

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZACIÓN DE LOS PERFILES
ENZIMÁTICOS DE *Beauveria bassiana* 885.2 EN
FERMENTACIÓN LÍQUIDA UTILIZANDO CHAPULÍN
COMO INDUCTOR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:

IVONNE JANETH AZAMAR JIMÉNEZ

ASESOR:

DR. OSCAR NUÑEZ GAONA

COASESOR:

DRA. LAURA PATRICIA RAMIREZ COUTIÑO



SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

ENERO, 2016

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Papaloapan, por formar parte de mi crecimiento como profesionista. Al CONACYT por la beca otorgada (clave del proyecto: CB-2011/169477).

Al mis asesores, Dr. Oscar Núñez Gaona y a la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño por su disposición y esfuerzos para dirigir esta tesis, y por la confianza de concederme la libertad para realizar el presente trabajo, con el cual expreso mi gratitud.

A mis revisores, Dra. Ana Karin Navarro, Dr. Andrés Aguirre Cruz y el Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo por sus valiosas correcciones, aportaciones, sugerencias y consejos.

Así como a la Dra. Ana Karin Navarro por toda su paciencia, apoyo y orientación que siempre me ha brindado; a la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa y al Dr. Julián Mario Peña Castro por sus muy acertados consejos y por el tiempo que invertían en cada una de sus enseñanzas; la paciencia, dedicación y esfuerzo que muestran es admirable, si alguna vez busque inspiración sin duda en ustedes la encontré.

A la Dra. Jacqueline Capataz Tafur, por la amabilidad que tuvo al prestarme su equipo, y a Walter Hernández Santos por todo el tiempo y empeño que dedicó a pasar esta tesis a L^AT_EX. A Tere Zamora y Osiris García por ser las mejores amigas y estar siempre dándome ánimos para seguir; mi corazón es suyo. En verdad muchas gracias.

A cada uno de los profesores que fueron parte de mi formación a lo largo de todos estos años, sin duda cada uno aportó algo para formar al profesionista que soy y que seré. A la licenciada Yesenia por todo el apoyo, la amabilidad y comprensión que muestra para apoyarnos, siempre tan atenta y cordial. Gracias.

A Hipólito, por todas las noches que durmió en el piso, para que pudiera trabajar.

Por último, pero no menos importante, a mi familia, de alguna manera ustedes son el principal reflejo de lo que soy. Sé que nunca me han dejado, que verme terminar es un gran orgullo y que de alguna manera siempre estaremos juntos. Ustedes siempre serán lo más importante en mi existencia.

Cada uno ha sido pieza importante para la realización y término de este trabajo.

¡A todos muchas Gracias!

Ivonne Azamar

ÍNDICE GENERAL

Resumen	XII
Abstract	XIII
1. Introducción	1
2. Revisión Bibliográfica	2
2.1. Generalidades de los Hongos	2
2.1.1. Clasificación	2
2.1.2. Morfología	2
2.1.3. Metabolismo	3
2.1.4. Reproducción	4
2.2. Hongos Entomopatógenos (HEP)	4
2.2.1. Conservación y virulencia	5
2.3. <i>Beauveria bassiana</i>	6
2.3.1. Generalidades	6
2.3.2. Taxonomía	6
2.3.3. Morfología	7
2.3.4. Conidios	8
2.3.4.1. Germinación de los conidios y penetración en la cutícula de los insectos	8
2.3.4.2. Crecimiento micelial y producción de esporas	9
2.3.4.3. Producción de toxinas	10
2.4. Estructura de los insectos	10

2.5. Enzimas infectivas	12
2.5.1. Proteasas	12
2.5.2. Quitinasas	13
2.5.3. Lipasas	14
2.6. Manejo integrado de plagas (MIP)	14
2.7. Control biológico	15
2.8. Formulados biológicos	16
2.9. Identificación bioquímica API ZYM	17
3. Antecedentes	20
3.1. Antecedentes directos	20
3.1.1. Crecimiento	21
3.2. Enzimas infectivas	21
3.2.1. Proteasas	22
3.2.2. Quitinasas	24
3.2.3. Lipasas	25
3.2.4. Plagas objetivo	26
3.2.5. Virulencia	26
4. Justificación	27
5. Alcance de la tesis	29
5.1. Hipótesis	29
5.2. Objetivo general	29
5.3. Objetivos específicos	29
6. Estrategia Metodológica	30
7. Materiales y métodos	31
7.1. Microorganismo	31
7.2. Inóculo	31
7.3. Fermentación líquida	32

7.3.1.	Cuantificación de biomasa	32
7.3.2.	Obtención de los extractos enzimáticos	32
7.3.2.1.	Determinación cualitativa de la actividad enzimática mediante la prueba API ZYM	33
7.3.2.2.	Determinación de proteína soluble extracelular	33
7.3.2.3.	Determinación de proteasas alcalinas	33
7.3.2.4.	Determinación de actividad N-acetilhexosaminidasa	34
7.3.2.5.	Determinación de actividad lipasa	34
7.3.2.6.	Determinación de azúcares reductores	34
7.4.	Análisis de datos	35
7.4.1.	Análisis estadístico	35
8.	Resultados y discusiones	36
8.1.	Crecimiento	36
8.1.1.	Biomasa	36
8.1.2.	Cuantificación de conidios	38
8.2.	Pruebas cualitativas	39
8.2.1.	Determinación cualitativa de la actividad enzimática mediante galerías API ZYM	39
8.3.	Pruebas cuantitativas	41
8.3.1.	Actividad Hexosaminidasa (NHAsas)	41
8.3.2.	Proteasas	43
8.3.3.	Lipasas	46
8.3.4.	Azúcares reductores	46
8.4.	Análisis estadístico	51
8.4.1.	Concentraciones volumétricas	51
8.4.1.1.	Análisis de varianza	51
8.4.1.2.	Análisis de medias individuales para cada determinación	51
8.4.1.3.	Gráfico de intervalos individuales para cada determinación	53

8.4.2. Actividades específicas.	54
8.4.2.1. Análisis de medias individuales para cada determinación en actividad específica (AE)	54
8.4.2.2. Grafico de intervalos individuales para cada determinación en actividad específica (AE)	55
9. Conclusiones	57
10. Aportaciones y perspectivas	58
Bibliografía	B 1
A. Anexos	A1
A.1. Gráficas Estadísticas	A1
A.1.1. Análisis de medias para actividades volumétricas	A1
A.1.2. Gráficas de intervalos para actividades volumétricas	A4
A.1.3. Análisis de medias para la actividad específica (AE)	A7
A.1.4. Gráficas de intervalos para la actividad específica (AE)	A9
A.2. Curvas de Calibración	A11

ÍNDICE DE FIGURAS

2-1. Aspecto colonial de hongos con crecimiento filamentoso (F) y levaduriforme (L).	18
2-2. Morfología micelial y levaduriforme con talo reproductor y vegetativo.	18
2-3. Principales ejes del cuerpo y relaciones entre las partes de los apéndices y el cuerpo de los insectos.	19
2-4. Estructura general del tegumento de los insectos	19
8-1. Producción de biomasa por <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 con chapulín como sustrato en fermentación líquida.	37
8-2. Producción de conidios por <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 con chapulín como sustrato en fermentación líquida	39
8-3. Galería API ZYM para los diferentes tratamientos en el día de mayor actividad enzimática	42
8-4. Actividad exoquitinasas (NHasa) en función de la proteína soluble	43
8-5. Relación de proteína soluble-proteasas (Blanco)	44
8-6. Producción de proteasas en función de la proteína soluble.	45
8-7. Relación de proteína soluble-Lipasas.	47
8-8. Relación de NHasa-Azúcares reductores	48
A-1. Resultados del análisis de medias para la cuantificación volumétrica de proteína soluble.	A1
A-2. Resultados del análisis de medias para la cuantificación volumétrica de N-acetilhexosaminidasa.	A2

A-3. Resultados del análisis de medias para la cuantificación volumétrica de lipasas.	A2
A-4. Resultados del análisis de medias para la cuantificación volumétrica de azúcares reductores.	A3
A-5. Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Cuantificación volumétrica de Proteína soluble.	A4
A-6. Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Cuantificación volumétrica de N-acetilhexosaminidasa.	A5
A-7. Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Cuantificación volumétrica de proteasas.	A5
A-8. Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Cuantificación volumétrica de lipasas.	A6
A-9. Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Cuantificación volumétrica de azúcares reductores.	A6
A-10. Resultados del análisis de medias para la actividad específica de N-acetilhexosaminidasa.	A7
A-11. Resultados del análisis de medias para la actividad específica de lipasas. . . .	A8
A-12. Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Actividad específica de N-acetilhexosaminidasas.	A9
A-13. Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Actividad específica de proteasas.	A10
A-14. Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Actividad específica de lipasas.	A10
A-15. Curva estándar de proteína empleando seroalbúmina bovina (BSA) por el método de micro ensayo de Bradford (1976).	A11
A-16. Curva estándar de reductores por el método de Miller (1959) empleando N-acetilglucosamina (NAG) como estándar.	A12
A-17. Curva estándar de N-acetilhexosaminidasa por el método de Tronsmo y Harman (1993) empleando una solución madre de p-nitrofenol a una concentración de 100 μ g/mL.	A12

ÍNDICE DE TABLAS

2-1. Clasificación taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i> según el National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012)	7
2-2. Comparación entre las características de los dos tipos de unidades infectivas producidas por <i>B. bassiana</i>	9
3-1. Medios de cultivos probados como inductores y represores de enzimas infectivas	20
3-2. Actividades enzimáticas volumétricas de <i>Beauveria bassiana</i> 88 para tres tipos de concentraciones de glucosas con tres medios diferentes.	22
3-3. Actividades enzimáticas volumétricas máximas de <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 para tres tipos de sustrato.	23
3-4. Velocidades específicas de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 para sustratos, desproteinizados y sin desproteinizarse.	24
3-5. El efecto de los ácidos grasos sobre la producción de lipasas.	26
8-1. Valores estimados de los parámetros cinéticos.	38
8-2. Pruebas cualitativas galerías API ZYM. Donde 0 = reacción negativa, 1 = reacción débil, 2, 3 y 4 = reacción moderada, 5 = reacción fuertemente positiva.	41
8-3. Relación C/N para cada una de las concentraciones de inductor empleadas.	46
8-4. Resumen de los días de máxima producción enzimática. Volumétrica y actividad específica	50
8-5. TAgrupación usando método de Tukey	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
SBD YPD	Sabouraud dextrosa enriquecido con extracto de levadura.
SDA	Agar Dextrosa Sabouraud.
MM	Medio mínimo.
QG	Medio con quitina suplementado con glucosa.
AE	Actividad específica (U/mg, unidades por miligramo de proteína)
ACB	Agente de control biológico.
<i>Bb de</i>	<i>Beauveria bassiana</i> .
CB	Control biológico.
C/N	Relación carbono/nitrógeno
EDC	Enzimas degradadoras de cutícula.
HEP	Hongos entomopatógenos.
MIP	Manejo integrado de plagas.
NAGasa	Quitinasas (N-acetilglucosaminidasa).
GlcNAc NAG	N-acetilglucosamina.
NHasa	Actividad enzimática N-acetilhexosaminidasa.
tg	Tiempo de generación del hongo [h].
μ_{max}	velocidad máxima de crecimiento [h^{-1}].
Unidades infectivas:	esporas, conidios.

Resumen

El presente trabajo muestra la caracterización cualitativa y cuantitativa de la cepa 885.2 de *Beauveria bassiana*, respecto a las enzimas de más importancia en procesos de patogenicidad para hongos entomopatógenos (proteasas, quitinasas y lipasas). Se evaluó además, el efecto que tuvo la adición de chapulín a diferentes concentraciones como sustrato en cultivos líquidos que ya poseían una fuente de carbono (dextrosa al 4 %), sobre la expresión de tales enzimas. Se realizaron determinaciones de biomasa y conteo directo de conidios, para monitorear el crecimiento del hongo. Por otro lado, el perfil enzimático del hongo se determinó de manera cualitativa con galerías API ZYM (para conocer el potencial de producción de otras enzimas) y por cuantificación espectrofotométrica de las enzimas quitinasas, proteasas y lipasas.

Los resultados mostraron en términos de actividad específica, que al emplear chapulín a una concentración de 5g/L se detectó la mayor actividad de quitinasas ($0.987\text{mU}/\mu\text{g}$ proteína), mientras que para lipasas la concentración de 10g/L fue más efectiva obteniéndose $0.608\text{ mU}/\mu\text{g}$ proteína y el blanco o control fue más adecuado para la producción de proteasas. Sin embargo, con estos tratamientos se presentó inhibición y retardo en la producción enzimática comparando con el control, lo cual se atribuyó a las elevadas relaciones C/N obtenidas; presumiblemente por un alto contenido de carbono.

Abstract

This work presents the qualitative and quantitative characterization of *Beauveria bassiana* strain 885.2, taken as reference the most important enzymes in the entomopathogenic fungi pathogenesis process (proteases, chitinases and lipases). Was evaluated also, the effect that had the addition of grasshopper at different concentrations in liquid media that already had dextrose (4%) as carbon source, over the expression of such enzymes. Determinations of biomass and conidia counting, were directed in order to monitoring the fungal growth. Besides, enzymatic profile was determined qualitatively by using API ZYM galleries (to know the broad potential of enzymes production) and chitinases, proteases and lipases, were determined by spectrophotometric quantification.

The results in terms of specific activity showed that treatment with grasshopper at 5 g/L produced the highest concentration of chitinases ($0.987 \text{ mU}/\mu\text{g}$ protein), for lipases the treatment with 10 g/L was more effective ($0.608 \text{ mU}/\mu\text{g}$ protein), while the control was more effective for proteases ($31.451 \text{ U}/\mu\text{g}$ protein). However, with these treatments a delay and inhibition for the enzymatic production was observed, this was attributed to the high C / N ratios reached compared to the control, related to a high carbon content.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos son agentes de mayor importancia en el control microbiano de insectos plaga y pueden contribuir a disminuir los problemas de contaminación asociados con los insecticidas convencionales (Ahmad et al., 2012). Estos hongos atacan a través de la cutícula, para después germinar esporas y finalmente producir hifas que invaden y penetran los tejidos del huésped (Castellanos 1997, Paterson et al. 1994, Smith et al. 1981, St. Leger et al. 1986, Zimmerman 1993). Las hifas se ramifican, colonizan y llegan hasta la hemolinfa liberando enzimas y toxinas que afectan la fisiología del insecto. Durante el proceso infeccioso el hongo degrada la cutícula del insecto, empleando varias enzimas (proteasa, lipasa, quitinasa y N-acetilglucosaminidasa) (Castellanos 1997, Paterson et al. 1994). Una de las especies más importantes de los hongos entomopatógenos es *Beauveria bassiana*, la cual tiene un alto potencial en condiciones de laboratorio para infectar plagas de insectos, cultivarla en masa, y además muestra cierta facilidad para aislarla en zonas donde el insecto plaga está afectando el cultivo (Echeverría, 2006). La producción a escala y la obtención de una formulación eficaz, requieren profundizar en el conocimiento de aspectos genéticos, bioquímicos, fisiológicos, estudios ecoambientales y factores de virulencia donde los entomopatógenos ejercen su espectro de acción (Castellanos 1997, Smith et al. 1981). El objetivo de este trabajo fue Cuantificar mediante técnicas instrumentales las enzimas extracelulares de mayor relevancia en los procesos de patogenicidad fúngica (proteasas, quitinasas y lipasas); así como la efectividad del uso de un inductor (chapulín) para incrementar su expresión.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades de los Hongos

2.1.1. Clasificación

Son un grupo amplio de organismos (existen entre 1 y 1.5 millones de especies) que se encuentran clasificados en el Reino *Fungi*; divididos en cuatro *Phyla*: *Ascomycota*, que comprende el 50 % de los hongos conocidos, *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Chytridiomycota*, estos últimos abarcan aproximadamente el 80 % de los hongos patógenos para los humanos. Son eucariotas, poseen un núcleo con varios cromosomas, un nucléolo rico en ARN y organelos citoplasmáticos: mitocondrias, vacuolas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi y ribosomas. El citoplasma se encuentra limitado por la membrana, que es una doble capa de lípidos que contiene proteínas, esteroides y polisacáridos que controlan la permeabilidad celular y participan en la síntesis de la pared celular, entre los polisacáridos más importantes se encuentran los polímeros quitina (n unidades de N-acetil glucosamina), manano (manosa) y glucano (glucosa) (Alexopoulos et al., 1996; Burnett, 2003).

2.1.2. Morfología

Los hongos poseen dos tipos de morfología: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular, levaduriforme (Figura 2-2). Sus células comparten similitudes estructurales con las de plantas y células humanas; las primeras se diferencian en la composición de la pared celular y en la carencia de cloroplastos y clorofila, las segundas tienen pared celular

y ergosterol en la membrana citoplásmica. Los hongos filamentosos (miceliares o mohos), presentan un crecimiento típico en cultivo sólido y sobre cualquier superficie sobre la que proliferen producen colonias características. Al microscopio óptico, presentan estructuras tubulares formadas por múltiples células, que se denominan hifas. Estas suelen ser septadas en la mayoría de los hongos. Sin embargo, los del *Phylum Zygomycota* presentan hifas que carecen de septos y se denominan cenocíticas o sifonadas (Peña, 2009).

Las hifas de los hongos septados suelen tener un diámetro menor (2-5 μm) en comparación con las de los sifonados (10-15 μm); éstas normalmente se desarrollan a partir de esporas, aunque también pueden originarse de fragmentos de hifas, ramificándose con mucha frecuencia hasta producir una maraña de filamentos que constituyen el micelio (Figura 2-1) (Peña, 2009).

2.1.3. Metabolismo

Los hongos obtienen nutrientes por absorción y tienen un metabolismo quimioheterótrofo. Esto provoca que en la naturaleza se encuentren asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos de reciclado del carbono y otros elementos o como patógenos oportunistas de animales y plantas; degradando una gran cantidad de sustratos, con exoenzimas que en algunos casos son también factores de virulencia. En el laboratorio, los hongos crecen fácilmente en la mayoría de los medios de cultivo. Los hongos filamentosos son aerobios y los levaduriformes anaerobios facultativos (Bial, 2002). Los hongos filamentosos tienen metabolismo primario y secundario. El primario se relaciona con los procesos de crecimiento y desarrollo, tales como la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno y la producción de enzimas. La asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno se realiza comúnmente mediante el empleo de medios simples definidos químicamente. Las enzimas liberadas al medio externo por parte de los hongos determinan los nutrimentos que éstos puedan utilizar y por tanto, su hábitat de crecimiento (Paterson y Bridge, 1994).

2.1.4. Reproducción

La mayoría presentan reproducción sexual y asexual. El estado sexual se denomina teleomorfo o meiospórico y el asexual anamorfo o mitospórico. En ocasiones un mismo hongo puede presentar dos tipos, el anamorfo y el teleomorfo, debido a que se descubrieron y nombraron de manera independiente. La reproducción asexual puede lograrse por fragmentación de las hifas, donde cada fragmento produce una nueva colonia, normalmente los hongos se reproducen, tanto sexual como asexualmente, por medio de esporas, cada una con la capacidad para desarrollar una nueva colonia. Las esporas sexuales se producen tras la fusión de los núcleos de dos hifas sexualmente compatibles o de dos levaduras y posterior meiosis. La morfología de las esporas sexuales es muy variada y tiene gran interés para la identificación, ya que presentan diferentes características. Los hongos del *Phylum Basidiomycota* producen basidiosporas en el exterior de una estructura denominada basidio, los *Ascomycota* producen ascosporas en el interior de una estructura en forma de saco denominada asca y los *Zygomycota* producen zigosporas (Peña, 2009).

2.2. Hongos Entomopatógenos (HEP)

Causan infecciones letales y regulan poblaciones de insectos en la naturaleza mediante epizootias (Burges, 1981; Carruthers y Soper, 1987; McCoy et al, 1988); se conocen aproximadamente 1000 especies que son reguladores de poblaciones de insectos plaga a través de un proceso infectivo que consta de cuatro pasos: adhesión, germinación, diferenciación y penetración, cada paso está influenciado por una serie de factores internos y externos integrados, que en última instancia determinan la virulencia. También tienen una especificidad, que les permite disminuir una plaga sin dañar otras especies, incluyendo insectos benéficos. Otra característica es su capacidad de producir toxinas y enzimas para luchar contra las defensas del huésped (López, et al., 2000). Una infección exitosa se logra por la adhesión de esporas al huésped, lo cual se consigue mediante la secreción de mucílago, además, de enzimas como

lectinas, las fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas también juegan un papel importante (Bustillo, 1998). Todo esto se considera como característica de las cepas virulentas (Al-Aidoors y Roberts, 1978).

2.2.1. Conservación y virulencia

Los HEP requieren métodos de preservación para asegurar su viabilidad, pureza e integridad genómica, evitando variaciones, reduciendo el deterioro de los aislados (Smith y Ryan, 2004). Para esto cada cepa debe ser preservada al menos por dos procedimientos diferentes (WFCC, 2010): la liofilización o la criopreservación (almacenamiento en nitrógeno líquido), son dos de los mejores métodos para minimizar cambios genéticos para la mayoría de las cepas (Humber 1997; Nakasone et al., 2004).

Es importante considerar un método adecuado para preservar la virulencia (velocidad con la que se causa la enfermedad (Shapiro et al., 2005)) de los HEP, el procedimiento más utilizado es infectando un huésped vivo, re-aislando posteriormente al hongo. La frecuencia de estos pasos por insectos está dada por las veces que el aislado puede multiplicarse sin perder la virulencia (Goettel y Inglis, 1997; Bustillo et al., 2002). Otro método empleado es la incorporación de larvas de lepidópteros desecados y pulverizados a un medio nutritivo comercial (Brownbridge et al., 2001; Bustillo, 2002; Monzón, 2001), este último método es utilizado en México por los laboratorios de producción masiva de agentes de control microbiano (Berlanga-Padilla et al, 2003).

