



UNPA

Universidad del Papaloapan

Terra Ubellima, Mens Aporta

Producción de quitinasas en cultivo líquido con hongos entomo y fitopatógenos, utilizando tres fuentes de quitina como inductor.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

BIOL. SANDRA EDIT JIMÉNEZ ALEJANDRO

Asesor: Dr. Oscar Nuñez Gaona
Co-Asesor: Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño

Tuxtepec, Oaxaca, Enero de 2016

El Posgrado en Biotecnología de la Universidad del Papaloapan está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad del Papaloapan bajo la dirección del Dr. Oscar Nuñez Gaona y la codirección de la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño. El trabajo experimental también se llevó a cabo con apoyo del programa de fortalecimiento académico para mujeres indígenas becarias CONACYT 2013, junto con una estancia de investigación (1 mes) en la Universidad autónoma metropolitana (UAM) con el financiamiento del programa de becas mixtas para becarios CONACYT nacionales: en el extranjero, de movilidad nacional, en los sectores de interés, de doble titulación. Así mismo agradezco la beca otorgada por CONACYT durante la maestría con número de registro de 483746.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 04 de Diciembre de 2015

L.P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la Biol. Sandra Edit Jiménez Alejandro, matrícula 12140004, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Producción de quitinasas en cultivo líquido con hongos entomo y fitopatógenos, utilizando tres fuentes de quitina como inductor**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular me despido quedando atento ante cualquier duda o aclaración.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Dr. Mario Valera Zaragoza
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

Ccp. Biol. Sandra Edit Jiménez Alejandro.
Ccp. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial. C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 21 de Septiembre de 2015

Biol. Sandra Edit Jiménez Alejandro
Estudiante de la Maestría en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado en Maestro en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. Ana Karin Navarro Martínez	UNPA	Presidente
M.C. Julio César Hernández Rosas	Universidad de la Cañada	Vocal
Dra. María de Jesús García Gómez	UNPA	Secretario
Dr. Alejandro Aparicio Saguilán	UNPA	1er Suplente
Dra. Alma Xochitl Avila Alejandre	Estancia Posdoctoral-UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.



Dr. Mario Valera Zaragoza
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

Atentamente

M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
VoBo.



Ccp. Dr. Oscar Nuñez Gaona, Director de tesis
Ccp. Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño, Co-director de tesis
Ccp. L.P. Yesenia Barrientos Arenal, Jefa de Servicios Escolares
Ccp. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque
Industrial. C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

Agradecimientos

A Dios por permitirme el Don de la vida y porque siempre a pesar de todo está a mi lado.

A la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño por el apoyo brindado, por sus exigencias, por ser un ejemplo de lo que es ser responsable y por haber confiado en mí para realizar esta tesis.

Al Dr. Oscar Nuñez Gaona por sus consejos tan acertados y por enseñarme que es mejor ocuparse y no preocuparse.

Al Ing. Faustino Sierra López, por ser un ejemplo a seguir, por enseñar con hechos lo que es la responsabilidad, tolerancia y respeto hacia uno mismo y hacia los demás, por sus consejos en los momentos precisos y por brindarme su confianza.

Al M.C. Santiago Tolentino Olivera por el apoyo brindado y por sus sabios consejos.

Al Ing. Elvís Reyes Fabián por brindarme su amistad y por apoyarme en momentos difíciles.

A mis amigos Monserrat, Marlen, Mariana, Alejandro, Amado, por los momentos compartidos.

A mis compañeros del laboratorio de Bioprocesos Adolfo, Xóchitl que son parte del proyecto de investigación y grandes amigos.

A la Q. B Ixchel Soriano Martínez por sus consejos en los momentos precisos, por enseñarme el respeto y amor hacia la naturaleza. Por ser una excelente profesora.

A mi amiga Nayely Fercano, por darme tan valiosos consejos y por ser siempre la amiga incondicional.

Dedicatoria

A mi hija Perla Aurora, por ser el motor de mi vida, la fuerza que me impulsa a seguir adelante y la alegría de vivir día a día, por esa bella y única sonrisa que es mi energía para seguir adelante.

A mis padres Irma y Francisco por el inmenso apoyo para lograr una de mis metas, darme la oportunidad de vivir y por estar siempre a mi lado.

A mi esposo Gilberto por apoyarme incondicionalmente en mis decisiones, por la confianza brindada, por recordarme siempre lo mucho que valgo, por esos momentos maravillosos que hemos pasado juntos a pesar de las adversidades.

A mis hermanos, Rosa, Francisco, Arturo, Leticia y Janet por sus buenos deseos y apoyo moral; aunque algunos estén lejos sé que siempre están a mi lado.

Solo cabe progresar cuando se piensa en grande, solo es posible avanzar cuando se mira lejos.

José Ortega y Gasset

ÍNDICE

	Pág.
<i>Agradecimientos</i>	i
<i>Dedicatoria</i>	ii
ÍNDICE	iv
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRAC	xiv
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Interacciones fúngicas.....	2
1.1.2. Interacción hongo-insecto.....	2
1.1.2.1. Los hongos entomopatógenos en el control biológico	4
1.1.2.2. <i>Beauveria bassiana</i>	5
1.1.2.3. Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	6
1.1.3. Interacción hongo-planta	7
1.1.3.1. Importancia de los hongos fitopatógenos	8
1.1.3.2. <i>Penicillium sp</i>	8
1.1.3.3. Taxonomía de <i>Penicillium sp</i>	9
1.2. Quitinasas.....	9
1.2.1. Las quitinasas y su papel en la industria.....	10
1.2.2. Métodos de producción de quitinasas.....	11
1.2.2.1. Fermentación en medio sólido (FMS)	11
1.2.2.3. Fermentación en medio líquido (FML).....	12
1.3. Sustratos.....	14
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. ANTECEDENTES	17
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1. Objetivo general	23
5.2. Objetivos específicos.....	23
6. METODOLOGÍA	24
6.1. Etapa I. Acondicionamiento	24
6.1.2. Microorganismos.	24
6.1.3. Preparación del inóculo para <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Penicillium sp</i>	24
6.1.4. Sustratos	24
6.2. Etapa II. Efecto de la desproteínización sobre las actividades NHasa y endoquitinasa detectadas en fermentaciones en medio líquido.....	26
6.3. Etapa III. Efecto de pH inicial sobre las actividades Nhasa y endoquitinasa detectadas en fermentaciones en medio líquido.....	27
6.4. Etapa IV. Efecto de la temperatura sobre las actividades Nhasa y endoquitinasa en fermentaciones en medio líquido.	28
6.5. Fermentaciones en medio líquido para la producción de quitinasas	29
6.6. Desarrollo de la etapa II	29
6.7. Desarrollo de la etapa III	29
6.8. Desarrollo de la etapa IV	29

6.9. Obtención del extracto enzimático de las fermentaciones en medio líquido.	29
6.9.2. Biomasa.....	30
6.9.2. Análisis de los extractos enzimáticos.....	30
6.9.2.1. Determinación de proteína.....	30
6.9.2.2. Determinación de actividad N-acetilhexosaminidasa.....	30
6.9.2.3. Determinación de actividad endoquitinasa.....	31
6.9.2.4 Determinación de azúcares reductores.....	31
6.10. Análisis electroforéticos de los extractos enzimáticos.....	31
6.10.1. Determinación de la masa molecular relativa.....	31
6.11. Análisis estadísticos.....	32
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	33
7.1. Desproteínización parcial de los sustratos.....	33
7.2. Fermentación en medio líquido con <i>Beauveria bassiana</i>	38
7.2.1. Efecto de la desproteínización sobre las actividades de Nhasa y endoquitinasas a pH y temperatura reportados.....	38
7.2.2 .Efecto de la desproteínización en el crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i>	47
7.2.3. Efecto del pH sobre las actividades NHasa y endoquitinasas con <i>Beauveria bassiana</i>	49
7.2.4. Crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> a pH variable.....	55
7.2.5. Efecto de la temperatura sobre las actividades NHasa y endoquitinasas con <i>Beauveria bassiana</i>	57
7.2.6. Crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> a diferentes temperaturas.....	59
7.3. Fermentación en medio líquido con <i>Penicillium sp</i>	60
7.3.1. Efecto de las desproteínización sobre las actividades de Nhasas y endoquitinasas a pH y temperaturas reportadas.....	60
7.3.2. Efecto de la desproteínización en el crecimiento de <i>Pencillium sp</i>	69
7.3.3. Efecto del pH sobre las actividades Nhasas y endoquitinasas con <i>Penicillium s</i>	70
7.3.4. Crecimiento de <i>Penicillium sp</i> a pH variable.....	74
7.3.5. Efecto de la temperatura sobre las actividades Nhasas y endoquitinasas con <i>Penicillium sp</i>	75
7.3.6. Crecimiento de <i>Penicillium sp</i> a diferentes temperaturas.....	78
7.4. Análisis electroforético (SDS-PAGE).....	79
7.4.1 Análisis electroforético de los extractos enzimáticos de <i>Beauveria bassiana</i> con sustratos sin desproteínizar.....	79
7.4.2. Análisis electroforético de los extractos enzimáticos de <i>Pencillium sp</i> con sustratos sin desproteínizar.....	80
7.4.3. Análisis electroforético de los extractos enzimáticos de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Penicillium sp</i> obtenidos en condiciones de mayor producción y con sustratos desproteínizados.....	81
8. CONCLUSIONES	88
9. PERSPECTIVAS	89
10. REFERENCIAS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Pared celular de los hongos, constituida principalmente por polímeros de glucano y quitina. Modificado de Franco <i>et al.</i> , 2011.	1
Figura 2. Extracción de proteína soluble empleando tetraborato de potasio al 1% (p/v) a 30 min intermitentes. Cutícula de chapulín, escarabajo y exoesqueleto de camarón.	33
Figura 3. Extracción de proteína soluble empleando tetraborato de potasio al 1%(p/v) a 30 minutos continuos. Cutícula de chapulín, cutícula de escarabajo y exoesqueleto de camarón.	34
Figura 4. Extracción de proteína soluble empleando tetraborato de potasio al 1%(p/v) a 11 horas continuas. Cutícula de chapulín, cutícula de escarabajo y exoesqueleto de camarón.	35
Figura 5. Extracción de proteína soluble de la cutícula de escarabajo evaluando el tiempo de exposición con tetraborato de potasio al 1% cada 30 minutos hasta las 2 horas	36
Figura 6. Extracción de proteína soluble empleando tetraborato de potasio al 1% cada 5 minutos hasta una hora con la cutícula de escarabajo.	36
Figura 7. Extracción de proteína soluble empleando tetraborato de potasio al 1%(p/v) a 1 horas continua. Cutícula de chapulín, cutícula de escarabajo y exoesqueleto de camarón.	37
Figura 8. Actividades enzimáticas NHasa y endoquitinasa con proteína sin proteína producidas por <i>Beauveria bassiana</i> utilizando cutícula de chapulín.	39
Figura 9. Actividades enzimáticas NHasa y endoquitinasa con proteína sin proteína producidas por <i>Beauveria bassiana</i> utilizando cutícula de escarabajo. ...	40
Figura 10. Actividades enzimáticas NHasa y endoquitinasa con proteína sin proteína producidas por <i>Beauveria bassiana</i> utilizando cutícula de camarón.	41
Figura 11. Proteína soluble y NAG de los extractos producidos por <i>Beauveria bassiana</i> utilizando cutícula de chapulín sin desproteínizar.	43
Figura 12. Proteína soluble y NAG de los extractos producidos por <i>Beauveria bassiana</i> utilizando cutícula de escarabajo sin desproteínizar.	43
Figura 13. Proteína soluble y NAG de los extractos producidos por <i>Beauveria bassiana</i> utilizando exoesqueleto de camarón sin desproteínizar.	44
Figura 14. Producción de biomasa por <i>Beauveria bassiana</i> con cutícula de chapulín, escarabajo y exoesqueleto de camarón sin desproteínizar.	44
Figura 15. Proteína soluble y NAG de los extractos producidos por <i>Beauveria bassiana</i> utilizando cutícula de chapulín desproteínizada.	45
Figura 16. Proteína soluble y NAG de los extractos producidos por <i>Beauveria bassiana</i> utilizando cutícula de escarabajo desproteínizada.	45
Figura 17. Proteína soluble y NAG de los extractos producidos por <i>Beauveria bassiana</i> utilizando exoesqueleto de camarón desproteínizado.	46
Figura 18. Producción de biomasa por <i>Beauveria bassiana</i> con cutícula de chapulín, cutícula de escarabajo y exoesqueleto de camarón desproteínizados. ...	46
Figura 19. Producción de Nhasa de los extractos producidos por <i>Beauveria bassiana</i> con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín, cutícula de escarabaj, exoesqueleto de camarón en función del pH inicial	50

Figura 20. Producción de endoquitinasas de los extractos de producidos por <i>Beauveria bassiana</i> con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín , cutícula de escarabajo, exoesqueleto de camarón en función del pH inicial	50
Figura 21. Proteína soluble de los extractos producidos por <i>Beauveria bassiana</i> con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín, cutícula de escarabajo, exoesqueleto de camarón en función del pH inicial	52
Figura 22. Producción de NAG de los extractos producidos por <i>Beauveria bassiana</i> con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín, cutícula de escarabajo, exoesqueleto de camarón en función del pH inicial	53
Figura 23. Producción de Biomasa de <i>Beauveria bassiana</i> con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín, cutícula de escarabajo, exoesqueleto de camarón en función del pH inicial.....	53
Figura 26. Actividades enzimáticas NHasa y endoquitinasa con proteína y sin proteína producidas por <i>Penicillium sp</i> utilizando cutícula de chapulín.	61
Figura 27. Actividades enzimáticas NHasa y endoquitinasa con proteína y sin proteína producidas por <i>Penicillium sp</i> utilizando cutícula de escarabajo.	62
Figura 28. Actividades enzimáticas NHasa y endoquitinasa con proteína y sin proteína producidas por <i>Penicillium sp</i> utilizando exoesqueleto de camarón.	63
Figura 29. Proteína soluble y NAG de los extractos producidos por <i>Penicillium sp</i> utilizando cutícula de chapulín sin desproteínizar.....	65
Figura 30. Proteína soluble y NAG de los extractos producidos por <i>Penicillium sp</i> utilizando cutícula escarabajo sin desproteínizar.....	66
Figura 32. Producción de biomasa producida por <i>Penicillium sp</i> con cutícula de chapulín, escarabajo y exoesqueleto de camarón sin desproteínizar.	67
Figura 36. Producción de biomasa producida por <i>Penicillium sp</i> con cutícula de chapulín, escarabajo y exoesqueleto de camarón desproteínizados.	69
Figura 37. Producción de Nhasa de los extractos producidos por <i>Penicillium sp</i> con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín, cutícula de escarabajo, exoesqueleto de camarón en función del pH inicial.....	71
Figura 38. Producción de endoquitinasa de los extractos producidos por <i>Penicillium sp</i> con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín , cutícula de escarabajo, exoesqueleto de camarón en función del pH inicial	71
Figura 39. Proteína soluble de los extracto producidos por <i>Penicillium sp</i> con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín, cutícula de escarabajo, exoesqueleto de camarón en función del pH inicial.....	73
Figura 40. Producción de NAG de los extractos producidos por <i>Penicillium sp</i> con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín, cutícula de escarabajo, exoesqueleto de camarón en función del pH inicial.....	73
Figura 41. Producción de Biomasa de <i>Penicillium sp</i> con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín, cutícula de escarabajo, exoesqueleto de camarón en función del pH inicial.....	74
Figura 44. SDS-PGE con tinción de azul de coomasie y tinción de plata de los extractos enzimáticos correspondientes a las fermentaciones en medio líquido de las 48 horas de <i>Beauveria bassiana</i> a pH y temperatura reportados con sustratos sin desproteínizar. Cantidad aproximada de proteína cargada por pozo 11.4 µg de proteína (M1): marcador amplio rango (BIO-RAD).....	80

Figura 45. SDS-PGE con tinción de azul de coomasie y tinción de plata de los extractos enzimáticos correspondientes a las fermentaciones en medio líquido de las 48 horas de <i>Penicillium sp</i> a pH y temperatura reportados con sustratos sin desproteinizar. Cantidad de proteína aproximada cargada por pozo 12.1µg de proteína (M2): marcador amplio rango (FERMENTAS).	81
Figura 46. SDS-PGE con tinción de plata de los extractos enzimáticos correspondientes a las fermentaciones en medio líquido de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Penicillium sp</i> efectuados a pH y temperatura de mayor producción. Cantidad de proteína aproximada cargada por pozo 17.1µg de proteína para <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Penicillium sp</i> (M2): marcador amplio rango (FERMENTAS).	82
Figura 47. SDS-PGE con tinción de azul de coomasie y tinción de plata de los extractos enzimáticos correspondientes a las fermentaciones en medio líquido de <i>Beauveria bassiana</i> de las 48 horas efectuados a diferentes pHs y temperatura reportada con sustratos desproteinizados. Cantidad de proteína aproximada cargada por pozo 13.1µg de proteína (M2): marcador amplio rango (FERMENTAS).	87
Figura 48. Curva estándar de proteína empleando seroalbúmina bovina (BSA) como referencia .Método de micro ensayo de Bradford (1976).	97
Figura 49. Curva estándar de reductores empleando N-acetilglucosamina (NAG) como estándar. Método de Miller (1954)	98
Figura 50. Curva estándar de N-acetilhexosaminidasa por el método de Tronsmo y Harman (1993) empleando una solución patrón de <i>p</i> -nitrofenol a una concentración de 100 µg/mL.....	98
Figura 51. Curva estándar para la determinación de la masa molecular relativa (MR) de proteínas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Penicillium sp</i> con sustratos sin desproteinizar mediante SDS-PAGE (Laemli, 1970). Se emplearon los valores de movilidad relativa (Rf) de proteínas conocidas (Tabla 11) presentes en marcador de amplio espectro (BioRad).....	117
Figura 52. Curva estándar para la determinación de la masa molecular relativa (MR) de proteínas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Penicillium sp</i> con sustratos desproteinizados mediante SDS-PAGE (Laemli, 1970). Se emplearon los valores de movilidad relativa (Rf) de proteínas conocidas (Tabla 12) presentes en marcador de amplio espectro (FERMENTAS).	117

ÍNDICE DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de fermentación en medio sólido y líquido. Modificada de Hölker y Höfer, 2004.....	13
Tabla 3. Efecto de la desproteización en velocidad específica de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i>	48
Tabla 5. Efecto del pH inicial en la velocidad específica de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i>	56
Tabla 6. Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i>	60
Tabla 7. Efecto de la desproteización en la velocidad específica de crecimiento de <i>Penicillium sp.</i>	69
Tabla 9. Efecto del pH inicial sobre la velocidad específica de crecimiento de <i>Penicillium sp.</i>	75
Tabla 10. Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento de <i>Penicillium sp.</i>	79
Tabla 12. Valores de masa molecular relativa (<i>MR</i>) y movilidad relativa (<i>Rf</i>) de las proteínas presentes en marcador de amplio espectro (BioRad).....	118
Tabla 13. Valores de masa molecular relativa (<i>MR</i>) y movilidad relativa (<i>Rf</i>) de las proteínas presentes en marcador de amplio espectro (FERMENTAS).....	118

ABREVIATURAS

HE	Hongos entomopatógenos
<i>Bb</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
<i>Psp</i>	<i>Penicillium sp</i>
NHasa	N-β-Acetil hexosaminidasa
PDA	Papa Dextrosa Agar
SD	Sin Desproteinizar
D	Desproteinizados
FML	Fermentación en medio líquido
Vol	Volumen
t	tiempo
T	Temperatura
Mr	Masa molecular relativa
Rf	Movilidad relativa
μ	Velocidad específica de crecimiento
pHi	pH intracelular
ATR	Respuesta a tolerancia acida
NAG	N- Acetil glucosamina
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
kDa	Kilo Dalton
CH	Chapulín
E	Escarabajo
C	Camarón
M1	Marcador 1
M2	Marcador 2

RESUMEN

La quitina, al ser el segundo polímero más abundante en nuestro planeta, requiere de estrategias para su hidrólisis, ya que presenta una estructura rígida que dificulta su aplicación. Sus derivados (quitosano y oligosacáridos) por el contrario, han mostrado tener un amplio espectro de aplicaciones en diversas áreas de la biotecnología como biomedicina, agricultura, ambiental, alimentos, cosmetología, entre otras, por lo que la producción de quitinasas específicas mediante métodos ambientalmente amigables, es de gran importancia para obtener derivados de interés. En años recientes se ha estudiado la producción de estas enzimas por hongos filamentosos. Puesto que la quitina es uno de los componentes estructurales de su pared celular, los hongos poseen la capacidad de expresar quitinasas (de tipo endo y exo) para degradar la quitina exógena, pero también para degradar la de su propia pared y remodelarla para su crecimiento (Hartl, 2012). Además, se ha observado la expresión de estas enzimas bajo procesos infectivos o de patogenicidad, por lo que son consideradas como indicadores en la selección de cepas virulentas para aplicarse en control biológico.

A la luz de estas observaciones, se han probado como métodos de producción, procesos fermentativos en estado sólido y líquido, empleando quitina como inductor (Ramírez-Coutiño, 2009). En este trabajo se optó por desarrollar fermentaciones en medio líquido, por las ventajas asociadas, como garantizar medios asépticos y un buen control de parámetros operacionales. Se seleccionaron hongos con patogenicidad probada, *Beauveria bassiana* 885.2 como entomopatógeno y *Penicillium sp.*, como fitopatógeno que afecta a frutos de la región (cítricos y papaya) pero del cual no existen reportes de expresión de quitinasas. Tres fuentes de quitina se emplearon como sustrato: cutícula de chapulín, cutícula de escarabajo harinero y exoesqueleto de camarón. De reportes anteriores, se sabe que el contenido de proteína residual en sustratos quitinosos puede ser causante de expresión de proteasas, las cuales pueden reducir o inhibir el nivel de expresión de quitinasas. Por lo anterior, fue necesario realizar un tratamiento previo de desproteínización empleando tetraborato de potasio. Bajo las mejores condiciones de este tratamiento, el exoesqueleto de camarón se

desproteinizó un 91%, la cutícula de chapulín 86% y 71 % la cutícula de escarabajo.

Las fermentaciones control se realizaron en medio líquido con sustratos sin desproteinar a condiciones de pH y temperatura reportados. Los resultados revelaron que las mayores concentraciones volumétricas de exoquitinasas (3.29 mU/mL) se obtuvieron con *Beauveria bassiana* utilizando cutícula de chapulín como sustrato. Para las endoquitinasas, las mayores concentraciones volumétricas (1150 mU/mL) se obtuvieron con *Penicillium sp* utilizando también chapulín como sustrato. Ambos valores obtenidos a las 48 horas de cultivo.

Posteriormente se realizaron fermentaciones con sustratos desproteinizados a pH y temperatura reportados, para evaluar el efecto de la desproteización sobre el incremento en la expresión de quitinasas. Los resultados revelaron nuevamente que la cutícula de chapulín es un buen inductor y que *Beauveria bassiana* expresó las mayores concentraciones volumétricas de exoquitinasas y *Penicillium sp* de endoquitinasas, ambos a las 48h. Las concentraciones de estas enzimas fueron 2.7 y 2.6 veces mayores respectivamente, considerando las fermentaciones control. Obtenido el tiempo de mayor producción y confirmado el efecto de la desproteización, se procedió a determinar el pH inicial del medio y temperatura de mayor producción.

En lo que respecta al pH de mayor producción, se encontró que a pH 3 *Beauveria bassiana* produjo las mayores concentraciones volumétricas de exoquitinasas y endoquitinasas, tales concentraciones fueron 3.6 y 3.8 veces mayores respecto a los mejores resultados de las fermentaciones control. Con *Penicillium sp* el pH de mayor producción fue de 6, y las concentraciones volumétricas de exoquitinasas y endoquitinasas fueron 1.65 y 2.9 veces mayores respecto a los valores control. En ambos casos la cutícula de chapulín desproteinizada fue el mejor inductor y el tiempo de mayor producción se mantuvo en 48h.

Posteriormente se evaluó la temperatura de mayor producción, observando que *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp* expresaron mejor ambas enzimas a 25°C.

Se realizó un análisis electroforético mediante SDS-PAGE de los extractos enzimáticos proveniente de las fermentaciones control, de las fermentaciones con

sustratos desproteinizados y bajo las mejores condiciones de producción a fin de evaluar la pérdida de proteínas. Este estudio reveló la pérdida de bandas proteicas pero no de aquellas con posible actividad quitinolítica. Se detectaron bandas proteicas con pesos moleculares de 94,88,78,66,64,60,56,54,40,38,29 kDa para *Beauveria bassiana*, y bandas proteicas de 94,88,85,78,64,58,54,40,29 kDa para *Penicillium sp.* Las bandas de proteínas expresadas a las mejores condiciones de fermentación con sustratos desproteinizados para ambos hongos, cuyos pesos moleculares van de 40-60 kDa coincidieron con los pesos moleculares reportados para las exoquitinasas, mientras que las correspondientes a endoquitinasas se estimaron entre 30-50 kDa (Hartl *et al*, 2012). Actualmente se han confirmado y complementado estos resultados mediante electroforesis nativa.

En este trabajo se concluye que el mejor productor de quitinasas fue *Beauveria bassiana* utilizando cutícula de chapulín desproteinizada como sustrato, en fermentaciones en medio líquido a pH 3, una temperatura de 25°C y por 48h. Lo anterior hace factible el empleo de este microorganismo para el desarrollo de bioformulados.

ABSTRAC

Chitin, being the second most abundant polymer on earth, it requires strategies for hydrolysis, as it presents a rigid structure that hinders its application. Its derivatives (Chitosan and oligosaccharides) by the other way, it has seen to have a wide range of applications in different areas of biotechnology and biomedicine, agriculture, environmental, food, cosmetics, among others, so its important the production of specific chitinase using methods environmentally friendly, it is of great importance to obtain derivatives of interest. In recent years we have studied the production of these enzymes from filamentous fungi. Since chitin is a structural cell wall components, fungi have the ability to express chitinases (endo and exo type) to degrade chitin exogenous, but also to degrade their own wall and remodel for growth (Hartl, 2012). Furthermore, there has been expression of these enzymes under infective pathogenicity or processes, which are considered as indicators in selecting virulent strains for application in biological control.

In light of these observations, it has been proven as methods of production, fermentation processes in solid and liquid using chitin as inductor (Ramírez-Coutiño, 2009). In this assignment we chose to develop fermentation in liquid medium, the associated benefits, such as ensuring aseptic media and good control of operating parameters. Pathogenic fungi tested were selected, *Beauveria bassiana entomopathogenic* and 885.2 as *Penicillium* sp., And pathogen plant that affects the region fruits (citrus and papaya) but for which there are no reports of expression of chitinase. Three sources of chitin were used as substrate: locust cuticle, cuticle flour beetle exoskeleton of shrimp. In previous reports, it is known that residual protein content chitinous substrates may be causing expression of proteases, which can reduce or inhibit the level of expression of chitinases. Therefore, it was necessary to perform deproteinization pretreatment using potassium tetraborate. Under the best conditions of this treatment, the exoskeleton of shrimp 91%, locust cuticle 86% and 71% cuticle deproteinized beetle.

The Control fermentations were carried out in liquid medium that contains substrates without deproteinization at pH and temperature conditions were reported. The results revealed that the largest volume concentrations of exoquitinasas (3.29 mU / mL) were obtained by using cuticle *Beauveria bassiana* grasshopper as substrate. For endochitinases, the largest volume concentrations (1150 mU / mL) were obtained with *Penicillium* sp grasshopper also using as substrate. Both values obtained at 48 hours.

Subsequently fermentations were carried out with substrates deproteinized pH and temperature reported to evaluate the effect of deproteinization on increased expression of chitinases. The results showed again that the cuticle grasshopper is a good inductor and *Beauveria bassiana* expressed the greatest volume concentrations of exoquitinasas and *Penicillium* sp endochitinases, both at 48h. The concentrations of these enzymes were 2.7 and 2.6 times higher respectively, considering the monitoring fermentations. Retrieved increased production time and confirmed the effect of deproteinization, we proceeded to determine the initial pH of the medium and higher output temperature.

Regarding the pH of increased production, it was found that at pH 3 *Beauveria bassiana* caused the largest volume concentrations of exoquitinasas and endochitinases such concentrations were 3.6 and 3.8 times higher compared to the best results in control fermentations. *Penicillium* sp pH greater production was 6, and volume concentrations of exoquitinasas and endochitinases were 1.65 and 2.9 times higher compared to control values. In both cases the cuticle of deproteinized grasshopper was the best inducer and at the time of optimal yield remained at 48h. Subsequently the temperature increased production was evaluated, noting that *Beauveria bassiana* and *Penicillium* sp best expressed both enzymes at 25 ° C.

Electrophoretic analysis by SDS-PAGE of the enzyme extracts from fermentations control of fermentations deproteinized substrates and under the best conditions of production to assess the loss of proteins was performed. This study revealed the loss of protein bands but not those with possible chitinolytic activity.

Protein bands with molecular weights of for *Beauveria bassiana* kDa 94,88,78,66,64,60,56,54,40,38,29, 94,88,85,78,64,58 and protein bands were detected, 54,40,29 kDa for *Penicillium sp.* The bands of proteins expressed its best deproteinized fermentation substrates for both fungi, whose molecular weights ranging from 40-60 kDa molecular weight coincided with reported for exoquitinasas, while those for endochitinases were estimated between 30-50 kDa (Hartl *et al*, 2012). They have now been confirmed and supplemented these results with native electrophoresis.

This paper concludes that the best producer of chitinase was *Beauveria bassiana* using deproteinized locust cuticle as substrate in fermentation in liquid medium at pH 3, a temperature of 25 ° C for 48h. This makes feasible the use of this organism to develop bioformulados.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los hongos son organismos eucariontes heterótrofos que pertenecen al reino Fungi cuyas células carecen de clorofila y poseen una pared celular compuesta de quitina, glucanos y otros polímeros (Figura 1), con evidencia de que se forma un entrecruzamiento entre estos componentes, creando una compleja estructura reticular. Ocupan el segundo lugar en abundancia en el suelo y están constituidos por estructuras somáticas filamentosas llamadas hifas que en conjunto forman el micelio (Ferrera y Alarcón, 2007).

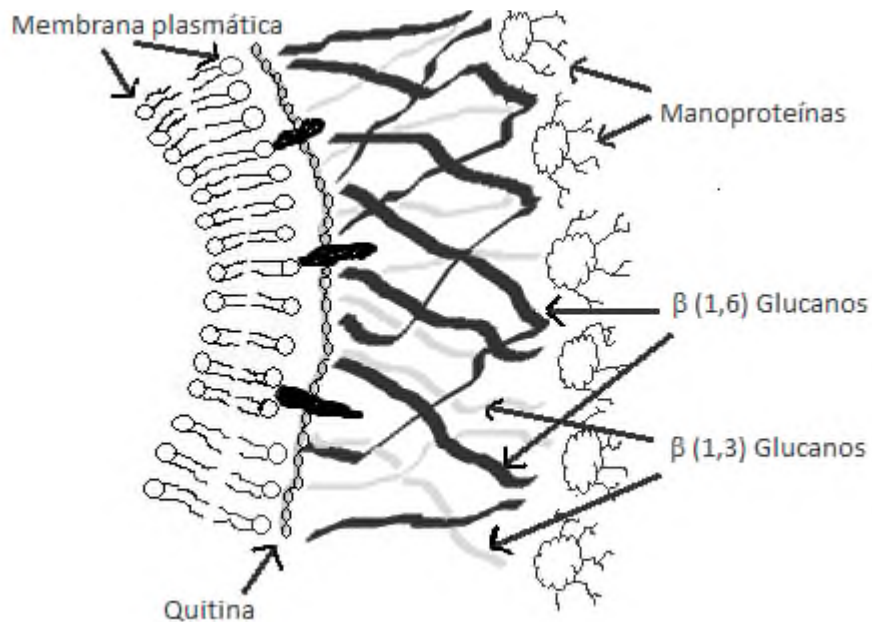


Figura 1. Pared celular de los hongos, constituida principalmente por polímeros de glucano y quitina. Modificado de Franco *et al.*, 2011.

Son un reino que se encuentra ampliamente distribuido por todo el planeta, se localizan en cualquier sitio que presente material orgánico, agua y una temperatura apropiada, pueden vivir en climas ecuatoriales, tropicales, subtropicales y aún en los fríos, siempre y cuando la temperatura no esté por debajo de los 0°C; desde el nivel del mar hasta altitudes mayores de 4000 m; así mismo se desarrollan en los lugares más húmedos hasta los sitios semidesérticos (Fransen, 1987). Los factores más relevantes en el desarrollo y la patogenicidad

de los hongos son temperatura y humedad relativa, el primero en un intervalo de 10 a 31.7°C mientras que para el segundo de 81-92% (Ortiz-Caton *et al*, 2011). Cabe resaltar que estos parámetros, en la mayoría de los casos, difieren de los que requieren para su desarrollo en los hospederos. Por lo que es importante considerar la influencia de la temperatura sobre el huésped y la duración de la etapa biológica en que ocurre la penetración y desarrollo de los hongos. También las condiciones óptimas de germinación, desarrollo, esporulación e infección de los hongos difieren de una especie a otra.

Dentro del reino Fungi se encuentran la división Eumycota, representados por los phylum, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota con potencial para el control de insectos, dentro de las especies más importantes de hongos entomopatógenos se encuentran en el orden de los Hypocreales, phylum Ascomycota anteriormente clasificados como Deuteromycota y sus subclases. Estos incluyen un gran número de hongos filamentosos llamados de esta manera por su forma de crecimiento, entre los géneros más comunes se encuentran: *Aspergillus*, *Beauveria*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Isaria*, *Lecanicillium* entre otros (Ulloa y Herrera, 1990).

1.1. Interacciones fúngicas

1.1.2. Interacción hongo-insecto

Los hongos y los insectos están estrechamente relacionados en muchos hábitats terrestres y algunos acuáticos. Esta relación data de por lo menos trescientos cincuenta y nueve millones de años (Blackwell, 2010). Bajo algunas circunstancias (cuando escasea un sustrato) el insecto es hospedero del hongo. Existen muchas interacciones entre ellos que van desde las transitorias hasta las obligadas, algunas de las cuales llegan a enfermar y a matar de manera prematura al hospedero, fenómeno conocido como patogenicidad (Currie *et al*, 2003). Lo anterior se sustenta, además de la evidencia fósil, por las tasas de divergencia molecular (Matheny *et al.*, 2009; Taylor y Berbee, 2006).

Los hongos entomopatógenos (HE), emplean insectos y otros artrópodos de diferentes órdenes como hospederos para desarrollar parte de su ciclo de vida (Aristegui, 2002). El mayor número de géneros con potencial para el control biológico se agrupan dentro de los Ascomycota (Echeverría, 2006). Los géneros más utilizados son *Beauveria*, *Metarhizium*, *Trichoderma* y *Lecanicillium* (De Faria y Wraight, 2007). Constituyen un grupo en donde el proceso de infección se da por contacto con su hospedero, logrando una penetración directa de la cutícula (St. Leger *et al*, 1991). Su patogenicidad está determinada por la velocidad de germinación, reproducción, tasa de esporulación, tiempo de exposición del insecto, producción de toxinas, estado de desarrollo y ciclo de vida del hospedero (Mena, 2011).

El proceso de infección se divide en las siguientes etapas:

Adhesión. Es el primer contacto de la espora con la cutícula del insecto. En algunos hongos es un fenómeno no específico, mientras en otros la especificidad está dada por componentes como glucoproteínas que sirven de receptores para las esporas (Brinkman y Gardner, 2000; St Leger *et al*, 1991). Una vez adherida la espora forma uno o varios tubos germinativos, que al elongarse dan origen a las hifas (Alean, 2003).

Penetración. Ocurre en la cutícula del insecto como resultado de la combinación entre la degradación enzimática y la presión mecánica del tubo germinativo. La acción enzimática está determinada principalmente por proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan la ruptura de la cutícula, lo que facilita la penetración (St Leger *et al*, 1991). Esto depende de las propiedades de la cutícula como: grosor, esclerotización, la presencia de sustancias antifúngicas y nutrientes. Algunos hongos, como *M. anisopliae*, producen un mucílago que ayuda al anclaje de la espora a la superficie (Mena 2011).

Invasión. La hifa sufre un engrosamiento y se ramifica en la cavidad del insecto formando colonias pequeñas y otros cuerpos hifales (Monzón, 2001).

