

Mtra. María Elena Contreras Garfias
 Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
 PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre :	
Matrícula :	Licenciatura :
Domicilio :	
Teléfono :	Celular :
Correo Electrónico :	CURP :

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto :							
Lugar donde se realizó el Servicio Social :							
Dependencia :							
Entidad Federativa :							
Municipio :	Localidad :						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: _____ Tipo: _____

Orientación: _____

FIRMAS

Asesor Interno
 Nombre, firma y No. Económico

Asesor Externo
 Nombre, firma y No. Económico

Alumno
 Nombre, firma

Vo. Bo. de la Comisión
 Nombre y firma de la persona que autoriza

México, CDMX, a 11 de diciembre del 2020

Dr. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos
Presente.

Por medio de la presente nos permitimos comunicarle que la alumna Karla Franco César, con matrícula 2143026860, de la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, concluyó el Servicio Social “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA Y QUITÍN-DESACETILASA DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS PRODUCIDOS POR FERMENTACIÓN SÓLIDA, A PARTIR DE CUTÍCULA DE CAMARÓN”. Dicho trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología, de la misma Institución. Dicho Servicio Social se realizó del 27 de septiembre del 2019 al 27 de marzo del 2020, bajo nuestra asesoría, cubriendo un total de 480 horas.

Sin más por el momento, aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente



Luz María Zenit Tovar Castro



Juan Esteban Barranco Florido

c.c.p. Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de CDB.

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. Del Hueso 1100 Col. Villa Quietud Deleg. Coyoacán CP 04960 México CDMX, Tel. 5483-7000 ext. 3445.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL:

*“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA Y QUITÍN-DESACETILASA
DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS PRODUCIDOS POR FERMENTACIÓN
SÓLIDA, A PARTIR DE CUTÍCULA DE CAMARÓN.”*

Correspondiente al proyecto genérico:

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

PRESENTA:

Karla Franco César

Matrícula: 2143026860

ASESORES:

Dr. Juan Esteban Barranco Florido

Dra. Luz María Zenit Tovar Castro

No. Económico: 24927

No. Económico: 32252

Lugar de realización: Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, con dirección: Calzada del Hueso 1100. Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P 04960, Cd. De México, México.

Periodo: 27 de septiembre del 2019 al 27 de marzo del 2020

Ciudad de México al 11 de diciembre de 2020

Contenido

1. Introducción	4
2. Hongos entomopatógenos HE	5
2.1. Importancia de los HE	6
2.1.1. <i>Metarhizium anisopliae</i>	7
2.1.2. <i>Beauveria bassiana</i>	8
2.1.3. <i>Lecanicillium lecanii</i>	8
2.1.4. <i>Trichoderma harzianum</i>	8
2.2. Importancia de la quitina	9
2.3. Caparazón de camarón	9
2.4. Enzimas quitinolíticas	10
2.5. Fermentación sólida	12
2.5.1. Ventajas de la fermentación sólida	12
2.5.2. Aireación y actividad enzimática	12
2.5.3. pH y actividad enzimática	13
2.6. Métodos analíticos	13
2.6.1. Espectrofotometría de Luz UV-Vis	13
2.6.2. Cromatografía de gases	14
3. Objetivo general	15
3.1. Objetivos específicos	15
4. Materiales y métodos	15
4.1. Materiales	15
4.1.2. Medio de cultivo sólido	15
4.1.3. Tratamiento del soporte	15
4.2. Métodos	16
4.2.1. Preparación del inóculo	16
4.2.2. Fermentación sólida	16
4.2.3. Condiciones de aireación	17
4.2.4. Tratamiento de muestras	17
4.2.5. Determinación de pH y biomasa	18
4.2.6. Determinación de proteína	18
4.3. Determinación de la Actividad Enzimática	19
4.3.1. Actividad N-acetilglucosaminidasa	19

4.3.2.	Actividad quitindesacetilasa (QDA)	19
4.4.	Determinación de producto de extracto enzimático por Cromatografía de Gases.....	20
4.5.	Selección del mejor HE productor de actividad quitinolítica y quitindesacetilasa.....	20
5.	Resultados y discusión	20
5.1.	Condiciones de aireación	20
5.2.	Determinación de pH.....	21
5.3.	Determinación de biomasa.....	22
5.4.	Determinación de proteína	23
5.5.	Determinación de la actividad enzimática	25
5.5.1.	Actividad N-acetilglucosaminidasa	25
5.5.2.	Actividad Quitin desacetilasa (QDA)	27
5.5.3.	Determinación de producto de extracto enzimático por Cromatografía de Gases	29
5.5.4.	Selección del mejor HE productor de actividad quitinolítica y quitindesacetilasa.....	29
6.	Objetivos y metas alcanzados	30
7.	Conclusiones.....	30
8.	Bibliografía.....	31
9.	Anexos	34
10.	Resumen.....	37

1. Introducción

La Quitina es el componente más importante en el exoesqueleto de los invertebrados, por ejemplo, anélidos, artrópodos y moluscos. Se encuentra además en hongos y mohos. Es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Su fórmula química es similar, sólo que en la quitina se encuentra un grupo acetamida en lugar del hidroxilo en el carbono 2, ambos actúan como materiales de defensa y estructurales. Se produce en las paredes celulares de hongos y levaduras, en el krill, en tendones y exoesqueleto de langostas, cangrejos, camarones y langostinos, así como también en cutículas de insectos.

La quitina se considera como el producto de la separación de varios constituyentes a los que se mantiene unida (proteínas, minerales, lípidos y pigmentos) en una matriz compleja llamada "estructura quitinosa". Es un polímero lineal con predominio de residuos 2-acetamida-2-deoxi D-glucopiranosos (N-acetil-D-glucosamina) y en menor proporción de 2-amino-2-deoxi- β -D-glucopiranosos (D-glucosamina). La materia prima es generalmente exoesqueleto de langosta, langostinos, camarones y cangrejos de varias especies (*Pandalus borealis*, *Euphausia superba*, *Pleoticus muller*, *Chionoeceter opilio*, *Japonicus bardii*). Los exoesqueletos de crustáceos, en base seca, contienen 15-20% de quitina, 25-40% de proteínas y 40-55% de sales minerales (carbonato y fosfato de calcio). Otros constituyentes son lípidos y algunos pigmentos, incluidos carotenoides.

La quitina una vez aislada se presenta como un polvo cristalino blanco, insoluble en agua, solventes orgánicos, ácidos y álcalis diluidos y concentrados. Su escasa solubilidad se debe a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares entre las cadenas β -(1,4)-glicosídicas y a su rígida estructura cristalina. Es soluble en hexafluoropropanol, hexafluoroacetona, cloroalcoholes en conjugación con soluciones acuosas de ácidos minerales y dimetilacetamida conteniendo un 5% de cloruro de litio. Este polisacárido presenta baja toxicidad y es inerte en el tracto gastrointestinal de mamíferos.

La quitina es biodegradable, debido a la presencia de las enzimas llamadas quitinasas, ampliamente distribuidas en la naturaleza y encontradas en bacterias, hongos, plantas y en el sistema digestivo de varios animales. Las quitinasas están involucradas en la defensa contra invasión de bacterias. La quitina desacetilasa es una hidrolasa perteneciente a la familia 4 de las carbohidrato-esterasas (CE4) y cataliza la conversión de quitina en quitosana, mediante la desacetilación de los residuos de NAG presentes en la molécula de la primera. La quitina desacetilasa puede desacetilar oligosacáridos solubles, producidos por acción de endoquitinasas sobre la quitina, fenómeno que puede darse durante la autólisis de la pared celular de aquellos microorganismos con quitina en dicha estructura. En estudios más recientes se ha demostrado que las quitina desacetilasas en general son más activas sobre oligosacáridos formados por NAG.

En este trabajo se estudió la capacidad de algunos microorganismos de utilizar este polisacárido como sustrato en cultivo sólido, para la producción de enzimas, así como sus productos de reacción mediante el empleo de las técnicas analíticas, como la Espectrofotometría de UV-Vis y la Cromatografía de gases, las cuales fueron empleadas para la identificación y cuantificación de estos productos de interés.

2. Hongos entomopatógenos HE

Los hongos entomopatógenos son organismos capaces de invadir y lisar diferentes órdenes de artrópodos. Estos hongos se pueden desarrollar en ambientes hidrofóbicos, como es el caso de la cutícula de los insectos, la cual está constituida principalmente por ceras, proteínas y quitina (Khater y Marín, 2012).

Los hongos entomopatógenos son patógenos obligados o facultativos que se desarrollan a expensas de los insectos. Existen más de 700 especies de hongos asociados a insectos, algunos de los cuales se utilizan como productos de control biológico, por ser fáciles de manipular, multiplicar, ser efectivos en el control de plagas de importancia agrícola y ser inocuos para otras especies y el ser humano (France, 2000).

Los hongos usan como fuente de carbono la quitina, la cual forma parte del exoesqueleto de los insectos, además de producir compuestos que incluyen diferentes tipos de enzimas, la función de estas es la degradación del tegumento de insectos; está demostrado que la actividad entomopatógena de los hongos depende de su equipamiento enzimático, ya que para la penetración requiere de la acción de enzimas hidrolíticas como: proteasas, quitinasas y lipasas, que degradan el tegumento y proporcionan nutrientes al hongo para una mayor proliferación dentro del insecto (St. Leger, *et al.*, 1986; Khan, *et al.*, 2003; Huang, *et al.*, Yang, *et al.*, 2007).

El desarrollo de la infección se divide en tres fases: 1) la adhesión y germinación del conidio en la partícula del insecto, 2) penetración en el hemocele y 3) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto (Téllez, *et al.*, 2009; Broetto *et al.*, 2010). El proceso de infección puede explicarse de la siguiente manera:

- a) Un conidio se adhiere a la cutícula del insecto, germina y forma la estructura de infección: el apresorio.

- b) Se produce la combinación de la acción enzimática que degrada la cutícula, la cual se rompe debido a la presión osmótica, medida por la generación de altas

concentraciones de glicerol, producto de la hidrólisis causada por las gotas de lípidos translocadas del contenido germinado.

c) En el hemocele, los cuerpos hifales producen blastosporas para colonizar el hospedero y aprovechar sus nutrientes, secretan proteínas efectoras y metabolitos secundarios para evadir la respuesta inmune, por lo que se contrarrestan los receptores del hospedero (proteínas de resistencia), y producen toxinas.

d) Debido a estas estrategias, el insecto muere, el hongo termina de colonizarlo, las hifas emergen del insecto y forman las células conoidiogenas.

c) Dependiendo de las condiciones, estas últimas producen la esporulación sobre el hospedero (Cortés, 2018).

