



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

**Cultivo en medio líquido de *Lecanicillium lecanii* utilizando
quitina e hidrocarburos como fuente de carbono**

TESIS

ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

I.B.I. Zaizy Rocha Pino

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

23 de Febrero de 2007

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de SEP-CONACyT, No. 2004-C01-46173. Asimismo agradezco al CONACYT por la beca otorgada y a la Unión Europea proyecto Alfa Polylyfe el financiamiento para asistir al curso de Biopolímeros en la Universidad de Potsdam, Alemania.

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

I.B.I. Zaizy Rocha Pino

El 23 día febrero de 2007

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología

Lector de tesis:

M. en C. Sergio Hernández Jiménez.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de ingeniería de Procesos e Hidráulica.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por la dirección de esta tesis, por compartirme sus conocimientos, apoyo y confianza y aún más por no solo ser una persona de quien aprender sino también a quien respetar y admirar.

A Sergio Hernández Jiménez, por darse el tiempo en leer esta tesis, y por todos sus comentarios impartidos a lo largo de la realización de la misma.

A mis compañeros del laboratorio quienes todo el tiempo comparten conmigo sus conocimientos y amistad. A mis amigos quienes están ahí en mis momentos de alegría y de cansancio. Sus nombres y actos vivirán en mi corazón hasta mi último latido, estarán constantemente en mi mente y en los momentos precisos en mi boca.

A mis padres y hermanos quienes no solo me han entregado su confianza, apoyo y amor incondicionalmente sino porque son lo más valioso de mi vida.

*Mil palabras no bastaran para expresar mi
agradecimiento, pero espero lograr darles
una ligera idea con mis actos cada día.*

INDICE

	Pág.
Lista de figuras	VI
Lista de tablas	VII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
3. Justificación	6
4. Hipótesis	7
5. Objetivos	7
5.1 Objetivo general	7
5.2 Objetivos particulares	7
6. Metodología	8
6.1 Microorganismo	8
6.2 Preparación de inóculo	8
6.3 Medio de cultivo para aclimatación de cepas degradadoras de hidrocarburos en cultivo líquido	8
6.4 Medio de cultivo líquido	8
6.5 Quitina coloidal	9
6.6 Quitina	9
6.7 Crecimiento radial en placa	9
6.8 Cinética de degradación de hidrocarburos y producción enzimática (microcosmos)	10
6.9 Cinética de hidrólisis de quitina y efecto del pH en la producción enzimática	10
6.10 Determinación de la concentración hidrocarburo y CO ₂ (microcosmos)	10
6.11 Extracto enzimático	11
6.12 Determinaciones enzimáticas	11
6.12.1 <i>N-acetil hexosaminidasas</i>	11

6.12.2 <i>Endoquitinasas</i>	12
6.12.3 <i>Proteasas</i>	12
6.13 Electroforesis	12
6.14 Microscopia electrónica de barrido	13
6.15 Estimación de la tasa de crecimiento radial en placas (μ_R)	13
7. Resultados y Discusiones	14
7.1 Crecimiento radial en placa	14
7.2 Microscopia electrónica de barrido	20
7.3 Determinación de la degradación de hidrocarburos y producción de CO ₂ (microcosmos)	22
7.4 Determinación de Actividad Enzimática durante la degradación de hidrocarburos (microcosmos)	25
7.5 Determinación de Actividad Enzimática durante la hidrólisis de quitina y efecto del pH	27
7.6 Electroforesis	31
8. Conclusiones	32
9. Trabajo futuro	33
10. Cursos y otras actividades	34
Referencias	35
Anexos	38
A1. Curva patrón de p-nitrofenol	38
A2. Curvas patrón de hidrocarburos	38
A2.1. Curva patrón de Tolueno	38
A2.2. Curva patrón de n-Hexano	39
A3. Determinación de la concentración de CO ₂	39
A4. Anova y comparación de medias del crecimiento radial en placas	40
A4.1. Tratamientos con Tolueno	40
A4.2. Tratamientos con n-Hexano	42

LISTA DE FIGURAS

	Contenido	Pág.
Figura 1	Degradación de quitina mediante endoquitinasas, exoquitinasas y oligosacaridasas.	3
Figura 2	Crecimiento radial con Tolueno como fuente de carbono y cepa aclimatada con este.	15
Figura 3	Controles de crecimiento radial, con la cepa <i>L. lecanii</i> 157 aclimatada con Tolueno.	16
Figura 4	Crecimiento radial con n-hexano como fuente de carbono y cepa aclimatada con este.	18
Figura 5	Controles de crecimiento radial, para la cepa <i>L. lecanii</i> 157 aclimatada con n-Hexano.	19
Figura 6	Microscopia electrónica de barrido de <i>L. lecanii</i> 157 en medio líquido en microcosmos con medio mineral y quitina coloidal como fuente de carbono con 4 días de incubación a 25°C y 180 rpm.	20
Figura 7	Microscopia electrónica de barrido de <i>L. lecanii</i> 157 en medio líquido en microcosmos con medio mineral y tolueno como fuente de carbono con 79 días de incubación a 25°C y 180 rpm.	21
Figura 8	Microscopia electrónica de barrido de <i>L. lecanii</i> 157 en medio líquido en microcosmos con medio mineral y n-hexano como fuente de carbono con 79 días de incubación a 25°C y 180 rpm.	21
Figura 9	Consumo de Tolueno o n-Hexano en microcosmos con la cepa de <i>L. lecanii</i> 157 aclimatada al hidrocarburo respectivo.	23
Figura 10	Producción de CO ₂ de <i>L. lecanii</i> 157, durante la cinética de degradación de hidrocarburos en microcosmos.	23
Figura 11	Producción de CO ₂ de <i>L. lecanii</i> 157 (cepas aclimatadas con hidrocarburos), en medio líquido (microcosmos) con Quitina Coloidal como única fuente de carbono.	24
Figura 12	Actividades enzimáticas reportadas como Unidad de actividad enzimática por gramo de Sustrato Inicial (U/gSI). Endoquitinasas (Endo) y Proteasas en medio líquido (microcosmos) con Tolueno o n-Hexano como fuente de carbono.	25
Figura 13	Actividad enzimática reportada como Unidad de actividad enzimática por gramo de Sustrato Inicial (U/gSI). N-acetil Hexosaminidasas (Nhasa) en medio líquido (microcosmos) con Tolueno o n-Hexano como fuente de carbono.	26
Figura 14	Actividades enzimáticas de Endoquitinasas (Endo) y Proteasas en fermentaciones con Quitina a pH 5.	28
Figura 15	Actividades enzimáticas de <i>N-acetil hexosaminidasa</i> (Nhasas) en fermentaciones con Quitina a pH 5.	28
Figura 16	Actividades enzimáticas. a) Endoquitinasas (Endo) y Proteasas en fermentaciones con Quitina variando pH de cultivo.	29

Figura 17	Actividades enzimáticas de <i>N-acetil hexosaminidasa</i> (Nhasas) en fermentaciones con Quitina variando pH de cultivo.	29
Figura 18	Pesos moleculares en gel de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) de extractos enzimáticos obtenidos de un cultivo sumergido de <i>L. lecanii</i> 157 con quitina variando pH (pH 8).	31

LISTA DE TABLAS

	Contenido	Pág.
Tabla 1.	Parámetros cinéticos del crecimiento radial en palca con diferentes medios, en presencia y ausencia (para el control) de n-hexano y la cepa de <i>L. lecanii</i> 157, previamente aclimatada al hidrocarburo.	17

Cultivo en medio líquido de *Lecanicillium lecanii* utilizando quitina e hidrocarburos como fuente de carbono.

1. Introducción

En los hongos se ha demostrado que factores extrínsecos como la humedad relativa, actividad de agua, gases (CO₂, O₂), pH, concentración y tipo de nutrientes afectan su fisiología y por lo tanto la producción de metabolitos como enzimas. Los hongos filamentosos representan un grupo diverso de microorganismos que se caracterizan por ser saprofitos, pueden ser patógenos o simbioses de plantas o animales. En su hábitat natural se encuentran frecuentemente colonizando la superficie de líquidos y sólidos, de tal forma que en un porcentaje elevado de hifas se encuentra rodeado de aire. Estos microorganismos forman un micelio ramificado que crece excretando grandes cantidades de enzimas que degradan substratos poliméricos (por ej. celulosa, quitina, almidón, proteína) a compuestos más simples que sirven como nutrientes.

En medio líquido, después de que el micelio vegetativo se ha desarrollado, se forman hifas aéreas que abandonan el ambiente hidrofílico para diferenciarse en estructuras simples o elaboradas que pueden contener esporas. Las hifas aéreas, esporas sexuales y asexuales en la mayoría de las especies son hidrofóbicas. Algunos de los procesos claves involucrados en la formación de hifas aéreas es la secreción de moléculas surfactantes que disminuyan la tensión superficial de los ambientes acuosos capacitándolas para crecer en aire. Estas moléculas en hongos son proteínas conocidas como hidrofobinas (Wösten y Willey, 2000).

Muchos de los substratos en los que se desarrollan los hongos son hidrofóbicos, por ejemplo la cutícula de los insectos. Los hongos entomopatógenos se caracterizan por realizar un reconocimiento superficial del huésped, para excretar enzimas que permitan la penetración de las hifas hasta que finalmente se observa la lisis del huésped. Estas depolimerasas son proteasas tipo subtilisinas, tripsinas, metaloproteasas y peptidasas, así como varios tipos de enzimas quitinolíticas que actúan después de las proteasas. En *Metarhizium anisopliae* y otros hongos entomopatógenos, las quitinasas son requeridas solo

por períodos cortos durante la penetración del hongo a la cutícula, estas están estrechamente reguladas por productos de degradación de quitina (Deshpande, 1986). La hidrólisis de quitina es realizada por un complejo enzimático mostrado en la Fig. 1 (Horsch *et al.*, 1997).

En los hongos, las quitinasas son enzimas morfogénicas que tienen parte integral en el metabolismo de la pared celular de los hongos siendo las microfibras de quitina el componente estructural de mayor cantidad en la pared celular de la mayoría de los hongos filamentosos (Ruíz Herrera y Ruíz-Medrano, 2003). Por su habilidad antagonica a parásitos con paredes celulares quitinosas o exoesqueletos son considerados importantes.

Estos patógenos tienen la capacidad de desarrollarse en intervalos amplios de pH, 2.5 a 10.5, y se ha reportado un patrón de expresión diferencial para cada enzima, proteasas y quitinasas, produciéndose en aquellos pHs a los cuales son activas. Esto se observa sin importar la presencia del inductor, es decir existen genes regulados por el pH ambiental. Así que en este sistema las hidrofobinas y quitinasas son expresadas en niveles altos a los intervalos de pH neutros a básico que corresponden a los del sitio de infección (St. Leger *et al.*, 1998).

Un género estudiado es *Lecanicillium*, en el que se agrupan especies micoparásitas y entomopatógenas, que producen enzimas extracelulares, entre estas quitinasas, como parte del mecanismo de antagonismo. La producción de estas enzimas aumentó considerablemente en presencia de quitina de ensilado de desechos de camarón y paredes celulares de *Agaricus bisporus*, que funcionaron como inductoras, e igualmente al hacer los cambios correspondientes de pH según las enzimas requeridas (Matsumoto *et al.*, 2004, Quijano-Govantes *et al.*, 2004, Iglesias *et al.*, 2002).