Muerte y esporulación. El hongo produce toxinas, lo que provoca que el insecto infectado no se alimente, presente debilidad, desorientación y manchas oscuras sobre el tegumento (Ferrera y Alarcón, 2007). Con la muerte del insecto termina el parasitismo del hongo y empieza la fase saprofita; invade totalmente al insecto y emerge en forma de hifa, esporula y sintetiza antibióticos para evitar el crecimiento de microorganismos oportunistas e inicia otro ciclo de infección (Lee *et al.*, 2005; Srivastara *et al.*, 2009). Después de la muerte del insecto se presenta la fase reproductiva en dos etapas, miceliación y esporulación en condiciones de humedad relativa y temperatura estrictas. Si las condiciones climáticas son secas, el proceso reproductivo se detiene y se observan insectos momificados mas no cubiertos por una capa algodonosa que corresponde a la miceliación; o por un polvillo verde, lila o blanco que corresponde a la esporulación, que es la capacidad de los hongos entomopatógenos para repoblar el área con más esporas para afectar otros insectos (Ferron, 1978).

Los HE al infectar a los insectos producen metabolitos, como enzimas hidrolíticas y anticuerpos. Las enzimas degradan la cutícula del huésped mientras que los metabolitos y los anticuerpos invaden el homocelo hasta ocasionar la muerte, la cual se produce por agotamiento de los nutrientes de la hemolinfa, bloqueo o inmovilización de elementos del sistema inmune. Además estos hongos al encontrarse en nichos ecológicos con alta biodiversidad y competencia sintetizan antibióticos. Los compuestos bioactivos señalados pueden ser utilizados como bioinsecticidas o fungicidas, y ser producidos por procesos fermentativos. Esto abre nuevas posibilidades de desarrollo agrobiotecnológico, acorde con las tendencias de la investigación agrícola a nivel mundial. Dentro de las enzimas degradadoras de la cutícula más importantes se encuentran las quitinasas las cuales están reguladas por sus productos de hidrólisis (St. Leger *et al.*, 1986a).

1.1.2.1. Los hongos entomopatógenos en el control biológico

La mayoría de los HE son usados para controlar poblaciones plaga por debajo del umbral económico, aceptando algunos daños en el cultivo. Además los HE tienen un papel importante en el manejo integral de plagas utilizados en combinación

con otras estrategias para lograr un control sustentable. En algunos casos han contribuido con un control equivalente al de los insecticidas. Estos además, han desarrollado su potencial para regular las poblaciones de insectos a costos ambientalmente más bajos que los insecticidas y contribuir a la estabilización de las poblaciones a largo plazo (SMCB, 2013).

Dentro de los hongos entomopatógenos se encuentran especies que presentan un amplio rango de hospederos, que tienen la capacidad de atacar a un gran número de especies de insectos, mientras otros géneros son más específicos. *Beauveria bassiana* y *Metharizium anisopliae* se consideran como un ensamble heterogéneo de especies en los que se encuentran diversos genotipos. Se ha observado que las especies tienen características diferenciales, se encuentran patotipos o razas que aunque presentan una morfología similar, tienen diferente rango de hospederos (Huang *et al*, 2005). Cabe mencionar que en este trabajo se seleccionó el género *Beauveria bassiana*.

1.1.2.2. *Beauveria bassiana*

El HE *B. bassiana* (Balsamo-Crivelli) fue descrito por primera vez hace 176 años (1835). Desde entonces es considerado como un hongo que puede ser utilizado como agente de control biológico de insectos plaga. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en todas las regiones del mundo y puede ser aislado de insectos, ácaros y de suelos, donde es parte de la biota microbiana y otros substratos. Se ha utilizado en todo el mundo por más de 100 años como micoinsecticida, principalmente contra plagas de cultivos agrícolas y forestales, y es considerado como factor de mortalidad de manera natural en poblaciones de insectos, causando epizootias en algunos ecosistemas (Montesinos, 2012).

Desde su descubriendo hace casi dos siglos, *Beauveria* se ha encontrado que posee varias características favorables, que lo ha posicionado como uno de los principales organismos utilizados en la investigación sobre patología en insectos y en el control biológico de ellos. Debido a su distribución cosmopolita, su fácil reconocimiento, y la aparición frecuente en la naturaleza, *Beauveria* es uno de los más encontrados y reconocidos, teniendo un rango extremadamente amplio de

hospederos (más de 270 especies de insectos) con una variación amplia en la virulencia hacia ellos. *Beauveria* es un organismo muy manejable, se aísla fácilmente de cadáveres de insectos o de muestras de suelo utilizando medios simples, antibióticos, y agentes selectivos. Además se puede cultivar en laboratorio con medios de cultivos sencillos y puede ser conservado utilizando métodos convencionales, por ejemplo, en solución de glicerol o liofilización (Montesinos, 2012).

1.1.2.3. Taxonomía de *Beauveria bassiana*

En 1912 Vuillemin describió formalmente el género *Beauveria*, asignando *Botrytis bassiana* como la especie tipo; posteriormente se le nombró *Beauveria bassiana* en reconocimiento a J. Beauverie (1914) quien la estudió, *Beauveria* en la enfermedad de la muscardina blanca, así como a Agostino Bassi quien describió por primera vez la enfermedad. Dado que las especies de *Beauveria* se reproducen por producción de conidios (mitosporas), han sido presuntamente clasificados de manera tradicional como hongos hifomicetes asexuales (Deuteromycetes), pero las herramientas moleculares que permiten colocar a tales hongos entre sus congéneres teleomorfos. A pesar de varios análisis taxonómicos exhaustivos de *Beauveria* durante el último siglo, aún subsisten problemas importantes en la identificación, taxonomía, y nomenclatura de las especies de este género. Los análisis moleculares filogenéticos recientes han evidenciado que *Beauveria* está relacionado de manera directa con el género teleomorfo *Cordyceps* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae) (Montesinos, 2012).

Clasificación taxonómica según el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, 2011):

Reino:

Fungi

Phylum:	<i>Ascomycota</i>
Subphylum:	<i>Pezizomycotina</i>
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>
Orden:	<i>Hypocreales</i>
Familia:	<i>Cordycipitaceae</i>
Género.	<i>Cordyceps (Beauveria)</i>
Especie:	<i>bassiana</i>

1.1.3. Interacción hongo-planta

Los hongos fitopatógenos causan enfermedades en las plantas mediante la secreción de enzimas. El mecanismo de infección comprende las siguientes fases: unión a la superficie de la planta, germinación y formación de estructuras de infección, penetración y colonización. Algunas de las formas en que se adhieren a la superficie de la planta es alterando ésta, mediante la excreción de enzimas proteasas, esterases y quitinasas (Jiménez, 1996).

El proceso de germinación de las esporas fúngicas, se inicia con la hidratación y aumento de volumen, la hidrólisis de las reservas energéticas endógenas, así como la síntesis de proteínas y materiales estructurales de membrana y pared, necesarios para la formación y elongación de los tubos germinativos (Ferrera y Alarcón, 2007).

La penetración puede tener lugar de forma mecánica, por digestión enzimática, a través de aberturas naturales o de la superficie intacta de la planta por medio de tubos germinativos, apresorios o agregados hifales más complejos (cojines de infección). La producción de quitinasas por parte de los hongos juega un papel determinante en la invasión de las plantas, lo que ha quedado demostrado mediante la inhibición de estas enzimas con anticuerpos o inhibidores químicos, que ocasionan una reducción en la virulencia del hongo (Calonje *et al.*, 1997). La colonización del tejido huésped por crecimiento intercelular de las hifas, a menudo ocasiona la muerte de las células del huésped mediante la secreción de enzimas y toxinas (Jiménez, 1996).

1.1.3.1. Importancia de los hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos con origen en el suelo, los encontramos ocasionando daño en todos los suelos de los ecosistemas y agroecosistemas del mundo. Algunos géneros y especies presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos, mientras que otros presentan características de adaptación más limitadas o bien son sumamente especializados, lo cual restringe su distribución (Cook y Baker 1983). Esta capacidad adaptativa de los hongos fitopatógenos va a depender en gran medida del grado de relación que han desarrollado con las plantas hospedantes, es decir, si son parásitos obligados, parásitos facultativos, o saprófitos facultativos. La importancia de los hongos fitopatógenos del suelo que atacan la raíz, no se limita sólo al daño que ocasionan en las plantas hospedantes, sino también debe considerarse el papel que juegan dentro de las cadenas tróficas y en las diversas relaciones que establecen con otros microorganismos del suelo (Agrios 1988).

Por otra parte estos hongos fitopatógenos pueden ser patógenos que invaden y provocan pudriciones en el sistema vascular como son los géneros *Penicillium*, *Verticillium* y *Fusarium*. La invasión de los tejidos vegetales vivos ocurre en forma muy similar a la colonización del tejido vegetal muerto; es decir se presenta todo un despliegue de enzimas degradadoras de tejidos y algunas veces también de fitotoxinas. Bajo esta perspectiva, estos hongos del suelo muestran un alto grado de habilidad competitiva saprofítica (Garret, 1981). Dentro de los hongos fitopatógenos se seleccionó a *Penicillium sp*, ya que es considerado un enemigo importante de plantas y frutos ocasionando con ello pérdidas económicas (Garret, 1981).

1.1.3.2. *Penicillium sp*

.El *Penicillium* es un género grande que puede encontrarse casi por todas partes, siendo el género de hongos más abundante en suelos. Su fácil proliferación de los *Penicillium* en los alimentos es un problema. Algunas especies benéficas producen toxinas, sin embargo muchas especies de *Penicillium* son beneficiosas para los seres humanos. Los quesos tales como el roquefort, brie, camembert, stilton, etc. se crean a partir de la acción de diferentes especies

de *Penicillium* sobre la leche, y son absolutamente seguros de comer. El antibiótico de penicilina es producido por el hongo *Penicillium chrysogenum*, un moho ambiental.

Se caracterizan por formar conidios mediante una estructura ramificada que recuerda la forma de un pincel, las ramificaciones terminan en unas células que se conocen como fialides. Las fialides originan las esporas.

1.1.3.3. Taxonomía de *Penicillium* sp

La primera descripción del género *Penicillium* en la literatura científica fue realizada por Johann Heinrich Friedrich Link en el año 1809. Link incluyó en su trabajo 3 especies: *Penicillium candidum*, *Penicillium expansum* y *Penicillium glaucum*. En 1979 una monografía de John I. Pitt dividió el género en 4 subgeneros: *Aspergilloides*, *Biverticillium*, *Furcatum* y *Penicillium*.

A continuación de la clasificación taxonómica de acuerdo a Link 1809.

Reino:	Fungi
Phylum:	<i>Ascomycota</i>
Clase:	<i>Euascmycetes</i>
Orden:	<i>Eurotiales</i>
Familia:	<i>Trichomaceae</i>
Género.	<i>Penicillium</i>

1.2. Quitinasas

En las dos interacciones mencionadas intervienen varias enzimas en el proceso de infección, estas son: proteasas, lipasas y quitinasas. Es importante el estudio de estas últimas dada la abundancia de su sustrato en la naturaleza (quitina).

Las quitinasas se agrupan acorde a su mecanismo hidrolítico en endoquitinasas y exoquitinasas.

Las endoquitinasas de acuerdo al Enzymes Comit se clasifican en EC 3.2.1.14 (3; de acuerdo a la reacción hidrolítica, 2; por el tipo de sustrato, 1; reacción catalizada, 14; número de serie de la enzima) rompen al azar enlaces internos en la cadena de quitina, generando oligómeros de N-acetilglucosamina de bajo peso molecular como quitobiosa, quitotriosa y quitotetraosa.

Las exoquitinasas, pueden dividirse en dos subcategorías, quitobiosidasas (EC 3.2.1.29), las cuales catalizan la liberación progresiva de quitobiosa comenzando desde el extremo no reductor de la quitina; y las 1-4- β -N-acetilglucosaminidasas (EC 3.2.1.30), que actúan sobre los productos oligoméricos de las endoquitinasas y quitobiosidasas, generando monómeros de N-acetilglucosamina, cabe mencionar que en esta última subcategoría se debe incluir a las denominadas quitobiosas, ya que estas generan dos moléculas de N-acetilglucosamina pero tienen mayor especificidad sobre el dímero quitobiosa (Ramírez-Coutiño, 2009). Dentro de estas enzimas, las endoquitinasas y N- β -acetilhexosaminidasas (Nhasa) son de relevancia, por encontrarse en puntos clave del mecanismo de hidrólisis de la quitina.

1.2.1. Las quitinasas y su papel en la industria

Los microorganismos quitinolíticos están involucrados en aspectos biotecnológicos, por ejemplo en la mineralización de la quitina al igual se ha sugerido el uso de quitinasas para combatir importantes infecciones micóticas superficiales, aunque tendrían que considerarse y resolverse importantes problemas inmunológicos antes de considerar a estas enzimas como agentes terapéuticos.

Otro campo importantes es el uso de los quito-oligosacáridos derivados de la hidrólisis enzimática de la quitina, los cuales sirven como sustrato de fermentación para producir sustancia de alto valor agregado.

Las quitinasas o microorganismo que las producen, podrían servir también para formular funguicidas, dentro del área de control biológico se conoce que los vegetales tienen un sistema digestivo complejo para protegerse del ataque de hongos fitopatógenos, que incluyen como un elemento importante a las quitinasas y beta 1,3 glucanasas, capaces de digerir la pared celular de los hongos

invasores, de acuerdo a lo anterior se han producido plantas transgénicas de tabaco que además de sus propias quitinasas expresan constitutivamente las de una variedad de frijol cuyos genes de quitinasas le fueron previamente insertados, esto le permite aumentar su capacidad de crecimiento en suelos infectado . De igual manera se promueve la producción de quitinasas mediante diversos mecanismos como la exposición a etileno, otros factores importantes que promueven la producción de quitinasas siguen siendo para el tratamiento del virus del mosaico del tabaco, así también el uso de ellas en la localización citoquímica de estructuras con contenido de quitina y quitosanas, también utilizadas en la sacarificación de la quitina y producción de quito-oligosacáridos,, para la producción de biomasa microbiana y para la obtención de protoplastos entre muchas otras investigaciones propuestas de gran interés en diversas áreas de estudio (Prado *et al*, 1999).

1.2.2. Métodos de producción de quitinasas

La producción de quitinasas a nivel industrial, se ha efectuado empleando principalmente bacterias como *Serratia marcescens* (Mejía *et al.*, 2006) y *Streptomyces griseus* (Ramírez -Coutiño, 2009), así como *Bacillus licheniformis*, *Nocardia orientalis* (Yuli *et al* 2004). Recientemente, las investigaciones de quitinasas de hongos han progresado rápidamente sobre todo por sus aplicaciones, siendo de gran importancia para la Biotecnología de hongos como: *Fusarium Chlamydosporium*, *Stachybotrys elegans*, *Talaromyces flavus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium chlamydosporium*, *Verticillium suchlasporium*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Rhizopus oligosporus*, e *Isaria japonica* (Gonzales *et al.*, 2005).

1.2.2.1. Fermentación en medio sólido (FMS)

Se define como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos o semisólidos en ausencia de agua libre. La principal característica de estos sistemas es que el sustrato no está disuelto en un gran volumen de agua (Viniegra *et al.*, 2003). Los principales parámetros que la afectan son: humedad, actividad

de agua, aireación, transferencia de oxígeno y regulación de la temperatura, tamaño de partícula (Hölker y Höfer, 2004). La producción de β -N-acetilhexosaminidasa (Nhasa) con *Verticillium lecanii* empleando como sustrato una mezcla de ensilaje de desecho de camarón y bagazo de caña de azúcar a un pH inicial de 6, mostró que los residuos de camarón ensilados indujeron eficazmente a la enzima, en comparación con medios suplementados con sacarosa en los que no se detectó actividad enzimática (Matsumoto *et al.*, 2004), las desventajas encontradas fueron la obtención de enzimas con impurezas provenientes de los sustratos y su posterior dificultad para purificarlas. Existen reportes de hongos fitopatógenos como *Penicillium chrysogenum* para la producción de pigmentos a pH 4 a 40°C utilizando como sustrato salvado de trigo con quitina (Patidar *et al.*, 2004), el mismo artículo señala a hongos como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Myrothecium* y *Beauveria* para la producción de quitinasas en medio sólido con quitina como sustratos.

1.2.2.3. Fermentación en medio líquido (FML)

También llamada cultivo sumergido, es un sistema en el cual los sustratos están disueltos o suspendidos en un medio acuoso y son agitados para conservar la homogeneidad del sistema (Viniestra *et al.*, 2003). Los principales parámetros que afectan a este sistema son: temperatura, pH, velocidad de agitación, aireación, tamaño y edad del inóculo, concentración y disponibilidad de los nutrientes (Hölker y Höfer, 2004). Cabe mencionar que esta modalidad es sutil porque es un medio no natural en el cual el hongo no logra crecer de manera adecuada, esto representa un estrés lo que hace que el hongo libere metabolitos como toxinas y enzimas que degraden el sustrato para el crecimiento del hongo (Merzendofer *et al.*, 2007).

Las quitinasas han sido producidas por *Metarhizium anisopliae* en medio líquido utilizando como fuente de carbono quitina coloidal (St Leger *et al.*, 1986b). Se encontraron pocos reportes que describen la influencia de variables ingenieriles sobre la producción de quitinasas en el caso de los hongos filamentosos. Uno de los primeros en evaluar el efecto y la velocidad de agitación fue Felse, (2000) con

Trichoderma harzianum utilizando como sustrato hojuelas de quitina de caparazón de cangrejo.

Felse y Panda (2000) reportaron quitinasas de *Streptomyces cinereoruber* también se reportó a *Trichoderma viride* por último *Talaromyces emersoni* utilizando quitina como sustrato.

A continuación se presentan las ventajas y desventajas de los dos sistemas de fermentación (Tabla 1).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de fermentación en medio sólido y líquido. Modificada de Hölker y Höfer, 2004.

	FML	FMS
VENTAJAS	Alto contenido de agua, facilitando el control de temperatura y distribución de nutrientes en el medio de cultivo (sistema homogéneo)	Baja demanda de agua
	Amplio desarrollo en sistemas de medición y control. Modelos cinéticos	Alta concentración de producto final
	Rápido crecimiento de los microorganismos	Simulación del entorno natural
		Sustratos económicos
	Incremento en los costos de separación y purificación	Los microorganismos crecen de manera lenta

DESVENTAJAS

Medios de cultivos caros.	Control deficiente de la temperatura.
Genera espuma	Gradientes de humedad, temperatura y nutrientes
Generación de grandes volúmenes de aguas y sólidos residuales.	Medios no asépticos
	Dificultades en el escalamiento

1.3. Sustratos

La literatura señala que la producción de quitinasas se incrementa en presencia de quitina, pared celular de *Agaricus bisporus* o cutícula de insectos, como fuentes de carbono y nitrógeno (Rocha, 2009). Sin embargo en la mayoría de las investigaciones los sustratos utilizados para la producción de las quitinasas son quitina purificada (SIGMA), coloidal, de pluma de calamar y de exoesqueleto de camarón. En esta investigación se emplearán las cutículas de camarón como comparativo y otras dos fuentes de insectos debido a los escasos reportes asociados a la producción de quitinasas.

2. JUSTIFICACIÓN

Existe un gran interés en investigar la producción de quitinasas debido a sus diversas aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas, además de ser elementos esenciales durante el proceso de patogénesis de hongos entomopatógenos. Los hongos fito y entomopatógenos producen quitinasas durante la elongación de la hifa, así como durante la invasión por lo que estas enzimas son parte fundamental en el mecanismo de infección. Estas enzimas se pueden inducir al utilizar quitina como sustrato, se consideraron tres fuentes de quitina; camarón, escarabajo y chapulín, para la expresión de quitinasas. Los escarabajos y los chapulines son abundantes en la región del Papaloapan y valles centrales de Oaxaca ya que son considerados insectos que tienen impacto económico. Cabe mencionar que no existen reportes del contenido de quitina en chapulín, pero se cree que tienen aproximadamente el mismo porcentaje que la langosta ya que ambos pertenecen a la división de los ortópteros.

Por otra parte, se utilizará la cutícula de los insectos desproteïnizada parcialmente (eliminación de proteína soluble) para reducir el nivel de expresión de proteasas que pudieran afectar la producción y actividad de las quitinasas, (Ramírez-Coutiño, 2009). No se consideró conveniente purificar completamente las cutículas a fin de evitar el uso de ácidos, álcalis y agua en las etapas de purificación de estos sustratos y de acuerdo a las investigaciones realizadas por el método de kjeldahl la quitina de la marca sigma aun presenta proteína remanente, no logrando con ello el total de la desproteïnización.

Así mismo, no se encontraron estudios que indiquen el contenido de proteína presente en las cutículas que pueda inducir mejor la expresión de quitinasas, por lo que ésta investigación sería pionera en este sentido.

La importancia de hongos filamentosos en la Biotecnología es para la producción de metabolitos como son las toxinas y las enzimas especialmente las quitinasas con potencial en el control biológico (Ferron, 1978; Franco *et al.*, 2011). Con base en lo anterior los hongos que se utilizaron fueron la cepa entomopatógena *Beauveria bassiana* debido a que infecta a más de 270 especies de insectos

(Huiping *et al.*, 2011), mientras que la cepa fitopatógena utilizada fue *Penicillium sp* ya que algunas especies de este género causan daños en cultivos de importancia en la región y de acuerdo a los antecedentes, la información es escasa en cuanto a la producción de quitinasas (Nhasas y endoquitinasas) en medio líquido. Mientras que los estudios de St Leger (1999) establecen que hay una pequeña divergencia genética entre los entomopatógenos y micoparásitos por lo que la expresión de enzimas y los mecanismos de infección son similares. Así mismo se puede extrapolar esto a los fitopatógenos debido a la similitud de expresión de enzimas durante el mecanismo de infección (Carrasco, 2011).

En este trabajo se realizó la producción de enzimas quitinolíticas por fermentación en medio líquido, debido a que se puede emplear un medio aséptico, hay un mejor control de pH y temperatura (parámetros), y se facilitan la difusión de nutrientes y oxígeno (algo limitado) por la agitación, así como la separación subsecuente de las enzimas.

Por otra parte, se consideró la evaluación del efecto del pH, temperatura y desproteinización parcial de las cutículas empleadas como sustrato, con el objeto de elucidar los valores de estos parámetros que afecten la fisiología de los hongos mencionados, a fin de obtener mayor producción de quitinasas.

3. ANTECEDENTES

A pesar de su abundancia, la quitina de camarón, chapulín y escarabajo tiene una tasa de degradación muy lenta, lo que hace necesario darle un tratamiento previo. Uno de los métodos tradicionales para la purificación a nivel industrial consiste en la desmineralización, **desproteínización** y decoloración, empleando para esto álcalis y ácidos que generan residuos tóxicos y demandan grandes cantidades de agua (Rocha-Pino *et al.*, 2008).

El tratamiento químico con ácidos fuertes ha permitido la obtención de la quitina con una estructura más abierta, sin embargo aún no se logra una total desproteínización, reportes por Ramírez-Coutiño (2009) para el caso de la cutícula de camarón por una fermentación sólida con bacterias ácido lácticas y posterior una desacetilación se reportan valores de desproteínización mayores del 80%.

El tratamiento del exoesqueleto de los crustáceos, para eliminación de proteínas por una "desproteínización", se realizó con una solución alcalina caliente al 10 %, con hidróxido de sodio o potasio, alcanzando valores de 75 % a 95 % (Castañeda *et al.*, 2011).

Se consideraron tres fuentes de quitina, para la expresión de quitinasas con base a la cantidad de este polímero en esas fuentes. Plascencia *et al.* (2012), reportaron que los porcentajes de quitina para los coleópteros (escarabajo) son del 27 al 35%, mientras que para los ortópteros (langosta) van del 60 al 75 %, ambos respecto al peso de cutícula orgánica. Para el caso de los crustáceos (camarón *Penaeus*), el contenido va del 13.1 al 23.2 % del peso corporal seco

De acuerdo a Liu *et al.*, 2012, señala que utilizando HCL 1 M por 30 minutos *Holotrichia parallela* no se logra desproteínizar totalmente, ya que el nitrógeno total era de aproximadamente del 11% mientras que después del tratamiento fue de 6.45%, estos datos obtenidos por el método de kjeldahl. Indicando así que logra un 58 % de la extracción.

El método para la desproteínización del escarabajo (*Tenebrio molitor*) empleado por Montesinos (2012) consistió en cinco lavados secuenciales cada 5 min hasta 30 min con tetraborato de potasio enjuagando después de cada lavado con agua

destilada, posteriormente la mezcla se agita durante once horas. Cabe señalar que no se reportan porcentajes de desproteínización.

En un estudio previo para el tratamiento de los desechos de camarón y chapulín por fermentación sólida empleando bacterias ácido lácticas (Amador *et al.*, 2014) se observó, una ligera desproteínización a las 120 horas de 5.04 y 19.86 % respectivamente lo cual se evidenció por el contenido de proteína soluble en la fracción líquida de los ensilados. Sin embargo estos porcentajes de desproteínización fueron bajos, y requieren tiempos prolongados para incrementar su eficacia, por lo que es necesario un pre-tratamiento químico empleando agentes alcalinos menos cáusticos que el NaOH como el tetraborato de potasio (Montesinos, 2012), que permite extraer la proteína para su uso posterior. Las cutículas previamente tratadas pueden utilizarse como sustratos en fermentaciones en medio líquido para la obtención de enzimas (quitinasas) empleando hongos filamentosos.

Los parámetros que afectan a la fisiología de los hongos son **pH, temperatura y sustrato**, parámetros que se estudiaron en este trabajo, asumiendo que en términos fisiológicos, la temperatura es considerada un parámetro de mayor significado que el contenido de calor de un cuerpo o sistema, desempeña un rol fundamental en el funcionamiento de ecosistemas al regular o afectar otros factores abióticos como son: la solubilidad de nutrientes y propiedades físico químicas del medio acuoso como pH, potencial redox, solubilidad de gases, densidad, el estado físico y la viscosidad del sustrato. La temperatura afecta la energía cinética de los reactivos, así como la estabilidad y actividad de las enzimas que participan en reacciones bioquímicas. En consecuencia la temperatura ejerce una marcada influencia sobre la reproducción, crecimiento y el estatus fisiológico de todas las entidades de vida (Wraight, 2007).

La fisiología, así como la producción de metabolitos fúngicos son afectadas por factores como humedad, actividad de agua, composición de la atmósfera (CO₂, O₂), pH, temperatura, concentración, tipo de nutrientes y cultivo donde el pH juega un papel importante en la regulación de la producción de enzimas. St. Leger *et al.* (1998) reportaron que las hidrofobinas y quitinasas son expresadas en altas

concentraciones en intervalos de pH de neutros a básicos, que corresponden a los encontrados en el sitio de infección. Esto es debido a la presencia de genes regulados por el pH ambiental y un patrón temporal de enzimas requeridas para el desarrollo y proceso infectivo de los hongos.

Las quitinasas han sido producidas de igual manera por *Metarhizium anisopliae* en medio líquido utilizando como fuente de carbono quitina coloidal al 2 %, en donde la máxima actividad alcanzada fue de 1.47 $\mu\text{mol NAG/mL/h}$ a un pH final de 6.89 en el quinto día de cultivo (St Leger *et al.*, 1986b).

Uno de los primeros en evaluar el efecto y la velocidad de agitación fue Felse, (2000) con *Trichoderma harzianum* NCIM 1185 en un biorreactor de 7L, utilizando como sustrato hojuelas de quitina de caparazón de cangrejo (12.5 kg/m^3), la temperatura y el pH se mantuvieron controlados a 30°C y 4.9 respectivamente. La velocidad de agitación más adecuada fue de 224 rpm para el crecimiento (15.3 g/L) y producción de quitinasas (0.391 U/mL) a las 112 h de la fermentación.

Reportes por Felse y Panda (2000) señalan que *Trichoderma harzianum* a nivel fermentador con un volumen de 5 L, con un modo de operación por lotes a pH 7, a 40°C y 224 rpm, utilizando quitina como sustrato produjo 0.391 U de quitinasas totales. Con *Talaromyces emersonii* se encontró que también en procesos por lotes, pero en un bioreactor de 8 L, produjo $0.45 \mu\text{mol/h/mL}$ /s con un pH 5 a una temperatura de 45°C y 200rpm.

Para el caso de *Talaromyces emersonii* utilizando células de *Aspergillus niger* a nivel fermentador tipo Batch con un volumen de 8 L, a pH 5, 45°C y 200 rpm produjo 17 U de quitinasas totales (Felse y Panda, 2000).

De todos los factores descritos, el pH y la temperatura han sido los más estudiados, en particular en fermentación en medio líquido. Experimentos con *Lecanicillium lecanii* (antes *Verticillium lecanii*) en matraces agitados con 200 mL de volumen de trabajo, utilizando como fuentes de carbono maltosa y polvo de camarón, y como fuente de nitrógeno peptona, la mayor actividad quitinasa (9.95 mU/ml) se obtuvo a 24°C y 150 rpm. Al escalar a bioreactor de 5L manteniendo la temperatura y probando 3 velocidades de agitación (75, 150, 225 rpm), se detectó la mayor actividad enzimática (9.26 mU/ml) al sexto día y con 150rpm. Al evaluar

el efecto del pH sobre la actividad quitinasa, se encontró que el pH de mayor actividad fue 4.0. Al realizar un segundo escalamiento (30 L), bajo las mismas condiciones de operación se alcanzó un valor máximo de 19.9 mU/ml después de seis días (Liu *et al.*, 2003).

Los esfuerzos de investigación en las últimas décadas han puesto de manifiesto la producción de enzimas quitinolíticas por hongos y no sólo por bacterias (Méndez *et al.*, 2007; Infante *et al.*, 2005). La temperatura también, es un factor importante donde la mayoría de los hongos entomopatógenos tiene un amplio intervalo, que va de 20 a 30 °C (Wraight, 2007), intervalo que permite la producción de enzimas quitinolíticas de interés para la degradación de la cutícula de insectos así como para la infección, crecimiento y esporulación del hongo.

Por otro lado, la producción de quitinasas (endoquitinasas y N-acetilhexosaminidasas) y proteasas, empleando la cepa 4519 de *Verticillium fungicola* var. *flavidum* a pH 5.0 con quitina de camarón fermentada (por bacterias ácido lácticas) como sustrato, fue evidente desde el inicio de la fermentación, las endoquitinasas se produjeron a las 12 horas a una concentración de 1.093 mU/mL, mientras que las N-acetilhexosaminidasas fueron detectadas a una concentración basal de 0.18 mU/mL. La máxima producción de endoquitinasas y N-acetilhexosaminidasas fue detectada hasta las 144 h, cuantificándose en 4.13 mU/mL y 6.83 mU/mL respectivamente. En fermentaciones realizadas a pH variable (en gradientes de 5 a 8 y controlando por 24h), la producción de endoquitinasas y N-acetilhexosaminidasas en cultivo sumergido mostró que las máximas concentraciones de N-acetilhexosaminidasas (9.63 mU/mL) y endoquitinasas (5.33 mU/mL) se obtuvieron a las 132 y 144 h respectivamente. Estos valores fueron 29 y 22.5 % mayores con respecto a las máximas obtenidas en las fermentaciones a pH controlado (Ramírez-Coutiño, 2009).

La producción de quitinasas, proteasas e hidrofobinas con *Lecanicillium lecanii* en cultivos líquido y sólido empleando diversas fuentes de carbono, mostró que para el cultivo sólido, utilizando como única fuente de carbono quitina coloidal, la mayor actividad específica de N-acetilhexosaminidasa fue 4.5 veces mayor, en comparación con la producida en un medio con fructosa. *L. lecanii* produjo N-

acetilhexosaminidasas, aún en cultivos adicionados con fructosa como única fuente de carbono, en las primeras horas de crecimiento. En cultivo sumergido con fructosa se observó que la producción máxima de N-acetilhexosaminidasa fue de 0.87 mU/ μ g de proteína, a las 24 h. Por otra parte, la producción de esta enzima en el cultivo adicionado con fructosa y quitina mostró un comportamiento con dos fases de producción, en la primera que corresponde al mayor crecimiento del hongo se observa también la mayor producción de la enzima (0.13 mU/ μ g de proteína) hasta las 48 horas. Durante la segunda fase, la actividad se incrementó ligeramente a 0.14 mU/ μ g de proteína, tal diferencia se atribuye al cambio en el metabolismo que el hongo realiza para asimilar cada una de las fuentes de carbono presentes (Rocha, 2009).

En los estudios sobre la producción de enzimas extracelulares en medio líquido con 17 aislados de *Beauveria bassiana* a una temperatura de 28°C por 8 días de cultivo, los aislados UB1 y UB2 fueron los que mostraron la máxima actividad quitinolítica (quitinasas totales), con 45.53 y 46.49 U/mL respectivamente, al cuarto día y empleando como sustrato quitina coloidal (Mustafa y Kaur, 2010).

Otro estudio con este tipo de fermentación, es el de Swiontek y Jankiewicz (2012). donde la producción de quitinasas por *Aspergillus niger* LOCK 62 fue de 22.5 mU/mL después de seis días de cultivo, utilizando como medio una mezcla de extracto de levadura y quitina coloidal como fuente de carbono y nitrógeno, cuyas condiciones de cultivo fueron 40 °C y pH de 6,

4. HIPÓTESIS

La producción de quitinasas en medio líquido con hongos entomo y fitopatógenos, estará en función de la cepa del hongo, el contenido y fuente de quitina, así como de la cantidad de proteína presente en la cutícula de los diferentes sustratos; además de las condiciones del cultivo. Debido a lo anterior y a las interacciones que se presentan entre los hongos entomopatógenos y los insectos, la producción de quitinasas podría incrementarse al usar cutícula de chapulín y *Beauveria bassiana*, mientras que para *Penicillium sp* la producción será menor debido a que el mecanismo de defensa en las plantas es distintos al de los insectos, considerando que las quitinasas son la segunda respuesta de estas. En cuanto a las condiciones ambientales, la producción de quitinasas podría favorecerse cuando el pH y temperatura del medio líquido sean similares a los valores reportados durante la infección del hongo sobre el insecto en su hábitat natural.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la producción de las quitinasas en cultivo líquido empleando hongos entomo y fitopatógenos con tres fuentes distintas de quitina como inductor.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la desproteización sobre la producción de las quitinasas (Nhasa y endoquitinasas) en medio líquido empleando hongos entomo y fitopatógenos con las tres fuentes de quitina.
- Evaluar el efecto del pH (3, 4, 5, 6,7) y la temperatura (20,25 y 30°C) en medio líquido empleando hongos entomo y fitopatógenos con las tres fuentes de quitina.
- Evaluar el efecto de la fuente de quitina de chapulín, escarabajo y camarón sobre la actividad endoquitinasa y Nhasa.
- Determinar los cambios de expresión de proteínas bajo los diferentes sistemas de producción de quitinasas, mediante estudios electroforéticos.

6. METODOLOGÍA

6.1. Etapa I. Acondicionamiento

6.1.2. Microorganismos.

Se empleó la cepa *Beauveria bassiana* 885.2, donada por el Dr. Octavio Loera (UAM-Iztapalapa) y la cepa *Penicillium sp* fue aislado de la fruta papaya con signos de antracnosis obtenida del mercado de Tuxtepec. Los aislados de *Penicillium sp* se sembraron en cajas Petri con medio sólido de PDA, posteriormente se extrajo micelio hasta que cubrió por completo la superficie del medio, utilizando perlas y Tween 80 estériles para obtener una solución stock de conidios para ser inoculado en matraces con un volumen de 100 mL en medio sólido de Saboraud. Para el caso de *Beauveria bassiana* se utilizó una solución stock para sembrar de igual manera en matraces con 100 mL de medio sólido Saboraud para obtener inóculos para las fermentaciones.

6.1.3. Preparación del inóculo para *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp*

Se tomó una alícuota de la suspensión en conservación, agregándola bajo condiciones asépticas a 100 mL de medio sólido Saboraud estéril. Lo anterior se realizó por octuplicado. Los matraces se incubaron hasta que el micelio cubrió por completo la superficie del medio a las temperaturas reportadas para cada hongo (25°C). Después de este tiempo se obtuvieron suspensiones de esporas o conidios, empleando una solución estéril de Tween 80 (0.02 % p/v). Las concentraciones de estas suspensiones se determinaron empleando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico, obteniendo títulos de 1×10^7 conidios/mL, que se conservaron en refrigeración a 2-4 °C máximo 5 días para ser utilizados como inóculos en las fermentaciones.

6.1.4. Sustratos

Las tres fuentes de quitina que se utilizaron como sustrato fueron, exoesqueleto de camarón (*Penaeus sp*) proveniente de la embalsadera en la ciudad de Alvarado, Veracruz; cutícula de chapulín (*Sphenarium purpurascens*) de la comunidad de

Santo Tomas Jalieza, Ocotlán, Oaxaca; y cutícula de escarabajo harinero (*Tenebrio molitor*) perteneciente al insectario de la Universidad del Papaloapan.

