

## Actividad de $\alpha$ -amilasas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cultivado en medio líquido

$\alpha$ -Amylase activity from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* growing in liquid medium

MARTA CECILIA FLÓREZ M.<sup>1</sup>, JUAN C. LÓPEZ N.<sup>1</sup>, ARNUBIO VALENCIA JIMÉNEZ<sup>2\*</sup>

**Resumen.** Diferentes aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* se cultivaron en medio líquido (YPDA / YDA). Bajo estas condiciones *B. bassiana* fue capaz de producir y liberar al medio de cultivo una  $\alpha$ -amilasa digestiva. Mediante electroforesis en geles de isoelectroenfoque (IEF) se logró estimar el punto isoelectrico (*pI*) de esta banda de actividad en 6,75. No se observaron variaciones en la intensidad de la actividad en esta banda para los diferentes aislamientos. Sin embargo, estos aislamientos mostraron diferencias consistentes en la actividad de la enzima especialmente cuando se utilizaron diferentes concentraciones de conidios de *B. bassiana* en el medio de cultivo. Este es un método simple y sensible para la determinación de la actividad  $\alpha$ -amilasa presente en el medio líquido de *B. bassiana*, el cual podría usarse satisfactoriamente no sólo para la evaluación de diferentes hongos entomopatógenos, sino también, para hacer una determinación rápida de posibles variaciones genéticas debidas a la presencia o ausencia de una enzima específica.

**Palabras clave:** Enzimas. Cultivos monospóricos. Punto isoelectrico.

**Summary.** Different isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* were grown using a liquid medium (YPDA / YDA). Under these conditions *B. bassiana* was able to release an  $\alpha$ -amylase enzyme into the medium. Using electrophoresis on isoelectric focusing (IEF) gels the isoelectric point (*pI*) of this amylase activity band was estimated at 6.75 using isoelectric focusing (IEF). Variation in the intensity of enzyme activity was not observed in this band for the different isolates. However, these isolates showed consistent differences in the  $\alpha$ -amylase activity especially when different concentrations of *B. bassiana* conidia were used in the culture medium. This is a simple and sensitive method to determine  $\alpha$ -amylase activity in liquid culture of *B. bassiana*, which could be used satisfactorily not only to evaluate different fungal entomopathogens, but to make a rapid determination of the possible genetic variants based on the presence or absence of a specific enzyme.

**Key words:** Enzymes. Monosporic cultures. Isoelectric point.

### Introducción

Se han realizado diversas investigaciones con el propósito de evaluar la actividad de una enzima específica como ayuda para la caracterización de hongos entomopatógenos (St. Leger *et al.* 1993; Leopold y Samsinakova 1970; Bidochka y Khachatourians 1987; Paterson *et al.* 1989; May *et al.* 1979; Micales *et al.* 1986). Sin embargo, pocas se han enfocado en el estudio de la relación entre la actividad de estas enzimas y la virulencia de los hongos entomopatógenos hacia sus hospederos (St. Leger *et al.* 1996). Actualmente se sabe que enzimas como las amilasas, proteasas, quitinasas y lipasas participan en el mecanismo de infección durante la invasión al hospedero. Hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* inician su proceso de infección cuando la conidia germina y penetra a través de la cutícula del insecto. Las enzimas involucradas en este proceso pueden ser producidas *in vitro*; mediante el uso de sustratos específicos (St. Leger *et al.* 1993; Bidochka y Khachatourians 1987). La ac-

tividad de muchas enzimas intracelulares en hongos entomopatógenos ha sido evaluada previamente mediante diferentes metodologías (Leopold y Samsinakova 1970). Estas mismas metodologías pueden ser de utilidad cuando se trata de evaluar la actividad de enzimas extracelulares que son producidas por hongos que crecen en cultivos líquidos.

El cultivo de hongos filamentosos en medio líquido es muy recomendado, dado que no sólo permite una fácil cuantificación del material obtenido a lo largo del cultivo, sino también el estudio de las principales características fisiológicas del hongo, en especial por tratarse de un sistema homogéneo que facilita el intercambio gaseoso y evita la autólisis prematura de la célula, asegurando de esta forma un buen crecimiento celular. Estas enzimas extracelulares, presentes en cantidades suficientes por los hongos en el cultivo líquido, pueden ser detectadas y caracterizadas fácilmente por electroforesis (St. Leger *et al.* 1996; Bidochka y Khachatourians 1987; Leger *et al.* 1993). Estudios del

perfil electroforético de isoenzimas llevados a cabo en hongos como *B. bassiana* y *M. anisopliae* han sido utilizados como herramienta para la clasificación taxonómica de las diferentes poblaciones geográficas de la especie (St. Leger *et al.* 1993; Rath *et al.* 1995; Bridge *et al.* 1990).