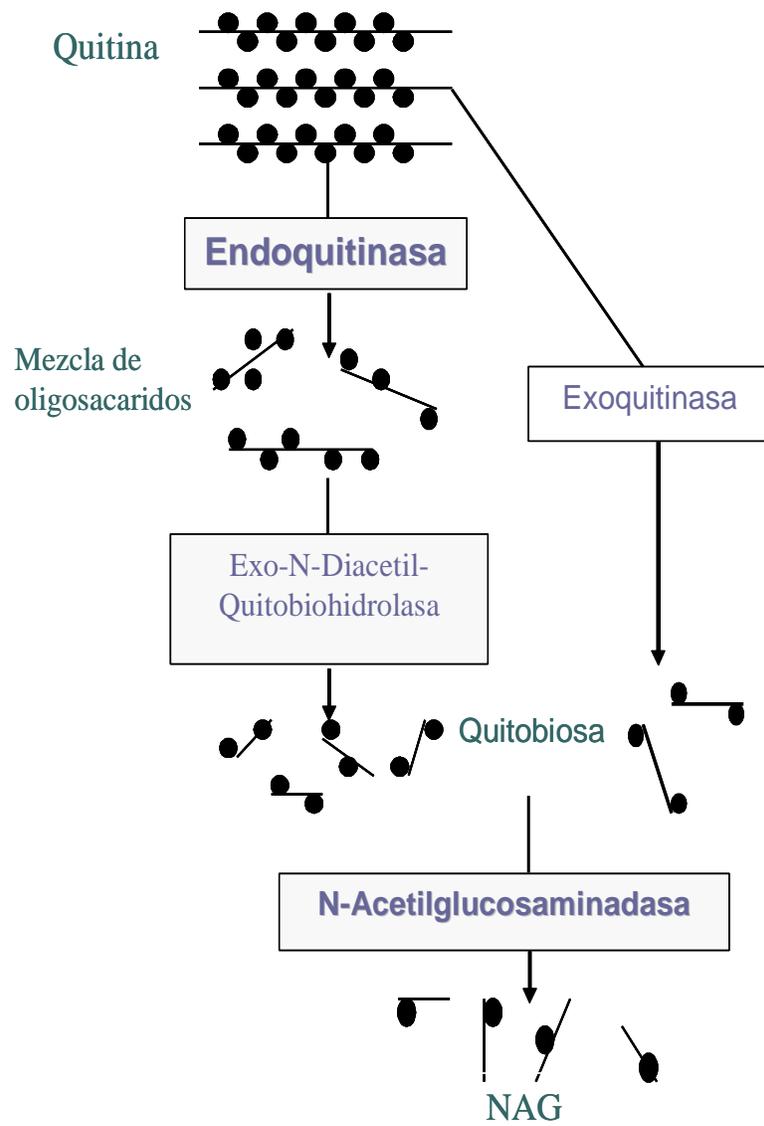


Figura 1. Degradación de quitina mediante endoquitinasas, exoquitinasas y oligosacaridasas. N-acetil-D-glucosamina (NAG); grupo acetilo (•). (Horsch *et al.*, 1997)

2. Antecedentes

En los últimos años se han evaluado diversas cepas de *Lecanicillium* como productores de enzimas que originaran cambios morfológicos en hongos fitopatógenos, y de esta manera lograr establecer las condiciones de cultivo que mejoran la producción de enzimas, como lo son: el pH, edad del inóculo, tipo de fermentación (sólida o líquida) y tipo de soporte (en el caso de fermentación sólida), reportando a *Lecanicillium fungicola* (USDA 4519) y las cepas de *Lecanicillium lecanii* (USDA 974, USD 2460, y ATCC 26854) las que presentaron las actividades más altas, según Matsumoto *et al.*, (2001).

Otra de las características importantes de este género son sus mecanismos de infección, particularmente se han reportado estudios de confrontación en placa de *Lecanicillium* y hongos fitopatógenos (*Macrophomina phaseolina*, *Aspergillus niger* y *Penicillium spp.*). En estas interacciones hifa-hifa fueron observadas mediante microscopía y procesamiento de imágenes, mostrando que *Lecanicillium fungicola* ocasionó un daño intenso a las hifas de todos los hongos fitopatógenos probados, mediante la formación de apresorios. El hongo más sensible fue *Macrophomina phaseolina* seguida de *Aspergillus niger* y *Penicillium spp.*, Iglesias *et al.*, (2002).

En el caso de *M. anisopliae* la producción de enzimas quitinolíticas muestra una expresión diferencial en respuesta del pH del medio, promoviéndose a pHs donde estas son activas (St. Leger *et al.*, 1998). En el cultivo líquido, las actividades enzimáticas de *L. fungicola* se incrementaron significativamente al variar el pH del cultivo de ácido a alcalino. Se observó una variación en el patrón enzimático, de tal forma que hubo mayor producción de endoquitinasas a pHs ácidos mientras que en alcalinidad se aumenta la actividad proteolítica. Quijano-Govantes *et al.*, (2004).

Al respecto Ramírez Coutiño *et al.*, (2006). Evaluaron la actividad quitinolítica de diversas cepas de *Lecanicillium* y una de *Verticillium*, determinando que *V. fungicola* y *L. lecanii* presentaron las actividades más altas en fermentación en medio líquido a pH constante de 5 a 25°C por 5 días de incubación.

La regulación de los genes, usualmente involucra la combinación de substratos que funcionen como inductores ejemplo claro de este fenómeno son las quitinasas, las cuales se encuentran reguladas por productos de la degradación de quitina. Existen algunos reportes en donde se ha crecido a *Beauveria bassiana* en medios enriquecidos con hidrocarburos (n-hexadecano) como única fuente de carbono, en el cual presentó un incremento notorio en la virulencia en contra del gorgojo de frijol. Los autores observaron una variación en la composición de lípidos de los hongos encontrando una mayor proporción de ácidos grasos insaturados debido a que el hongo no completa la β -oxidación (Crespo *et al.*, 2000; Crespo *et al.*, 2002), atribuyendo este fenómeno a la composición lipídica. Marín (2006) realizó una evaluación de la capacidad de degradación de n-hexano y tolueno de 21 cepas de *Lecanicillium*, determinándose que la cepa 157 presentó una mayor tolerancia y asimilación de los hidrocarburos como fuente de carbono (~50%), partiendo de un inóculo de esporas. Sin embargo este proceso de degradación aún requiere investigarse con más detalle.

3. Justificación

El genero *Lecanicillium* es considerado importante por su habilidad antagónica a parásitos con paredes celulares quitinosas o exoesqueletos, debido a la presencia de enzimas quitinolíticas, las cuales juegan un papel en la disolución de cutículas del insecto (de carácter hidrofóbico, así como de hongos patógenos. Sin embargo ha sido poco estudiado en cuanto a la capacidad de degradación de hidrocarburos, los cuales también son compuestos hidrofóbicos, además de ser contaminantes tóxicos y nocivos para la salud (Jun *et al.*, 1991; Calonje *et al.*, 1997; Askary *et al.*, 1997; Fenice *et al.*, 1997; Krivobok *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 2004).

Es por ello que en este trabajo se pretende estudiar a *Lecanicillium lecanii*, con el fin de caracterizar su morfología, así como su producción de quitinasas en presencia de hidrocarburos como fuente de carbono, y asimismo el efecto de las variaciones de pH del medio.

4. Hipótesis

En virtud de que *Lecanicillium* es un productor activo de enzimas hidrolíticas, las cuales se encuentran reguladas por factores extrínsecos como lo son los sustratos hidrofóbicos (cutícula de insectos) se espera que en cultivos líquidos adicionados con hidrocarburos se observe la producción de quitinasas, de igual forma cuando se cultive a *L. lecanii* a pH próximos al óptimo de actividad de cada grupo de enzimas (endoquitinasas, exoquitinasas y proteasas).

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de fuente de carbono (quitina, hidrocarburos) y pH de cultivo en la producción de quitinasas y su morfología de *Lecanicillium lecanii* en cultivos de medio líquido.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la adición de hidrocarburos como fuente de carbono sobre la morfología de *Lecanicillium lecanii*.
- Determinar la relación de la producción de quitinasas como respuesta fisiológica del hongo a desarrollarse en ambientes hidrofóbicos.
- Determinar el efecto de la variación de pH en medios de cultivo líquido de *Lecanicillium lecanii* sobre la producción de enzimas.

6. Metodología

6.1 Microorganismos

La cepa de *Lecanicillium lecanii* 157, proviene de la colección GRC (Genetic Resource Collection, anteriormente Internacional Mycological Institute IMI). Esta fue mantenida en agar de papa y dextrosa, los inóculos se prepararon por propagación en el mismo medio con producción de esporas a 25°C. Para algunos experimentos los hongos fueron sometidos a un proceso de aclimatación a los hidrocarburos en cultivo líquido en matraces a 25°C, durante 79 días con adición de 10mL de medio mineral y 5µL de hidrocarburo cada 26 días.

6.2 Preparación de inóculo

La suspensión de esporas se preparo con propagación de las cepas en agar de papa y dextrosa con producción de esporas a 25°C por 7 días por agitación con agua estéril y Tween 80 (Bidochka y Khachatourians, 1988).

6.3 Medio de cultivo para aclimatación y cinética de cepas degradadoras de hidrocarburos en cultivo líquido

Se utilizo el medio mineral con la composición siguiente (g/L): K₂PO₄ 2.80, MgSO₄ 7 H₂O 1.38, CaSO₃ 2H₂O 0.48, FeSO₄ 7H₂O, (NH₄)Cl 4.10, NaH₂PO₄ 7H₂O 1.67, variando la fuente de carbono de acuerdo al medio, Control (g/L): Glucosa 25.68, extracto de levadura 1.00, Quitina coloidal 10. Testigo (g/L): n-hexano 10.18 o tolueno 1.94, se ajusta a un pH inicial de 6.0 usando NaOH 1N. Los hidrocarburos se adicionan después de esterilizar el medio de cultivo. (Marín, 2006)

6.4 Medio de cultivo líquido

El medio líquido utilizado fue el medio Czapeck modificado. Composición del medio g/L: quitina cruda o glucosa respectivamente 10; NaNO₃ 1; MgSO₄7H₂O 0.5; KCl 0.5; K₂HPO₄3H₂O 0.3; FeSO₄7H₂O 0.05. (Matsumoto, 2001).

6.5 Quitina coloidal

La quitina coloidal fue preparada por modificación del medio Pegg (1988). La pasta obtenida se neutralizó con lavados con agua destilada y conservada en refrigeración (2°C) con 0.02% (p/v) de azida de sodio hasta su posterior utilización.

6.6 Quitina

Fue obtenida de desecho de camarón por fermentación láctica, sus características son: partícula de 0.5mm de diámetro, 5.4% humedad y 14.3% proteína residual (Cira *et al.*, 2002; Matsumoto, 2001).

6.7 Crecimiento radial en placa

Se realizó con medio mineral (sección 6.3) adicionado con agar bacteriológico (15 g/L) para los siguientes tratamientos: a) Medio Mineral (MM), b) MM + Quitina Coloidal (QCo), c) MM + Extracto de levadura (E), d) MM + Glucosa (G) y e) MM + Glucosa + Extracto de levadura (GE). Estos medios fueron esterilizados y vertidos en cajas petri y una vez solidificado el medio en las cajas, estas se inocularon por medio de la técnica de siembra en pozo al cual se adiciono 45 µL de inóculo tanto de la cepa aclimatada en tolueno como para la aclimatada en n-hexano.

Los tratamientos se colocaron junto con un tubo con carbón activado en el cual se adiciono 1 mL de tolueno o n-hexano (según el caso de la cepa aclimatada), en contenedores herméticos e incubados a 25°C durante 28 días, la adición del hidrocarburo se realizó cada dos días. Sucesivamente se realizaron las mediciones del crecimiento radial cada 7 días.

Los controles fueron realizados de igual forma (para ambas cepas), en ausencia del hidrocarburo.

6.8 Cinética de degradación de hidrocarburos y producción enzimática (microcosmos)

Se realizó en botellas serológicas de 125 mL, adicionadas con 10 mL de medio mineral (sección 6.3) con 1% v/v de las cepas aclimatadas en tolueno y n-hexano, posteriormente fueron tapadas con válvulas milinert y enseguida se les adiciono el hidrocarburo correspondiente y fueron incubadas en agitación a 25°C y 180 rpm, durante 28 días.

Los controles se realizaron con medio mineral y quitina coloidal tanto para las cepas aclimatadas en tolueno y n-hexano respectivamente, en ausencia del hidrocarburo y mismas condiciones de incubación. El muestreo se realizo cada 24 horas.

6.9 Cinética de hidrólisis de quitina y efecto del pH en la producción enzimática

Las fermentaciones de quitina se llevaron a cabo en un bioreactor (Applikon B. V., Holland) de 3 litros con medio Czapeck con: 10g/L de quitina cruda como fuente de carbono. Las condiciones fueron: flujo de aire de 1vvm; 25°C; 180 rpm e inóculo de 10^7 esporas/mL. Se mantuvo un pH de 5 las primeras 72 h, posteriormente se aumento una unidad cada 24 h hasta llegar a un pH 8. Control: se realizo de igual forma solo que el pH de 5 se mantuvo constante durante toda la fermentación. El muestreo de la fermentación se realizo cada 12 horas.

