



Fermentación líquida como herramienta biotecnológica para la obtención de quitinasas con *Beauveria bassiana*

Sandra E. Jiménez-Alejandro | Óscar Núñez-Gaona | Laura P. Ramírez-Coutiño

| UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN campus Tuxtepec

correo-e: sandy_edit@hotmail.com

Resumen

El objetivo de este trabajo fue realizar fermentaciones en medio líquido (FML), empleando un hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y sustratos quitinosos de camarón (C), chapulín (CH) y tenebrio (T) para la producción de quitinasas, se evaluaron los cambios de pH, se determinó la cantidad de proteína en el sobrenadante, actividades quitinolíticas endoquitinasas y exoquitinasas usando una curva patrón de N-acetilglucosamina (NAG) y biomasa por peso seco. Se indicó que a las 48 h presentaron la mayor actividad volumétrica de 4370.6 mu/mL a un pH óptimo de 3, para el caso de las endoquitinasas y para las exoquitinasas (nhasa) de 11.7 mu/mL utilizando chapulín como sustrato siendo el mejor productor de quitinasas en comparación con los otros sustratos, donde se observa que este hongo produce más enzimas en un medio ácido produciendo más endoquitinasas que exoquitinasas. Para fines de biocontrol, las quitinasas son un método atractivo para una agricultura sustentable.

Palabras clave: biocontrol, sustratos quitinosos, enzimas.

Introducción

Las fermentaciones líquidas han sido de gran importancia a nivel industrial pero también en el área de la agricultura para la obtención de sus productos y utilización de ellos, uno de los productos obtenidos al implementar la fermentación líquida son las quitinasas, al utilizar quitina como inductor, al ser este polímero el segundo más abundante de la naturaleza, se puede obtener de diversas fuentes ya sea de crustáceos, cutícula de insecto entre otros.

Se considera así a la quitina como la molécula blanco a ser atacada por agentes fungicidas o insecticidas que contienen o producen quitinasas. Estas quitinasas han sido de importancia en diversos campos de la investigación: biomedicina, biorremediación y biocontrol (Cruz y Rojas, 1999). Este último es de gran interés en la agricultura ya que existen reportes de las quitinasas de *Beauveria bassiana* que atacan a *Galleria mellonella* y las del hongo *Nomuraea riley* hacia larvas de *Trichoplusia ni* que ataca a la lechuga, la papa y el algodón, entre otros cultivos (Cruz y Rojas, 1999) fundamentales para la agricultura mexicana. Nuestro país no sólo produce sus alimentos básicos, sino que también los exporta (SAGARPA, 2011), donde la agricultura se ve afectada por diversos factores, ambientales, de manejo y de mayor importancia los abióticos, ya que es donde se encuentran las plagas y donde las quitinasas juegan un papel trascendental para la sustentabilidad de la agricultura en México.

Trabajos reportados por Felse (2000) señala una producción de quitinasas de 0.38 U/mL a pH 5 a las 108 h de producción utilizando el hongo *Trichoderma harzianum*. El objetivo de este trabajo fue realizar fermentaciones en medio líquido a pH variable 3, 4, 5, 6, 7 para la obtención de quitinasas utilizando *Beauveria bassiana*.

Metodología

El microorganismo empleado fue el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* 885.2, donado por Octavio Loera (UAM-Iztapalapa), que fue cultivado en medio papa dextrosa agar (PDA) durante ocho días a 25 °C, después de este tiempo los conidios se extrajeron empleando Tween 80 al 0.02% (p/v). La concentración del inóculo empleado en las fermentaciones fue de 1×10^7 conidios/mL.

Se utilizaron tres fuentes de sustratos quitinosos: exoesqueleto de camarón (*Penaeus*) provenientes de la embalsadera en la ciudad de Alvarado, Veracruz; chapulines (*Sphenarium purpurascens*) de la comunidad de Santo Tomas Jalieza, Ocotlán, Oaxaca; y escarabajo harinero (*Tenebrio molitor*) como insecto modelo perteneciente al insectario de la Universidad del Papaloapan.

Los sustratos previamente se desproteinizaron utilizando tetraborato de potasio al 4% (p/v). Al final de cada tratamiento los sustratos se neutralizaron con agua destilada se molieron y tamizaron para obtener un tamaño de partícula de 449 µm.

La fermentación en medio líquido (FML) se realizó en matraces, empleando medio Czapeck modificado, utilizando como fuente de carbono y nitrógeno los sustratos desproteinizados de chapulín, tenebrio y camarón (10g/L) incubados a 25 °C, a un pH inicial de 5, a una agitación de 180 rpm durante ocho días. Después se hicieron a 72 h tiempo máximo de producción de estas enzimas para variar el pH y encontrar el óptimo. El control de pH se realizó empleando soluciones estériles de NaOH y HCl (0.1M). El pH se ajustó al inicio de la fermentación a 3, 4, 5, 6, y 7 (Ramírez-Coutiño, 2009).

En la fracción líquida de las muestras obtenidas cada 24 h, se determinó proteína en el sobrenadante por el método de Bradford (1976), actividades quitinolíticas endoquitinasas y exoquitinasas (Tronsmo y Harman, 1993), azúcares reductores (Miller, 1959), empleando una curva patrón de N-acetilglucosamina (NAG) y biomasa por peso seco.