La electroforesis de enzimas pectolíticas ha sido aplicada para la interpretación genética en estudios de fusión de protoplastos híbridos de *Penicillium chrysogenum* y *P. roquefortin* (Paterson *et al.* 1989). Dado que los métodos existentes para la medición cuantitativa de la actividad de  $\alpha$ -amilasas de hongos entomopatógenos son bastante diversos y en algunos casos dispendiosos, se hace necesario estandarizar una metodología para la cuantificación rápida y sencilla de la actividad de esta enzima. El presente trabajo se planteó con el objetivo principal de proponer una metodología de evaluación de enzimas extracelulares provenientes de hongos, la cual permita una evaluación mucho más rápida y sen-

1 Auxiliar IV y Asistente de Investigación, respectivamente. Disciplina de Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFÉ, Chinchina-Colombia. E-mail: JuanCarlos.Lopez@cafedecolombia.com

2\* Autor para correspondencia: Profesor Asociado. Dpto de Fitotecnía. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas. Calle 65 N° 26-10. Manizales-Colombia. Tel. (68) 861250. E-mail: arnubio@terra.com.co

cilla de la actividad de ésta y otras enzimas que pudieran estar relacionadas con características de patogenicidad del hongo. Una metodología como ésta permitiría estudiar con mayor detalle otros sistemas enzimáticos, facilitando la selección de aislamientos de hongos entomopatógenos con mayor potencial para el control de insectos plaga.

### Materiales y Métodos

#### Material Biológico

Se utilizaron los cultivos monoespóricos: 1, 2, 3, 4, 5 y 21 obtenidos a partir del aislamiento *Beauveria bassiana* (Balsamo) *Bb* 9205 previamente reactivados sobre adultos de *H. hampei*, provenientes de la colección que posee la Disciplina de Entomología del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé (Chinchiná-Colombia).

#### Medios de cultivo evaluados

Los medios de cultivo utilizados fueron: YPGA (extracto de levadura 0,5%, peptona 1%, glucosa 2% y almidón soluble 0,5%) y YGA (extracto de levadura 0,5%, glucosa 2% y almidón 0,5%). Una vez preparados los medios se esterilizaron en autoclave durante 15 min.

#### Concentración de conidios/ml

Un volumen de 100 ml del medio de cultivo YGA se inoculó con 1 ml de una suspensión de conidios de *B. bassiana* a concentraciones de  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  conidios/ml, dejándose a 25°C, en agitación constante a 100 rpm durante 6 días. A partir del momento de la siembra y cada 24 h se tomaron muestras de 1ml, las cuales se centrifugaron a 12000 x g durante 15 min. El sobrenadante se utilizó para la determinación de la cantidad de sustrato remanente como consecuencia de la actividad acumulada de la enzima. Cada determinación se efectuó por triplicado.

#### Determinación de la actividad amilolítica

La actividad amilasa se determinó de acuerdo con una modificación del método de Hopkins y Bird (1954). 200 µl del sobrenadante del medio de cultivo se mezclaron con 1 ml de agua destilada más 5 ml de solución de Iodo (I: 0.5 % y KI: 5 %). La absorbancia de la muestra se leyó espectrofotométricamente a 580 nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS marca UNICAM. Una unidad de actividad enzimática se definió como una disminución en 0,001 unidades de absorbancia. Para cada prueba de actividad se tomaron 5 repeticiones.

El efecto de la composición del medio sobre la actividad amilolítica del monoespérico *Bb* 9205 (5), se determinó utilizando los medios de cultivo YDA y YPDA. Un volumen de 100 ml de cada uno de los medios de cultivo evaluados se inoculó con 1 ml de una suspensión de conidios de *B. bassiana*, a una concentración de  $1 \times 10^3$  conidios/ml, dejándose a 25°C en agitación constante a 100 rpm durante 7 días. A partir del momento de la siembra y cada 24 h se tomaron muestras de 1ml del sobrenadante, las cuales se centrifugaron a 12000 x g durante 15 min para proceder con las determinaciones de actividad de la enzima.

