10.

- Mitchell, D.A. and von Meien, O.F. (2000). Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the Zymotis packed-bed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. **68**, 127-135.
- Mollier, P., Lagnel, J. Quiot, J.M. Aioun, A. and Riba, G. (1994). Cytotoxic activity in culture filtrates from the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **64**, 208-213.
- Neurath, H. (1989). The diversity of proteolytic enzymes. In *Proteolytic enzymes. A practical approach*. R.J. Beynon & J.S. Bond Eds. IRL PRESS. Oxford University Press. England. pp 1-13.
- Pandey, A. (1991). Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid state fermentation. *Bioresearch Technology*. **37**, 169-172.
- Pandey, A. (1994). Solid state fermentation: an overview. New Delhi: Wiley Easter Limited; pp 3-10.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr Sci* **77**, 149-162.
- Pandey, A., Soccol, C.R. and Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. **35**, 1153-1169.
- Paterson, I.C., Charnley, A.K., Cooper, R.M. and Clarkson, J.M. (1993). Regulation of production of a trypsin-like protease by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. **109**, 323-328.
- Paterson, I.C., Charnley, A.K., Cooper, R.M. and Clarkson, J.M. (1994). Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology*. **140**, 185-189.
- Patil, R.S., Ghormade, V. and Deshpande, M.V. (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*. **26**, 473-483.
- Pekrul, S. and Grula, E.A. (1979). Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. *Journal Invertebrate Pathology*. **34**, 238-247.
- Perrakis, A., Wilson, K.S., Chet, I., Oppenheim, A.B. and Vorgias, C.E. (1993). Phylogenetic relationships of chitinases. In: *Chitin Enzymology*. Muzzarelli RAAA, editor. Ancona: Eur. Chitin. Soc. p. 217-232.
- Perraud-Gaime, I. (1995). Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, p 209.
- Poirié, M. and Pasteur, N. (1991). La resistencia de los insectos a los insecticidas. *Mundo Científico*. **11**, 944-952.

- Puterka, G.J., Humber, R.A. and Poprawski, T.J. (1994). Virulence of fungal pathogens (imperfect fungi: Hyphomycetes) to pear *psylla* (Homoptera:Psyllidae). *Environmental Entomology*. **23**, 514-520.
- Raimbault, M. and Alazard, D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European Journal Applied Microbiology Biotechnology*. **9**, 199-209.
- Rao, P. and Pattabiraman, T.N. (1989). Reevaluation of the Phenol-Sulfuric Acid Reaction for the estimation of hexoses and pentoses. *Analytical Biochemistry*. **181**, 18-22.
- Riou, C., Freyssinet, G. and Fevre, M. (1991). Production of cell-wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied Environmental Microbiology*. **57**, 1478-1484.
- Roberts, D.W. (1989). World Picture of Biological Control of Insect by Fungi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 84, 100.
- Rodríguez-Iglesias, J., Castrillón, L. Maranon, E. and Sastre, H. (1998). *Bioresearch Technology*. **63**, 29.
- Rodríguez-Vázquez, R., Cruz-Córdova, T., Fernández-Sánchez, J.M., Roldán-Castillo, T., Mendoza Cantú, A., Saucedo-Castañeda, G. and Tomasini-Campocosio, A. (1999). *Folia Microbiology*. **44**, 213.
- Roukas, T. (1999). Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. **24**, 54-59.
- Roussos, S. (1985). Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse Doctorat d'Etat, Université de Provence, Marseille, France, p 193.
- Roussos, S., Raimbault, M., Saucedo-Castaneda, G. and Lonsane, B.K. (1992). *Biotechnol Techniques*. **6**, 429.
- Sánchez-Peña, S.R. and Thorvilson, H.G. (1995). Effect of long-term cryogenic storage and conidial suspending agents on the virulence of *Beauveria bassiana* toward *Solenopsis invicta*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **65**, 248-252.
- Sangsurasak, P. and Mitchell, D.A. (1998). Validation of a model describing two-dimensional heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. **60**, 739-749.
- Sardjono, Zhu, Y. and Knol, W. (1998). *Journal Agronomy Food Chemistry*. **46**, 3376.
- Sarhy-Bagnon, V. Lozano, P. Saucedo-Castañeda, G. and Roussos, S. (2000). Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochemistry*. **36**, 103-109.