Resultados y discusión

Los resultados de las fermentaciones indican que utilizando sustratos quitinosos procedente de chapulín, a pH 5 que es el reportado y a una temperatura reportada de 25 °C, produjo la mayor cantidad de quitinasas de 1374.8 mU/mL a las 48 h, cabe mencionar que esta concentración volumétrica fue similar en los dos sustratos de insectos siendo 1.7 veces mayor en comparación con el sustrato de camarón donde la actividad volumétrica fue de 810.2 mU/mL. Cuando se varió el pH, las concentraciones volumétricas cambiaron dando la mayor cantidad de actividad volumétrica a un pH 3, siendo similar nuevamente en los sustratos de insectos de hasta 4 veces mayor en comparación con el sustrato de camarón y 3.2 veces mayor en comparación con el pH 5, de igual manera el pH 4 indica una alta concentración volumétrica no siendo mayor que el pH 3 mientras que para el pH 6 y 7 las concentraciones volumétricas son bajas (cuadro 1).

Cuadro 1

Evaluaciones de las fermentaciones en medio líquido (FML) empleando *Beauveria bassiana* a pH variable

pH	Endoquitinasas (mU/mL) 48h			Exoquitinasas (mU/mL) 48h		
	C	CH	T	C	CH	T
3	2150± 0.001	4370.6± 0.01	3378.7± 0.004	8.9± 0.003	11.7± 0.003	10.7± 0.004
4	647.5± 0.001	2626.8± 0.04	3166.2± 0.02	7.2± 0.003	9.7± 0.004	9.7± 0.06
5	810.2± 0.01	1374.8± 0.04	824± 0.01	6.1± 0.005	8.4± 0.006	8.8± 0.002
6	121.2± 0.002	227± 0.001	585.5± 0.01	0.3± 0.004	0.57± 0.02	0.5± 0.005
7	52.5± 0.5	81.2± 0.01	73.5± 0.04	0.1± 0.002	0.32± 0.006	0.2± 0.01

C= camarón, CH= chapulín, T= tenebrio.

El tiempo de mayor producción enzimática coincidió con la máxima producción de azúcares reductores, proteína soluble y biomasa (cuadro 2), lo que

indica que la producción mayor de estas enzimas es a las 48 h.

Al encontrar los parámetros óptimos de producción de las quitinasas con *Beauveria bassiana*, éstos pueden realizarse a escala para obtener más producto y utilizarlas para un biocontrol, con ello al implementar un nuevo método de control de plagas se contribuiría a la disminución de insecticidas que degradan los suelos y volviendo resistente a la plaga, mejorando con ello la producción de los cultivos teniendo una agricultura sustentable.

Cuadro 2

Evaluaciones de las fermentaciones en medio líquido (FML) empleando *Beauveria bassiana* a pH variable

pH	Biomasa (g/l) 48h			Proteína soluble (µg/mL) 48h			Azúcares reductores (mg NAG/mL) 48h		
	C	CH	T	C	CH	T	C	CH	T
3	0.005± 0.01	0.009± 0.001	0.008± 0.003	9.2± 0.01	13.5± 0.02	16.2± 0.09	0.85± 0.01	0.92± 0.001	0.92± 0.001
4	0.004± 0.001	0.007± 0.001	0.006± 0.009	7.1± 0.02	11.7± 0.07	15.6± 0.02	0.59± 0.02	0.73± 0.01	0.84± 0.001
5	0.005± 0.001	0.006± 0.01	0.006± 0.006	5.7± 0.02	4.8± 0.21	4.6± 0.005	0.24± 0.05	0.28± 0.01	0.24± 0.01
6	0.003± 0.001	0.005± 0.001	0.004± 0.009	2.2± 0.01	3.2± 0.06	5.2± 0.004	0.02± 0.01	0.22± 0.001	0.20± 0.001
7	0.004± 0.01	0.004± 0.001	0.004± 0.002	2.4± 0.001	5.1± 0.04	3.3± 0.01	0.008± 0.002	0.18± 0.01	0.17± 0.02

C=camarón, CH=chapulín, T= tenebrio.

Conclusiones

El empleo de la fermentación en medio líquido es de gran utilidad como herramienta biotecnológica para la evaluación de pH variable sobre la producción de enzimas quitinolíticas, lo que muestra que el mejor es el extracto derivado de chapulín a un pH de 3, al utilizar la cepa de *Beauveria bassiana* 885.2, de modo que es un hongo acidófilo.

Agradecimientos

A la beca Conacyt, al departamento de posgrado de la universidad del Papaloapan, a los organizadores del simposio y en especial a mis asesores, doctores Laura y Óscar.

Referencias

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding *Analytical Biochemistry Methods in the biological Sciences*, 72(1-2): 248-254.
- Cruz, C.R., Rojas, A.L.I. (1999). Las quitinasas bacterianas y sus posibles aplicaciones biotecnológicas. En Prado B., L.A. (Ed.), *Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología*. México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Felse, A. (2000). Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors-the influence of agitator speed. *Biochemical Engineering Journal*, 4(2):115-120.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428.
- Ramírez-Coutiño, L.P. (2009). *Producción de quitinasas y proteasas de Verticillium fungicola y su evaluación en la hidrólisis de quitina para la producción de quitin oligómeros* (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa) (2011). *Producción agrícola nacional (2006-2011)*. Recuperado de [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/estudios_economicos/Seminarios/entorno_agroeconomico/PRODUCTIVIDAD%20Y%20COMPETITIVIDAD%20DE%20GRANOS%20EN%20MEXICO%20\(Abr%202014\).pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/estudios_economicos/Seminarios/entorno_agroeconomico/PRODUCTIVIDAD%20Y%20COMPETITIVIDAD%20DE%20GRANOS%20EN%20MEXICO%20(Abr%202014).pdf)
- Tronsmo, A., Harman, G.E. (1993). Detection and quantification of N-acetyl-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry Methods in the biological Sciences*. 208:74-79.