6.10 Determinación de la concentración de hidrocarburos y CO₂ (microcosmos)

tanto los hidrocarburos como el CO₂ fueron medidos en la fase gaseosa con un cromatógrafo de gases Agilent Technologies serie 6890N y software HPCORE CheStation, GC ChemStation. Agilent Technologies 1990-2001. Tomando en cuenta la curva patrón correspondientes a cada elemento (ANEXO A2 y A3).

Detección de hidrocarburos

Detector de Ionización de Flama (FID)

Columna: Capilar ATTM – WAX 25 m de longitud, 0.25mm diámetro interno y 0.20µm de espesor de película

Gas acarreador: Helio

Flujo: 0.6 mL/min

Temperatura de columna: 65°C

Temperatura de inyector: 200°C

Temperatura de detector: 250°C

Detección de CO₂

Detector de Conductividad Térmica (TCD)

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

Gas acarreador: Helio

Flujo: 0.6 mL/min

Temperatura de columna: 65°C

Temperatura de inyector: 110°C

Temperatura de detector: 110°C

6.11 Extracto enzimático

Los extractos enzimáticos crudos se obtuvieron de las muestras tomadas tanto de los microcosmos como del fermentador, respectivamente, las cuales fueron centrifugadas a 11500 rpm a 4°C por 20 min, y a partir del sobrenadante se realizaron las determinaciones enzimáticas (sección 6.12), después de los análisis correspondientes fueron ultrafiltrados a través de una membrana de 10 kDa y liofilizados.

6.12 Determinaciones enzimáticas

A partir del extracto enzimático crudo obtenido se determinó la actividad de:

6.12.1 N-acetil hexosaminidasas: Se determinó a partir de la liberación de p-nitrofenol, 200µL de extracto enzimático, 200µL de buffer de citrato/fosfato (0.2M) y 200µL de p-nitrofenil-N-acetil glucosamida se incubaron a 37°C por una hora a 180 rpm. Al término de la incubación se adicionó 1mL de NaOH 0.02M, se midió su absorbancia a 400nm. La concentración de p-nitrofenol se determinó con una curva patrón (Anexo 1). Siendo una *Unidad enzimática la cantidad de enzima que libera 1µmol de p-nitrofenol por minuto* (Tronsmo y Harman, 1993).

6.12.2 Endoquitinasas

Se determino por reducción de turbidez en soluciones de quitina coloidal. 500µL de extracto enzimático y 500µL de suspensión de quitina coloidal (1% p/v de quitina coloidal en buffer de fosfatos 50mM, pH 6.7), se incubaron a 30°C por 24 horas a 180 rpm. Posteriormente se adicionaron 5mL de agua destilada y se agito, se midió la absorbancia a 510nm. El testigo se preparo igual, pero no fue incubado. La Actividad enzimática se define como *la cantidad de enzima que disminuye la turbidez de una suspensión de quitina coloidal en 0.05 unidades de absorbancia con respecto a un testigo con las mismas condiciones que no fue incubado* (Tronsmo y Harman, 1993).

6.12.3 Proteasas

75µL de extracto enzimático se mezclaron fue adicionado a 500µL de una solución de caseína (1% p/v en buffer de fosfatos 50mM pH 7), se incubo a 30°C una hora. Posteriormente se adicionaron 2mL de ácido tricloroacético 5%, se centrifugo a 12000 rpm durante 7 minutos y al sobrenadante se le midió la absorbancia a 280nm. Asimismo se preparó un testigo, en el cual los 75µL de extracto enzimático se adicionaron después del ácido tricloroacético. Una unidad de actividad enzimática fue definida *como la cantidad de enzima que aumenta 0.001 unidades de absorbancia/min al substrato con respecto a su testigo correspondiente* (Kunitz, 1946).

6.13 Electroforesis

Se realizo a partir del extracto crudo enzimático liofilizado (fermentación pH 8) bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), con un gel de separación de 15% y uno de concentración de 5%, a 200V por 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, el gel fue teñido con azul de coomassie. Se utilizaron proteínas de peso molecular conocido como estándares de amplio intervalo (Laemmli, 1970). Las bandas fueron analizadas por densitometría (Gel-Doc 100 y el programa imageJ versión 2.1 para windows).

6.14 Microscopia electrónica de barrido

Las muestras tratadas fueron fijadas inicialmente con glutaraldehído, lavadas y fijadas por segunda vez con tetraóxido de osmio, deshidratadas y secadas, posteriormente fueron montadas en placas de aluminio las cuales fueron cubiertas con una ligera capa de oro. Dichas preparaciones fueron analizadas con un microscopio electrónico de barrido (SEM, marca JEOL JSM-5410LV).

6.15 Estimación de la tasa de crecimiento radial en placas (μ_R)

Para la estimación de la tasa de crecimiento radial se utilizaron los datos de dicha cinética (sección 6.7), los cuales se les ajusto con el modelo logístico:

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

X = Biomasa alcanzada en un tiempo dado (cm)

X_{\max} = Biomasa máxima alcanzada (cm)

X_0 = Biomasa inicial (cm)

μ = Tasa de crecimiento radial (días⁻¹)

t = tiempo (días)

Los ajustes se realizaron con el programa estadístico STATISTICA 6.0 (Stat Soft, Inc USA).

7. Resultados y Discusiones

Se ha mencionado anteriormente que la producción de enzimas quitinolíticas esta influenciada por diversos factores extrínsecos, Liu *et al.*, 2003 menciona que el factor de mayor relevancia en la producción enzimática de *L. lecanii* es la agitación, sin embargo este trabajo muestra la relevancia de otros factores tales como: la fuente de carbono al ser directamente un inductor de enzimas quitinolíticas y a partir de esta producción, y con el fin de aumentar la producción enzimática variar el pH según al cual se tenga la actividad óptima de cada una de estas, producidas por un hongo entomopatógeno que en este caso en particular es *L. lecanii*.

7.1 Crecimiento radial en placa

Con el fin de observar el efecto del tolueno y n-hexano como fuentes de carbono, en cepas de *L. lecanii* 157 previamente aclimatadas en estos hidrocarburos, se realizo la prueba de crecimiento en placa tanto en presencia del hidrocarburo (tratamiento) así como en ausencia (control), tomando las medidas de crecimiento radial.

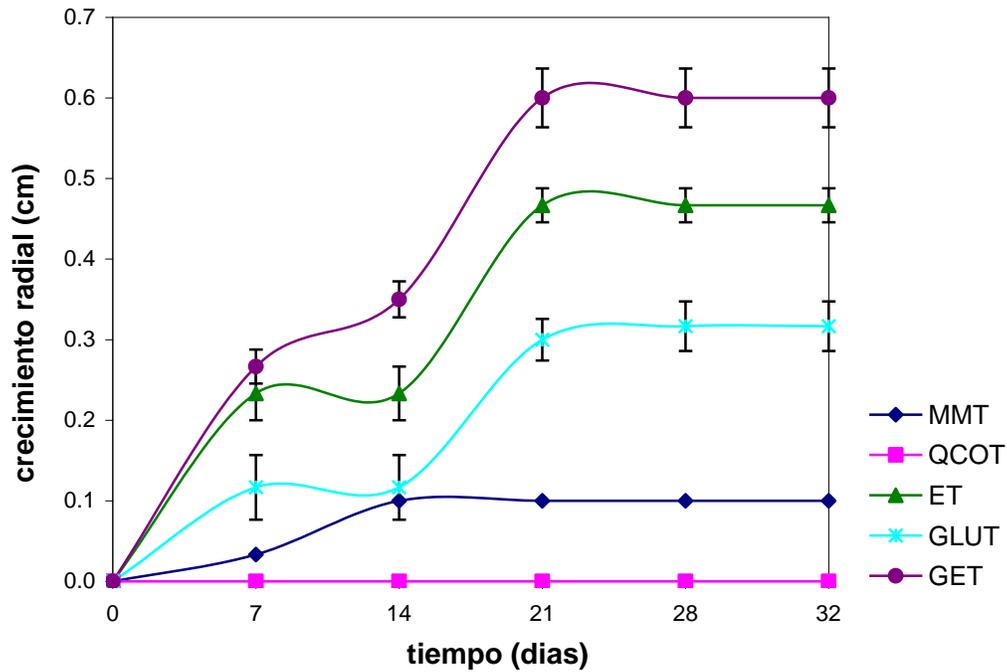


Figura 2. Crecimiento radial con Tolueno como fuente de carbono y cepa aclimatada con este. a) Medio Mineral (MMT), b) MM + Quitina Coloidal (QCOT), c) MM + Extracto de levadura (ET), d) MM + Glucosa (GLUT) y e) MM + Glucosa + Extracto de levadura (GET)

Para obtener los parámetros cinéticos de este experimento se probaron los modelos de crecimiento lineal, logístico, exponencial y Gompertz, sin embargo los datos experimentales obtenidos del crecimiento radial con el tratamiento de tolueno no se lograron ajustar a ningún de estos modelos, debido al claro el efecto diuaxico provocado por la presencia de una segunda fuente de carbono de fácil asimilación (como la glucosa), así como la adición del extracto de levadura, lo cual favoreció el crecimiento de *L. lecanii* 157 aclimatado en presencia del tolueno (Fig. 2). La adición del nitrógeno (i.e. extracto de levadura) fue aún más importante ya que el crecimiento fue mayor que en el medio adicionado con glucosa (GLUT).

En el caso del medio adicionado con quitina coloidal (QCOT), y presencia de tolueno el crecimiento del hongo es nulo lo que implica que no hay asimilación de la quitina. Marín *et*

al., (2006) reportan un comportamiento similar en medio con quitina, explicando que la inhibición fue debido al efecto tóxico del hidrocarburo en la actividad quitinolítica.

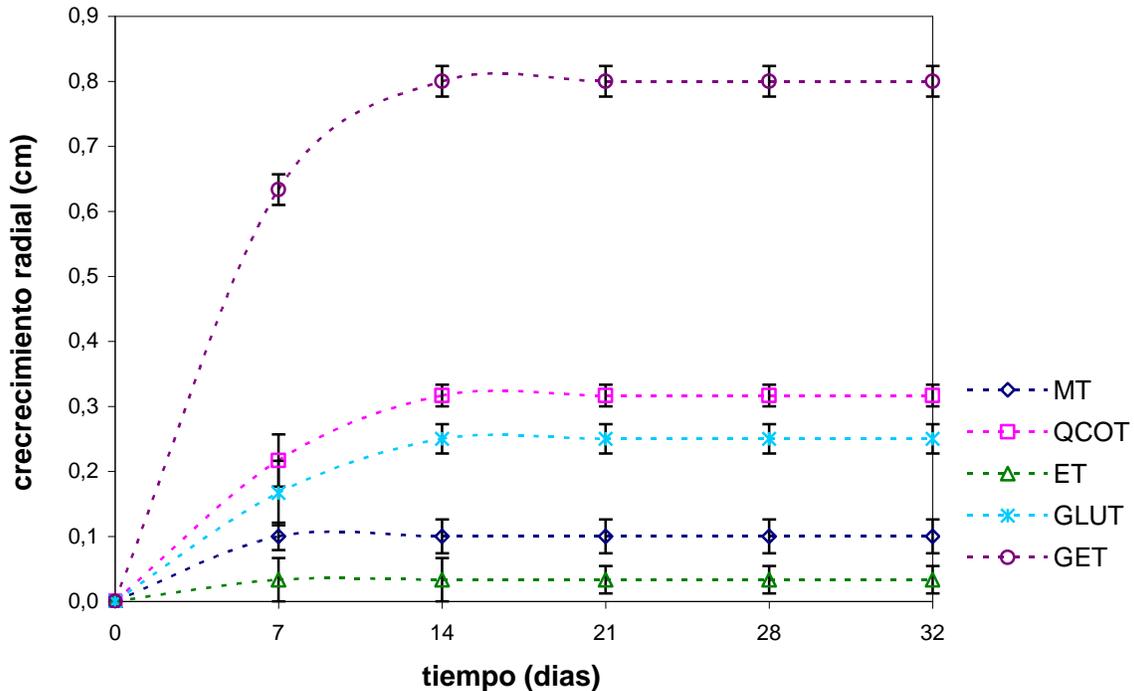


Figura 3. Controles de crecimiento radial, con la cepa *L. lecanii* 157 aclimatada con Tolueno. a) Medio Mineral (MMT), b) MM + Quitina Coloidal (QCOT), c) MM + Extracto de levadura (ET), d) MM + Glucosa (GLUT) y e) MM + Glucosa + Extracto de levadura (GET).