2.3. *Beauveria bassiana*

2.3.1. Generalidades

En 1912 Vuillemin describió formalmente el género *Beauveria*, designando a *Botrytis bassiana* como la especie tipo; posteriormente se le nombró *Beauveria bassiana* en reconocimiento a J. Beauverie quien la estudio en la enfermedad de la muscardina blanca (Vega y Blackwell, 2005), así como a Agostino Bassi quien la describió por primera vez.

Beauveria bassiana tiene un rango amplio de huéspedes (aproximadamente 200 especies de insectos) con una variación extensa en la virulencia hacia ellos, volviéndolo un candidato muy versátil como agente de control biológico (ACB). Este hongo ataca plagas agrícolas de importancia económica para México, como: picudo del algodón (*Anthonomus grandis* Boh), mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens* Loew), perforador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis* Hübner) (Laverlam, 2006), broca del café (*Hypothenemus hampei*) entre otros. Además es cosmopolita, por último, *Beauveria* es un organismo que se aísla fácilmente de cadáveres de insectos o de muestras de suelo utilizando medios simples con antibióticos, y agentes selectivos. Además se puede cultivar en laboratorio en sustratos sencillos y conservarse utilizando métodos convencionales, como solución de glicerol o liofilización. En consecuencia, es el HEP más representativo en las colecciones a nivel mundial (Vega y Blackwell, 2005).

2.3.2. Taxonomía

Dado que las especies de *Beauveria* se reproducen por conidios (mitosporas), han sido clasificadas de manera tradicional dentro de los hongos hifomicetes asexuales (*Deuteromycetes*). A pesar de varios análisis taxonómicos exhaustivos durante el último siglo, aún subsisten problemas para la identificación, taxonomía, y nomenclatura de este género. Gracias

Tabla 2-1: Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana* según el National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012)

Nombre <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill. 1912	
Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Cordycipitaceae
Género	<i>Beauveria</i> (<i>Cordyceps</i>)
Especie	<i>bassiana</i>

a los avances en biología molecular, los análisis moleculares filogenéticos recientes revelan que *Beauveria* está relacionado de manera directa con el género teleomorfo *Cordyceps* (*Ascomycota*: Hypocreales: *Clavicipitaceae*) (Rehner y Buckley, 2005), una hipótesis previamente supuesta pero no comprobada. Todos los teleomorfos de *Beauveria*, fueron descritos en Asia (Vega y Blackwell, 2005). La Tabla 2-1 presenta su clasificación taxonómica.

2.3.3. Morfología

Beauveria bassiana (Balsamo-Crivelli) *Vuillemin* es un hongo de micelio blanco o ligeramente amarillento (dependiendo de las condiciones del cultivo). Presenta hifas septadas de las cuales se ramifican los conidióforos (estructuras reproductivas), sobre los que se desarrollan los conidios que son unicelulares y transparentes (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999; Rehner, 2005). Tiene la capacidad de vivir de manera parásita o saprofita, lo que le permite subsistir con o sin huésped. En el suelo, su forma de crecimiento es micelial, junto con la materia orgánica. Sin embargo, durante la infección, el conidio germina produciendo micelio y estructuras semejantes a levaduras conocidas como blastosporas (Wong, 2003).

2.3.4. Conidios

B. bassiana produce dos tipos de unidades infectivas: blastosporas, cuerpos de hifas unicelulares que se producen durante el crecimiento en la hemolinfa y los conidios que se forman una vez que el hongo emerge del insecto (Roberyts Humber, 1981). Durante su producción dependiendo del tipo de cultivo empleado van a ser las unidades infectivas que produzca; en cultivo sumergido son blastosporas y conidios mientras que en cultivo superficial y fermentación en medio sólido produce sólo conidios (Hegedus et al., 1990; Thomas et al., 1987). En la Tabla 2-2 se presenta una comparación entre las características de los dos tipos de unidades infectivas producidas por *B. bassiana*. Los conidios tienen mejores características que las blastosporas para ser utilizados en el control de plagas de insectos. A pesar de que las blastosporas germinan en menor tiempo; los conidios son más resistentes durante el almacenamiento y frente a condiciones ambientales adversas, por otro lado la hidrofobicidad es superior en ellos. Esto último contribuye a protegerlos contra la deshidratación y aumenta su capacidad de adhesión a la cutícula de los insectos (Hegedus et al., 1992). La resistencia frente a condiciones ambientales adversas es una ventaja de *B. bassiana* sobre los pesticidas convencionales debido a que produce efectos prolongados sobre las plagas de insectos (Goettel y Roberts, 1991).

Para evaluar la sobrevivencia y éxito durante la infección de los conidios, es necesario conocer las condiciones adecuadas de temperatura, humedad y tiempo de germinación.

2.3.4.1. Germinación de los conidios y penetración en la cutícula de los insectos

Para la germinación de *B. bassiana* es necesaria una humedad relativa elevada ($\geq 90\%$), esto no representa una limitación pues el microclima del follaje, particularmente durante los periodos de lluvia, asegura este valor (Roberts y Humber, 1981). Los estimuladores e inhibidores de la germinación se encuentran en la cutícula por lo que el hongo debe estar adaptado a las condiciones de esta (Charnley, 1991). Las bacterias presentes en la cutícula pueden tener un efecto inhibitorio sobre la germinación (Roberts y Humber, 1981).

Tabla 2-2: Comparación entre las características de los dos tipos de unidades infectivas producidas por *B. bassiana*

Conidios ^a	Blastosporas ^b
Son resistentes a condiciones adversas por ejemplo al secado y/o temperaturas extremas pues tienen una pared celular gruesa como resultado de la acumulación continúa del material en ella (1,4).	Se consideran de “vida corta” para el control de insectos pues tienen una pared celular muy delgada, factor que ocasiona poca resistencia a las condiciones ambientales adversas (1, 4).
Son más pequeños $3.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$. Tienen forma esférica, tamaño uniforme, pared rugosa y apariencia cristalina (4).	Tienen mayor tamaño, pared lisa, forma cilíndrica y dimensiones variables (4)
Hidrofobicidad de 89 % (2)	Hidrofobicidad de 79 % (2)
Puede almacenarse por varios meses, a bajas temperaturas sin que disminuya su viabilidad (2,3).	No son estables a las mismas condiciones. Pérdida de la viabilidad asociada con la pérdida de potencial infecciosos (2,3).
Tiempo de germinación de 24 h (4)	Germinan en menos de 16 h (4)

a: conidios producidos en cultivo superficial. b: blastosporas producidas en cultivo sumergido.

Fuentes: Hegedus et al, 1990 (1); Hegedus et al., 1992 (2); Lane et al. 1991 (3)

Thomas et al., 1987 (4).

2.3.4.2. Crecimiento micelial y producción de esporas

En esta etapa el hongo invade prácticamente todos los órganos del insecto provocándole la muerte. Si las condiciones de humedad y temperatura ambientales no son las adecuadas, permanece dentro del cadáver que le sirve como reservorio; para cuando se establezcan las condiciones apropiadas y pueda emerger a través de la cutícula y producir esporas (conidios), que se dispersaran con las corrientes de aire o agua (Roberts y Humber, 1981). Es en esta fase donde *B. bassiana* puede establecer relaciones endofíticas con diferentes plantas, colonizándolas sin dañarlas o interactuar de forma específica con ellas, pues no es un hongo fitopatógeno. Se ha demostrado que este hongo puede colonizar plantas de maíz a nivel de los verticilos, moverse por su sistema vascular de forma pasiva, y persistir en su interior por largos periodos. Esta capacidad puede aprovecharse en el control de plagas (Bing y Lewis, 1993).

2.3.4.3. Producción de toxinas

B. bassiana puede matar a sus huéspedes, antes de invadir los órganos, mediante la producción de toxinas (Charnley, 1991), las cuales son producidas por el hongo; pero pueden ser producidas también por el insecto como respuesta a la infección (Roberts y Humber, 1981). Se han detectado, en filtrados de cultivos, compuestos de bajo peso molecular biológicamente activos: péptidos cíclicos, dextruxinas, beauvericina y sus análogos las eniantinas, la bassianolida o la citocalasina B, todas con poder insecticida (Bidochka y Khachatourians, 1991). El pigmento rojo oosporeína detectado en filtrados de cultivos *in vitro* y en insectos infectados con *B. bassiana* tiene actividad antibacteriana (Mazet et al., 1994).

Para entender los procesos de penetración del hongo en el huésped (primer paso de la infección), es necesario conocer la composición y estratificación de las capas que conforman a un insecto.

2.4. Estructura de los insectos

El estudio de su morfología es de importancia, en la entomología agrícola y particularmente en el manejo de plagas. Para una correcta identificación de los insectos, es necesario reconocer las principales estructuras y sus funciones para agruparlos en órdenes, familias, géneros y especies; la morfología externa brinda información importante sobre su ecología, comportamiento, biología y evolución. Los insectos son invertebrados con una simetría bilateral, su cuerpo está formado por 20 o 21 segmentos primitivos, agrupados en tres regiones bien definidas o tagmas: cabeza, tórax, abdomen; la segmentación en anillos dispuestos uno a continuación del otro es uno de los caracteres más notables. Cada anillo o segmento típico está dividido en cuatro regiones principales (Figura 2-3): una dorsal (noto), una ventral (externo) y dos laterales (pleuras) (Brewer y Arguello, 1982).

La cutícula es un sistema de soporte conocido como exoesqueleto, que provee una base

rígida aunque flexible para el cuerpo, no se estira, excepto en determinados momentos durante el desarrollo (muda); está formada principalmente por quitina, un homopolímero conformado por unidades de N-acetilglucosamina que representa del 15 al 30 % del peso seco en partes rígidas y 13 % en las secciones “suaves”, embebida en una matriz proteica, con polifenoles y pequeñas cantidades de lípidos (Vincent y Wegts, 2004; St. Leger et al., 1986b).

Sus características estructurales hacen de la cutícula una cubierta físicamente fuerte cuya función es proteger los órganos internos del daño mecánico, representando la primera barrera que debe de superar un HEP para poder invadir al huésped (Brewer y Arguello, 1982). La cutícula puede variar desde muy rígida, como una armadura, en la mayoría de los coleópteros, a delgada y flexible, en las larvas. Otra función de la cutícula es prevenir la deshidratación lo que es vital para los insectos terrestres, particularmente por su tamaño reducido. También actúa como una cubierta protectora contra choques o acciones químicas, impidiendo la entrada de agua y microorganismos. Además es una capa no celular secretada por una celular (la epidermis); juntas forman el tegumento que recubre todo el cuerpo del insecto (Figura 2-4), su límite interno es una fina membrana denominada membrana basal.

La epidermis segrega la mayor parte de la cutícula y su función es disolver y absorber casi la totalidad de la cutícula vieja cuando el insecto muda y también reparar heridas. Cuando la cutícula se diferencia, determina la forma y aspecto del insecto; está compuesta por tres capas: epicutícula, la más externa y muy delgada, exocutícula, más gruesa y la endocutícula, interna y más gruesa. La epicutícula está compuesta por varias capas: la cuticulina, una capa interna lipoproteica importante en el proceso de desarrollo, ya que es permeable a químicos y nutrientes necesarios para el crecimiento e impermeable a las enzimas que degradan la vieja cutícula durante la muda.

La exocutícula le da a la cutícula su característica resistencia y elasticidad, está formada principalmente por quitina, sin embargo la dureza no la confiere la quitina sino una modificación de la matriz proteica que es impregnada por compuestos fenólicos (quinonas), lo que da como resultado un material duro, pardo, llamado esclerotina. Este proceso de endurecimiento y oscurecimiento, conocido como esclerotización, da lugar a la formación de los escleritos.

Algunas quinonas son incorporadas directamente en la cutícula; otras son polimerizadas para formar pigmentos negros o marrones oscuros conocidos como melanina (Brewer y Arguello, 1982).

La endocutícula también contiene quitina y proteínas, pero no está endurecida, se conserva blanda y flexible. Entre esas placas el tegumento es membranoso o blando (membrana intersegmental) lo que permite el movimiento y expansión del cuerpo durante la alimentación y desarrollo de los huevos (Brewer y Arguello, 1982).

2.5. Enzimas infectivas

Los principales componentes de la cutícula del insecto son: quitina, proteínas y lípidos, por consiguiente, las enzimas para hidrolizar cada uno de estos componentes son: proteasas, quitinasas, y lipasas, las cuales se consideran determinantes en la virulencia de HEP. En su hábitat natural, los hongos pueden utilizar una gran variedad de compuestos como fuentes de carbono y/o nitrógeno; pero no todas ayudan al crecimiento y metabolismo de igual manera. Algunas fuentes de carbono complejas, son energéticamente menos eficientes en su utilización en comparación con fuentes simples; también se considera que las rutas metabólicas son altamente reguladas para permitir la utilización preferencial de compuestos energéticamente favorables, ejemplo de ello es la glucosa (Chang y Todd, 2004).

El orden de producción para las enzimas hidrolíticas depende de las capas que conforman al insecto. Estas enzimas se describen con más detalle en los siguientes apartados.

2.5.1. Proteasas

Son secretadas en las primeras etapas de penetración (Bidochka y Khachatourians, 1990), son el factor de virulencia más importante porque las proteínas constituyen del 61-70 % de la cutícula (Bidochka, 1989) además de que se encuentran rodeando a las microfibrillas de quitina, algunas se encuentran ligadas a la quitina (Qazi y Khachatourians, 2008). Las

proteasas de HEP son del tipo subtilisina [Pr1 A y B], serin proteasas [Pr2], [Pr3], cisteín proteasas [Pr4], carboxipeptidasas [MeCPA], metaloendoproteasas y dipeptidilpeptidasas, entre otros (Hegedus y Khachatourians, 1995; St. Leger, 1995; St. Leger et al., 1996; Joshi et al., 1997; Clarkson y Charnley, 1996).

2.5.2. Quitinasas

Las enzimas quitinolíticas tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces β 1-4 de N-acetilglucosamina presentes en la quitina y peptidoglucano, componentes que se encuentran en la mayoría de los insectos (Arakane y Muthukrishnan, 2009). Dicho proceso se lleva a cabo en 2 pasos hidrolíticos, el primero da como resultado oligómeros, y el segundo forma monómeros de N-acetilglucosamina. Este proceso es utilizado por hongos para crecer y durante la germinación de los conidios, formar el apresorio elongando las hifas (Ulhoa y Peberdy, 1991).

Las quitinasas ligadas a quimioelastasas (Pr1) y tripsina (Pr2), se consideran enzimas determinantes en la virulencia de HEP; las de diferente peso molecular, y quitosanasas, reblandecen el exoesqueleto del insecto mientras que las proteasas se encargan de la penetración del hongo (St. Leger et al., 1996b, 1998; St. Leger y Screen 2001; Charnley 2003; Campos et al., 2005; Kim et al., 2010).

La hidrólisis de quitina es mediada principalmente por una serie de exo-N-acetilglucosamidases, quitobiasas y endoquitinasas (Hegedus y Khachatourians, 1995; Clarkson y Charnley, 1996). Existen dos tipos de quitinasas excretadas por los HEP: exo- y endo-quitinasas, cuya diferencia estriba en el sitio de hidrólisis, ubicados en extremos no reductores y en puntos intermedios de las cadenas del biopolímero respectivamente (Arakane y Muthukrishnan, 2009).

2.5.3. Lipasas

Hidrolizan triglicéridos a ácidos grasos y glicerol, bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa (Rohit et al., 2001). Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y están presentes en los procesos metabólicos degradativos de algunas plantas y animales, son producidas por un gran número de microorganismos para fines comerciales (Coca, 2001). Las lipasas no juegan un papel significativo en la penetración de la cutícula debido a que sus sustratos potenciales, triacilglicéridos y ésteres de ceras, se encuentran en pequeñas proporciones en la cutícula (Hegedus y Khachatourians, 1988); pero posiblemente su actividad se exprese durante el crecimiento en la hemolinfa que tiene una composición de lípidos (p/v) entre 1.5-5.5 % (Charnley, 1991).

La biotecnología agrícola tiene como meta dar solución a problemas que causan baja producción y pérdidas económicas en cultivos de interés comercial, su enfoque principal es lograr una agricultura sustentable, reduciendo la dependencia de químicos, para disminuir los costos de insumos ayudando a solucionar los problemas ambientales (Tamez-Guerra et al, 2001), para lograr esto, se apoya del manejo integrado de plagas (MIP).

2.6. Manejo integrado de plagas (MIP)

Se define como el control de plagas mediante enemigos naturales, combinado con diversas prácticas de cultivo (Whipps y Lumsden, 2001).

El MIP es un método de control que integra estrategias confiables desde el punto de vista ecológico, económico y toxicológico, con énfasis en el empleo de elementos reguladores naturales, manteniendo una relación costo beneficio equilibrada (Gallegos, 2003), incluye el uso de insecticidas químicos y formulados biológicos (Van Lenteren, 2006); para que este pueda aplicarse se requiere conocimiento pleno de la ecología, biología de la plaga y del cultivo (Perdigo, 1996; van Enteren, 2006). Utiliza dos estrategias: 1) emplear formulados biológicos para reemplazar insecticidas químicos convencionales y 2) elaborarlos con organismos

endémicos de una zona en particular como parte de una estrategia ecológica de aumento en el control natural de plagas de la zona. Dentro del potencial de la biotecnología agrícola y el MIP se encuentra el control biológico de insectos, empleando hongos entomopatógenos (HEP) (Ingles et al., 2001).

2.7. Control biológico

Método milenario que utilizaron culturas como la china en el siglo III; pero a partir de finales del siglo XIX fue cuando el control biológico de plagas despertó un gran interés debido al éxito que se consiguió con la introducción de la catarina *Rodolia cardinales* (Coleoptera: *Coccinellidae*) para el control de la cochinilla acanalada *Icerya purchasi* (Homoptera: *Coccidae*) (Nicholls, 2008). Este método sirve para manejar poblaciones plaga, haciendo uso de uno o más organismos para reducir la densidad poblacional que causa daño económico al hombre (DeBach, 1964); por todo lo anterior, puede definirse como: el uso de organismos benéficos (enemigos naturales y microorganismos) contra aquellos que causan daño. Para la regulación de poblaciones se emplean: parásitos, depredadores o patógenos, entre los últimos se encuentran los hongos, bacterias, virus, protozoarios y nematodos que enferman y/o matan a los organismos blanco (Nicholls, 2008).

Cabe mencionar que la erradicación completa de plagas resulta ambiciosa y en la mayoría de los casos trae problemas ecológicos. Si un controlador elimina completamente a una plaga, quedaría sin alimento para continuar su desarrollo, causando un desequilibrio en el ecosistema. El control biológico busca reducir las poblaciones plaga a una densidad que no cause daño económico, garantizando la supervivencia del controlador; así el agente prevalece previniendo un repunte de la infección (Kamp y Bidochka, 2002).

2.8. Formulados biológicos

Están constituidos por microorganismos y/o sus metabolitos. El interés en ellos se ha incrementado debido a que son más seguros para humanos y ganado, pueden ser específicos y no generan residuos tóxicos; además es difícil para el insecto desarrollar resistencia (Davidson, 1979), debido a las semejanzas estructurales (quitina).

Le dan valor agregado a los cultivos, permitiéndoles ser aceptados mundialmente por estar libres de residuos tóxicos (van Lenteren, 2006). Una de las dificultades que tiene el desarrollo de estos productos es la expectativa general para estos, ya que se considera que al sustituir un insecticida organosintético por un formulado biológico su función y aplicación serán similares, sin embargo, debido a que los formulados tienen como principio activo organismos vivos, cada uno tiene propiedades que determinan su producción, formulación y uso potencial (Alatorre-Rosas, 2007; Barrera, 2007).

A nivel industrial, la mayoría de los sistemas de producción de hongos entomopatógenos utilizan un sistema bifásico: primero el micelio o cuerpos hifales son producidos en un medio líquido con agitación; para posteriormente, ser transferidos a un sustrato sólidos para la producción de conidios aéreos (Jenkins, et al., 1998; Alves et al., 2002). En este proceso el hongo inicialmente crece en un medio líquido hasta el final de la fase del crecimiento exponencial, para después transferir esta biomasa a un sustrato sólido (Aponte et al., 2000). El medio líquido empleado en la primera etapa de producción contiene una concentración adecuada de carbono y nitrógeno. En la fermentación sólida, el sustrato además de proveer un área superficial alta para la aireación, sirve también como soporte físico para la producción de estructuras germinativas (conidios aéreos) y puede ser usado como fuente de nutrientes. Dentro de las ventajas de la fermentación bifásica se puede mencionar que es fácil identificar la contaminación durante la fermentación líquida, por lo cual el proceso puede ser detenido a tiempo para evitar la propagación de la contaminación en la fase sólida, también aumenta la competitividad del hongo al colonizar el sustrato sólido y reducir la contaminación, además

las características morfológicas del inóculo líquido (pellets o micelio libre) facilita la cobertura del sustrato sólido y un crecimiento homogéneo sobre este (Lomer et al., 2002).

Para la obtención un formulado biológico no solo es necesario enfocarse en las condiciones ideales de cultivo para producir abundante micelio o conidios con alta germinación; también es necesario conocer la diversidad enzimática que excreta el hongo bajo las diferentes condiciones ambientales a las que los conidios serán sometidos. Para tener una idea de la producción enzimática se utilizan una serie de pruebas bioquímicas cualitativas.

2.9. Identificación bioquímica API ZYM

Existen métodos cuantitativos para determinar la producción de enzimas extracelulares; que es a partir de la cantidad de enzima liberada en medios de cultivo, mediante lecturas del diámetro de la actividad enzimática, determinando el peso seco del hongo y mediante técnicas espectrofotométricas. Otros métodos son cualitativos: electroforesis, cromatografía, sustratos enzimáticos comerciales como “API-ZYM”, uso de medios de cultivo con un indicador de pH (Chang et al., 1992; Valdés et al., 1999). El sistema API ZYM hace posible la detección de 19 actividades enzimáticas en cuatro horas. La galería sirve como un sistema de evaluación preliminar para la identificación y tipificación de enzimas específicas o para identificar bacterias y hongos (Humble, 1977).