- Saucedo-Castañeda, G., González, P., Revah, S., Viniegra, G. and Raimbault, M. (1990). Effect of lactobacilli-inoculation on cassava (*Manihot esculenta*) silage: fermentation pattern and kinetic análisis. *Journal Science Food Agric.* **50**, 467-477.
- Saucedo-Castañeda, G. (1991). Controlê du métabolisme de *Schwanniomyces castellii* cultivé sur support solide. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, France, p 212.
- Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernández, M.R., Lonsane, B.K., Navarro, J.M., Roussos, S., Dufour, D. and Raimbault, M. (1992). On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry.* **29**, 13-24.
- Shaikh, S.A. and Deshpande, M.V. (1993). Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. *World Journal. Microbiology Biotechnology* **9**, 468-475.
- Shankaranand, V.S. Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K. (1992). Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process. Biochemistry.* **27**, 33-36.
- Selvakumar, P., Ashakumary, L. and Pandey, A. (1998). *Bioresearch Technology.* **65**, 83.
- Shakir, F.K., Audilet, D., Drake III, A.J. and Shakir, K.M.M. (1994). A rapid protein determination by modification of the Lowry procedure. *Analytical Biochemistry.* **216**, 232-233.
- Shimahara, K. and Takiguchi, Y. (1988). Preparation of crustacean chitin. In *Methods in enzymology* Vol. 161. G.E.Permann and L. Lorand, Eds. Academic Press, New York. Pp 417-423.
- Siqueira Pinto, A., Chaves Barreto, C., Schrank, A., José Ulhoa, C. and Henning Vainstein, M. (1997). Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology.* **43**, 322-327.
- Smith, D. (1974). Maintenance of fungi. In *Maintenance of microorganisms*. Kirsop B.E. y Snell J.J.S. Eds. Academic Press Inc. USA. p. 90.
- Smith, R.J. and Grula, E.A. (1981). Nutritional requeriments for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal Invertebrate Pathology.* **37**,:222-230.
- Soccol, C.R., Ayala, L.A., Soccol, V.T., Krieger, N. and Santos, H.R. (1997). Spore production by entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* from de-classified potatos by solid state fermentation. *Rev. Microbiol.* **28**, 34-42.
- Sree, N.K., Sridhar, M., Rao, L.V. and Pandey, A. (1999). Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast. *Process Biochemistry.* **34**, 115-119.
- St-Leger, R.J. (1991). Integument as a barrier to microbial infections. In: *The Physiology of Insect Epidermis*. A. Retnakaran, K. Binnington. Australia: CSIRO pp. 286-308.

- St-Leger, R.J. (1993). Biology and mechanisms of invasion of deuteromycete fungal pathogens. In: *Parasites and pathogens of insects*. N.C. Beckage, S.N. Thompson and B.A. Federici eds. Vol. 2, Academic press, INC., San Diego Calif. Pp. 211-229.
- St-Leger, R.J., Bidochka, M.J. and Roberts, D.W. (1994). Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Archives Biochemistry Biophysics*. **313**, 1-7.
- St-Leger, R.J., Charnley, A.K. and Cooper, R.M. (1987a). Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **253**, 221-232.
- St-Leger, R.J., Cooper, R.M. and Charnley, A.K. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology*. **132**, 1509-1517.
- St-Leger, R.J., Cooper, R.M. and Charnley, A.K. (1987b). Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *Journal of General Microbiology*. **133**, 1371-1382.
- St-Leger, R.J., Cooper, R.M. and Charnley, A.K. (1987c). Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **258**, 123-131.
- St-Leger, R.J., Durrands, P.K., Cooper, R.M. and Charnley, A.K. (1988). Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Microbiology*. **150**, 413-416.
- St-Leger, R.J., Frank, D.C., Roberts, D.W. and Staples, R.C. (1992). Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal Biochemistry*. **204**, 991-1001.
- St-Leger, R.J., Goettel, M., Roberts, D.W., and Staples, R.C. (1991). Pre-penetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal Invertebrate Pathology*. **58**, 168-179.
- St-Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J. Rizzo, N.W. and Roberts, D.W. (1996a). Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridde*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 907-912.
- St-Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J., Rizzo, N.W. and Roberts, D.W. (1996b). Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 1257-1264.