Se realizó un análisis de ANOVA y comparación de medias por Tukey (anexo A4.1) entre los tratamientos de crecimiento radial en presencia de tolueno (Fig. 2) y sus respectivos controles en ausencia de tolueno (Fig. 3), estos resultados ratifican que no hay asimilación de la quitina coloidal en presencia del hidrocarburo, ya que en su ausencia aun con la misma cepa aclimatada si hay crecimiento y por tanto consumo de quitina coloidal, de igual forma se observa el mismo efecto negativo en el medio con glucosa (GLUT) y extracto de levadura (GET).

Los medios donde se muestra que no existe diferencia significativa con respecto a sus controles son el medio mineral (MT) y el medio con glucosa (GLUT), es decir, en

presencia o ausencia del hidrocarburo, lo cual nos indica que no hubo efecto de inhibición del crecimiento por parte del hidrocarburo.

Por lo contrario se observa que en el medio con extracto de levadura (ET) se favorece el crecimiento solo al adicionar el hidrocarburo, esto haría pensar en la ayuda que proporciona el extracto de levadura al funcionar principalmente como fuente de nitrógeno para la degradación o bien para la tolerancia del tolueno.

A diferencia de la cepa aclimatada con tolueno, los datos obtenidos del crecimiento radial con la cepa aclimatada con n-hexano, si lograron ajustarse al modelo logístico, con lo que se muestran sus respectivos parámetros de dicha cinética en la tabla 1 y gráficos 4 y 5.

Tabla 1. Parámetros cinéticos del crecimiento radial en palca con diferentes medios, en presencia y ausencia (para el control) de n-hexano y la cepa de *L. lecanii* 157, previamente aclimatada al hidrocarburo.

Tratamiento con n-Hexano				
	$X_{\max R}$ (cm)	X_{0R} (cm)	μ_R (h^{-1})	R^2
MM	6.712014	0.191098	0.194206	0.97688
Control MM	6.852040	0.309220	0.206925	0.99223
QCo	6.962740	0.244318	0.193680	0.98771
Control QCo	5.170691	0.193379	0.282320	0.99168
Ext.Lev.	6.170068	0.126980	0.235455	0.99256
Control Ext.Lev.	4.906391	0.084221	0.302190	0.93637
Glu	2.772673	0.095799	0.340207	0.98971
Control Glu	4.438428	0.224892	0.196454	0.97715
Glu + Ext.Lev.	2.72*	0	-	-
Control Glu + Ext.Lev.	2.63813	0.161678	0.336755	0.93674

MM- Medio Mineral, QCo- Quitina Coloidal, Ext. Lev.- Extracto de Levadura, Glu- Glucosa.

$X_{\max R}$ = Biomasa radial máxima alcanzada (cm), X_{0R} = Biomasa radial inicial (cm), μ_R = Tasa de crecimiento radial ($días^{-1}$).

Promedio de 2 experimentos independientes y 6 mediciones

*Valores obtenidos a partir de los datos experimentales

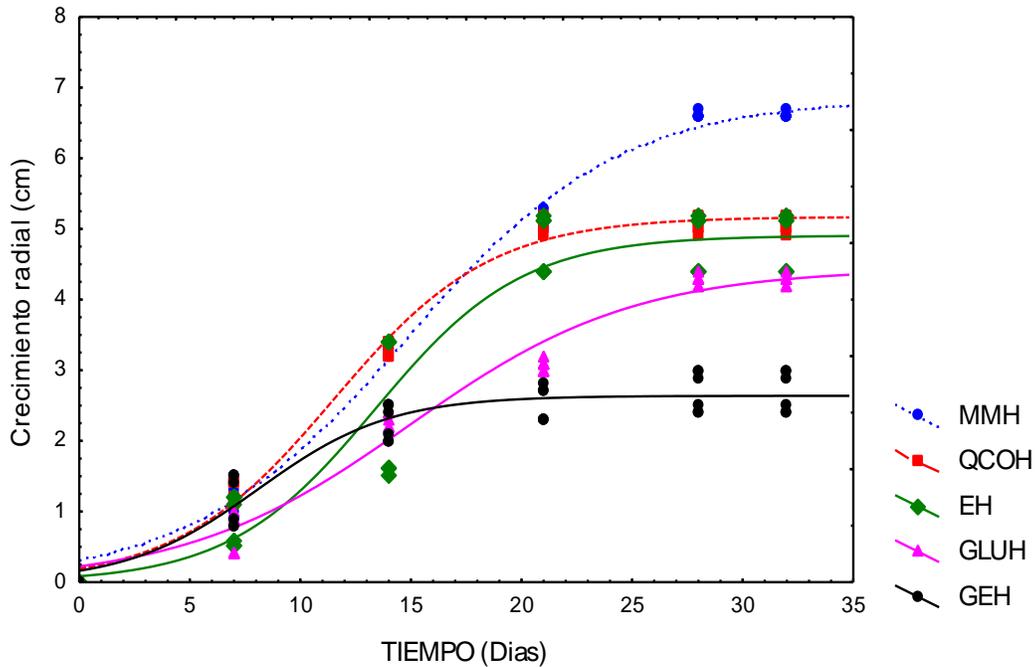


Figura 4. Crecimiento radial con n-hexano como fuente de carbono y cepa aclimatada con este. a) Medio Mineral (MMH), b) MM + Quitina Coloidal (QCOH), c) MM + Extracto de levadura (EH), d) MM + Glucosa (GLUH) y e) MM + Glucosa + Extracto de levadura (GEH).

El análisis de ANOVA junto con la comparación de medias de tukey (anexo A4.2) nos dice que no hay diferencia significativa ($\sim 0.25\text{cm}$) en el crecimiento radial de *L. lecanii* 157, entre el medio con n-hexano (MMH) o en medios adicionados con quitina coloidal o extracto de levadura (de igual forma en presencia del hidrocarburo). Sin embargo si hay diferencia ($\sim 3.9\text{cm}$) con los medios que contienen glucosa (GLUH), siendo estos últimos menos favorecidos en el crecimiento, lo cual nos habla de una represión por sustrato.

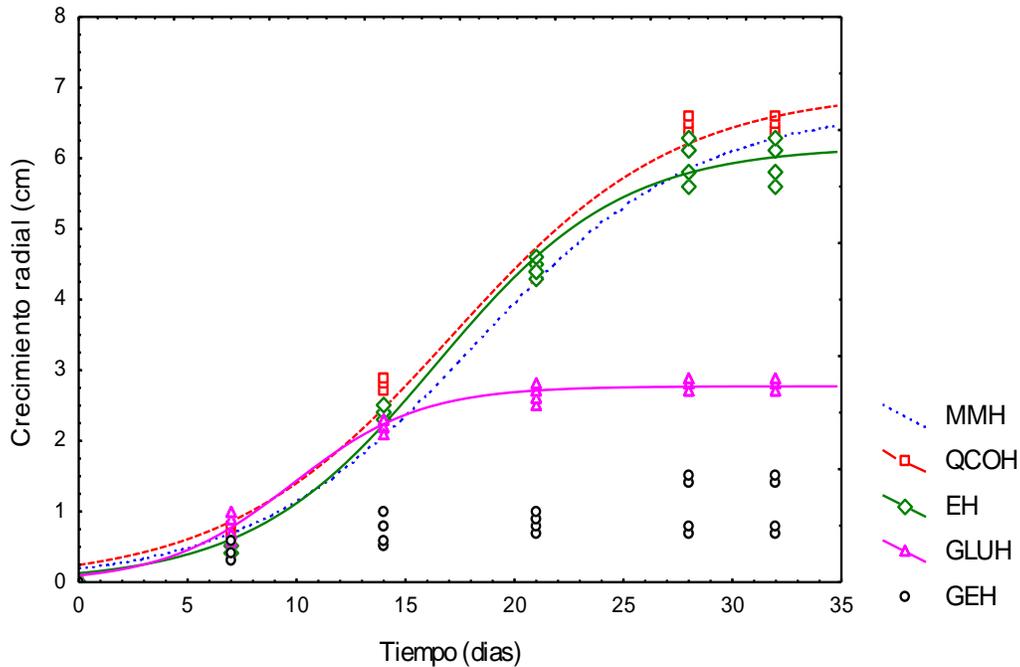


Figura 5. Controles de crecimiento radial, para la cepa *L. lecanii* 157 aclimatada con n-Hexano. a) Medio Mineral (MMH), b) MM + Quitina Coloidal (QCOH), c) MM + Extracto de levadura (EH), d) MM + Glucosa (GLUH) y e) MM + Glucosa + Extracto de levadura (GEH).

En contraste entre los tratamientos con n-hexano y sus respectivos controles nos indican que la diferencia (~3%) en el crecimiento radial del hongo en presencia del hidrocarburo que en ausencia de este, no es significativa incluso en el medio con quitina coloidal. Esto nos marca que no hay un efecto del n-hexano como fuente de carbono para el hongo, así como tampoco de inhibición, siempre y cuando no haya una segunda fuente de carbono como lo es la glucosa, caso en el cual si se observa la inhibición aproximadamente del 37%.

Una diferencia importante entre los tratamientos con tolueno y n-hexano es la magnitud del crecimiento radial, siendo alrededor de 10 veces mayor en presencia de n-hexano que con tolueno, para cualquiera de los medios probados, lo cual nos da un indicio del daño celular provocado por los hidrocarburos (ocurrido durante la aclimatación), el cual ha sido reportado por Marín *et al.*, (2006), quien señala un mayor daño celular en el hongo en presencia de tolueno que en n-hexano.

Existe la posibilidad de atribuirle a este daño morfológico, la gran dispersión encontrada entre los datos de los tratamientos con tolueno, tomando en cuenta, que el inóculo manejado para estos tratamientos (así como para los realizados con n-hexano), si bien si se tomo de la forma más homogénea posible, el inóculo no estaba estandarizado.

7.2 Microscopia electrónica de barrido

Debido a las peculiaridades encontradas en el crecimiento radial de las cepas aclimatadas en hidrocarburos (sección 7.1) se realizaron estudios de microscopia electrónica de barrido (MEB) al inóculo probado en estos experimentos, tomando como control la cepa no aclimatada y crecida con quitina coloidal.

Las figuras 6, 7 y 8 muestra la morfología de *L. lecanii* 157 según la fuente de carbono y edad del microorganismo.

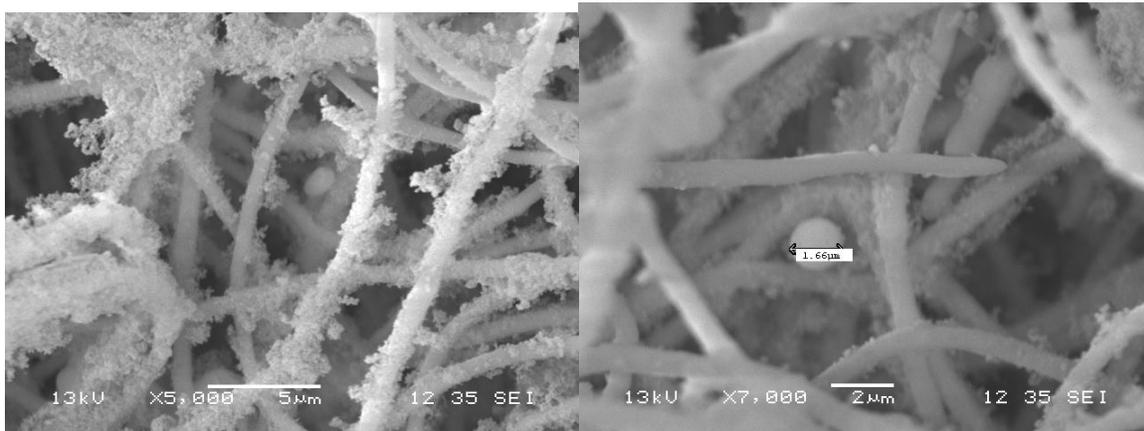


Figura 6. Microscopia electrónica de barrido de *L. lecanii* 157 en medio líquido en microcosmos con medio mineral y quitina coloidal como fuente de carbono con 4 días de incubación a 25°C y 180 rpm.