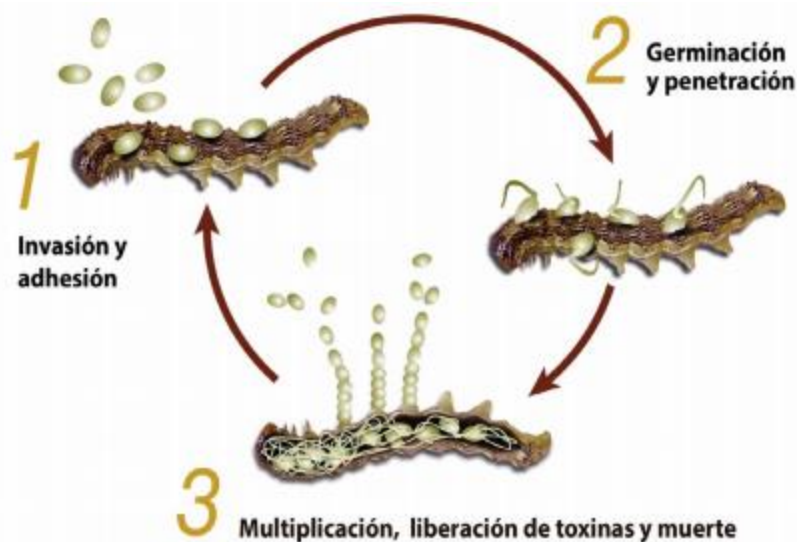


Figura 1. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos (Crespo, 2016)

2.1. Importancia de los HE

Los hongos entomopatógenos son muy importantes para el manejo de plagas dentro de los agroecosistemas, son reconocidos como agentes de control biológico por su capacidad natural de producir diferentes compuestos que causan enfermedad y muerte a los insectos (Assaf, 2007; Dias, *et. al.*, 2008; Mustafa y Kaur, 2009).

Las especies más importantes se distribuyen en las clases de los Zigomicetos (orden Entomophthorales), Deuteromicetos (Hifomicetos) y Ascomicetos (en particular los géneros *Cordyceps* y *Torrubiella*) y originan micosis en diferentes taxones de Artrópodos, pero sin duda, los Deuteromicetos, y en concreto los Hifomicetos, contienen el mayor número de especies entomopatógenas. Las ventajas de los HE son: poseen mecanismos de invasión que les permiten atravesar la cutícula o la pared del tracto digestivo de los insectos (tabla 1), actuando como insecticidas de contacto y no necesitan ser ingerido (Charnley y Collins, 2007). Su aplicación y manejo no representa peligro para el hombre y son inocuos en los productos agrícolas (Leng, *et. al.*, 2011; Shahid, *et. al.*, 2012).

Tabla 1. Los hongos entomopatógenos y sus hospederos (De Albuquerque *et al.*, 2009)

Subdivisión	Clase	Entomopatógeno	Hospedante
Mastigomycotina	Chytridiomycetes	<i>Coelomyces</i>	Larvas mosquitos
	Oomycetes	<i>Leptolegnia</i> <i>Lagenidium giganteum</i>	Larvas mosquitos
Zygomycotina	Zygomycetes	<i>Mucor</i>	Varios por heridas
		Entomophthorales	Diversos
Ascomycotina	Plectomycetes	<i>Ascospaera</i>	Abejas
	Pyrenomycetes	<i>Cordyceps</i>	Varios
Deuteromycotina	Coelomycetes	<i>Aschersonia</i>	Cochinillas y moscas blancas
		<i>Beauveria</i>	Varios
		<i>Culicinomyces</i>	Mosquitos
		<i>Hirsutella</i>	Ácaros
		<i>Metarhizium</i>	Varios
		<i>Nomuraea</i>	Noctuidos
		<i>Paecilomyces</i>	Varios
		<i>Toypocladium</i>	Larvas mosquitos
<i>Verticillium</i>	Cochinillas, moscas blancas, pulgones		

(Adaptada de Ainsworth, 1973).

2.1.1. *Metarhizium anisopliae*

Presentan conidióforo ramificado, conidias cilíndricas a ovales que se forman en cadenas originadas en fiálides. Las conidias son producidos en sucesión basipétala, estando la conidia más joven en la base de la cadena. Las conidias son blancas cuando son jóvenes, pero conforme maduran toman el color verde oscuro característico de esta especie. Características: Colonias de color verde que varían desde el oliváceo hasta amarillo-verde o verde oscuro. Desarrollan bien a 26 °C en Papa -Dextrosa- Agar (PDA), o en Sabouraud Dextrose Agar (SDA), o en (PDA-LC).

2.1.2. *Beauveria bassiana*

Este hongo ha sido aislado de más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de cultivos de importancia económica. La fructificación está constituida por células conidiógenas que dormán conidias sucesivas en un raquis que se desarrolla en forma de zig zag. Esta fructificación ocurre como conjunto de células conidiógenas unidas. Los insectos muertos por este hongo presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por el micelio y esporas de hongo. Presenta colonias blancas que se vuelven crema, amarillo pálido, incoloras al reverso, amarillas o rojizas, en medio Papa -Dextrosa-Agar (PDA) o Agar Papa Dextrosa Levadura de Cerveza (PDA-LC) presentan aspecto más pulverulento de blanco a crema, abundante esporulación (Vega, 2008).

2.1.3. *Lecanicillium lecanii*

Presenta micelio tabicado, conidióforos simples o verticilados, más anchos en la base y adelgazándose hacia los extremos, en donde se encuentran las conidias agrupadas en cabezuelas, rodeados de una sustancia mucilaginosa, unicelulares, hialinos, forma cilíndricos y ovoides. Este hongo cubre con un micelio de color blanco a sus hospederos, rodeándolo con un halo, de allí se le conoce con el nombre de “hongo blanco de la corona”. Características: Colonias blancas o cremas, algodonosas delicadas, micelio pegado al sustrato, incoloras al reverso, amarillo pálido o amarillo oscuro a los 10 días a 25 °C en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) o en Papa Dextrosa Agar (PDA) (SENASA, 2014).

Lecanicillium lecanii es un representante importante de estos patógenos, pertenece al grupo de los ascomicetos. Este hongo tiene capacidad para infectar insectos como la mosquita blanca, pulgones, cochinillas y trips (insectos patógenos de plantas) y cobra importancia debido a que ha sido utilizado comercialmente como una alternativa de biocontrol en agricultura y horticultura (Garraway y Evans, 1984; Gillespie y Claydon, 1989; Osborne y Landa, 1992; Butt *et al.*, 2001).

2.1.4. *Trichoderma harzianum*

El tamaño de los conidióforos es de 62.5-69 x 34.7 µm. Los conidióforos son de color verde, presentan diversas ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres, ubicadas en un ángulo amplio. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Las fiálides son largas y delgadas, solitarias a lo largo del eje, asimétricas, con un tamaño de 6.3-15.6 x 2.7-3.4 µm, con forma citriforme y subglobosos. Sus clamidosporas son intercalares y formadas por el micelio sumergido, subglobosas, de pared dentada, color verde suave y un tamaño de 12.5-10 µm. Características: Micelio blanco y eventualmente desarrollando un color verde oscuro después de la esporulación. Las colonias crecen y maduran rápidamente a los 5 días de incubación en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a 25 °C. Generalmente prefieren un pH ácido de

4.5-5, se desarrolla en áreas con un excesivo contenido de humedad y un estancamiento de bióxido de carbono en la atmósfera (Romero *et al.*, 2009).

2.2. Importancia de la quitina

La quitina es el polímero más abundante después de la celulosa. Está presente en la pared celular de hongos, levaduras y en el exoesqueleto de los invertebrados como cangrejos e insectos (Rodríguez y Ramírez, 2012). Es un polisacárido natural, de tonalidad blanca-amarillenta, rígido y no elástico. Se calcula que su tasa de regeneración en la biosfera es de casi el doble de la celulosa. La principal fuente de obtención de la quitina son los desechos de los crustáceos (Pacheco, 2013).

La quitina, es un homopolímero de β -(1,4) N- acetilglucosamina, es el polímero biológico más abundante en la biósfera después de la celulosa; es el principal componente estructural en las paredes celulares de los hongos y de exoesqueletos de invertebrados. Las quitinasas actúan simultáneamente con las proteasas, involucradas en la degradación de la cutícula de los insectos. Se encuentran ligadas a muchas etapas del proceso infectivo de los HE como la germinación, el crecimiento hifal, la morfogénesis, la nutrición y defensa contra competidores.

El genoma de los hongos filamentosos contiene entre 10 y 25 quitinasas diferentes. Algunas de las funciones fisiológicas de quitinasas incluyen: a) degradación de la quitina presente en las paredes celulares de fragmentos de hifas muertas o en los exoesqueletos de artrópodos, y el uso de los productos de degradación como una fuente de nutrientes; b) Remodelación de la pared celular durante el ciclo de vida de hongos, durante el crecimiento de las hifas, ramificación, fusión de hifas, autólisis y competencia; c) defensa contra otros hongos o artrópodos que se encuentran en el mismo nicho ecológico. Todas las quitinasas caracterizadas hasta la fecha, fueron clasificadas en las familias de GH 18 y 19, catalizan la hidrólisis del enlace β -1,4 de la quitina, del cual se obtiene una cadena corta de quitooligómeros. Las familias GH 18 y 19 no tienen estructuras tridimensionales diferentes, la familia 18 contiene quitinasas de bacterias, hongos, virus, animales y de plantas, clases III y V. La familia 19 contiene quitinasas de plantas clase I, II y IV (Sahai y Manocha, 1993).

Dada su importancia en la estructura de la pared, la síntesis de la quitina es una buena diana para la acción de los antifúngicos (Pontón, 2008).

2.3. Caparazón de camarón

El exoesqueleto es el principal producto sólido del camarón, el cual está constituido de proteínas, minerales, carotenos y quitina, siendo esta última uno de los principales componentes, que representa alrededor del 27 % en peso del caparazón, tomando en consideración este porcentaje de quitina y que en su

estructura principal está compuesto por unidades de N-acetilglucosamina, se propone determinar si es eficiente la obtención de glucosamina a partir de una hidrólisis ácida de la quitina derivada de los desechos del camarón.

Por su composición química los residuos de camarón son considerados como materia prima con un amplio potencial industrial, principalmente por la quitina; contiene un porcentaje de 3% carotenos, 27% quitina, 30% carbonato de calcio y 40% proteínas (Mustafa y Kaur, 2009).

2.4. Enzimas quitinolíticas

Dependiendo de sus patrones de corte (fig. 2), las quitinasas pueden dividirse en:

- Endoquitinasas: Rompen al azar enlaces internos de la molécula de quitina, dando como productos secundarios oligosacáridos formados de 2 a 6 unidades de N-acetilglucosamina.
- Exoquitinasas: Cortan desde el extremo no reductor de la cadena y el producto liberado es N-acetilglucosamina. Separan las moléculas de disacárido quitobiosa a partir del extremo no reductor de la molécula de quitina, o de aquellos oligosacáridos mayores a 3 unidades de N-acetilglucosamina.
- Quitobiasas: Son enzimas que hidrolizan al disacárido quitobiosa, en dos moléculas de N-acetilglucosamina.
- N- β -acetilglucosaminidasa o N- β -acetilhexosaminidasa: Corta el enlace no reducido de la quitina, aunque con preferencia utiliza como sustrato a la quitibiosa y puede actuar sobre quitotriosa o quitotetraosa.

Un análisis filogenético de las quitinasas de un genoma secuenciado de hongos demostró que pueden dividirse en tres subgrupos, Subgrupos A y B (que corresponde a las clases V y III, respectivamente) en donde se ubican un grupo nuevo de quitinasas de alto peso molecular, que todavía no se había descrito en hongos filamentosos (Seidl, 2008).

El subgrupo A tiene un dominio catalítico, pero no un CBM (módulo de unión a la quitina), en promedio tiene un peso molecular de 40-50 kDa y están presentes en todos los genomas de hongos.

El subgrupo B es de tamaño y estructura de dominio muy variable, tienen un peso molecular que se encuentra entre 30-90 kDa. Se pueden agrupar en pequeños subgrupos B de bajo peso (30-45 kDa) frecuentemente contienen CBM, una característica que está ausente del subgrupo A y en las proteínas de 90 kDa. El número de quitinasas del subgrupo B es muy variable entre las diferentes especies de hongos ascomicetos, se encuentran presentes en: *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Mycosphaerella*

fijiensis, *Mycosphaerella graminicola* y *Coccidoides immitis*. Y basidiomicetos (*Laccaria bicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Postia placenta*).