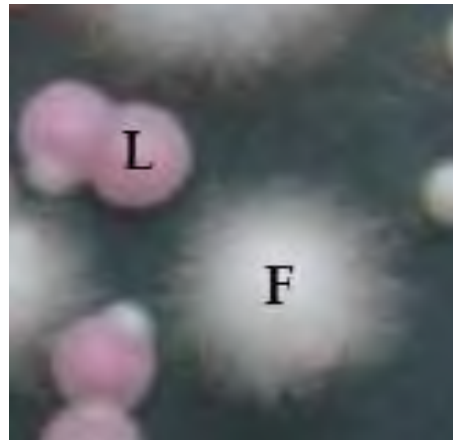


Figura 2-1: Aspecto colonial de hongos con crecimiento filamentoso (F) y levaduriforme (L). Tomado de Peña, 2009.

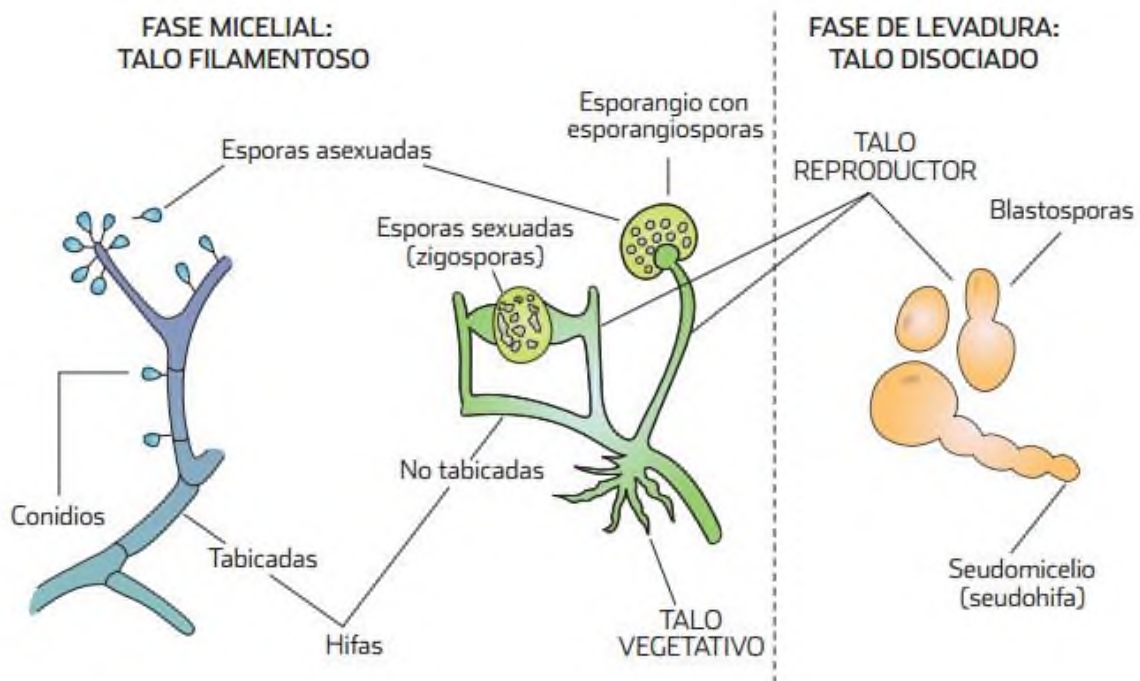


Figura 2-2: Morfología micelial y levaduriforme con talo reproductor y vegetativo. Tomado de Arenas, 2011.

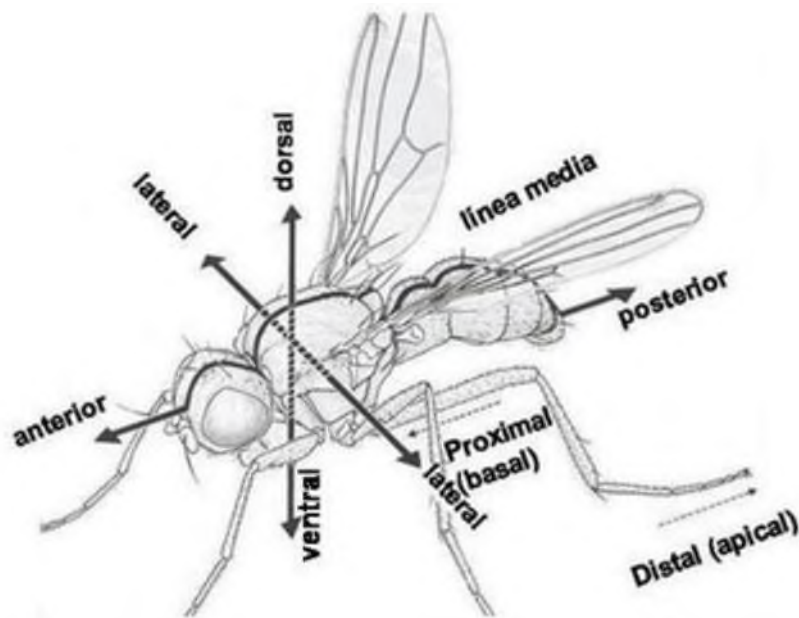


Figura 2-3: Principales ejes del cuerpo y relaciones entre las partes de los apéndices y el cuerpo de los insectos. Tomado de Gullan y Craston, 2005

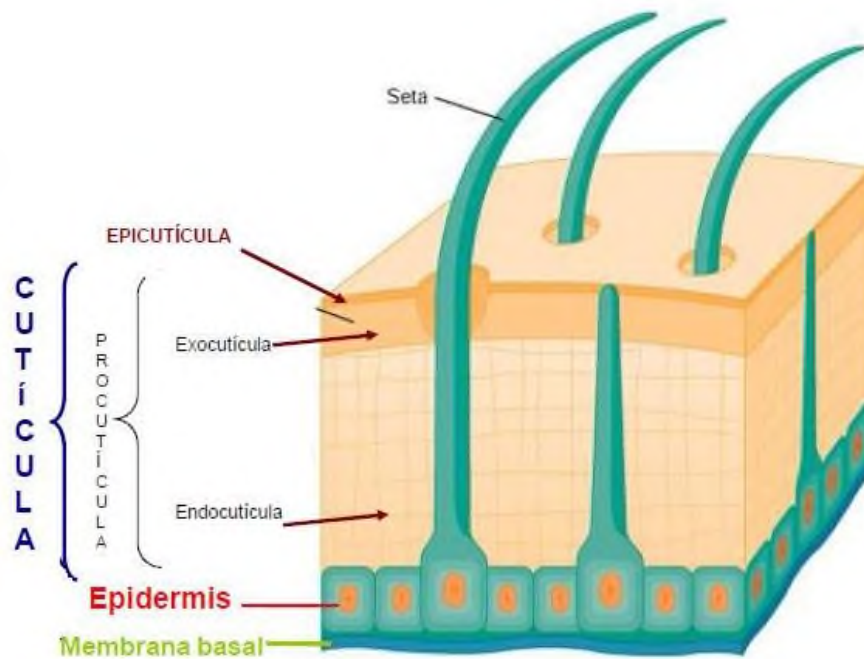


Figura 2-4: Estructura general del tegumento de los insectos. Tomado de Vazquez García, 1987

3. ANTECEDENTES

Los trabajos sobre hongos también se han enfocado al estudio de patogenicidad desde el punto de vista de enzimas extracelulares, utilizando este criterio para clasificación e identificación. A continuación se muestra una serie de trabajos sobre trabajos que se han llevado a cabo con *B. bassiana*.

3.1. Antecedentes directos

Montesinos-Matías, (2012), inició los trabajos con la cepa usada en esta investigación; utilizando tres medios: mínimo (MM), con quitina suplementado con glucosa (QG) y de cutícula suplementado con glucosa (CG) para la inducción de quitinasas, N-acetilglucosaminidasas, y proteasas. En la Tabla 3-1 se muestran las concentraciones usadas de glucosa y la relación carbono/nitrógeno (C/N).

Tabla 3-1: Medios de cultivos probados como inductores y represores de enzimas infectivas

Medio de cultivo	Glucosa (g/L)	C/N
MM	5	6.86
QG	0, 1.25, 2.5 y 5	6.86
CG	0, 1.25, 2.5 y 5	4.18

Relación C/N en medio sin glucosa. Montesinos-Matías, 2012.

El autor obtuvo actividades enzimáticas específicas en el sobrenadante del medio mínimo (MM), utilizando nitrato de sodio como fuente de nitrógeno (C/N=6.86). Las proteasas mostraron una actividad específica de 0.379 ± 0.036 U/ μ g proteína, las quitinasas de 0.033 ± 0.004 U/ μ g proteína y la actividad de N-acetilglucosaminidasas fue de 0.088 ± 0.019

U/ μ g proteína. Los resultados más relevantes relacionados con las actividades volumétricas se presentan en la Tabla 3-2.

Dentro de los trabajos que se han llevado a cabo con la cepa Bb 885.2 se encuentra el de Jiménez-Alejandro, (2015) quien evaluó diferentes cutículas de insectos (sustratos: chapulín, camarón y escarabajo) desproteinizadas y sin desproteínizar como sustrato, para la expresión de quitinasas de tipo exo denominadas N-acetilhexosaminidasas (NHAsas). Este autor desarrolló fermentaciones en medio líquido a un pH 5 y temperatura de 25°C, y señala que una elevada desproteínización fue efectiva para incrementar la producción de las quitinasas evaluadas, debido a que con este tratamiento se elimina la mayor o total proteína que el insecto contiene, para dejar solo la cutícula rica en quitina, y de esta manera tener más certeza de que las enzimas expresadas fueron por el sustrato quitinoso y no haya otro factor que interfiera en la expresión o represión enzimática, como puede ser la presencia de proteasas.

La Tabla 3-3 muestra la cantidad y tipo de enzima detectada (NHAsas) con cada uno de los sustratos utilizados (chapulín, camarón y escarabajo), desproteínizados o sin desproteínizar, la relación con el contenido de proteína soluble, el tiempo y pH de fermentación en el cual se obtuvo la mayor producción enzimática

3.1.1. Crecimiento

Jiménez-Alejandro, (2015) reportó los efectos sobre el crecimiento de *Beauveria bassiana* empleando sustrato sin desproteínizar y desproteínizado. El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 3-4 donde se observa una disminución de la velocidad específica de crecimiento al quitar la proteína de la cutícula.

3.2. Enzimas infectivas

Samsinokova et al, (1971) mostraron que *B. bassiana* en medio de cultivo sólido secreta por lo menos tres tipos de enzimas: lipasas, proteasas y quitinasas; necesarias para el paso

Tabla 3-2: Actividades enzimáticas volumétricas de *Beauveria bassiana* 88 para tres tipos de concentraciones de glucosas con tres medios diferentes.

Enzima evaluada	Glucosa [g/L]	Quitina	Cutícula	Medio mínimo
Proteasas totales		7.134 ± 1.11	82.07 ± 2.38	—
Quitinasas totales	0	0.020 ± 0.014	1.67 ± 0.33	—
β -N-acetilglucosaminidasas		0.207 ± 0.237	0.58 ± 0.11	—
Proteasas totales		5.93 ± 0.022	34.28 ± 2.69	—
Quitinasas totales	1.25	0.021 ± 0.012	2.6 ± 0.45	—
β -N-acetilglucosaminidasas		0.026 ± 0.009	1.13 ± 0.18	—
Proteasas totales		5.919 ± 0.022	12.26 ± 0.59	—
Quitinasas totales	2.5	0.014 ± 0.003	1.1 ± 0.61	—
β -N-acetilglucosaminidasas		0.019 ± 0.009	0.45 ± 0.06	—
Proteasas totales		6 ± 0.063	4.06 ± 0.86	0.85 ± 0.081
Quitinasas totales	5	0.037 ± 0.018	0.615 ± 0.07	0.07 ± 0.009
β -N-acetilglucosaminidasas		0.020 ± 0.006	0.26 ± 0.06	0.20 ± 0.042

Se utilizaron 5 g/ L en todos los cultivos; como fuente de nitrógeno se utilizó nitrato de sodio (C/N= 6.86); se reporta unidades de actividad enzimática para cada tipo de hidrolasa, definido previamente (Sección materiales y métodos). Montesinos-Matías, 2012

del hongo a través de la cutícula de los insectos. De la misma forma se ha demostrado que al añadir fuentes de carbono y nitrógeno al Agar Dextrosa Sabouroud (SDA) aumenta la producción de proteasas y no la de quitinasas (NAGasa) o esterases (Qazi y Khachatourians, 2008).

3.2.1. Proteasas

Según Bidochka y Khachatourians, (1990) las proteasas son secretadas en las primeras etapas de penetración, siendo el factor de virulencia más importante debido a que las proteínas son el constituyente más abundante de la cutícula (61-70 %); además de que se encuentran rodeando a las microfibrillas de quitina (Bidochka, 1989). Minocha, (1972) indicó una posible relación entre la gravedad de las lesiones que produce una determinada especie fúngica y el nivel de proteasas que produce. *B. Bassiana* tiene la capacidad de secretar al medio estas proteínas en los primeros 4 días de crecimiento, las quitinasas aparecen después del día

Tabla 3-3: Actividades enzimáticas volumétricas máximas de *Beauveria bassiana* 885.2 para tres tipos de sustrato.

Sustrato	Enzima	Horas	pH	Sin desproteínizar [mU/mL]	Desproteínizado [mU/mL]
Chapulín	Proteína Soluble			7.5	-
	Hexoquinasas (NHAsas)			3.39	8.89
Escarabajo (Tenebrio molitor)	Proteína Soluble	48	5	7	-
	Hexoquinasas (NHAsas)			2.11	7.97
Camarón	Proteína Soluble			5.5	-
	Hexoquinasas (NHAsas)			0.56	6.68

*Se usaron 10 g/ L de cutícula en todos los cultivos

5 y están presentes en mayor cantidad que las proteasas (Leopold y Samsišňáková, 1970).

En trabajos más recientes Montesinos-Matías, (2012), indujo la producción de proteasas con cutícula y diferentes niveles de glucosa. La mayor actividad enzimática de proteasas fue cercana a 90 U/ mL para la cepa silvestre, utilizando cutícula como única fuente de carbono y nitrógeno; al suplementar el medio con glucosa (5 g/L), se obtuvo la actividad más baja (4 U/ mL) lo que representó una disminución del 95 % en comparación con el blanco.

Sumado a estos trabajos se encuentra el de Bidochka, (1998) quien realizó trabajos con *Beauveria bassiana* para conocer la interacción de este hongo con componentes cuticulares de insectos; utilizó un medio líquido que incorporaba la gelatina como única fuente de carbono y nitrógeno y un medio líquido sin gelatina. Sus resultados reflejaron que *B. bassiana* podía utilizar N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc; 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa) como única fuente de carbono y nitrógeno. La síntesis de proteasas fue reprimida en medio de gelatina que contenía GlcNAc a niveles $> 1.07 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de hongo en peso seco. Con niveles por debajo de este valor, se inició la síntesis de proteasas; posteriormente, apareció en el medio nitrógeno libre de aminoácidos y se observó un crecimiento diaúxico. La alimentación lenta con GlcNAc (35.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no reprimió la síntesis de proteasas y tampoco se acumuló en el medio por encima de 0,5 mg/mL. El aumento de la velocidad de liberación de GlcNAc (83.51

$\mu\text{g/mLh}$) resultó en su acumulación (2 mg/ mL), un aumento del 45 % en el crecimiento y una disminución en la síntesis de proteasas en aproximadamente 81 %. Los aminoácidos libres generados a partir de la hidrólisis de la gelatina no reprimieron la síntesis de proteasas. Las máximas concentraciones de proteasas \approx 2.5 unidades de proteasas (UP) se observaron al sexto y séptimo día.

Tabla 3-4: Velocidades específicas de crecimiento de *Beauveria bassiana* 885.2 para sustratos, desproteinizados y sin desproteinizarse.

Sustrato	Tratamiento	μ_{max} (h^{-1})
Chapulín	S/D	0.059 ± 0.002
	D	0.031 ± 0.001
Escarabajo	S/D	0.056 ± 0.001
	D	0.029 ± 0.003
Camarón	S/D	0.027 ± 0.002
	D	0.015 ± 0.001

S/D= sin desproteinizarse; D= desproteinizado

3.2.2. Quitinasas

Diversos autores (de Moraes et al., 2003; Campos et al., 2005; Dhar y Kaur, 2009; Ali et al., 2010) mostraron que la producción de quitinasas está regulada por mecanismos de inducción/represión por sustrato, es decir, las actividades enzimáticas varían de acuerdo a las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas, no obstante se ha observado que generalmente la glucosa reprime la síntesis de las enzimas que depolimerizan la cutícula de los insectos, entre ellas las quitinasas (de Moraes et al., 2003; Campos et al., 2005; Safavi et al., 2007). Las mayores actividades enzimáticas se obtienen con medios que contienen quitina, mientras que la adición de carbohidratos, lípidos y proteínas reprimen la producción de estas enzimas (St. Leger et al. 1986).

Montesinos-Matías, (2012) indujo la producción de quitinasas con cutícula y diferentes concentraciones de glucosa en dos cepas de *Beauveria bassiana*, la 88 y la 881.2. Obteniendo

una concentración total de quitinasas de 4.35 ± 0.68 mU/mL con una concentración de 1.25 g/L de glucosa, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas al emplear exclusivamente cutícula. Por otro lado, el perfil de excreción de quitinasas totales tuvo un comportamiento similar al de proteasas, mostrando un descenso en la actividad al incrementarse la concentración de glucosa. Los resultados también mostraron, en el sobrenadante del medio con cutícula y 1.25 g/L de glucosa, altos niveles de actividad β -N-acetilglucosaminidasa (cepa 88, 1.13 ± 0.18 UI/ mL; cepa 881.2, 0.81 ± 0.067 U/mL). Por otro lado, se reportaron bajos niveles de actividad la misma enzima (884.5, 0.09 ± 0.016 U/mL) cuando la concentración de glucosa se incrementó (5 g/L). Lo anterior, mostro que con concentraciones menores de glucosa, la represión catabólica es menor. Coudron, (1984) observó un aumento rápido de la actividad durante el crecimiento del micelio con la máxima detectada cerca de la esporulación.

3.2.3. Lipasas

Hegedus y Khachatourians, (1988) produjeron una lipasa extracelular en medio líquido de extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD) con *Beauveria bassiana*, utilizando aceite de oliva como inductor. La adición de ácidos grasos, como, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y araquídónico, inhibió tanto el crecimiento como la producción de lipasas (Tabla 3-5), la cual se evaluó también en medio YPD y medio mínimo de sales y glucosa (GMS). La adición de aceite de oliva aumentó la inducción de lipasas más en YPD que en GMS. Los compuestos que contienen un grupo éster hidrolizable, como el Tween, inhibieron la actividad lipasa. En cultivos en fase estacionaria con *B. bassiana*, en ausencia del inductor, la actividad de lipasa fue de 100 U/mL. La adición de concentraciones crecientes de aceite de oliva resultó en un incremento en la producción de lipasas. En este caso, la producción más alta fue con la adición de 5%. La actividad lipasa en el sobrenadante del cultivo se detectó después de 5 días de incubación.

Tabla 3-5: El efecto de los ácidos grasos sobre la producción de lipasas.

Ácido graso ^a	Crecimiento (610 nm)	Actividad de lipasas [U/mL]
Ninguno	2.10	1080
Mirístico	1.41	860
Palmítico	1.15	1050
Esteárico	0.97	1000
Linoleico	1.37	850
Oleico	1.53	1000
Araquídico	1.42	860

a= se adiciono a un medio YPD + Aceite de Oliva. Hegedus, (1988).

3.2.4. Plagas objetivo

B. bassiana se considera que posee una alta especificidad contra insectos, debido a que a lo largo del tiempo ha compartido nichos ecológicos con estos y ha desarrollado mecanismos de defensa contra ellos es por eso que ataca con alta eficiencia a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes. Entre las que destacan: escarabajo colorado de la papa (*Lepinotarsa decemlineata* Say), mosca común (*Musca domestica* Linnaeus), picudos (*Anthonomus* sp. Germar, *Cosmopolites* sp. Chevrolat, *Metamasius* sp. Linnaeus, *Rhynchophorus* sp.), saltamontes verde (*Turpilia opaca* Brunn), los trips del melón (*Thrips palmi* Karny), gusano soldado o cortador (*Mythimna unipunctata* Haworth), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith), entre otros (Alves et al., 2002; Coates et al., 2002).

3.2.5. Virulencia

Diversos autores han publicado que la virulencia entre sus asociaciones se encuentra ligada a la producción de toxinas y ácidos orgánicos cuando hay altas concentraciones de enzimas hidrolíticas extracelulares (St Leger et al., 1996; Khachatourians, 1996; Talaei-Hassanloui et al., 2006; Safavi et al., 2007; Fan et al., 2007).

4. JUSTIFICACIÓN

México tiene una superficie agrícola cultivable de 59.4%, todo cultivo está propenso a las condiciones ambientales y a los ataques de plagas que los dañan, causando pérdidas económicas. La práctica tradicional más común para la disminución o eliminación de los efectos perjudiciales ocasionados por los agentes fitopatógenos se basa en el empleo de plaguicidas, práctica conocida como control químico. Sin embargo, el aumento en la conciencia social ante el enorme deterioro ambiental que supone la utilización indiscriminada de estos compuestos químicos, ha despertado interés en la búsqueda de sistemas sustentables para el control de plagas y enfermedades. Esto demanda la selección de mejores aislados entomopatógenos con parámetros fisiológicos que puedan evaluarse de manera sencilla y confiable, siendo de ayuda para identificar fenotipos virulentos. La búsqueda, caracterización y producción de un formulado biológico, depende del microorganismo usado, del tipo de metabolito de interés y de los procesos involucrados en su obtención.