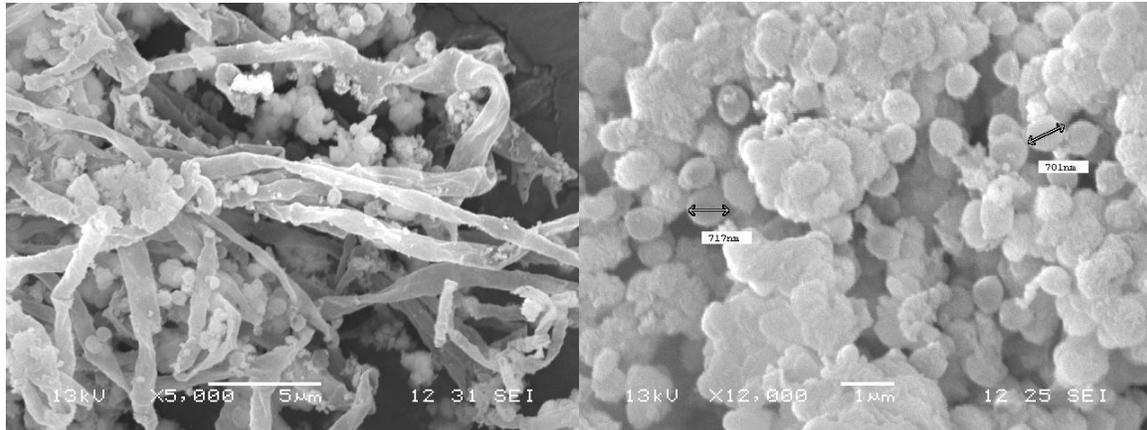


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido de *L. lecanii* 157 en medio líquido en microcosmos a los 4 días de la adición de medio mineral y tolueno, como fuente de carbono y un total de 79 días de incubación a 25°C y 180 rpm.

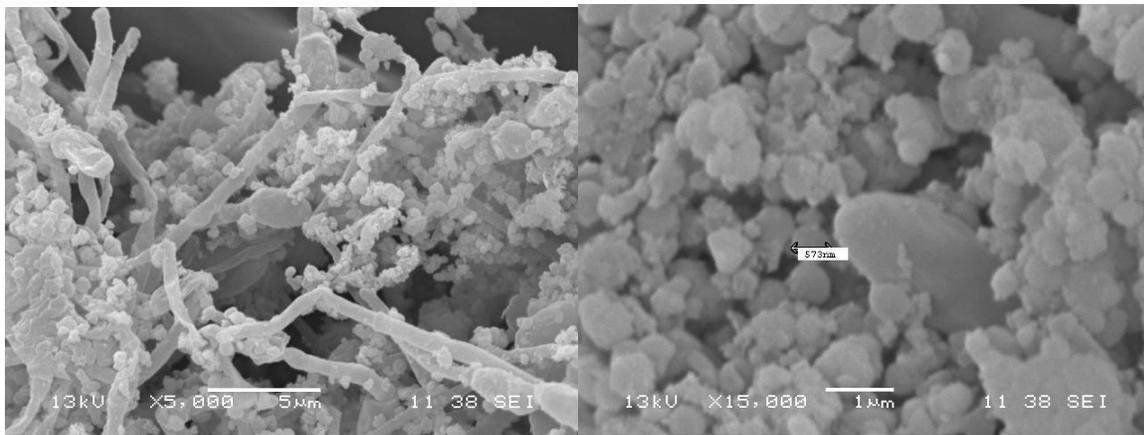


Figura 8. Microscopía electrónica de barrido de *L. lecanii* 157 en medio líquido en microcosmos a los 4 días de la adición de medio mineral y n-hexano, como fuente de carbono y un total de 79 días de incubación a 25°C y 180 rpm.

Se observa la diferencia morfológica tanto de las hifas como de las esporas en los medios con quitina coloidal (figura 6) y medio con tolueno. En el primero, se muestran lisas y redondas, con diámetros de esporas aproximadamente de 1.66µm, mientras que en el caso de la aclimatación con tolueno (figura 7), tanto el micelio como las esporas se encuentran bastante deformadas, mostrando diámetros de esporas aproximados de 700nm, es decir, menores con respecto a los del control, así como una mayor cantidad de esporas que de micelio.

Asimismo la cepa aclimatada con n-hexano (figura 8) muestra daño en las hifas y una reducción mayor en el diámetro de las esporas (aproximada de 570nm), sin embargo la cepa aclimatada con tolueno, presento una mayor cantidad de esporas germinadas y un poco más de micelio que de esporas, esto nos da una indicio del porque las diferencias encontradas en el crecimiento radial, así como el hecho de trabajar con el inóculo no estandarizado.

7.3 Determinación de la degradación de hidrocarburos y producción de CO₂ (microcosmos)

Otro de los tratamientos realizados fue el crecimiento de las cepas aclimatadas en los hidrocarburos en medio líquido con el fin de observar la asimilación del hidrocarburo (sección 6.8) y asimismo su efecto como inductor de enzimas quitinolíticas, al ser compuestos hidrofóbicos. Además debido a que uno de ellos es poco soluble en agua (tolueno) y otro nulamente soluble (n-hexano) en esta, lograr descartar efectos de toxicidad según el grado de contacto con el hidrocarburo.

Por otra parte y como se ha mencionado anteriormente se realizó una previa aclimatación del hongo al hidrocarburo con el fin de iniciar rápidamente su degradación, evitando así su fase de adaptación.

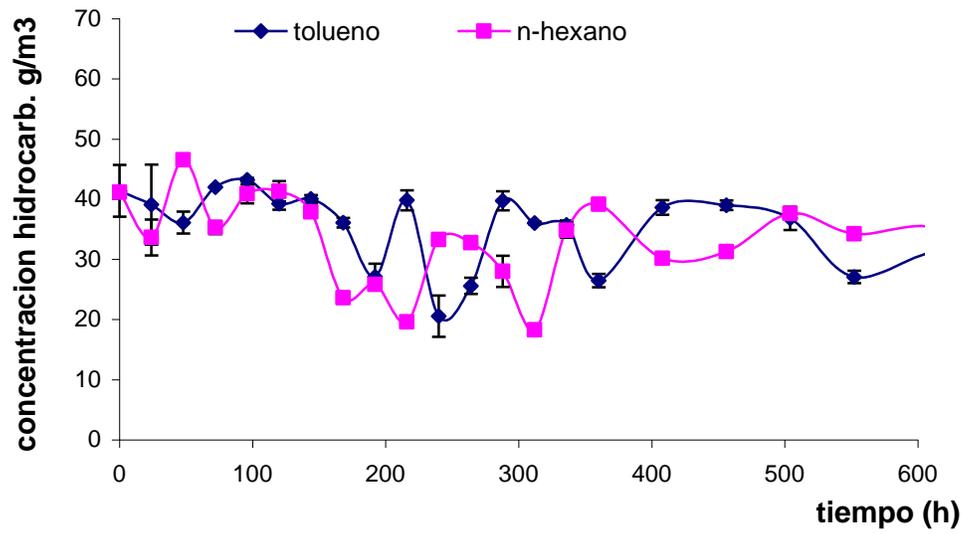


Figura 9. Consumo de Tolueno o n-Hexano en microcosmos con la cepa de *L. lecanii* 157 aclimatada al hidrocarburo respectivo.

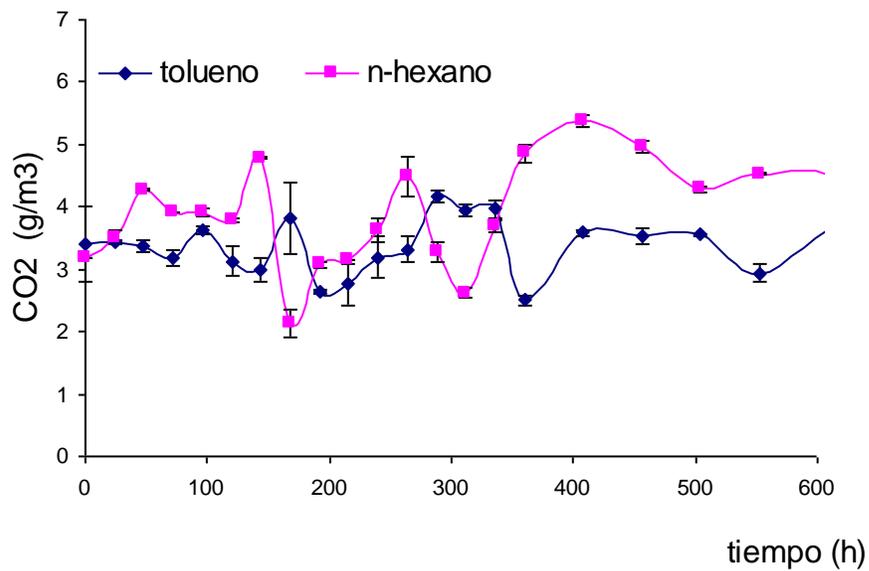


Figura 10. Producción de CO₂ de *L. lecanii* 157, durante la cinética de degradación de hidrocarburos en microcosmos.

Como nos muestra la figura de consumo de hidrocarburo (Fig. 9), no hay un consumo del hidrocarburo como fuente de carbono, lo que comprueba la producción de CO₂ (Fig. 10) al no percibirse un incremento significativo de este.

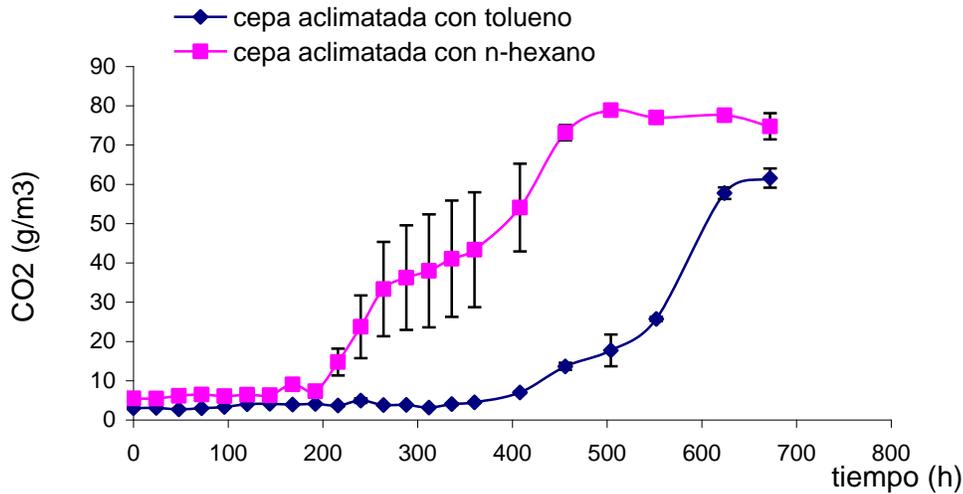


Figura 11. Producción de CO₂ de *L. lecanii* 157 (cepas aclimatadas con hidrocarburos), en medio líquido (microcosmos) con Quitina Coloidal como única fuente de carbono. Promedio de 2 experimentos independientes y 6 mediciones

A diferencia de la producción de CO₂ encontrada en los microcosmos de degradación de hidrocarburos (Figura 10), en el caso de las cepas aclimatadas con los hidrocarburos en medio con quitina coloidal como única fuente de carbono (Fig. 11). La producción de CO₂ si es relevante, lo cual confirma, junto con los resultados de crecimiento radial en placa que no hay una asimilación del hidrocarburo por parte del hongo y por lo tanto que la etapa de aclimatación del hongo al hidrocarburo no favorece, a dicha asimilación.

Un detalle importante a tomar en cuenta de esta gráfica (figura 11) es que el hongo tarda hasta las 200 h de haber sido incubado en estado de latencia o fase de adaptación producido por el cambio de la fuente de carbono, y posteriormente se observa el incremento en la producción de CO₂ (crecimiento exponencial).

7.4 Determinación de Actividad Enzimática durante la degradación de hidrocarburos (microcosmos)

Marín *et al.*, (2006) reporta que durante la degradación de tolueno existe un aumento en la actividad específica de endoquitinasas en cepas de *L. lecanii* 2149, y no así en la actividad de N-acetil hexosaminidasas (Nhasa) y con un consumo aproximado del 50% del hidrocarburo.

Aunque en este trabajo no se encontró consumo de los hidrocarburos se realizaron los análisis correspondientes para la actividad quitinolítica (sección 6.12) de *L. lecanii* 157 con el fin de comprobar el efecto de inducción de dichas enzimas por parte de los hidrocarburos.