Subgrupo C es un nuevo grupo de quitinasas en hongos, la quitinasas descrita por primera vez de este subgrupo fue en *Hypocrea atroviridis* (*Tichoderma atroviride*) CHI18-10 (Seidl, *et. al.*, 2005). Este subgrupo tiene un peso molecular de 140-170 kDa. Las quitinasas del subgrupo C comparadas con los subgrupos A y B sugiere un papel distintivo y especial en la degradación de la quitina.

Estudios realizados sobre las quitinasas producidas por *B. bassiana* demuestran que secreta 20 quitinasas divididas en los tres subgrupos, ocho pertenecen al subgrupo A (sin un dominio de unión a la quitina, CBM), cuatro al subgrupo B (un CBM en el extremo C-terminal), y ocho son subgrupo C quitinasas (poseen dos dominios CBM y CBM) (Seidl, 2008).

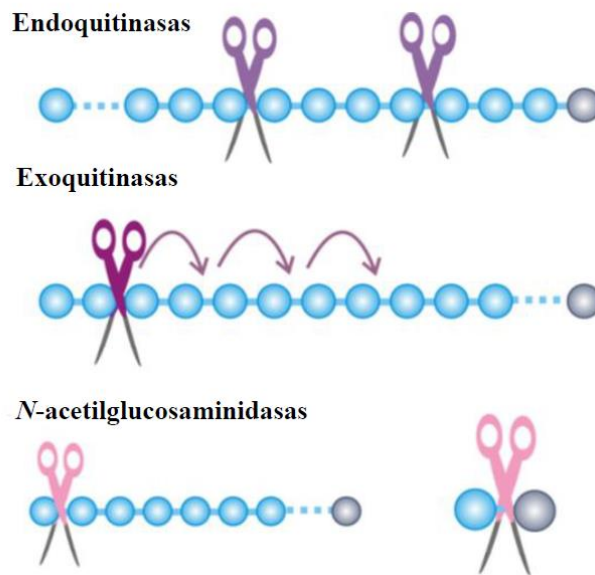


Figura 2. Hidrólisis de quitina mediante quitinasas (modificado de Seidl *et al.*, 2008)

2.5. Fermentación sólida

La fermentación en medio sólido se define como el cultivo de microorganismos en soportes sólidos o semisólidos en ausencia de agua libre, ya sea en vehículos inertes o sobre sustratos insolubles que pueden, además, ser utilizados como fuente de carbono y energía (Pandey, *et. al.*, 2000). El agua necesaria se encuentra en forma absorbida dentro de la matriz sólida. Las fermentaciones de estas características son aquellas en las cuales el sustrato no está disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua y los microorganismos que crecen en la superficie o en el interior de una matriz sólida y porosa. La cual está compuesta por un sustrato húmedo o de un soporte inerte, capaz de absorber los nutrientes que se encuentran disueltos en una solución, sin el escurrimiento de líquidos (Pandey, 2003).

2.5.1. Ventajas de la fermentación sólida

Entre las ventajas de usar la fermentación en medio sólido se encuentra la obtención de productos de alto valor agregado. Además, se obtiene altos niveles de productividad; los volúmenes de fermentación son menores a los sistemas sumergidos y el tratamiento del efluente es reducido. Algunas otras ventajas son:

- Mayores rendimientos, en un menor período de tiempo
- Mayor facilidad de recuperación de los productos
- No se producen espumas
- El riesgo de contaminación es menor dado los bajos niveles de humedad en el medio
- Mejor circulación del oxígeno
- Se puede emplear como sustratos materias primas o residuos de bajo coste de industrias agrícolas
- Se asemeja al hábitat de los hongos filamentosos

2.5.2. Aireación y actividad enzimática

En la mayoría de los procesos de fermentación en medio sólido participan microorganismos aerobios; es decir, que para que los microorganismos puedan crecer requieren de oxígeno, y es por esto por lo que la aireación es un factor fundamental para el desarrollo del proceso.

La aireación se utiliza para suministrar el oxígeno necesario, extraer el dióxido de carbono formado, así como para extraer el calor metabólico formado, de manera que el flujo óptimo de aire debe tomar en consideración la naturaleza del microorganismo utilizado, los requerimientos de oxígeno para el crecimiento y/o la

formación del producto deseado, la velocidad de generación de calor metabólico, la concentración crítica del dióxido de carbono y otros metabolitos volátiles, el espesor de la masa de sólido, entre otros.

La aireación en las fermentaciones en medio sólido es más fácil que las fermentaciones sumergidas, porque la superficie de contacto es mayor entre el aire y el líquido que está absorbido en las partículas. El tipo de inóculo en las fermentaciones en medio sólido puede ser de dos tipos fundamentales tanto a nivel laboratorio y a nivel industrial: esporas o micelio. 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 (Viniestra, *et. al.*, 2003)

2.5.3. pH y actividad enzimática

La temperatura es un factor importante en el crecimiento de éstos, y también para que se lleven a cabo toda una serie de diversas y múltiples reacciones químicas, de manera que puedan llevar a cabo todas sus actividades celulares. Este factor puede ser considerado como una variable crítica, debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo sólido-líquido-gas, lo que favorece la acumulación del calor metabólico en el sistema y un aumento de la temperatura del cultivo.

El pH es otra variable que afecta el desarrollo de los procesos de fermentación en estado sólido, este se puede ver afectado por la secreción de ácidos, o algunos otros metabolitos durante el proceso. Hablando de la fermentación en medio sólido, el control es algo complicado más no imposible; la complejidad es debida a la ausencia de instrumentos capaces de medir el pH en la capa de líquido que rodea el sólido.

En cuanto al medio de cultivo sobre el cual se desarrollarán los microorganismos, este debe tener todos los nutrientes necesarios de forma balanceada y con concentraciones adecuadas para favorecer el crecimiento del microorganismo. Al igual que en cualquier otro medio de cultivo, las relaciones entre algunos de sus elementos son de particular importancia; por ejemplo, carbono-nitrógeno y fósforo-oxígeno. (Pandey, 2003).

2.6. Métodos analíticos

2.6.1. Espectrofotometría de Luz UV-Vis

La espectrofotometría se basa en la medida de la absorción, por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática. La banda espectral empleada en las mediciones se extiende desde las longitudes de onda corta de la

zona ultravioleta hasta la visible del espectro. Por cuestiones prácticas, este intervalo espectral puede considerarse como si estuviera constituido por dos zonas, la ultravioleta de 190 a 380 nm y la visible de 380 a 780 nm. La espectrofotometría en la zona visible es la medida de la absorción de luz visible, que generalmente no es monocromática pero que se selecciona mediante el empleo de filtros pigmentados o de interferencia. En general, los espectros ultravioleta y visible de una sustancia, no tiene un alto grado de especificidad, sin embargo, son muy adecuados para las valoraciones cuantitativas y en el caso de muchas sustancias constituyen un medio útil de identificación adicional.

El uso de la espectrofotometría de absorción como procedimiento de valoración, se basa en el hecho de que la absorptividad de una sustancia en términos generales es una constante independiente de la intensidad de la radiación incidente, de la longitud interna de la celda y de la concentración, por lo cual ésta última puede determinarse fotométricamente. La Ley de Beer no considera el efecto de temperatura, la longitud de onda o el tipo de disolvente, pero en la mayoría de las determinaciones analíticas el efecto de variación normal de temperatura es insignificante (Farmacopéa, 2011).

2.6.2. Cromatografía de gases

La Cromatografía de gases es la técnica de más amplia utilización; ninguna técnica analítica puede ofrecer su capacidad de separación o su sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles. La utilización de la cromatografía de gases está restringida a la separación de compuestos con un peso molecular menor de 1000 a una temperatura máxima de trabajo de aproximadamente 400 °C; dentro de estos límites la única limitación existente será la estabilidad térmica. Para realizar una separación mediante cromatografía de gases, se inyecta una pequeña cantidad de la muestra a separar en una corriente de un gas inerte a elevada temperatura; esta corriente de gas atraviesa una columna cromatográfica que separará los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición (cromatografía gas líquido), de adsorción (cromatografía gas sólido) o, en muchos casos, por medio de una mezcla de ambos. Los componentes separados, emergerán de la columna a intervalos discretos y pasarán a través de algún sistema de detección adecuado, o bien serán dirigidos hacia un dispositivo de recogida de muestras.

3. Objetivo general

Evaluar la actividad quitinolítica y quitin-desacetilasa de extractos enzimáticos producidos por fermentación sólida, a partir de cutícula de camarón.

3.1. Objetivos específicos

1. Determinar las condiciones de aireación para la producción de enzimas quitinolíticas en fermentación sólida, a partir de los hongos entomopatógenos: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Trichoderma harzianum* (HE).
2. Evaluar la actividad quitinolítica y quitin-desacetilasa a partir de los extractos enzimáticos de HE.
3. Determinar los productos de las reacciones enzimáticas (oligoquitosanos), por Espectrofotometría UV y Cromatografía de gases.
4. Seleccionar el mejor HE productor de actividad quitinolítica y quitindesacetilasa.

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

4.1.1. Microorganismos

Los hongos entomopatógenos: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* y *Trichoderma harzianum*, fueron donados por la Planta Piloto 4 de fermentaciones y el Laboratorio de la Biología Molecular de la UAM Iztapalapa, así como del laboratorio de Biotecnología de la UAM Xochimilco. Estos microorganismos fueron conservados en viales con glicerol a -20 °C, propagados en PDA y/o mantenidos a 4 °C hasta su utilización.

4.1.2. Medio de cultivo sólido

El medio mineral empedado consistió en (g/L): 6 de NH_4SO_4 , 1.2 de MgSO_4 , 1 de NaCl , 15 de KH_2PO_4 , 0.1 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.028 de ZnSO_4 y 0.032 de MnSO_4 y 60 g de caparazón de camarón y bagazo de caña (Barranco *et al.*, 2002) como fuente de carbono y nitrógeno e inductor de las enzimas hidrolíticas.

4.1.3. Tratamiento del soporte

Se empleó caparazón de camarón y bagazo de caña en una concentración de 26.47 y 73.53%, respectivamente. El camarón provino de la Central de abastos de la zona Oriente de la Ciudad de México. La preparación del caparazón implicó la eliminación de la pulpa. Este material se puso a hervir en agua, Posteriormente se volvió a hervir con agua y se le adicionaron 5 mL de HCl 0.2 N, se mantuvo en agitación por 30 min (sin calor), se retiró el líquido y se enjuagó con agua destilada 2 veces. Nuevamente se le adicionó agua destilada y 20 lentejas de NaOH en agitación

constante por 20 min. Por último, se enjuagó con agua destilada y se dejó en estufa hasta sequedad. El material resultante se molió y tamizó a través de una malla 32.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparación del inóculo

El inóculo se preparó de la siguiente manera: los HE se inocularon en matraces ErlenMeyer de capacidad de 125 mL con medio de cultivo PDA, se incubaron por 7 días a 28 °C. Posteriormente se transfirió a cada matraz 10 mL de Tween 80 y un agitador magnético estériles y se agitó en vórtex por 5 min para recuperar las esporas. Después se hizo una dilución de cada suspensión (fig. 3) y se obtuvo la concentración de conidios por mL de suspensión (células/mL) que se empleó como inóculo para la fermentación en medio sólido.