Beauveria bassiana es uno de los entomopatógenos más usados para el control biológicos, pues es de fácil aislamiento, cosmopolita en la naturaleza, es tolerante a una gran variedad de condiciones ambientales, produce una diversidad de enzimas para asimilar una amplia gama de sustratos, y no causa daño a las plantas, ganado, ni a los seres humanos; al menos no en la concentraciones que se usan comúnmente en los formulados biológicos.

Para los HEP la capacidad de producir la enfermedad depende de la síntesis y excreción de enzimas; la detección de éstas y su cuantificación abre nuevas posibilidades para usarlas como agentes de control biológico e indicadores de calidad de las cepas. El uso de formulados biológicos, ha tomado importancia como fuente alternativa para el control de plagas, entre estos formulados se encuentran los producidos mediante procesos bifásicos, los cuales generan

grandes cantidades de enzimas y biomasa durante la fase líquida, que sirven posteriormente como inóculo para la fase sólida que es donde se producen conidios aéreos, más infectivos, junto con enzimas. La producción de estos formulados requiere de una estandarización en el proceso de producción, para esto la actividad enzimática puede tomarse como criterio para predecir la patogenicidad y virulencia del microorganismo; permitiendo que conidios y enzimas infectivas trabajen en conjunto.

5. ALCANCE DE LA TESIS

5.1. Hipótesis

La adición de insectos (chapulín) como sustrato al medio líquido, incrementará la producción de enzimas hidrolíticas implicadas en los procesos infecciosos de *B. bassiana*

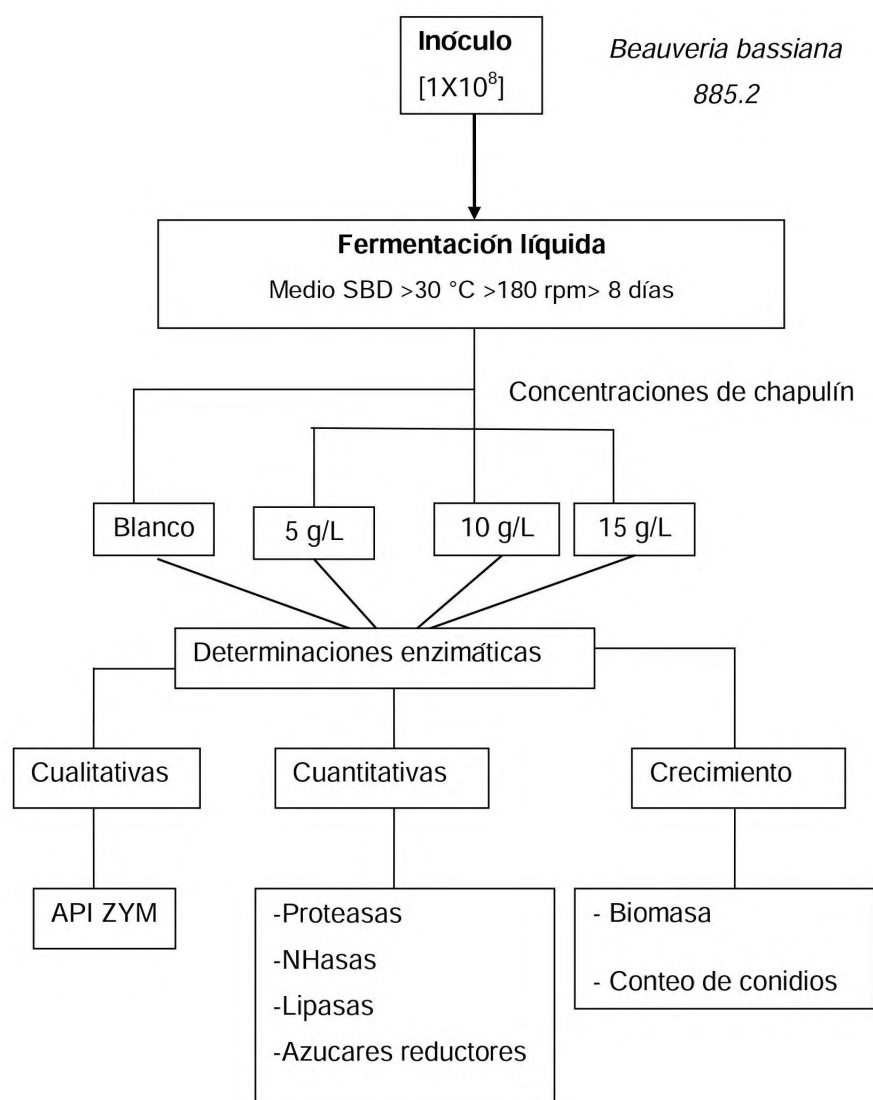
5.2. Objetivo general

Cuantificar mediante técnicas instrumentales las enzimas extracelulares de mayor relevancia en los procesos de patogenicidad fúngica (proteasas, quitinasas y lipasas); así como evaluar la efectividad del uso de un inductor (chapulín) para incrementar su expresión.

5.3. Objetivos específicos

- Evaluar diferentes concentraciones de inductor (5, 10, y 15 g/L) sobre la expresión de enzimas hidrolíticas en fermentación líquida.
- Determinar cuantitativa y cualitativamente la actividad enzimática de *Beauveria bassiana* en fermentación líquida.
- Evaluar la relación entre la producción de enzimas hidrolíticas y la fase de crecimiento de *Beauveria bassiana* en fermentación líquida.

6. ESTRATEGIA METODOLÓGICA



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Microorganismo

Se empleó la cepa *Beauveria bassiana* 885.2, perteneciente al cepario de la Universidad del Papaloapan. La cual se cultivó en matraces con medio Sabouraud dextrosa agar (SDA) al 4% a 25 °C durante 8 días. Al final del cultivo, los conidios se extrajeron con agua destilada estéril, cuantificaron en un microscopio óptico (Motic Modelo DM45C-F) empleando una cámara de Neubauer y se conservaron a 4°C, evaluando la viabilidad cada mes.

7.2. Inóculo

Se preparó colocando una solución de conidios a una concentración de 1×10^8 conidios/mL en caldo Sabouraud glucosa al 4% (p/v) enriquecido con extracto de levadura (5 g/L). El cultivo se incubó durante una semana a 25 °C y 180 rpm, posteriormente se realizó un conteo de conidios en un microscopio óptico empleando una cámara de Neubauer. Para el conteo de conidios se realizaron diluciones seriales dependiendo de la facilidad de conteo y siguiendo un criterio estadístico.

7.3. Fermentación líquida

Se evaluaron diferentes concentraciones de sustrato; tomando como referencia las concentraciones 5 g/L (González-García, 2001) y 10 g/L (Jiménez-Alejandro, 2015). Debido a la alta tasa de producción de sustratos quitinosos, buscando utilizar al máximo los mismos, se evaluó la concentración de 15 g/L. Las fermentaciones se realizaron en matraces con caldo Sabouraud dextrosa enriquecido con extracto de levadura, se realizaron un total de 4 repeticiones por cada tratamiento y un control sin inductor, todos los matraces fueron inoculados con una concentración de 1×10^8 conidios/mL, incubándose a 25 °C y 180 rpm durante 8 días. Cada 24 horas se tomaron muestras para realizar las determinaciones correspondientes.

7.3.1. Cuantificación de biomasa

Para evaluar el crecimiento fúngico, se colectó un mililitro del caldo de fermentación en un tubo eppendorf estéril, previamente pesado, se centrifugó a 11,500 rpm por 10 minutos (Thermo Scientific, Modelo Heraeus Megafugue 16R), desechando el sobrenadante, posteriormente se adiciono 1 mL agua destilada estéril, centrifugando nuevamente bajo las condiciones descritas. Este paso se repitió dos veces más, para eliminar residuos del medio. El tubo con la biomasa se almacenó a -20 °C. Al final los tubos se liofilizaron. La biomasa se determinó por peso seco, expresando el resultado en miligramos de biomasa por mililitro de medio (mg biomasa/mL).

7.3.2. Obtención de los extractos enzimáticos

El medio de cultivo al final de la fermentación se centrifugó a 5500 rpm por 20 minutos, para retirar el micelio y obtener el extracto enzimático crudo a partir de la fracción líquida.

7.3.2.1. Determinación cualitativa de la actividad enzimática mediante la prueba API ZYM

Las actividades enzimáticas se evaluaron con el sistema de micro método semi-cuantitativo API ZYM de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioMérieux). Cada microcúpula con sustratos enzimáticos cromogénicos deshidratados se inocularon con 65 μL del extracto enzimático. Posteriormente, las galerías se incubaron por 4 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se adicionó una gota del reactivo ZYM A y una gota de reactivo ZYM B en cada pozo; las evaluaciones se realizaron en una escala de reacción de 0 a 5 con base en la intensidad de color, en donde 0=reacción negativa, 1=reacción débil; 2, 3 y 4=reacción moderada y 5=reacción fuertemente positiva. Las actividades enzimáticas evaluadas fueron: fosfatasa alcalina, esterasa (C 4), esterasa lipasa (C 8), lipasa (C 14), leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina, quimotripsina, α - fosfatasa ácida, Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -manosidasa y fucosidasa. Las muestras evaluadas fueron las de los días que presentaron la mayor producción enzimática durante la fermentación.

7.3.2.2. Determinación de proteína soluble extracelular

La concentración de proteína en el extracto enzimático se determinó mediante el método de microensayo de Bradford (1976), empleando una curva patrón de seroalbúmina bovina como estándar (Anexo 1). La concentración se reportó como μg de proteína/mL.

7.3.2.3. Determinación de proteasas alcalinas

Se determinaron utilizando como sustrato una solución de caseína al 1 % (p/v) en amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7). Un volumen de 500 βL del sustrato se incubó con 75 βL de los extractos enzimáticos, a 25 °C por 1 h y 180 rpm. Finalizado el tiempo, la reacción se detuvo agregando ácido tricloroacético al 5 % (p/v) y se centrifugó a 11500 rpm durante 10 min. Al sobrenadante se le midió la absorbancia a 280 nm con celdas de cuarzo. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produce un incremento

de 0.001 unidades de absorbancia por minuto, bajo las condiciones descritas (Kunitz, 1947).

7.3.2.4. Determinación de actividad N-acetilhexosaminidasa

A 200 β L de extracto enzimático crudo se le adicionaron 200 β L de amortiguador de citratos-fosfatos (0.2 M, pH 5.6) y posteriormente, 200 β L de solución de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida (pNAG) a 1.0 mg/mL. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C y 180 rpm durante una hora, la reacción se detuvo adicionando 1 mL de NaOH 0.02 M. Después de agitar, se midió la absorbancia a 400 nm. La cuantificación de p-nitrofenol liberado se determinó mediante una curva patrón. La actividad N-acetilhexosaminidasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 β mol de p-nitrofenol por mL de enzima por minuto bajo las condiciones de reacción (Tronsmo y Harman, 1993).

7.3.2.5. Determinación de actividad lipasa

Se modificó la técnica de Palomo et al., (2002). Se midió el aumento en la absorbancia a 348 nm la cual se produjo por la liberación de p-nitrofenol en la hidrólisis de 4-nitrofenilbutirato 0.4 mM en amortiguador de fosfato de sodio (25 mM, pH 7) a 25 °C. La reacción se inició añadiendo 0.05 mL de solución del extracto enzimático a 2.5 ml de solución de sustrato. Una unidad de actividad lipasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 β mol de pNPB por minuto (UI) bajo las condiciones descritas.

7.3.2.6. Determinación de azúcares reductores

La cuantificación de azúcares reductores se realizó mediante la modificación del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) de Miller, (1959) empleando una curva patrón de N-acetilglucosamina.

7.4. Análisis de datos

7.4.1. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las determinaciones enzimáticas (proteasas, quitinasas y lipasas) se analizaron mediante un Análisis de Varianza utilizando la prueba de Tukey para comparaciones múltiples de medias con un nivel de significancia (α) de 0.05. También se realizaron análisis y graficas de agrupación de medias, por separado, para la concentración de enzima presente en cada determinación y azúcares reductores. Para la actividad específica se realizaron los mismos análisis estadísticos, ya descritos anteriormente. Para este análisis se utilizó el software Minitab 16.1 para Windows (Sección Anexos, página A-1).

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1. Crecimiento

8.1.1. Biomasa

En la Figura 8-1 se presenta la producción de biomasa para las concentraciones de inductor evaluadas, en esta se observa que el blanco presentó una fase de adaptación de un día, comenzando la fase exponencial al segundo día, después se observó una fase estacionaria durante los días 3 y 4, posteriormente una disminución en el crecimiento del día 5 al 7. La máxima producción de biomasa obtenida fue de 120 mg/mL al tercer día. El segundo incremento de la biomasa a partir del día 7 y hasta el final de la fermentación, se atribuye al uso de la peptona y extracto de levadura incluidas en el medio.

El tratamiento de 5 g/L de inductor presentó respecto al blanco, un retardo en la fase de adaptación y a partir del cuarto día se observó un crecimiento diaúxico como resultado de la asimilación alternada de la fuente compleja de carbono y nitrógeno proveniente del chapulín. La máxima producción de biomasa (158 mg/mL) se detectó al final de la fermentación. El tratamiento de 15 g/L, presentó un comportamiento similar al blanco, pero títulos de biomasa menores a los obtenidos con este último. La fase de latencia fue de 1 día, comenzando después la fase exponencial que duró hasta el tercer día con un máximo de biomasa de 89.5 mg/mL. Después del tercer día, la biomasa disminuyó gradualmente hasta el séptimo día, a partir de donde se incrementó nuevamente, sin alcanzar el valor máximo.

El tratamiento de 15 g/L mantuvo la fase de latencia por dos días, después la fase expo-

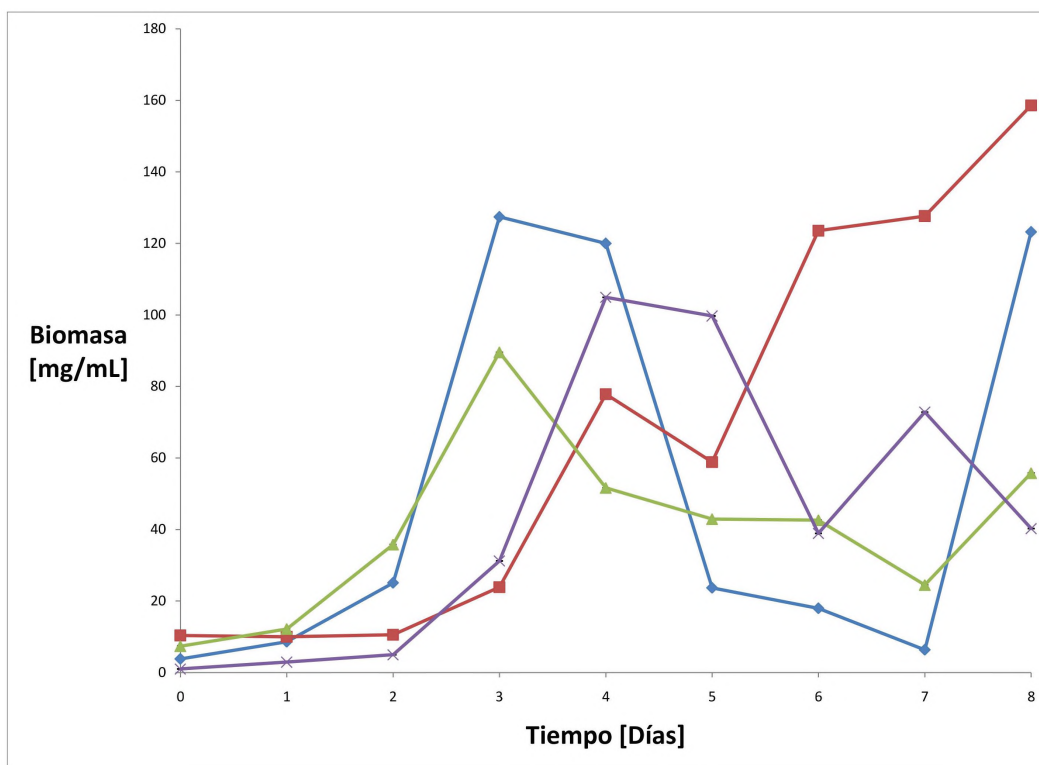


Figura 8-1: Producción de biomasa por *Beauveria bassiana* 885.2 con chapulín como sustrato en fermentación líquida. Blanco (◆), 5 g/L (■), 10 g/L (▲), 15 g/L (×).

nencial de crecimiento duró hasta el día 4, obteniéndose la máxima concentración de biomasa (104 mg/mL). La fase estacionaria se mantuvo hasta el día 5, después de éste, la concentración de biomasa disminuyó (día 6), incrementándose del sexto al séptimo día para disminuir nuevamente al octavo día. El tratamiento de 5 g/L produjo una mayor concentración de biomasa, en comparación con las otras dos concentraciones evaluadas, como ya se mencionó anteriormente. El tratamiento de 10 g/L presentó un crecimiento menor en comparación con las demás concentraciones.

Con respecto a la velocidad de crecimiento máxima (μ_{max}) (Tabla 8-1), el blanco presentó el valor máximo (0.056 h⁻¹) seguido por el tratamiento de 15 g/L (0.050 h⁻¹); los tratamientos de 5 y 10 g/L presentaron una β_{max} semejante (0.041 h⁻¹), pero menor que el blanco y el tratamiento de 15 g/L. De lo anterior se puede deducir que a pesar de que los tratamientos de 5 y 10 g/L tienen una alta producción de biomasa, tardan más en producirla.

Lo anterior se refuerza al comparar los tiempos de generación (t_g) en la misma tabla, donde se puede observar que el blanco tiene un menor tiempo de generación (9.5 h) comparado con el tiempo que presentan las concentraciones de 5 y 10 g/L (16.7 h). Resumiendo, la velocidad máxima de crecimiento y el tiempo de generación se vieron afectados por la concentración de chapulín usada. *B. bassiana* creció más rápido y produjo más biomasa en un medio SDB que en un medio SDB con chapulín.

Tabla 8-1: Valores estimados de los parámetros cinéticos.

Concentración	Parámetros
Blanco	$\mu_{max} = 0.056 \text{ h}^{-1}$ $t_g = 9.50 \text{ h}$
5 g/L	$\mu_{max} = 0.041 \text{ h}^{-1}$ $t_g = 16.7 \text{ h}$
10 g/L	$\mu_{max} = 0.041 \text{ h}^{-1}$ $t_g = 16.7 \text{ h}$
15 g/L	$\mu_{max} = 0.050 \text{ h}^{-1}$ $t_g = 12 \text{ h}$

t_g = Tiempo de generación del hongo [h];
 μ_{max} = velocidad máxima de crecimiento [h^{-1}]

8.1.2. Cuantificación de conidios

La Figura 8-2 presenta la concentración de conidios producidos con las diferentes concentraciones del inductor. En ella se observa que los perfiles del blanco y los tratamientos de 5 y 10 g/L de inductor, son similares a las obtenidas para biomasa por peso seco. Con el blanco, la concentración de conidios se incrementó en función del tiempo hasta alcanzar el valor máximo al tercer día (7×10^9 conidios/mL), disminuyendo después hasta el séptimo día, donde se observó un repunte. Cabe observar el dato inicial, que aquí muestra un valor cercano a 1×10^9 conidios/mL, apenas un orden mayor pero concordante con la cantidad inoculada.

En el tratamiento de 10 g/L se observó un incremento gradual en la producción de conidios, alcanzando el valor máximo (4×10^9) al tercer día disminuyendo después de este punto

y teniendo un repunte del séptimo al octavo día. Igualmente, esta concentración máxima fue menor a las obtenidas con los otros tratamientos.

Para el tratamiento de 15 g/L, la producción de conidios comenzó a incrementarse desde el segundo día, obteniendo la máxima producción de conidios (4.6×10^9 conidios/mL), mantuvo este comportamiento hasta el quinto día, disminuyó y se incrementó a partir del séptimo día.

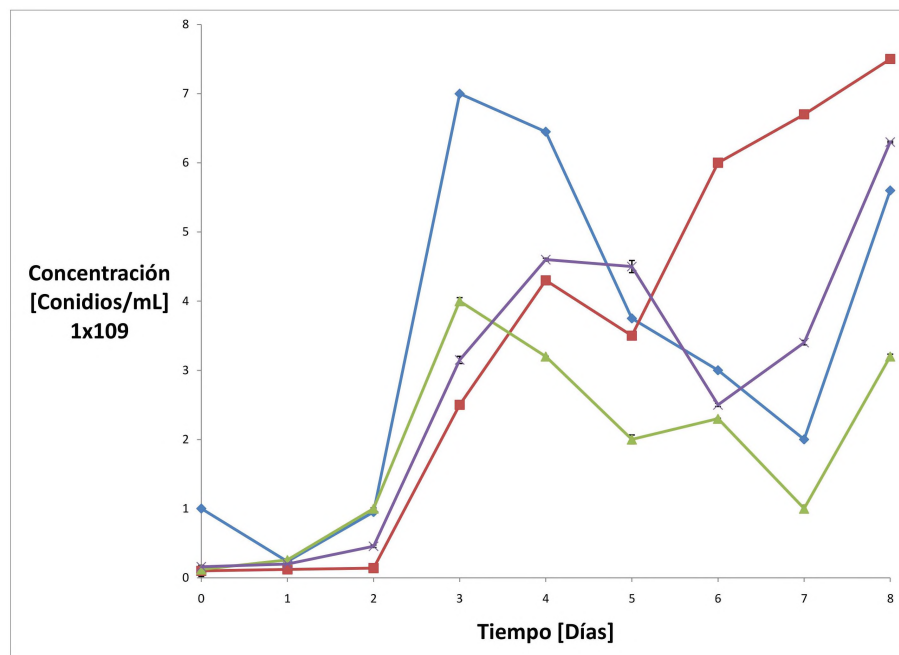


Figura 8-2: Producción de conidios por *Beauveria bassiana* 885.2 con chapulín como sustrato en fermentación líquida Blanco (◆), 5 g/L (■), 10 g/L (▲), 15 g/L (X).