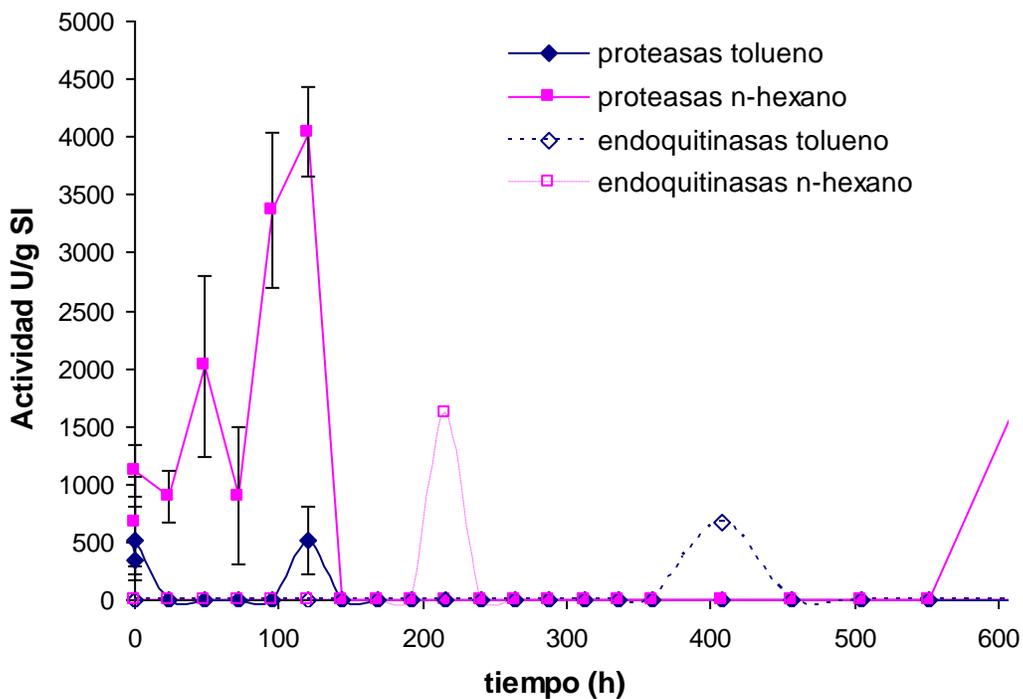


Figura 12. Actividades enzimáticas reportadas como Unidad de actividad enzimática por gramo de Sustrato Inicial (U/gSI). Endoquitinasas (Endo) y Proteasas en medio líquido (microcosmos) con Tolueno o n-Hexano como fuente de carbono.

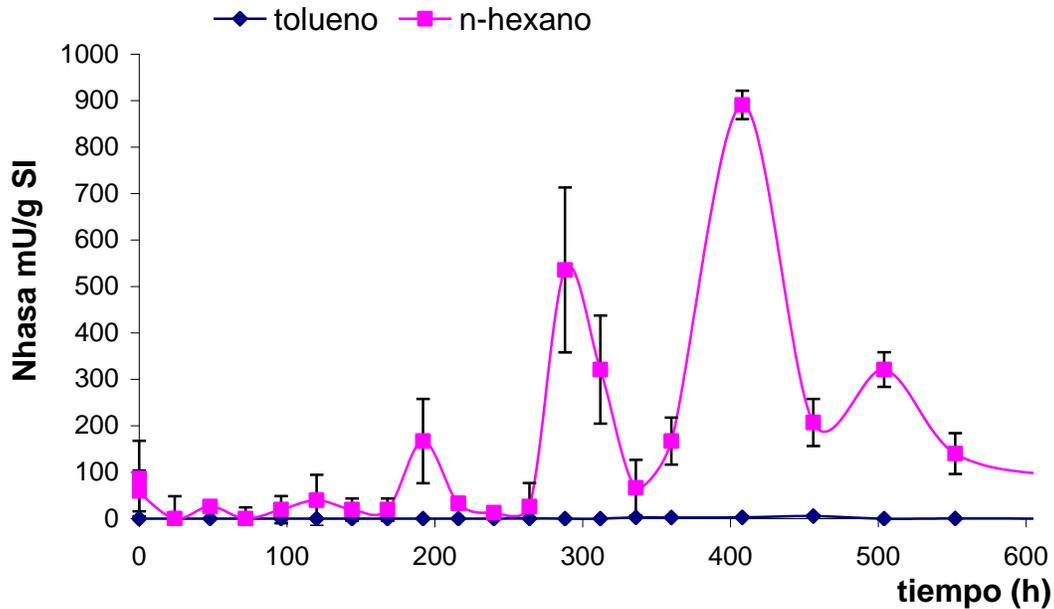


Figura 13. Actividad enzimática reportada como Unidad de actividad enzimática por gramo de Sustrato Inicial (U/gSI). N-acetil Hexosaminidasas (Nhasa) en medio líquido (microcosmos) con Tolueno o n-Hexano como fuente de carbono.

Aunque la actividad enzimática es mínima si se observa la presencia de las principales enzimas quitinolíticas y congruentemente con los resultados preliminares, donde el mayor crecimiento radial lo presenta la cepa aclimatada con n-hexano, la producción de Proteasas, Endoquitinasas y N-acetil hexosaminidasas de esta misma cepa es mayor que en la cepa aclimatada con tolueno, seguramente debido a los daños celulares mencionados anteriormente.

Lo relevante de la producción enzimática en las cinéticas de degradación de hidrocarburos (figuras 12 y 13) es que aunque no hay un consumo o producción de CO_2 aparente en las cinéticas si hay presencia de las enzimas, esto nos indica que existe la posibilidad de que el hidrocarburo aunque no funcione como una fuente de carbono si este influyendo como inductor al darle el carácter hidrofóbico al medio, (como lo son muchos de los sustratos

donde se desarrollan los hongo, por ejemplo, las cutículas de los insectos, Deshpande, 1986).

No obstante autores como Mach *et al.*, 1999 menciona que la regulación de los genes responsables de la actividad quitinolítica de hongos como *Trichoderma* pueden ser inducidos tanto por la fuente de carbono (por ejemplo la quitina), así como por inanición de esta. Tomando en cuenta la presencia de proteasas desde las primeras horas y que justamente cuando estas dejan de actuar es cuando se observa la presencia de las enzimas quitinolíticas también se podría pensar en la posibilidad de que la producción de enzimas quitinolítica sea resultado del efecto de inanición.

7.5 Determinación de Actividad Enzimática durante la hidrólisis de quitina y efecto del pH

Con el fin de observar el efecto del pH en la productividad enzimática de *L. lecanii* 157 este parámetro se probó únicamente en medio líquido adicionado con quitina como fuente de carbono (sección 6.9), debido a la casi nula producción de enzimas encontradas en el caso donde se utilizo hidrocarburos como fuente de carbono.

En las graficas siguientes se presentan las actividades de cada grupo enzimático implicadas en la hidrólisis de quitina, como es el caso de las Endoquitinasas, N-acetil hexosaminidasas y Proteasas. Tanto de una fermentación control en la cual el pH se mantuvo constante todo el tiempo (figura 14 y 15) y las otras donde se vario el pH del medio (figura 13 y 14). Las actividades se reportan como unidad de actividad enzimática por gramo de sustrato inicial (U/gSI).

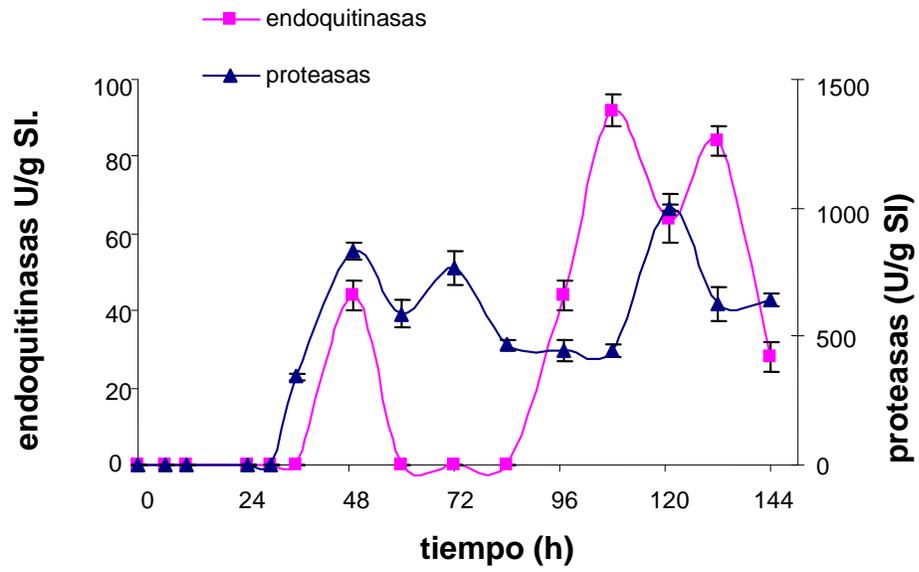


Figura 14. Actividades enzimáticas de Endoquitinasas (Endo) y Proteasas en fermentaciones con Quitina a pH 5.

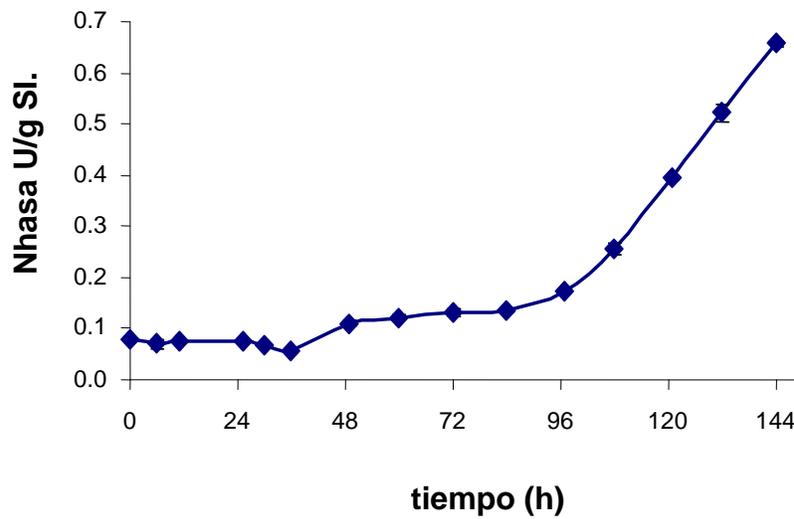


Figura 15. Actividades enzimáticas de *N-acetilhexosaminidasa* (Nhasas) en fermentaciones con Quitina a pH 5.

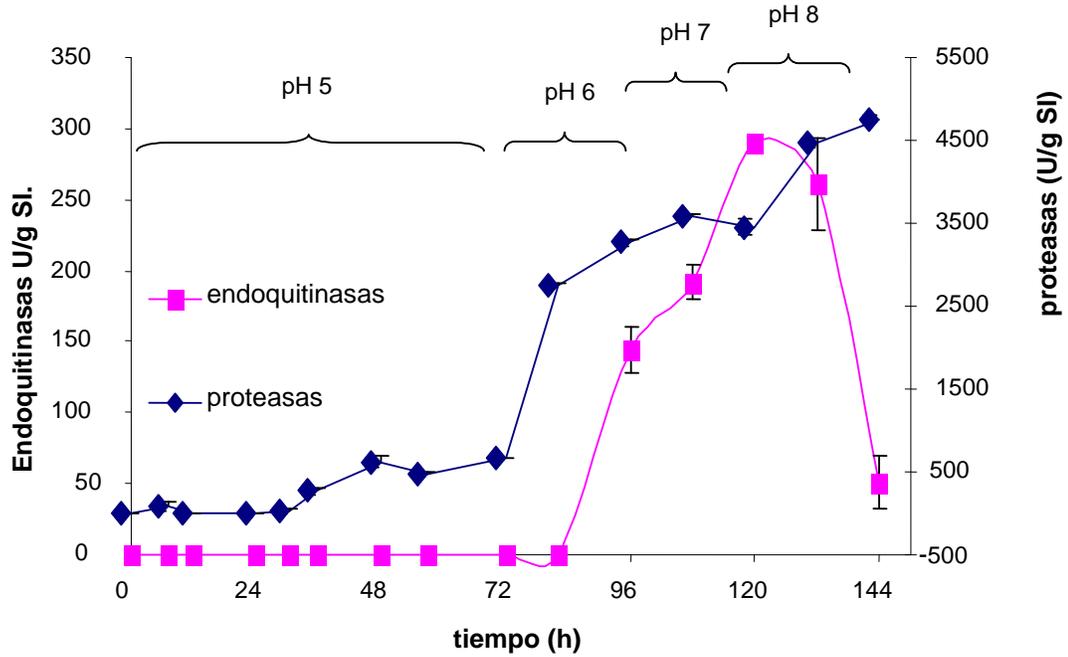


Figura 16. Actividades enzimáticas. a) Endoquitinasas (Endo) y Proteasas en fermentaciones con quitina variando pH de cultivo.

