

ENZ-3

EFFECTO DE pH Y ADICIÓN DE GLUCOSA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE QUITINASAS DE *Verticillium lecanii* EN CULTIVO SUMERGIDO. (EFFECT OF pH AND GLUCOSE ADDITION ON CHITINASES AND PROTEASES PRODUCTION OF *Verticillium lecanii* IN SUBMERGED CULTURE)

Yoyi Matsumoto, Alfonso Gayosso y Keiko Shirai *

Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. Lab. de Biopolímeros. Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina Iztapalapa. D.F. Tel. 58044921/Fax 5804 47 12 e-mail: smk@xanum.uam.mx

Abstract. The ambient pH has been identified as a signal for the disease process and developmental life cycle of entomopathogenic fungi due to expression of cuticle degrading enzymes (β -N-acetylhexosaminidases, chitinases and proteases) [1]. Besides it is well known that the pH of the fungal culture is determinant for synthesis and regulation of extracellular enzymes. Instead of using the microorganisms, spraying mixture of enzymes for biocontrol of agricultural pests can be other option of application. Therefore the importance of study potential producers using inexpensive inducers that improve enzyme yields. The aim of this study was utilised shrimp waste silage both as substrate and inducer of β -N-acetylhexosaminidases, chitinases and proteases of *Verticillium lecanii* in submerged culture, taking advantage of abundance and composition of crustacean wastes. Enzyme production was carried out varying pH: i) controlling at pH 5; ii) controlling pH at 5 during the first 72 hours of growth, and varying pH every 24 hours at 6, 6.5, 7 and 8. The enzyme activities of experiments at pH 5 were lower than varying pH, 128 U/g of nutrient and 1020 U/g of nutrient of β -N-acetylhexosaminidases, respectively. Enzyme increased when pH shifted to alkaline (figure 1). Experiments with added glucose were also studied at the conditions above mentioned, despite of biomass production was better with glucose the enzyme yields were not achieved (table 1).

Introducción. Las quitinasas son enzimas hidrolíticas importantes por su habilidad antagónica a parásitos con paredes celulares quitinosas (hongos) o exoesqueletos (insectos). Las quitinasas se obtienen principalmente de *Serratia marcescens* y *Streptomyces griseus*, las únicas quitinasas de origen fúngico, provienen de *Trichoderma harzianum* y su costo es alto. El pH ha sido identificado como una señal para desencadenar el proceso infectivo de hongos patógenos, en el cual la expresión de quitinasas juega un papel muy importante¹. Se ha reportado que al cultivar *Verticillium lecanii* en desechos de camarón, estos inducen la producción y excreción de quitinasas al medio de cultivo².

El propósito de este trabajo fue evaluar el pH del medio de cultivo y adición de glucosa en la producción de quitinasas por *V. lecanii* utilizando desechos de camarón ensilados (quitina cruda).

Metodología. *V. lecanii* ATCC 26584 se cultivó en un reactor con 1.5 l de medio Czapeck con 10 g/l de quitina cruda, en algunos experimentos se adicionó glucosa (10 g/l). Los experimentos fueron realizados con diferentes condiciones de pH: i) controlándolo a 5 durante el tiempo total de cultivo (166h); ii) manteniéndolo a 5 durante las primeras 72 horas y variando a 6, 6.5, 7 y 8 cada 24 horas. La actividad de N-acetilhexosaminidasa fue determinada mediante la liberación de *p*-nitrofenol², 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.

Resultados y Discusión. En la figura 1 se muestra el efecto de la variación de pH y la adición de glucosa sobre la producción de enzimas. La adición de glucosa reprimió la producción de enzimas, cuando esta fue consumida las enzimas comienzan a producirse (48 a 72 h) (figura 1). La producción de N-acetilhexosaminidasa y proteasas fueron incrementadas 10 y 2 veces, respectivamente cuando no se adicionó glucosa al medio (figura 1).

Las máximas actividades tanto para proteasas como N-acetilhexosaminidasas fueron obtenidas cuando el pH fue de 8. Las quitinasas totales se midieron, obteniéndose bajos rendimientos, el pH en el que mejor se producen son a pH de 5 y 6, mientras que a pH de 7 y 8 la actividad detectada fue menor. Cuando el pH se mantuvo en 5, se observa la máxima actividad de quitinasas totales. La producción de biomasa se ve favorecida por la presencia de glucosa, más que por los cambios de pH (tabla 1). La adición de glucosa al

medio afectó desfavorablemente la producción de enzimas, ya que en los experimentos donde no se adicionó glucosa se obtuvieron mejores rendimientos (tabla 1). Se observó que la producción de estas enzimas es regulada por un mecanismo de inducción – represión, en donde la glucosa actúa como represor y la quitina como inductor. Por otro lado, el pH ha sido reportado¹ como un factor de regulación en la producción de enzimas hidrolíticas de la cutícula de insectos, esto es al nivel de la transcripción de ARN mensajero, o por expresión de hidrofobinas que intervienen en la excreción de las enzimas al medio.