#### Isoelectroenfoque (IEF) y zimogramas de actividad enzimática

Con el objetivo de identificar y caracterizar parcialmente (*pI*) cada una de las bandas de actividad  $\alpha$ -amilasa producidas por el hongo *B. bassiana* en medio líquido se corrieron electroforesis sobre geles de isoelectroenfoque (IEF) 3-9 en una cámara de electroforesis PhastSystem (Farmacia). Después de la electroforesis el gel se incubó en una solución de almidón al 1 % durante una hora a 4°C. Posteriormente se incubó por 1 h a 30°C con solución amortiguadora citrato 0.05 M pH 5,0 conteniendo 10 mM de NaCl y 20 mM de CaCl<sub>2</sub>. Finalmente el gel se tiñó con una solución de Iodo (I: 0.5% y KI: 5 %) durante 10-15 min. Las bandas de actividad con este tratamiento aparecen como zonas blancas sobre un fondo azul oscuro. El punto isoelectro se calculó haciendo uso de un patrón de proteínas con *pI* conocido y apoyados con el software (ImageMaster VDS) suministrado por Pharmacia Biotech.

### Resultados y Discusión

#### Efecto de la composición del medio líquido sobre la actividad amilolítica

En este experimento no se observaron diferencias en cuanto al crecimiento y actividad amilolítica del hongo a lo largo de siete días de evaluación en los dos medios de cultivo (Fig. 1). La actividad de la enzima no se detectó en los primeros cuatro días de cultivo evidenciando de esta forma una baja producción. Sólo a partir de este momento se empezó a detectar ligeramente, registrándose la mayor actividad a partir del sexto día. En las últimas 24 h de cultivo se produjo cerca del 90 % del total de actividad generada en todo el tiempo de evaluación. El hecho de que las dos gráficas de actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa se superpongan entre sí, es una evidencia clara

de la gran precisión y fiabilidad de la metodología aquí utilizada.

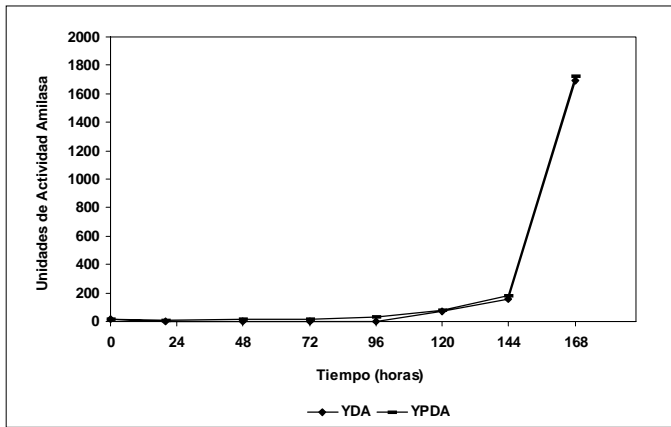
Al igual que en *B. bassiana*, en *Clostridium thermosulfurogenes* SV9 la mayor cantidad de  $\alpha$ -amilasa se produce al final del periodo exponencial de crecimiento (Swamy y Seenayya 1996). Resulta notorio que la actividad de las  $\alpha$ -amilasas esté directamente relacionada con el crecimiento del hongo lo cual evidencia que el crecimiento micelial es crucial para la adecuada producción de las diferentes proteínas extracelulares (Carlsen *et al.* 1996). Sin duda alguna, la expresión de enzimas digestivas por parte de los hongos entomopatógenos que crecen en medios de cultivo líquido dependerá en gran medida de la composición del mismo. Hongos como *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces* spp. y *V. lecanii*, producen grandes cantidades de proteasas y quitinasas en medios de cultivo líquido (Gillespie 1988).

Igualmente se encontró que un medio de cultivo que contenga peptona y extracto de levadura se constituye en una muy buena fuente de nitrógeno para la producción de enzimas como las amilasas, lo cual está en concordancia con los datos suministrados Swamy y Seenayya (1996).