Figura 3. Inóculo de los HE para la fermentación en medio sólido.

4.2.2. Fermentación sólida

La fermentación sólida se llevó a cabo de la siguiente manera; se emplearon 20 frascos transparentes con capacidad de 10 mL por cepa con aproximadamente 1 gramo de materia seca (gms) por frasco. Para cada cepa se colocaron en un vaso de precipitado 22 gms a los cuales se les adicionaron 33 mL de medio de cultivo, se mezcló homogéneamente y se esterilizó en autoclave a 120 °C y 15 psi por 15 min. Posteriormente, a cada vaso se le adicionó el volumen de medio de cultivo y suspensión de esporas necesaria para tener una humedad del 75% con un inóculo de 1×10^7 conidios/gms de los HE en 22 gms (fig. 4). Posteriormente a cada frasco se le adicionaron aproximadamente 3 gramos de materia húmeda (gmh). Todos los cultivos se incubaron a 28 °C por 11 días.

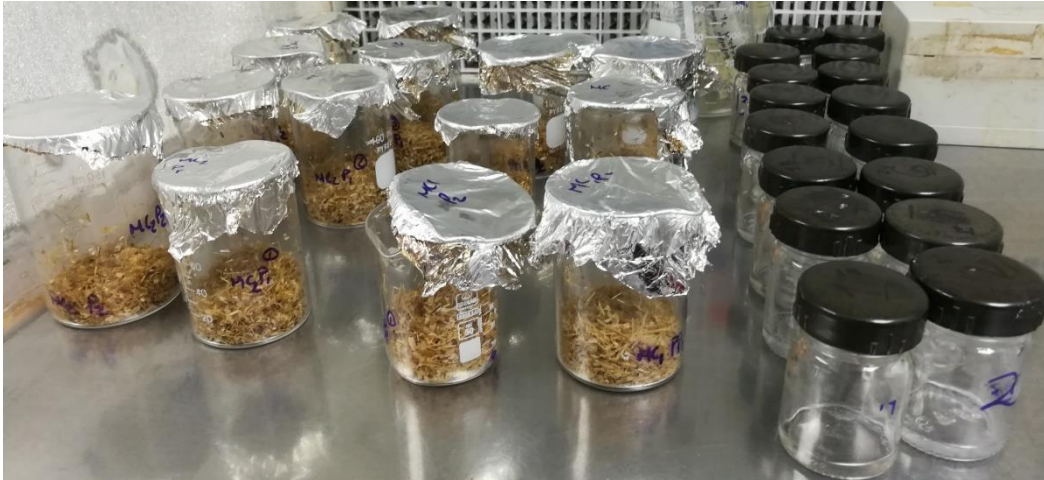


Figura 4. Fermentación sólida de los HE.

4.2.3. Condiciones de aireación

Una vez que se llenaron los frascos con materia a fermentar, se dividieron en 2 bloques, uno con los frascos tapados con tapón de rosca los cuales se consideraron sin aireación, y otro con los frascos tapados sólo con una capa de cubrebocas y una liga, los cuales se consideraron con aireación, como se observa en la figura 5.



Figura 5. Ilustración de la aireación en los cultivos de los HE.

4.2.4. Tratamiento de muestras

Una vez iniciada la fermentación sólida, se tomaron muestras cada 12 h (incluido el tiempo inicial) y se trataron de la siguiente manera: Se tomó 0.5 g de materia húmeda fermentada (gmhf) y se le adicionó 2 mL de agua destilada, se agitó en vórtex por 1 min, se separó el sobrenadante, se transfirió a microtubos de capacidad de 2 mL y se llevó a centrifugación por 2 min a 10, 000 rpm (fig. 6). El sobrenadante

se separó y se congeló hasta la determinación de pH, proteína, actividades enzimáticas y determinación de los oligosacáridos. El precipitado se empleó para la determinación de biomasa.



Figura 6. Tratamiento de la materia húmeda fermentada de los HE.

4.2.5. Determinación de pH y biomasa

El pH se midió a partir de los sobrenadantes o extractos enzimáticos obtenidos en pHmetro Hanna. La biomasa se leyó en Espectrofotómetro UV-Vis Varian a 600 nm, cuantificando la cantidad de biomasa con respecto a la absorbancia dada por una muestra seca, resuspendida en agua destilada y medida bajo estas condiciones de estudio por triplicado (fig. 7).



Figura 7. Precipitados y sobrenadantes de la materia húmeda fermentada de los HE.

4.2.6. Determinación de proteína

El ensayo de Bradford (Bradford, 1976) se basa en la formación de un complejo entre el colorante azul brillante de Coomassie G-250 y las proteínas en solución. El colorante libre existe en 4 formas iónicas. La forma azul más aniónica se une a proteínas y absorbe a 595 nm. La concentración de proteínas puede ser evaluada determinando la cantidad de colorante en su forma iónica azul y midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm utilizando un espectrofotómetro. El colorante

se une principalmente a residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina. En este estudio se realizó una curva de calibración empleando albúmina sérica como estándar a diferentes concentraciones de estudio (1-1000 mg/L), adicionando 100 μ L de estándar y 900 μ L de reactivo de Bradford. Los tubos se agitaron, se dejaron reposar a la oscuridad por 5 min y se leyó absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Varian, contra un blanco. Se realizó el mismo procedimiento para los extractos enzimáticos de los HE y se cuantificó la concentración de proteína a partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración

4.3. Determinación de la Actividad Enzimática

4.3.1. Actividad N-acetilglucosaminidasa

La actividad se determinó usando *p*-nitrofenol N-acetil- β -D-glucosamina (Sigma) como sustrato. 100 μ L del extracto enzimático se adicionó a una mezcla de 150 μ L de agua destilada, 200 μ L amortiguador de citrato-fosfato 0.2 M (pH 5.6) 0.2 M y 400 μ L del sustrato (1 mg/mL). La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C (180 rpm) y la reacción se detuvo con 1 mL de una solución NaOH 0.02 M. El cambio en la concentración de *p*-nitrofenol se calculó empleando una curva de calibración a 400 nm. (Método modificado de Agrawal y Kotasthane, 2012). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que liberó 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto por gramo de materia seca (μ mol/min-gms).

4.3.2. Actividad quitindesacetilasa (QDA)

Se ensayó de acuerdo con Pacheco *et al.* (2013) utilizando etilenglicol quitina (EGQ) como sustrato. La mezcla de reacción consistió en 100 μ L del amortiguador tetraborato de sodio/HCl, pH 8.5, 100 μ g de sustrato en 100 μ L de amortiguador y 50 μ L de extracto enzimático se incubó a 37 °C por 30 min, la reacción se detuvo con la adición de 250 μ L de H₂SO₄ al 5 % (v/v) y se dejó reposar por 5 min. Se agregaron 250 μ L de hidracina al 0.5% (p/v) y la mezcla se calentó en baño María por 3 min. Los tubos de ensayo se colocaron en hielo y se agregó FeCl₃ 0.5 % (p/v), se dejó reposar 30 min y se leyó contra un blanco a 650 nm. Una unidad de actividad QDA se definió como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μ mol de acetato por min (μ mol acetato/min). Se realizó una curva de calibración utilizando glucosamina como estándar, reemplazando la EGQ por la glucosamina a diferentes concentraciones y el extracto enzimático por agua.

Una vez controlado este problema se tomaron muestras en el tiempo para llevar a cabo las determinaciones y establecer la mejor condición para la producción de las enzimas quitinolíticas, como se presenta a continuación.

5.2. Determinación de pH

En la figura 9 se presentan las cinéticas de pH de los cultivos de los HE. Como se puede apreciar, independientemente del microorganismo, el pH aumentó con respecto al tiempo de cultivo. En el caso de *M. anisopliae* se observó que la aireación sí tuvo un efecto sobre el pH del cultivo, lo cual se apreció después de las 84 h.

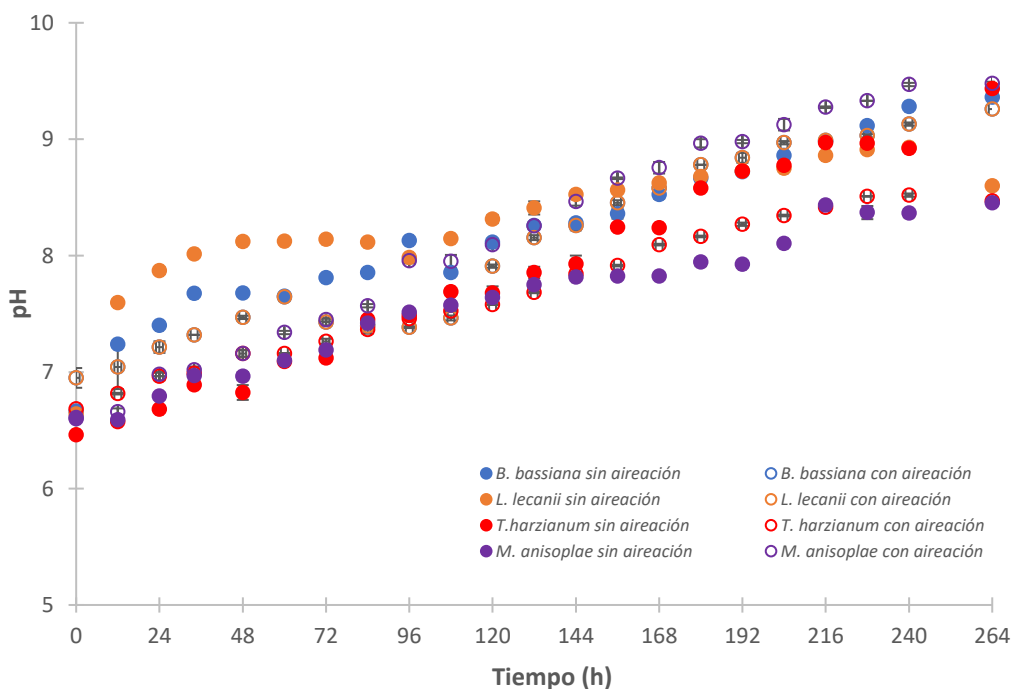


Figura 9. Cinética de pH de los cultivos de los HE.

Algunos estudios reportan que el pH de los cultivos se debe mantener controlado entre 6-7 para la producción de enzimas quitinolíticas (Arias Cifuentes, 2015; Kavanagh K, 2005), sin embargo, en otros estudios mencionan que la actividad enzimática se ve favorecida a pH básicos de aproximadamente 8 (Ramírez-Coutiño *et al.*, 2010; Quijano-Govantes *et al.*, 2004). Este aumento en el pH puede deberse a la hidrólisis de proteínas, lo cual se puede apreciar con los resultados de proteína, en donde entre las 72 y 96 h la concentración empezó a disminuir.

De igual manera, el pH es un parámetro importante para considerar en los cultivos, ya que puede afectar funciones de la membrana celular, morfología, estructura celular, solubilidad y asimilación de nutrientes, la formación de metabolitos (Fang y Zhong, 2002) y la liberación de NH_4^+ crea un microambiente modificado por el hongo, que es un factor que contribuye a su mecanismo de patogenicidad (St-Leger *et al.*, 1999).

5.3. Determinación de biomasa

En la figura 10 se puede apreciar que la aireación si tuvo un efecto sobre la producción de biomasa de los HE, en donde la mayor producción se presentó 12 h antes en comparación con los cultivos sin aireación de *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecanii*.