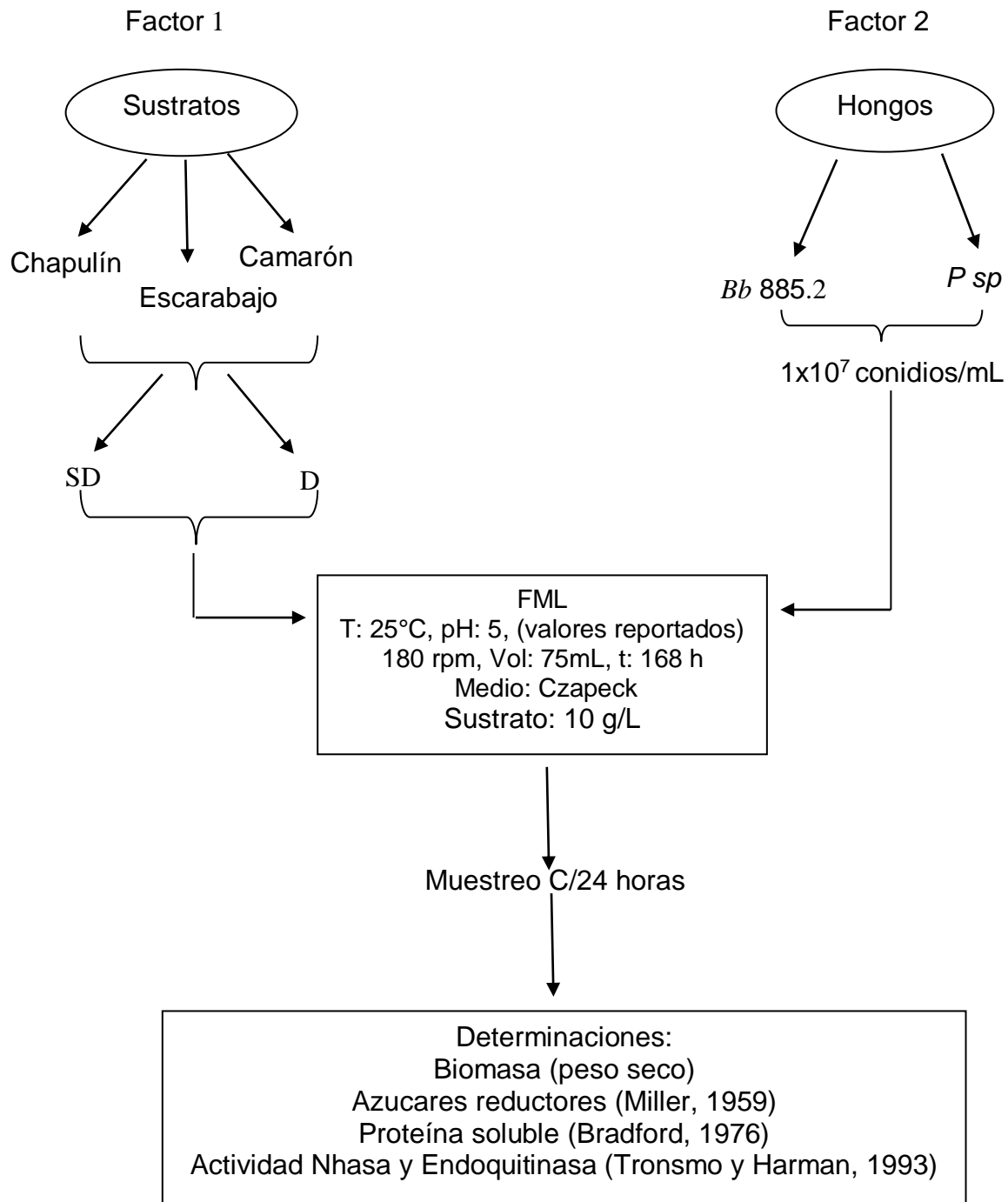
Para el caso de los insectos se contaba con los organismos completos, fue necesario hacer un tratamiento de desproteización para eliminar material proteico de la hemolinfa, para hacer más comparables las fermentaciones.

6.1.5. Desproteización de las cutículas de insectos y de crustáceo.

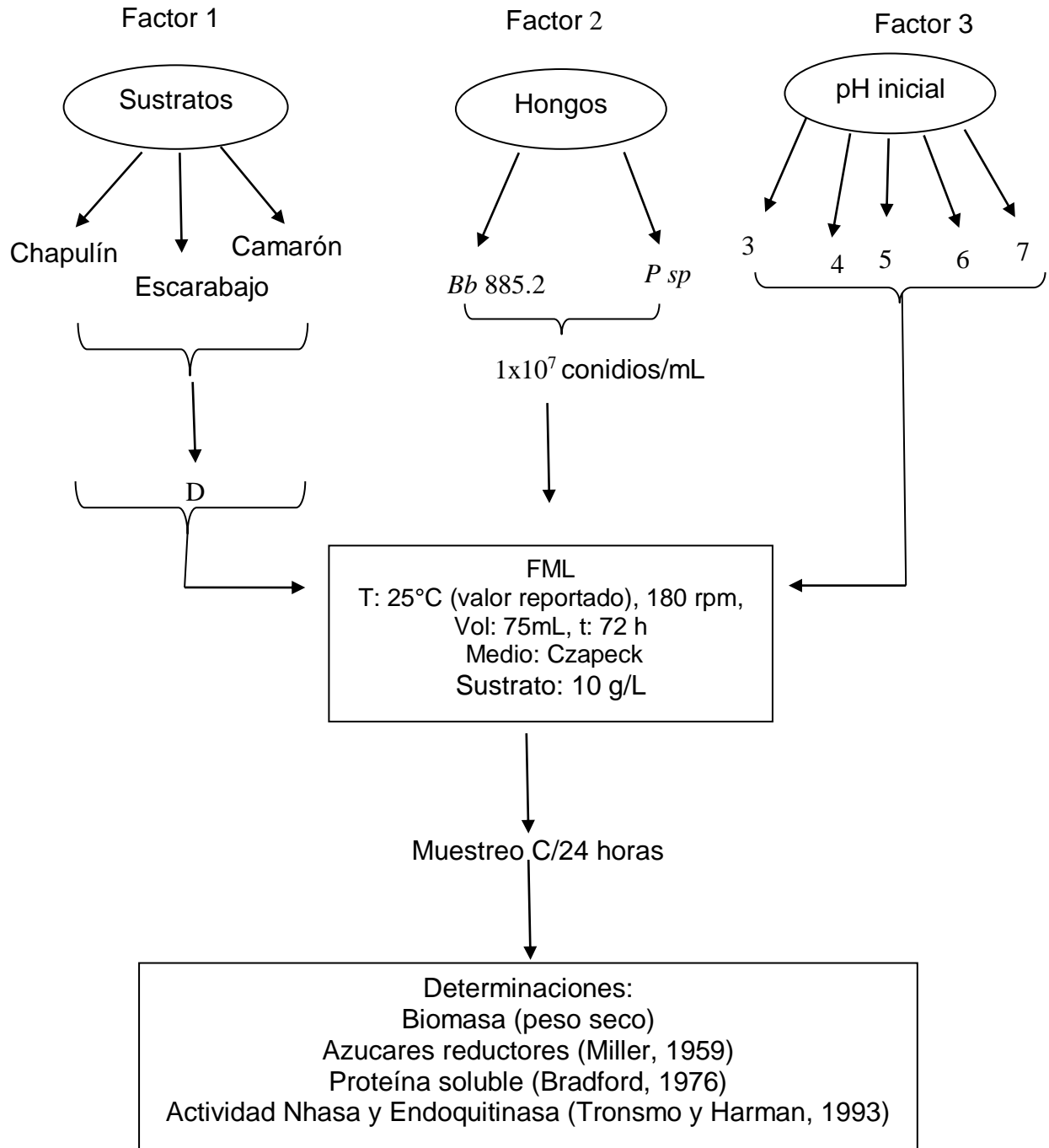
Se llevó a cabo con una solución de tetraborato de potasio al 1 % (p/v) modificando la técnica reportada por Montesinos (2012). La modificación consistió en secar hasta peso constante, 100 insectos a 50 °C por 12 horas, en un horno de convección forzada (Felisa modelo análogo tipo pT-100) para establecer los cálculos de la sal con base al peso seco de las cutículas. Posteriormente, se molieron en un procesador de alimentos (Hamilton Beach) para disminuir el tamaño de partícula (3-5 mm) y aumentar el área de contacto con la sal. Se realizaron suspensiones de tetraborato de potasio con las cutículas molidas y secas a una concentración de 7.1 % (p/v), las cuales se agitaron evaluando diversos periodos de extracción: (a) tratamientos intermitentes y secuenciales de 5 minutos, hasta alcanzar un periodo de 30 minutos, (b) periodo continuo de 30 minutos, (c) periodo continuo de 11 h y (d) tratamientos continuos de 30 min, 60 min, 90 min, y 120 minutos. Para el caso de las cutículas de camarón, previo al tratamiento con tetraborato, se lavaron con agua corriente para eliminar residuos y mal olor. Estas muestras después se secaron en horno de panificación (modelo HG4-120AI, dimensiones 1.20x1.0x1.50 cm) a 150 °C durante 20 min y posteriormente se molieron en un molino para nixtamal (marca Antarix línea ukura 5.7 /7 HP piedra número 6, modelo 5), debido al gran volumen de esta muestra para su procesamiento (aprox. 30 kg), alcanzando un tamaño de partícula de 3 mm. El lavado con el tetraborato de potasio se realizó de la misma manera que con las cutículas de insectos. Las muestras tratadas con la sal, se lavaron con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro, se filtraron al vacío con filtros de rayón-poliéster (50 %) puestos previamente a peso constante y nuevamente se dejaron secar en horno (Felisa modelo análogo tipo pT-100) durante 12 horas a una temperatura de 50°C. Las cutículas tratadas y secas se molieron en una licuadora

(Oster) y se homogeneizaron a 149 μm empleando un tamiz número 100, para ser empleadas en las fermentaciones.

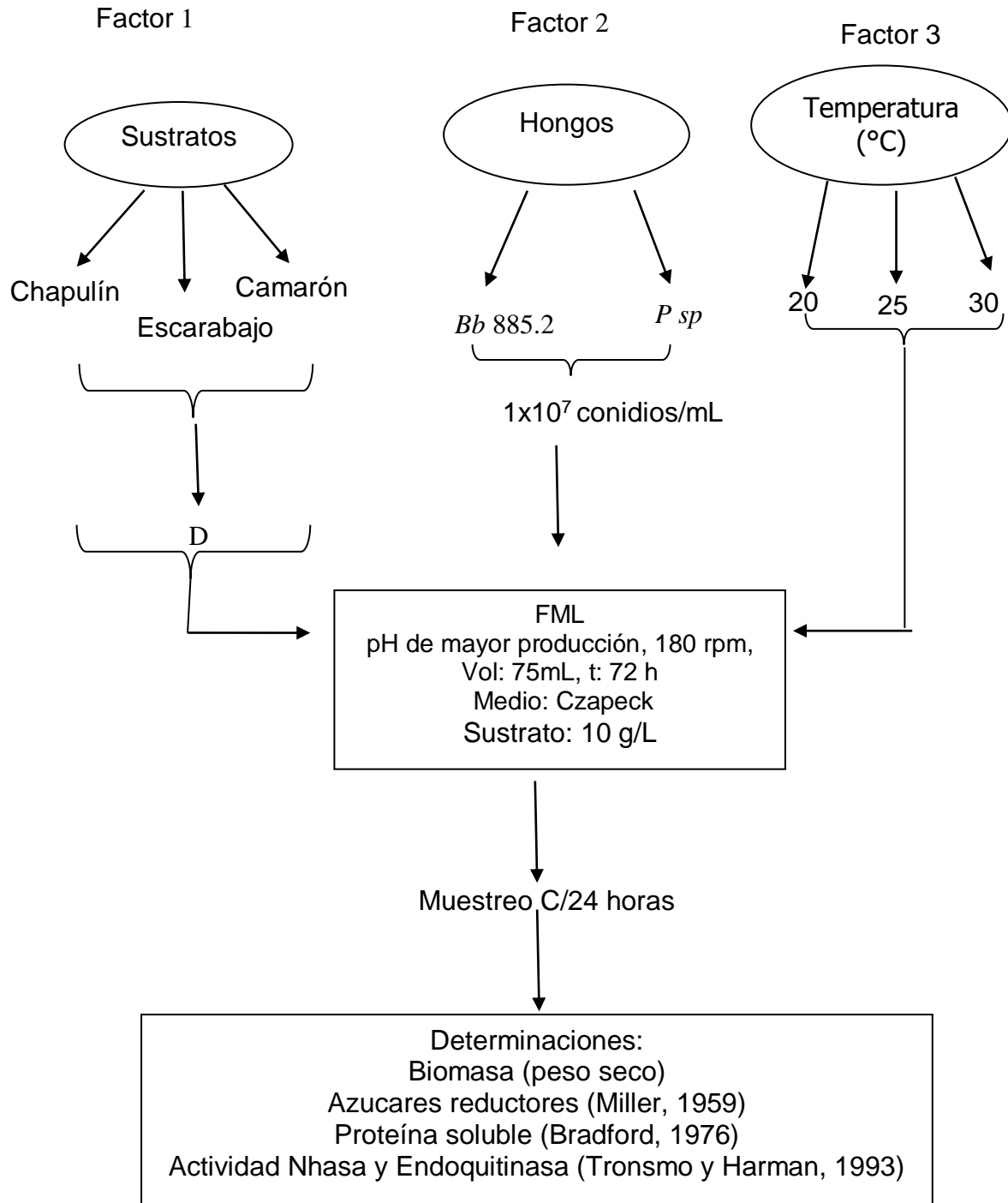
6.2. Etapa II. Efecto de la desproteínización sobre las actividades NHasa y endoquitinasa detectadas en fermentaciones en medio líquido.



6.3. Etapa III. Efecto de pH inicial sobre las actividades Nhasa y endoquitinasa detectadas en fermentaciones en medio líquido.



6.4. Etapa IV. Efecto de la temperatura sobre las actividades Nhasa y endoquitinasa en fermentaciones en medio líquido.



6.5. Fermentaciones en medio líquido para la producción de quitinasas

Las fermentaciones en medio líquido (FML) se realizaron con medio Czapeck modificado por Cira *et al*, 2002 (Anexo 1) por duplicado, en matraces Erlenmeyer de 125 mL con tapa de rosca, empleando un volumen de cultivo de 75 mL. Los matraces se mantuvieron con agitación constante a 180 rpm en incubadora orbital (Prendo, modelo INO 650V-7) a las temperaturas y tiempos evaluados (valores reportados y de mayor producción). El pH se ajustó inicialmente con soluciones de NaOH o HCl (0.01 N). El medio se esterilizó por calor húmedo durante 15 min a 121°C y una atmósfera de presión.

6.6. Desarrollo de la etapa II

Las fermentaciones testigo, se realizaron empleando las cutículas sin desproteínizar y desproteínizadas. Ambas se realizaron ajustando el pH inicial del cultivo a 5.0, temperatura 25°C (Mustafa y Kaur, 2010) a 180 rpm durante 168 horas, cabe mencionar que aparte de conocer el efecto de la desproteínización también se obtuvo el tiempo de mayor producción de estas enzimas para programar los siguientes experimentos. Se tomaron alícuotas cada 24 horas para su análisis inmediato.

6.7. Desarrollo de la etapa III

El efecto del pH sobre la producción de quitinasas se evaluó en un intervalo de 3 a 7, y manteniendo la temperatura en 25 °C para *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp*. El pH se ajustó al inicio empleando soluciones de NaOH y HCl (0.1N). El cultivo se agitó a 180 rpm durante el tiempo determinado de mayor producción de quitinasas.

6.8. Desarrollo de la etapa IV

Una vez determinado el tiempo y pH de mayor producción, se evaluaron 3 niveles de temperatura: 20, 25 y 30°C, con la misma agitación.

6.9. Obtención del extracto enzimático de las fermentaciones en medio líquido.

Las muestras que se tomaron cada 24h, por duplicado de 25 mL cada una, se centrifugaron a 4°C y 5580 rpm por 15 minutos (Thermo Scientific rotor TX 200). Se

tomó una porción de dicha fracción para medir las actividades quitinolíticas, proteína y producción de azúcares reductores inmediatamente. El extracto enzimático crudo restante se liofilizó (LABCONCO, Modelo 69132 EUA) para su posterior análisis electroforético.

6.9.1. Determinaciones

6.9.2. Biomasa

Las muestras provenientes de la fermentación se filtraron al vacío empleando filtros de rayón-poliéster (50 %) a un peso constante, posteriormente los filtros se colocaron en una estufa a 50 °C por 12 h. Después de este tiempo los filtros se pesaron en una balanza analítica (Adventurer Pro AV114C EUA) y la biomasa se determinó por la diferencia de peso.

6.9.2. Análisis de los extractos enzimáticos

6.9.2.1. Determinación de proteína

Después de la centrifugación, a cada sobrenadante se le determinó el contenido de proteína mediante la técnica de microensayo de Bradford (1976). La concentración de proteína se determinó empleando una curva de seroalbúmina bovina como estándar (Anexo 2 figura 48) leyendo a una longitud de onda de 595 nm (lector de microplacas iMARK BIO-RAD).

6.9.2.2. Determinación de actividad N-acetilhexosaminidasa.

A 200 µL de extracto enzimático crudo se le adicionaron 200 µL de amortiguador de citratos-fosfatos 0.2 M, pH 5.6 y posteriormente, 200 µL de solución de *p*-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida (pNAG) a concentración de 1.0 mg/mL. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C y 180 rpm durante una hora, posteriormente la reacción se detuvo adicionando 1 mL de NaOH 0.02 M. Después se agitó en un vórtex, y se le cuantificó la absorbancia a 400 nm (Espectrofotómetro JENWAY 6700 vis). La determinación de *p*-nitrofenol liberado se hizo mediante una curva patrón (Anexo2 figura 49). La actividad N-acetilhexosaminidasa se definió como la

cantidad de enzima que libera 1 μmol de *p*-nitrofenol por mL de enzima por minuto bajo las condiciones especificadas (Tronsmo y Harman 1993).

6.9.2.3. Determinación de actividad endoquitinasa

La actividad endoquitinasa se determinó empleando como sustrato 0.5 mL de una suspensión de quitina coloidal al 1 % (p/v) en solución amortiguadora de fosfatos 5 mM a pH 6.7 (Tronsmo y Harman 1993). Las muestras y testigos se hicieron reaccionar con proporciones iguales de sustrato, para el caso de las muestras estas se incubaron a 30 °C por 24 horas a 180 rpm, mientras que los testigos no se incubaron. Al finalizar la reacción, las muestras se llevaron a un volumen final de 6 mL agregando agua destilada y agitando vigorosamente, para leer la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm (Espectrofotómetro JENWAY 6700 vis). Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir la turbidez de una suspensión de quitina coloidal en un 5 % a 30 °C por 24 horas.

6.9.2.4 Determinación de azúcares reductores.

La concentración de azúcares reductores en cada muestra se determinó mediante el método del ácido dinitrosalicílico (Miller 1959) empleando una curva patrón de N-acetilglucosamina (Anexo 2 figura 50) a una longitud de onda de 575 nm (Espectrofotómetro JENWAY 6700 vis).

6.10. Análisis electroforéticos de los extractos enzimáticos

6.10.1. Determinación de la masa molecular relativa

Las proteínas presentes en los extractos enzimáticos previamente liofilizados y resuspendidos en amortiguador de corrimiento/carga, fueron analizados para determinarles su masa molecular relativa (M_r) por electroforesis mediante la técnica modificada de Laemmli (1970). Tal modificación consistió en correr los geles (14 y 15 % de acrilamida para el de separación y 4 % el de concentración) a un voltaje constante de 150 V por 1 hora y media. La cantidad de proteína total cargada en cada carril fue aproximadamente de 11.4 μg para extractos obtenidos por *Beauveria bassiana* a partir de sustratos sin desproteínizar, 12.1 μg ídem para

sustratos sin desproteinizar utilizando *Penicillium sp* y 17.1 µg para sustratos desproteinizados utilizando ambos hongos.

El análisis densitométrico de las bandas proteicas se realizó empleando los valores de movilidad relativa (Rf) de proteínas conocidas de dos marcadores de masa molecular empleados como estándares (Anexo 4, figura 51 Marcador de Bio- Rad, figura 52 Marcador de Fermentas). El primer marcador (M1) contenía Miosina (209 kDa), β-galactosidasa (124 kDa), seroalbúmina bovina (80 kDa), ovoalbúmina (49.1 kDa), Anhidrasa carbónica (34.8 kDa), inhibidor de tripsina de soya (34.8 kDa), lisozima (20.6 kDa) y Aprotinina (7.1 kDa) (Anexo 4, Tabla 12). El segundo marcador (M2) no presenta la identidad de las proteínas sólo los pesos moleculares los cuales fueron; 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26,17 y 10 kDa (Anexo 4 tabla 13). La tinción de los geles se realizó de dos maneras, la primera empleando azul de Coomassie y posteriormente tinción de plata (Ramírez-Coronel, 2000).

6.11. Análisis estadísticos

El análisis estadístico, se llevó acabo con un modelo factorial para los tratamientos, una prueba de Fisher para las medias teniendo como variables de respuesta las actividades enzimática NHasa y endoquitinasas, mediante el software MINITAB versión 16.1

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Desproteínización parcial de los sustratos.

En este trabajo la desproteínización consistió primeramente en realizar los lavados secuenciales como lo reportado (figura 2) donde se observa que para el caso del exoesqueleto de camarón la mayor desproteínización sucedió a los 5 min con un 8 %, cabe mencionar que la desproteínización es menor para el caso del camarón debido a que las muestras no tenían la parte interna del cadáver solo las cascarras o cutícula que recubren el cuerpo es por ello que son bajos los porcentajes, también debido al tiempo en que la muestra está expuesta a la solución salina. Este perfil difiere del de los insectos, ya que la mayor desproteínización (69 %) se obtuvo para la cutícula de chapulín a los 10 min, mientras que en el escarabajo la desproteínización fue de 32% en el mismo tiempo que la de chapulín. Cabe señalar que en este proceso, sólo se cuantificó la proteína soluble

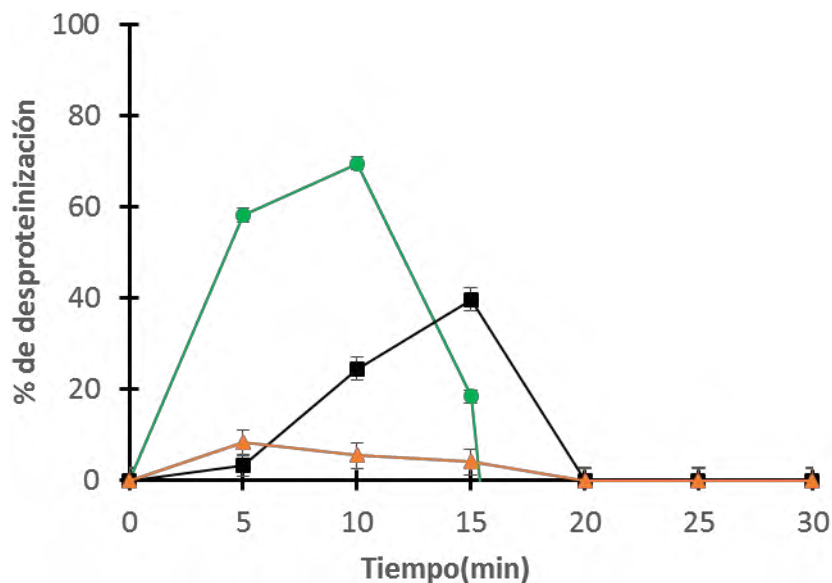


Figura 2. Extracción de proteína soluble empleando tetraborato de potasio al 1% (p/v) a 30 min intermitentes. Cutícula de chapulín (●), escarabajo (■), camarón (▲).

Como no se logró la completa desproteínización para los tres sustratos, se planteó el siguiente experimento: las tres cutículas se desproteínizaron durante 30 min continuos (figura 3), observándose que para el caso del camarón se logró una mayor desproteínización de hasta un 91%, es decir 11.8 veces más que en el experimento anterior, esto debido al contacto por más tiempo entre la sal y la muestra; para el caso de chapulín de 69 % paso a 86% de desproteínización, esto es 1.2 veces más que en los 30 minutos intermitentes; finalmente el escarabajo de 32% aumentó a 44% de desproteínización, siendo 1.3 veces mayor que en el experimento anterior lo que se atribuye a la presencia de pigmentos en la cutícula del escarabajo, lo que dificultaría la extracción de proteínas aunado al poco tiempo de exposición entre la proteína y la sal.

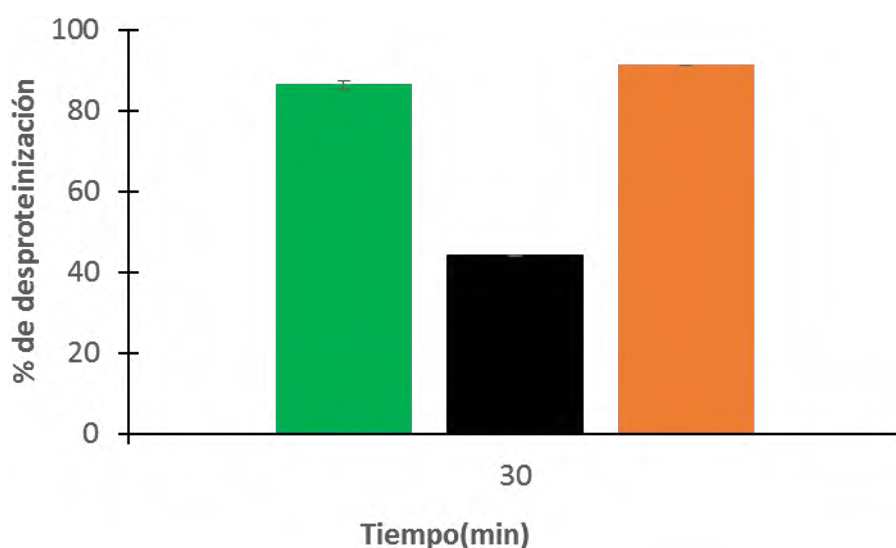


Figura 3. Extracción de proteína soluble empleando tetraborato de potasio al 1%(p/v) a 30 minutos continuos. Cutícula de chapulín (■), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (■).

Es por ello que se realizó un tercer lavado por 11 horas continuas como lo reporta Montesinos (2012) para las tres cutículas (figura 4). Para el caso de camarón y chapulín los porcentajes se mantuvieron constantes, mientras que para el

escarabajo aumentó a 71% asumiendo que fue la mayor desproteínización lograda con estos sustratos.

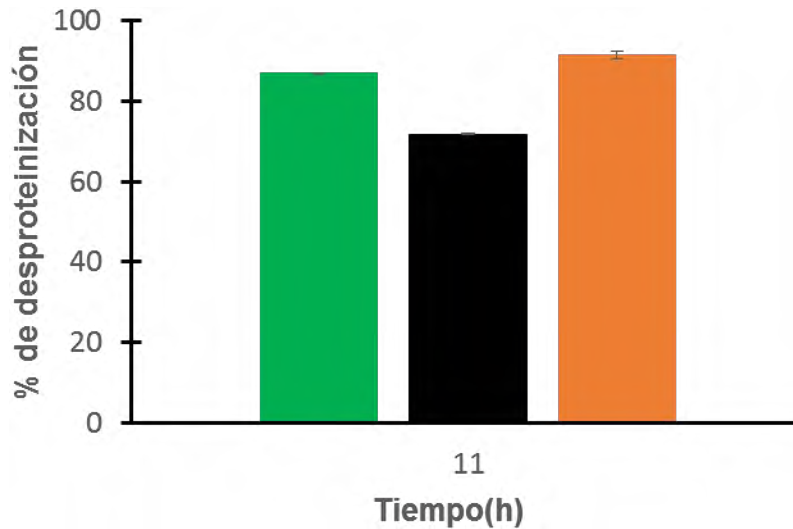


Figura 4. Extracción de proteína soluble empleando tetraborato de potasio al 1%(p/v) a 11 horas continuas. Cutícula de chapulín (■), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (■).

Esto llevó a proponer otro experimento que consintió en una cinética a partir de la media hora de exposición de la muestra con la solución salina, tomando muestras cada 30 minutos hasta alcanzar las 11 horas, lo anterior sólo se realizó para la cutícula del escarabajo, que fue la del menor porcentaje de desproteínización (figura 4). Los resultados mostraron que después de una hora de tratamiento se obtenía el mismo porcentaje de desproteínización que a las 11 horas, es por ello que otra cinética se llevó hasta las dos horas para corroborar que se mantenía constante (figura 5).

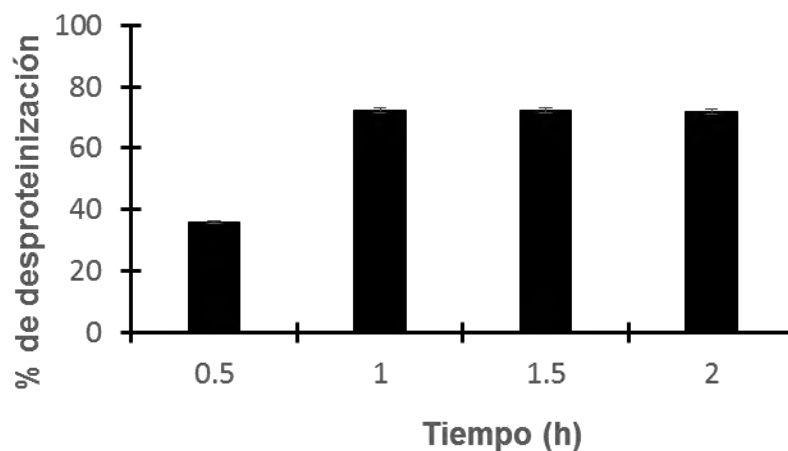


Figura 5. Extracción de proteína soluble de la cutícula de escarabajo evaluando el tiempo de exposición con tetraborato de potasio al 1% cada 30 minutos hasta las 2 horas (■).

Sin embargo para determinar el tiempo exacto se realizó una cinética donde se tomaron muestras cada 5 min después de los primeros 30 min de exposición entre la muestra expuesta y la solución salina (figura 6) hasta alcanzar una hora, tiempo que señala el experimento anterior se logra la máxima desproteínezación.

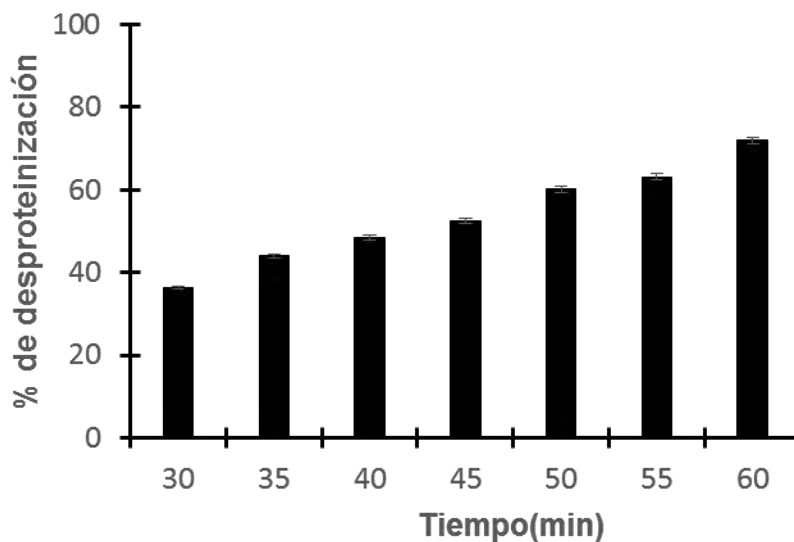


Figura 6. Extracción de proteína soluble empleando tetraborato de potasio al 1% cada 5 minutos hasta una hora con la cutícula de escarabajo (■).

Se observó que después de una hora el máximo valor de la desproteínización fue de 70 %. Para homogeneizar el tratamiento, todas las cutículas se desproteínizaron durante una hora (figura 7), lo que permitió alcanzar la mayor extracción de proteína con los tres sustratos, reducir el tiempo del lavado y ahorrar hasta cuatro veces la cantidad de la sal y el consumo de agua en comparación con la técnica reportada. No obstante, no se logró el 100 % de remoción de proteína soluble con la cutícula del escarabajo debido a que posiblemente las proteínas remanentes estaban asociadas a otros componentes como pigmentos, ceras y lípidos con los cuales el tetraborato no tuvo afinidad.

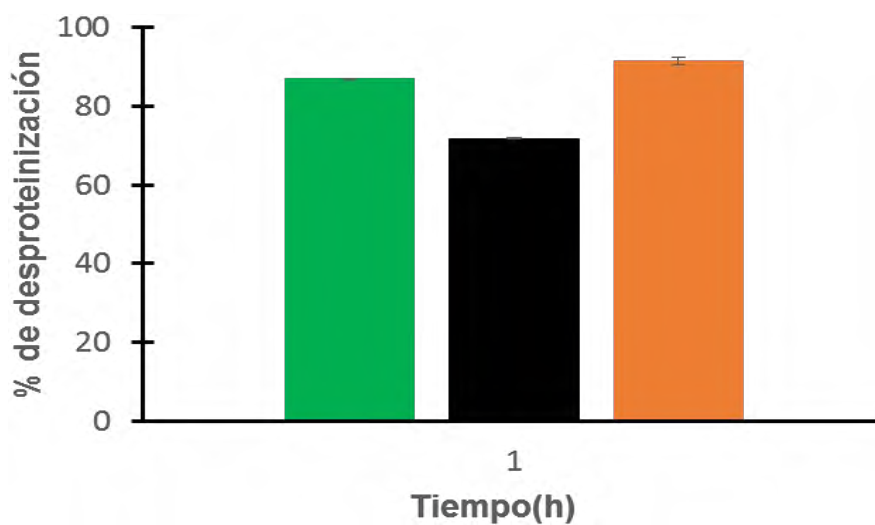


Figura 7. Extracción de proteína soluble empleando tetraborato de potasio al 1%(p/v) a 1 horas continua. Cutícula de chapulín (■), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (■).

Para la cutícula de chapulín no hay reportes en la literatura sobre la desproteínización, para el caso del escarabajo la desproteínización se encontró en 1.2 veces mayor en comparación con lo reportado por Liu *et al*, 2012, para el camarón estos valores están 1.2 veces mayores en comparación con lo reportado por Ramírez-Coutiño, 2009 y Castañeda, 2011.

La finalidad de la desproteínización es eliminar la mayor cantidad de proteína adherida al polímero para evitar la expresión de proteasas asumiendo que éstas son las primeras en expresarse al momento de la infección de los hongos sobre los insectos, así también las lipasas entre otras. Asumiendo que para las proteínas de la cutícula de chapulín los segmentos hidrofóbicos tuvieron que ser más largos para poder agregarse y precipitarse antes que aquellas con pequeños o pocos segmentos hidrofóbicos. Cabe mencionar que cuando una sal es adicionada al sistema, el agua solvata los iones y a medida que la concentración salina aumenta, el agua que rodea a la proteína es secuestrada, exponiendo eventualmente las porciones hidrofóbicas. Es entonces cuando los segmentos hidrofóbicos de una molécula proteínica pueden interactuar con los de otra resultando en la agregación de éstas. La precipitación ocurre por la neutralización de las cargas de superficie por la sal, por la reducción de la actividad química de la proteína y por la disminución efectiva de la concentración de agua, siendo este el fenómeno denominado “salting out” (Prado *et al*, 1999).

7.2. Fermentación en medio líquido con *Beauveria bassiana*.

7.2.1. Efecto de la desproteínización sobre las actividades de Nhasa y endoquitinasas a pH y temperatura reportados.

Estos experimentos se realizaron hasta las 168 horas para determinar el tiempo de mayor producción de las enzimas y se observó si la desproteínización afecta el metabolismo, con base en ello evaluar los parámetros de pH y temperatura. Los resultados de las **fermentaciones en medio líquido con sustratos sin desproteínizar** a pH 5 y a temperatura de 25°C (valores reportados) (figura 8) indican que *Beauveria bassiana*, produjo la mayor concentración volumétrica de quitinasas, 3.29 mU/mL y 690 mU/mL, exoquitinasas (NHasas) y endoquitinasas respectivamente, cuando se utilizó cutícula de chapulín como sustrato. Para el caso de **las fermentaciones en medio líquido con sustratos desproteínizados** indicaron, que la cutícula de chapulín es un buen inductor para la expresión de quitinasas mostrando un incremento de 1.9 veces para las exoquitinasas (de 3.39 mU/mL a 8.89 mU/mL) y de 2.7 veces para las endoquitinasas (de 690 mU/mL a

1375 mU/mL) en comparación con el sustrato sin desproteínizar. Ambas enzimas se expresaron a las 48 horas independientemente del sustrato utilizado atribuyéndolo a que la desproteínización no afecta el metabolismo del hongo (figura 8).