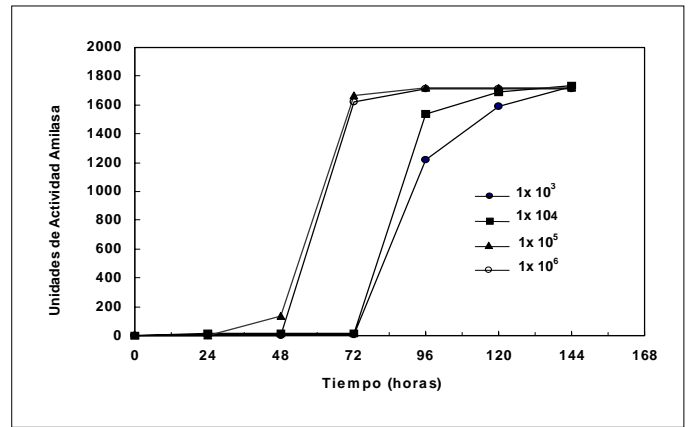
#### Concentración de conidios/ml

Los análisis del efecto de la concentración inicial del inóculo sobre la actividad de  $\alpha$ -amilasas de *B. bassiana* se evaluaron durante 144 h en el medio de cultivo YGA. El comportamiento de la actividad amilolítica bajo estas condiciones se muestra en la Figura 2. Si bien no se encontraron diferencias en la actividad de la enzima entre las concentraciones de  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  conidios/ml, sí se presentaron diferencias cuando se compararon contra las otras dos concentraciones evaluadas, especialmente después de las primeras 48 h de cultivo. Así mismo, se puede apreciar con claridad que la cinética del desdoblamiento del almidón sigue un comportamiento similar en todas las concentraciones evaluadas, lo cual se denota en la pendiente de la curva obtenida. Conforme se incrementa la concentración de conidios/ml del inóculo inicial, el desdoblamiento enzimático del almidón se presenta más tempranamente como consecuencia de una mayor cantidad de la enzima que está siendo liberada al medio de cultivo, permitiendo de esta forma establecer diferencias entre las diferentes concentraciones.

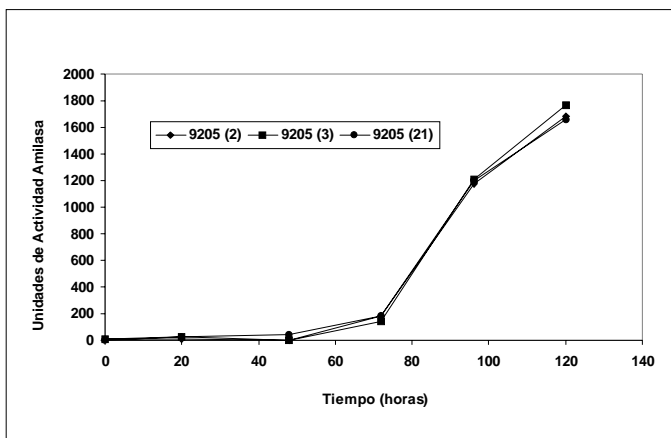
Es evidente que una mayor actividad de la enzima, propiciada por una mayor concentración del inóculo acorta notable-



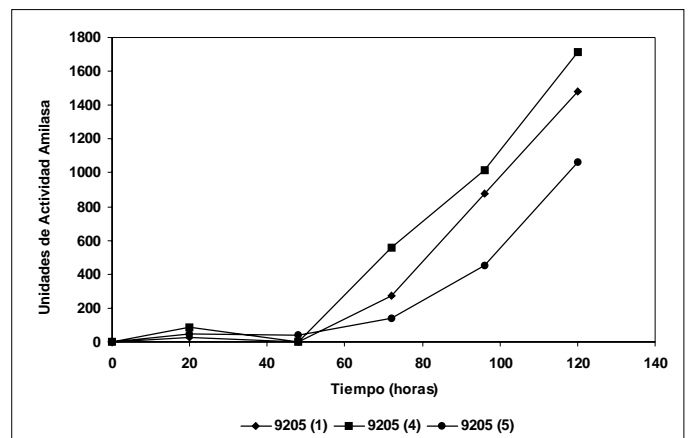
**Figura 1.** Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la actividad amilolítica de un cultivo monoespórico de *B. bassiana* Bb 9205 (5).



**Figura 2.** Efecto de la concentración de conidios de *B. bassiana* (Bb 9205) sobre la actividad amilolítica.



**Figura 3.** Comportamiento de la actividad amilasa de tres aislamientos monoespóricos obtenidos de *B. bassiana* (Bb 9205).