- St Leger, R.J., Joshi, L. and Roberts, D.W. (1997). Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology*. **143**, 1983-1992.
- St Leger, R.J., Joshi, L. and Roberts, D. (1998). Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 709-713.
- St-Leger, R.J., May, B., Allee, L.L., Frank, D.C., Staples, R.C. and Roberts, D.W. (1992). Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **60**, 89-101.
- St-Leger, R.J., Staples, R.C. and Roberts, D.W. (1993). Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology*. **61**, 81-84.
- Steenberg, T. and Humber, R. A. (1999). Entomopathogenic potential of *Verticillium* and *Acremonium* species (Deuteromycotina:Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*. **73**, 309-314.
- Stredansky, M., Conti, E., Navarini, L. and Bertocchi, C. (1999). Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*. **34**, 11-16.
- Susuki, A., Kanaoka, M., Isogai, A. Murakoshi, S., Ichinoe, M. and Tamura, S. (1977). Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tetrahedron Letters*. **25**, 2167-2170.
- Tanada, Y. and Kaya, H.K. (1993). *Insect Pathology*. Academic Press Inc. Pp 362, 575-576, 583.
- Tengerdy, R.P. (1998). Solid substrate fermentation for enzyme production. In: *Advances in Biotechnology*. Pandey A, editor. New Delhi: Educational Publishers & Distributors. pp 13-16.
- Tengerdy, R.P. and Szakács, G. (1998). Perspectives in agrobiotechnology. *Journal of Biotechnology*. **66**, 91-99.
- Trejo-Hernández, M. (1992). Physiologie de croissance de souches de *Claviceps*: Production d'alcaloïdes par fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat, Université de Provence, Aix-Marseille I, p 164.
- Varela, A. and Morales, E. (1996). Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **67**, 147-152.
- Walsh, K.A. and Wilcox, P.E. (1970). Serine proteases. In *Methods in Enzymology* Vol. 19 G.E.Permann and L. Lorand, Eds. Academic Press, New York. pp 31-43.

- Watanabe, T., Kobori, K., Yamada, T. Ito, Y., Uchida, M. and Tanaka, H. (1993). Domain structures and functions of bacterial chitinases. In: *Chitin Enzymology*. Muzzarelli RAA, editor. Ancona: Eur. Chitin. Soc. pp 329-336.
- Weber, F.J., Tramper, J. and Rinzema, A. (1999). A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minutans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. *Biotechnology Bioengineering*. **65**, 447-458.
- West, E.J. and Briggs, J.D. (1968). *In vitro* toxin production by the fungus *Beauveria bassiana* and bioassay in greater wax moth larvae. *Journal Economy Entomology*. **61**, 684-687.
- Wright, S.P., Carruthers, R.I., Bradley, C.A., Jaronski, S.T., Lacey, L.A., Wood, P. and Galaini-Wright, S. (1998). Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **71**, 217-226.
- Wu, G., Chabot, J.C., Caron, J.J. and Heitz, M. (1998). Biological elimination of volatile organic compounds from waste gases in a biofilter. *Water Air and Soil Pollution*. **101**, 69-78.
- Zare, R. and Gams, W. (2001a). A revision of *Verticillium* sect. *Prostata*. III. Generic classification<sup>a</sup>). *Nova Hedwigia*. **72**, 329-337.
- Zare, R. and Gams, W. (2001b). A revision of *Verticillium* sect. *Prostata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. Nov.<sup>a</sup>). *Nova Hedwigia*. **73**, 1-50.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and Van't Riet K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**, 1875-1881.

---

---

## ANEXOS

---

---

Iztapalapa, D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2003

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

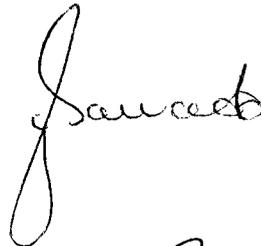
**Contribución al estudio de las actividades enzimáticas involucradas en el mecanismo de patogenicidad de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* cultivado en medio sólido**

**Presentó**

**M. en B. Juan Esteban Barranco Florido**

**Director:**

**Dr. Gerardo Saucedo Castañeda**



**Jurado:**

**Dra. Raquel Alatorre Rosas**  
**Colegio de Postgraduados**



**Dr. Mariano Gutiérrez Rojas**  
**Universidad Autónoma Metropolitana-I**



**Dr. Gustavo Viniegra González**  
**Universidad Autónoma Metropolitana-I**

**Dr. Hermilo Leal Lara**  
**Universidad Nacional Autónoma de México**

