

EFFECTO DE LA VARIACIÓN DEL PH EN UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE SALVADO DE TRIGO PARA LA PRODUCCIÓN DE AMILASA POR PAECILOMYCES LILACINUS.

Effect of the change in pH in a culture medium based on wheat bran for the production of amylase by Paecilomyces lilacinus.

Luis Pichén-Moreno , Mariana Flores-Abad , Cinthya Obeso-Villazón , Julio Arellano-Barragán²

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la variación del pH en cultivos a base de salvado de trigo para la producción de amilasa por Paecilomyces lilacinus, los cultivos se realizaron en botellas planas de 250 mL conteniendo 20 gramos de salvado de trigo, solución tampón Acetato 0.1 M pH 5, Fosfato 0.1 M pH 7 y Carbonato 0.1 M pH 9; controlándose las variables temperatura, tiempo y contenido de humedad. Las amilasas producidas en el medio se extrajeron con 80 mL de la solución buffer respectiva, agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se filtró al vacío y se conservó el eluato. La actividad amilásica se determinó usando una solución de almidón tamponada (0.05 % almidón, 0.15 M NaCl, 0.1 M acetato de sodio pH 5.0) como sustrato. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro a 540 nm para obtener las unidades enzimáticas. En valores promedios se determinó que a pH 5 se obtuvo la mayor producción de unidades amilolíticas con un valor de 614.94 UA/dL, en contraste con los obtenidos a pH 7 y pH 9 que fueron de 508.77 y 488.86 UA/dL respectivamente. Los resultados del análisis de varianza, determinaron que existe diferencia altamente significativa en el tratamiento a pH 5 en comparación con los otros tratamientos ensayados.

Palabras clave: Amilasa, Paecilomyces lilacinus, Almidón, Salvado de trigo, pH.

ABSTRACT

This work was aimed at determining the effect of the change in pH in a culture medium based on wheat bran for the production of amylase by Paecilomyces lilacinus under experimental conditions, crops were flat in bottles of 250 mL containing 20 grams Wheat bran, 0.1 M acetate buffer pH 5, phosphate and carbonate PH 7 M 0.1 M 0.1 pH 9; the variables of temperature, time and moisture content were managed in their values more suitable for this process. The amylases produced in the middle were extracted with 80 mL of the respective buffer solution, stirring for 30 minutes at room temperature. It then leaked to the vacuum and the eluate was retained. The amylase activity was determined using a starch solution buffered (0.05% starch, 0.15 M NaCl, 0.1 M sodium acetate, pH 5.0) as a substrate. The readings were performed in a spectrophotometer to an absorbance of 540 nm to obtain the units enzyme. On average values are determined that at pH 5 was obtained by the increased production of amilolytic units with a value of 614.94 AU/dL, higher than those obtained at pH 7 and pH 9, which were 508.77 and 488.86 AU/dL respectively. The results of all experiments were analyzed by the statistical method analysis of variance determined that there is a highly significant difference in treatment at pH 5 compared with the other treatments tested.

Key words: Amylase, Paecilomyces lilacinus, Starch, Wheat Bran, pH.

INTRODUCCIÓN

Las propiedades de *Paecilomyces lilacinus* como entomopatógeno, la conservación de la virulencia en la preparación (antes de su aplicación y después de un período de almacenaje) y la especificidad que presentan¹, han sido objeto de estudios en los últimos años. Otro aspecto estudiado, es con respecto a su actividad biocida reportándose que las enzimas proteolíticas y quitinolíticas de *P. lilacinus* están involucradas en el ataque a los huevos de los nemátodos².

