

ENZ-7

SELECCIÓN DE CEPAS DE *Verticillium* PRODUCTORAS DE QUITINASAS Y PROTEASAS.

(SCREENING OF ENTOMOPATHOGENIC AND MYCOPARASITE STRAINS OF *Verticillium* AS PROTEOLYTIC AND CHITINOLYTIC ENZYME PRODUCERS)

Yoyi Matsumoto, Azucena Tinoco, Marco Antonio Cantor y Keiko Shirai*

Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. Lab. 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 genus *Verticillium* has been reported as heterogeneous group with great academic interest for its potential in biocontrol, since it contains parasitic species of insects, plants and fungi. In this study, chitinolytic and proteolytic activities of 22 strains of *Verticillium* were evaluated in superficial agar media (colloidal chitin and casein). Other screening was carried out by submerged cultures with added chitin from prawn waste silage, in order to determine activities in the extracts. Strains USDA 4519 and ATCC 26854 have been chosen for further chitinases production for achievement of enzyme yield; and purification due to low production of proteases that might provide more stable enzymatic extract. For biocontrol applications strains USDA 974 and USDA 2460 are convenient because produce proteases and chitinases which their combined action is essential during the infection process of the pathogen.

Introducción.

Los microorganismos que degradan la quitina se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Por su insolubilidad, tamaño, complejidad molecular y composición heterogénea, la quitina no es degradada dentro de la célula, sino los microorganismos recurren a la excreción de enzimas con diferente especificidad, para transformarlos o hidrolizarlos. La hidrólisis enzimática de la quitina es llevada a cabo por dos sistemas sinérgicos y consecutivos: Endoquitinasas la que produce oligómeros solubles de N-acetilglucosamina, esta actividad involucra rompimientos al azar en puntos internos de la cadena. Exoquitinasa, N-acetil- β -glucosaminidasa y quitobiosa, las cuales actúan progresivamente en los extremos no reductores de la cadena liberando N-acetilglucosamina, la cual es utilizada por los microorganismos como nutriente¹.

Verticillium es reconocido como un potente productor de quitinasas utilizando quitina proveniente de diferentes fuentes en fermentación en medio líquido y sólido², además de que es un hongo entomopatógeno en la naturaleza con uso en biocontrol.

El propósito de este trabajo fue evaluar la producción de quitinasas y proteasas por diferentes cepas de *Verticillium* usando quitina cruda como inductor para la producción de enzimas en cultivo superficial y sumergido.

Metodología.

La selección de cepas de los hongos productores de quitinasas y proteasas, se realizó mediante inoculación de 21 cepas de *Verticillium* (USDA, ATCC) en medios de cultivo: agar Czapeck con 10 g/L de quitina coloidal y agar de leche descremada 15 g/L; pH 6, incubando a 25 °C, el control contenía sacarosa. La quitina cruda fue obtenida mediante fermentación láctica de desechos de camarón³, secada y molida hasta un tamaño de 0.177 mm.

La selección en cultivo sumergido se llevo a cabo en matraces erlenmeyer de 250 mL con 75 mL de medio Czapeck modificado con 10 g/L de quitina cruda, se inocularon con 10^7 esporas/mL, incubándose a 25 °C y 180 rpm. A los 5 días de fermentación, la biomasa fue separada por centrifugación a 14000 g durante 15 minutos a 4°C. A los sobrenadantes se les midió actividad quitinolítica⁴ y proteolítica⁵.

Resultados y Discusión.

Zonas claras alrededor del crecimiento del hongo fueron medidas para evaluar la hidrólisis de la quitina coloidal y la caseína, indicando la producción de quitinasas y proteasas de los diferentes hongos probados.

En cultivo sumergido la selección de la cepa se llevó a cabo, utilizando quitina cruda, esta contiene azúcares y proteínas, 0.04 y 14.3 % respectivamente. La composición de la quitina puede favorecer la producción de proteasas debido a las proteínas presentes, por otra parte los azúcares favorecen el crecimiento microbiano,

sin inhibición en la producción de quitinasas ya que se encuentran en bajas concentraciones. Para mejorar la disponibilidad del sustrato para el microorganismo esta fue pulverizada y suspendida en el medio de cultivo. El uso de desechos de camarón que han sido purificados parcialmente a quitina (quitina cruda) permitió la producción de enzimas con uso potencial en biocontrol, proteasas y quitinasas. Las cepas que presentaron mayor actividad quitinolítica fueron la cepa 974 (200 U/mg de proteína), 2460 (125 U/mg de proteína), 4519 (425 U/mg de proteína) y ATCC 26854 (180 U/mg de proteína) (Figura 1).

Mientras que las cepas que presentaron mayor actividad proteolítica fueron: 974 (4705.5 U/mg de proteína), 2009 (U/mg de proteína), 2460 (6200 U/mg de proteína) y 5129 (6725 U/mg de proteína) (Figura 2).

La cepa 4519, resulto ser la mejor productora de quitinasas, aunque no de proteasas las que se detectaron en bajas concentraciones. Esta cepa es un hongo, micoparásito del champiñón que fue cultivada en un reactor de 2 L para la producción de quitinasas y proteasas, obteniéndose mayores rendimientos en menos tiempo.

Agradecimientos.

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

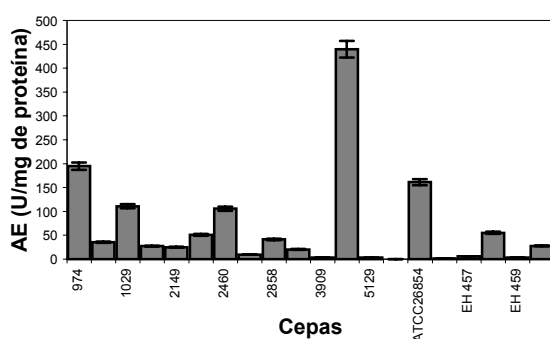


Figura 1. Actividad específica de quitinasas de los diferentes microorganismos en cultivo sumergido en medio Czapeck modificado con 10 g/L de quitina cruda a 25°C y 180 rpm a los 5 días de fermentación.

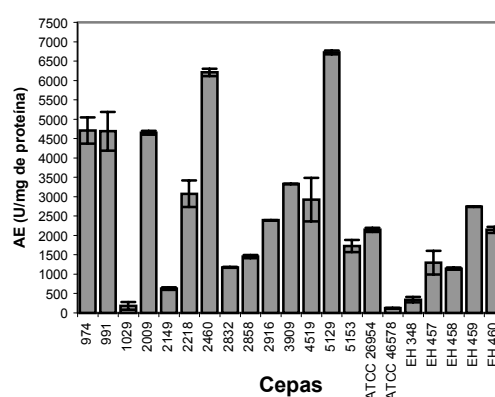


Figura 2. Actividad específica de proteasas de los diferentes microorganismos en cultivo sumergido en medio Czapeck modificado con 10 g/L de quitina cruda a 25°C y 180 rpm a los 5 días de fermentación.

Referencias.

1. Tronsmo A., Hjeljord L., Klemsdal S. S., Varum K. M., Nordtveit Hjerde R., y Harman G. E. 1996. Chitinolytic enzymes from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Chitin Enzymology, Vol.2, pp 235-244. Tronsmo y col. 1996.
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. Cira LA, Huerta S, Hall GM and Shirai K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. Process Biochemistry, 37(12): 1359-1366.
4. Coudron T. A.; Kroha M. J. y Ignoffo. C.M; 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. Comp. Biochemistry. Physiology. Vol. 79B. No.3. pp 339-348.
5. Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. Journal of General Physiology. 30: 291-310.