

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE CEPAS ENTOMOPATÓGENAS Y  
MICOPARÁSITAS DE *Verticillium* CON USO POTENCIAL EN BIOCONTROL  
(PRODUCTION OF ENZYMES FROM ENTOMOPATHOGENIC AND  
MYCOPARASITE STRAINS OF *Verticillium* WITH POTENTIAL APPLICATION ON  
BIOCONTROL)

Keiko Shirai, Mariana Iglesias, María del Carmen Marín, Yoyi Matsumoto, Neith Pacheco, Nery Paniagua,  
Maribel Plascencia, Laura Ramírez-Coutiño, Elizabeth Valgañón.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros. Av.  
San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina C.P. 09340 Iztapalapa, México, D.F. Tel +58044921/Fax  
+58044712. Correo electrónico: [smk@xanum.uam.mx](mailto:smk@xanum.uam.mx)

**Abstract** Cell wall in fungi and cuticle in insects share common structural components, specifically chitin, proteins, and fungi protective covers also contain glucans. The success of the infective process of the entomopathogenic and mycoparasite fungi to the host is the penetration and killing where the cuticle degrading and mycolytic enzymes play an essential role. *Verticillium* has been recognized as potential biocontrol agent of arthropod pests and also for controlling rust disease, as it produces insect cuticle degrading enzymes such as proteases and chitinases, and also has been reported as a mycoparasite. Based on these characteristics, degrading enzymes such as chitinases, proteases, glucanases of *Verticillium* have been produced in submerged (SF) and solid state fermentations (SSF).

The aim of this research was studied factors that affected  $\beta$ -N-acetylhexosaminidases, chitinases and glucanases production of *Verticillium*, such as utilisation of chitin from shrimp waste silage, fungal cell walls as substrate and inducer of enzymes, pH in SF, moisture content in SSF and inoculum age. Microorganisms interaction were also studied among *Verticillium* and phytopathogenic fungi (*Macrophomina*, *Aspergillus* and *Rhizopus*).

Enzyme production in submerged fermentation (SF) was dependent of fungal growth, it increased when pH shifted to alkaline (8 to 9). The maximum was detected at an initial pH of 6 inoculated with spores or mycelia. Chitin from shrimp waste silage and fungal cell walls were efficient inducers of extracellular enzymes, compared with media supplemented with sucrose or glucose where enzymatic activity was not detected. Solid state fermentations (SSF) were carried out using two types of carriers: i) mixture of shrimp waste silage, sugar cane pith bagasse and media; ii) polyurethane foam, colloidal chitin and media. In general the increment of moisture content in SSF improved significantly the enzyme yield and reduced the lag phase, i.e. 75% of moisture content with sugar cane bagasse as carrier and inoculated with spores or mycelia produced 1016 and 1673 U/g initial dry substrate, respectively. SSF accomplished higher enzyme yields than SF, however it required longer time than SF, and enzymatic extracts with sugar cane bagasse system contained high amount of impurities from shrimp waste silage and carrier. Partial purification of three  $\beta$ -N-acetylhexosaminidases were detected with isoelectrical pHs of 2.5, 3.5 and 5.5, and four proteases with 4, 6, 7, and 8. Molecular weight of the enzymes were determined 31 and 66 kDa.

**Introducción.** En la naturaleza existe una interacción continua entre patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya enfermedad en la mayoría de los casos; es decir, el control biológico (ó biocontrol) funciona naturalmente, ya que los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la naturaleza. Sin embargo, los cultivos se presentan con frecuencia enfermedades causadas por hongos. El uso indiscriminado de funguicidas químicos cada vez se ve más restringido por consideraciones sanitarias y ecológicas.

Las cubiertas protectoras de hongos (pared celular) y de insectos (cutícula), presentan componentes estructurales semejantes. La pared celular es un organelo dinámico que se requiere para la viabilidad del hongo. Su estructura es compleja y tiene varias funciones, tales como protección osmótica para el protoplasma, transporte de macromoléculas, crecimiento, conjugación y formación

de esporas. La pared celular de los hongos esta compuesta principalmente de los polisacáridos quitina y glucanos.

El género *Verticillium* es un grupo heterogéneo de gran interés, debido a que en éste se agrupan especies parásitas de insectos, plantas, hongos, nemátodos y arañas, por lo que su estudio es de considerable interés. *V. lecanii*, *V. chlamydosporium*, *V. fungicola* y *V. indicum* infectan insectos y hongos, por lo que se caracterizan por producir proteasas, glucanasas y quitinasas.