8.2. Pruebas cualitativas

8.2.1. Determinación cualitativa de la actividad enzimática mediante galerías API ZYM

Los resultados de las pruebas cualitativas se muestran en la Tabla 8-2, el número corresponde a la intensidad del color desarrollado. El blanco para el día 4 mostró una co-

loración positiva para las enzimas: esterasa (C 4), esterasa lipasa (C 8), lipasa (C 14), leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina, β -quimotripsina, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfosfohidrolasa (Fosfoamidasa), β -galactosidasa, β -glucuronidasa, β -glucosidasa, β -glucosidasa, β -mannosidasa, con una reacción débil para las enzimas: fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, β -fucosidasa. Para el día 7 los resultados mostraron positivo para las mismas enzimas pero la coloración varió, aumentando en algunos pozos donde había sido débil y disminuyendo/aumentando en otros donde la coloración había sido moderada o aumentada. Los tratamientos de 5,10 y 15 g/L dieron positivo a todas las enzimas a partir del día en que comenzaron a evaluarse, disminuyendo en intensidad o aumentando según el día evaluado (Tabla 9). (Tabla 8-2).

En general esta prueba fue favorable para cada una de las concentraciones usadas, pues el extracto enzimático contenía las enzimas necesarias para aprovechar los 19 sustratos de la prueba, aunque la intensidad de la reacción fue diferente para cada una de las enzimas, esta prueba ayudó a ver la amplia variedad de enzimas que produce *B. bassiana* debido a que no sólo se produjeron las enzimas relevantes para la patogenicidad. Siendo las lipasas las que presentaron reacciones más positivas, seguidas de fosfatasas y proteasas.

Los resultados anteriores coinciden con Valdes et al., (1999) quien al evaluar diferentes aislados de *B. bassiana* mostró que estas podían producir una variedad de enzimas para utilizar diversos sustratos; sin embargo no todas las cepas podían asimilar todos los sustratos, aún en los tratamientos y entre aislados, los resultados variaron; esta variabilidad se atribuyó a la naturaleza multiespórica de los aislados. Los resultados presentados por estos autores señalan fuertes positivos para lipasas (esterasa (C 4), esterasa lipasa (C 8), proteasas (leucina arilamidasa, valina arilamidasa), fosfatasas (fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfosfohidrolasa) y glucosidasas (β -glucosidasa). Estas enzimas coinciden con todas las que se obtuvieron en este trabajo aunado al hecho de que también, produjeron otras glucosidasas como β -galactosidasa, β -glucuronidasa, β -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, β -mannosidasa, β -fucosidasa, lo que demuestran la capacidad de *Beauveria bassiana* 885.2 para aprovechar muchos sustratos, explicando su crecimiento en diferentes

hábitats. En la Figura 8-3 se muestra el sistema comercial API-ZYM durante los días de mayor producción enzimática.

Tabla 8-2: Pruebas cualitativas galerías API ZYM. Donde 0 = reacción negativa, 1 = reacción débil, 2, 3 y 4 = reacción moderada, 5 = reacción fuertemente positiva.

Muestra	Día	Blanco	Fosfatasa alcalina	Esterasas (C 4)	Esterasas lipasa (C 8)	Lipasa (C 14)	Leucina arilamidasa	Valina arilamidasa	Cistina arilamidasa	Tripsina	α -quimotripsina	Fosfatasa ácida	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa (Fosfoamidasa)	α -Galactosidasa	β -Galactosidasa	β -Glucuronidasa	α -Glucosidasa	β -Glucosidasa	N-acetil- β -glucosaminidasa	α -Mannosidasa	α -Fucosidasa
Blanco	4	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	4	5	3	1	3	3	3	1	3	1
Blanco	7	2	4	4	3	2	2	2	3	2	2	5	2	2	5	2	2	2	5	2	5
5 g/L	2	3	3	4	4	3	3	3	3	3	3	5	5	3	3	3	3	3	4	3	3
5 g/L	5	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	4	1	2	2	2	2	2	2	2	2
5 g/L	6	1	1	4	3	1	2	2	2	2	2	5	3	1	2	1	1	1	2	1	1
10 g/L	1	3	1	1	3	3	3	3	3	3	3	5	3	2	3	3	3	3	1	3	1
10 g/L	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	5	4	1	1	1	1	1	2	1	1
10 g/L	7	2	2	3	2	1	2	2	2	2	2	5	4	2	1	2	3	4	4	2	1
10 g/L	6	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	5	3	1	1	1	1	1	2	1	1
15 g/L	2	2	4	4	4	2	3	3	3	3	4	5	5	2	3	3	3	3	3	2	1
15 g/L	3	2	3	3	3	2	2	2	2	2	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2
15 g/L	5	2	2	3	3	2	2	2	2	2	3	5	2	2	2	2	2	3	2	1	1

8.3. Pruebas cuantitativas

8.3.1. Actividad Hexosaminidasa (NHAsas)

En la Figura 8-4 se muestran los resultados obtenidos para la cuantificación volumétrica de quitinasas en función de la proteína soluble extracelular presente en el medio. El blanco en el primer día presentó una baja producción de NHAsas (0.807 mU/mL), aumentando proporcionalmente en función de el tiempo hasta los días 7 y 8 que es donde alcanza la máxima producción (2.0484 mU/mL); el máximo de proteína soluble no coincidió con el

máximo de NHasas.

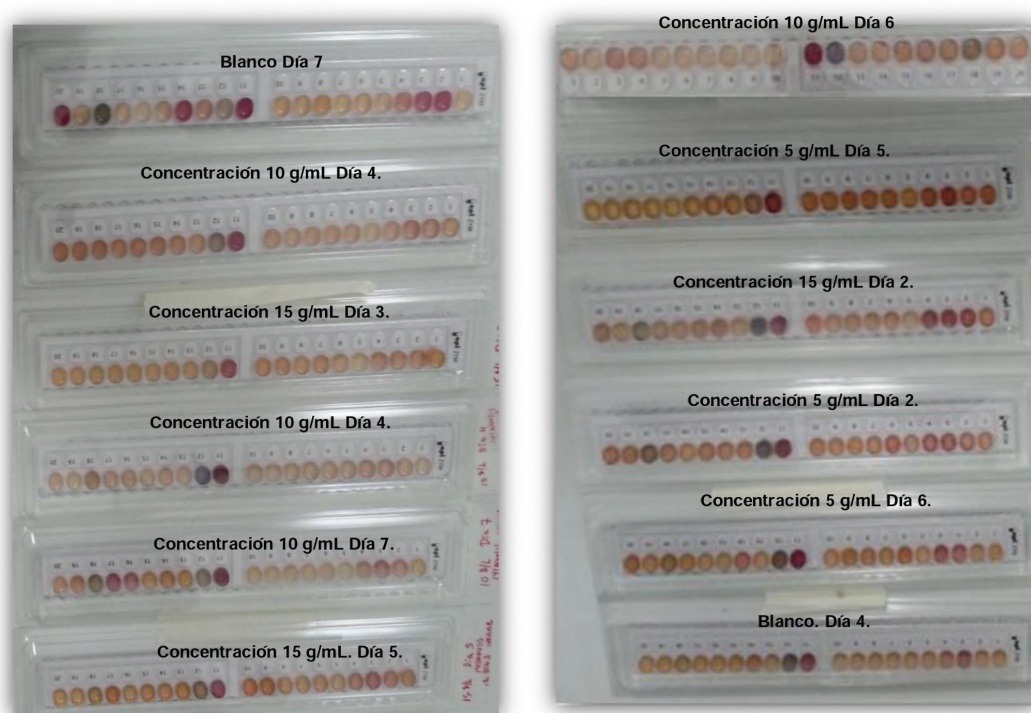


Figura 8-3: Galería API ZYM para los diferentes tratamientos en el día de mayor actividad enzimática

Cuando la concentración de enzima comenzó a incrementarse, la proteína soluble decayó, esto implicaría que las NHasas se produjeron en menor cantidad en comparación con la proteína generada. La concentración de proteína soluble aumentó junto con la de NHasas del día 2 al 4, pero la mayor actividad específica (AE) se presentó el séptimo día (1.759 mU/ β g proteína). El tratamiento de 5 g/L presentó una máxima concentración volumétrica al quinto día (1.383 mU/mL) coincidiendo con un pico de proteína soluble y AE de 0.987 mU/ β g proteína, indicando que en este día de toda la proteína excretada por el hongo las NHasas fueron las predominantes; después la concentración disminuyó gradualmente hasta el final de la fermentación. El tratamiento de 10 g/L mostró al quinto día la mayor AE (0.240 mU/ β g proteína), pero la producción volumétrica se mantuvo sin cambios relevantes durante toda la fermentación; este tratamiento mostró los valores más bajos de enzima en

comparación con el blanco y los otros tratamientos, la máxima concentración de NHasas se observó al inicio de la fermentación con un valor de 0.381 mU/mL. El tratamiento de 15 g/L mostró la mayor concentración de NHasas en el día 3 (1.503 mU/mL), el cual se encuentra 5.98 veces por debajo del valor maximo reportado por Jiménez-Alejandro, 2015 al segundo día; y la máxima AE hasta el día 6 (0.941 mU/ β g proteína), indicando que en este día de todas la enzimas excretadas por el hongo, la mayor concentración fue de NHasas (Figura 8-4).

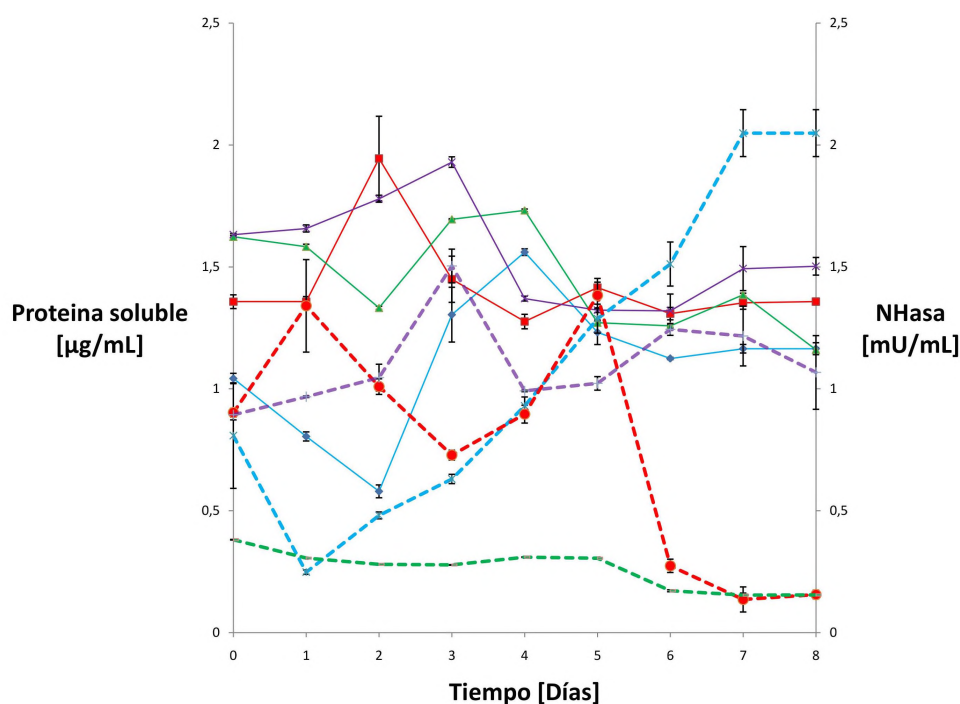


Figura 8-4: Actividad exoquitinasas (NHase) en función de la proteína soluble. Proteína blanco (♦), Proteína 5 g/L (■), Proteína 10 g/L (▲), Proteína 15 g/L (X), NHase Blanco (- - -), NHase 5 g/L (- - -), NHase 10 g/L (- - -), NHase 15 g/L (- - -).

8.3.2. Proteasas

Las figuras 8-5 y 8-6 muestran los perfiles de producción de proteasas con diferentes concentraciones de chapulín y el blanco. El blanco (Figura 8-5) al inicio de la fermentación

obtuvo una concentración de 9.111 U/mL, incrementándose en los días uno y dos, y en el tercer día este valor disminuyó, aumentando gradualmente los días 4 y 5 y disminuyendo el día sexto e incrementándose para los días 7 y 8, este perfil es característico de asimilación de sustratos complejos. Cabe destacar que la mayor concentración de proteasas en comparación con los tratamientos sucedió el día 7 (31.555 U/mL) lo cual no es coincidente con la máxima AE, observada en el día 2 (31.451 U / β g proteína). Mientras que para el tratamiento 10 g/L la máxima se presentó en el sexto día (1.035 mU/mL) junto con una AE de 8.23×10^{-4} U / β g proteína y el tratamiento de 15 g/L presentó su máxima producción volumétrica al quinto día (0.652 mU/mL) con una AE de 4.93×10^{-4} U / β g proteína. A partir del quinto

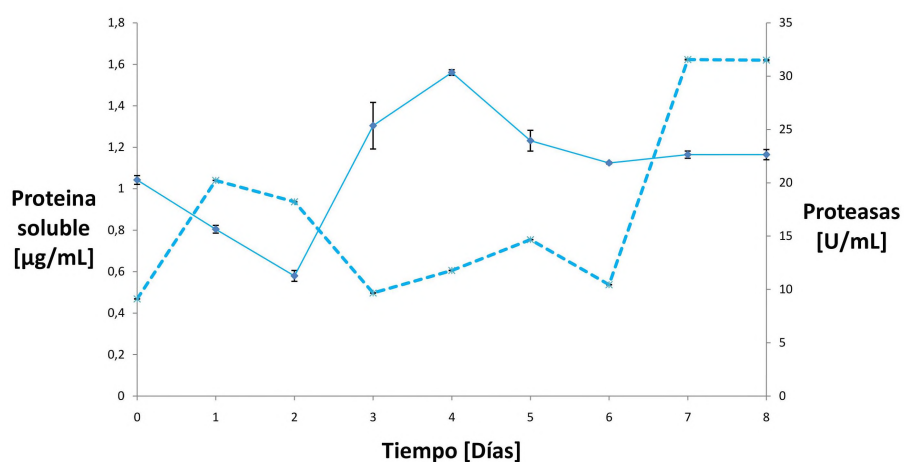


Figura 8-5: Relación de proteína soluble-proteasas (Blanco) Proteína blanco (◆), Proteasa Blanco (- - -).

día la concentración de proteasas fue aproximadamente igual en todos los tratamientos. Cabe destacar que las concentraciones de proteasas obtenidas en los tratamientos fueron mil veces menores en comparación con el blanco, esto debido a las altas concentraciones de carbono lo que causó una represión sobre la producción enzimática, estas observaciones se justifican al comparar los resultados con lo publicado por Montesinos-Matías, (2012) donde obtuvo concentraciones de proteasas muy por arriba de las obtenidas en este trabajo, 82.07 U/mL mientras que la máxima producción en este trabajo fue de 31.45 U/mL, en el blanco; los valores reportados se atribuyen a la inclusión de la cutícula tratada con tetraborato sin

ninguna otra fuente de glucosa.

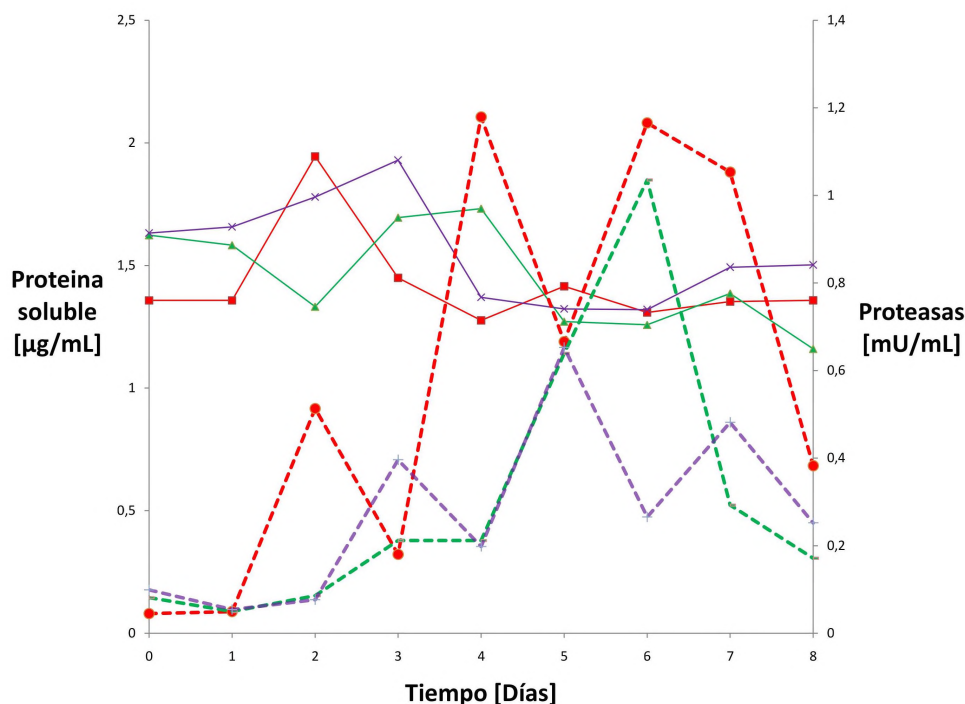


Figura 8-6: Producción de proteasas en función de la proteína soluble. Proteína blanco (◆), Proteína 5 g/L (■), Proteína 10 g/L (▲), Proteína 15 g/L (X), Proteasa 15 g/L (- - -), Proteasa 5 g/L (- - -), Proteasa 10 g/L (- - -), Proteasa 15 g/L (- - -).

Cabe mencionar que la relación C/N obtenida para las fermentaciones blanco en este trabajo, fue mayor en comparación con las diferentes concentraciones de inductor utilizadas (Tabla 8-3); ya que el blanco contenía menor cantidad de nitrógeno incrementando la relación. Al incluir al chapulín como inductor en diferentes concentraciones, se aumentó de manera sustancial la concentración de nitrógeno y la de carbono fue proporcional a la concentración empleada de inductor, haciendo que la relación disminuyera. Montesinos-Matías, (2012) reporta altos valores de producción enzimática (proteasas y quitinasas) al trabajar con un medio mínimo sin glucosa y con cutícula (tratada con tetraborato para su desproteización) manteniendo una relación C/N de 6.86; al comparar sus resultados con los de este trabajo se observó que todos los tratamientos y el blanco presentaron una relación C/N más alta, debido a que al inductor no se le dio ningún tipo de tratamiento.

Tabla 8-3: Relación C/N para cada una de las concentraciones de inductor empleadas.

Concentración	Relación C/N
Blanco	9.4341
5 g/L	8.4882
10 g/L	7.7218
15 g/L	7.4083

8.3.3. Lipasas

En la Figura 8-7 se muestra el perfil enzimático para la producción de lipasas para el blanco, inicia con una actividad mínima hasta el día 2, después aumenta hasta llegar a la máxima concentración al sexto día (1.296 mU/mL), para disminuir continuamente los días posteriores hasta el final de la fermentación. El tratamiento de 5 g/L mostró la mayor producción en el segundo día (0.853 mU/mL) coincidiendo con la mayor producción de proteína soluble (1.944 β g/mL), indicándonos que del total de proteína que *Beauveria* produjo ese día una gran parte son lipasas; al tercer día la actividad enzimática decayó, para incrementar-se nuevamente; a partir del quinto día la producción enzimática se mantuvo prácticamente constante.

La concentración de 10 g/L, comenzó con una producción enzimática mínima, la cual se incremento hasta llegar al día 4 a partir de donde se mantiene prácticamente constante, hasta alcanzar la máxima producción al séptimo día (0.843 mU/mL) decayendo al día siguiente.

El tratamiento de 15 g/L mostró el menor de los perfiles de producción en comparación con el resto de los tratamientos, pero superior con respecto al blanco. La máxima producción enzimática fue al cuarto día (0.478 mU/mL), descendiendo gradualmente hasta el día 8.

8.3.4. Azúcares reductores

La Figura 8-8 presenta el perfil de liberación de azúcares reductores (estimados como NAG) comparado con la producción de NHasas; esta comparación se realizó para conocer la concentración de monómero de N-acetilglucosamina que se está liberando en función de la

producción y actividad de NHasas producidas, de no coincidir los perfiles se podría afirmar que hay otras enzimas hidrolizando la fuente de carbono, como por ejemplo glucanasas. El blanco mantuvo una producción prácticamente constante los días del 1 al 3; presentando la máxima liberación al inicio de la fermentación ($181.305 \mu\text{g}/\text{mL}$) seguida del quinto día ($156.212 \mu\text{g}/\text{mL}$); para los días 6 y 7 la producción permaneció constante y para el octavo descendió considerablemente ($70.645 \mu\text{g}/\text{mL}$). En cuanto a la relación entre la producción de NHasas y la liberación de azúcares reductores se observó que la liberación de azúcares osciló desde el día 0 hasta el 5, siendo este día el único en el cual ambas concentraciones coinciden, pues mientras los azúcares reductores se encontraron en su máxima expresión la producción de NHasas fue elevada, pero no la máxima.