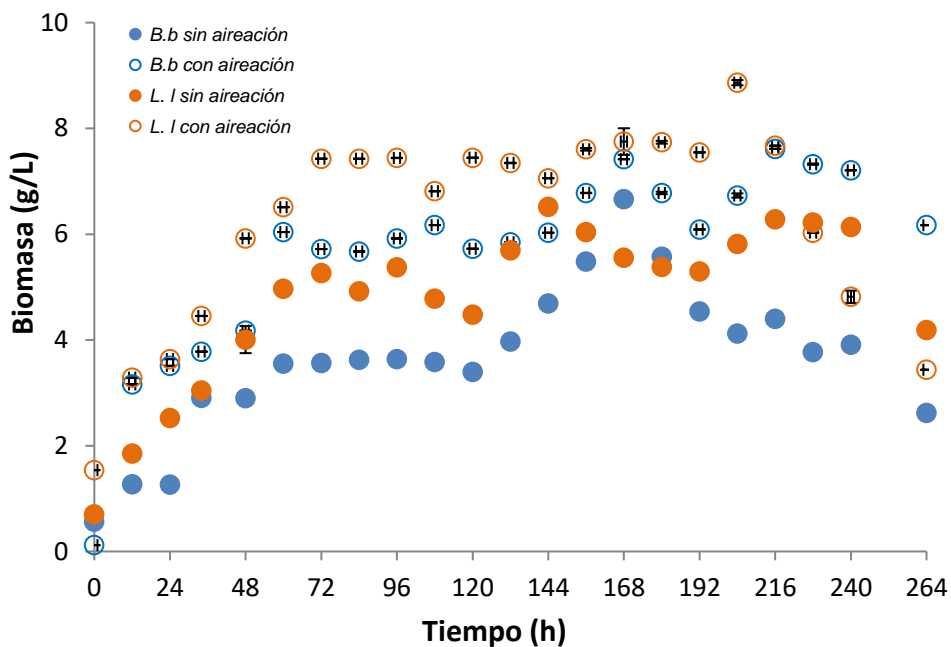


Figura 10. Cinética de biomasa de los cultivos de *B. bassiana* y *L. lecanii*.

Mientras que para *Trichoderma harzianum* y *Metarrizium anisopliae*, la mayor producción se presentó 24 y 48 h antes (14.63 y 17.81 g/L, respectivamente), como se observa en la figura 11.

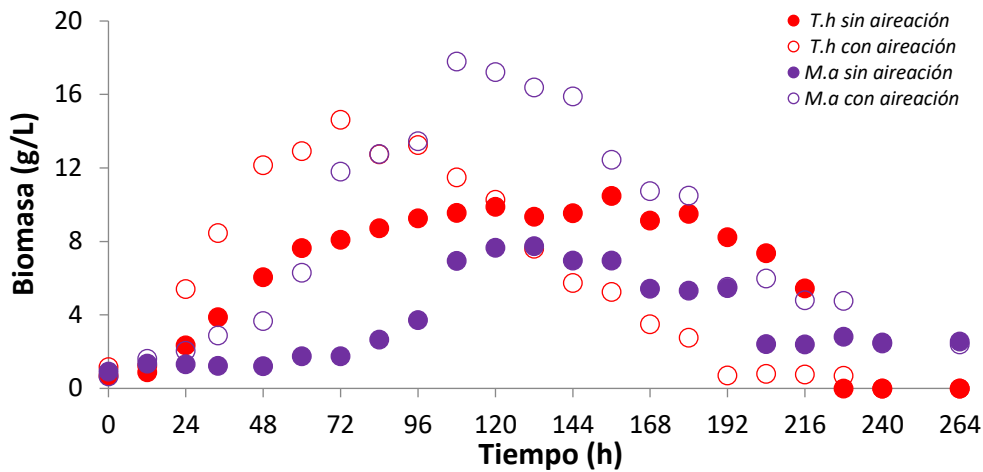


Figura 11. Cinética de biomasa de los cultivos de *T. harzianum* y *M. anisopliae*.

Los HE lograron asimilar el sustrato, que en este caso fue la quitina del caparazón de camarón, lo cual es importante ya que algunos reportes mencionan que la quitina en hojuelas y la quitina coloidal son más accesible a los microorganismos (Nawani *et al.*, 2005), sin embargo, estos resultados pueden deberse al tratamiento previo que se le dio a la quitina, haciéndola más accesible para los HE.

5.4. Determinación de proteína

La determinación de proteína es un parámetro importante para medir ya que es una medida indirecta del crecimiento microbiano, como lo podemos observar en los resultados obtenidos. Las concentraciones de proteína obtenidas a partir de los cultivos de los HE se encontraron en intervalos de 12.97 ± 0.02 a 77.47 ± 0.02 mg/L, como se puede observar en las figuras 12 y 13.

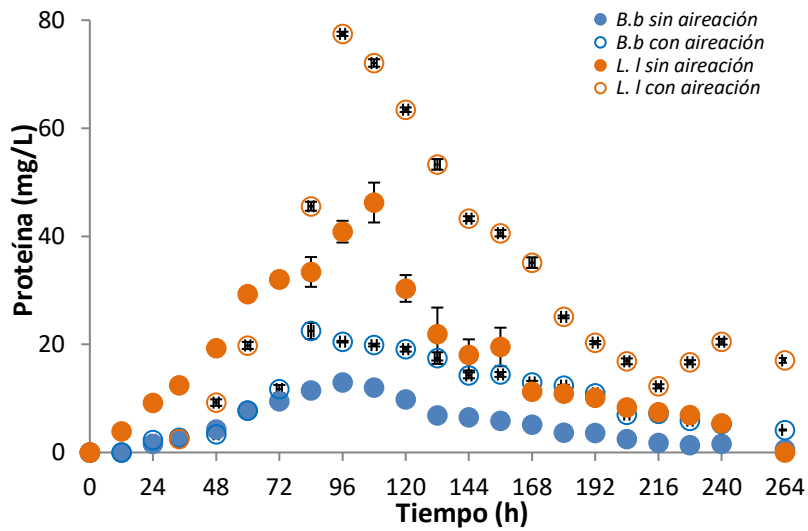


Figura 12. Proteína de los extractos enzimáticos de *B. bassiana* y *L. lecanii*.

En casi todos los casos, excepto para *T. harzianum*, nuevamente la aireación tuvo un efecto positivo sobre la proteína producida, siendo *L. lecanii* quien presentó los mayores títulos de proteína.

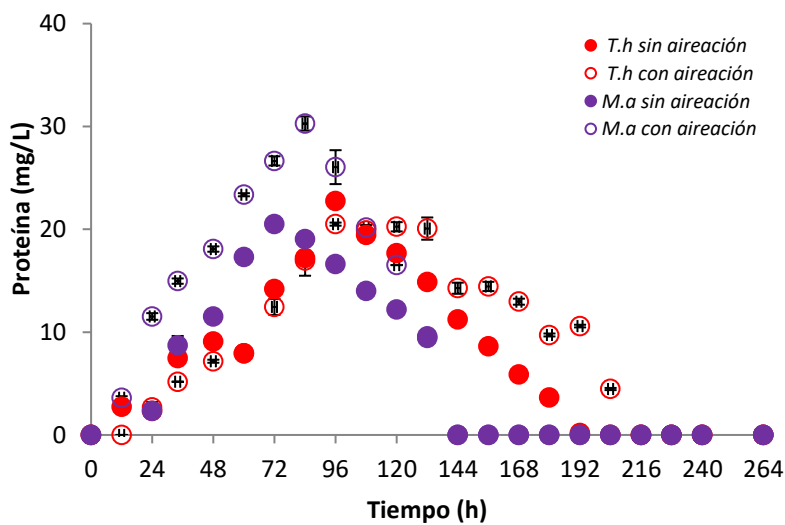


Figura 13. Proteína de los extractos enzimáticos de *T. harzianum* y *M. anisopliae*.

Estos resultados sugieren que los microorganismos pudieron hidrolizar el sustrato proporcionado.

5.5. Determinación de la actividad enzimática

5.5.1. Actividad N-acetilglucosaminidasa

La actividad enzimática es considerada como medida indirecta de crecimiento de hongos. En este sentido y bajo estas condiciones de cultivo, la mayor actividad enzimática de N-acetilglucosaminidasa se presentó en los extractos de los HE *L. lecanii* y *M. anisopliae* con títulos entre 442.44 y 252.77 U/gms a las 60 y 72 h de cultivo, respectivamente, como se observa en las figuras 14 y 15.

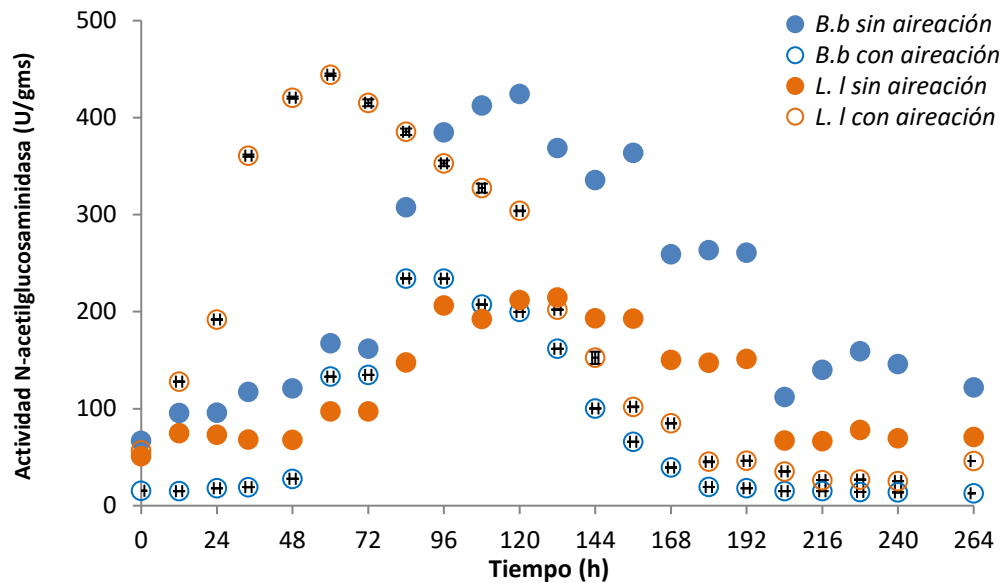


Figura 14. Actividad N-acetilglucosaminidasa de los extractos enzimáticos de *B. bassiana* y *L. lecanii*.

B. Bassiana y especialmente *L. lecanii* y son hongos que se adaptan al cultivo en estado sólido de acuerdo con investigaciones realizadas por Barranco y col. (2002; 2009). Otros estudios han reportado la producción de quitinasas a partir de este hongo empleando residuos de camarón (Matsumoto *et al.*, 2004) y cultivo líquido con polvo de cáscara de camarones y cangrejo (BingLan *et al.*, 2003). Sin embargo, se presentaron problemas debido al alto contenido de impurezas en ensilaje, en el primero caso, y el largo tiempo de cultivo requerido en el segundo. Estos resultados nos permiten inferir que el sistema de fermentación es apropiado para la producción de enzimas quitinolíticas empleando el caparazón de camarón para inducir su actividad.

Es importante resaltar que en el caso de los extractos obtenidos de *L. lecanii* sin aireación, se presentaron actividades enzimáticas que se mantuvieron estables por aproximadamente 60 h (sin diferencia significativa entre estos tiempos de producción enzimática), lo cual es importante porque permite obtener estas enzimas en tiempos más cortos en comparación con otros microorganismos.