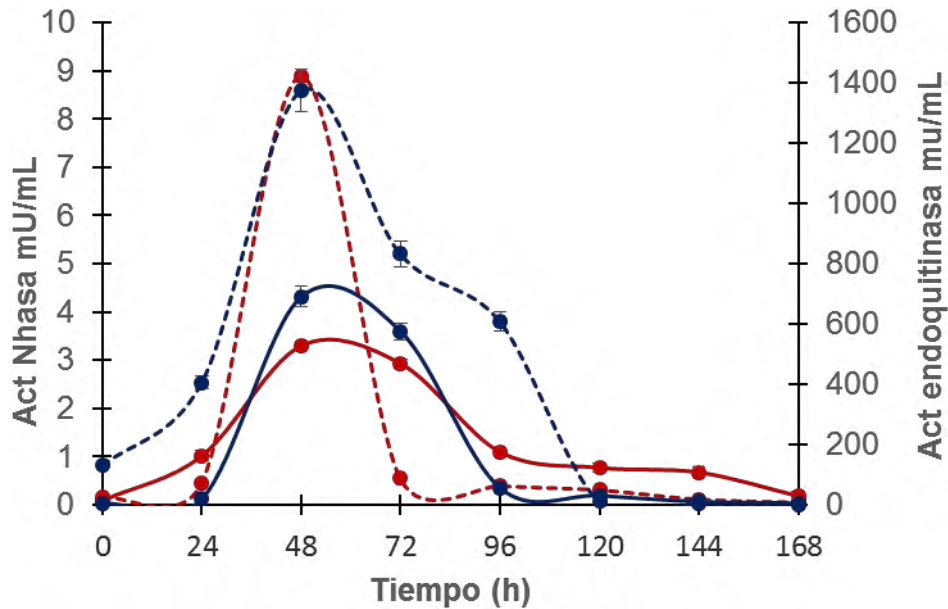


Figura 8. Actividades enzimáticas NHasa con proteína (—●—) y sin proteína (---●---). Endoquitinasa con proteína (—▲—) y sin proteína (---▲---) producidas por *Beauveria bassiana* utilizando cutícula de chapulín.

En las fermentaciones se observó que ambas enzimas se expresan desde el inicio en el caso de cutícula de chapulín con 0.32 mU/mL y las endoquitinasa con 20mU/mL (fig. 8), indicando que son constitutivas. Estos resultados sugieren la existencia de una relación evolutiva entre el hongo y los insectos (Blackwell, 2009).

Para el caso de las fermentaciones utilizando escarabajo sin desproteínizar, señala una concentración volumétrica de 2.11 mU/mL para las NHasas, mientras que con los sustratos desproteínizados se incrementó a 7.97 mU/mL, esto es 3.7 veces mayor en comparación con los sustratos sin desproteínizar. Para el caso de las endoquitinasa se obtuvieron valores de 675 mU/mL con sustratos sin desproteínizar, mientras que con los sustratos desproteínizados se obtuvieron

valores de 901 mU/mL esto representa un valor de 1.3 veces mayor en comparación con los sustratos sin desproteinizar. Ambas enzimas se expresaron a las 48 horas independientemente del sustrato utilizado atribuyéndolo a que la desproteinización no afecta el metabolismo del hongo (figura 9).

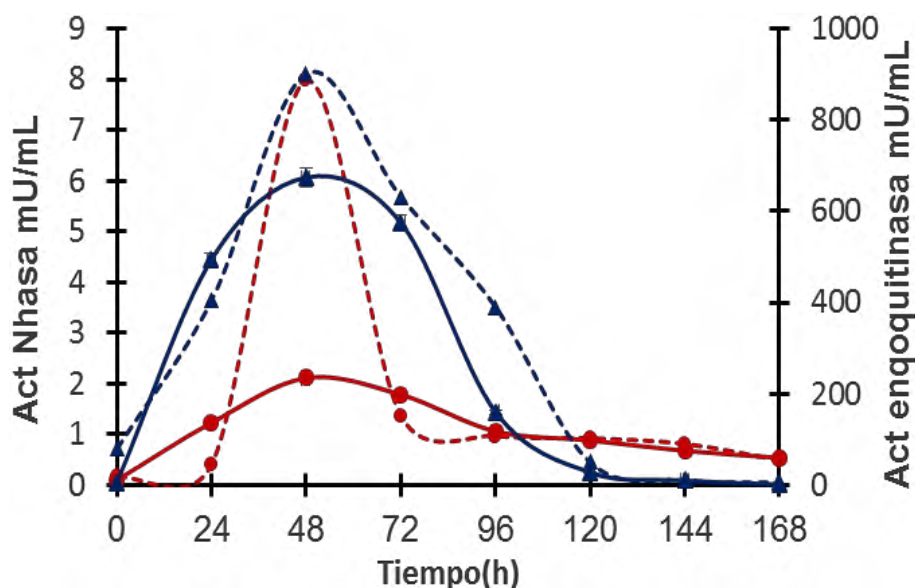


Figura 9. Actividades enzimáticas NHasa con proteína (—●—) y sin proteína (---●---). Endoquitinasa con proteína (—▲—) y sin proteína (---▲---) producidas por *Beauveria bassiana* utilizando cutícula de escarabajo.

De manera generalizada se observó que el efecto del tiempo de desproteinización sobre la producción de enzimas incrementó la concentración volumétrica. No obstante los incrementos que se obtuvieron con camarón desproteinizado, no fueron mayores a los obtenidos con las cutículas de insectos.

Los resultados de las fermentaciones utilizando exoesqueleto de camarón sin desproteinizar como sustrato, presentaron concentraciones volumétricas de 0.56 mU/mL para las NHasas y 30 mU/mL para las endoquitinasas, mientras que para los sustratos desproteinizados las concentraciones fueron de 6.68 mU/mL para las NHasa y 850 mU/mL para las endoquitinasas. Siendo las NHasa producidas con sustratos desproteinizados 11.9 veces mayor en comparación con los sustratos sin desproteinizar y 28 veces mayor las endoquitinasas con respecto a las producidas

con sustratos sin desproteínizar, estos valores se detectaron a las 48 horas de la fermentación (figura 10).

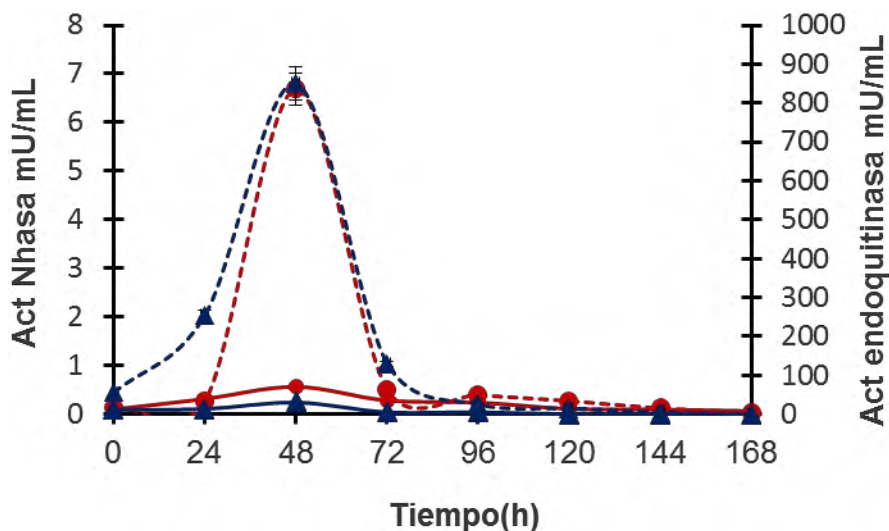


Figura 10. Actividades enzimáticas NHasa con proteína (—●—) y sin proteína (- -●- -). Endoquitinasa con proteína (—▲—) y sin proteína (- -▲- -) producidas por *Beauveria bassiana* utilizando exoesqueleto de camarón.

Cabe mencionar que la concentración volumétrica de estas dos enzimas, producidas por *Beauveria bassiana*, fue del mismo orden de magnitud con los sustratos de insectos (figuras 8 y 9), siendo 235 veces mayores en comparación con el camarón.

Montesinos (2012), reportó una concentración volumétrica de 250 mU/mL a las 36 horas con quitina desproteínizada de escarabajo como fuente de carbono y nitrógeno y utilizando *Beauveria bassiana*. Este valor representó un incremento de 27 veces para las Nhasas, en comparación con lo reportado en este trabajo, lo que es atribuible al pH empleado.

Por otro lado, en un estudio sobre la producción de quitinasas, proteasas e hidrofobinas con *Lecanicillium lecanii* en cultivos líquido y sólido utilizando diversas fuentes de carbono, se observó que para el cultivo sumergido con fructosa, la producción máxima de N-acetilhexosaminidasa fue de 0.87 mU/μg de proteína, a las 24 h. El cultivo adicionado con fructosa y quitina mostró un

comportamiento similar en cuanto a crecimiento, con dos fases de producción. La primera que corresponde al mayor crecimiento del hongo observándose también la mayor producción de N-acetilhexosaminidasa (0.13 mU/ μ g de proteína) y que duró hasta las 48 h. Durante la segunda, la actividad se incrementó hasta 0.14 mU/ μ g de proteína, la diferencia en la producción fue atribuible al cambio en el metabolismo del hongo para asimilar las diferentes fuentes de carbono (Rocha, 2009).

La actividad enzimática se detectó a partir del tiempo cero para el caso de chapulín con una actividad de 0.32 mU/mL para las NHasa y endoquitinasas con 20mU/mL, para el escarabajo los valores fueron de 0.09 y 5 mU/mL para las NHasa y endoquitinasa respectivamente y por último de 0.09 y 11 mU/mL para las NHasa y endoquitinasa con sustrato de camarón, no observándose en las gráficas debido a que son valores bajos, asumiendo que son enzimas de tipo constitutivas, incrementándose a las 24 horas hasta alcanzar la mayor producción con los tres sustratos a las 48 horas.

Las mayores concentraciones de N-acetilglucosamina (NAG) y proteína soluble, se observaron a las 48 horas independientemente del sustrato empleado (figuras 11, 12 y 13), coincidiendo con la mayor producción enzimática y de biomasa (figura 14) para las fermentaciones con sustratos sin desproteínizar. Para las fermentaciones con sustratos desproteínizados el cambio en la concentración de biomasa fue mínimo lo que indicaría que las fuentes de carbono y nitrógeno se emplearon principalmente en la síntesis de enzimas (figura 18). La concentración de NAG se relacionó directamente a acción de las Nhasas. (15, 16 y 17).

.

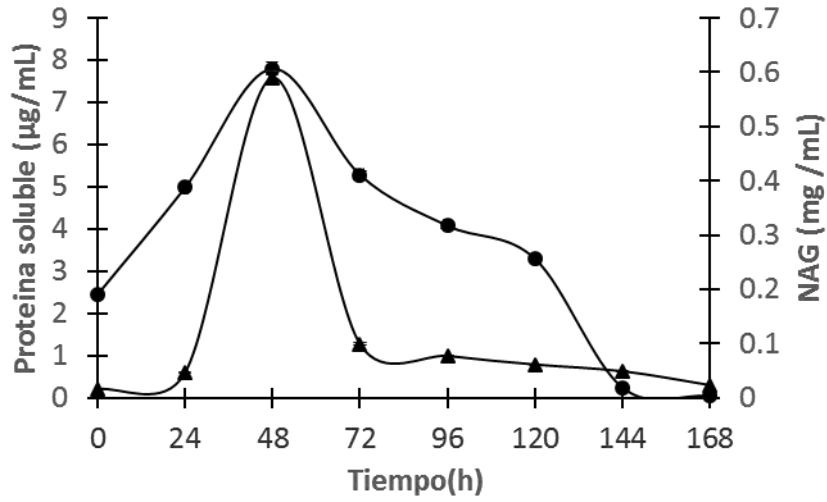


Figura 11. Proteína soluble (●) y NAG (▲) de los extractos producidos por *Beauveria bassiana* utilizando cutícula de chapulín sin desproteinizar.

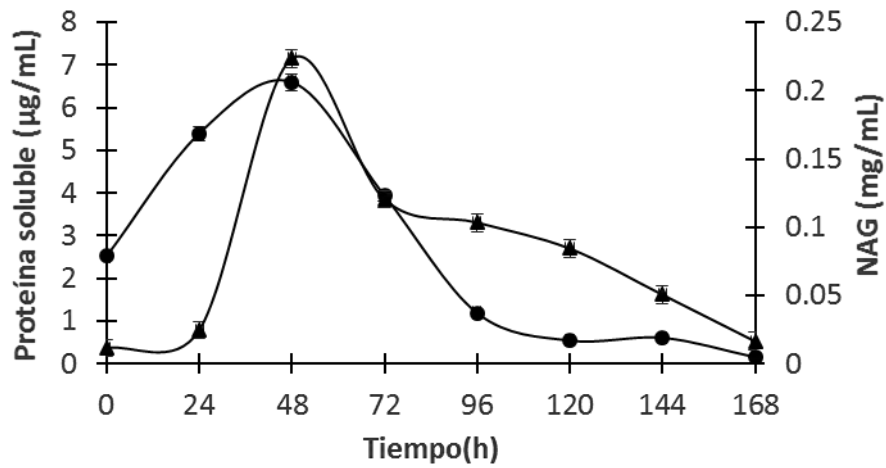


Figura 12. Proteína soluble (●) y NAG (▲) de los extractos producidos por *Beauveria bassiana* utilizando cutícula de escarabajo sin desproteinizar.

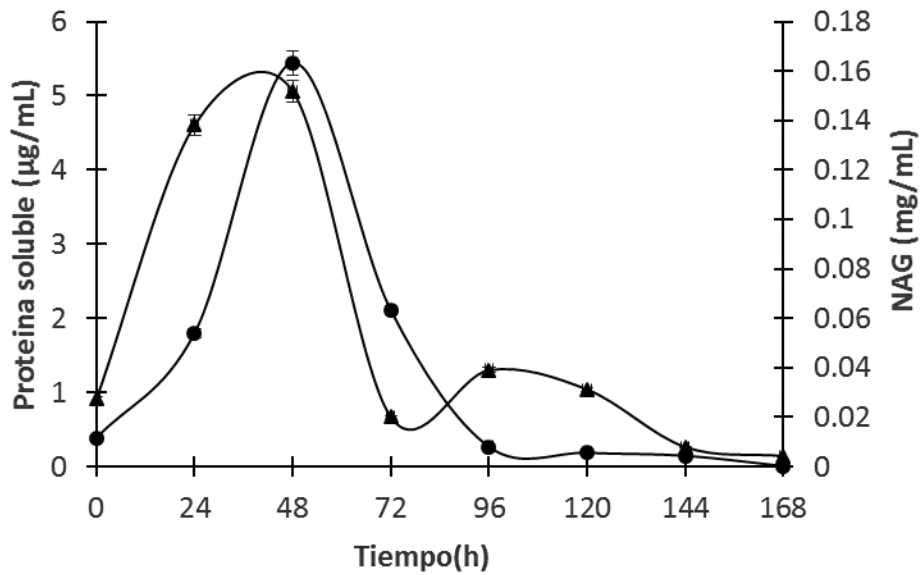


Figura 13. Proteína soluble (●) y NAG (▲) de los extractos producidos por *Beauveria bassiana* utilizando exoesqueleto de camarón sin desproteinizar.

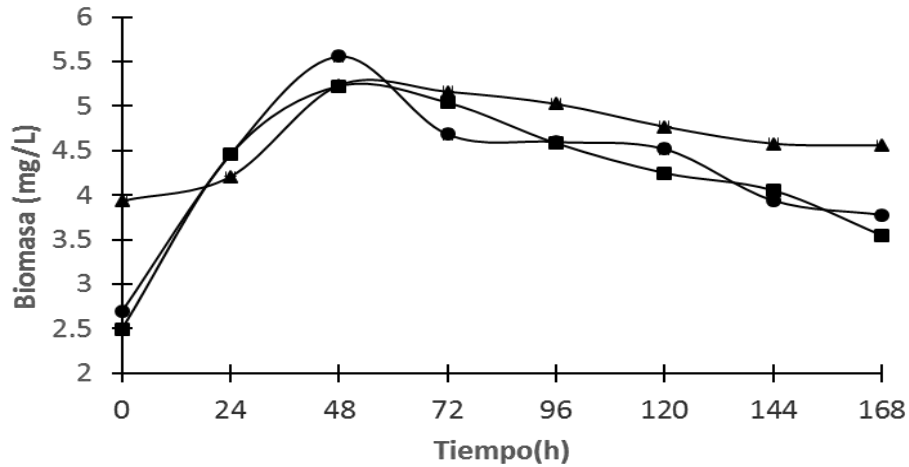


Figura 14. Producción de biomasa por *Beauveria bassiana* con cutícula de chapulín (●), escarabajo (■) y exoesqueleto de camarón (▲) sin desproteinizar.

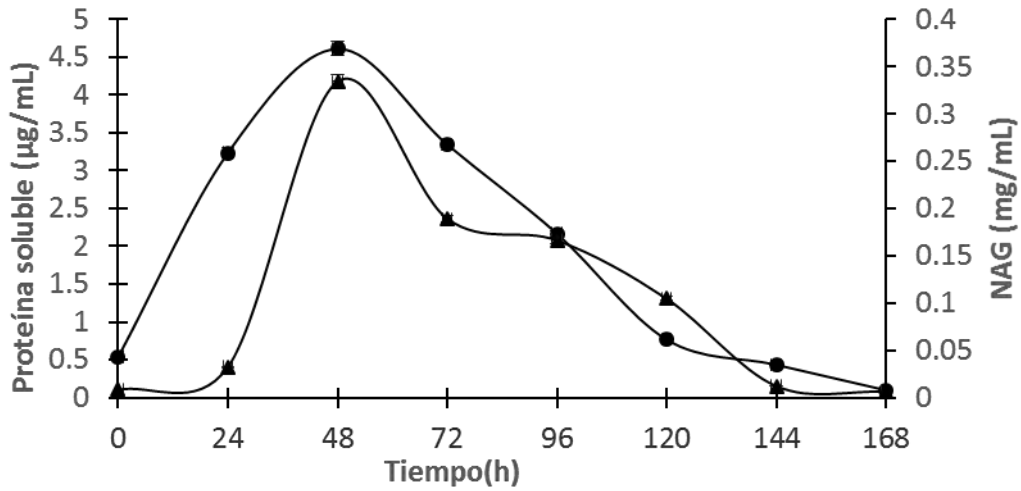


Figura 15. Proteína soluble (●) y NAG (▲) de los extractos producidos por *Beauveria bassiana* utilizando cutícula de chapulín desproteinizada.

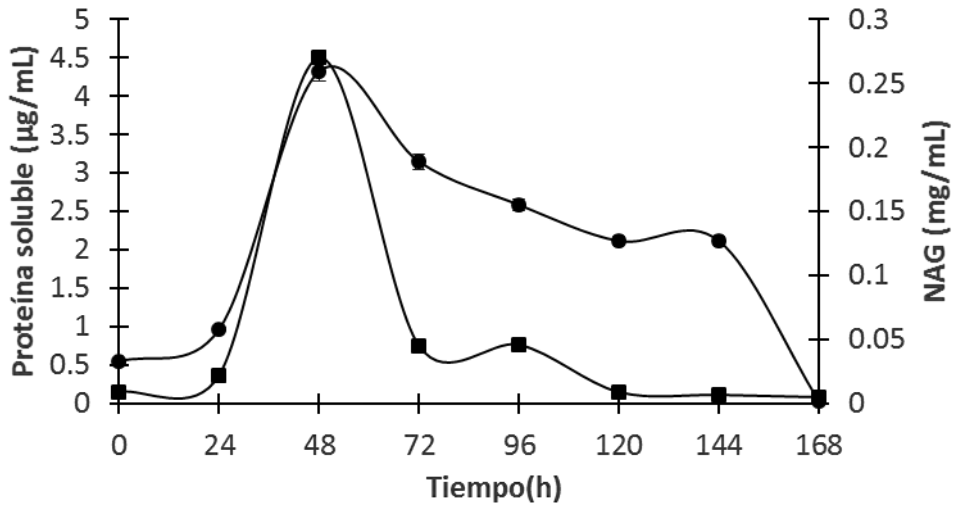


Figura 16. Proteína soluble (●) y NAG (▲) de los extractos producidos por *Beauveria bassiana* utilizando cutícula de escarabajo desproteinizada.

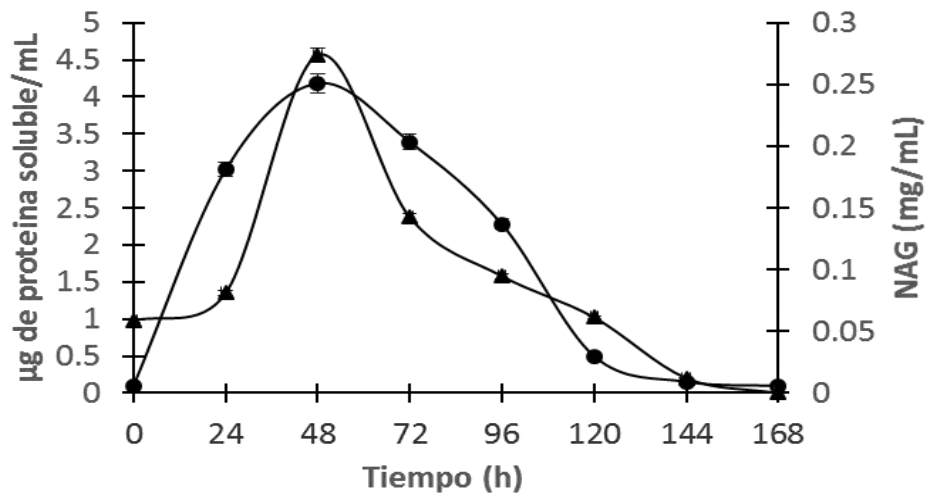


Figura 17. Proteína soluble (●) y NAG (▲) de los extractos producidos por *Beauveria bassiana* utilizando exoesqueleto de camarón desproteinizado.

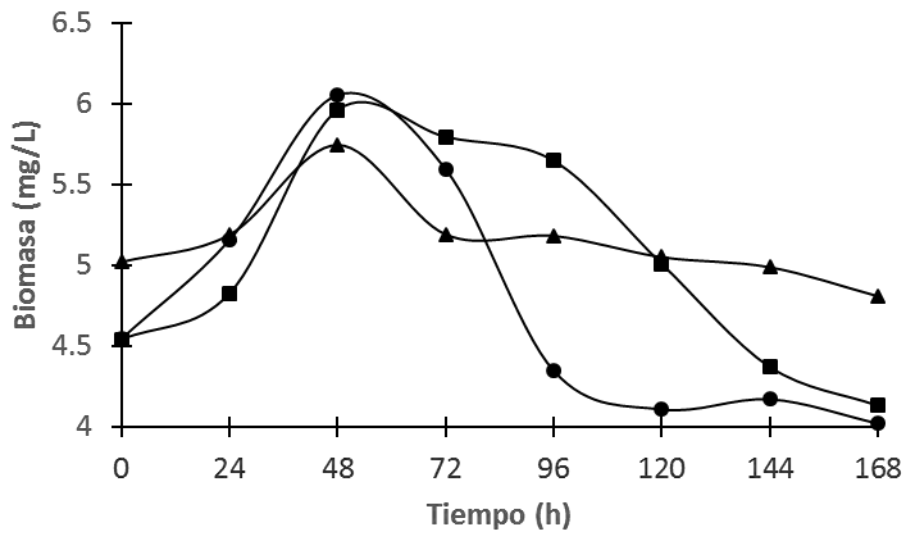


Figura 18. Producción de biomasa por *Beauveria bassiana* con cutícula de chapulín (●), cutícula de escarabajo (■) y exoesqueleto de camarón (▲) desproteinizados.

7.2.2 .Efecto de la desproteínización en el crecimiento de *Beauveria bassiana*.

En general, el metabolismo de los hongos filamentosos se divide en metabolismo primario y secundario. El metabolismo primario consiste en el resultado de varias reacciones químicas catalizadas por las enzimas y proporciona a las células la energía y las macromoléculas indispensables para la construcción de las células tales como las proteínas, los polímeros estructurales y el ADN. A partir de este metabolismo se pueden obtener un gran número de moléculas (**enzimas**, toxinas, ácidos orgánicos) de interés industrial.

El metabolismo secundario regenera sustancias de menor interés desde el punto de vista económico para las células, se produce cuando el crecimiento apical de los mohos disminuye, este metabolismo está limitado a algunas especies, a diferencia del metabolismo primario que es común para varios microorganismos.

En este sentido, *Beauveria bassiana* presentó un metabolismo primario con los sustratos de chapulín, escarabajo y camarón (figuras 7,8 y 9).

Por otra parte, se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ) para *Beauveria bassiana* sobre los sustratos sin desproteínizar a partir de la pendiente de las curvas de producción de biomasa. La mayor velocidad específica de crecimiento fue con cutícula de chapulín (0.059 h^{-1}). Observándose que para el hongo utilizando como sustrato la cutícula de los insectos la velocidad de crecimiento fue similar, esto debido a que este hongo por ser entomopatógeno, tiene más afinidad hacia sustratos provenientes de insectos, reconociendo secuencias específicas para la expresión de varias enzimas, como las quitinasas (tabla 3). Con los sustratos desproteínizados se determinó nuevamente la velocidad específica de crecimiento (μ) para *Beauveria bassiana* de la misma manera que los primeros experimentos. Al igual que con el sustrato sin desproteínizar, la mayor velocidad específica de crecimiento a valores de pH y temperatura reportados (tabla 3), se obtuvo con cutícula de chapulín desproteínizados (0.031 h^{-1}). De igual manera el hongo tuvo un metabolismo primario, encontrándose en la parte exponencial productos de interés como las enzimas (figura 15 y 20).

Tabla 3. Efecto de la desproteínización en velocidad específica de crecimiento de *Beauveria bassiana*.

Sustratos *SD	μ (h⁻¹)	Sustratos *D	μ (h⁻¹)
Chapulín	0.059±0.002	Chapulín	0.031±0.001
Escarabajo	0.056±0.001	Escarabajo	0.029±0.003
Camarón	0.027±0.002	Camarón	0.015±0.001

Las velocidades específicas de crecimiento fueron menores con los tres sustratos desproteinizados en comparación con los sustratos sin desproteínizar, nuevamente los valores correspondientes con los sustratos de insectos fueron similares. El crecimiento fue menor y por ende el contenido remanente de proteína en el sustrato apenas lo asimiló el hongo para crecer (Guillen *et al*, 1988). Por otra parte, como la desproteínización está asociada a otras estructuras como minerales, lípidos y pigmentos entre otros compuestos, al dejarse expuestos sitios en la cadena del polímero, el hongo pudo adherirse y tuvo que empezar a secretar quitinasas para hidrolizar estas secuencias, por lo que la desproteínización permitió la inducción de quitinasas pero redujo el crecimiento (Ramírez-Coutiño, 2009).

El hongo, con sustratos desproteinizados de insectos, probablemente encontró un mayor número de secuencias de reconocimiento y zonas de hidrólisis, evidenciándose por las actividades volumétricas detectadas para estos sustratos (Ramírez-Coutiño, 2009).

En el trabajo de Montesinos (2012) utilizando la misma cepa y como fuente de carbono y nitrógeno cutícula de escarabajo desproteínizado, la velocidad de crecimiento fue 0.064 (h⁻¹), siendo este valor similar al obtenido en este trabajo ya que se utilizó el mismo hongo y un sustrato similar.

7.2.3. Efecto del pH sobre las actividades NHasa y endoquitinasas con *Beauveria bassiana*

El cultivo sumergido para la producción de quitinasas fue elegido debido a que es más fácil la recuperación de enzimas extracelulares, micelio y esporas, se controlan mejor la agitación, aireación, oxígeno disuelto, niveles de inóculo, pH y temperatura, parámetros que más afectan la producción de enzimas en este tipo de cultivos (Ramírez-Coutiño, 2009). En este trabajo los parámetros estudiados fueron pH y temperatura.

Se ha establecido como una generalidad que la acción de las endoquitinasas debe preceder a la de las N-acetilhexosaminidasas (Nhasas), dado que los productos de reacción de las primeras sirven como sustrato para las segundas, sin embargo, bajo las condiciones empleadas en este trabajo, se observó, desde el inicio de la fermentación a pH 5.0 (valor reportado) la presencia de Nhasas a una concentración volumétrica de 0.09 , y 11 mU/mL para las endoquitinasa estos son los valores más bajos que se obtuvieron en las fermentaciones anteriores lo cual indicaría que son constitutivas (Ramírez-Coutiño, 2009).

En este trabajo cuando se modificó el pH inicial del medio de 3 a 7, se consideró trabajar con dos unidades por arriba y dos unidades por debajo del valor reportado (pH 5.0). No se decidió ir hacia un pH más ácido, ya que en condiciones naturales de antagonismo y en procesos de infección del hongo, no se han reportado valores de pH menores a 3. Por otra parte, las concentraciones volumétricas de endoquitinasas y Nhasas, fueron mayores a pH 3 (figuras 19 y 20), para este hongo. Los valores obtenidos de enzimas quitinolíticas con las cutículas de insectos fueron 4 veces mayores en comparación con los obtenidos con exoesqueleto de camarón y 3.2 veces mayores con respecto al pH 5 reportado por Montesinos, (2012).

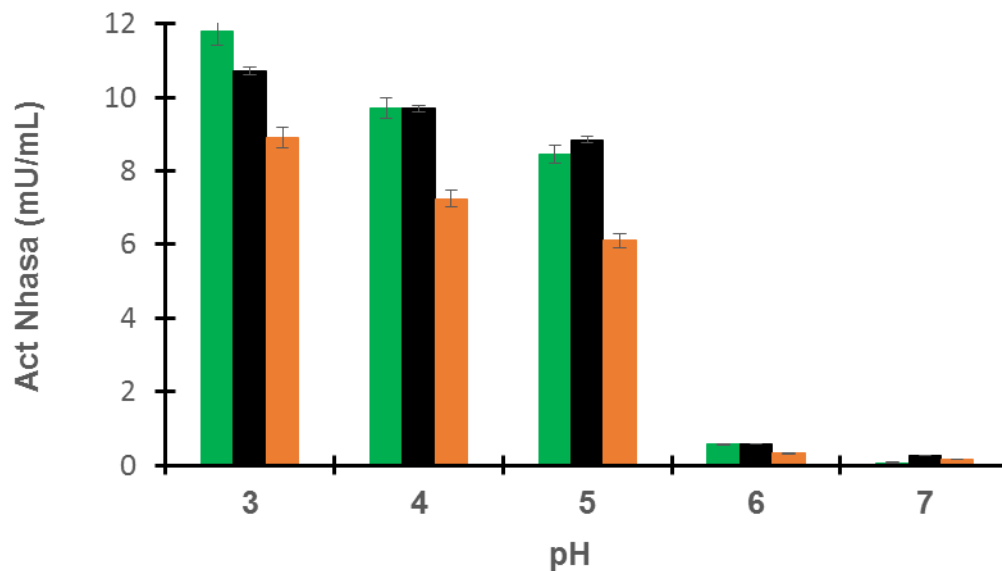


Figura 19. Producción de NHasa de los extractos producidos por *Beauveria bassiana* con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (■), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (■) en función del pH inicial

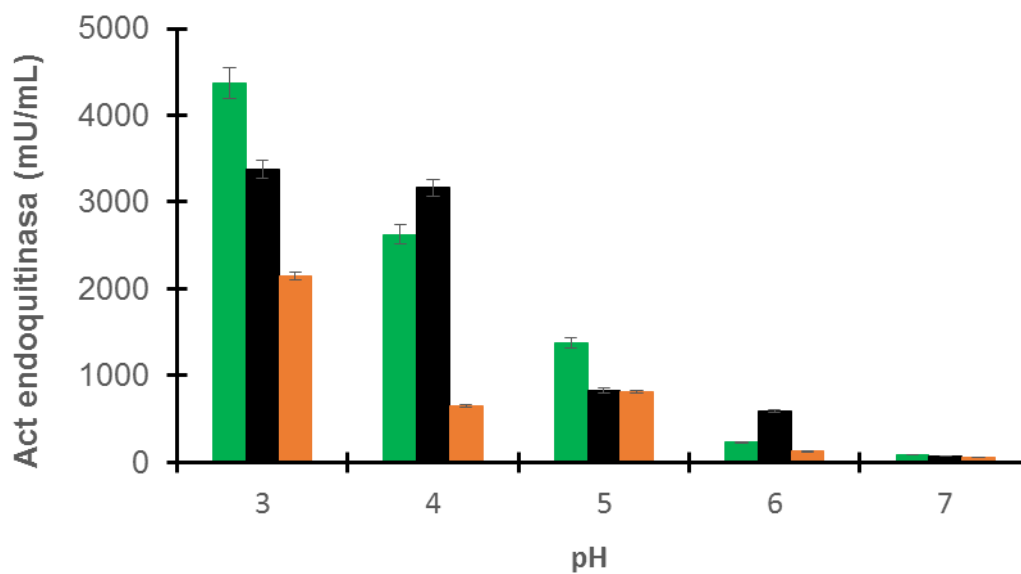


Figura 20. Producción de endoquitinasas de los extractos de producidos por *Beauveria bassiana* con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (■), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (■) en función del pH inicial

Cabe mencionar el concepto de homeostasis, que es la habilidad de los organismos de regular su pH intracelular. El pH intracelular (pHi) es mantenido por la modulación de la bomba de protones celulares primarios así como los sistemas antiporto K^+ /protones y Na^+ /protones. Este proceso se referencia como la respuesta a tolerancia ácida (ATR) y se activa con valores de pH entre 5 y 6, pero puede proteger contra valores de pH más ácidos (pH 3-4), cuando la homeostasis de pH falla. El proceso de ATR incluye dos fases; la primera llamada choque preácido es inducida a pH 5.8 e involucra la producción de un sistema de homeostasis de pH, que es funcional a valores de pH externos por debajo de 4. La segunda fase ocurre mientras sigue un cambio a pH de 4.5 o por debajo y se llama choque postácido. Durante esta fase son sintetizadas 43 proteínas de choque ácido (ASPs), se cree que algunas de estas son responsables de la prevención o reparación del daño ácido a macromoléculas. Aunque ambas fases de la respuesta ATR se requieren para una mayor protección contra valores de pH demasiado bajos, sólo un periodo breve (15 min) de exposición a pH 4.3 permite a las células tolerar un cambio subsecuente de pH a 3.3. El sistema ATR es sensible a inhibidores externos de la síntesis de proteínas, mientras que la homeostasis del pH constitutiva clásica no se ve afectada por inhibidores de la síntesis de proteínas y solo es eficaz a valores de pH 4 (Moat y Foster, 1995).

Resulta interesante saber por qué hubo una mayor producción de quitinasas a un pH 3 y no al valor reportado, cabe mencionar que los microorganismos crecen a un pH determinado, sin embargo, muchos se desarrollan en un amplio intervalo. Se ha reportado desde hace mucho tiempo que los microorganismos responden a una disminución del pH interno, mediante la producción de enzimas que convierten los metabolitos ácidos a neutros, reguladas por los genes *Cad A* que codifica para la lisinadescarboxilasa y el gen *Adi* que codifica para la arginadescarboxilasa encargada de aumentar el pH ácido externo.(Moat y Foster, 1995). De esta manera, a pH 3 hubo una mayor producción de enzimas de tipo descarboxilasas y que bajo una reacción en cascada permitieron la expresión de quitinasas. Así el hongo al estar a un pH de 3, tuvo un estrés mayor que a los otros valores de pH, respondió más rápido y según lo descrito anteriormente, el pH

del medio no se mantuvo constante, sino que aumentó de manera que probablemente se encontró al final de la fermentación al pH de crecimiento.

En cuanto a los perfiles de producción para las NHasas, se observó que son similares independientemente del sustrato. Mientras, que las endoquitinasas difieren en función del sustrato obteniéndose concentraciones volumétricas de dos órdenes de magnitud mayores en comparación con las de NHasas, lo que indicaría el grado de especificidad de las endoquitinasas, ya que reconocen enlaces internos en la cadena de la quitina.

Las concentraciones volumétricas para las Nhasas coinciden con la máxima liberación de proteína soluble, asumiendo que ésta se relaciona con la concentración de las enzimas, mientras que la producción de azúcares reductores (figuras 21 y 22) se relaciona con la de N-acetilglucosamina, monómero que se libera por la acción de las Nhasas. Para la biomasa (figura 23) la mayor producción se obtuvo con cutícula de chapulín, sin embargo no hubo un crecimiento apreciable en los tres sustratos, por lo que se asume que toda la fuente de carbono y nitrógeno se empleó en la producción de enzimas.