Para la utilización de *P. lilacinus* se han diseñado diferentes medios de cultivo adecuados para el crecimiento de este hongo, teniendo en cuenta el sustrato a emplear. Entre los medios más usados en laboratorio tenemos al agar papa dextrosa (PDA), arroz, y granos de cereales, pero no son económicamente recomendables. Otro medio usado es el maíz semimolido, vaina de arroz, agua de azúcares, machacado de papa y hojas de *Lucaena leucecephala* para una producción óptima de *P. lilacinus*³, también en Cuba se desarrolló un procesamiento para la obtención de un formulado del hongo *P. lilacinus* viable y de valor comercial para el control de nemátodos, el cual está basado en el diseño de un medio de cultivo optimizado y de bajo costo compuesto por melaza de caña (2-4%) y fosfato de amonio (0.8-1,0%) que permite alcanzar altos volúmenes de conidios (90 a 95% de las esporas totales) en cultivo sumergido⁴.

Uno de los principales obstáculos que presenta el uso de este hongo como controlador biológico, es la escasa disponibilidad de métodos de bajo costo para la producción de altos volúmenes de esporas estables (conidios) en condiciones industriales, ya que las mismas son consideradas las de mayor interés para su empleo como bioplaguicidas, debido a su resistencia y estabilidad⁵.

En todos estos diseños de producción se controlan factores como pH, luz, temperatura. Cada uno de los métodos tiene ventajas y desventajas, por lo cual la decisión depende de varios factores, entre los que por

supuesto, la calidad del producto final y su factibilidad tecnológica y económica son los más importantes⁶.

Existen sustratos sólidos baratos y con buena disponibilidad como el salvado del trigo, el salvado de arroz, el salvado de cebada, pero su aprovechamiento está relacionado directamente con el comportamiento enzimático del microorganismo⁷.

En esa dirección se han enfocado trabajos tendientes a evaluar diferentes matrices sólidas sobre las cuales inmovilizar y multiplicar el hongo, que les sean útiles como fuente de carbono y que tengan bajo costo, esto es el caso del salvado de trigo, que es un producto de desecho, y en donde se observó un buen crecimiento, siendo posible optimizar un sistema a base de éste para la productividad de *P. lilacinus*⁸.

Se han realizado diversas investigaciones con el propósito de evaluar la actividad de una enzima específica como ayuda para la caracterización de hongos entomopatógenos^{9,10}. 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^{9,11}.

Las amilasas son enzimas que catalizan las reacciones hidrolíticas del almidón, dando origen a diversos productos que poseen una gran relevancia para algunas operaciones y procesos industriales. Las amilasas son comúnmente halladas en animales y en plantas, sin embargo, para fines industriales, las más utilizadas son aquellas de origen bacteriano o fúngico^{12,13}.

Con respecto a *Paecilomyces* y su producción de amilasa se encontró un trabajo relacionado al "Beiju" que es una masa de yuca fermentada naturalmente de los países orientales, utilizada para la producción de

una bebida alcohólica indígena llamada “Tiquira” aquí se encontró que las poblaciones microbianas en el “Beiju” resultaron ser mohos, predominantemente fueron *Aspergillus niger* y *Paecilomyces* sp también se encontraron poblaciones moderadas de *Rhizopus* sp semejantes a *R. delemar* y pequeñas poblaciones de *Neurospora* sp. en el “Beiju”. Se encontró que *Paecilomyces* sp produjo una elevada actividad del alfa-amilasa, en tanto que *R. delemar* produjo pequeñas cantidades de la enzima. Por otra parte, *A. niger* y *R. delemar* produjeron grandes cantidades de amilogluosidasa, en tanto que *Paecilomyces* sp. y *Neurospora* sp. produjeron pequeñas cantidades de enzima¹⁴. El pH del medio donde crecerá el hongo es también de mucha importancia para la producción de enzimas y el comportamiento de las mismas, por ejemplo, se ha encontrado que las amilasas presentes en el complejo enzimático del cultivo de *Aspergillus* sp. sobre salvado de trigo, fueron activas en el desdoblamiento en la molécula de almidón a pH 5.0 y temperatura de 37°C demostrando el carácter débilmente ácido y su proveniencia mesófila. Esto contrasta con pruebas anteriores en las cuales se ha establecido el pH óptimo de las α – amilasas en un valor de 7.0 y 5.0 respectivamente¹³.