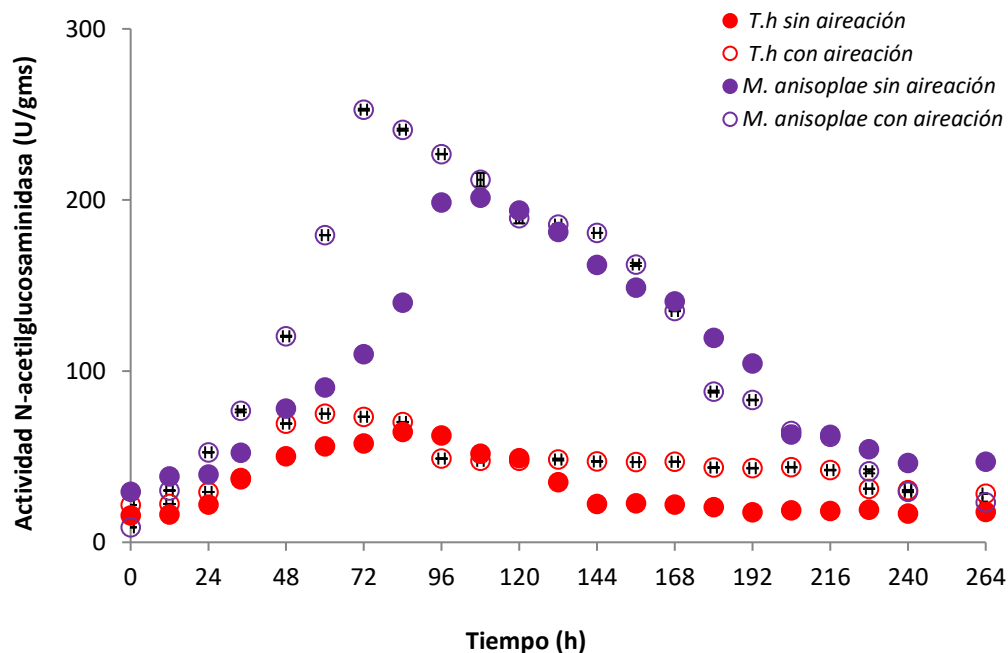


Figura 15. Actividad N-acetilglucosaminidasa de los extractos enzimáticos de *T. harzianum* y *M. anisopliae*.

En un estudio llevado a cabo por Ramírez-Coutiño y col. (2010) usando *Lecanicillium fungicola*, observaron que la producción de quitinasas extracelulares aumentó cuando el pH del medio de cultivo se incrementó de 5 a 8, encontrando sus actividades máximas entre las 132 y 144 h. Quijano-Govantes y col. (2004) obtuvieron resultados similares, mostrando un incremento significativo en la producción de enzimas quitinolíticas cuando se llevaba a cabo variaciones en el pH, con la diferencia de que ellos reportan valores de pH óptimos de 8 y 7 para la producción Nhasa y Endo respectivamente, caso similar es el reporte de Ramírez-Coutiño y col., (2010) quienes reportan pH de producción óptima de 7 y 8 para Nhasa y Endo respectivamente.

5.5.2. Actividad Quitin desacetilasa (QDA)

Los títulos de actividad enzimática obtenidos en ese trabajo podrían ser explicados por el uso de soportes que favorecen la producción de las enzimas, como el residuo de camarón que contiene quitina, ya que se ha descrito que *Metarhizium anisopliae* requiere de la acción de QDAs (Murad *et al.*, 2008) al igual que los demás microorganismos estudiados para actuar sobre estos sustratos, como se observa en las figuras 16 y 17.

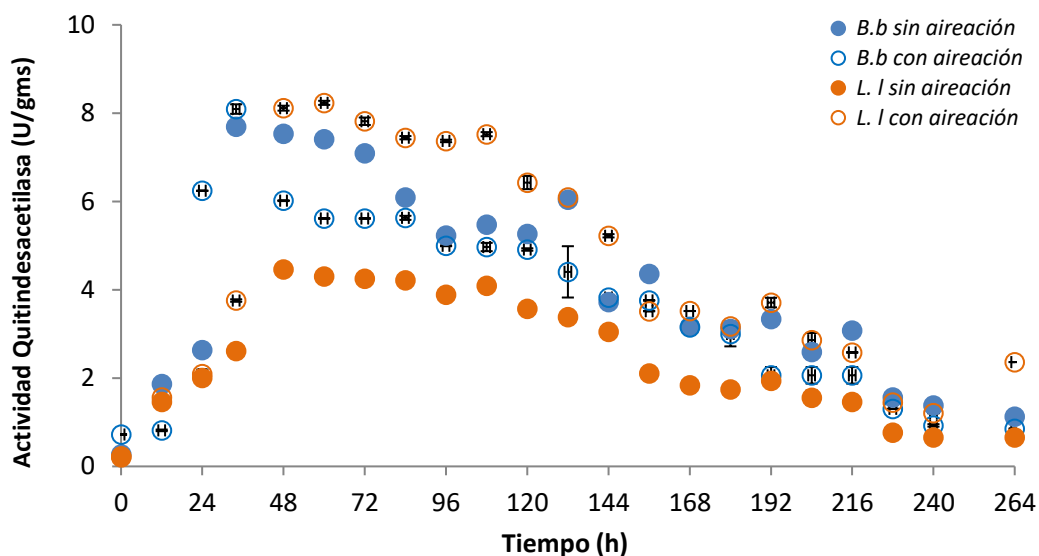


Figura 16. Actividad Quitindesacetilasa (QDA) de los extractos enzimáticos de *B. bassiana* y *L. lecanii*.

T. harzianum ha sido una de las especies de *Trichoderma* más estudiadas, y se ha determinado en esta especie la producción de enzimas N-acetilglucosaminidasas, endoquitinasas, y quitobiosidasas, las cuales tienen funciones importantes en el control de fitopatógenos, la producción de quito-oligosacáridos y en la degradación de sustratos de quitina (4,6), el 25- 60% del total de los hongos filamentosos tienen esta capacidad quitinolítica lo que permite degradar la quitina tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Ulacio, 2002).

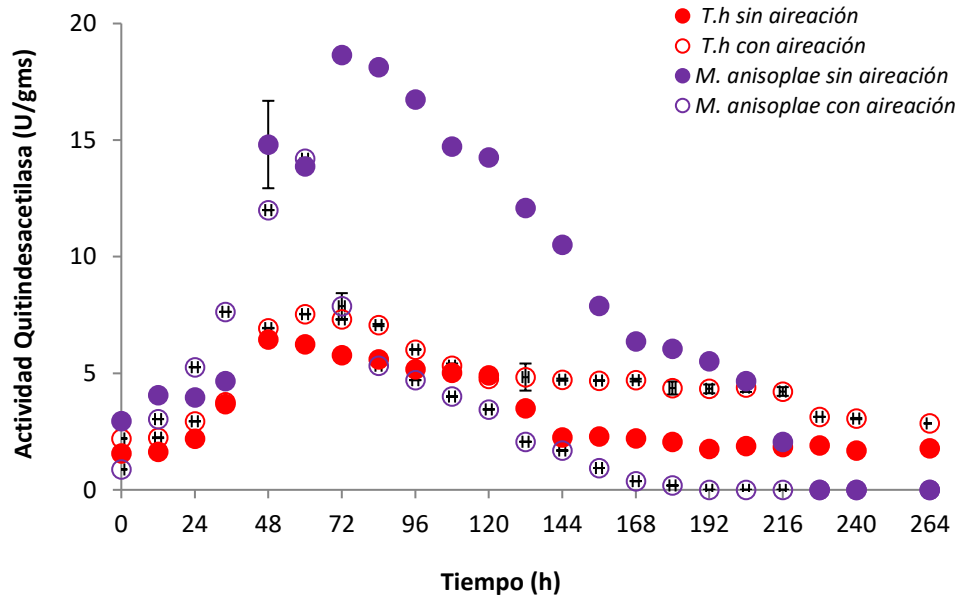


Figura 17. Actividad QDAs de los extractos enzimáticos de *T. harzianum* y *M. anisopliae*.

En otros estudios han evaluado la producción de QDAs de *C. lindemuthianum* en cultivo sólido utilizando dos tipos de soportes: desechos de camarón y salvado de trigo adicionado con quitosano (Suresh *et al.*, 2011), reportando 392 y 460 U/gsi a las 192 y 96 h, respectivamente. Se observó que el rendimiento de la enzima decaía cuando se pasaba el tiempo óptimo de incubación del hongo probablemente debido a la acción de proteasas, sin embargo, los medios utilizados no son los mismos. Los autores mencionan que la diferencia en los tiempos de máxima actividad entre ambos tipos de sustrato se debe a la naturaleza física y la capacidad de retener agua; en el caso del desecho de camarón el tiempo más largo de cultivo se podría deber a la naturaleza compleja y nutricionalmente inerte del mismo (altas concentraciones de minerales que dificultan la asimilación de nutrientes) y por otro lado el menor tiempo de incubación en el salvado de trigo se podría deber a la adición de quitosano (Ulacio, 2002).

Nawani y col., (2005) probaron tanto quitina comercial en hojuelas como quitina coloidal, encontrando que el medio suplementado con quitina coloidal presentó actividad quitinolítica rápidamente (a partir de las 48 h) alcanzando su máximo en un tiempo de 96 h. Esto se atribuyó a que este sustrato presenta fácil acceso para el microorganismo, posteriormente, hubo un descenso en la actividad enzimática, que fue atribuido al agotamiento del sustrato. Al emplear quitina en hojuela, los tiempos de producción de quitinasas se incrementaron, alcanzando el máximo a las 264 h, una vez que las hojuelas estaban completamente disueltas en el medio. En

otros trabajos se ha reportado que la quitina coloidal, al ser un sustrato fácilmente asimilable, puede llegar a reprimir la producción de quitinasas ya que se pueden ir generando productos de hidrólisis de la quitina que inhiben la actividad quitinolítica. Es importante mencionar que dependiendo del tipo de quitina que se emplee es el patrón de quitinasas producidas en el medio ya que se sugiere que el microorganismo detecta el tipo de fuente de carbono que se está empleando y produce las quitinasas apropiadas para poder degradarla (Khan y col., 2010). Consistente con lo mencionado anteriormente, Fenice y col. (1996) encontraron actividades quitinolíticas mayores con quitina cruda pero los picos de actividad aparecen en tiempos más prolongados (120 h), también reportan que la quitina cruda favoreció el crecimiento de hongo, asociado con mayor producción de proteína en el extracto y, por lo tanto, una actividad específica menor. En nuestro caso, los resultados encontrados difieren de lo anterior en el tiempo de producción enzimática máxima, ya que las actividades más elevadas de QDAs se encontraron a las 48 h en el mejor de los casos con quitina cruda.

5.5.3. Determinación de producto de extracto enzimático por Cromatografía de Gases

Para poder establecer las condiciones de operación del cromatógrafo de gases para la cuantificación de los productos de reacción enzimática de los extractos crudos provenientes de las fermentaciones de los HE, se determinaron las condiciones en cuanto a disolvente, temperaturas, flujos, volumen de inyección y tiempo de corrida. Se probaron disolventes como la acetona, el etanol y el metanol, el cual fue el más adecuado para este estudio. De igual manera, se analizaron temperaturas de la columna que fueron de 100-220 °C, encontrando la mejor resolución (fig. 13) con una temperatura de la columna de 130 °C y del detector e inyector de 180 °C, con un flujo de helio de 25 mL/min, H₂ de 75 mL/min y aire de 300 mL/min. El mejor volumen de inyección fue de 4 µL, con un tiempo de corrida de 7 min. Sin embargo, ya no fue posible analizar las muestras y sólo se determinaron condiciones de operación.