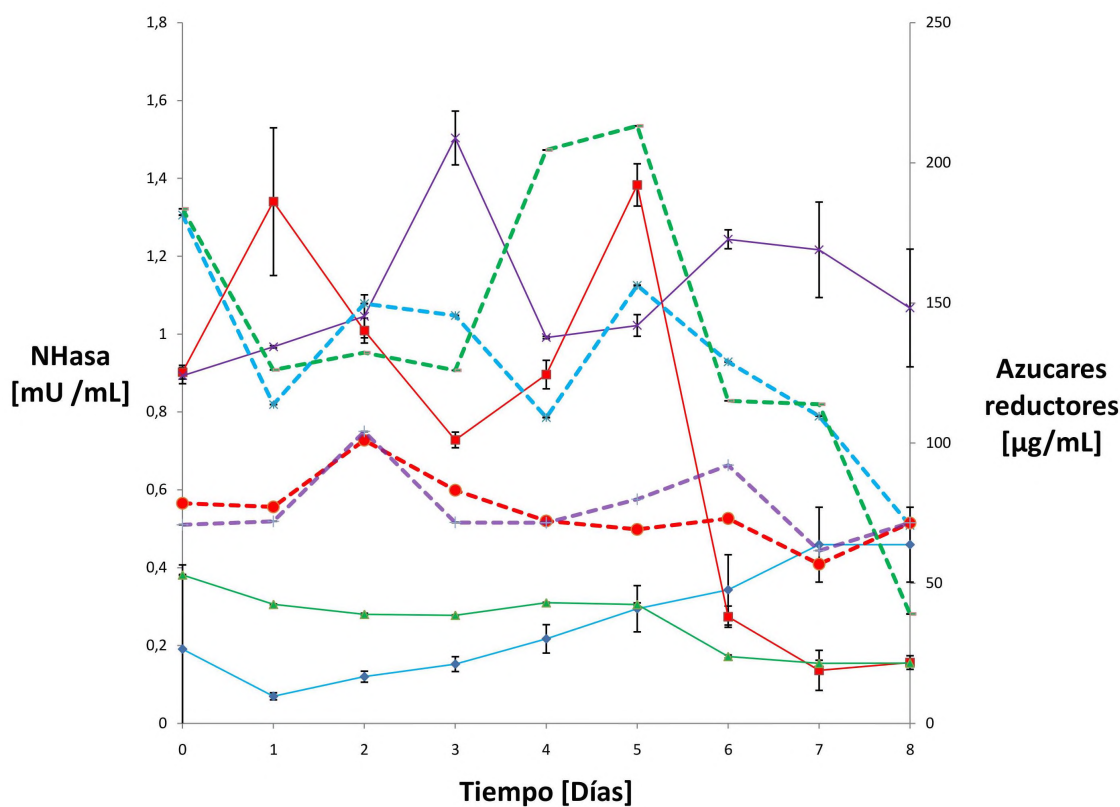


Figura 8-7: Relación de proteína soluble-Lipasas. Proteína blanco (◆), Proteína 5 g/L (■), Proteína 10 g/L (▲), Proteína 15 g/L (X), Lipasas Blanco (- - -), Lipasas 5 g/L (- - -), Lipasas 10 g/L (- - -), Lipasas 15 g/L (- - -).

El tratamiento de 5 g/L no mostró variación sensible en la liberación de azúcares reductores a lo largo de toda la fermentación, los valores estuvieron entre 50 y 100 $\beta\text{g/mL}$ a excepción del valor máximo (101.010 $\beta\text{g/mL}$) obtenido en el día 2 que coincide con la máxima AE de las NHasas. Esto indicaría, que en este día se produjo la mayor concentración de NHasas; pero al comparar de manera global la producción enzimática junto con la liberación de azúcares reductores se observó que no hay una relación proporcional entre ellos, ya que los días donde las NHasas mostraron sus máximos no coincidieron con la máxima liberación de azúcares reductores, por el contrario, al estar elevada la producción de NHasas la liberación de azúcares reductores permaneció baja y sin variaciones considerables a lo largo de la fermentación. Por otro lado, el tratamiento de 10 g/L, al inicio presentó un valor elevado

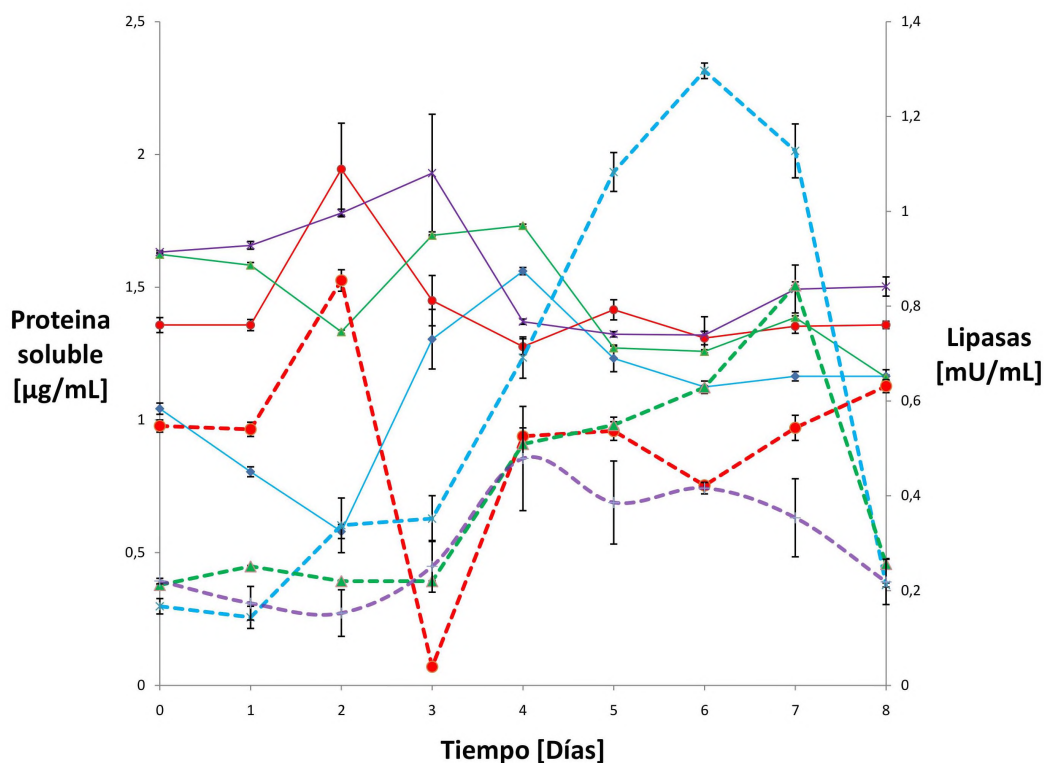


Figura 8-8: Relación de NHasa-Azúcares reductores. NHasa blanco (\diamond), NHasa 5 g/L (\blacksquare), NHasa 10 g/L (\blacktriangle), NHasa 15 g/L (\times), Azucres reductores Blanco (- - -), Azucres reductores 5 g/L (- - -), Azucres reductores 10 g/L (- - -), Azucres reductores 15 g/L (- - -).

de azúcares reductores ($183.5625 \beta\text{g/mL}$) del día 1 al 3 la concentración fue menor que la inicial pero constante, para los días 4 y 5 se incrementó, siendo el ultimo día el de mayor producción ($213.145 \beta\text{g/mL}$) y de AE para las NHasas, indicando que a pesar de la baja concentración volumétrica la mayor parte de la proteína soluble eran NHasas. Durante los días 6 y 7 la liberación de azúcares reductores fue similar a la inicial, para el octavo día la liberación disminuyó.

En el tratamiento de 15 g/L, de manera general se observó que la liberación de azúcares reductores se mantuvo en un rango de 70 a 80 $\beta\text{g/mL}$, excepto los días de mayor liberación. Las concentraciones fueron menores en cualquier tratamiento y el blanco. La mayor liberación de azúcares reductores fue al segundo día ($104.118 \beta\text{g/mL}$) y es coincidente con la mayor AE de NHasas, indicando que para este día la mayor parte de la proteína soluble fueron NHasas, posteriormente se presentó otro aumento en el día 6 ($92.104 \beta\text{g/mL}$).

Las máximas producciones enzimáticas, tanto volumétricas como de AE llegan a coincidir algunos días como se muestra remarcado con verde en la Tabla 8-4. Las proteasas se produjeron en mayor concentración entre los días 4 y 6 para todos los tratamientos y blanco, según lo reportado por Leopold y Samšičáková, (1970) las proteasas deben expresarse en los primeros cuatro días de crecimiento, este comportamiento se observó particularmente con el tratamiento de 5 g/L donde el máximo se presentó al cuarto día, para los tratamientos de 10 y 15 g/L los días cambiaron, desfasándose 2 días para el primero y 1 para el segundo; pero contrastando estos resultados con el trabajo de Bidochka, (1998) se observó que se encuentran en rangos aceptables, pues el autor reporta las concentraciones máximas para el sexto y séptimo día. Comparando las máximas concentraciones obtenidas en este trabajo con lo reportado por Montesinos-Matías, (2012) y Bidochka, (1998) las concentraciones volumétricas están por debajo, excepto para el blanco que presenta mayor producción que Bidochka, (1998).

Las quitinasas mostraron una máxima AE entre los días 5 al 7, lo cual coincide con lo reportado por Leopold y Samšičáková, (1970) quienes mostraron que las quitinasas (NAGasa) deben expresarse después del quinto día y en mayor producción que las proteasas; esto

Tabla 8-4: Resumen de los días de máxima producción enzimática. Volumétrica y actividad específica

Concentración [g/L]	Enzima	Día	Actividad volumétrica [mU/mL]	Día	Actividad específica [mU/ μ g proteína]
0	Quitinasas	7	0.458	7	0.394
	Proteasas	7	31.555	2	31.451
	Lipasa	6	0.296	6	0.263
5	Quitinasas	5	1.383	1	0.987
	Proteasas	4	1.179	4	9 x 10 ⁻⁴
	Lipasa	2	0.853	8	0.464
10	Quitinasas	0	0.381	5	0.24
	Proteasas	6	1.035	6	8 x 10 ⁻⁴
	Lipasa	7	0.843	7	0.608
15	Quitinasas	3	1.503	6	0.941
	Proteasas	5	0.652	5	4 x 10 ⁻⁴
	Lipasa	4	0.478	4	0.349

coincidió con los tratamientos de 10 y 15 g/L; sin embargo no fue así para el tratamiento de 5 g/L donde el día de mayor producción de NHasas fue el primero, y su expresión fue mayor que la de proteasas, la otra excepción fue el blanco, que presentó una mayor concentración de proteasas.

La producción de lipasas varió con respecto a las concentraciones de inductor usadas; los reportes indican que estas enzimas se presentan a partir del quinto día (Hegedus y Khachatourians, 1988); en este trabajo las mayores concentraciones de lipasas se encuentran alrededor del día reportado por Hegedus y Khachatourians, (1988) pues van desde el día 4 (15 g/L), 6 (blanco), 7 (10 g/L) y 8 (5 g/L).

8.4. Análisis estadístico

8.4.1. Concentraciones volumétricas

8.4.1.1. Análisis de varianza

El resultado de este análisis se muestra en la Tabla 8-5, donde se observan los grupos formados de acuerdo a la prueba de Tukey. Estadísticamente la proteína soluble, las NHasas y las lipasas pertenecen al mismo grupo, esto indica que no hay una diferencia significativa entre la producción enzimática para estas tres pruebas.

Tabla 8-5: Agrupación usando método de Tukey

	Media	Agrupamiento
Proteasas	4.366	A
Proteína soluble	1.384	B
NHasas	0.808	B
Lipasas	0.455	B

8.4.1.2. Análisis de medias individuales para cada determinación

Se realizó un análisis de medias con los valores de las determinaciones enzimáticas en cada tratamiento (concentraciones de 0, 5, 10 y 15 g/L), de cada día durante 8 días y sus respectivas repeticiones (5 por determinación). Para la proteína soluble, el análisis de medias mostró que el día de mayor producción de proteína soluble para el blanco fue el día 4, para el tratamiento de 5 g/L el día 2, para 10 g/L todos los valores están por debajo de la media, es decir, presenta un efecto negativo pues todos los valores de las concentraciones enzimáticas se encuentran por debajo de la media, lo que lo vuelve un tratamiento deficiente, lo mismo pasa con el tratamiento de 15 g/L. Estadísticamente los mejores tratamientos para la producción de proteína soluble fueron el blanco y el de 5 g/L, siendo este último el más rápido en cuanto a la liberación de enzimas, pues desde el segundo día ya tiene un alto contenido de proteína en el medio, esto puede deberse a la inducción producida por el chapulín. Al evaluar los

efectos de las medias en cada tratamiento (las diferentes concentraciones evaluadas) para la Proteína soluble se observó que el tratamiento de 15 g/L tiene un mayor efecto en la liberación de NHasas, mientras que los tratamientos de 5 y 10 g/L se encuentran por debajo de la media, es decir, no tuvieron efecto sobre la concentración de éstas, siendo el blanco el que menor efecto presentó, lo cual era esperado al no tener inductor. Al evaluar el efecto por día se observó que el mejor tiempo de secreción de proteínas solubles fue el día 3, (Anexo 1, Figura A-1).

N-acetilhexosaminidasas El análisis de medias en el blanco mostró que los mejores días de producción enzimática fueron el 7 y 8, el día 6 también es un día que se encuentra ligeramente por encima de la media pero no tanto como los días mencionados, mientras que el tratamiento de 5 g/L muestra altas actividades enzimáticas al inicio (día 1 y 2) y al día 5 de la fermentación, pero después de este día y hasta el final de la fermentación se presenta un efecto negativo en la producción enzimática, indicándonos que después del quinto día la producción enzimática disminuye considerablemente. El tratamiento de 10 g/L muestra un efecto negativo en la producción enzimática, es decir, la producción de N-acetilhexosaminidasas fue baja y eso hace que se encuentre por debajo de la media, el tratamiento de 15 g/L presenta la media más alta de actividad enzimática únicamente el día 3. Al analizar el efecto de las concentraciones (tratamiento usado) se puede ver que las que causan un mayor efecto fueron el blanco y la concentración de 15 g/L; por último, el día de mayor efecto para todos los tratamientos y el blanco fue el día 5, lo cual coincide con Leopold y Samšičáková, (1970) quienes mostraron que las quitinasas están presentes en mayor cantidad en el quinto día de fermentación (Anexo 1, Figura A-2).

Lipasas. El análisis de medias mostró un mayor efecto en el blanco (días del 5 al 7) y en el tratamiento de 5 g/L (días 1,2 y 8), el tratamiento de 10 g/L mostró la menor interacción y el tratamiento de 15 g/L mostró al día 3 como el de mayor producción. Al evaluar de manera general el efecto que causaron las concentraciones utilizadas (tratamientos) se observó que la

mayor producción de lipasas fue con el blanco y empleando en 5 g/L de inductor; al evaluar el efecto del tiempo se obtuvieron los días 6 y 7 como los mejores para su producción, considerando también los días 4 y 5 aunque en menor proporción (Anexo 1, Figura A-3).

Azúcares reductores. Se observó en el análisis de medias que el blanco en el día cero tuvo el mayor contenido de azúcares, disminuyendo conforme se incrementaron los días, lo contrario sucede con el tratamiento de 5 g/L, donde estadísticamente la mayor liberación de azúcares se presentó en el día 8; el tratamiento de 10 g/L muestra un mayor efecto para los días 4 y 5, lo cual no coincide con la producción de NHasas para este tratamiento, esto indicaría la existencia de otra(s) enzima(s) que está(n) hidrolizando a la quitina para liberar los monómeros de N-acetilglucosamina, pudiendo ser una glucosidasa ya que en las pruebas API ZYM se obtuvieron resultados positivos para diversas enzimas glucosídicas; para el tratamiento de 15 g/L se observó que el día 8 es el de mayor liberación de azúcares reductores coincidiendo con el día de mayor producción de NHasas. El blanco liberó la mayor cantidad de azúcares reductores (estimados como glucosa) junto con el tratamiento de 10 g/L. Al analizar el efecto del tiempo de producción se observó que el de mayor liberación de azúcares reductores fue al inicio de la fermentación (día 0), al segundo y quinto día, lo cual es coincidente con el día de mayor liberación para las NHasas (Anexo 1, Figuras A-2 y A-4).

8.4.1.3. Gráfico de intervalos individuales para cada determinación

En estos gráficos se puede observar que para la Proteína soluble sólo el blanco se encuentra dentro de un intervalo diferente al de los tratamientos, esto quiere decir, que no hay una diferencia significativa entre las medias al utilizar una u otra concentración de inductor. También se observó que aunque no existan diferencias significativas entre tratamientos, éstos producen mayor proteína soluble que el blanco, y es el de 15 g/L el que tiene un intervalo mayor de concentraciones (Anexo 1, Figura A-5). Para las N-acetilhexosaminidasas se observó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos de 5, 15 g/L y el blanco; pero si existió con 10 g/L, pues las concentraciones obtenidas fueron mínimas, en compa-

ración con los demás tratamientos, y aunque no existieron diferencias significativas entre algunos tratamientos con el blanco se observó en el gráfico (Anexo 1, Figura A-6) que el blanco generó una mayor concentración de NH₄As.

Para la producción de proteasas, los tratamientos no mostraron diferencias significativas respecto al blanco (Anexo 1, Figura A-7). Lo mismo sucedió con la producción de lipasas, no hubo diferencias significativas entre tratamientos y el blanco (Anexo 1, Figura A-8); pero sí se observó en el rango de concentraciones probadas, que los tratamientos produjeron en orden inverso con respecto al blanco, siendo el tratamiento de 15 g/L el de menor producción y el de 5 g/L el de mayor, ambos sin superar al blanco.

Los azúcares reductores presentaron dos grupos, el primero no mostró diferencias significativas entre el blanco y la concentración de 10 g/L, observándose que el tratamiento de 10 g/L fue el que presentó mayor concentración de azúcares reductores; el segundo no muestra diferencias significativas con los tratamientos de 5 y 15 g/L, pero su producción de azúcares se encuentra por debajo del grupo 1 (Anexo 1, Figura A-9).

8.4.2. Actividades específicas.

8.4.2.1. Análisis de medias individuales para cada determinación en actividad específica (AE)

Para las N-acetilhexosaminidasas se observó que los días de mayor producción en el blanco fueron del 6 al 8, para el tratamiento de 5 g/L estos fueron 1 y 5, para 10 y 15 g/L no se observaron interacciones, es decir, sus medias se encuentran por debajo de la media estadística. El efecto de las medias mostró que los mejores fueron el blanco y en menor proporción el tratamiento de 15 g/L. El tiempo de mayor producción enzimática fue el día 5 (Anexo 1, Figura A-10).

Las lipasas mostraron que el blanco tiene mayor producción durante los días del 5 al 7, mientras que para 5 g/L esta se localizó al inicio (días 0 y 1) y al final (día 8). Se observó nuevamente, un efecto negativo para los tratamientos de 10 y 15 g/L, pues los

valores se encuentran por debajo de la media y estadísticamente no tienen un día de mayor producción. El blanco únicamente tuvo un mayor efecto significativo, todos los tratamientos se ubicaron por debajo de la media, por último los días de mayor producción enzimática fueron del 5 al 7 (Anexo 1, Figura A-11).

8.4.2.2. Grafico de intervalos individuales para cada determinación en actividad específica (AE)

En los gráficos de intervalos para las actividades específicas de N-acetilglucosaminidasa se observaron tres grupos, en el primero se encontró al blanco, con la mayor producción de N-acetilglucosaminidasa, el segundo a los tratamientos 5 y 15 g/L los cuales presentaron una menor producción en comparación con el primero; el último con 10 g/L que presentó la menor producción de enzima en comparación con los otros grupos (Anexo 1, Figura A-12). Al comparar los resultados del estadístico sobre las concentraciones volumétricas con los resultados de AE, se observó que, mientras en el estadístico de concentraciones volumétricas no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el blanco, sí existió diferencia entre tratamientos, ya que la concentración del inductor afectó la cantidad específica de N-acetilhexosaminidasa obtenida.

Para las proteasas ocurrió lo mismo que en la prueba para la concentración volumétrica, no existieron diferencias significativas entre tratamientos y blanco. Esto puede deberse a la represión que causaron las altas concentraciones de carbono presentes en el medio, ya que según Montesinos-Matías, (2012) y Bidochka, (1998), altas concentraciones de fuente de carbono pueden causar una represión en la producción de proteasas que a su vez causará una baja en la producción de otras enzimas como las quitinasas (Anexo 1, Figura A-13).

Estadísticamente hay dos tipos de efectos para la producción de lipasas, en el primer grupo se encontró únicamente el blanco, el cual además mostró las mayores concentraciones de proteasas, en el segundo grupo estuvieron los tratamientos, esto indicaría que la aplicación de un insecto como inductor en conjunto a una fuente de carbono de fácil asimilación (glucosa) no generó una diferencia significativa en la producción enzimática, por el contrario, condujo

a una menor producción debido a las altas concentraciones de carbono y nitrógeno (Anexo 1, Figura A-14).

9. CONCLUSIONES

1. La adición de chapulín en conjunto a una fuente de carbono de fácil asimilación como la glucosa al medio, no incrementó la producción enzimática de *Beauveria bassiana* 885.2 en fermentación líquida.
2. La mayor producción de quitinasas (NHAsas) expresadas como actividades volumétricas se obtuvieron para el blanco y el tratamiento con 15g/L de chapulín, mientras que la mayor actividad específica para esta enzima se obtuvo con los tratamientos de 5 y 15 g/L; además de que dichas concentraciones se obtuvieron en menor tiempo. Para las proteasas el blanco fue el mejor productor, por la menor cantidad de fuente de carbono. Las lipasas para los tratamientos de 5 y 10 g/L presentaron aproximadamente el doble de producción en comparación con el blanco; el único inconveniente fue que tardan un día más en llegar al máximo de producción.
3. La baja actividad enzimática se debió a la alta concentración de carbono presente en el medio, la cual fue mayor que la reportada de 1.25 g/L de glucosa, provocando una inhibición por sustrato.
4. El uso del chapulín en combinación con una fuente de carbono de fácil asimilación en medio líquido, tuvo como efecto retardar la expresión de las enzimas, por lo que en términos de productividad y para garantizar una mayor biomasa en menor tiempo, la composición del medio del blanco o control resulta más adecuada.

10. APORTACIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo contribuye al conocimiento sobre las enzimas que *B. bassiana* puede expresar al utilizar diferentes concentraciones de chapulín, confirmando que altas concentraciones de C/N pueden llegar a inhibir la producción enzimática del hongo. También enriquece el conocimiento a nivel enzimático que se tiene sobre esta cepa para conservar una idea de cuánto sustrato nuevo se puede utilizar sin que intervenga en su expresión enzimática; para de esta forma poder potencializar la expresión enzimática y puedan crearse en un futuro formulados biológicos que contengan un nivel considerable de enzimas hidrolíticas y que además se conozca la cantidad de enzima presente, juntos con las demás normas de calidad que debe cumplir el formulado.

Ya que las enzimas son un factor determinante para la penetración y degradación de la cutícula de un insecto durante el proceso de infección, deberían ser valoradas también como un criterio para la efectividad de un formulado biológico o para cuando se busquen nuevas cepas entomopatógenas o para el mejoramiento de HEP. Otros trabajos que ayudarían al enriquecimiento del conocimiento de esta cepa son:

- Utilizar un medio que solo utilice como fuente de carbono al chapulín, para observar si de esta manera la expresión enzimática aumenta y encontrar la concentración que no inhiba la producción enzimática; también se pueden probar nuevos sustratos y la combinación de ellos para poder hacer un medio más económico.
- Estudiar si hay una correlación entre la producción enzimática, la virulencia y patogenicidad del hongo, probándolo tanto *in vitro* como en campo. Estas propuestas llevarán a crear formulados con mayores estándares de calidad, que tengan más exactitud en

su forma de acción. Pues estos resultados arrojarán conocimiento adicional sobre las enzimas y toxinas involucradas en los mecanismos de patogenicidad de *B. bassiana*.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, I., Ahmd, F., y Pichtel, J. (2012). Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications. *Springer Science Business Media LLC*, 1(1):415–430.
- Alatorre-Rosas, R. (2004). Hongos entomopatógenos. En: Memorias del XV Curso Nacional de Control Biológico, Los Mochis (México).
- Alexopoulos, C., Mims, C. W., y Blackwell, M. (1996a). Introductory Mycology. John Willey and Sons. *Inc., New York*, 868.
- Alexopoulos, C., Mims, C. W., y Blackwell, M. (1996b). Introductory Mycology. John Willey and Sons. *Inc., New York*, 868.
- Ali, S., Wu, J., Huang, Z., y Ren, S. X. (2010). Production and regulation of extracellular chitinase from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Biocontrol Science and Technology*, 20(7):723–738.
- Alves, S. B., Rossi, L. S., Lopes, R. B., Tamai, M. A., y Pereira, R. M. (2002). *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of invertebrate pathology*, 81(2):70–77.
- Antonio, C. y Enrique, J. (2012). *Potenciación de la producción de enzimas degradadoras de cutícula a partir de dos aislamientos monospóricos de beauveria bassiana (BALS:) vuillemin para mejorar el biocontrol de la conchuela del frijol, epilachna varivestis (MULSANT)*, Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Aponte, G. y Carmona, I. (2000). Producción de conidiosporas de *Beauveria bassiana* como base para el desarrollo de un bioinsecticida. Tesis de pregrado. ingeniería química, Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional.
- Arenas Guzmán, R. (2003). Micología médica ilustrada.
- Aristegui, B. (2002). El reino de los hongos. *Rev Iberoam Micol*, 1(1):1–3.
- Barrera, J. (2007). *Introducción, filosofía y alcance del Control Biológico*, chapter 1. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México.
- Bidochka, M. J. (1990). *Interaction of the entomopathogenic fungus, Beauveria bassiana, with the migratory grasshopper, Melanoplus sanguinipes: a systematic study of pathogenesis.*
- Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. (1988). N-acetyl-D-glucosamine-mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and environmental microbiology*, 54(11):2699–2704.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1):248–254.
- Brewer, M. y Arguello, N. (1980). Guía ilustrada de insectos comunes de la Argentina. *Miscelánea*, 67:9–131.
- Bruguera, M. T., Abarca, M. L., Bragulat, M. R., y Cabañes, F. J. (1997). Determinación de actividades enzimáticas en cepas de *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum*. *Rev Iberoam Micol*, 14:119–124.
- Burnett, J. H. (2003). *Fungal populations and species*. Oxford University Press.
- Butt, T. M., Jackson, C., y Magan, N. (2001). *Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential*. CABI.

- Campos, R. A., Arruda, W., Boldo, J. T., da Silva, M. V., de Barros, N. M., de Azevedo, J. L., Schrank, A., y Vainstein, M. H. (2005). Boophilus microplus Infection by Beauveria amorpha and Beauveria bassiana: SEM Analysis and Regulation of Subtilisin-like Proteases and Chitinases. *Current microbiology*, 50(5):257–261.
- Castellanos, D. (1997). Importancia en la patogenicidad de la acción enzimática del hongo Beauveria bassiana sobre la broca del café. *Revista Colombiana de Entomología*, 23(1-2):65–71.
- Chang, T., Yang, X., y Ko, W. (1992). A sensitive method for detecting production of extracellular enzymes by fungi on solid media. *Mycologia*, 1(1):923–926.
- Coates, B. S., Hellmich, R. L., y Lewis, L. C. (2002). Allelic variation of a Beauveria bassiana (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. *Genome*, 45(1):125–132.
- Coudron, T., Kroha, M., y Ignoffo, C. (1984). Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. *Comparative biochemistry and physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 79(3):339–348.
- Davidson, R. H., Lyon, W. F., y cols. (1979). *Insect pests of farm, garden and orchard*. John Wiley & Sons.
- De Moraes, C. K., Schrank, A., y Vainstein, M. H. (2003). Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide Metarhizium anisopliae. *Current Microbiology*, 46(3):0205–0210.
- Dhar, P. y Kaur, G. (2009). Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from Metarhizium anisopliae isolates. *Annals of microbiology*, 59(3):545–551.
- Echeverría, F. (2006). *Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo*

- entomopatógeno Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin.*, Instituto tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
- Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., Li, D., Jin, K., Bidochka, M. J., y Pei, Y. (2007). Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1):295–302.
- Gallegos, G., M.S., C., y Olayo, P. (2003). *Entomopatógenos*. México, D.F.: trillas.
- González, M., Valencia, A., y Bustillo, A. (2001). Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 60:31–35.
- Hegedus, D. D. y Khachatourians, G. G. (1988). Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnology Letters*, 10(9):637–642.
- Humble, M., King, A., y Phillips, I. (1977). API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *Journal of Clinical Pathology*, 30(3):275–277.
- Jenkins, N. E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A., y Lomer, C. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information (United Kingdom)*.
- Jiménez-Alejandro, S. (2015). *Producción de quitinasas en cultivo líquido con hongos entomo y fitopatógenos utilizando tres sustratos quitinosos como inductor.*, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca.
- Kamp, A. y Bidochka, M. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied microbiology*, 35(1):74–77.
- Kunitz, M. F. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *The Journal of general physiology*, 30(4):291–310.

- Leopold, J. y Sams in áková, A. (1970). Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15(1):34–42.
- Lomer, H. y Lomer, C. (2002). *Pathologie dinsectes*. A.
- Miller, G. (1959). Determination of reducing sugar by DNS method. *Anal chem*, 31:426–428.
- Minocha, Y., Pasricha, J., Mohapatra, L., y Kandhari, K. (1972). Proteolytic activity of dermatophytes and its role in the pathogenesis of skin lesions. *Medical Mycology*, 10(1):79–85.
- Montesinos-Matías, R. (2012). *Relación de la inducción/represión de enzimas hidrolíticas con la infectividad en cepas de Beauveria bassiana resistentes a 2-desoxi-D-glucosa*, Universidad Autonoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de Salud. México D. F.
- Nicholls, C. I. (2008). *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Universidad de Antioquia.
- Palomo, J. M., Muñoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2002). Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19:279–286.
- Paterson, R., Bridge, P., y cols. (1994). *Biochemical techniques for filamentous fungi*. Number 1. CAB INTERNATIONAL.
- Peña Reyes, R. A. (2009). Caracterización taxonómica y molecular de cepas de hongos termófilos: estudios de crecimiento y producción de lipasas. Master's thesis, Universidad Autonoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División de ciencias biológicas y de la salud. México, D.F.

- Perdigo, L. (1996). *Entomology and Pest Management*, volume Second Edition. Prentice Hall Inc.
- Qazi, S. S. y Khachatourians, G. G. (2008). Addition of exogenous carbon and nitrogen sources to aphid exuviae modulates synthesis of proteases and chitinase by germinating conidia of *Beauveria bassiana*. *Archives of microbiology*, 189(6):589–596.
- Rehner, S. A. y Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1):84–98.
- Safavi, S., Shah, F. A., Pakdel, A. K., Rasouljan, G. R., Bandani, A. R., y Butt, T. M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1):116–123.
- Samsinokova, A., Msikova, A., y Leopold, J. (1971). Acción de sistemas enzimáticos de *Beauveria bassiana* sobre el exoesqueleto de *Galleria melonella* en estadio larvario. *Invertebrate Pathology*, 3(1):322–320.
- Smith, R., Pekrul, S., y Gula, E. A. (1981). Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of entomopathogenic hyphomycetes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38(1):335–344.
- St Leger, R. J., Cooper, R. M., y Charnley, A. K. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology*, 132(6):1509–1517.
- Talaei-Hassanloui, R., Kharazi-Pakdel, A., Goettel, M., y Mozaffari, J. (2006). Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Science and Technology*, 16(5):525–534.
- Tamez Guerra, P., Galán Wong, L. J., Medrano Roldán, H., García Gutiérrez, C.,

- Rodríguez Padilla, C., Gómez Flores, R. A., y Tamez Guerra, R. S. (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, 4(2):143–152.
- Tronsmo, A. y Harman, G. E. (1993). Detection and quantification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical biochemistry*, 208(1):74–79.
- Valdés, B. E., Vélez, P., y Montoya, E. (1999). Caracterización enzimática y patogenicidad de aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. *Cenicafé*, 50(2):106–118.
- Van Lenteren, J. (2008). *IOBC Internet book of biological control*. International Organization for Biological Control, Wageningen, The Netherlands.
- Vega, F. E. y Blackwell, M. (2005). *Insect-fungal associations: ecology and evolution*. Oxford University Press.
- Whipps, J. M. y Lumsden, R. D. (2001). Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. *Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential*, 1(1):9–22.
- Zimmerman, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37(1):373–379.

A. ANEXOS

A.1. Gráficas Estadísticas

A.1.1. Análisis de medias para actividades volumétricas

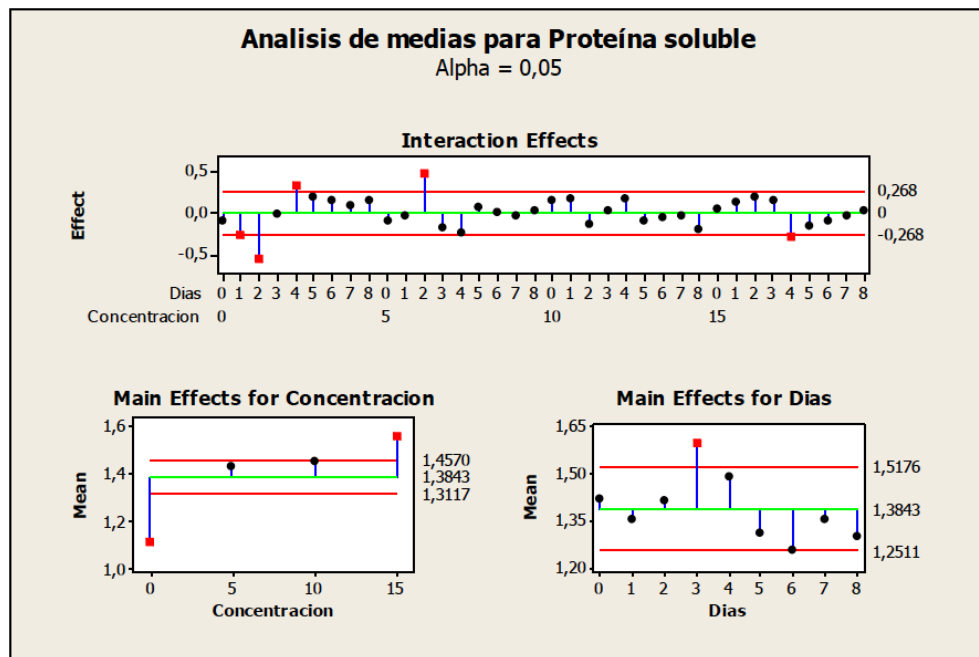


Figura A-1: Resultados del análisis de medias para la cuantificación volumétrica de proteína soluble.

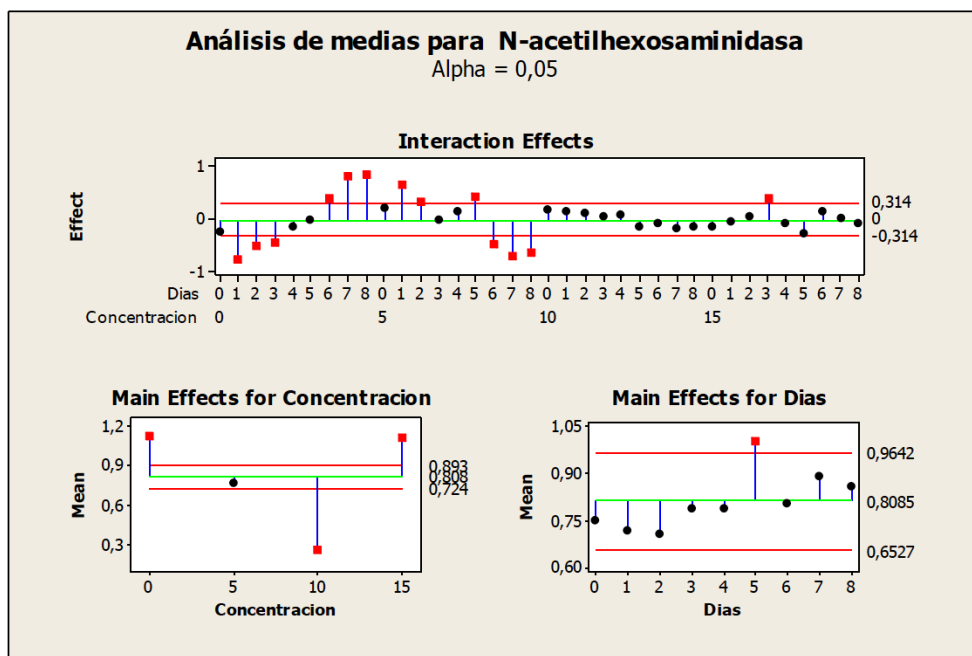


Figura A-2: Resultados del análisis de medias para la cuantificación volumétrica de N-acetilhexosaminidasa.

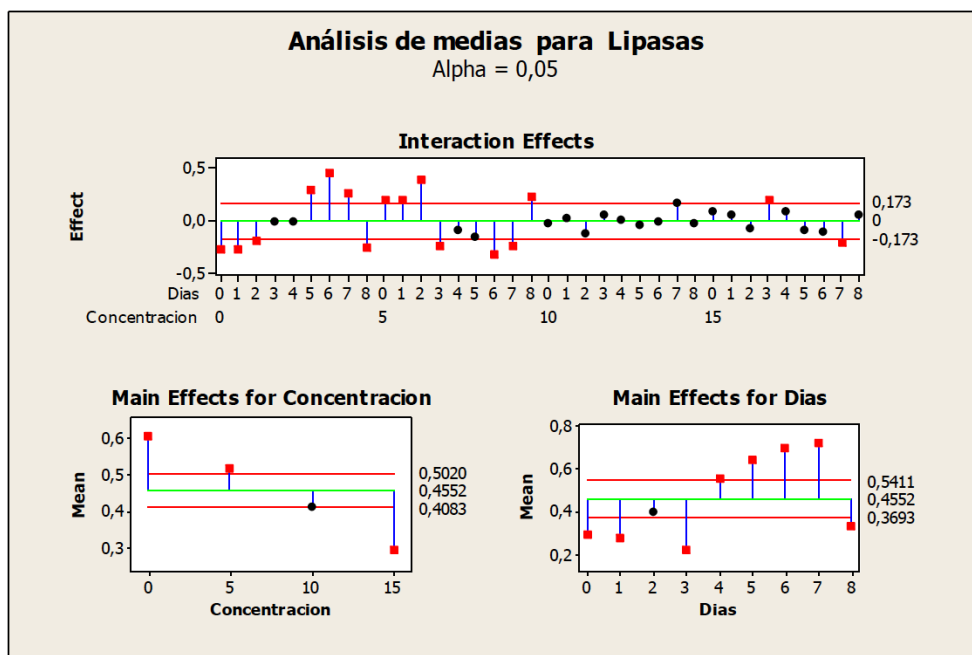


Figura A-3: Resultados del análisis de medias para la cuantificación volumétrica de lipasas.

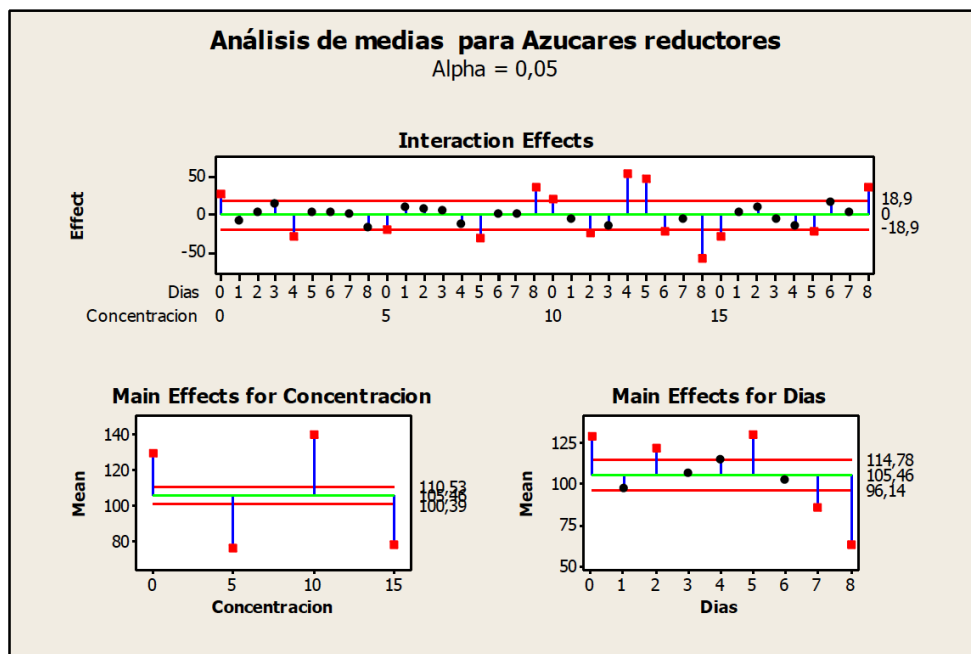


Figura A-4: Resultados del análisis de medias para la cuantificación volumétrica de azúcares reductores.

A.1.2. Gráficas de intervalos para actividades volumétricas

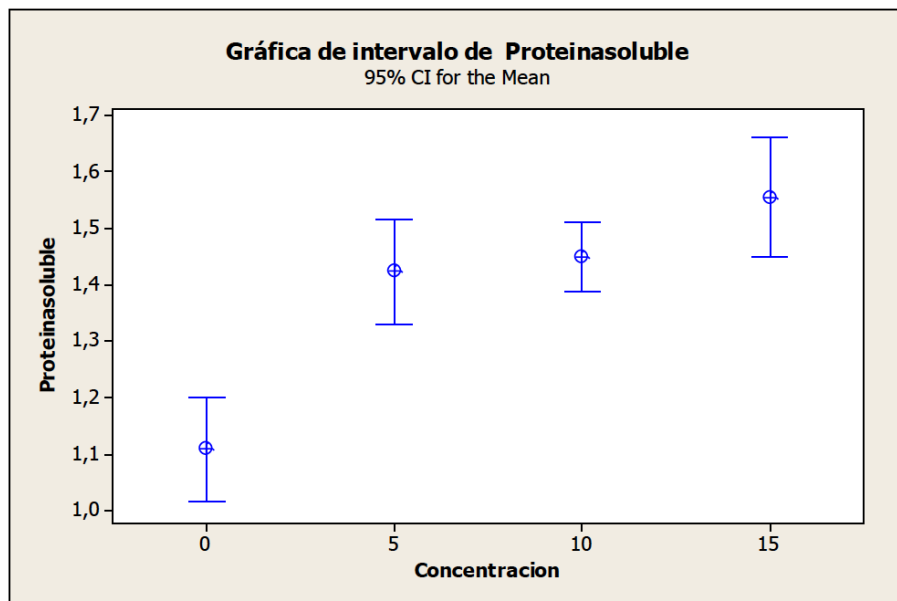


Figura A-5: Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Cuantificación volumétrica de Proteína soluble.

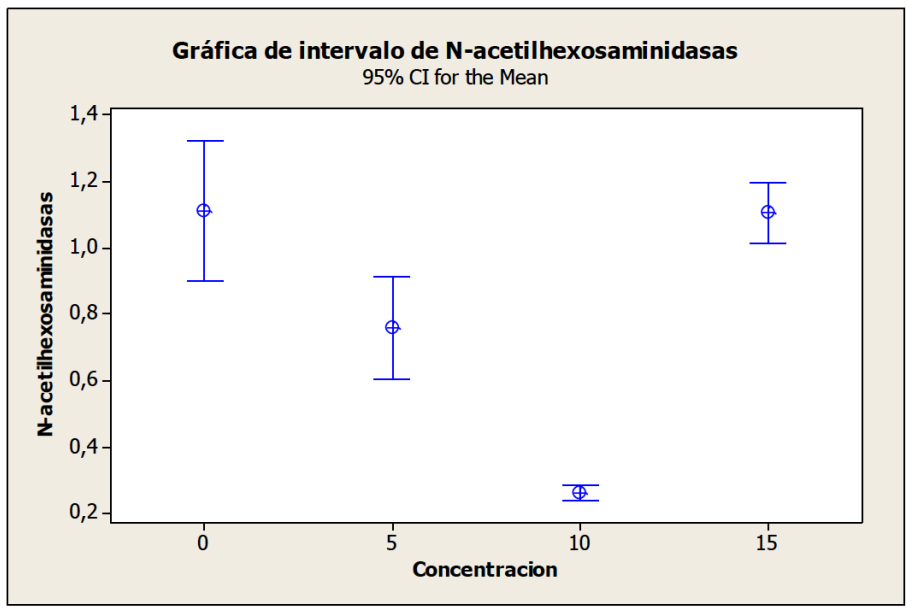


Figura A-6: Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Cuantificación volumétrica de N-acetilhexosaminidasa.