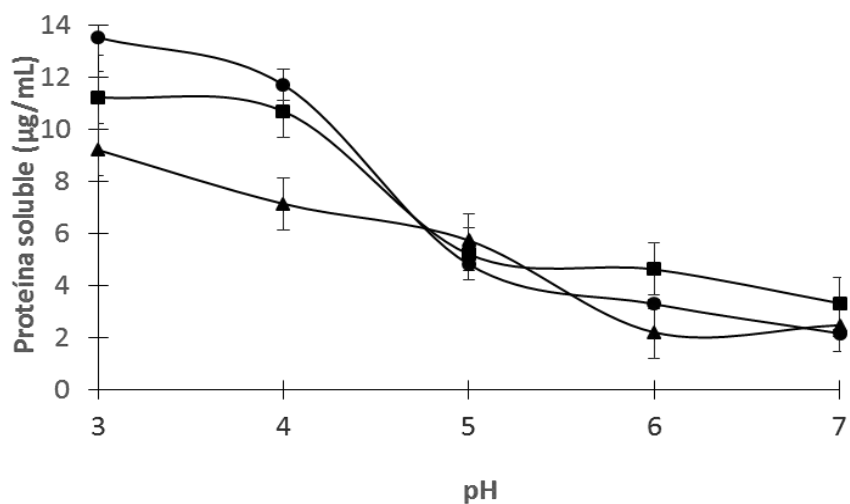


Figura 21. Proteína soluble de los extractos producidos por *Beauveria bassiana* con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (●), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (▲) en función del pH inicial

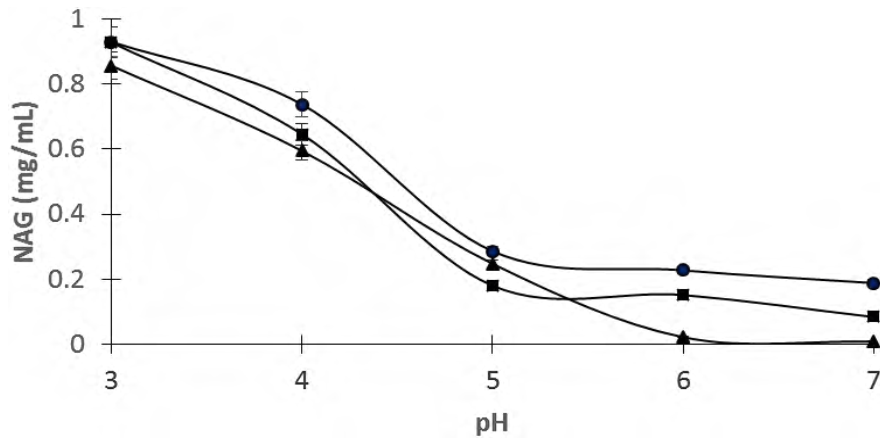


Figura 22. Producción de NAG de los extractos producidos por *Beauveria bassiana* con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (●), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (▲) en función del pH inicial

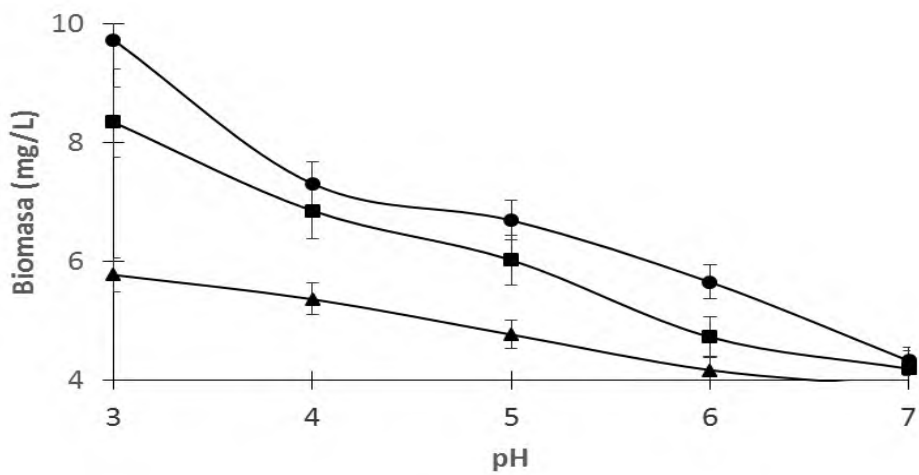


Figura 23. Producción de Biomasa de *Beauveria bassiana* con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (●), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (▲) en función del pH inicial

Hay reportes para la producción de quitinasas con *Lecanicillium lecanii*, (*Verticillium lecanii*) en fermentación líquida, en matraz agitado y biorreactor (5 L) usando como fuente de carbono maltosa, polvo de camarón y como fuente de nitrógeno peptona, la mayor actividad de quitinasas (9.95 mU/ml) se obtuvo a 24°C, con 200 mL y 150 rpm. La actividad de las quitinasas se modificó en función de la variación del pH en el medio en un intervalo de 2 a 9, con un pH de mayor actividad igual a 4. Al escalar el proceso en un bioreactor de 30 L, manteniendo las mismas condiciones de operación se alcanzó un valor máximo de 19.9 mU/ml después de seis días (Liu *et al*, 2003).

En el presente trabajo se alcanzó una concentración volumétrica en matraz agitado igual a 4370 y 11.7 mU/mL para endoquitinasas y exoquitinasas respectivamente a 180 rpm, y pH 3 utilizando cutícula de chapulín, estos incrementos se atribuyen a que el chapulín es un insecto plaga siendo reconocido por el hongo entomopatógeno debido a su relación que data de millones de años (Blackwell, 2003), no así para el escarabajo y el camarón ya que el hongo no ha tenido contacto directo con estos organismos en la naturaleza.

En comparación con lo reportado (Liu *et al* 2003), para matraz agitado y bioreactor de 5 L representó un incremento de 452 veces y de 226 veces para un bioreactor de 30 L, lo que representó un incremento de 452 veces, asumiendo este incremento a la fuente de carbono y nitrógeno así como al hongo utilizado ya que el pH y temperatura fueron similares.

La producción de quitinasas (endoquitinasas y N-acetilhexosaminidasas) y proteasas con *Verticillium fungicola* 4519 var. *flavidum* se reportaron a un pH constante de 5.0 empleando cutícula de camarón fermentada como sustrato. Las endoquitinasas se detectaron a las 12 h a una concentración de 1.093 mU/mL, mientras que las N-acetilhexosaminidasas fueron detectadas a una concentración basal de 0.18 mU/mL. La máxima producción de endoquitinasas y N-acetilhexosaminidasas se detectó a las 144 h, siendo de 4.13 U/mL y 6.83 mU/ml respectivamente (Ramírez-Coutiño, 2009).

La producción de endoquitinasas y N-acetilhexosaminidasas en cultivo sumergido con pH variable, de 5 a 8 mostró que las máximas concentraciones de N-

acetilhexosaminidasas (9.63 mU/mL) y endoquitinasas (5.33 mU/mL) se obtuvieron a las 132 y 144 h respectivamente. Estos valores fueron 29 y 22.5 % mayores con respecto a las máximas obtenidas en las fermentaciones con el pH controlado (Ramírez-Coutiño, 2009). En este trabajo se alcanzaron las máximas concentraciones volumétricas a las 48 horas, por lo que se asume que el hongo micopatógeno demora para liberar estas enzimas a diferencia del entomopatógeno que las expresa más. La mayor producción enzimática se obtuvo a pH ácido (3), empleando cutícula de chapulín para el caso de las Nhasas, cuya concentración volumétrica fue 1.7 veces mayor y para las endoquitinasas 1.08 en comparación con lo reportado, para un hongo micopatógeno (Ramírez-Coutiño, 2009).

7.2.4. Crecimiento de *Beauveria bassiana* a pH variable

La mayor velocidad de crecimiento se observó a pH 3 en todos los sustratos coincidiendo con el máximo de producción de quitinasas, observando la mayor velocidad específica de crecimiento para cutícula de chapulín (0.088 h^{-1}) siendo 1.3 veces mayor en comparación con la de escarabajo y 3.3 veces mayor en comparación con exoesqueleto de camarón, también los valores fueron mayores que los obtenidos con el de pH reportado, mientras que a los otros valores de pH la velocidad específica de crecimiento disminuyó, asumiendo que hay un intervalo en donde el hongo reconoce secuencias específicas para la producción de estas enzimas (tabla 5).

Tabla 5. Efecto del pH inicial en la velocidad específica de crecimiento de *Beauveria bassiana*

pH	Sustratos		
	Chapulín	Escarabajo	Camarón
	μ (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
3	0.088±0.001	0.063±0.001	0.026±0.004
4	0.046±0.002	0.061±0.001	0.021±0.001
5	0.046±0.001	0.029±0.003	0.017±0.002
6	0.037±0.004	0.037±0.005	0.014±0.002
7	0.019±0.003	0.019±0.004	0.027±0.003

Al igual que a los valores reportados, el hongo tuvo un metabolismo primario asumiendo que en éste de acuerdo a la literatura, es donde se expresan productos de interés como toxinas y enzimas (Moat y Foster, 1995) (figura 25).

García *et al.* (2013), reportaron una velocidad específica de crecimiento para *Beauveria bassiana* de 0.036 h⁻¹ y 0.039 h⁻¹ en fermentación en medio líquido a nivel matraz y bioreactor respectivamente, utilizando quitina como sustrato con un valor de pH de 5.4 y una temperatura de 28 °C, siendo en este trabajo 2.4 y 2.2 veces mayor a los valores obtenidos al pH y temperatura reportados, estos valores son comparados con cutícula de chapulín, sustrato con el que se obtuvo el mayor valor de μ , asumiendo que la cepa utilizada en este trabajo es diferente, al igual el sustrato no fue quitina pura sino proveniente de insectos y crustáceo, el pH fue más ácido y la temperatura de 25°C .

7.2.5. Efecto de la temperatura sobre las actividades NHasa y endoquitinasas con *Beauveria bassiana*

La producción de exoquitinasas y endoquitinasas en este trabajo mostró que al utilizar cutícula de chapulín como sustrato a 25° C y pH 3 se obtuvieron las mayores actividades volumétricas a las 48 horas, cuyos valores fueron de 9.19 y 4545 mU/mL, respectivamente (figuras 24 y 25), los valores fueron similares para la quitina proveniente de cutícula de escarabajo; por otro lado se observó un incremento de 1.2 y 1.7 veces en comparación con las Nhasas y endoquitinasas producidas con exoesqueleto de camarón (8.12 mU/mL y 2670 mU/mL) a las 48 horas (figura 26).

Cuando la temperatura se ajustó a 20 y 30 °C, disminuyeron las concentraciones volumétricas para todos los sustratos obteniéndose valores similares con las cutículas de insectos (figuras 24 y 25). La temperatura de mayor producción fue 25 °C, mostrando un incremento de hasta 22 veces en comparación con las otras temperaturas. El tiempo de mayor actividad enzimática (48 h) coincidió con el de máxima producción de NAG, proteína soluble y biomasa.

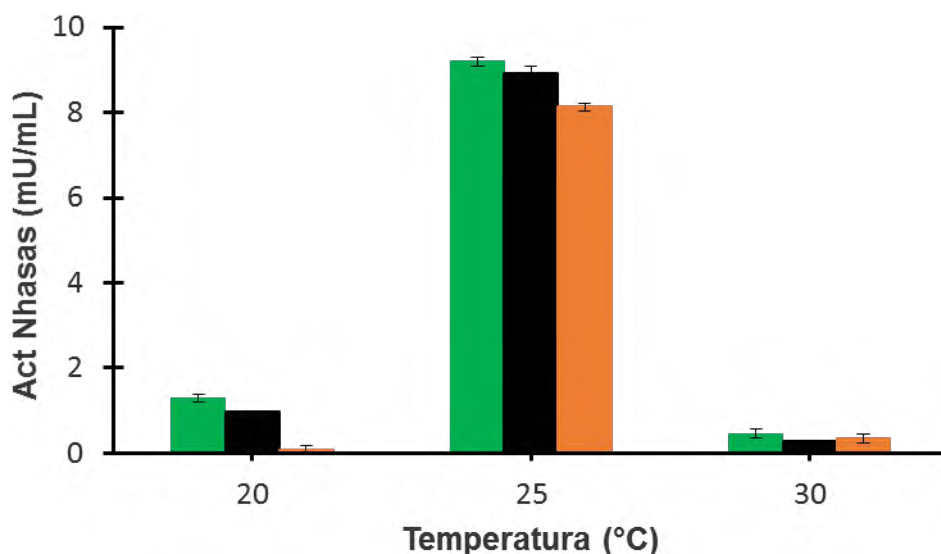


Figura 24. Producción de Nhasas de los extractos producidos por *Beauveria bassiana* empleando sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (■), cutícula de escarabajo (■) y exoesqueleto de camarón (■) en función de la temperatura.

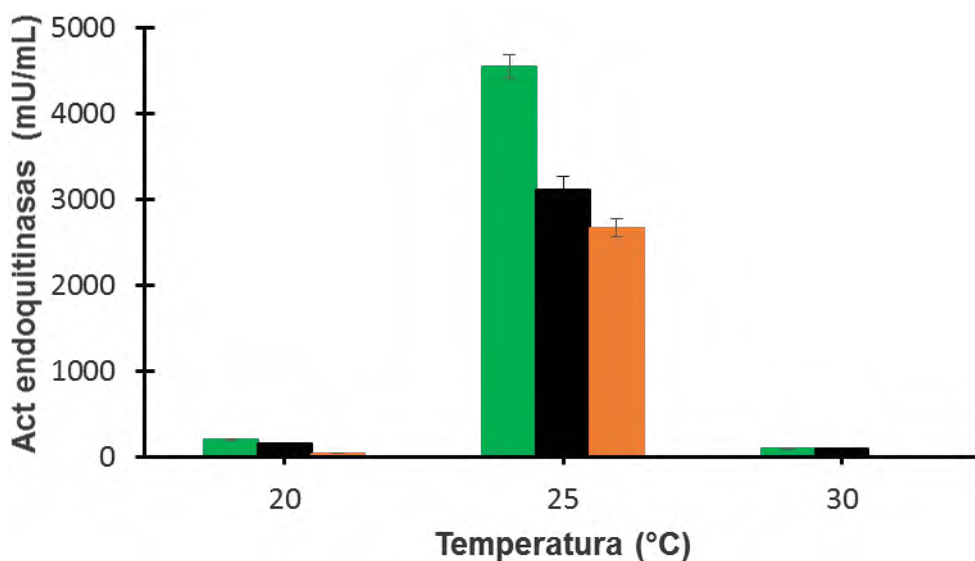


Figura 25. Producción de endoquitinasas de los extractos producidos por *Beauveria bassiana* empleando diferentes sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (■), cutícula de escarabajo, (■) exoesqueleto de camarón (■) en función de la temperatura.

La producción de quitinasas por *Lecanicillium lecanii*, (*Verticillium lecanii*) mediante fermentación líquida, en matraz agitado usando como fuente de carbono maltosa, polvo de camarón y como fuente de nitrógeno peptona, reportó la mayor actividad de quitinasas (9.95 mU/ml) a 24 °C, con 200 mL y 150 rpm (Liu *et al.*, 2003). La temperatura fue similar (25 °C) aunque la actividad enzimática fue 1.2 y 489 veces mayor en comparación con las Nhasas y endoquitinasas respectivamente obtenidas en este trabajo. También, la producción de quitinasas por *Trichoderma harzianum* en fermentación en medio líquido en bioreactor reportan 390 mU/mL a 40°C (Felse y panda, 2000), estando este trabajo 10 veces mayor en comparación con las endoquitinasas asumiendo que la temperatura empleada para *Trichoderma harzianum* es mayor y el hongo es un antagonista. En los estudios sobre la producción de enzimas extracelulares en medio líquido con 17 aislados de *Beauveria bassiana* a una temperatura de 28°C por 8 días de cultivo, los aislados UB1 y UB2 fueron los que mostraron la máxima actividad

quitinolítica (quitinasas totales), con 45.53 y 46.49 U/mL respectivamente, al cuarto día y empleando como sustrato quitina coloidal (Mustafa y Kaur, 2010) comparando estos resultados con los de este trabajo es mucho mayor en comparación con las quitinas sin embargo la temperatura es similar, atribuyéndolo al sustrato utilizado.

7.2.6. Crecimiento de *Beauveria bassiana* a diferentes temperaturas.

Los mayores valores de μ se observaron a 25 °C con los tres sustratos coincidiendo esta temperatura con la de infección y crecimiento del hongo en su hábitat natural, obteniéndose la mayor velocidad con cutícula de chapulín 0.083 (h^{-1}) siendo 1.12 veces mayor en comparación con escarabajo y 2.6 veces en comparación con camarón; contrariamente a 20 y 30 °C se observó una disminución (tabla 6) ya que a una temperatura de 20°C bajan la solubilidad de los componentes del medio y el transporte de nutrientes es lento (Moat y Foster, 1995) , mientras que a 30° C los componentes del medio son más solubles y el metabolismo podría acelerarse modificándose el nivel de expresión hacia otras enzimas como las asociadas al choque térmico o hacia el mantenimiento del hongo (Moat y Foster, 1995), esto debido a que la temperatura del inoculo era de 4°C , aumentando 26°C de lo cual se asume un choque térmico . Para el caso del metabolismo del hongo a esta temperatura, al igual que con el pH, el metabolismo fue primario lo que significa que en la parte exponencial, dentro de este metabolismo se expresaron las quitinasas.

Tabla 6. Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento de *Beauveria bassiana*

Temperatura (°C)	Sustratos		
	Chapulín	Escarabajo	Camarón
	μ (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
20	0.012±0.002	0.012±0.001	0.012±0.004
25	0.083±0.002	0.074±0.001	0.031±0.001
30	0.012±0.001	0.015±0.003	0.015±0.001

7.3. Fermentación en medio líquido con *Penicillium sp*

7.3.1. Efecto de la desproteínización sobre las actividades de Nhasas y endoquitinasas a pH y temperaturas reportadas.

Las fermentaciones en medio líquido al igual que *Beauveria bassiana* se llevaron a 168 horas para evaluar los tiempos de mayor producción y con ellos realizar fermentaciones para determinar pH y temperatura de mayor producción. Los resultados con **sustratos de chapulín sin desproteínizar**, indicaron que *Penicillium sp* produjo 0.230 y 1150 mU/mL para las NHasas y endoquitinasas respectivamente, mientras que en las fermentaciones con sustratos desproteínizados se obtuvieron valores de 1.117 para las NHasas y 2985 mU/mL para las endoquitinasas (figura 26).

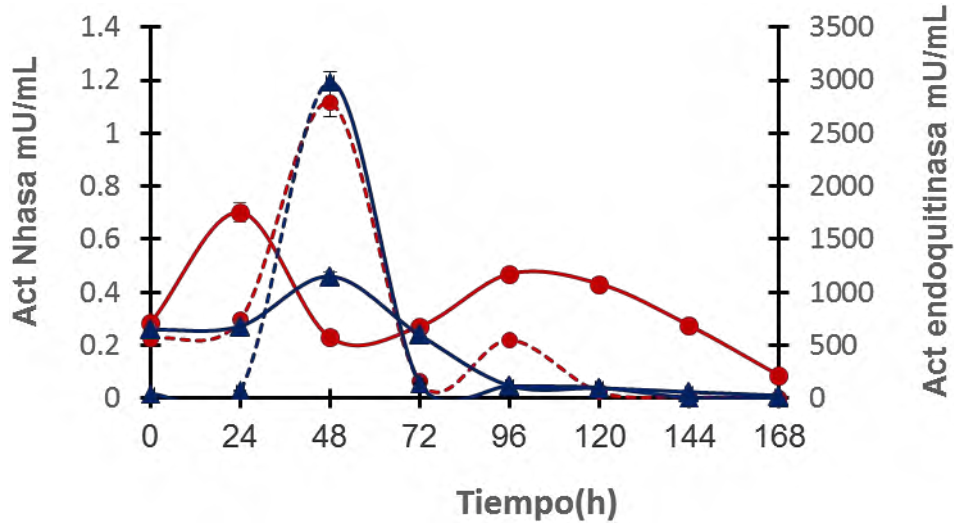


Figura 26. Actividades enzimáticas NHasa con proteína (—●—) y sin proteína (---●---). Endoquitinasa con proteína (—▲—) y sin proteína (---▲---) producidas por *Penicillium* sp utilizando cutícula de chapulín.

Los resultados de las fermentaciones en medio líquido, utilizando sustratos de escarabajo sin desproteínizar, indicaron que *Penicillium* produjo concentraciones volumétricas de 0.382 y 45 mU/mL para las NHasas y endoquitinasa respectivamente, mientras que los resultados con escarabajo desproteínizados, indicaron concentraciones de 3.997 mU/mL para las NHasas y 680 mU/mL de endoquitinasa (figura 27).

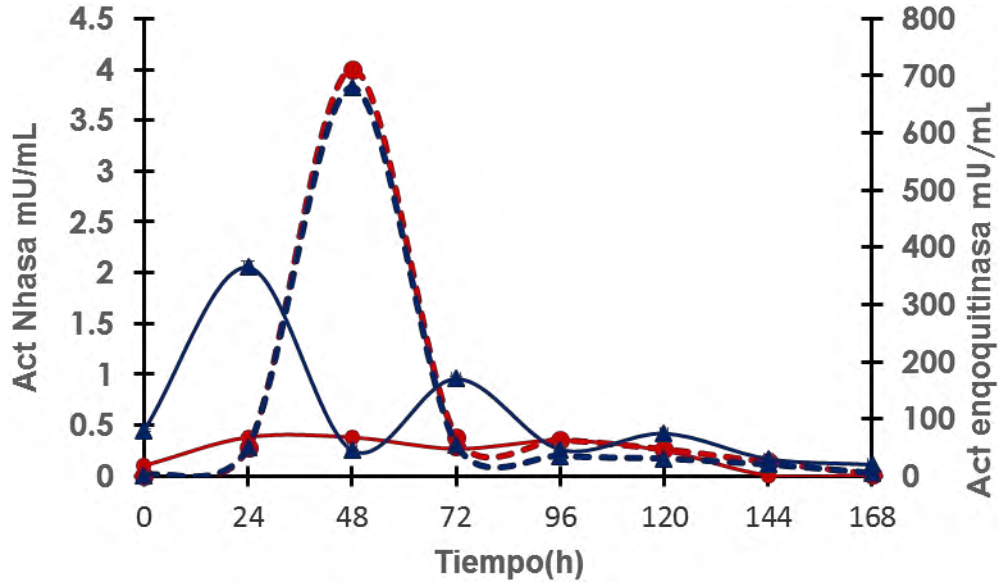


Figura 27. Actividades enzimáticas NHase con proteína (—●—) y sin proteína (---●---). Endoquitinasa con proteína (—▲—) y sin proteína (---▲---) producidas por *Penicillium* sp utilizando cutícula de escarabajo.

Las fermentaciones en medio líquido utilizando exoesqueleto de camarón sin desproteinizar indicaron que *Penicillium* sp produjo concentraciones volumétricas de 1.939 y 961 mU/mL para las NHases y endoquitinasas, mientras que los resultados de las fermentaciones con exoesqueleto de camarón desproteinizado mostraron concentraciones de 4.561 mU/mL para las NHases y 1255 mU/mL para las endoquitinasas (figura 28).

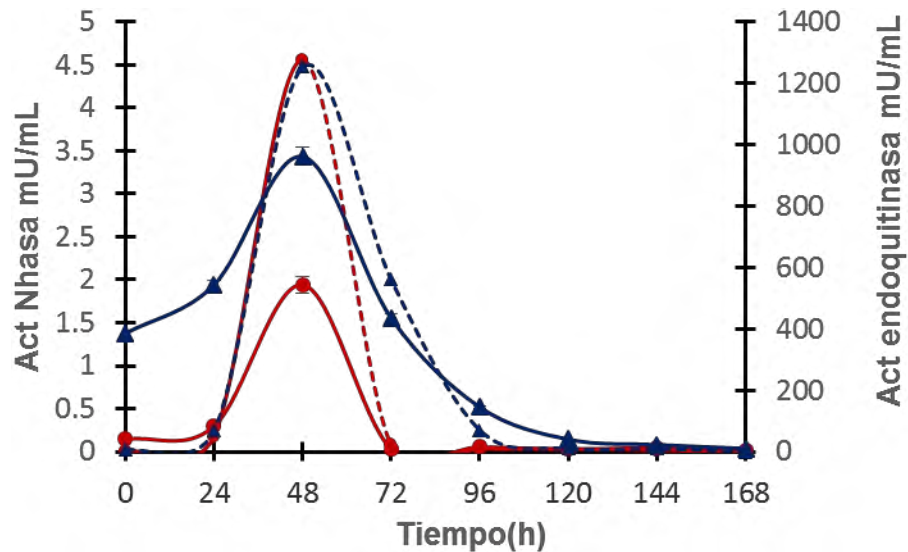


Figura 28. Actividades enzimáticas NHasa con proteína (—●—) y sin proteína (---●---). Endoquitinasa con proteína (—▲—) y sin proteína (---▲---) producidas por *Penicillium sp* utilizando exoesqueleto de camarón.

Los resultados de las fermentaciones con sustratos desproteinizados, mostraron el mismo comportamiento que los sustratos sin desproteinizar independientemente del sustrato empleado, ya que a las 48 horas se incrementó la concentración volumétrica para las dos enzimas (figura 26, 27 y 28).

Cabe mencionar que las concentraciones volumétricas de las endoquitinases fueron diferentes con los tres sustratos, siendo 3.1 veces mayor con la cutícula de chapulín en comparación con la del escarabajo (figura 27 y 28) y 1.19 mayor en comparación con el exoesqueleto de camarón (figura 30). Para el caso de la actividad de las NHasas, con el exoesqueleto de camarón fue 2.7 mayor en comparación con la de cutícula de chapulín (figura 26) y 5.1 veces mayor en comparación con la del escarabajo (figura 27).

Los resultados de las fermentaciones en medio líquido con sustratos **sin desproteinizar**, indicaron que utilizando cutícula de camarón como sustrato,

Penicillium sp produjo la mayor cantidad de NHasas (1.939 mU/mL), mientras que utilizando cutícula de chapulín produjo la mayor cantidad de endoquitinasas donde obtuvo concentraciones de 1150 mU/mL. Sin embargo las fermentaciones con *Beauveria bassiana* indicaron que utilizando cutícula de chapulín produjo la mayor cantidad de NHasas con valores volumétricos de 3.296 mU/mL, siendo 1.69 veces mayor en comparación con *Penicillium sp*, para el caso de *Beauveria bassiana* utilizando cutícula de chapulín produjo la mayor cantidad de endoquitinasas dónde obtuvo concentraciones volumétricas de 690 mU/mL, siendo 0.6 veces menor en comparación con *Penicillium sp*.

Los resultados de las fermentaciones con sustratos **desproteinizados** indicaron que utilizando cutícula de camarón como sustrato, *Penicillium sp* produjo la mayor cantidad de NHasas de 4.561 mU/mL, mientras que utilizando cutícula de chapulín produjo la mayor cantidad de endoquitinasas donde obtuvo concentraciones de 2985 mU/mL. Sin embargo las fermentaciones con *Beauveria bassiana* indicaron que utilizando cutícula de chapulín produjo la mayor cantidad de NHasas con valores volumétricos de 8.892 mU/mL, siendo 1.94 veces mayor en comparación con *Penicillium sp*, para las endoquitinasas indicaron que utilizando cutícula de chapulín *Beauveria bassiana* produjo la mayor cantidad, dónde obtuvo concentraciones volumétricas de 1375 mU/mL, siendo 2.17 veces menor en comparación con *Penicillium sp*.

El mejor tratamiento para la producción de NHasas de acuerdo a la prueba de medias de ficher fue con *Beauveria bassiana* utilizando chapulín desproteinado como sustrato, teniendo los valores máximos de 8.89 mU/mL mostrando diferencias significativas entre los tratamientos, con un grado de confiabilidad de 95 % de (Anexo 3).

Para el caso de las endoquitinasas el mejor tratamiento de acuerdo a la prueba de medias de ficher fue con *Penicillium sp* utilizando chapulín desproteinado como sustrato teniendo los valores máximos de 2985 mU/mL mostrando diferencias significativas entre los tratamientos, con un grado de confiabilidad de 95 % (Anexo 3).

Las mayores concentraciones de N-acetilglucosamina (NAG) y proteína soluble, se observaron a las 48 horas independientemente del sustrato empleado (figuras 29, 30 y 31), coincidiendo con la mayor producción enzimática y de biomasa (figura 32) para las fermentaciones con sustratos sin desproteínizar. Para las fermentaciones con sustratos desproteínizados el cambio en la concentración de biomasa fue mínimo lo que indicaría que las fuentes de carbono y nitrógeno se emplearon principalmente en la síntesis de enzimas (figura 36). La concentración de NAG se relacionó directamente a acción de las Nhasas. (33, 34 y 35).

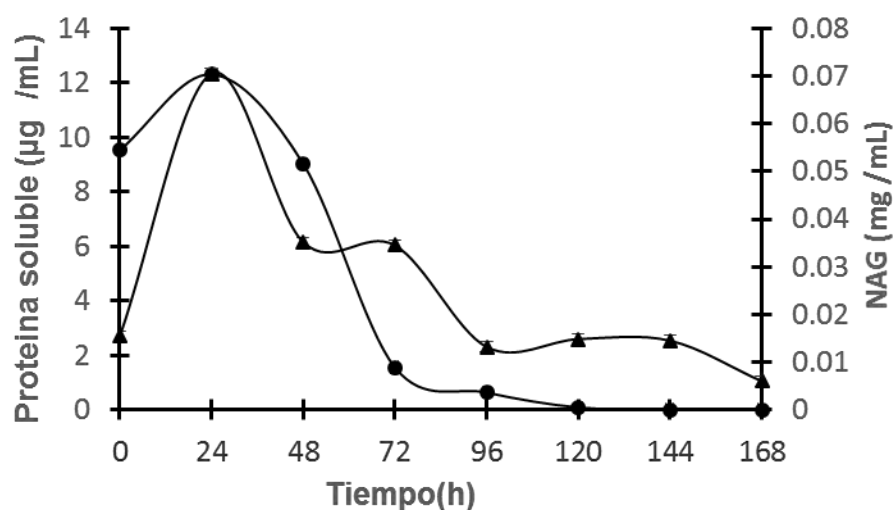


Figura 29. Proteína soluble (●) y NAG (▲) de los extractos producidos por *Penicillium sp* utilizando cutícula de chapulín sin desproteínizar.

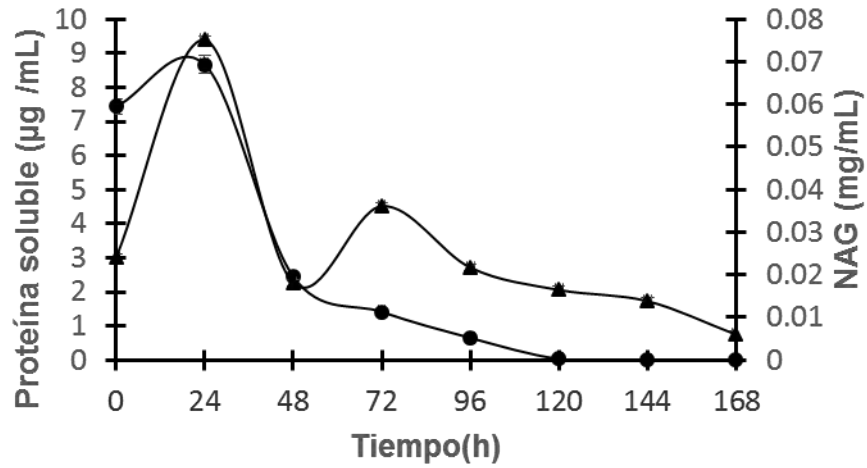


Figura 30. Proteína soluble (●) y NAG (▲) de los extractos producidos por *Penicillium sp* utilizando cutícula escarabajo sin desproteínizar.

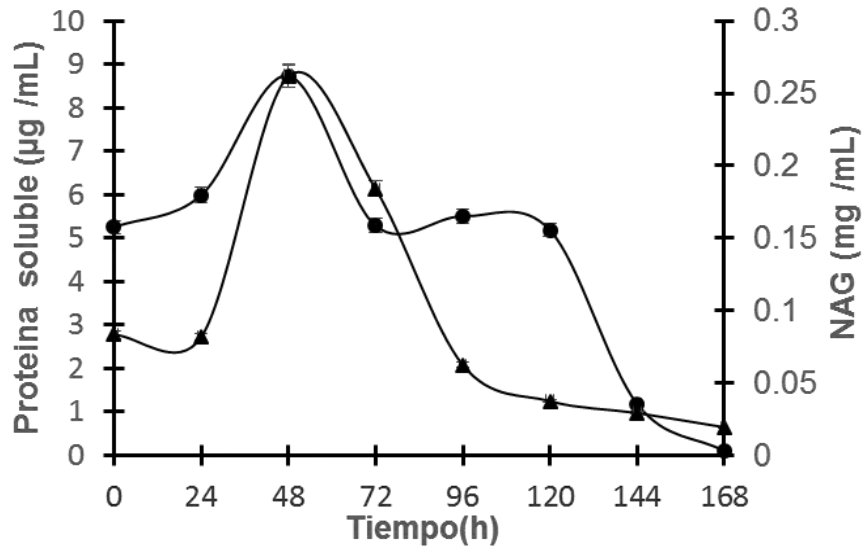


Figura 31. Proteína soluble (●) y NAG (▲) de los extractos producidos por *Penicillium sp* utilizando exoesqueleto de camarón sin desproteínizar.

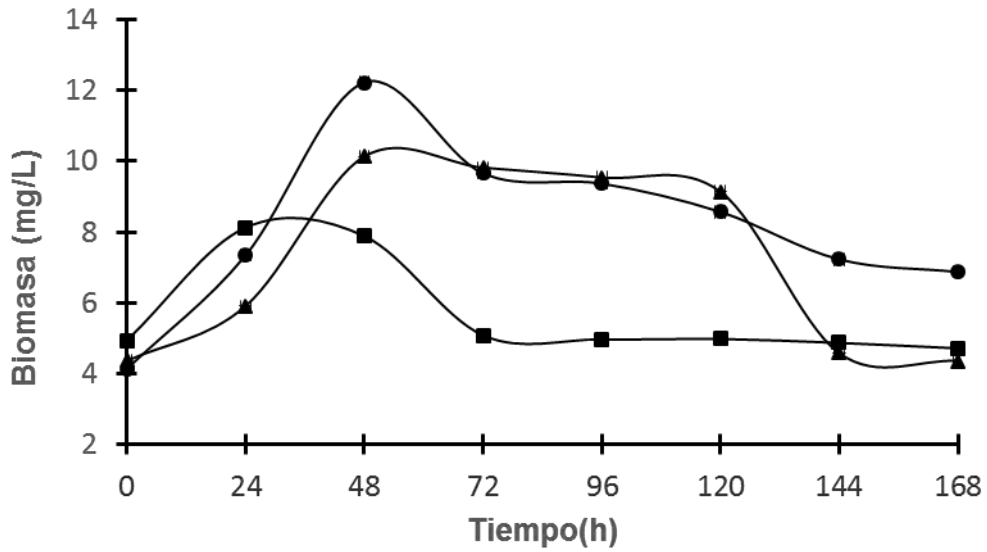


Figura 32. Producción de biomasa producida por *Penicillium sp* con cutícula de chapulín (●), escarabajo (■) y exoesqueleto de camarón (▲) sin desproteinizar.

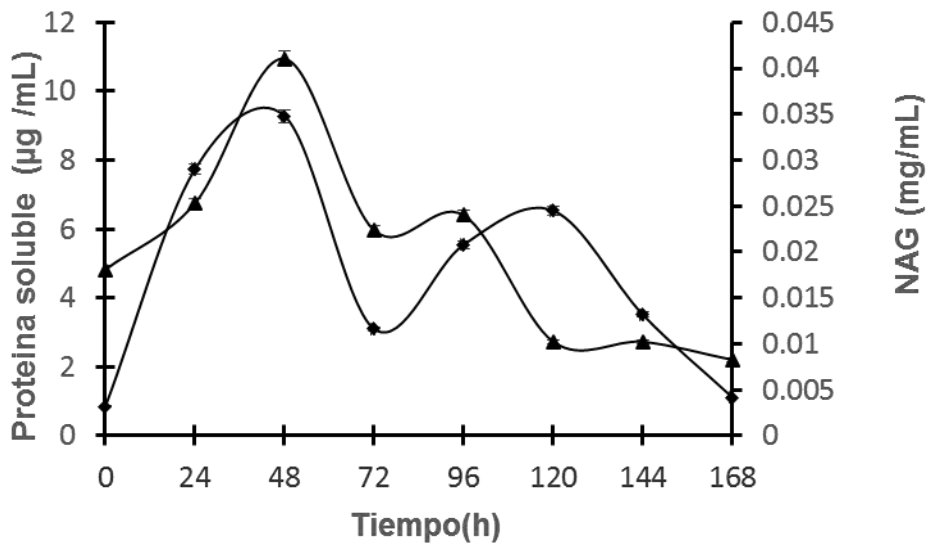


Figura 33. Proteína soluble (●) y NAG (▲) de los extractos producidos por *Penicillium sp* utilizando cutícula de chapulín desproteinizado.