P. lilacinus mostró un cambio morfológico de filamentoso a células artroconidias redondas cuando el pH era cambiado del neutro al alcalino. Hay muchos informes sobre la producción de metabolitos asociados con el cambio de pH así como con la condición medioambiental¹⁶.

El presente trabajo busca desarrollar una metodología para la evaluación rápida y sencilla de la producción de amilasa de *P. lilacinus*, pues no se han encontrado reportes de producción de amilasa en la especie *P. lilacinus* de *Paecilomyces*, asimismo, el empleo de un medio sólido utilizando el salvado de trigo a diferentes pHs con el propósito de encontrar el pH con el que se obtenga la mayor producción de esta enzima. Del mismo modo se, evaluó el empleo del

salvado de trigo como soporte sólido-sustrato para la producción de amilasa por *P. lilacinus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Cultivo puro de *P. lilacinus* proporcionado por el Laboratorio de Tecnología enzimática, En tomopatógenos y Productos Naturales. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.

Salvado de trigo (*Triticum Sativum* Lam) obtenido del mercado local.

PROCEDIMIENTO

Reactivación de la cepa de *P. lilacinus*⁵ A partir de un stock de cultivo de *P. lilacinus* se realizó una suspensión con Tween 80 al 0,5 %, luego se procedió a hacer resiembras del cultivo en 6 placas petri conteniendo Agar Sabouraud - Almidón los cuales se incubaron a 28°C \pm por 6 días.

Siembra e incubación de cultivos monospóricos⁵

De las 6 placas conteniendo *P. lilacinus* sembrado en Agar Sabouraud – Almidón, se obtuvo una suspensión de esporas en agua destilada estéril, la cual se estandarizó a una concentración de 10⁴ esporas por mililitro, luego se separó 1 mL de la suspensión estandarizada a esa concentración y se mezcló con 1 mL de agua destilada estéril en un tubo de ensayo, obteniéndose una concentración final de 5x10³ esporas/mL. Posteriormente se inoculó por superficie un volumen de 0,1 mL con la suspensión de esporas obtenida en 6 placas petri con teniendo Agar Sabouraud – Almidón. La totalidad de las placas fueron incubadas a 28°C \pm por espacio de 24 horas, observadas al microscopio con la finalidad de poder detectar las esporas que germinaron, las mismas que fueron extraídas con bisturí esterilizado y sembradas en la parte central de placas conteniendo Agar Sabouraud – Almidón. Las placas se incubaron a 28°C \pm por espacio de 13 días, obteniéndose así

cultivos monospóricos de *Paecilomyces lilacinus*.

Tamizado de colonias de *P. lilacinus* productoras de amilasas¹⁶

Los 6 cultivos monospóricos de *P. lilacinus* se replicaron por puntura en 6 placas petri con medio Sabraud – Almidón. Se incubaron a 28°C durante 3 días. Posteriormente las colonias de *P. lilacinus* quemás produjeron enzimas hidrolíticas se observando el halo de degradación del almidón (círculo claro alrededor de la colonia). Para facilitar la detección, se reveló la presencia de almidón en el medio por el agregado de solución de I₂/KI (0.026 % I₂ + 0.26 % KI) que formó un complejo con el polisacárido dando una coloración azul. Los cultivos monospóricos de los cuales se obtuvo los cultivos con mayor producción de enzimas hidrolíticas del almidón fueron rotulados y guardados en refrigeración.