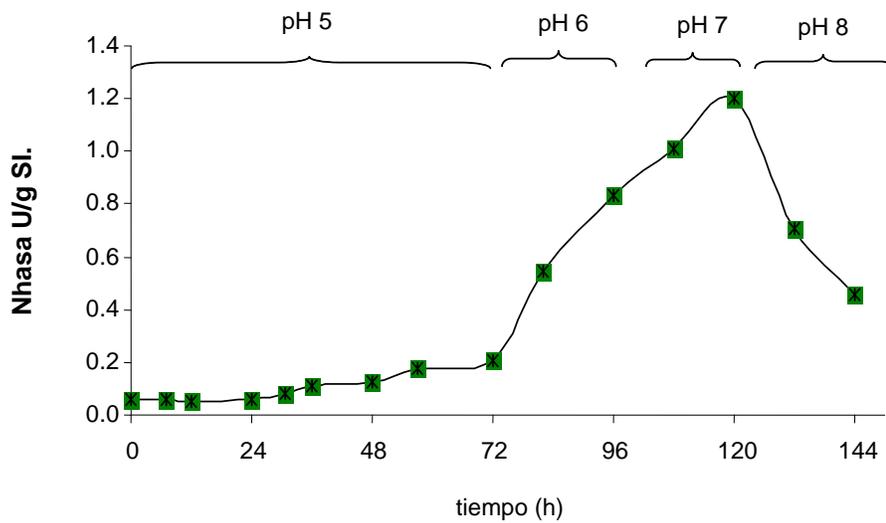


Figura 17. Actividades enzimáticas de *N-acetil hexosaminidasa* (Nhasas) en fermentaciones con Quitina variando pH de cultivo.

Corroborando lo reportado por Quijano-Govantes, *et al.* (2004) hay un aumento significativo en la producción de enzimas quitinolíticas como resultado de la variación del pH del medio (figuras 16 y 17).

Un punto importante a mencionar referente a los datos mostrados por Quijano Govantes, *et al.* (2004), es que son enzimas producidas por un hongo micoparásito (*Verticillium fungicola*), mientras que en este caso se trabajó con un hongo entomopatógeno (*Lecanicillium lecanii*), el cual muestra una mayor producción de enzimas en comparación al micoparásito, sin embargo ambos muestran el mismo mecanismo de acción de dichas enzimas durante el proceso de hidrólisis de la quitina.

De esta forma logramos observar a las endoquitinasas las cuales trabajan directamente sobre la quitina, expresarse desde las primeras horas y alcanzando su máxima concentración a las 108h con una producción máxima de 100 U/g SI en medios de pH 5, sin embargo dicha producción aumenta hasta 300 U/g SI a las 120h, con pH 7 debido al cambio de pH del medio, de igual forma este efecto de aumento en la producción enzimática se ve reflejado en las otras enzimas involucradas, teniendo un aumento desde 0.7 U/g SI de N-acetil hexosaminidasa en medios con pH constante hasta 1.2 U/g SI en fermentaciones con pH variado (a las 120h, con pH 7), para el caso de las proteasas el incremento es de 1000 hasta 4500 U/g SI respectivamente (con pH 8).

Otro dato que cabe resaltar es el efecto provocado de las proteasas sobre los otros grupos enzimáticos como lo son las endoquitinasas y N-acetil hexosaminidasas, las cuales, en las fermentaciones con pH variado alcanzan su máxima concentración a las 120h y posteriormente se observa su descenso, justo cuando las proteasas alcanzan su máximo, así mismo la expresión de estas últimas, se observa a lo largo de toda la fermentación, debido a su acción sobre la proteína residual de la quitina con el fin de liberarla, como por la misma forma de infección del hongo.

7.6 Electroforesis

Con el liofilizado obtenido de la fermentación con quitina y variación de pH se realizó un gel de electroforesis. Este gel (figura 18) muestra los pesos moleculares de las bandas mejor expresadas correspondientes a las enzimas excretadas a un pH de 8 durante la fermentación de *L. lecanii* 157 con quitina como fuente de carbono y comparándolas con un marcador de amplio rango, a partir de lo cual podemos observar que estas se encuentran entre los 24 y 123 kDa. Mostrando bandas entre los 30 y 50 kDa (según el marcador), las cuales corresponden al peso molecular de las quitinasas reportadas por Liu *et al.*, (2003).

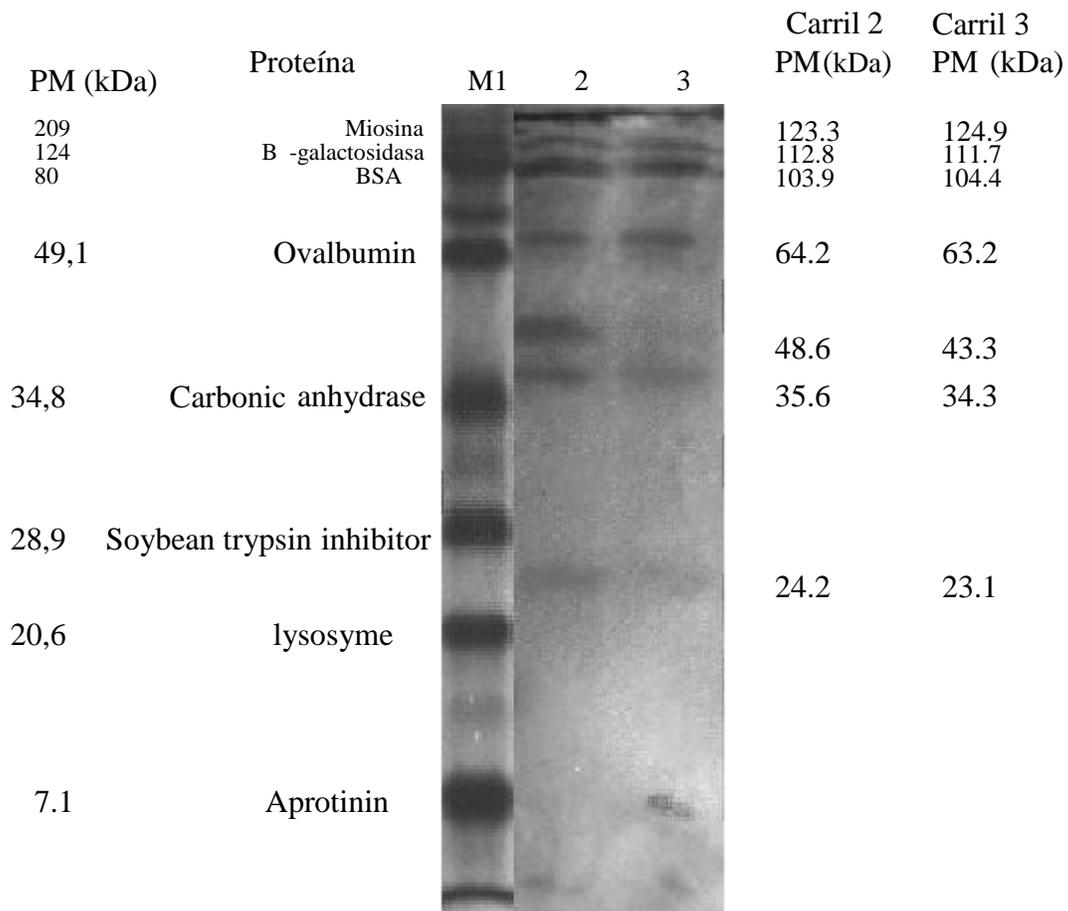


Figura 18. Pesos moleculares en gel de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) de extractos enzimáticos obtenidos de un cultivo sumergido de *L. lecanii* 157 con quitina variando pH de cultivo: Carril 1 Marcador estándar 2 y 3 Extracto enzimático (pH 8).

8. Conclusiones

Este trabajo mostró que la previa aclimatación de *L. lecanii* 157 a los hidrocarburos no favoreció a la asimilación de estos, por el contrario le producen al hongo un daño tal que impide su asimilación. Las micrografías electrónicas reflejan este daño celular, tanto en hifas como en esporas.

Sin embargo aún sin la asimilación del hidrocarburo se observó la presencia de quitinasas, por ello es posible pensar que estos sí funcionan como inductores enzimáticos, dando un carácter hidrofóbico al medio. No obstante habrá que hacer más estudios acerca de esto con el fin de comprobar o rechazar este resultado.

La acción de cada grupo enzimático observado en las cinéticas con hidrocarburos, así como en la hidrólisis de quitina corrobora el mecanismo de acción de las enzimas quitinolíticas reportado por (Horsch *et al.*, 1997). Se observó el aumento de actividad enzimática al hacerse los cambios de pH en el medio con quitina, favoreciendo de esta forma la producción de endoquitinasas con pH de 5 a 7, N-acetil hexosaminidasas con pH 7 y las proteasas con pH 8, proporcionando así mayor eficiencia a la acción del complejo enzimático involucrado en dicha hidrólisis.

A su vez la variación del pH en medio líquido con quitina ocasiona que *L. lecanii* 157 exprese proteínas a pH 8 con pesos moleculares que van de los 100 a los 123 kDa, aunque es relevante la presencia de proteínas entre los 30 y 50 kDa, los cuales corresponden a pesos moleculares de quitinasas reportados por Liu *et al.*, (2003).

9. Trabajo Futuro

Debido a que el crecimiento de las cepas aclimatadas con quitina coloidal (figura 8) se inicia hasta después de las 200 h de haberse incubado el hongo, se puede ver que en las cinéticas con los hidrocarburos respectivos la producción de Endoquitinasas y N-acetil hexosaminidasas se presentan al mismo tiempo. Lo cual nos podría hacer pensar que la presencia de estas enzimas es simplemente debido a otro patrón genético del hongo el cual no requiriera forzosamente de un inductor para la producción enzimática, sino más bien que estas enzimas sean de tipo constitutivas. Por ello se recomienda hacer más estudios sobre dicho metabolismo, con el fin de descartar o confirmar esta posibilidad.

Con respecto a los resultados de crecimiento radial en placa, los cuales mostraron que la adición del extracto de levadura ayuda a la asimilación o bien a la tolerancia del tolueno es posible hacer otros experimentos que ayuden a discernir entre ambas posibilidades, así como el probar otras fuentes de nitrógeno más simples para descartar que este funcione no solo como fuente de nitrógeno sino también como fuente de carbono.

10. Cursos Y Otras Actividades Realizadas

1. Barrera L., Cira L.,Martínez-Piña M., Pacheco N., Plascencia M., Ramírez JC., Rocha Z.,Shirai K. Aprovechamiento de desechos de camarón, calamar y pescado para recuperación de compuestos con valor agregado. V Congreso del Noroeste, I Nacional de Ciencias Alimentarias y Biotecnología. 7-12 de noviembre de 2005, Hermosillo, Sonora, México.
2. Curso de biopolímeros en la Universidad Potsdam, Alemania. Del 11 al 29 de Septiembre, 2006.

REFERENCIAS

1. Askary, H., Benhamou, N. y Brodeur, J., 1997. Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Biochemistry and Cell Biology* 87(3): 359-368.
2. Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G., 1988. N-acetyl-D-glucosaminemediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(11): 2699-2704.
3. Bradford MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
4. Calonje M., García, M.C., Galán, B., and Novaes-Ledieu, M., 1997. Enzymic activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *agaricus bisporus* fruit body cell walls. *Microbiology*, 143: 2999-3006.
5. Cira LA, Huerta S, Hall GM, Shirai K. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochem.* 2002, 37(12):1359-1366.
6. Crespo R., Juárez M. P., and Cafferatta L.F.R., 2000. Biochemistry of the interaction between entomopathogenous fungi and their insect host-like hydrocarbons. *Mycologia* 92: 528-536.
7. Crespo R., Juárez M. P., Dal Bello G. M., Padín S., Calderón g. and Pedrini N., 2002. Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassian*. *Biocontrol* 47: 685-698.
8. Deshpande, M.V. 1986. Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *Journal of Scientific and Industrial Research* 45:273-281.
9. Fenice M., Di Giambattista R., Petruccioli M., Federico F., 1997. Production of N-Acetyl-D-Glucosamine and Chitinolytic Enzymes by a Strain of *Verticillium lecanii* Cultivated in Bench-top Fermentor. *Advance in Chitin Science*, Vol.II. pp-145-150.
10. Horsch M, Mayer C., Sennhauser U. and Rast D. 1997. β -N-Acetylhexosaminidase: A target for the Design of Antifungal Agents. (1-3). pp. 187-218.
11. Iglesias Arroyo M., Paniagua Paniagua N., Larralde Corona CP y Shirai K. "Elicitors of fungal cell wall degrading enzymes production by *Verticillium fungicola* and interaction

with phytopathogenic fungi". VII Simposio Latinoamericano de Polímeros, VI Congreso Iberoamericano de Polímeros, II Simposio Iberoamericano de Quitina, XV Congreso Nacional de Polímeros. Acapulco, Guerrero México. 10-15 Noviembre 2002.