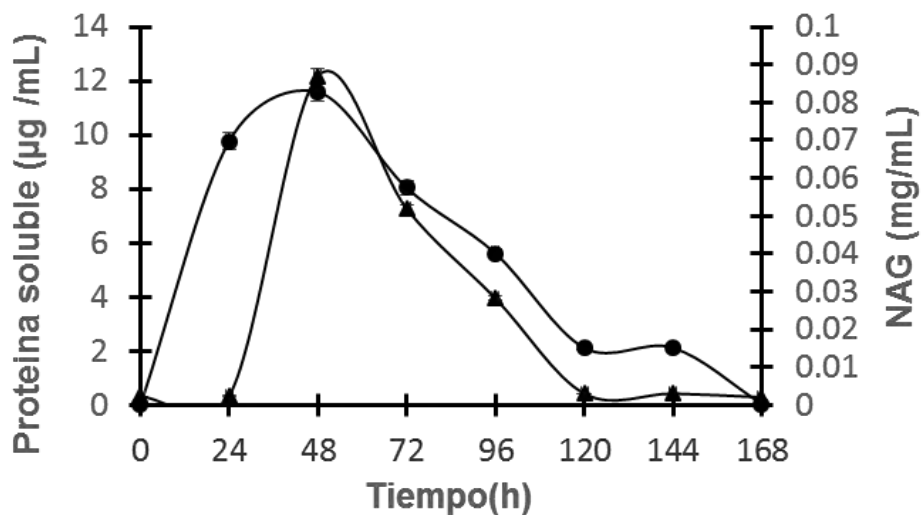


Figura 34. Proteína soluble (●) y NAG (▲) de los extractos producidos por *Penicillium sp* utilizando cutícula de escarabajo desproteinizado.

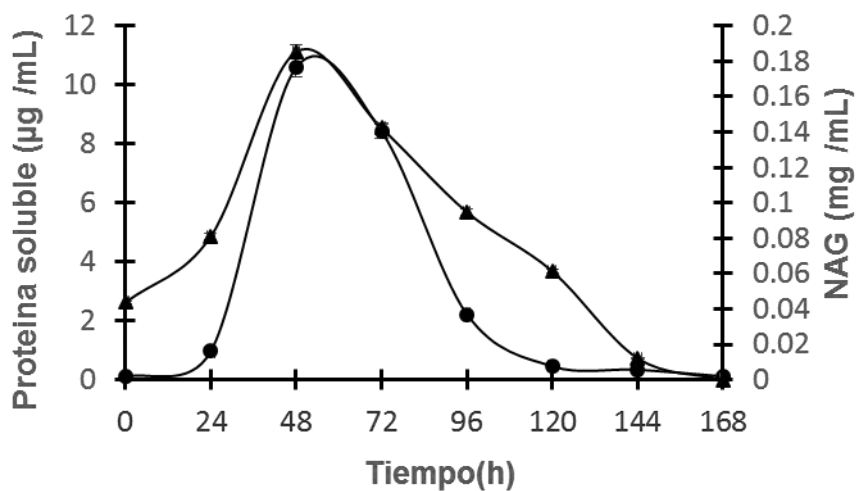


Figura 35. Proteína soluble (●) y NAG (▲) de los extractos producidos por *Penicillium sp* utilizando exoesqueleto de camarón desproteinizado.

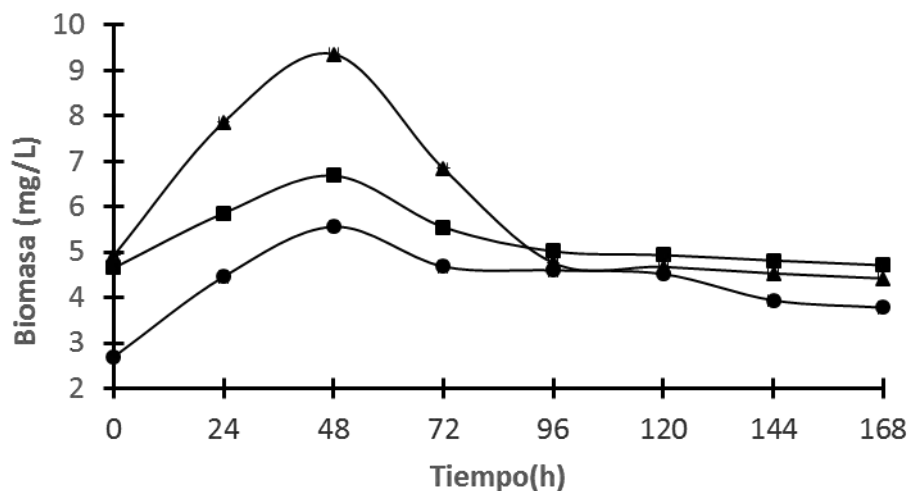


Figura 36. Producción de biomasa producida por *Penicillium sp* con cutícula de chapulín (●), escarabajo (■) y exoesqueleto de camarón (▲) desproteinizados.

7.3.2. Efecto de la desproteinización en el crecimiento de *Pencillium sp*.

Para el caso de *Penicillium sp* la mayor velocidad específica de crecimiento con sustratos sin desproteinizar fue con chapulín (0.168 h^{-1}) seguido del escarabajo (0.133 h^{-1}) y por último camarón (0.120 h^{-1}) siendo 2.8, 2.3 y 4.4 veces mayores que las obtenidas con *Beauveria bassiana* utilizando chapulín, escarabajo y camarón sin desproteinizar (tabla 7).

Tabla 7. Efecto de la desproteinización en la velocidad específica de crecimiento de *Penicillium sp*.

Sustratos *SD	μ (h^{-1})	Sustratos *D	μ (h^{-1})
Chapulín	0.168 ± 0.002	Chapulín	0.151 ± 0.001
Escarabajo	0.133 ± 0.001	Escarabajo	0.042 ± 0.002
Camarón	0.120 ± 0.001	Camarón	0.092 ± 0.002

Estas velocidades fueron mayores probablemente porque este hongo reconoció varias secuencias específicas para codificar a este tipo de enzimas y que no todas eran para la expresión de estas, debido a la gran cantidad de proteína presente en las cutículas y donde *Penicillium sp* reconoce más secuencias que *Beauveria bassiana*, teniendo más afinidad con estos sustratos, sin embargo siguió siendo chapulín el sustrato con el que se tuvo una mayor velocidad. De manera similar a *Beauveria bassiana* el metabolismo con sustratos sin desproteínizar fue primario, suponiendo que la expresión de estas enzimas se da en diversos hongos filamentosos.

Con los sustratos desproteínizados la mayor velocidad de crecimiento se obtuvo nuevamente con chapulín (0.151 h^{-1}), siendo 4.8, 1.4 y 6.1 veces mayor en comparación con el chapulín (0.031 h^{-1}), escarabajo (0.029 h^{-1}) y camarón (0.015 h^{-1}) desproteínizado con *Beauveria bassiana* (tabla 7).

La velocidad de crecimiento fue mayor en comparación con los valores de *Beauveria bassiana* confirmando nuevamente que este hongo asimiló mejor este tipo de sustratos y al no lograr el total de la desproteínización, la proteína presente se pudo emplear para la expresión de otras enzimas que no se cuantificaron.

7.3.3. Efecto del pH sobre las actividades Nhasas y endoquitinasas con *Penicillium sp*.

Al modificar el pH del medio (3-7), las concentraciones volumétricas para las Nhasas y endoquitinasas cambiaron, obteniéndose los mayores a pH 6 (figuras 37 y 38), los valores obtenidos con las cutícula de chapulín para el caso de las endoquitinasas fueron 2.49 veces mayores en comparación con los del exoesqueleto de camarón y 4.02 veces mayor respecto a la cutícula de escarabajo, mientras que 1.24 veces mayores con respecto a lo reportado para pH 5 por Montesinos, (2012).

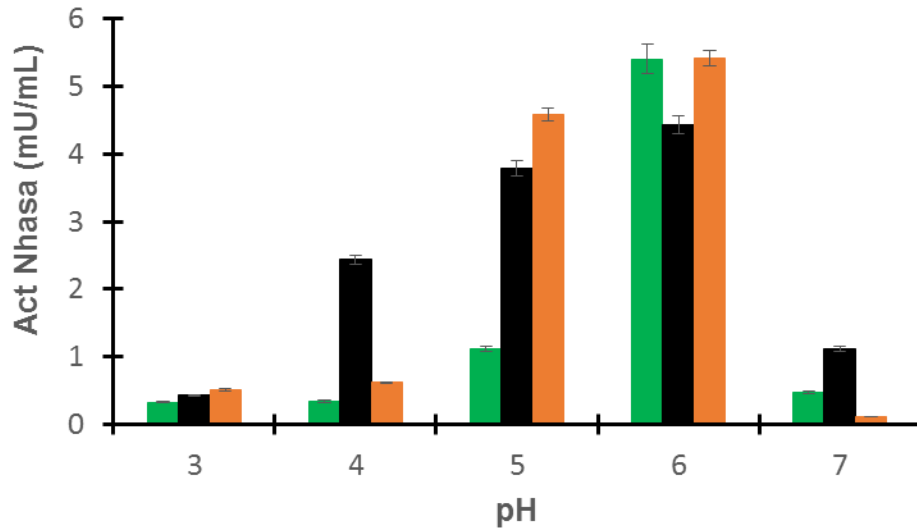


Figura 37. Producción de Nhasa de los extractos producidos por *Penicillium* sp con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (■), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (■) en función del pH inicial

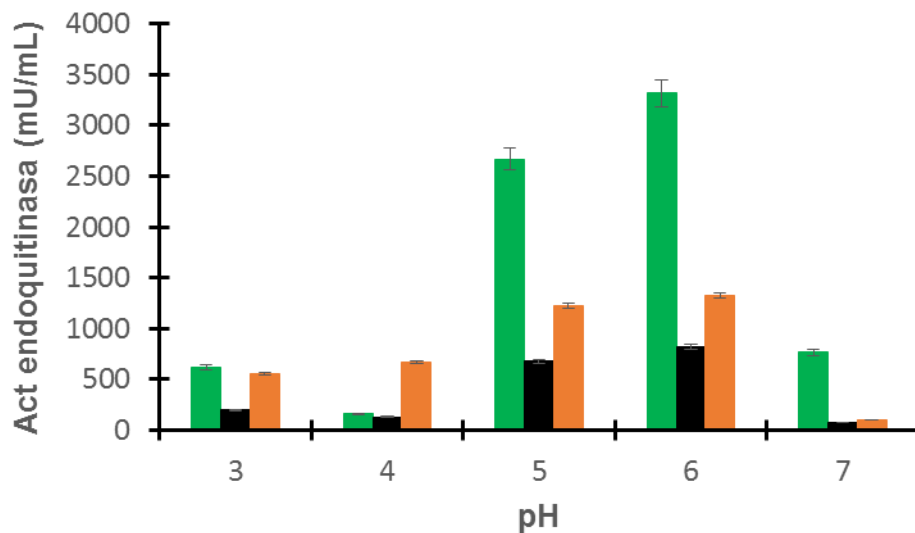


Figura 38. Producción de endoquitinasa de los extractos producidos por *Penicillium* sp con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (■), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (■) en función del pH inicial

En cuanto a los perfiles de producción para las Nhasas, se observó que conforme se incrementa el pH aumenta la concentración de estas enzimas, obteniéndose la mayor producción a pH 6. Por otro lado, para las endoquitinasas se obtuvieron incrementos de dos órdenes de magnitud en comparación con las de Nhasas, lo que indicaría el grado de especificidad de las endoquitinasas debido a que los títulos alcanzados con este hongo fueron similares a los obtenidos con el entomopatógeno, sin embargo el mejor productor de estas enzimas fue *Beauveria bassiana*.

Para el hongo fitopatógeno las mayores concentraciones de las enzimas se obtuvieron al utilizar cutícula de chapulín seguido del exoesqueleto de camarón y finalmente la cutícula de tenebrio, diferenciándose de *Beauveria bassiana* con el que se obtuvieron concentraciones similares cuando se emplearon cutículas de insectos, disminuyendo con el exoesqueleto de camarón. Se asume que *Penicillium sp* reconoció secuencias específicas en el exoesqueleto de camarón, similares al del chapulín, cabe señalar que no existen reportes para la producción de quitinasas utilizando chapulín como sustrato para *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp*.

El mejor tratamiento para el pH en la producción de Nhasas de acuerdo a la prueba de medias de ficher fue con *Beauveria bassiana* utilizando chapulín desproteínizado como sustrato a pH3, teniendo los valores máximos de 11.791 mU/mL mostrando diferencias significativas entre los tratamientos, con un grado de confiabilidad de 95 % de (Anexo 3).

Para el caso de las endoquitinasa el mejor tratamiento de pH de acuerdo a la prueba de medias de ficher con *Beauveria bassiana* utilizando chapulín desproteínizado como sustrato a pH 3 teniendo los valores máximos de 4376 mU/mL mostrando diferencias significativas entre los tratamientos, con un grado de confiabilidad de 95 % (Anexo 3).

Las concentraciones volumétricas de las Nhasas coincidieron con la máxima concentración de proteína soluble, asumiendo que ésta se relaciona con la concentración de las enzimas, mientras que la producción de azúcares reductores

(figuras 39 y 40), específicamente N-acetilglucosamina, se libera por la acción de las Nhasas (Ramírez-Coutiño,2009).

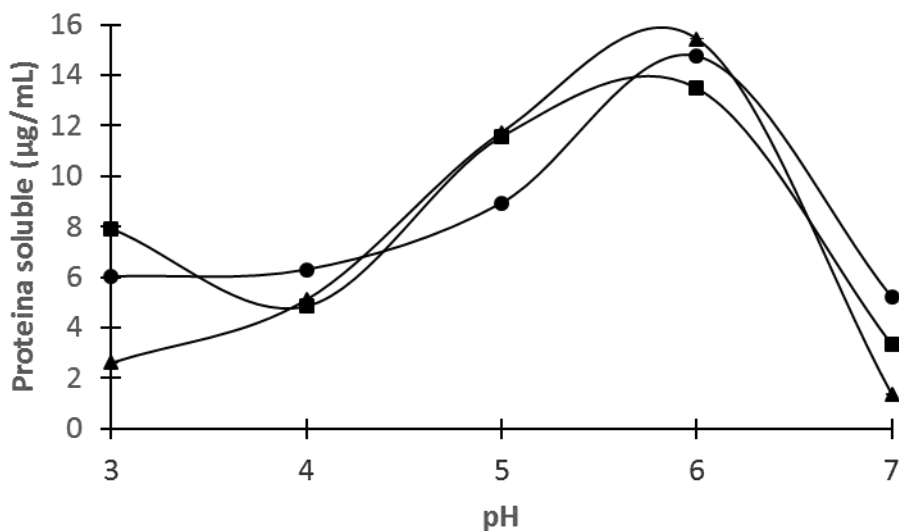


Figura 39. Proteína soluble de los extracto producidos por *Penicillium sp* con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (●), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (▲) en función del pH inicial

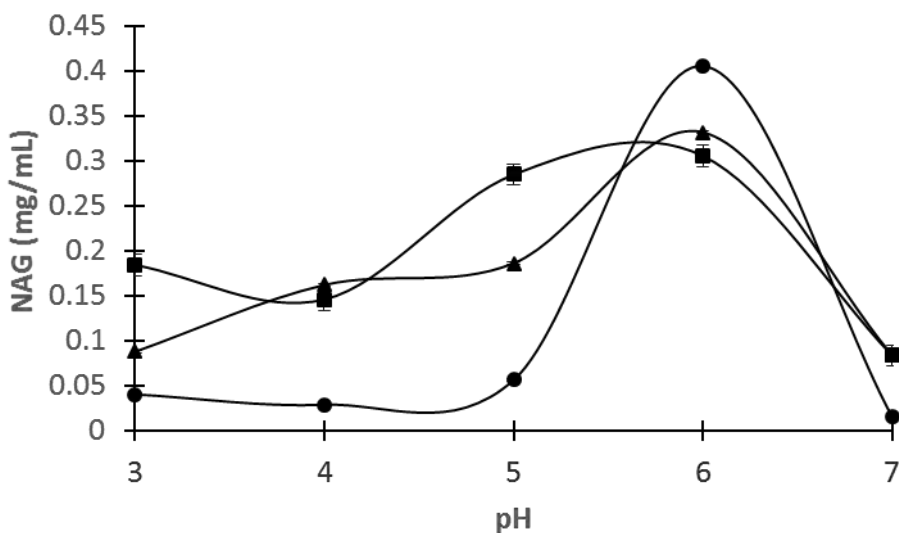


Figura 40. Producción de NAG de los extractos producidos por *Penicillium sp* con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (●), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (▲) en función del pH inicial

Para la biomasa (figura 41) la mayor producción se obtuvo con cutícula de chapulín a pH 6, sin embargo no hubo un crecimiento apreciable del hongo con los tres sustratos utilizados, por lo que se asume que toda la fuente de carbono y nitrógeno se empleó en la producción de enzimas de manera similar que en el caso de *Beauveria bassiana* (Ramírez-Coutiño, 2009).

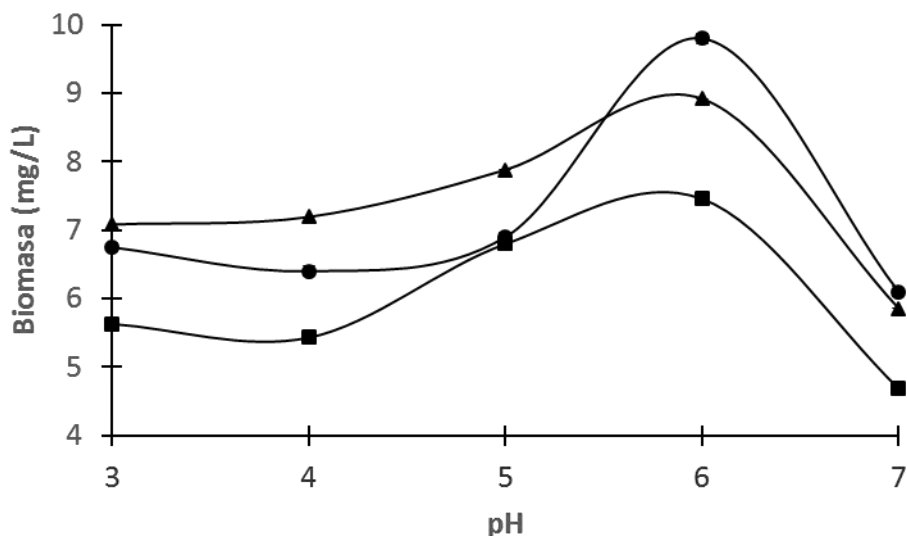


Figura 41. Producción de Biomasa de *Penicillium sp* con sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (●), cutícula de escarabajo (■), exoesqueleto de camarón (▲) en función del pH inicial

7.3.4. Crecimiento de *Penicillium sp* a pH variable

La mayor velocidad específica de crecimiento con este hongo se observó a pH 6 (tabla 9) con los tres sustratos, coincidiendo con el máximo valor de producción de quitinasas. El hongo empleando chapulín como sustrato presentó el mayor valor de μ (0.145 h^{-1}) siendo 1.8 veces mayor en comparación con tenebrio y 1.0 veces mayor en comparación con camarón, mientras que a los otros valores de pH la velocidad específica de crecimiento disminuyó, debido a que fuera del rango óptimo de pH para el hongo, se alteran las actividades enzimáticas y el transporte de nutrientes (Guillen, 1998). Al igual que el hongo anterior, *Penicillium sp* tiene un intervalo de pH para ser expresadas las quitinasas, compartiendo un metabolismo primario (Frioni, 1999).

Tabla 9. Efecto del pH inicial sobre la velocidad específica de crecimiento de *Penicillium sp*

pH	Sustratos		
	Chapulín	Escarabajo	Camarón
	μ (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
3	0.016±0.001	0.025±0.002	0.055±0.001
4	0.016±0.003	0.017±0.001	0.054±0.001
5	0.039±0.002	0.031±0.003	0.108±0.003
6	0.145±0.001	0.079±0.001	0.132±0.001
7	0.020±0.003	0.024±0.004	0.029±0.002

García *et al.* (2013), reportaron una velocidad específica de crecimiento para *Beauveria bassiana* de 0.036 h⁻¹ y 0.039 h⁻¹ en fermentación en medio líquido a nivel matraz y bioreactor respectivamente, utilizando quitina como sustrato con un valor de pH de 5.4 y una temperatura de 28°C, siendo en este trabajo 2.4 y 2.2 veces mayor en comparación con las obtenidas con el pH y la temperatura reportados, estos valores son comparados con chapulín, sustrato con el que se obtuvo el mayor valor de μ , asumiendo que la cepa utilizada en este trabajo es diferente, mientras que el sustrato no es quitina pura sino proveniente de insectos y crustáceo, siendo , la temperatura menor (25°C); la óptima para el crecimiento de esta cepa y el de mayor producción para las quitinasas en este trabajo (tabla 9).

7.3.5. Efecto de la temperatura sobre las actividades Nhasas y endoquitinasas con *Penicillium sp*.

Penicillium sp al utilizar cutícula de chapulín como sustrato a pH 6 evaluando diferentes temperaturas, produjo la mayor actividad volumétrica de exoquitinasas y endoquitinasas a 25° C a las 48 horas, siendo de 5.42 y 3120 mU/mL, respectivamente (figuras 42 y 43).

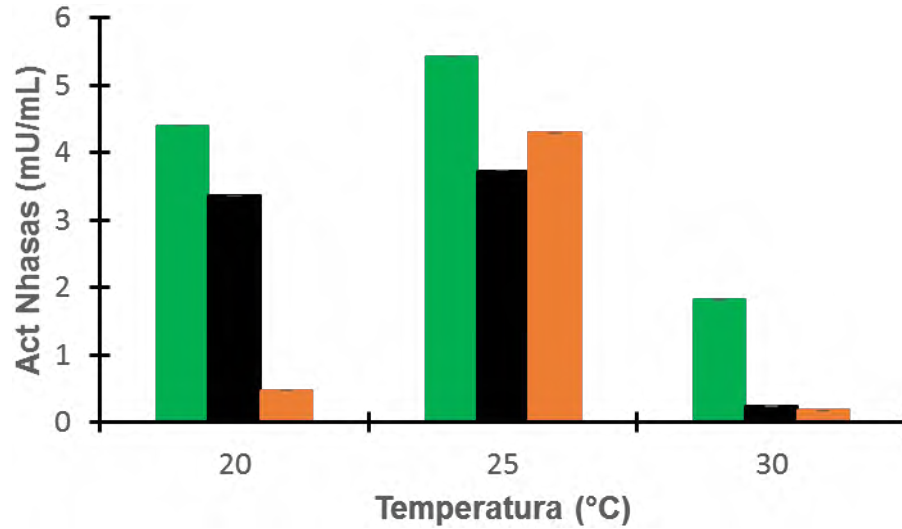


Figura 42. Producción de Nhasas de los extractos producidos por *Penicillium sp bassiana* empleando sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (■), cutícula de escarabajo (■) y exoesqueleto de camarón (■) en función de la temperatura.

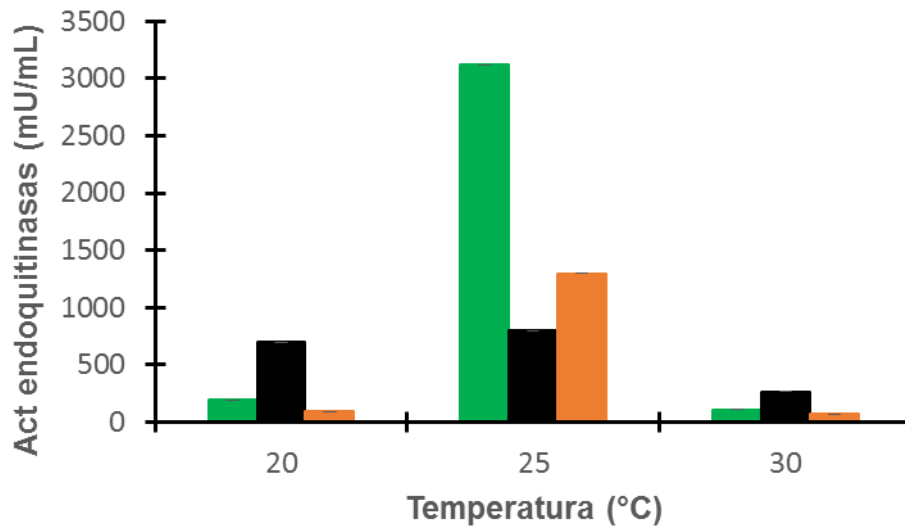


Figura 43. Producción de endoquitinasas de los extractos producidos por *Penicillium sp bassiana* empleando sustratos quitinosos; cutícula de chapulín (■), cutícula de escarabajo (■) y exoesqueleto de camarón (■) en función de la temperatura.

Las concentraciones volumétricas a 20 °C para el caso de las Nhasas empleando la cutícula de chapulín fueron de 4.4 mU/mL y escarabajo 3.36 mU/mL. Cuando la temperatura se modificó a 25°C las mayores concentraciones de las enzimas se obtuvieron con la cutícula de chapulín. Sin embargo, con la cutícula del escarabajo no se observó el mismo comportamiento quedando por debajo del exoesqueleto de camarón. El empleo de chapulín mejoró la secreción de Nhasas y endoquitinasas de 1.2 y 2.4 veces en comparación con las producidas con exoesqueleto de camarón (4.29 mU/mL y 1295 mU/mL) a las 48 horas, mientras que para el caso del escarabajo el incremento fue de 1.4 y 3.92 veces en comparación con las Nhasas y endoquitinasas de camarón (3.7 mU/mL y 795 mU/mL) a las 48 horas.

El comportamiento de la expresión de ambas enzimas producidas por *Penicillium sp* fue diferente con todas las temperaturas evaluadas. Contrariamente las actividades enzimáticas de *Beauveria bassiana* que mostraron un comportamiento similar en las tres temperaturas.

Al comparar el hongo entomopatógeno y el fitopatógeno, se observó que el mejor productor de ambas enzimas fue *Beauveria bassiana* (entomopatógeno) mostrando un incremento 1.4 y 1.6 (9.19 mU/mL y 4545 mU/mL) veces mayor en comparación con las Nhasas y endoquitinasas (5.42 mU/mL y 3120 mU/mL) producidas por *Penicillium sp* al utilizar cutícula de chapulín, y de 3.9 y 2.4 (8.9 mU/mL y 3122 mU/mL) veces mayor en comparación con las Nhasas y endoquitinasas (3.7 y 795 mU/mL) producidas por *Penicillium sp* con cutícula del escarabajo; por último un incremento de 2 y 1.8 (2670 mU/mL y 8.12 mU /mL) veces en comparación con las Nhasas y endoquitinasas (1295 mU /mL y 4.29mU/mL) producidas por *Penicillium sp* al utilizar exoesqueleto de camarón.

Comparando los tres sustratos, hubo un mayor incremento para las dos enzimas de interés con el escarabajo. Comparando entre hongos, *Beauveria bassiana* produjo más enzimas en términos de títulos de producción de enzimas ya que este hongo es más virulento que *Penicillium sp* llegando a atacar a más de 270 especies (Huiping *et al*, 2011), se asume que este hongo reconoce el sustrato de

insectos ya que estos tuvieron que evolucionar para no ser atacados (Huiping *et al.*, 2011).

La literatura señala que *Trichoderma harzianum* en biorreactor alcanzó una concentración volumétrica de quitinasas totales de 2 U/mL (Felse *et al.*, 1999) mientras que en este trabajo se alcanzó 3 U/mL, siendo ligeramente superior al reporte. Lo anterior se atribuye a que la temperatura y el pH empleados fueron diferentes (Guillen, 1998).

El mejor tratamiento de las temperaturas para producción de NHAsas de acuerdo a la prueba de medias de ficher fue con *Beauveria bassiana* utilizando chapulín desproteínizado como sustrato a 25°C, teniendo los valores máximos de 9.194 mU/mL mostrando diferencias significativas entre los tratamientos, con un grado de confiabilidad de 95 % de (Anexo 2).

El mejor tratamiento de las temperaturas para producción de endoquitinasas de acuerdo a la prueba de medias de ficher fue con *Beauveria bassiana* utilizando chapulín desproteínizado como sustrato a 25°C, teniendo los valores máximos de 4545 mU/mL mostrando diferencias significativas entre los tratamientos, con un grado de confiabilidad de 95 % de (Anexo 3).

7.3.6. Crecimiento de *Penicillium sp* a diferentes temperaturas.

La mayor velocidad específica de crecimiento se observó a 25 °C con los tres sustratos al igual que con *Beauveria bassiana*, el valor más alto se obtuvo con chapulín (0.159 h⁻¹), siendo 1.6 veces mayor en comparación con el escarabajo (0.099 h⁻¹) y 1.3 veces mayor en comparación con camarón (0.114 h⁻¹). Cabe mencionar que estas velocidades fueron mayores a las obtenidas con el entomopatógeno, siendo 1.91 veces mayor en comparación con chapulín, 1.33 veces mayor en comparación con el escarabajo y 3.67 veces mayor en comparación con camarón, donde se asume que *Penicillium sp* utilizó la fuente de carbono y nitrógeno para su crecimiento y no para la producción de quitinasas (tabla 10). De la misma manera que con *Beauveria bassiana*, la expresión de las quitinasas con el fitopatógeno fue posible en un intervalo de temperaturas (de 20 a 25°C).

Tabla 10. Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento de *Penicillium sp*

Temperatura (°C)	Sustratos		
	Chapulín	Escarabajo	Camarón
	μ (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
20	0.026±0.002	0.034±0.001	0.028±0.002
25	0.159±0.001	0.099±0.002	0.114±0.005
30	0.021±0.002	0.023±0.003	0.023±0.003

7.4. Análisis electroforético (SDS-PAGE)

7.4.1 Análisis electroforético de los extractos enzimáticos de *Beauveria bassiana* con sustratos sin desproteínizar

La determinación de las bandas proteicas en el cultivo líquido utilizando sustratos sin desproteínizar con *Beauveria bassiana* se tiene que en la figura 44 (carriles 1, 2 y 3) *B. bassiana* al utilizar camarón como sustrato expresó 12 bandas proteicas con pesos moleculares (PM) de 148, 137, 117, 111, 97, 85, 71, 65, 52, 39, 32 y 23 kDa. Al utilizar residuos quitinosos de insectos como sustrato se expresaron más proteínas, por ejemplo con el escarabajo, se expresaron 15 bandas con PM de 151, 148, 137, 123, 120, 114, 111, 97, 92, 81, 75, 65, 56, 45 y 37 kDa (carriles 4, 5 y 6), mientras que para chapulín (carriles 7, 8 y 9) se presentan 16 bandas con PM de 151, 144, 137, 130, 127, 117, 97, 95, 88, 85, 69, 56, 45, 37, 32 y 27 kDa, siendo similares el número de bandas proteicas y PM de éstas, en los extractos producidos utilizando cutícula de insectos.

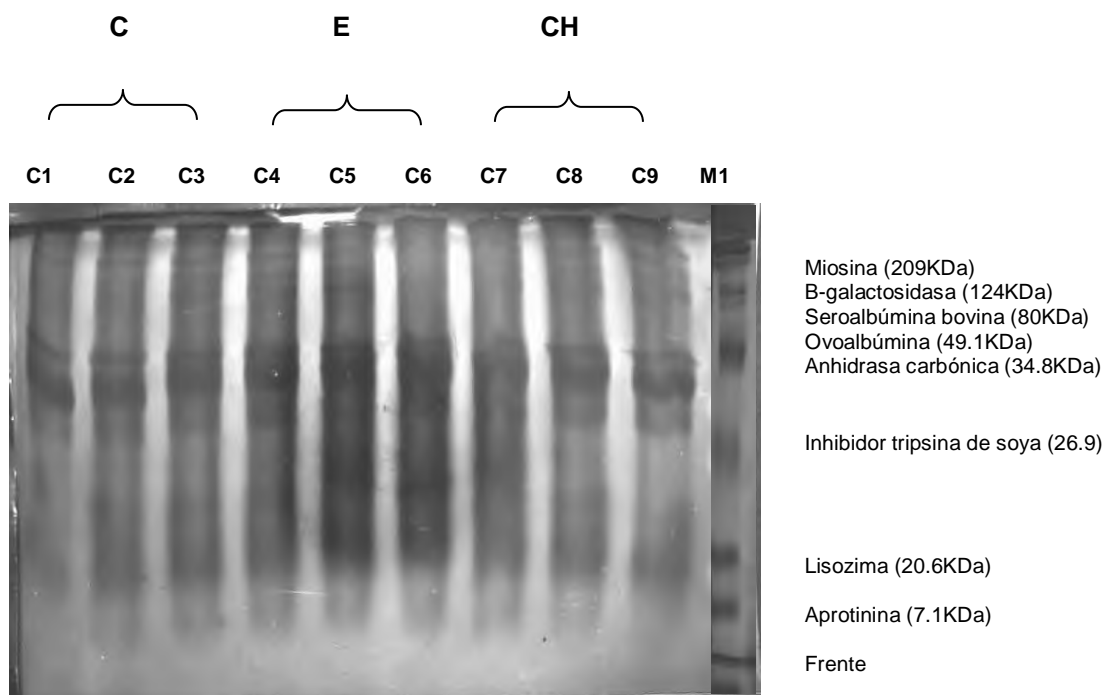


Figura 44. SDS-PGE con tinción de azul de coomasie y tinción de plata de los extractos enzimáticos correspondientes a las fermentaciones en medio líquido de las 48 horas de *Beauveria bassiana* a pH y temperatura reportados con sustratos sin desproteínizar. Cantidad aproximada de proteína cargada por pozo 11.4 µg de proteína (M1): marcador amplio rango (BIO-RAD).

7.4.2. Análisis electroforético de los extractos enzimáticos de *Penicillium sp* con sustratos sin desproteínizar

La determinación de las bandas proteicas expresadas en el cultivo líquido utilizando sustratos sin desproteínizar con *Penicillium sp* se efectuó de la misma manera como se describió para *B. bassiana*. Los resultados correspondientes indican que este hongo al emplear como sustrato camarón, expresó 5 bandas con PM de 160, 48, 40, 37 y 22 kDa (carril 3). Al utilizar insectos como sustrato se tiene que escarabajo expresó 4 bandas (carril 2) con PM de 160, 110, 48 y 26 kDa; mientras que al utilizar chapulín como sustrato expresó 13 bandas (carril 1) con PM de 127, 101, 96, 88, 69, 65, 45, 48, 26, 22, 20, 6 y 4 kDa.

Para el caso de este hongo se observaron menos bandas que con *Beauveria bassiana* (figura 45). El sustrato con el que ambos hongos expresaron mayor cantidad de bandas proteicas fue chapulín.

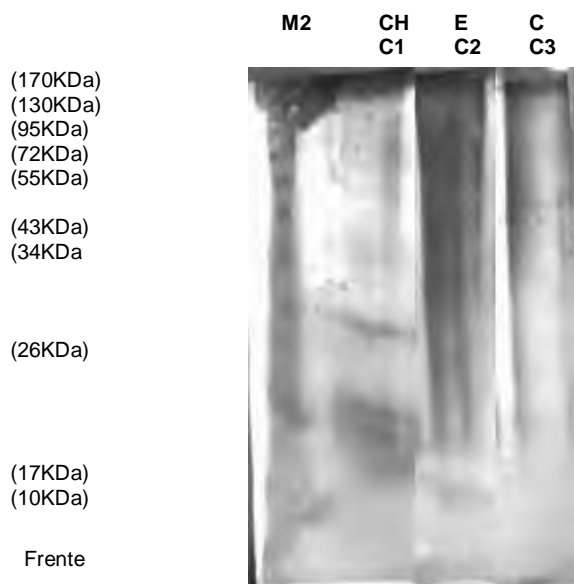


Figura 45. SDS-PGE con tinción de azul de coomasie y tinción de plata de los extractos enzimáticos correspondientes a las fermentaciones en medio líquido de las 48 horas de *Penicillium sp* a pH y temperatura reportados con sustratos sin desproteínizar. Cantidad de proteína aproximada cargada por pozo 12.1µg de proteína (M2): marcador amplio rango (FERMENTAS).

7.4.3. Análisis electroforético de los extractos enzimáticos de *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp* obtenidos en condiciones de mayor producción y con sustratos desproteínizados.

La determinación de las bandas proteicas durante las condiciones de mayor producción para *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp* se efectuó de la misma manera que los geles anteriormente mencionados. Se observó que hay efecto sobre la desproteínización en los perfiles electroforéticos ya que no se logran observar las mismas bandas en los geles de los sustratos sin desproteínizar (figura 45) que los desproteínizados (figura 46).

