



CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE ENZIMAS QUITINOLÍTICAS Y PROTEOLÍTICAS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS CULTIVADOS EN MEDIO

María Eva Limón- Molina, Juan Esteban Barranco-Florido *, Gerardo Saucedo-Castañeda
Depto. Biotecnología, UAM-Iztapalapa, * Depto. Sistemas Biológicos, UAM-Xohimilco.
México, D.F., Fax (55) 5804-6554, saucedo@xanum.uam.mx

Palabras clave: Hongos entomopatógenos, proteasas, quitinasas

Introducción. Los hongos entomopatógenos son utilizados como agentes de control biológico de plagas de insectos, como ejemplo tenemos: *Lecanicillium lecanii*, *B.bassiana* y *M. anisoplia* (1). Durante el proceso infectivo estos hongos producen enzimas hidrolíticas que degradan la cutícula y facilitan la penetración del hongo en el insecto. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de sustratos complejos, usados inductores, en la expresión quitinasas y proteasas.

Metodología. Se usaron dos cepas de hongos entomopatógenos una de *Beauveria bassiana* 6 y otra de *Lecanicillium lecanii* ATCC 2685. El caparazón de camarón y la cutícula de *S. purpurascens* (chapulín) se usaron como sustratos inductores de las enzimas. Los cultivos realizaron en medio sólido usando poliuretano de baja densidad como soporte, a una humedad de 80% e incubando a 27°C por 4 días. La producción de CO₂ se midió por cromatografía de gases. La actividad proteolítica se determinó de acuerdo a lo descrito con anterioridad (1,2), una Unidad Enzimática (U.E) se definió como la cantidad de enzima requerida para incrementar 0.1 unidades de absorbancia ($\lambda=520$ nm) por $\text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$. Las UE se expresaron por gramo sustrato. La actividad quitinolítica se determinó por el método del p-nitrofenol N-acetil- β -D-glucosánida (1), na Unidad Enzimática (U.E.) se definió como la cantidad de enzima requerida a producir un μmol de p-nitrofenol $\text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ Las UE se expresaron por gramo de sustrato.

Resultados y discusión. La producción de CO₂, permite hacer una estimación indirecta del crecimiento en cultivos donde la única fuente de C y N proviene de los sustratos complejos, en ambos casos crecen los hongos.

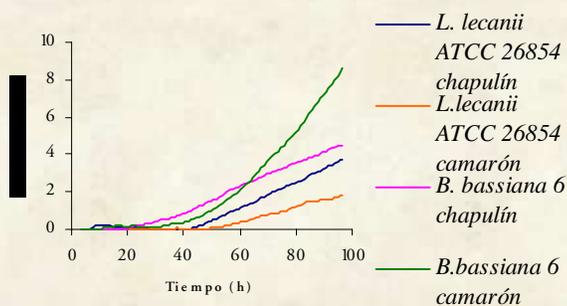


Fig. 1. Producción de CO₂ con cutícula de *S. purpurascens* y caparazón de camarón.

La cepa de *B. bassiana* presentó la mayor producción de CO₂, después de 4 días de cultivo con ambos sustratos, lo cual es especialmente interesante para el caparazón de camarón que le da un uso potencial a este residuo marino.

Tabla. 1 Actividad quitinolítica con p-nitrofenol N-acetil- β -D-glucosánida en los dos diferentes inductores usados.

| SUSTRATO | CEPA | U.E. ($\mu\text{mol} / \text{ml min.}$) |
|--|--|--|
| Caparazón de camarón | <i>Beauveria bassiana</i> 6 | 2.68 \pm 0.13 |
| Caparazón de camarón | <i>Lecanicillium lecanii</i> ATCC 26854 | 1.90 \pm 0.01 |
| Cutícula de <i>S. purpurascens</i> (chapulín) | <i>Beauveria bassiana</i> 6 | 8.23 \pm 0.02 |
| Cutícula de <i>S. purpurascens</i> (chapulín) | <i>Lecanicillium lecanii</i> ATCC26854 | 9.31 \pm 0.72 |

Tabla 2. Actividad proteolítica con azoccol en los dos diferentes inductores usados

| SUSTRATO | CEPA | U.E. ($\mu\text{mol} / \text{ml min.}$) |
|--|--|--|
| Caparazón de camarón | <i>Beauveria bassiana</i> 6 | 0.029 \pm 0.012 |
| Caparazón de camarón | <i>Lecanicillium lecanii</i> ATCC 26854 | 0.041 \pm 0.001 |
| Cutícula de <i>S. purpurascens</i> (chapulín) | <i>Beauveria bassiana</i> 6 | 0.121 \pm 0.0003 |
| Cutícula de <i>S. purpurascens</i> (chapulín) | <i>Lecanicillium lecanii</i> ATCC26854 | 0.116 \pm 0.047 |

Las actividades enzimáticas (Tablas 1 y 2), son mayores usando cutícula de *S. purpurascens* (chapulín) aun cuando el crecimiento aparente medido por respirometría fue menor.

Conclusiones. *B. bassiana* presentó la mayor tasa de producción de CO₂ con cutícula de camarón, mientras que las actividades enzimáticas (proteasas y quitinasas) son mayores utilizando cutícula de *S. Purpurascens* (chapulín).

Agradecimiento. Al financiamiento de CONACYT.

Bibliografía.

- Barranco, J. E., Alatorre, R., Gutiérrez, M., Viniegra, G., Saucedo, G. (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 910-915.
- Rozs, M., Manezinger, L., Vágvolgyi, Cs. kevei, F. Hochkoppler, A, Vara -Rodríguez, A.G. (2001). Fermentation characteristics and secretion of proteases of a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*: *Biotechnology Letters* **23**: 1925-1929.
- Leger, St. (1986). Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **253**: 221-232.