**Metodología.** *Fermentación en medio líquido.* Para los experimentos para determinar el efecto del pH, glucosa e inductores (paredes celulares ó quitina), edad del inóculo (esporas ó micelio) *Verticillium* fue cultivado en matraces erlenmeyer con agitación a 180 rpm a 25°C. Posteriormente una vez determinadas estas condiciones, se realizaron fermentaciones en un reactor con 1.5 l de medio de cultivo, variando pH y adicionando inductores. *Fermentación en medio sólido* (FMS). Se utilizaron dos sistemas: i) columnas empacadas con el medio de cultivo, inóculo y bagazo de caña (soporte) en las que se hacia pasar aire con una tasa de 1.4 ml air/min/g de materia húmeda, ii) tipo Koji utilizando espuma de poliuretano (soporte) en el que se impregnó el medio de cultivo y el inóculo. Con estos sistemas se evaluaron condiciones como contenido de humedad. *Actividades enzimáticas.* La actividad de N-acetilhexosaminidasa fue determinada mediante la liberación de p-nitrofenol, y la de quitinasas totales mediante azúcares reductores. La actividad proteolítica se determinó mediante reacción del extracto enzimático con caseína midiendo cambios de absorbancia a 280 nm. *Evaluación de la capacidad antagónica en cultivos duales.* El antagonismo será determinado mediante pruebas de confrontación en caja Petri con agar papa dextrosa entre hongos (fitopatógeno y micoparásito). *Purificación parcial.* Extractos enzimáticos obtenidos de SF fueron purificados mediante ultrafiltración, electroenfoque y se determinó homogeneidad con electroforesis.

**Resultados.** Se realizó una selección de cepas de colección de *Verticillium*; *V. lecanii*, *V. fungicola* y *V. chlamydosporium*; de acuerdo a su capacidad de producir quitinasas, proteasas y  $\beta$ -1,3 glucanasas. *V. fungicola* (USDA 4519) y *V. lecanii* (ATCC 26854) fueron utilizadas en la producción de enzimas en medio líquido (SF) con quitina y paredes celulares de hongos como inductores; también se evaluó el efecto de pH. Por otra parte, *V. lecanii* (ATCC 26854) fue cultivado en medio sólido utilizando dos diferentes tipos de soporte, bagazo de caña y espuma de poliuretano, en los que se adicionó glucosa como fuente adicional de carbono, evaluando el efecto del contenido de humedad en el sustrato sobre la producción de enzimas y crecimiento del hongo. Los estudios de microscopia electrónica de barrido permitieron observar el desarrollo del hongo en los sistemas de fermentación evaluados así como la hidrólisis de la quitina debido a la secreción de las enzimas. Finalmente se estudió la interacción micro y macroscópica de *Verticillium* con hongos fitopatógenos (*Macrophomina*, *Aspergillus* y *Rhizopus*) en donde se observaron estructuras como apresorios relacionados con la capacidad micoparásita de *Verticillium*.

## Referencias

1. Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M. y Shirai, K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry* 37:1359-1366.
2. Cira, L.A., Huerta, S. y Shirai, K. 2000. Scaling up of lactic acid fermentation of prawn wastes in packed-bed column reactor for chitin recovery. *Advances Chitin Science* Vol. 4:21-27. Editada por M.G. Peter, A. Domard, y R.A.A. Muzzarelli. University of Potsdam, Alemania ISBN 3-9806494-5-8.
3. Matsumoto, Y., Saucedo, G., Revah, S. y Shirai, K. 2001. Chitinases production in solid state fermentation and submerged fermentation by *Verticillium lecanii* with silage shrimp as substrate. *Chitin and Chitosan in Life Science*. T. Uragami, K. Kurita y T. Fukamizo (eds). Kodansha Scientific Ltd. Tokyo. 403-406. ISBN 4-906464-13-0.
4. Matsumoto, Y., Saucedo, G., Revah, S. y Shirai, K. 2001. Chitinases production in solid state fermentation and submerged fermentation by *Verticillium lecanii* with silage shrimp as substrate. *Chitin Enzymology*. Editado por R.A.A. Muzzarelli, Atec Edizioni, Italia. 381-389. ISBN 88-86889-06-2.