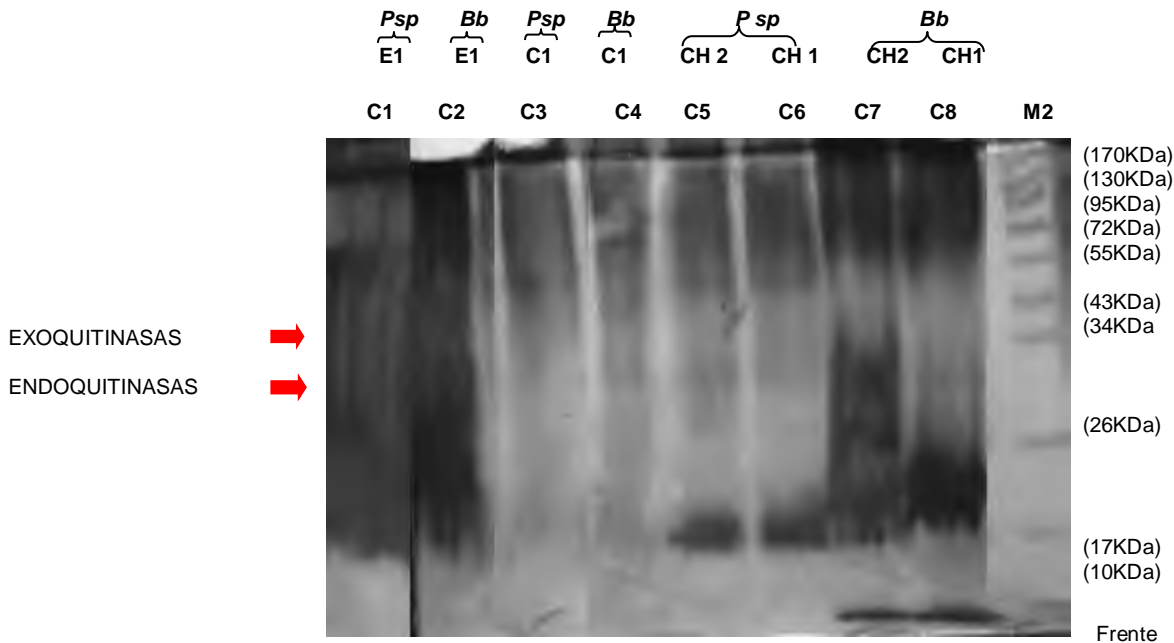


Figura 46. SDS-PGE con tinción de plata de los extractos enzimáticos correspondientes a las fermentaciones en medio líquido de *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp* efectuados a pH y temperatura de mayor producción. Cantidad de proteína aproximada cargada por pozo 17.1µg de proteína para *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp* (M2): marcador amplio rango (FERMENTAS).

En esta figura, los carriles 7 y 8 pertenecen a extractos enzimáticos de *Beauveria bassiana* utilizando chapulín desproteinizado. En éstos, se detectaron 12 bandas con PM de 94,88,78,66,64,60,56,54,40,38,29 y 20 kDa. Para los carriles 5 y 6, pertenecientes a los extractos enzimáticos de *Penicillium sp* utilizando chapulín desproteinizado, se presentan 10 bandas con PM de 94,88,85,78,64,58,54,40,29 y 20 kDa. Para el carril 4 pertenecientes a camarón con el hongo *Beauveria bassiana* se tienen 8 bandas con PM de 94,85,80,70,64,58,41,16 kDa, mientras que para el carril 3 perteneciente a camarón con *Penicillium sp* se tienen 4 bandas cuyos pesos moleculares fueron 94,80,49,34kDa, para el carril 2 perteneciente a el escarabajo con *Beauveria bassiana* se detectan cuatro bandas con PM de

64,54,41 y 24 kDa, y para el caso del escarabajo con *Penicillium sp* se presentan 3 bandas con PM de 54,48 y 38 kDa en el carril 1.

Cabe mencionar que en los análisis electroforéticos de los extractos enzimáticos de *Beauveria bassiana* obtenidos bajo condiciones de mayor producción de quitinasas (figura 46), se observó una disminución en el número de bandas proteicas en comparación con sustratos no desproteinizados. Utilizando chapulín sin desproteinar como sustrato, se observaron 16 bandas mientras que utilizando el sustrato desproteinado se observaron 11. Las bandas que no se evidenciaron correspondieron a las de mayor PM, es decir 151, 144, 137, 130, 127,117 y 97 kDa, sin embargo se observaron dos nuevas bandas proteicas con PM de 64 y 66 kDa. Igualmente, con el escarabajo sin desproteinar, se detectaron 15 bandas y al utilizar el sustrato desproteinado sólo se observaron 4 bandas. Las bandas proteicas que no se observaron fueron de 151, 148, 137, 123, 120, 114, 111, 97, 81 y 75 kDa. Por último, para camarón sin desproteinar se detectaron 12 bandas, mientras que con este sustrato desproteinado sólo 7 bandas fueron visibles. Las bandas proteicas que no se observaron fueron de 148,137, 117,111 y 97 kDa (figura 44).

Para el caso de *Penicillium sp* en los análisis electroforéticos de los extractos enzimáticos obtenidos bajo condiciones de mayor producción (figura 46) de igual manera que con *Beauveria bassiana* se nota la disminución en el número de bandas proteicas en comparación cuando se emplearon los sustratos desproteinizados. Utilizando chapulín sin desproteinar como sustrato, se observaron 13 bandas y para este sustrato desproteinado se observaron 7 bandas. No se evidenciaron la presencia de bandas proteicas con mayor peso molecular (127 y 110kDa) con sustratos desproteinizados, al igual bandas proteicas con bajo PM de 48, 26, 22, 20,6 y 4 kDa, conservándose las bandas con PM de 88, 69,65 y 45 kDa, sin embargo se observaron dos nuevas bandas proteicas con PM de 85 y 58 kDa.

Los extractos enzimáticos resultante de las fermentaciones utilizando escarabajo sin desproteinar como sustrato se detectaron 4 bandas y al emplear este sustrato desproteinado disminuyó a 3 de las cuales se perdieron las de mayor

PM (160 y 110 kDa) y una de bajo PM (26 kDa), conservándose una de 48k Da, y también observándose dos nuevas bandas de 54 y 38 kDa. Por último, con camarón sin desproteínizar se detectaron 5 bandas y al emplear sustratos desproteínizados sólo se detectaron 4, de las cuales se perdieron una de mayor peso molecular (160 kDa), tres de bajo peso molecular (48,40 y 22 kDa), conservándose una de PM similar a 37 kDa y finalmente se observaron tres nuevas bandas de 70,54 y 44 kDa, esto debido que al desproteínizar las cutículas se perdieron proteínas quedando el polímero libre para que el hongo pudiera hidrolizar y producir las quitinasas.

La desproteínización tuvo efecto sobre los perfiles proteicos de *Penicillium sp* y *B. bassiana*, al disminuir el número de proteínas expresadas cuando se utilizan sustratos desproteínizados ya que en la desproteínización con tetraborato de potasio hubo muchas proteínas que no tenían afinidad a esta sal. Este efecto fue más notorio para *B. bassiana* utilizando el escarabajo como sustrato, ya que se redujo el número de bandas al utilizar sustrato desproteínizado, en comparación con *Penicillium sp*. Además, independientemente si el sustrato fue desproteínizado o no, con ambos hongos se expresó una mayor cantidad de bandas proteicas con chapulín, confirmándose esto con los estudios espectrofotométricos.

Considerando que en los sustratos sin desproteínizar, el chapulín al igual que el escarabajo, se ocuparon los cuerpos completos de los insectos (secados, molieron y tamizados), es lógico observar una mayor expresión de proteínas, en comparación con el camarón, del que sólo se dispuso el exoesqueleto las cutículas sin los órganos internos. Reafirmando lo anterior, cuando se realizaron los estudios electroforéticos concernientes al empleo de chapulín, se observaron bandas de alto peso molecular debido a su alto contenido proteico y gran parte de la hemolinfa fue un inductor para la producción de proteasas, lipasas entre otras enzimas. De acuerdo a Ramírez-Coutiño, (2009) se reportan proteasas de 99-120kDa coincidiendo estos valores con las bandas proteicas de *B. bassiana* y *Penicillium sp* con sustratos sin desproteínizar. Se atribuye que la desproteínización tuvo efecto positivo ya que se removieron proteínas, lípidos y

ceras (los cuales están asociados en una matriz) que pudieran intervenir positivamente en la producción de quitinasas.

Por ello, al utilizar sustratos desproteinizados se logran observar más bandas con pesos moleculares que corresponden a exoquitinasas y endoquitinasas. De acuerdo al estudio sobre la caracterización bioquímica y enzimática de un aislado de *Beauveria bassiana* perteneciente al estado de Oaxaca realizado por Azamar *et al.* (2014), utilizando la cepa 885.2, ésta presentó una respuesta positiva para 13 de las 20 enzimas evaluadas. Las pruebas mostraron resultados positivos de actividad a las enzimas fosfatasa alcalina, esterasa lipasa, leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina, α -quimotripsina, fosfatasa acida, α y β galactosidasa, β glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -mannosidasa. Siendo de importancia lo anterior debido a que fue la misma cepa empleada en esta investigación, se cree que algunas enzimas también se expresaron en este trabajo al utilizar sustratos sin desproteinar como las fosfatasas (85-180 kDa), entre otras enzimas antes mencionadas.

Las proteínas expresadas con sustratos desproteinizados para ambos hongos, coinciden con los pesos moleculares de las exoquitinasas y endoquitinasas que van de 40-60 kDa, mientras que para las endoquitinasas de 30-50 kDa para hongos de acuerdo con Hartl *et al.* (2012). Rocha (2009) reportaron pesos moleculares de las exoquitinasas de *Lecanicillium lecanii* de 31 y 45 kDa en cultivo líquido y sólido, también Ramírez-Coutiño (2009) reportó pesos moleculares para las quitinasas de 23 a 45 kDa para *Verticillium fungicola*. Barranco *et al.* (2009) reportaron quitinasas con masas moleculares de 70, 58, 45 y 31 kDa producidas por *Lecanicillium lecanii* en cultivo sólido. Las masas moleculares observadas coinciden de igual manera con las de quitinasas de *Metarhizium anisopliae* reportadas por Krieger de Moraes *et al.* (2003), quienes identificaron bandas de 31 kDa con actividad exoquitinasa y endoquitinasa. Barreto *et al.* (2004), reportaron una endoquitinasa de 42 kDa. Así también trabajos realizados en el laboratorio de bioprocesos por Escobar, 2015, señala que las bandas proteicas con pesos moleculares de 30 a 40 kDa y una de 70 kDa que se obtuvieron con las condiciones de este trabajo, mostraron actividad Nhasa. Este estudio, permitirá

tomar decisiones para la purificación posterior de las quitinasas expresadas. Retomando lo mencionado en el apartado 7.3 acerca de la homeostasis y la activación de la respuesta a tolerancia acida (ATR) dentro de la segunda fase postácido donde son sintetizados las 43 proteínas de tipo ASP_S, se asume que probablemente en el pH 3 se sintetizan algunas de este tipo ya que en los valores de pH 4, 5, 6 y 7 hay menos bandas proteicas, también para el caso de los genes *Cad A* y *Adi*, los cuales codifican para la lisina y argininadescarboxilasa se cree que de acuerdo a los PM que presentan las bandas proteicas en el pH 3 (94,89,87,82,73,69,65,40 kDa) algunas de ellas pueden ser las enzimas antes descritas, cabe mencionar que estas no están reportadas para *Beauveria bassiana*, pero según la literatura se cree que corresponden a estas enzimas evidenciándolo por los pesos moleculares, expresándose justamente cuando el microorganismo presenta un estrés por choque ácido, mientras que a pH 4 presenta bandas proteicas con PM de 75, 76, 68, 41 kDa, para el caso de pH 5 los PM fueron de 73,74,61,64,43 kDa, para pH 6 los PM fueron de 63, 43, 42, 40 kDa y por último a pH 7 fueron de 61, 32, 34, 36 kDa (figura 44) no evidenciándose a pH 4, 5, 6 y 7 las bandas proteicas con PM de 94, 89, 87 y 82 kDa asumiendo que pudieran ser enzimas de tipo descarboxilasas. De los dos hongos es notable que el de mejor respuesta fue *Beauveria bassiana* al actuar de manera rápida en presencia del choque ácido y con ello liberando gran cantidad de quitinasas al utilizar chapulín como sustrato.

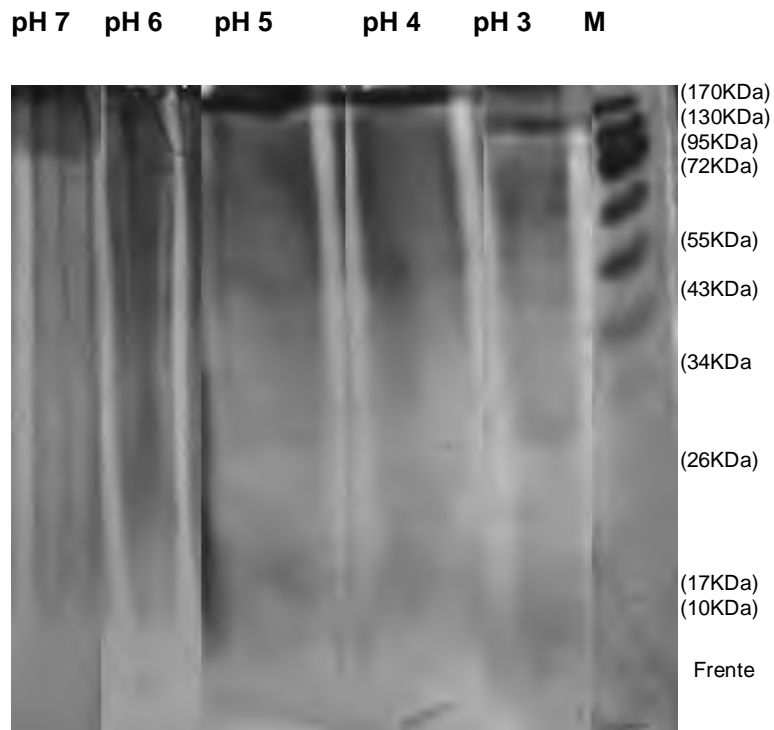


Figura 47. SDS-PGE con tinción de azul de coomasie y tinción de plata de los extractos enzimáticos correspondientes a las fermentaciones en medio líquido de *Beauveria bassiana* de las 48 horas efectuados a diferentes pHs y temperatura reportada con sustratos desproteinizados. Cantidad de proteína aproximada cargada por pozo 13.1µg de proteína (M2): marcador amplio rango (FERMENTAS).

8. CONCLUSIONES

La desproteínización alcanzada con tetraborato de potasio fue de 90% para camarón, 85 % para chapulín y 70% para el escarabajo. Con estos porcentajes, la producción de quitinasas se vio favorecida obteniéndose casi el doble con los dos hongos utilizando los tres sustratos. Aunque no se logró el 100% de desproteínización, se alcanzaron títulos o concentraciones elevados. La producción de enzimas estuvo asociada al crecimiento.

En este trabajo se obtuvieron concentraciones de quitinasas por encima de los reportados. La proteína remanente en las cutículas de los insectos y camarón fue suficiente para la expresión de estas enzimas

La máxima producción de quitinasas para ambos hongos se observó a las 48 horas, independientemente del sustrato. Los valores de pH de mayor producción fueron 3 para *Beauveria bassiana* y 6 para *Penicillium sp*, la temperatura de producción fue de 25 °C para ambos hongos. La expresión de estas enzimas se vio favorecida al utilizar chapulín como sustrato, obteniendo valores máximos de concentraciones volumétricas de 9.19 y 4545 mU/mL para Nhasa y endoquitinasas respectivamente con *Beauveria bassiana*, mientras que con *Penicillium sp* se obtuvieron concentraciones volumétricas de 5.42 y 3120 mU/mL para Nhasa y endoquitinasa respectivamente.

Los extractos enzimáticos analizados por estudio electroforético SDS-PAGE, revelaron que los pesos moleculares correspondientes a las exoquitinasas y endoquitinasas oscilan entre 20-70 kDa a pH 3 y 6 y a una temperatura de 25°C a las 48 horas de cultivo para *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp*. Un mayor número de bandas fueron observadas en los extractos obtenidos cuando se utilizó cutícula de chapulín desproteínizada como sustrato. Nuevamente las bandas proteicas fueron más notorias al utilizar chapulín como sustrato.

9. PERSPECTIVAS

Otras estrategias que pueden utilizarse para una mayor desprotección de las cutículas, es aumentar la concentración de la sal así como seleccionar otras sales de mayor afinidad, de igual manera utilizar métodos combinados como el de dos fases acuosas.

Con las condiciones de mayor producción establecidas, se puede escalar para lograr un mayor volumen, y además dados los pesos moleculares presentados para las enzimas, se posibilita su purificación posterior y estudios bioquímicos de estas, de manera que permitan su uso hacia ciertos sectores.

Al determinar que *Beauveria bassiana* es el mejor productor de quitinasas, se propone continuar los estudios para su inclusión como agente de control biológico, empleando sustratos más baratos para su crecimiento, como los residuos quitinosos como el camarón.

Debido a que el chapulín fue el mejor sustrato para la inducción de quitinasas, resulta de interés continuar con su empleo mediante fermentaciones tanto en estado líquido como sólido.

10. REFERENCIAS

1. Agrios, G.N. 1988. Plant Pathology. Third Edition. Academic Press. New York. Pp.803
2. Alean Carreño, I. (2003). Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Tesis de licenciatura Microbiología Agrícola y Veterinaria. Universidad Javeriana Colombia.
3. Alves SBB, Rossi LS, Lopes RB, Tamai MA, Pereira RM (2002) *Beauveria bassiana* yeast phase on agar médium and its pathogenicity against *Diatraea saccharlis* (Lepidóptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Journal Invertebrate Pathology 81:70-77.
4. Amador, M, A., Ramírez, C. L.P., Aguirre, C, A., Nuñez, G.O. (2014). Estudio comparativo de microensilados biológicos a partir de exoesqueletos de camarón y chapulín fermentados en medio sólido. AMIDIQ.
5. Aristegui, B. (2002). Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. Annual review of entomology. 23:409-442.
6. Azamar, I. J., Francisco, R.R., Núñez-Gaona, O., Ramírez-Coutiño, L. P. (2014). Caracterización bioquímica y enzimática de un aislado de *Beauveria bassiana* perteneciente al estado de Oaxaca. 2do Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Oaxaca. Oaxaca, Oaxaca, México.
7. Barranco FE., Bustamante CP., Mayorga-Reyes L., González CR., Martínez CP. y Azaola A. 2009. β -N-acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* ATCC 26854 by solid-state fermentation utilizing shrimp shell. Interciencia. 34(5): 356-360.
8. Barreto CC., Staats CC., Schrank A. Vainstein MH. (2004). Distribution of Chitinases in the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. Microbiology. 48: 102-107.
9. Blackwell M. (2010). Fungal evolution and taxonomy. Biocontrol 55: 7-16.
10. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding Analytical Biochemistry Methods in the Biological Sciences 72, 248-254.

-
11. Calonje, M.; Garcia Mendoza, C.; Galan, B.; Novaes-Ledieu, M. (1997). Enzymic activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *Agaricus bisporus* fruit body cell walls. *Microbiology*. 143: 2999-3006.
 12. Carrasco, N. U. (2011). Producción y purificación de β -Nacetilhexosaminidasa en cultivo sumergido de *Lecanicillium lecani* inmovilizado en espuma de poliuretano. Tesis de maestría en Biotecnología UAM-Iztalapa. México.
 13. Cook, R.J. & Baker, K.F. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minn. Pp.539
 14. Currie C.R., Wong B., Suart A.E., Schultz T.R., Rehnersa. (2003). Ancient tripartite coevolution in microbe symbiosis. *Science* 299:386-388.
 15. Curso nacional de control Biológico XXIV, editors Del Rincon Castro M.C., Rios Olivera. V DE J. Sociedad Mexicana de control Biológico. 2013. Oaxaca, México. Pp.215
 16. Dahiya, N., Tewari, R., Singh, H.G. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiol Biotechnology*. 71:773-782.
 17. De Faria MR Wraight SP. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43: 237–256.
 18. Echeverria. B.F. (2006). Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 19. Felse. A. (2000). Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors: the influence of agitator speed. *Journal of Biochemical Engineering* 4:115-120.
 20. Ferrera C. R; Alarcón, A. (2007). *Microbiología Agrícola*. México: Edit, Trillas. Pp 568.
 21. Ferron P. (1978). Biological control of insect pests by entomopathogenic fungi. *Annual Review of entomology* 23: 409-442.
 22. Flores G. E. 1998. Biodiversidad de Artrópodos Argentinos: una perspectiva biotaxonómica. Ediciones Sur. Pp 599.
 23. Fransen JJ. (1990). Natural enemies of whitefly: fungi. Ed; D. Gerling. In: *Whiteflies: Their bionomics, pest status and management*. Tel Aviv, Israel: Tel Aviv University, 137-225.

-
24. Franco C.K.G., Rodríguez, N.S., Cervantes, M.J.F., Barronco F.J.E. (2011). Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *Sociedades rurales, producción y medio ambiente*, 11:22-42.
25. Frioni Lillian. (1999). *Procesos microbianos*. Edit. Fundacion Universidad Nacional de rio cuarto. 1999. Argentina. Pp 332.
26. Gangwere, S. K., M. C. Muraliranga & M. Muraliranga. 1997. *The Bionomics Grasshoppers, katyids and their kin*. CAB International. Madras, India. Pp 529.
27. García Gutiérrez C. (2013). *Desarrollo de bioinsecticidas micro y nanoencapsulados para el control de plagas de tomate*. (Informe técnico parcial) Instituto politécnico nacional. Proyecto interdisciplinario 1539. Pp 48. México.
28. Garret, S.D. (1981). *Soil Fungi and Soil Fertility. An Introduction to Soil Mycology*. 2nd edition. Pergamon Press. Oxford. EUA. Pp 150.
29. Gerber G. H. (1975). Reproductive behaviour and phisiology of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). II. Egg development and oviposition in young females and the effects of mating. 107: 551-559.
30. Gonzales- Cárdenas, J. C., Maruri- García J.M., Gonzales-Acosta, A. (2005). Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma sp.* Contra *Fusarium oxysporum*, agente causal de la pudrición de plántulas de papaya (*Caruca papaya* L.) en Tuxpan Veracruz, México. *Revista ODU agrícola* 1:45.57.
31. Guillen-Navarro. G. K., Marque-Rocha. F., Sanchez-Vazquez. J. E. (1998). Producción de biomasa y enzimas lignolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología*. 15: 302-306.
32. Hartl L., Zach S., Seidl-Seiboth V. (2012). Fungal Chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied Microbiology Biotechnology*. 93:533-543.
33. Hölker. U. M and Höfer. J. L. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology Biotechnology* 64:175-186.
34. Huiping LI, Dazhuang H, Zhigang W. (2011). Potential of *Beauveria bassiana* for biological control of *Apriona Germari*. *Agricultural Sciences in china*, 5(4): 666-670.
35. Humber Richard A, (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of invertebrate pathology* 98:262-266.
36. Infante D., Martínez, B., González. Reyes Y. (2009). Mecanismo de acción de trichoderma frente a hongos fitopatógenos. *Protección vegetal* 24: 14-21

-
37. Jiménez, G. J. (1996). Patogenocidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. Tesis de maestría en Biotecnología, Universidad Javeriana de Colombia. Colombia.
38. Krieger de Moraes C., Schrank A., Vainstein MH. 2003. Regulation of extracellular Chitinases and Proteases in the entomopathogen y acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology*. 46: 205-210.
39. Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
40. Lee, Y. (2005). Cultivation of entomopathogenic fungi for the search of antibacterial compounds. *Mycopathologia* 160: 321-325.
41. Liu S., Sun J., Yu L., Zhang C., Bi J., Zhu F., Qu M., Jiang C and Yang Q. Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules* 17: 4604-4611.
42. Liu B.L. (2003). Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 6:1-6.
43. Matheny P. B, Aime MC, Bougher NL, Buyck B, Trappe JM. (2009) .Out of the palaeotropics historical biogeography and diversification of the cosmopolitan ectomycorrhizal mushroom family inocybaceae. *Journal of Medical Biography*, 36:577-592.
44. Matsumoto Y, Saucedo C.G, Revah S, Shirai K. (2004). Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry* 39 665–671
45. Mejia J.S, Waliszewski N.K, Garcia A.M, Cruz R.C. (2006). The use of crude shrimp shell powder for chitinase production by *Serratia marcescens* WF. *Food Technology. Biotechnology*. 44:95-100.
46. Mena. S. (2011). Evaluación de hongos entomopatógenos como potencial biocontrolador de la hormiga arriera *Atta colombica* (G.) del municipio de Lloró – Chocó. Tesis de maestría, Universidad de Colombia. Pp 112.
47. Méndez-Zavala. A., Contreras-Esquivel, J.C., Lara-Victoriano., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. (2007). Producción fúngica de un pigmento rojo empleando la cepa xerolífica *Penicillium purpurogenum* GH-2. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6:267-273.

-
48. Merzendofer, H. Lars Z. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin Synthases and Chitinases. *Experimental Biology* 206: 4393-4412.
49. Miller G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
50. Moat, G.A, Foster, J.W. (1995). *Microbial physiology*. Third edition, EUA, pp. 575.
51. Montesinos MR. (2012). Relación de la inducción/represión de enzimas hidrolíticas con la infectividad en cepas de *Beauveria bassiana* resistentes a 2-desoxi-D glucosa. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
52. Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 63. 95-103.
53. Munkacsi AB, Pan JJ, Villensen P, Mueller UG, McLaughlin DJ. (2004). Convergent coevolution in the domestication of coral mushrooms by fungus-growing ants. *Proceedings of the Royal Society B; Biological Sciences* 271:1777-1782.
54. Mustafa, M. U. Kaur G. (2010). Studies on extracellular enzyme production in *Beauveria bassiana* isolates. *Journal of biotechnology and biochemistry* 6:701-713.
55. Plascencia J.M, Martinez C.P, Jaime Q.A, Velez H.J, Quintana O.E. (2012)., Gonzales. A. (Eds). Quitosano y control biológico como alternativas naturales para el control de hongos filamentosos en alimentos; En *Nuevas tendencias en ciencia y tecnología de alimentos*. Edit Trillas. México.
56. Otte D. 1995. Orthoptera Species File 4. Grasshoppers [Acridomorpha] C. Acridoidea (part). *Publications in Orthop-teran Diversity*. Academy of Natural Sciences and Orthop-terists' Society. Pp 18.
57. Ortiz-Catón. M., Alatorre-Rosas, A.R., Valdivia- Bernal, R., Ortiz-Catón .A., Medina-Torres. R., Alejo-Santiago. G. (2011). Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo de los hongos entomopatógenos. *Biociencias* 1: 42-53
58. Prado, B. L.A., Huerta, O.S., Rodríguez, S.G., Saucedo, C.G. (1999). Purificación En *Avances en purificación y aplicación de enzimas en Biotecnología*. Departamento de Biotecnología, CBS. Pp.367:89-100. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México.
59. Ramírez Coronel, M.A. Purificación y caracterización de una tanasa de *Aspergillus niger* Aa20, producida por fermentación en medio sólido. [Tesis de maestría en Biología Experimental]. Francia-México, 2000.

-
60. Ramírez-Coutiño, L.P (2009). Producción de quitinasas y proteasas de *Verticillium fungicola* y su evaluación en la hidrólisis de quitina para la producción de quitin-oligómeros. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana México.
61. Ren Y.K.E., Chang. F.N. (2000). Deficiency of current methods in assaying endochitinase activity. *Biochemical and biophysical research communications* 268:302-305.
62. Rocha P.Z. (2009). Estudio de la producción de quitinasas, proteasas e hidrofobinas de *Lecanicillium lecanii* en cultivos líquido y sólido utilizando diversas fuentes de carbono. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
63. Srivastara, D. (2009). Prospective role of insecticides of fungal origin: *Entomology*. 39: 341-355.
64. St. Leger R.J, Cooper M.R, Charnley K.A. (1986 a). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of Microbiology*, 132, 1509-1517.
65. St. Leger R.J, Charnley K.A, Cooper M.R. (1986 b). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*. 48:85-95.
66. St. Leger RJ, Goettel M, Roberts DW, Staples RC (1991). Prepenetration events during the infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 58:168–179.
67. St. Leger, R. J., Nelson, J. O. Screen, S. E. (1999). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology* 14: 2691-2699.
68. Swiontek B. Jankiewicz. (2012). Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. *Current Microbiology*, 65:666-672.
69. Taylor Jw, Berbee ML. (2006) Dating divergences in the fungal tree of life: review and new analyses. *Mycology* 98:83-84.
70. The National Center for Biotechnology information (NCBI). (2011). www.ncbi.nlm.nih.com
71. Tronsmo, A. Harman, GE. (1993). Detection and quantification of N-acetyl-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry. Methods in the Biological Sciences* 208: 74-79.

72. Ulloa Miguel y Herrera Teófilo, (1990). El reino de los hongos, micología básica y aplicada. UNAM, México, DF, Edt Trillas. Pp 1123:19-66. México.

73. Vega, FE y Blackwell M (2005). Insect-Fungal Associations Ecology and Evolution. Oxford University Press. Inc. USA. Pp 352.

74. Viniegra G, Favela T.E, Aguilar C.N, Romero S, Augur C. (2003). Advantages of funga enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. Journal of Biochemical Engineering 13:1157-167.

75. Wrainght, S.G., Douglas I.G. (2007). Fung in the freld manual of techniques. Invertebrate Pathology, 23: 223-248.

76. Zimmermann G (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beuaveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology 17:553-596.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla. 11

Composición del medio Czapeck modificado (Cira et al, 2002). Empleado para la producción de quitinasas de *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp.*

Reactivo	Cantidad g/L
Quitina cruda ¹	10
NaNO ₃	1
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5
KCl	0.5
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0.5
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.01

¹Cira et al, 2002

Anexo 2

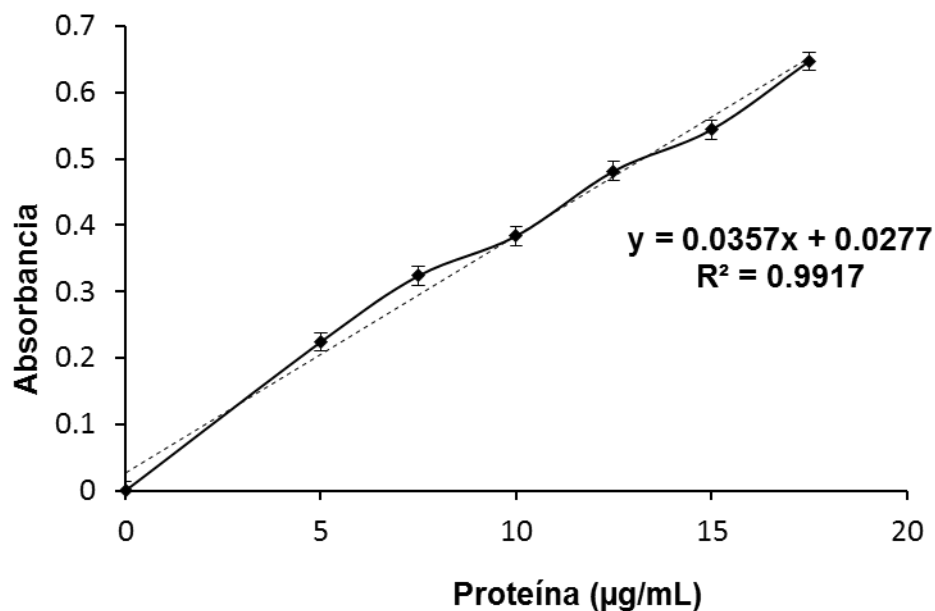


Figura 48. Curva estándar de proteína empleando seroalbúmina bovina (BSA) como referencia. Método de micro ensayo de Bradford (1976).

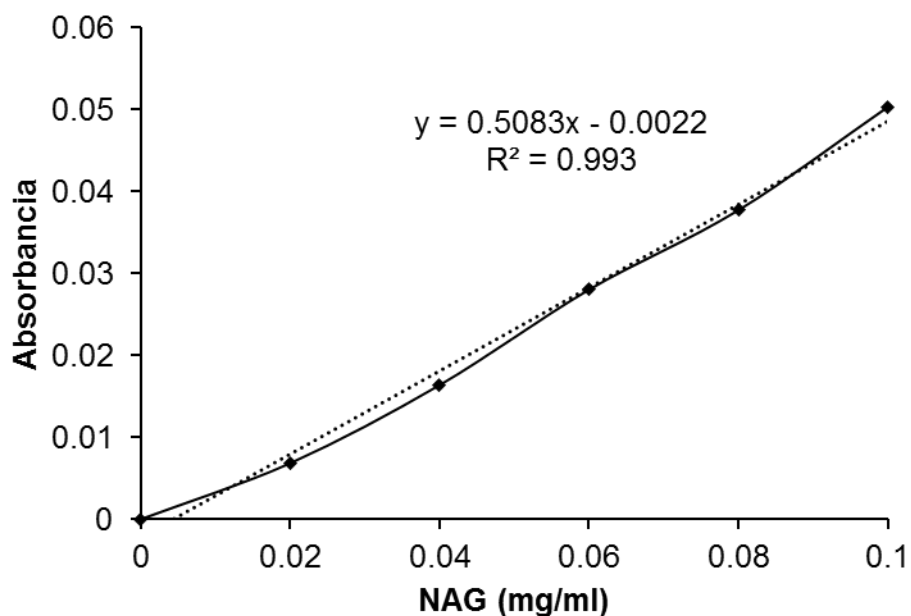


Figura 49. Curva estándar de reductores empleando N-acetilglucosamina (NAG) como estándar. Método de Miller (1954)

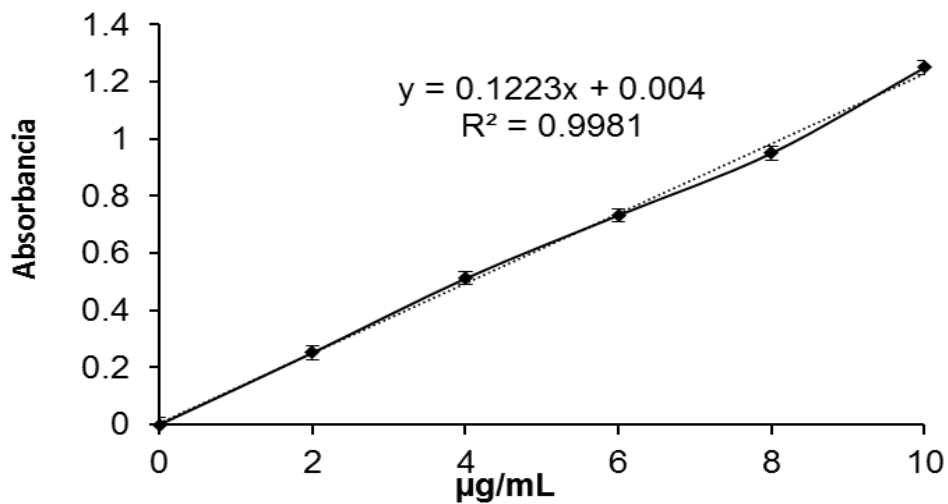


Figura 50. Curva estándar de N-acetilhexosaminidasa por el método de Tronsmo y Harman (1993) empleando una solución patrón de *p*-nitrofenol a una concentración de 100 µg/mL.

Anexo 3

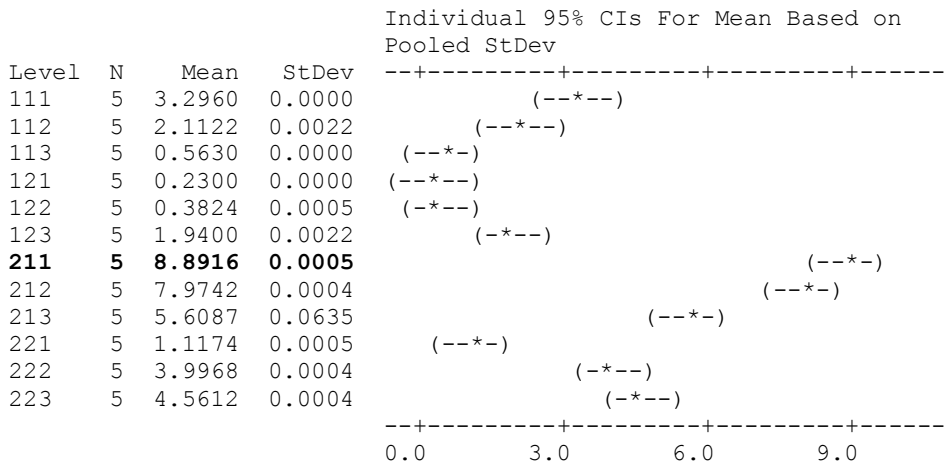
1. Efecto de la desproteínización sobre la actividad NHasa con *Beauveria bassiana* y *Pencillium sp* utilizando sustratos de chapulín, escarabajo y camarón.