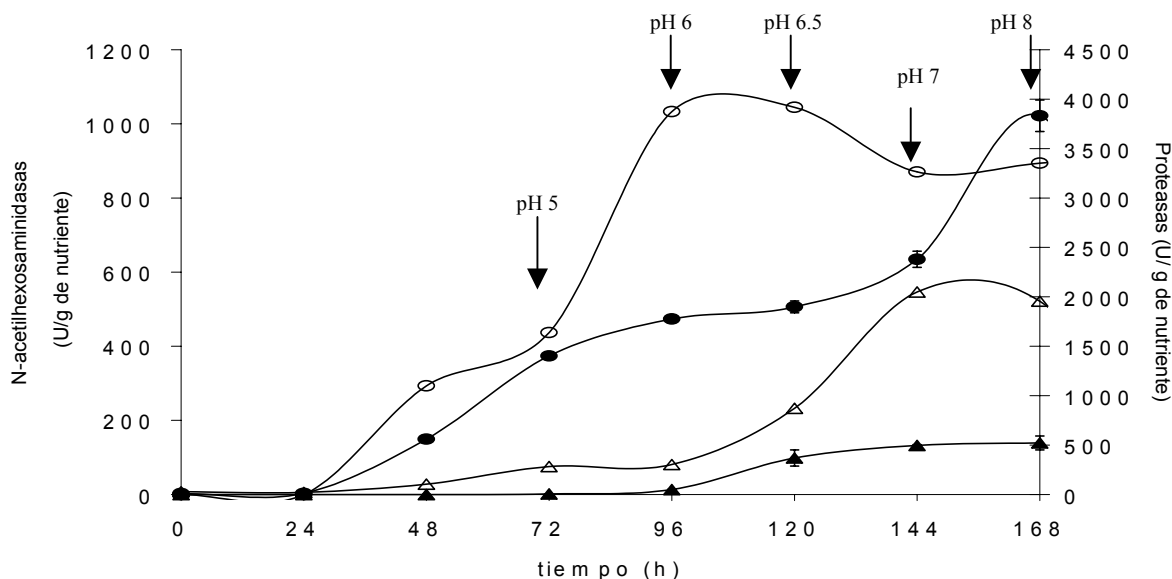


Figura 1. Producción de enzimas, exoquitinasas, endoquitinasas, proteasas en cultivos sumergido de *V. lecanii* ATCC26854 en medio Czapeck con 10 g/l de quitina cruda manteniendo el pH a 5 durante las primeras 72 horas y variándolo a 6, 6.5, 7 y 8 cada 24 horas. Sin glucosa: ● N-acetilhexosaminidasa, ○ proteasa, y con glucosa: ▲ N-acetilhexosaminidasa, △ proteasa.

Tabla 1. Biomasa y rendimientos de N-acetilhexosaminidasa, quitinasas totales, proteasas determinados en los cultivos de *V. lecanii* a pH controlado a 5, y variando de 5 hasta 8 durante 166 horas

Condiciones de Fermentación.	Biomasa (g/l)	N-acetilhexosaminidasa (U/g de nutriente)	Quitinasas Totales (U/ g de nutriente)	Proteasas (U/g de nutriente)
Controlado a pH 5	0.9	128	100	464
Variando pH de 5 hasta 8 en medios con glucosa	3.2	140	9	2050
Variando pH de 5 hasta 8 en medios sin glucosa	0.75	1020	16	3950

Agradecimientos.

Los autores agradecen a CONACyT por el apoyo a través del proyecto No. 400200-5-J33566-E.

Referencias.

1. St Leger R, Joshi L and Roberts D. Ambient pH is a Major Determinant in the Expression of Cuticle-Degrading Enzymes and Hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (2): 709-713.
2. Matsumoto Y, Revah S., Saucedo G., 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.
3. Fenice M., Di Giambattista R., Selbmann L., y Federici F., Production of N-Acetyl-D-Glucosamine and Chitinolytic Enzymes by a Strain of *Verticillium lecanii* Cultivated in Bench-top Fermentor. 1997. Advance in Chitin Science, Vol.II. pp-145-150