**Figura 4.** Comportamiento de la actividad amilasa de tres aislamientos monoespóricos obtenidos de *B. bassiana* (Bb 9205).

mente el tiempo requerido para que el desdoblamiento enzimático del almidón se inicie, permitiendo de esta forma que el hongo alcance a completar la digestión total del sustrato.

El hongo en concentraciones de  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^4$  conidios/ml inicia su actividad amilolítica a las 72 h mientras que a concentraciones de  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  esta actividad se hace evidente a partir de las primeras 48 h de cultivo. De esta manera se puede llegar a establecer cuál sería el comportamiento de la producción de amilasas extracelulares de un hongo en función de la concentración y tiempo del crecimiento del mismo. Se podría pensar que bajo condiciones de campo, una mayor concentración del inóculo sobre el insecto hospedero traería como consecuencia un evento más temprano de patógenesis y en consecuencia una muerte más temprana.

El término producción de una enzima está referido tanto a la síntesis de la enzima por parte del hongo como a la actividad de la enzima en el medio una vez que ha

sido producida (Hankin y Anagnostakis 1975). La capacidad de estos hongos para degradar el almidón fue usada en este experimento como un criterio para determinar el potencial de producir enzimas de tipo amilolítico.

#### Actividad amilolítica

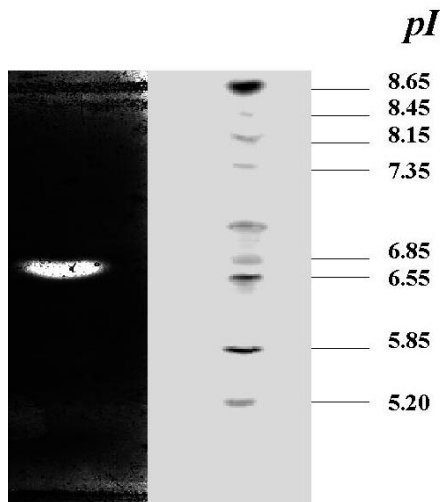
Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4. Los aislamientos 9205 (2), 9205 (3) y 9205 (21) presentan un comportamiento bastante similar entre ellos, mientras que los restantes aislamientos 9205 (1), 9205 (4) y 9205 (5) evidencian un comportamiento de la actividad de la enzima que no se correlaciona con el tipo de monoespórico evaluado. Dado que se trata de cultivos provenientes de aislamientos monoespóricos de *B. bassiana* queda en evidencia que el comportamiento bioquímico de sus enzimas, por lo menos en lo que respecta a las  $\alpha$ -amilasas, no sigue un patrón uniforme indicando de esta manera que aún bajo estas condiciones de cultivo se pueden esperar resultados diferentes bajo condiciones de crecimiento en laboratorio y en campo.

La metodología aquí evaluada permitiría conocer, de manera muy rápida, diferencias en cuanto a la actividad de esta importante enzima entre diferentes aislamientos del hongo, las cuales podrían estar correlacionadas con mayor o menor actividad controladora de insectos plaga. La mayor rapidez de estos análisis bioquímicos se fundamenta en el hecho de que mediante el uso de esta metodología no resulta indispensable la purificación o aislamiento de la enzima a partir del medio de cultivo. En caso de ser necesaria la purificación de la enzima; esta tarea sin duda requeriría de mayor tiempo (Hankin y Anagnostakis 1975). Sin duda, las enzimas extracelulares que son producidas por estos hongos son de gran importancia para entender mejor la forma como ellos utilizan y transforman el sustrato sobre el cual crecen.

#### Zimogramas de actividad enzimática

Los zimogramas de actividad efectuados para las muestras provenientes del medio de cultivo del hongo y desarrollados sobre geles de isoelectroenfoque IEF 3-9

mostraron la presencia de una sola banda de actividad amilasa la cual al parecer representa en *B. bassiana* la totalidad de la actividad de esta enzima (Fig. 5). El *pI* calculado mediante el uso de marcadores de *pI* fue de 6,70, indicando su naturaleza casi neutra. No es muy común en hongos entomopatógenos que la actividad digestiva de un sustrato en particular lo efectúe una sola isoforma de la enzima. Al parecer, y basados en los resultados encontrados en el presente trabajo, el crecimiento de hongos en medio líquido pudiera eventualmente favorecer la actividad de estas enzimas y propiciar que sólo una o muy pocas isoformas se expresen bajo tales condiciones. Por lo tanto, se hace necesario estudiar los patrones de expresión de ésta y otras enzimas cuando se encuentran atacando al insecto.