Prueba de Medias

One-way ANOVA: NHasa versus Tratamientos

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamientos	11	463.845	42.168	58.30	0.000
Error	48	34.716	0.723		
Total	59	498.561			

S = 0.8504 R-Sq = 99.04% R-Sq (adj) = 99.44%



Pooled StDev = 0.8504

Grouping Information Using Fisher Method

Tratamientos	N	Mean	Grouping
211	5	8.8916	A
212	5	7.9742	A
213	6	5.6087	B
223	5	4.5612	C
222	5	3.9968	C D
111	5	3.2960	D
112	5	2.1122	E
123	5	1.9400	E
221	5	1.1174	E F
113	5	0.5630	F
122	5	0.3824	F
121	4	0.2300	F

Means that do not share a letter are significantly different.

Fisher 95% Individual Confidence Intervals
 All Pairwise Comparisons among Levels of Tratamientos

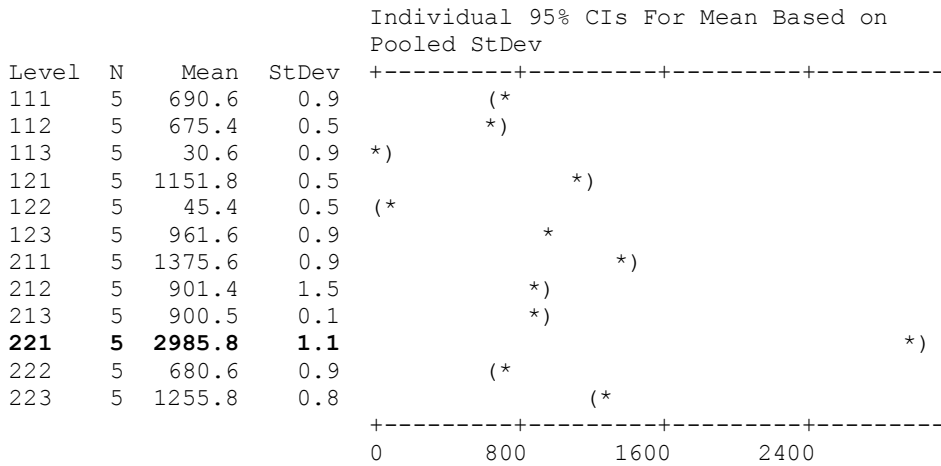
Tratamiento	Descripción
111	Tratamiento; SD a pH y temperatura reportados ,con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
112	Tratamiento; SD a pH y temperatura reportados ,con <i>Bb</i> , , sustrato escarabajo
113	Tratamiento; SD a pH y temperatura reportados ,con <i>Bb</i> , , sustrato camarón
121	Tratamiento; SD a pH y temperatura reportados ,con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
122	Tratamiento; SD a pH y temperatura reportados ,con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
123	Tratamiento; SD a pH y temperatura reportados ,con <i>Psp</i> , sustrato camarón
211	Tratamiento; con D a pH y temperatura reportados, con <i>Bb</i>, sustrato chapulín
212	Tratamiento; con D a pH y temperatura reportados, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
213	Tratamiento; con D a pH y temperatura reportados, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
221	Tratamiento; con D a pH y temperatura reportados, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
222	Tratamiento; con D a pH y temperatura reportados, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
223	Tratamiento; con D a pH y temperatura reportados, con <i>Psp</i> , sustrato camarón

2. Efecto de la desproteínización sobre la actividad endoquitinasa con *Beauveria bassiana* y *Pencillium sp* utilizando sustratos de chapulín, escarabajo y camarón.

One-way ANOVA: Endoquitinasa versus Tratamientos

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamientos	11	31662510	2878410	1848.65	0.000
Error	48	74737	1557		
Total	59	31737248			

S = 39.46 R-Sq = 99.76% R-Sq(adj) = 99.71%



Pooled StDev = 39.5

Grouping Information Using Fisher Method

Tratamientos	N	Mean	Grouping
221	5	2985.8	A
211	5	1375.6	B
223	5	1255.8	C
121	4	1151.8	D
123	5	961.6	E
212	5	901.4	F
213	6	900.5	F
111	5	690.6	G
222	5	680.6	G
112	5	675.4	G
122	5	45.4	H
113	5	30.6	H

Means that do not share a letter are significantly different.

Fisher 95% Individual Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Tratamientos

Simultaneous confidence level = 31.58%

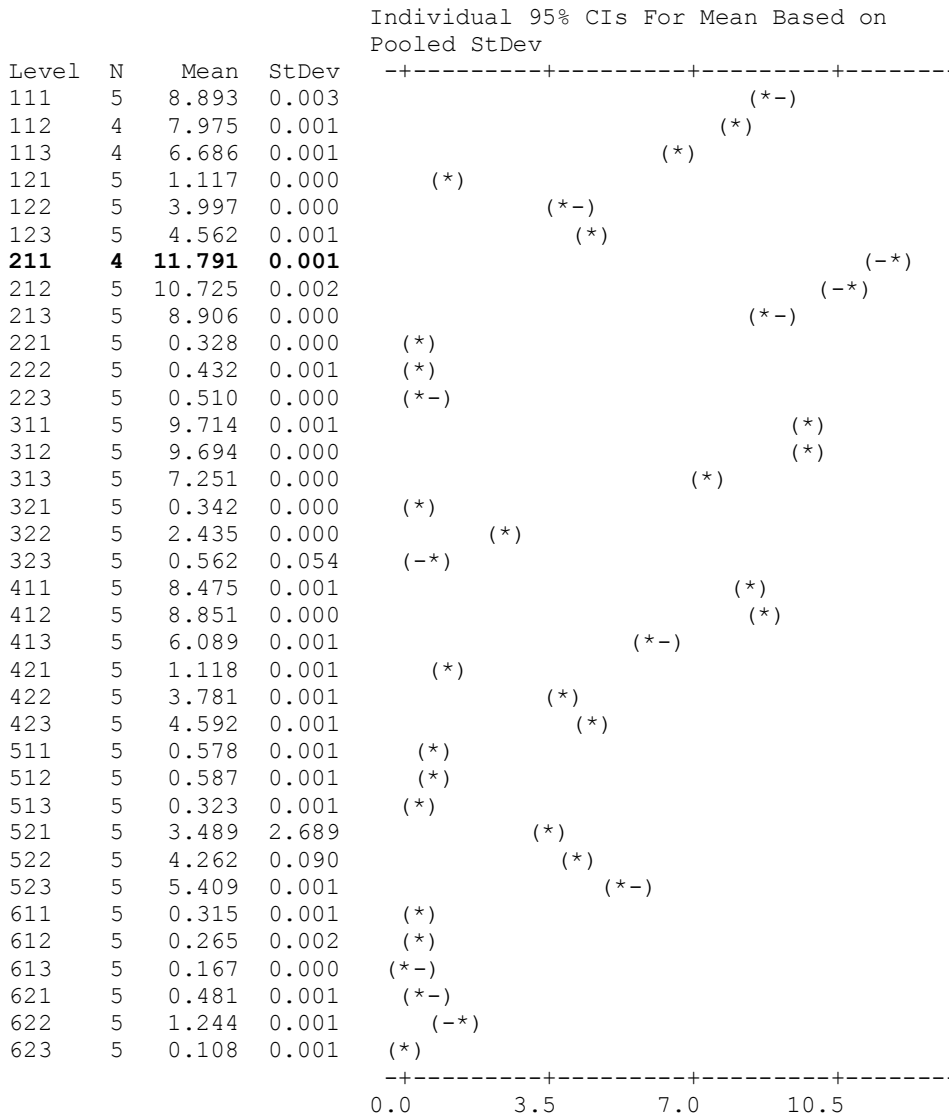
Tratamiento	Descripción
111	Tratamiento; SD a pH y temperatura reportados ,con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
112	Tratamiento; SD a pH y temperatura reportados ,con <i>Bb</i> , , sustrato escarabajo
113	Tratamiento; SD a pH y temperatura reportados ,con <i>Bb</i> , , sustrato camarón
121	Tratamiento; SD a pH y temperatura reportados ,con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
122	Tratamiento; SD a pH y temperatura reportados ,con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
123	Tratamiento; SD a pH y temperatura reportados ,con <i>Psp</i> , sustrato camarón
211	Tratamiento; con D a pH y temperatura reportados, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
212	Tratamiento; con D a pH y temperatura reportados, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
213	Tratamiento; con D a pH y temperatura reportados, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
221	Tratamiento; con D a pH y temperatura reportados, con <i>Psp</i>, sustrato chapulín
222	Tratamiento; con D a pH y temperatura reportados, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
223	Tratamiento; con D a pH y temperatura reportados, con <i>Psp</i> , sustrato camarón

3. Efecto del pH inicial sobre la actividad NHasa con *Beauveria bassiana* y *Pencillium sp* utilizando sustratos de chapulín, escarabajo y camarón.

One-way ANOVA: NHasa versus Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamiento	35	2418.346	69.096	336.22	0.000
Error	141	28.976	0.206		
Total	176	2447.322			

S = 0.4533 R-Sq = 98.82% R-Sq(adj) = 98.52%



Pooled StDev = 0.453

Grouping Information Using Fisher Method

Tratamiento	N	Mean	Grouping
211	4	11.791	A
212	5	10.725	B
311	5	9.714	C
312	5	9.694	C
213	5	8.906	D
111	5	8.893	D
412	5	8.851	D
411	5	8.475	D E
112	4	7.975	E
313	5	7.251	F
113	4	6.686	F G
413	5	6.089	G
523	5	5.409	H
423	5	4.592	I
123	5	4.562	I J
522	5	4.262	I J K
122	5	3.997	J K L
422	5	3.781	K L
521	5	3.489	L
322	5	2.435	M
622	5	1.244	N
421	5	1.118	N O
121	5	1.117	N O
512	5	0.587	O P
511	5	0.578	O P
323	5	0.562	O P
223	5	0.510	P
621	5	0.481	P
222	5	0.432	P
321	5	0.342	P
221	5	0.328	P
513	5	0.323	P
611	5	0.315	P
612	5	0.265	P
613	5	0.167	P
623	5	0.108	P

Means that do not share a letter are significantly different.

Fisher 95% Individual Confidence Intervals
 All Pairwise Comparisons among Levels of Tratamiento

Simultaneous confidence level = 0.93%

Tratamiento	Descripción
111	Tratamiento; a pH y temperatura reportados ,con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
112	Tratamiento; a pH y temperatura reportados ,con <i>Bb</i> , , sustrato escarabajo
113	Tratamiento; a pH y temperatura reportados ,con <i>Bb</i> , , sustrato camarón
121	Tratamiento; a pH y temperatura reportados ,con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
122	Tratamiento; a pH y temperatura reportados ,con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
123	Tratamiento; a pH y temperatura reportados ,con <i>Psp</i> , sustrato camarón
211	Tratamiento; a pH 3 y temperatura reportada, con <i>Bb</i>, sustrato chapulín
212	Tratamiento; a pH 3 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
213	Tratamiento; a pH3 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
221	Tratamiento; a pH 3 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
222	Tratamiento; a pH 3 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
223	Tratamiento; a pH 3 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato camarón
311	Tratamiento; a pH 4 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
312	Tratamiento; a pH 4 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
313	Tratamiento; a pH 4 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
321	Tratamiento; a pH 4 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
322	Tratamiento; a pH 4 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
323	Tratamiento; a pH 4 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
411	Tratamiento; a pH 5 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
412	Tratamiento; a pH5 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
413	Tratamiento; a pH 5 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
421	Tratamiento; a pH 5 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
422	Tratamiento; a pH 5 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
423	Tratamiento; a pH 5 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato camarón
511	Tratamiento; a pH 6 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
512	Tratamiento; a pH 6 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo

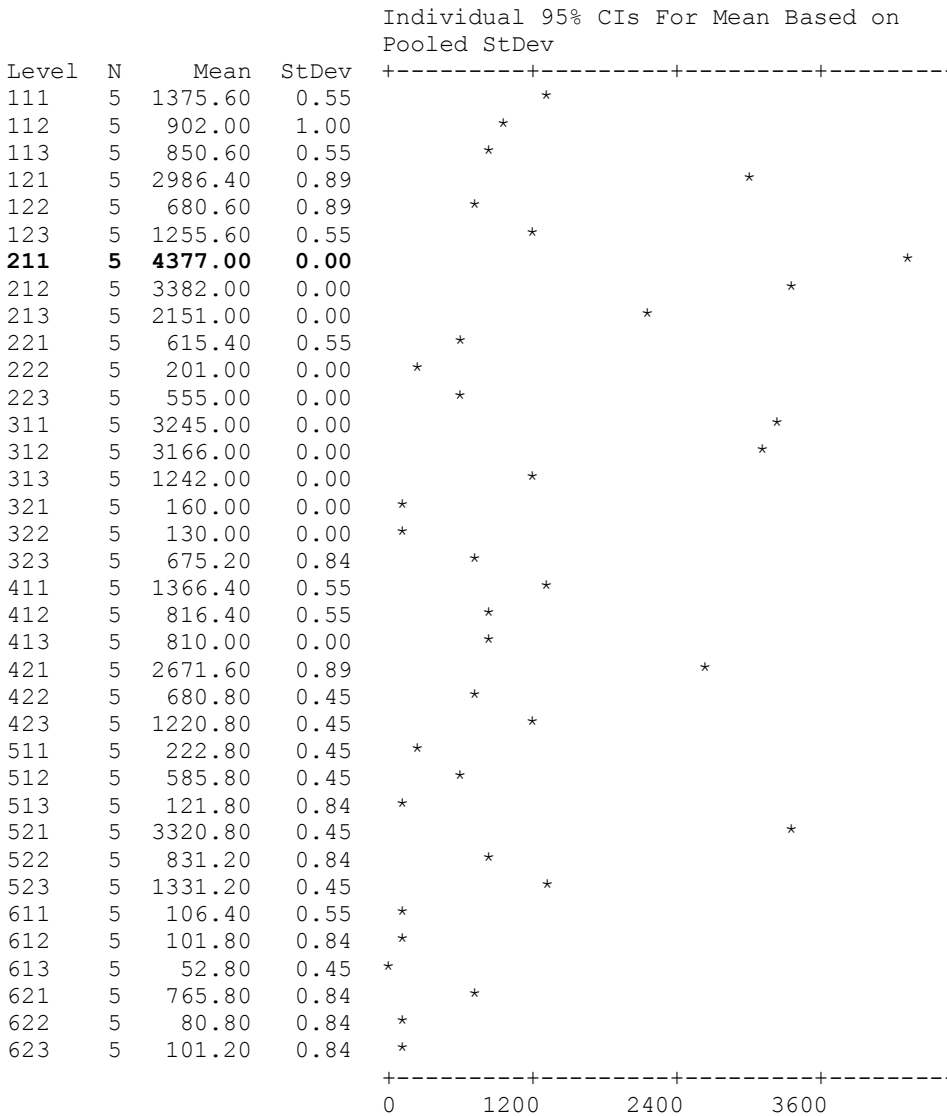
513	Tratamiento; a pH 6 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
521	Tratamiento; a pH 6 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
522	Tratamiento; a pH 6 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
523	Tratamiento; a pH 6 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato camarón
611	Tratamiento; a pH 7 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
612	Tratamiento; a pH 7 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
613	Tratamiento; a pH 7 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
621	Tratamiento; a pH 7 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
622	Tratamiento; a pH 7 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
623	Tratamiento; a pH 7 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato camarón

4. Efecto del pH inicial sobre la actividad endoquitinasas con *Beauveria bassiana* y *Pencillium sp* utilizando sustratos de chapulín, escarabajo y camarón.

One-way ANOVA: Endoquitinasa versus Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamiento	35	240230097	6863717	20940153.70	0.000
Error	144	47	0		
Total	179	240230144			

S = 0.5725 R-Sq = 100.00% R-Sq(adj) = 100.00%



Pooled StDev = 0.57

Grouping Information Using Fisher Method

Tratamiento	N	Mean
211	5	4377.00
212	5	3382.00
521	5	3320.80
311	5	3245.00
312	5	3166.00
121	5	2986.40
421	5	2671.60
213	5	2151.00
111	5	1375.60
411	5	1366.40
523	5	1331.20
123	5	1255.60
313	5	1242.00
423	5	1220.80
112	5	902.00
113	5	850.60
522	5	831.20
412	5	816.40
413	5	810.00
621	5	765.80
422	5	680.80
122	5	680.60
323	5	675.20
221	5	615.40
512	5	585.80
223	5	555.00
511	5	222.80
222	5	201.00
321	5	160.00
322	5	130.00
513	5	121.80
611	5	106.40
612	5	101.80
623	5	101.20
622	5	80.80
613	5	52.80

Tratamiento	Grouping
211	A
212	B
521	C
311	D
312	E
121	F
421	G
213	H
111	I
411	J
523	K
123	L
313	M
423	N
112	O
113	P
522	Q
412	R
413	S
621	T
422	U
122	U
323	V
221	W

512
 223
 511
 222
 321
 322
 513
 611
 612

X
 Y
 Z
 AA
 AB
 AC
 AD
 AE

Means that do not share a letter are significantly different.

Fisher 95% Individual Confidence Intervals
 All Pairwise Comparisons among Levels of Tratamiento

Simultaneous confidence level = 0.93%

Tratamiento	Descripción
111	Tratamiento; a pH y temperatura reportados ,con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
112	Tratamiento; a pH y temperatura reportados ,con <i>Bb</i> , , sustrato escarabajo
113	Tratamiento; a pH y temperatura reportados ,con <i>Bb</i> , , sustrato camarón
121	Tratamiento; a pH y temperatura reportados ,con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
122	Tratamiento; a pH y temperatura reportados ,con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
123	Tratamiento; a pH y temperatura reportados ,con <i>Psp</i> , sustrato camarón
211	Tratamiento; a pH 3 y temperatura reportada, con <i>Bb</i>, sustrato chapulín
212	Tratamiento; a pH 3 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
213	Tratamiento; a pH 3 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
221	Tratamiento; a pH 3 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
222	Tratamiento; a pH 3 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
223	Tratamiento; a pH 3 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato camarón
311	Tratamiento; a pH 4 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
312	Tratamiento; a pH 4 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
313	Tratamiento; a pH 4 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
321	Tratamiento; a pH 4 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
322	Tratamiento; a pH 4 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo

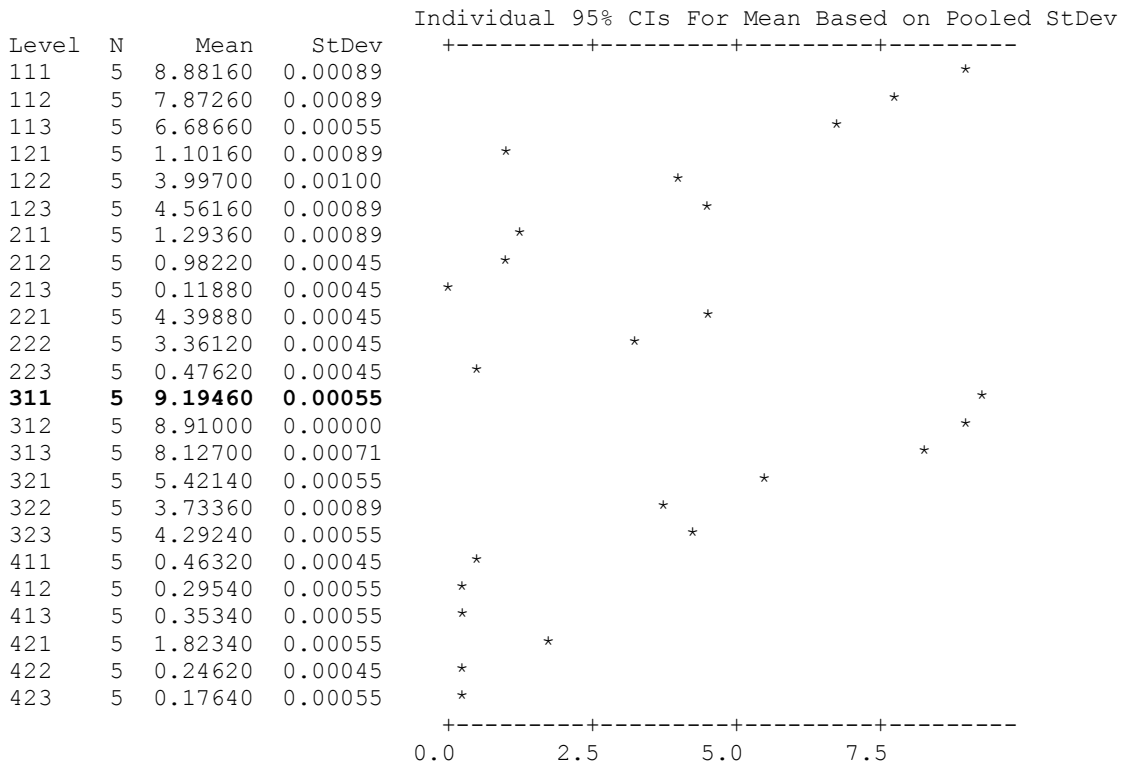
323	Tratamiento; a pH 4 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
411	Tratamiento; a pH 5 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
412	Tratamiento; a pH5 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
413	Tratamiento; a pH 5 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
421	Tratamiento; a pH 5 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
422	Tratamiento; a pH 5 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
423	Tratamiento; a pH 5 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato camarón
511	Tratamiento; a pH 6 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
512	Tratamiento; a pH 6 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
513	Tratamiento; a pH 6 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
521	Tratamiento; a pH 6 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
522	Tratamiento; a pH 6 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
523	Tratamiento; a pH 6 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato camarón
611	Tratamiento; a pH 7 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
612	Tratamiento; a pH 7 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
613	Tratamiento; a pH 7 y temperatura reportada, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
621	Tratamiento; a pH 7 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
622	Tratamiento; a pH 7 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
623	Tratamiento; a pH 7 y temperatura reportada, con <i>Psp</i> , sustrato camarón

4. Efecto de la temperatura sobre la actividad NHasa con *Beauveria bassiana* y *Pencillium sp* utilizando sustratos de chapulín, escarabajo y camarón.

One-way ANOVA: Nhasa versus Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamiento	23	1194.851	51.950	1.23446E+08	0.000
Error	96	0.000	0.000		
Total	119	1194.851			

S = 0.0006487 R-Sq = 100.00% R-Sq(adj) = 100.00%

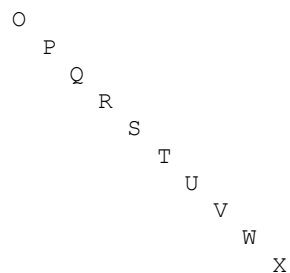


Pooled StDev = 0.00065

Grouping Information Using Fisher Method

Tratamiento	N	Mean	Grouping
311	5	9.19460	A
312	5	8.91000	B
111	5	8.88160	C
313	5	8.12700	D
112	5	7.87260	E
113	5	6.68660	F
321	5	5.42140	G
123	5	4.56160	H
221	5	4.39880	I
323	5	4.29240	J
122	5	3.99700	K
322	5	3.73360	L
222	5	3.36120	M
421	5	1.82340	N

211	5	1.29360
121	5	1.10160
212	5	0.98220
223	5	0.47620
411	5	0.46320
413	5	0.35340
412	5	0.29540
422	5	0.24620
423	5	0.17640
213	5	0.11880



Means that do not share a letter are significantly different.

Fisher 95% Individual Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Tratamiento

Simultaneous confidence level = 5.74%

Tratamiento	Descripción
111	Tratamiento; a temperatura y pH reportado, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
112	Tratamiento; a temperatura y pH reportado, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
113	Tratamiento; a temperatura y pH reportado, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
121	Tratamiento; a temperatura y pH reportado, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
122	Tratamiento; a temperatura y pH reportado, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
123	Tratamiento; a temperatura y pH reportado, con <i>Psp</i> , sustrato camarón
211	Tratamiento; a temperatura 20°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
212	Tratamiento; a temperatura 20°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
213	Tratamiento; a temperatura 20°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
221	Tratamiento; a temperatura 20°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
222	Tratamiento; a temperatura 20°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
223	Tratamiento; a temperatura 20°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato camarón
311	Tratamiento; a temperatura 25°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i>, sustrato chapulín
312	Tratamiento; a temperatura 25°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
313	Tratamiento; a temperatura 25°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato camarón

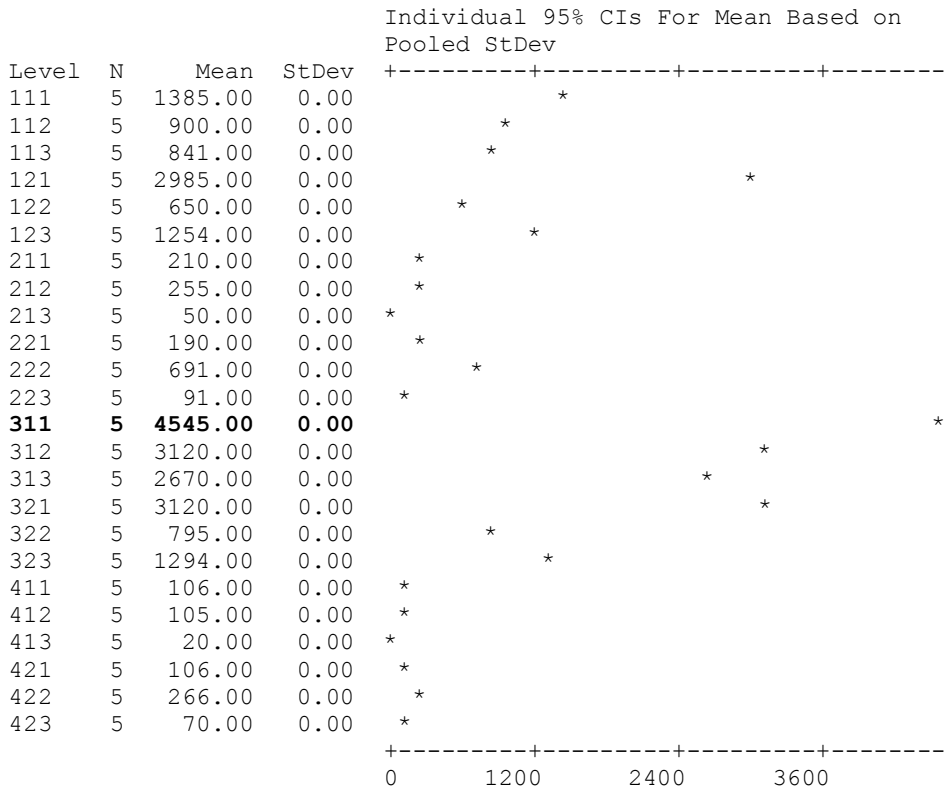
	camarón
321	Tratamiento; a temperatura 25°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
322	Tratamiento; a temperatura 25°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
323	Tratamiento; a temperatura 25°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato camarón
411	Tratamiento; a temperatura 30°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
412	Tratamiento; a temperatura 30°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
413	Tratamiento; a temperatura 30°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
421	Tratamiento; a temperatura 30°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
422	Tratamiento; a temperatura 30°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
423	Tratamiento; a temperatura 30°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato camarón

5. Efecto de la temperatura sobre la actividad endoquitinasa con *Beauveria bassiana* y *Pencillium sp* utilizando sustratos de chapulín, escarabajo y camarón.

One-way ANOVA: endoquitinasa versus Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamiento	23	185419248	8061706	*	*
Error	96	0	0		
Total	119	185419248			

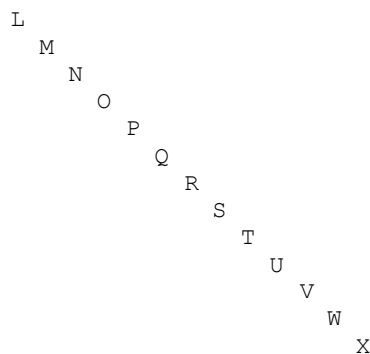
S = 0 R-Sq = 100.00% R-Sq(adj) = 100.00%



Grouping Information Using Fisher Method

Tratamiento	N	Mean	Grouping
311	5	4545.00	A
321	5	3120.00	B
312	5	3120.00	C
121	5	2985.00	D
313	5	2670.00	E
111	5	1385.00	F
323	5	1294.00	G
123	5	1254.00	H
112	5	900.00	I
113	5	841.00	J
322	5	795.00	K

222	5	691.00
122	5	650.00
422	5	266.00
212	5	255.00
211	5	210.00
221	5	190.00
421	5	106.00
411	5	106.00
412	5	105.00
223	5	91.00
423	5	70.00
213	5	50.00
413	5	20.00



Means that do not share a letter are significantly different.

Fisher 95% Individual Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Tratamiento

Simultaneous confidence level = 5.74%

Tratamiento	Descripción
111	Tratamiento; a temperatura y pH reportado, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
112	Tratamiento; a temperatura y pH reportado, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
113	Tratamiento; a temperatura y pH reportado, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
121	Tratamiento; a temperatura y pH reportado, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
122	Tratamiento; a temperatura y pH reportado, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
123	Tratamiento; a temperatura y pH reportado, con <i>Psp</i> , sustrato camarón
211	Tratamiento; a temperatura 20°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
212	Tratamiento; a temperatura 20°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
213	Tratamiento; a temperatura 20°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
221	Tratamiento; a temperatura 20°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
222	Tratamiento; a temperatura 20°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
223	Tratamiento; a temperatura 20°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato camarón
311	Tratamiento; a temperatura 25°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i>, sustrato chapulín

312	Tratamiento; a temperatura 25°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
313	Tratamiento; a temperatura 25°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
321	Tratamiento; a temperatura 25°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
322	Tratamiento; a temperatura 25°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
323	Tratamiento; a temperatura 25°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato camarón
411	Tratamiento; a temperatura 30°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato chapulín
412	Tratamiento; a temperatura 30°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato escarabajo
413	Tratamiento; a temperatura 30°C y pH de mayor producción, con <i>Bb</i> , sustrato camarón
421	Tratamiento; a temperatura 30°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato chapulín
422	Tratamiento; a temperatura 30°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato escarabajo
423	Tratamiento; a temperatura 30°C y pH de mayor producción, con <i>Psp</i> , sustrato camarón

Anexo 4

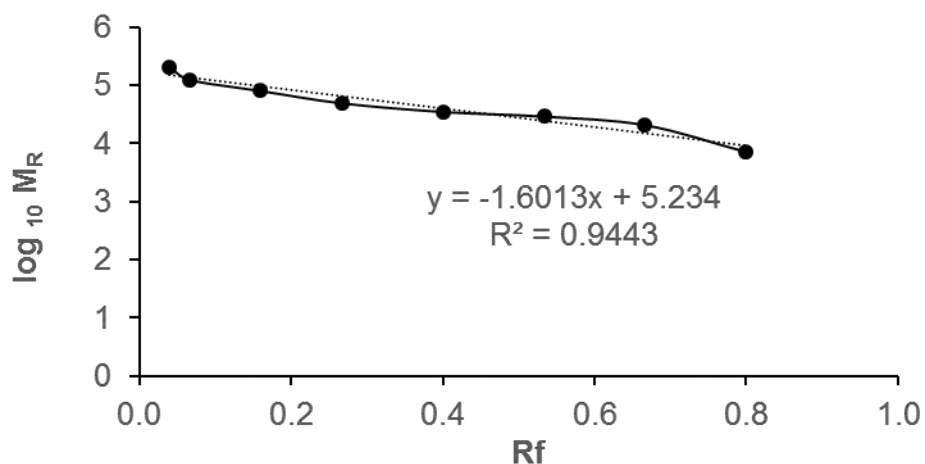


Figura 51. Curva estándar para la determinación de la masa molecular relativa (MR) de proteínas de *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp* con sustratos sin desproteínizar mediante SDS-PAGE (Laemli, 1970). Se emplearon los valores de movilidad relativa (R_f) de proteínas conocidas (Tabla 11) presentes en marcador de amplio espectro (BioRad).

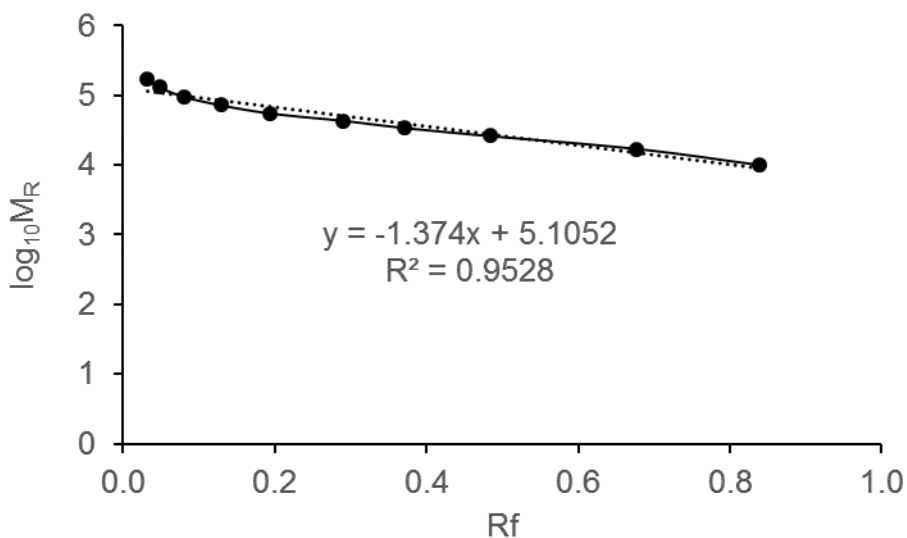


Figura 52. Curva estándar para la determinación de la masa molecular relativa (MR) de proteínas de *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp* con sustratos desproteínizados mediante SDS-PAGE (Laemli, 1970). Se emplearon los valores de movilidad relativa (R_f) de proteínas conocidas (Tabla 12) presentes en marcador de amplio espectro (FERMENTAS).

Anexo 5

Tabla 12. Valores de masa molecular relativa (*MR*) y movilidad relativa (*Rf*) de las proteínas presentes en marcador de amplio espectro (BioRad).

Proteína	M_R (kDa)	R_f
Miosina	(209 kDa)	0.04
B-galactosidasa	(124 kDa)	0.07
Seroalbúmina bovina)	(80 kDa)	0.16
Ovoalbúmina	(49.1)	0.27
Anhidrasa carbónica	(34.8)	0.40
Inhibidor tripsina de soya	(26.9)	0.53
Lisozima	(20.6 kDa)	0.67
Aprotinina	(7.1 kDa)	0.80

Tabla 13. Valores de masa molecular relativa (*MR*) y movilidad relativa (*Rf*) de las proteínas presentes en marcador de amplio espectro (FERMENTAS).

M_R (kDa)	R_f
(209 kDa)	0.04
(124 kDa)	0.07
(80 kDa)	0.16
(49.1)	0.27
(34.8)	0.40
(26.9)	0.53
(20.6 kDa)	0.67
(7.1 kDa)	0.80

11. TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

Jiménez A. S. E, Amador M. A, Nuñez-Gaona. O, Ramírez-Coutiño. L. P. Fermentación de desechos quitinosos y obtención de compuestos de interés biotecnológico como alternativa a la disminución de contaminantes de origen orgánico, en el XIII congreso Internacional y XIX congreso nacional de ciencias ambientales: gestión sustentable, una necesidad ante el cambio climático por la academia nacional de ciencias ambientales. Acapulco Guerrero. México. Junio, 11-13, 2014.

Jiménez A. S. E, Amador M. A, Nuñez-Gaona. O, Ramírez-Coutiño. L. P. Fermentación líquida como herramienta biotecnológica para la obtención de quitinasas con *Beauveria bassiana*. III simposio nacional de herramientas biotecnológicas para una agricultura sustentable. Zacatecas, México. Septiembre, 23-26, 2014.

Jiménez A. S. E, Amador M. A, Nuñez-Gaona. O, Ramírez-Coutiño. L. P. Evaluación de la temperatura óptima de producción de enzimas quitinolíticas de un hongo entomopatógeno (*Beauveria bassiana*) utilizando diferentes sustratos quitinosos en el XXXVII congreso nacional de control biológico. Mérida Yucatán, México. Noviembre, 5-7, 2014.

Jiménez A. S. E, Amador M. A, Nuñez-Gaona. O, Ramírez-Coutiño. L. P. Evaluación de la desproteínización sobre la producción de quitinasas en medio líquido empleando un hongo fitopatógeno (*Penicillium sp*), utilizando tres fuentes de sustrato, en el XXXVII congreso nacional de control biológico. Mérida, Yucatán, México. Noviembre, 5-7, 2014.