5.5.4. Selección del mejor HE productor de actividad quitinolítica y quitindesacetilasa

Los extractos enzimáticos de los cultivos en medio sólido de *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae* presentaron los mayores títulos de actividad N-acetilglucosaminisada, con valores de 444.22±0.02 y 252.77±0.0052 U/gms a las 60 y 72 h, respectivamente. En el caso de la actividad Quitindesacetilasa, los mejores productores fueron *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, con títulos de 8.09±0.001 y 18.65±0.001 U/gms a las 34 y 72 h, respectivamente.

Es importante enfatizar en el uso de este tipo de residuo como es el caparazón de camarón para poder emplearlo como sustrato en estos sistemas, ya que la producción de enzimas quitinolíticas está muy regulada por la concentración de la fuente de carbono, encontrando que ésta puede tener una regulación dual, lo que significa que concentraciones bajas puedan inducir la producción y secreción de enzimas quitinolíticas, mientras que concentraciones altas pueden tener un efecto represor.

6. Objetivos y metas alcanzados

- Se logró establecer que la aireación juega un papel importante en el crecimiento y producción de enzimas quitinolíticas de los hongos entomopatógenos estudiados *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Trichoderma harzianum*.
- Se llevaron a cabo las fermentaciones sólidas de los hongos en estudio bajo 2 condiciones de estudio, así como el tratamiento y obtención de los extractos enzimáticos provenientes de dichos cultivos.
- Se evaluó adecuadamente la actividad N-acetilglucosaminidasa y Quitindesacetilasa proveniente de los extractos enzimáticos de las fermentaciones sólidas de los hongos entomopatógenos en estudio.
- Se lograron cuantificar los productos de las reacciones enzimáticas por espectrofotometría UV-Vis y se puso a punto un Cromatógrafo de Gases VARIAN CP-338, con detector FID para el análisis de estos.
- Se seleccionaron a los mejores hongos entomopatógenos por su capacidad de producir enzimas quitinolíticas y quitindesacetilasas.

7. Conclusiones

La aireación juega un papel muy importante en los parámetros del crecimiento, los parámetros de la fermentación y las actividades enzimáticas de los microorganismos y en especial de los hongos entomopatógenos estudiados en este trabajo, los cuales se vieron favorecidos bajo estas condiciones de cultivo. En este sentido, todos los hongos fueron capaces de crecer empleando caparazón de camarón como fuente de quitina, lo cual lo hace un residuo muy interesante para seguir empleando como modelo de estudio.

Los HE *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae* fueron los microorganismos que presentaron los mayores títulos de actividad N-acetilglucosaminidasa mientras que los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* presentaron los

mayores títulos de Quitindesacetilasa, con tiempos de cultivo relativamente corto que variaron entre 34 y 72 h.

El empleo de técnicas cromatográficas usando equipos requiere de un manejo adecuado para poder llevar a cabo el análisis de las muestras de interés y en este sentido se logró poner a punto el manejo de un Cromatógrafo de Gases VARIAN CP-338, con detector FID.

Se recomienda llevar a cabo las fermentaciones de estos microorganismos con niveles de aireación controlados de tal manera que se permita mejorar las actividades obtenidas en este estudio.

1. Seidl V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*. 22: 36- 42.

8. Bibliografía

1. Kather R, Martin J (2012) Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: advantages, limitations, and technical aspects. *Physiol Entomol* 37(1):25–32.
2. France, A., Ernesto Cisternas, Irina Urtubia (2000) Hongo entomopatógenos: Microorganismos benéficos para el control de *A. nodipennis*: //www.inia.cl/
3. ST LEGER, R. J., CHARNLEY, A. K. & COOPER, R. M. (1986a). Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi. Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* (in the Press).
4. Khan, A., K. L. William, M. P. Molloy, H. Nevalainen. 2003. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *P. lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. *Protein Expression and Purification* 32: 210-220.
5. Huang, X.W., N.H. Zhao, K.Q. Zhang. 2004. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Research in Microbiology* 155: 811-816.
6. Yang, J., B. Tian, L. Liang, K.Q. Zhang. 2007. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 21-31.
7. Téllez, J.A., M. G. Cruz, A. Mercado, A. A. Asaff. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología* 30: 73-80.
8. Broetto, L., W. O. Beys da Silva., A. M. Bailão., C de A. Soares., M. H. Vainstein and A. Schrank. 2010. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: cell Surface localization and role in host adhesion. *FEMS Microbiology Letters* 312: 101-109.
9. Cortés, Alba M. 2018. Control Biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Agentes de control biológico.
10. Crespo Martín, Eva; Gallego Sánchez, Luis M.; Gámez Arcas, Samuel (2016) Hongo entomopatógenos: de la agricultura a la conservación del patrimonio histórico
11. Assaf, L. H. A. 2007. Ecological study and evaluation of activity of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill and *Paecilomyces farinosus* (Dicks ex Fr.) Against the popular leaf beetle *Melasoma populi* L. (Ph.D thesis). University of Mosul, College of Agriculture and Forestry. Iraq. 231 pp.
12. Dias, B. A., P. M. O. J. Neves., L. F. Maia and M. C. Furlaneto. 2008. Cuticle degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus entomopathogene *Beauveria bassiana*. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 301-306.
13. Mustafa, U. and G. Kaur. 2009. Extracellular enzyme production in *Metarhizium anisopliae* isolates. *Folia Microbiologica* 54: 499-504.

14. Charnley, A. K and S.A. Collins. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: 299 Kubicek, C. P., I. S. Druzhinina. Eds. *The Mycota IV: Environmental and Microbial 300 Relationships* (2nd edition). Springer-Verlag, Berlin 159-187.
15. Leng, P., Z. Zhang, G. Pan, M. Zhao. 2011. Application and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology* 88: 19864-19873.
16. Shahid, A. A., A. Q. Rao, A. Bakhsh, T. Husnain. 2012. Entomopathogenic Fungi as Biological Controllers: New Insights into their Virulence and Pathogenicity. *Archives Biological Sciences* 1: 21-42.
17. De Albuquerque Maranhao, Elizabeth; De Albuquerque Maranhao, Henrique (2009) Hongos entomopatogénos: Importante herramienta para el control de "moscas blancas" (*Honopter: Aleyrodidae*).
18. Vega, F. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal Invertebrate Pathology* 98: 277–279.
19. SENASA. 2014. Manual de producción y uso de Hongos entomopatogénos.
20. Garraway, M. O y R.C. Evans, 1984. *Fungal nutrition and Physiology*. A Wley-Intercience Publication, John Wiley & Sons, New York.E.U.
21. Gillespie AT, Claydon N (1989) The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Sci.* 27: 203-215.
22. Osborne. L.S. y Z. Landa. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Fla. Entomol.* 75: 456-471.
23. N.L. CARRECK, T.M. BUTT, Luda IBRAHIM, Judy K. PELL, Ingrid H. WILLIAMS, UNITED KINGDOM 2001. The use of honeybees to disseminate an insect pathogenic fungus for control of insect pests on oilseed rape. In book: *Mycota*. Chapter: Use of entomogenous fungi for the control of insect pests Publisher: Springer-Verlag
24. Romero Arenas, Omar; Huerta Lara, Manuel; Damián Huato, Miguel A.; Domínguez Hernández, Francisco (2009) Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles.
25. Rodríguez Pedroso, A.T.; Ramírez Arrebato, M.A. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatogénos.
26. Sahai, A. S and M. S. Manocha. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews* 11: 317-338.
27. Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina.
28. Barriga Gaibor, Karla M. 2016. Obtención de glucosamida por hidrólisis ácida a partir de quitina derivada de la cáscara de camarón.
29. Seidl, V., B. Huemer, B. Seiboth, C. P. Kubicek. 2005. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS Journal* 272: 5923–5939.
30. Seidl, V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. British Mycological Society. *Fungal Biology Reviews* 22: 36-42.
31. Pandey, A., C. R. Soccol and D. Mitchell. 2000. New developments in solid state fermentation: Ibioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35: 1153-1169.
32. Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemistry Engenier* 13: 81–84.
33. Viniestra, G. G., E. T. Favela, C. Aguilar, S. G. Romero, G. G. Díaz y C. Augur. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13: 157-167.
34. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Tomo I (FEUM), Edición 11° (2011) Espectrofotometría Visible y Ultravioleta.
35. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-54.
36. Agrawai, T y Kotasthane, S. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. Agrawal and Kotasthane SpringerPlus 2012, 1:73 <http://www.springerplus.com/content/1/1/73>

37. Pacheco N., Trombotto S., David L., Shirai K. 2013. Activity of chitin deacetylase from *Colletotrichum gloeosporioides* on chitinous substrates. *Carbohydrate Polymers* **96**: 227-232.
38. Arias Cifuentes EL, Piñeros Espinosa PA. 2008. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los paramos de Guasca y Cruz verde. Vol. 1, Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.
39. Kavanagh K. 2005. Fungi biology and applications.. 267 p. 29.
40. Ramírez 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.
41. 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.
42. Fang Q. y Zhong, J. 2002. Two-Stage Culture Process for Improved Production of Ganoderic Acid by Liquid Fermentation of Higher Fungus *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology Progress*. **18**(1): 51-4.
43. St-Leger RJ, Nelson JO, Screen SE. 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology* **145**: 2691- 2699.
44. Nawani, N., Kapadnis, B. 2005. Optimization of chitinase production using statics based experimental designs. *Process Biochemistry*. **40**:651-660.
45. Barranco-Florido J.E., Alatorre-Rosas R., Gutiérrez-Rojas M., Viniegra-González G., Saucedo-Castañeda G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. **30**: 910-915.
46. Barranco Florido E., Bustamante-Camilo P., Mayorga-Reyes L., González- Cervantes R., Martínez-Cruz P. y Azaola A. 2009. *Interciencia* vol. 34 No. 5.
47. Matsumoto Y, Saucedo-Castañeda G, Revah S, Shirai K. 2004. Production of β -Nacetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochem.* **39**: 665-671.
48. Bing-Lan L, Pao-Min K, YewMin T, Kuo-Ching F. 2003. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enz. Microb. Technol.* **33**: 410-415.
49. Murad A., Noronha E., Miller R., Costa F., Pereira C., Mehta A., Caldas R., Franco O. 2008. Proteomic analysis of *Metarhizium anisopliae* secretion in the presence of the insect pest *Callosobruchus maculatus*. *Microbiology*. **154**:3766-3774
50. Ulacio D, Salas J, Querales P, Sanabria ME. Microbiota del suelo de zonas productoras de papa Del Estado Mérida Y Su Relación con *Rhizoctonia solani*. *Bioagro*. 2002;**14**(1):11–6.
51. Suresh KK, et al. (2011) Comparative and chemical proteomic approaches reveal gatifloxacin deregulates enzymes involved in glucose metabolism. *J Toxicol Sci* **36**(6):787-96
52. Fenice M, Gooday GW (2006) Mycoparasitic actions against fungi and oomycetes by a strain (CCFEE 5003) of the fungus *Lecanicillium muscarium* isolated in Continental Antarctica. *Ann Microbiol* **56**(1):1–6.

9. Anexos

A1. Preparación del reactivo de Bradford

Para la preparación del reactivo de Bradford se utilizarán 0.025 g/L Azul de Coomassie G-250, 0.0125g/ L etanol, 0.025g/ L ácido fosfórico, 0.25g/ L agua.