**Figura 5.** Zimograma de amilasas de *B. bassiana* (Bb 9205), en un gel IEF (3-9) y determinación de su *pI*.

Con base en los resultados presentados se puede señalar que la metodología utilizada y estandarizada en el presente trabajo permitirá no sólo la evaluación rápida y sencilla de la actividad de amilasas provenientes de hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, sino también facilitará el estudio de otros sistemas enzimáticos generados en medios de cultivo conteniendo o no un sustrato específico. Dado que actualmente se sabe que existe una marcada correlación entre la actividad de enzimas digestivas de hongos y su patogenicidad en campo, la implementación de una metodología como la que se plantea en este trabajo

podría facilitar la evaluación y selección de aislamientos de hongos entomopatógenos por su potencial para el control de insectos plaga.

### Conclusiones

- Se logró la estandarización de una metodología que permite la evaluación rápida y sencilla de la actividad de  $\alpha$ -amilasas provenientes de hongos entomopatógenos que crecen en medio líquido.
- El hongo entomopatógeno *B. bassiana*, bajo condiciones de cultivo en medio líquido, produce al parecer una sola isoforma de  $\alpha$ -amilasa con un *pI* cercano a la neutralidad.
- En razón a las diferencias encontradas entre aislamientos monospóricos en cuanto a la actividad de esta enzima, esta variable podría ser utilizada como un nuevo criterio de selección de aislamientos del hongo por su potencial para el control de insectos plaga.

### Recomendaciones

- Adelantar nuevos estudios que exploren los patrones de expresión de esta y otras enzimas en el sistema insecto-hongo.
- Proponer trabajos de investigación que correlacionen la patogenicidad de diferentes aislamientos de hongos entomopatógenos y los niveles de actividad de  $\alpha$ -amilasas.

### Literatura citada

BIDOCHKA, M. J.; KACHATOURIANS, G. G. 1987. Purification and properties of an extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1679-1684.

BRIDGE, P. D.; ABRAHAM, Y. J.; CORNISH, M. C.; PRIOR, C.; MOORE, D. 1990. The chemotaxonomy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina : Hyphomycetes) isolates from the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Mycopathologia* 11(2): 85-90.

CARLSEN, M.; SPOHR, A. B.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. 1996. Morphology and physiology of an  $\alpha$ -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnology & Bioengineering* 49 (3): 266-276.

GILLESPIE, A. 1988. Use of fungi to control pest of agricultural importance. In: Burge, M. (Ed) *Fungi in biological control systems*. Manchester University Press, Manchester, England. 269 p.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.

HOPKINS, R. H.; BIRD, R. 1954. The action of some  $\alpha$ -amylases on amylose. *Biochemical Journal* 56: 86-96.

LEOPOLD, J.; SAMSINAKOVA, A. 1970. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 34-44.

MAY, B.; ROBERTS, D. W.; SOPER, R. S. 1979. Intraspecific genetic variability in laboratory strains of *Entomophthora* as determined by enzyme electrophoresis. *Experimental Mycology* 3: 289-297.

MICALES, J. A.; BONDE, M. R.; PETERSON, G. L. 1986. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon* 27: 405-449.

PATERSON, R. R. M.; BRIDG, P. D.; CROSSWAITE, M. J.; HAWKSWORTH, D. L. A. 1989. A reappraisal of the *Terverticillate penicillia* using biochemical, physiological and morphological features. III. An evaluation of pectinase and amylase isoenzymes for species characterization. *Journal of General Microbiology* 135: 2979-2991.

RATH, A. C.; CARR, C. J.; GRAHAM, B. R. 1995. Characterization of *Metarhizium anisopliae* strain by carbohydrate utilization (API50CH). *Journal of Invertebrate Pathology* 65(2): 152-161.

ST. LEGER, R. J.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. 1993. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 81-84.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D. W. 1996. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3): 907-912.

SWAMY M. V.; SEENAYYA G. 1996. Thermostable pullulanase and  $\alpha$ -amylase activity from *Clostridium thermosulfurogenes* SV9- optimization of culture conditions for enzyme production. *Process Biochemistry* 31 (2): 157-162.