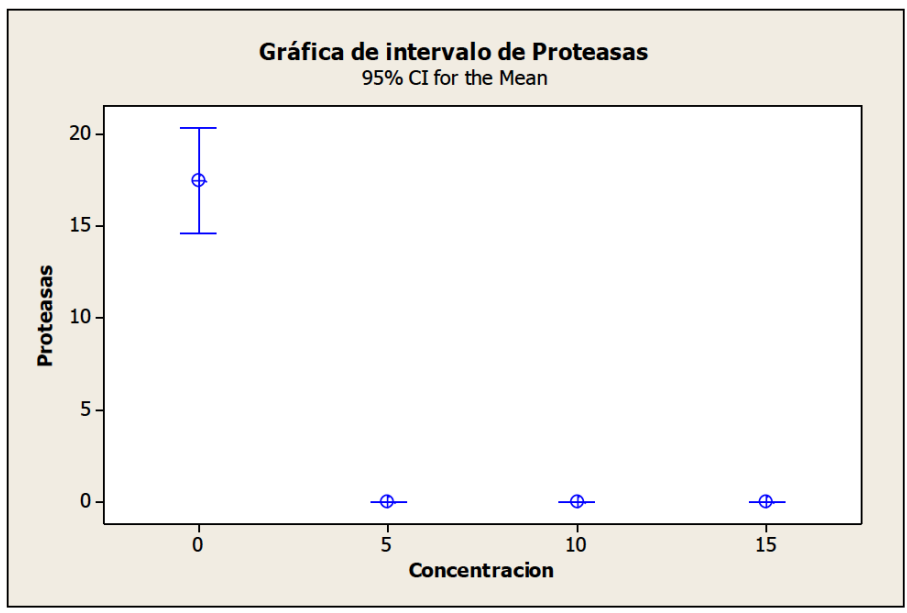


Figura A-7: Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Cuantificación volumétrica de proteasas.

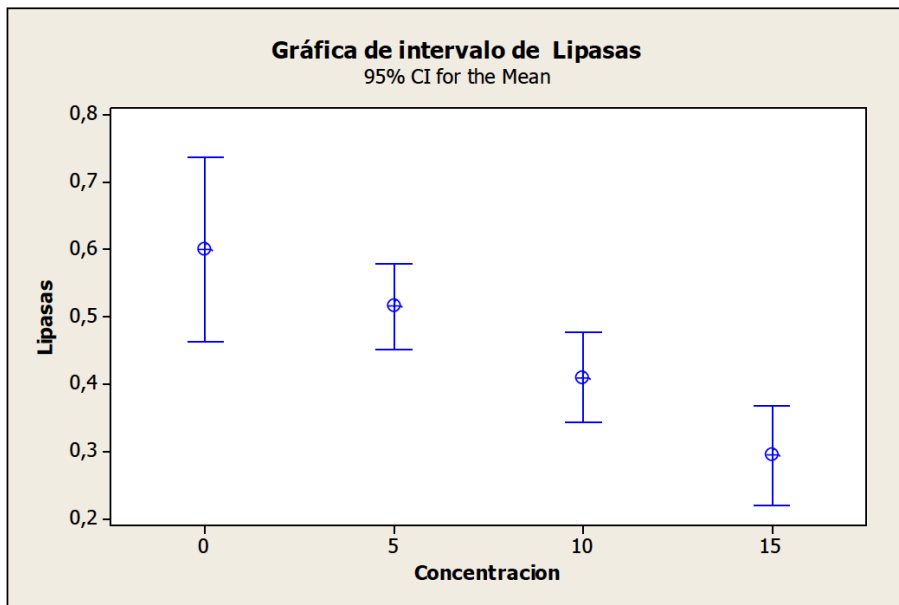


Figura A-8: Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Cuantificación volumétrica de lipasas.

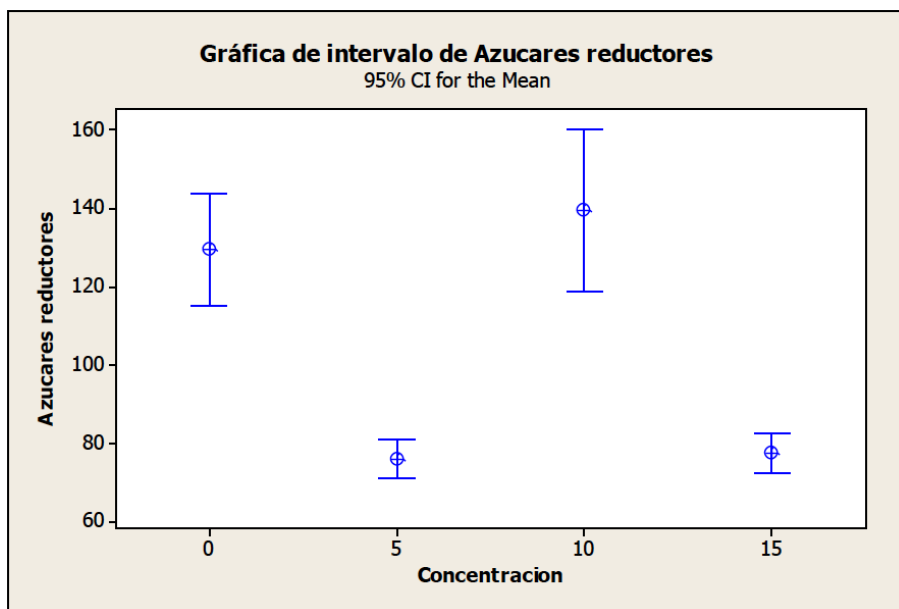


Figura A-9: Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Cuantificación volumétrica de azúcares reductores.

A.1.3. Análisis de medias para la actividad específica (AE)

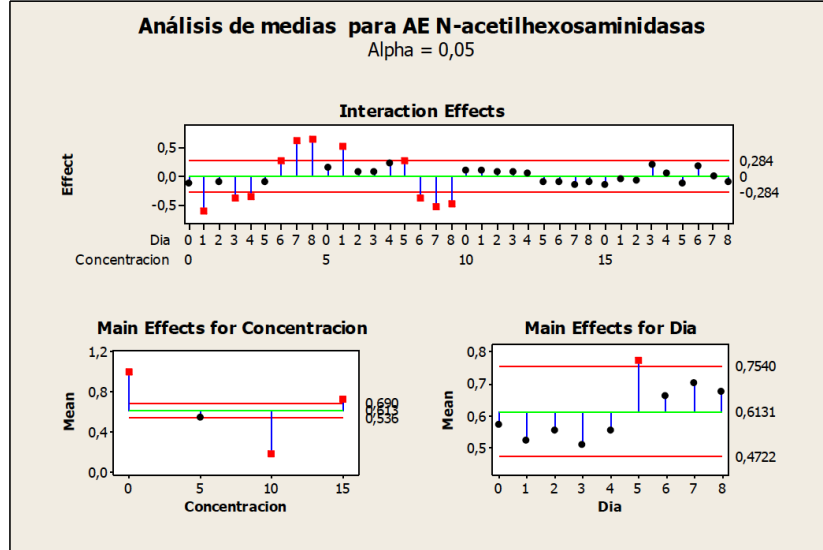


Figura A-10: Resultados del análisis de medias para la actividad específica de N-acetilhexosaminidasa.

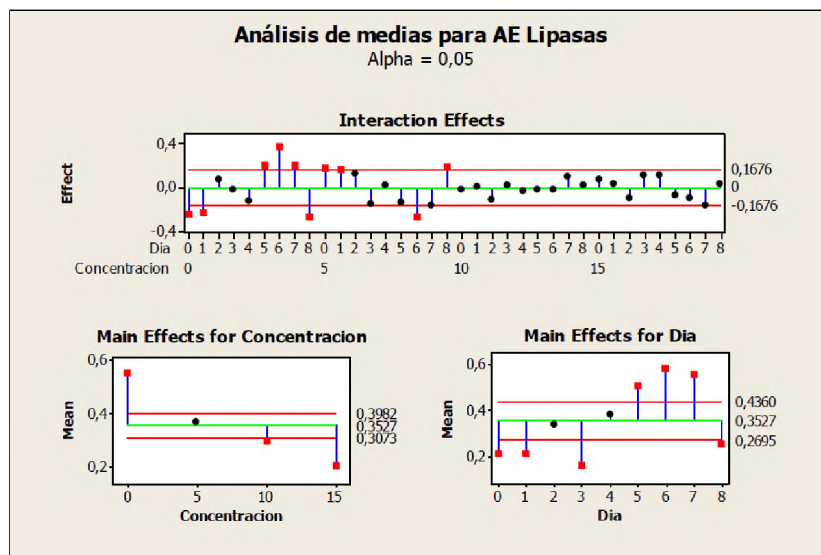


Figura A-11: Resultados del análisis de medias para la actividad específica de lipasas.

A.1.4. Gráficas de intervalos para la actividad específica (AE)

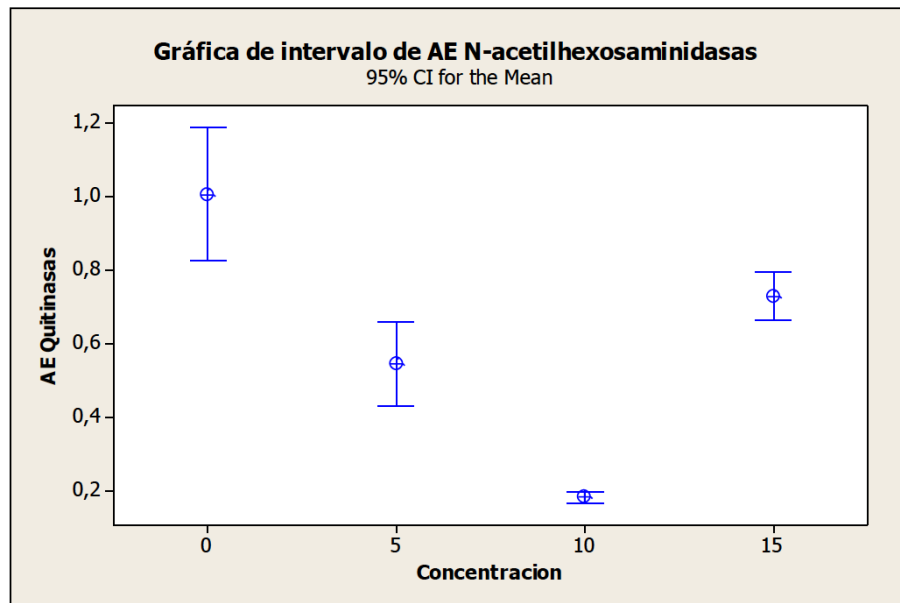


Figura A-12: Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Actividad específica de N-acetilhexosaminidasas.

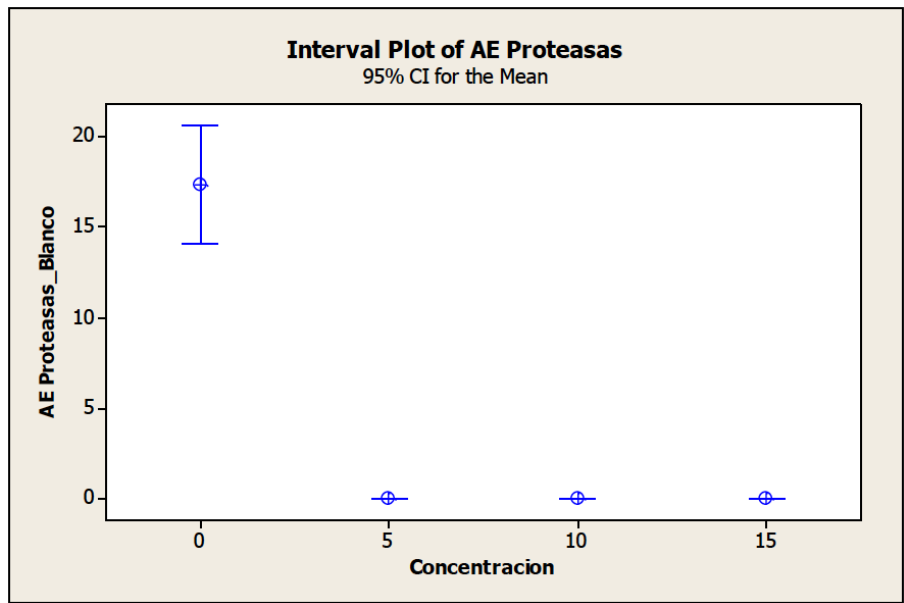


Figura A-13: Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Actividad específica de proteasas.

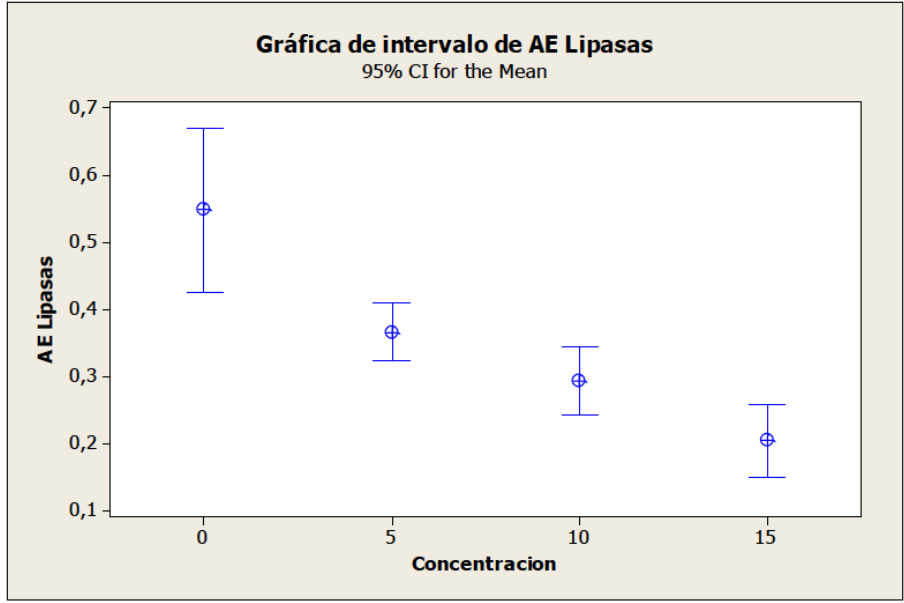


Figura A-14: Resultados de gráfica de intervalos para las medias. Actividad específica de lipasas.

A.2. Curvas de Calibración

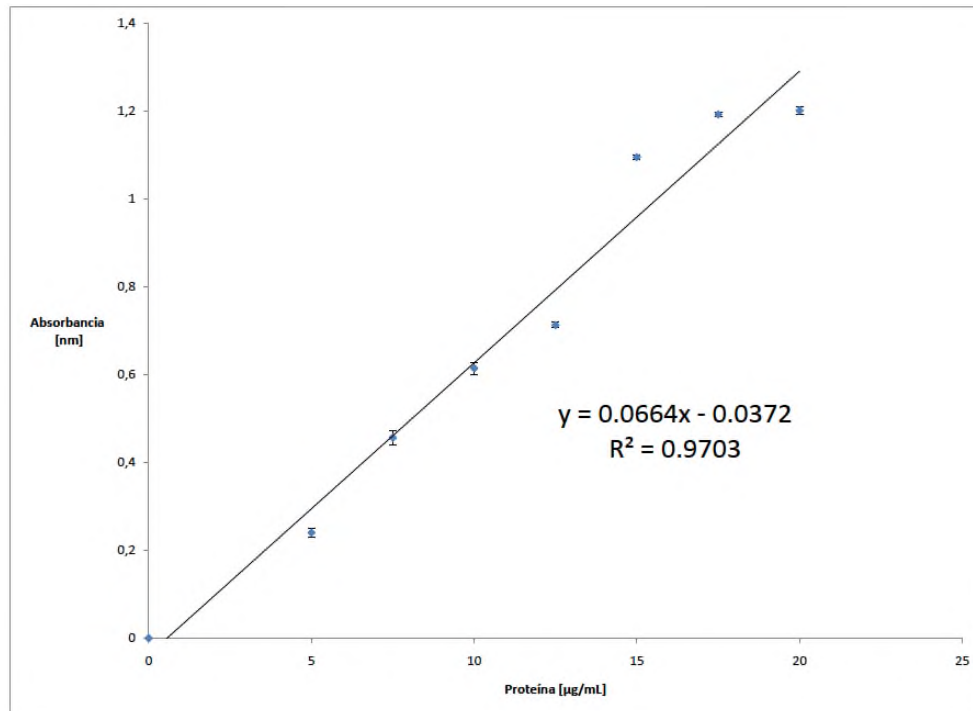


Figura A-15: Curva estándar de proteína empleando seroalbúmina bovina (BSA) por el método de micro ensayo de Bradford (1976).

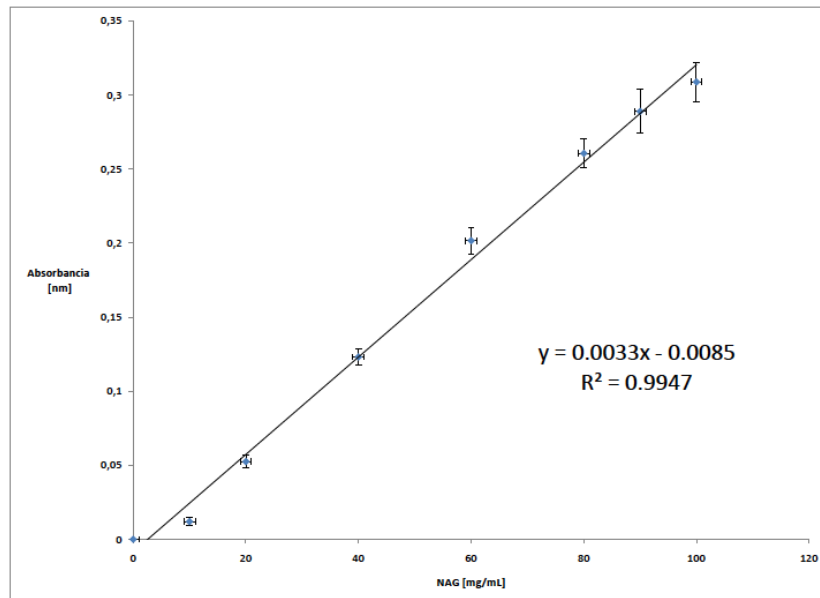


Figura A-16: Curva estándar de reductores por el método de Miller (1959) empleando N-acetilglucosamina (NAG) como estándar.

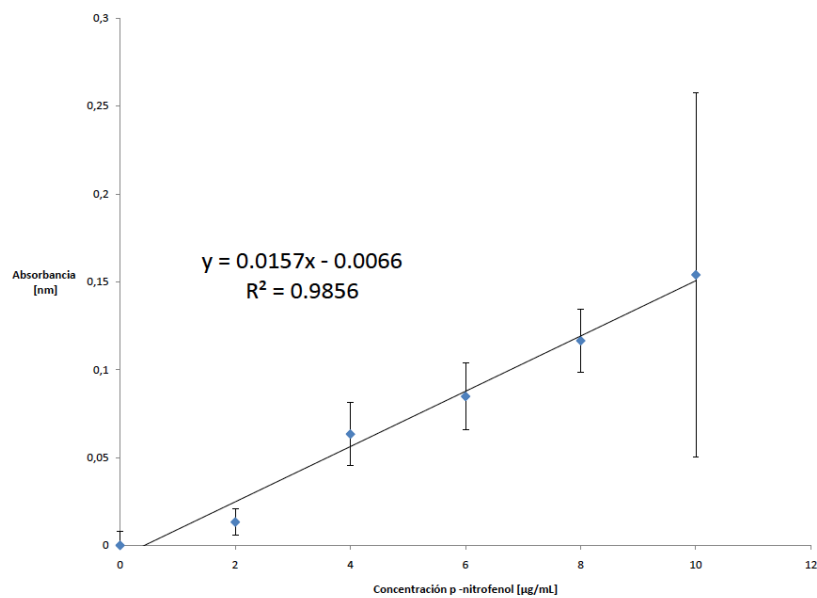


Figura A-17: Curva estándar de N-acetilhexosaminidasa por el método de Tronsmo y Harman (1993) empleando una solución madre de p-nitrofenol a una concentración de 100 µg/mL.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 18 de Diciembre del 2015 a las **12:00 hr**, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Caracterización de los perfiles enzimáticos de *Beauveria bassiana* 885.2 en fermentación líquida utilizando chapulín como inductor** presentado por la alumna **Ivonne Janeth Azamar Jiménez**, con número de matrícula **10090002**, aspirante al grado de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron QUE LA TESIS **SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU APROBACIÓN PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.**

Tuxtepec, Oax., a 18 de Diciembre del 2015.

ATENTAMENTE. LA COMISIÓN REVISORA

Asesor de Tesis

Dr. Oscar Nuñez Gaona
Profesor-Investigador

Presidente

Dra. Ana Karin Navarro Martinez
Profesor-Investigador

Vocal

Dr. Paúl Mauricio Sánchez Ocampo
Profesor-Investigador

Co-asesor de Tesis

Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño
Profesor-Investigador

Secretario

Dr. Andrés Aguirre Cruz
Profesor-Investigador