12. Jun, Y., Bridge, P.D. y Evans, H.C., 1991. An integrated approach to the taxonomy of the genus *Verticillium*. J. Gen. Microbiol. 137: 1437-1444.

13. Krivobok S, Miriouchkine E, Seigle-Murandi F; Benoit-Guyod JL., 1998. Biodegradation of antracene by soil fungi. Chemosphere. 37(3): 523-530.

14. Kunitz, M., 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. Journal of General Physiology 30, 291-310.

15. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

16. Liu Bing-Lan, Kao Pao-Min, Tzeng Yew-Min, Feng Kuo-Ching., 2003. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. Enzyme and Microbial Technology. 33(4): 410-415.

17. Mach R. L., Peterbauer C.K., Payer k., Jaksits S., Woo S. L., Zeilinger S., Kullnig C. M., Loito M., and Kubicek C. P., 1999. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. Applied and environmental microbiology. 65(5): 1858-1863.

18. Marín MC. 2006. Evaluación de actividad quitinolítica de cepas de *Lecanicillium* en medios hidrófobos utilizando compuestos orgánicos volátiles. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

19. Marín MC, Matsumoto Y, Viniestra G y Shirai, K. Effect of type of mycelial agregation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases and proteases by solid-state fermentation on polyurethane foam. Enviado a Enzyme Microbial Technology.

20. Matsumoto, Y, Saucedo-Castañeda, G. Revah, S. and Shirai K . 2004. Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentation utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. Process Biochemistry 39(6): 665-671.

21. Matsumoto, Y, Saucedo G, Revah S y Shirai K., 2001 "Chitinases production in solid state fermentation and submerged fermentation by *Verticillium lecanii* with silage shrimp as substrate. Chitin Enzymology. 381-389.

-
22. Pegg G.F. 1988. Chitinase from tomato *Lycopersicon esculentum*. Methods in enzymology. (161): 484-487.
23. Quijano-Govantes G, Ramírez-Coutiño L, Paniagua N, Larralde-Corona CP y Shirai K., 2004. Evaluation of pH of culture on the chitinolytic and proteolytic activities of *Verticillium fungicola* using shrimp waste silage. Advances in Chitin Science, volume VII. Boucher I, Jamieson K and Molecular Microbiology 84 (3): 229-238.
24. Ramirez Coutiño L., Marin M.C, Huerta S., Revah S., Shirai K. 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. Process Biochemistry 41: 1106-1110.
25. Ruíz Herrera y Ruíz-Medrano R., 2003. in Handbook of fungal Biotechnology, ed Arora, D. Dekker Nueva York pp. 600.
26. St. Leger RJ, Joshi I, y Roberts D. 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hidrophobin by *Metarhizium anisopliae*. Applied and Environmental Microbiology, 64(2): 709-713.
27. Tronsmo A. y Harman, G.E. 1993. Detection and quantification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solution and on gels. Analytical Biochemistry 208: 74-79.
28. Wösten HAB and Willey J. 2000. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. Microbiology 146: 767-773.

ANEXOS

A1. Curva Patrón p-nitrofenol

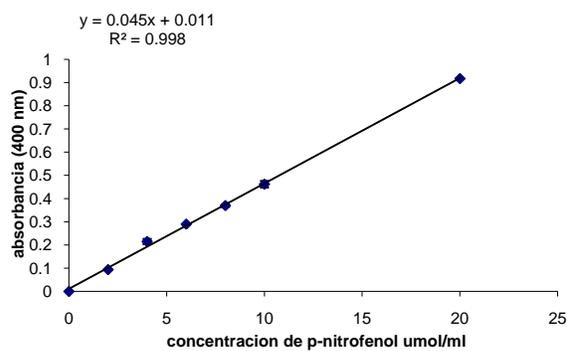


Figura. A1. Curva patrón de p-nitrofenol (Tronsmo y Harman, 1993).

A2. Curva Patrón de hidrocarburos

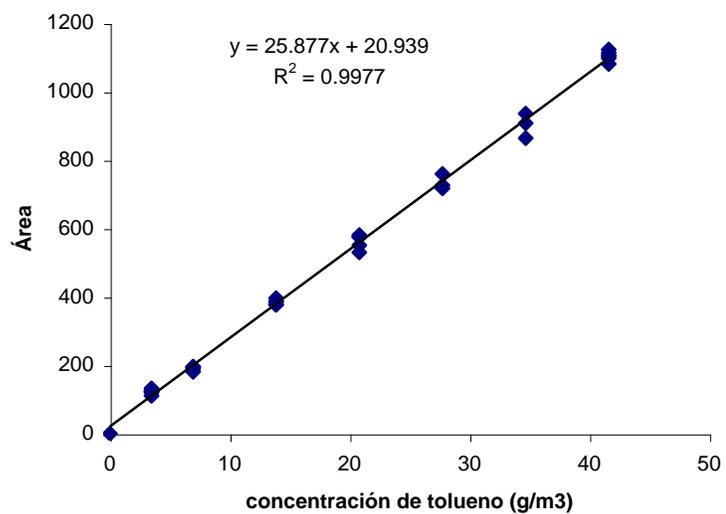


Figura. A2.1. Curva patrón de Tolueno.

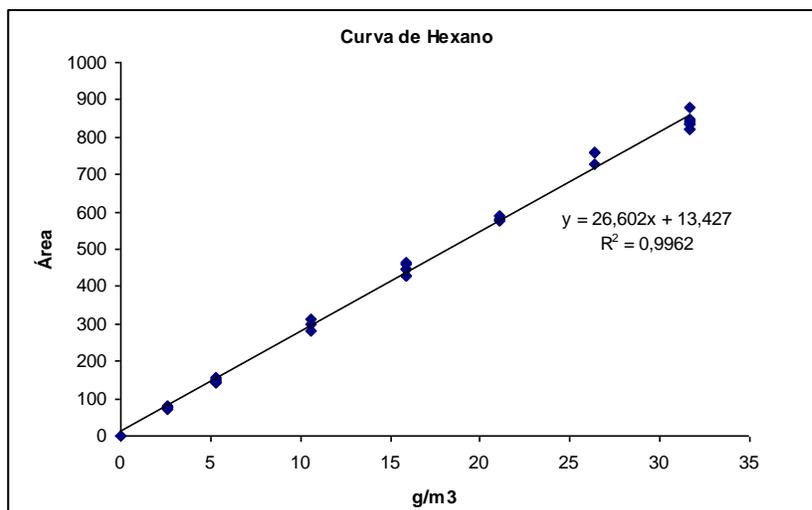


Figura. A2.2. Curva patrón de n-Hexano.

A3. Determinación de la concentración de CO₂

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

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

C_{CO_2} = Concentración de CO₂

A_{CO_2} = Área de CO₂

A_{total} = Área CO₂ + Área N₂

F_c = Factor de corrección

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

Procedimiento 029: Determinación de Dióxido de Carbono en Aire- Método de Cromatografía de Gases

A4. ANOVA y comparación de medias del crecimiento radial en placas

A4.1 Tratamientos con Tolueno

ANOVA con hidrocarburo

	Grados de libertad	Media de Cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia (alpha = 0.05)
Entre grupos	4	5.3995	8.51	0.000005	0.998604
Dentro de grupos	115	18.24375			
Total	119	23.64325			

*Term significant at alpha = 0.05

ANOVA control, sin hidrocarburo

	Grados de libertad	Media de Cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia (alpha = 0.05)
Entre grupos	4	7.793667	71.83	0.000000*	1.000000
Dentro de grupos	115	3.119583			
Total	119	10.91325			

*Term significant at alpha = 0.05

Comparación de medias multiple Tukey-Kramer (entre tratamientos)

Tratamiento	Lecturas	Diámetros (cm)	Grupos diferentes
MMT	24	$8.33 \cdot 10^{-2}$	ET, GLUT, GET
QCoT	24	0	ET, GT, GET
ET	24	0.51875	MMT, QCoT, GLUT
GLUT	24	0.2125	MMT, QCoT, ET, GET
GET	24	0.5375	MMT, QCoT, GLUT

Alpha=0.050 Error Term=115 MSE=1.321014E-02

Comparación de medias multiple Tukey-Kramer (entre controles)

Tratamiento	Lecturas	Diámetros (cm)	Grupos diferentes
MMT	24	0.1	QCoT, EGT
QCoT	24	0.2916	MMT, ET, GET
ET	24	3.33E-02	QCoT, GLUT, GET
GLUT	24	0.2291	ET, GET
GET	24	0.7583	MMT, QCoT, ET, GLUT

Alpha=0.050 Error Term=S DF=115 MSE=2.712681E-02

MMT= Medio Mineral, QCoT= MM+ Quitina Coloidal, ET= MM + Extracto de levadura, GLUT= MM + Glucosa, GET= MM + Extracto de Levadura + Glucosa. Todos en presencia de Tolueno (T).

A4.2 Tratamientos con n-Hexano

ANOVA con hidrocarburo

	Grados de libertad	Media de Cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia (alpha = 0.05)
Entre grupos	4	149.0288	13.56	0.000000*	0.999996
Dentro de grupos	115	315.9442			
Total	119	464.973			

*Term significant at alpha = 0.05

ANOVA control, sin hidrocarburo

	Grados de libertad	Media de Cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia (alpha = 0.05)
Entre grupos	4	59.65867	6.06	0.000184*	0.983547
Dentro de grupos	115	283.045			
Total	119	342.7037			

*Term significant at alpha = 0.05

Comparación de medias multiple Tukey-Kramer (entre tratamientos)

Tratamiento	Lecturas	Diámetros (cm)	Grupos diferentes
MMH	24	3.225	GLUH, GEH
QCoH	24	3.591	GLUH, GEH
EH	24	3.725	GEH
GLUH	24	2.212	QCoH, EH, GEH
GEH	24	0.7625	MMH, QCoH, GLUH, GEH

Alpha=0.050 Error Term=S DF=115 MSE=2.747341

Comparación de medias multiple Tukey-Kramer (entre controles)

Tratamiento	Lecturas	Diámetros (cm)	Grupos diferentes
MM	24	4.0625	QCoH, EH
QCo	24	3.683	MMH, EH
E	24	3.404	MMH, QCoH
GLU	24	2.587	MMH, QCoH, EH, GEH
GE	24	2.154	MMH, QCoH, EH, GLUH

Alpha=0.050 Error Term=S DF=115 MSE=2.461261

MMH= Medio Mineral, QCoH= MM+ Quitina Coloidal, EH= MM + Extracto de levadura,
GLUH= MM + Glucosa, GEH= MM + Extracto de Levadura + Glucosa. Todos en
presencia de n-Hexano (H)



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00015

CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO DE
Lecanicillium lecanii
UTILIZANDO QUITINA E
HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE
CARBONO

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 14 del mes de marzo del año 2007 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. CONCEPCION KEIKO SHIRAI MATSUMOTO
M. EN C. SERGIO HERNANDEZ JIMENEZ

siendo la primera asesora de la alumna y lector el segundo, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: ZAIZY ROCHA PINO



de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Zaizy Rocha Pino
ZAIZY ROCHA PINO
FIRMA DE LA ALUMNA

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

[Signature]
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DR. JOSE FRANCISCO FLORES
PADROCHE

ASESORA

[Signature]
DRA. CONCEPCION KEIKO SHIRAI
MATSUMOTO

LECTOR

[Signature]
M. EN C. SERGIO HERNANDEZ
JIMENEZ