A2. Curva de calibración de albúmina sérica bovina

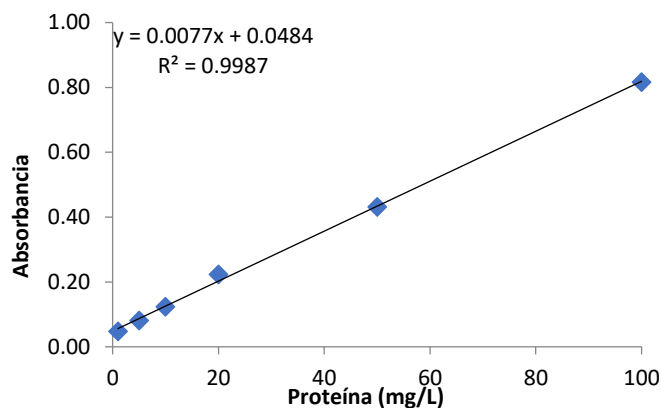


Figura A2. Curva de calibración de albúmina sérica por Bradford.

A3. Curva de calibración de p-nitrofenol.

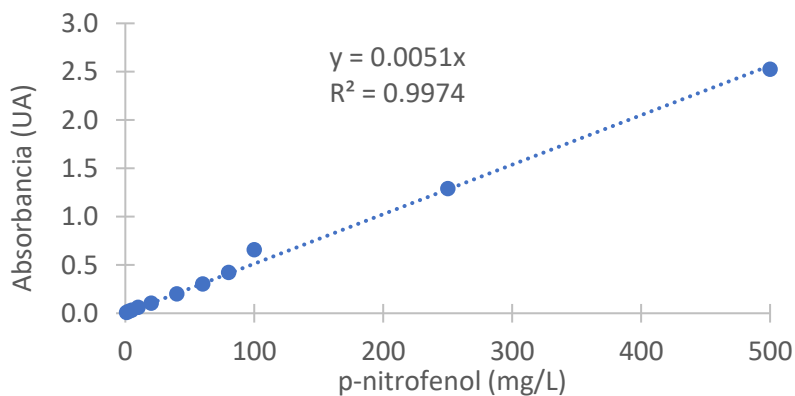


Figura A3. Curva de calibración de p-nitrofenol.

Vo. Bo. DE LOS ASESORES



Juan Esteban Barranco Florido



Luz María Zenit Tovar Castro



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL:

*“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA Y QUITÍN-DESACETILASA
DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS PRODUCIDOS POR FERMENTACIÓN
SÓLIDA, A PARTIR DE CUTÍCULA DE CAMARÓN.”*

Correspondiente al proyecto genérico:

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

PRESENTA:

Karla Franco César

Matrícula: 2143026860

ASESORES:

Dr. Juan Esteban Barranco Florido

No. Económico: 24927

Dra. Luz María Zenit Tovar Castro

No. Económico: 32252

Lugar de realización: Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, con dirección: Calzada del Hueso 1100. Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P 04960, Cd. De México, México.

Periodo: 27 de septiembre del 2019 al 27 de marzo del 2020

Ciudad de México al 11 de diciembre de 2020

10. Resumen

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos que revisten gran importancia en el manejo de plagas dentro de los agroecosistemas, son reconocidos como agentes de control biológico por su capacidad natural de producir diferentes compuestos que causan enfermedad y muerte a los insectos (Assaf, 2007; Dias, *et al.*, 2008; Mustafa y Kaur, 2009).

Existen más de 700 especies de hongos asociados a insectos, algunos de los cuales se utilizan como productos de control biológico, por ser fáciles de manipular, multiplicar, ser efectivos en el control de plagas de importancia agrícola y ser inocuos para otras especies y el ser humano (France, 2000) y dentro de sus ventajas se pueden mencionar que: poseen mecanismos de invasión que les permiten atravesar la cutícula o la pared del tracto digestivo de los insectos, actuando como insecticidas de contacto y no necesitan ser ingerido (Charnley y Collins, 2007). Su aplicación y manejo no representa peligro para el hombre y son inocuos en los productos agrícolas (Leng, *et al.*, 2011; Shahid, *et al.*, 2012).

La quitina es el polímero más abundante después de la celulosa. Está presente en la pared celular de hongos, levaduras y en el exoesqueleto de los invertebrados como cangrejos e insectos (Rodríguez y Ramírez, 2012). Es un polisacárido natural, de tonalidad blanca-amarillenta, rígido y no elástico. Se calcula que su tasa de regeneración en la biosfera es de casi el doble de la celulosa. La principal fuente de obtención de la quitina son los desechos de los crustáceos (Pacheco, 2013). Este polímero es biodegradable debido a la presencia de las enzimas llamadas quitinasas, ampliamente distribuidas en la naturaleza y encontradas en bacterias, hongos, plantas y en el sistema digestivo de varios animales. Las quitinasas están involucradas en la defensa contra invasión de bacterias. La quitina desacetilasa es una hidrolasa perteneciente a la familia 4 de las carbohidrato-esterasas (CE4) y cataliza la conversión de quitina en quitosana, mediante la desacetilación de los residuos de NAG presentes en la molécula de la primera. La quitin desacetilasa puede desacetilar oligosacárido solubles, producidos por acción de endoquitinasas sobre la quitina, fenómeno que puede darse durante la autólisis de la pared celular de aquellos microorganismos con quitina en dicha estructura. En estudios más recientes se ha demostrado que las quitin desacetilasas en general son más activas sobre oligosacáridos formados por NAG.

Dentro de los procesos de fermentación en medio sólido se puede encontrar la participan de microorganismos que requieren oxígeno a partir de un cultivo aireado, siendo un parámetro fundamental para el desarrollo del proceso (Pandey 2000, 2003). En tanto que los para la identificación y cuantificación de los productos de las reacciones enzimáticas se requieren de métodos espectrofotométricos y/o cromatográficos como es el caso de la Cromatografía de Gases, en donde esta

herramienta analítica es la técnica de más amplia utilización para el análisis de compuestos volátiles. La utilización de la cromatografía de gases está restringida a la separación de compuestos con un peso molecular menos de 1000 a una temperatura máxima de trabajo de aproximadamente 400 °C; dentro de estos límites la única limitación existente será la estabilidad térmica.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad quitinolítica y quitindesacetilasa de extractos enzimáticos producidos por fermentación sólida, a partir de cutícula de camarón, empleando los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Trichoderma harzianum*. Para cumplir con este objetivo se llevaron a cabo fermentaciones en medio sólido empleando caparazón de camarón como fuente de carbono por su contenido de quitina. Las fermentaciones se llevaron a cabo bajo condiciones simuladas de aireación y sin aireación con la finalidad de determinar el efecto de este parámetro sobre las variables importantes del cultivo, especialmente sobre la inducción de las actividades N-acetilglucosaminidasa y Quitindesacetilasa. Se pudo comprobar que la aireación sí juega un papel importante en los parámetros del crecimiento, los parámetros de la fermentación y las actividades enzimáticas de los microorganismos y en especial de los hongos entomopatógenos estudiados en este trabajo, los cuales se vieron favorecidos bajo estas condiciones de cultivo. En este sentido, todos los hongos fueron capaces de crecer empleando caparazón de camarón como fuente de quitina, lo cual lo hace un residuo muy interesante para seguir empleando como modelo de estudio.

Los extractos enzimáticos de los cultivos en medio sólido de *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae* presentaron los mayores títulos de actividad N-acetilglucosaminidasa, con valores de 444.22 ± 0.02 y 252.77 ± 0.0052 U/gms a las 60 y 72 h, respectivamente. En el caso de la actividad Quitindesacetilasa, los mejores productores fueron *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, con títulos de 8.09 ± 0.001 y 18.65 ± 0.001 U/gms a las 34 y 72 h, respectivamente.

Es importante resaltar que en el caso de los extractos obtenidos de *L. lecanii* sin aireación, los títulos de actividad N-acetilglucosaminidasa se mantuvieron estables por aproximadamente 60 h (sin diferencia significativa entre estos tiempos de producción enzimática), lo cual es importante porque permite obtener estas enzimas en tiempos más cortos en comparación con otros microorganismos.

Los títulos de actividad enzimática obtenidos en ese trabajo son explicados por el uso de soportes que favorecen la producción de las enzimas, como el residuo de camarón que contiene quitina, ya que se ha descrito que *Metarhizium anisopliae* requiere de la acción de QDAs (Murad *et al.*, 2008) al igual que los demás microorganismos estudiados para actuar sobre estos sustratos.

Para poder establecer las condiciones de operación del cromatógrafo de gases para la cuantificación de los productos de reacción enzimática de los extractos crudos provenientes de las fermentaciones de los HE, se manejó un Cromatógrafo de Gases VARIAN CP-338, con detector FID. Sin embargo, ya no fue posible analizar las muestras y sólo se determinaron algunas condiciones de operación.

Se recomienda llevar a cabo las fermentaciones de estos microorganismos con niveles de aireación controlados de tal manera que se permita mejorar las actividades obtenidas en este estudio.

Referencias

1. Assaf, L. H. A. 2007. Ecological study and evaluation of activity of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill and *Paecilomyces farinosus* (Dicks ex Fr.) Against the popular leaf beetle *Melasoma populi* L. (Ph.D thesis).University of Mosul, College of Agriculture and Forestry. Iraq. 231 pp.
2. Dias, B. A., P. M. O. J. Neves., L. F. Maia and M. C. Furlaneto. 2008. Cuticle degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus entomopathogene *Beauveria bassiana*. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 301-306.
3. Mustafa, U. and G. Kaur. 2009. Extracellular enzyme production in *Metarhizium anisopliae* isolates. *Folia Microbiologica* 54: 499-504.
4. France, A., Ernesto Cisternas, Irina Urtubia (2000) Hongo entomopatógono: Microorganismos benéficos para el control de *A. nodipennis*: [//www.inia.cl/](http://www.inia.cl/)
5. Charnley, A. K and S.A. Collins. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: 299 Kubicek, C. P., I. S. Druzhinina. Eds. *The Mycota IV: Environmental and Microbial 300 Relationships* (2nd edition). Springer-Verlag, Berlin 159-187.
6. Leng, P., Z. Zhang, G. Pan, M. Zhao. 2011. Application and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology* 88: 19864-19873.
7. Shahid, A. A., A. Q. Rao, A. Bakhsh, T. Husnain. 2012. Entomopathogenic Fungi as Biological Controllers: New Insights into their Virulence and Pathogenicity. *Archives Biological Sciences* 1: 21-42.
8. Rodríguez Pedroso, A.T.; Ramírez Arrebato, M.A. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos.
9. Pacheco N., Trombotto S., David L., Shirai K. 2013. Activity of chitin deacetylase from *Colletotrichum gloeosporioides* on chitinous substrates. *Carbohydrate Polymers* 96: 227-232.
10. Pandey, A., C. R. Soccol and D. Mitchell. 2000. New developments in solid state fermentation: Ibioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35: 1153-1169.
11. Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemistry Engenier* 13: 81-84.
12. Murad A., Noronha E., Miller R., Costa F., Pereira C., Mehta A., Caldas R., Franco O. 2008. Proteomic analysis of *Metarhizium anisopliae* secretion in the presence of the insect pest *Callosobruchus maculatus*. *Microbiology*. 154:3766-3774

Vo. Bo. DE LOS ASESORES



Juan Esteban Barranco Florido



Luz María Zenit Tovar Castro