Determinación del contenido de Humedad del Salvado de Trigo¹⁷ El contenido de humedad del salvado de trigo fue estimado secando 10 gr. de salvado de trigo hasta un peso constante a 95°C por 12 horas y el peso seco fue registrado. Luego se fijó el contenido de humedad inicial del medio sólido remojando el salvado de trigo con la cantidad deseada de agua (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mL de agua/10 g. de salvado de trigo en cada caso). Después, la muestra otra vez fue secada como se describió inicialmente y el contenido de humedad fue calculado así:

$$\frac{\text{Pérdida de peso durante la desecación.}}{\text{Pérdida de peso antes de desecarse.}} * 100 = \% \text{H}_2\text{O}$$

Luego se observó que el contenido mayor de humedad fue obtenido al agregar 10 mL de agua, que nos dió 56 % de humedad en el Salvado de trigo, que fue el utilizado en el presente trabajo. Producción de amilasas en medio sólido Producción de esporas⁵

Los cultivos monospóricos con mayor actividad amilásica se replicaron en Tubos de Ensayo 13x100 mm conteniendo 5 % de salvado pulverizado y 2% agar. Se sembró con el asa cada colonia en un Tubo de ensayo. Se

incubó a 28°C durante 5 días.

Preparación de Tampones¹⁸

Los Tampones usados fueron: Tampón Acetato 0.1 M pH 5, Tampón Fosfato 0.1 M pH7 y el Tampón Carbonato 0.1 M pH 9.

Preparación del sustrato sólido e inoculación de esporas¹⁶

En botellas planas de 250 mL se colocó 20 g de salvado de trigo y se autoclavó, luego se humedeció el salvado con 20 mL del tampón en experimentación previamente autoclavado. Se colocaron las botellas planas en forma horizontal y, en condiciones de esterilidad, se confirmó el pH del medio con cintas de pH esterilizadas en una cámara UV. Posteriormente de los cultivos de *P. Lilacinus* contenidos en tubos de ensayo se hizo una suspensión en 5 mL de NaCl – Tween 80 al 0.5 %. Se inoculó 3 mL de la suspensión de esporas (llevada a una concentración de 2×10^8 esporas/mL) en las botellas planas de 250 mL conteniendo humedecido con el Tampón de experimentación y con una bagueta se extendió el medio tratando de formar una superficie plana. Luego fueron incubados a 28 °C durante 5 días hasta la formación de abundante micelio.

Extracción de las enzimas¹⁶

Las amilasas producidas en el medio de salvado del trigo por *P. lilacinus* en los diferentes niveles de pH, se extrajeron con 80 mL de la solución tampón respectivo. Agitamos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego filtramos al vacío y se conservó el eluido en congelación a - 13°C hasta la determinación de las unidades de enzima. diferentes niveles de pH, se extrajeron con 80 mL de la solución tampón respectivo. Agitamos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego filtramos al vacío y se conservó el eluido en congelación a -13°C hasta la determinación de las unidades de enzima.

Medición de la actividad Enzimática 16

La actividad amilásica se determinó utilizando almidón como sustrato. La solución de sustrato consiste en una solución de almidón tamponada (0.05 % almidón, 0.15 M NaCl, 0,1 M acetato de sodio pH: 5.0). La reacción enzimática consistió en

incubar 10 µl del eluido del cultivo de *P. lilacinus* con 0.5 ml de solución de sustrato. La incubación se realizó a 37°C durante 7.5 min. La reacción se detuvo agregando 4.5 ml de solución reveladora y se midió la absorbancia a 640 nm. El protocolo se detalla a continuación:

Medición de actividad amilásica

Tubo Nº	Extracto enzimático	Solución de sustrato	Incubación a 37°C	Solución reveladora	Absorbancia a 640 nm
Blanco reactivo	-	0.5 mL	7.5 min.	4.5 mL	-
Blanco muestra	10 µL	-	7.5 min.	4.5 mL	-
Muestra	10 µL	0.5 mL	7.5 min.	4.5 mL	-

Para el cálculo de resultado usamos la siguiente formula:

$$\text{Amilasa UA/dl} = \frac{\text{Absorbancia (Blanco)} - \text{Absorbancia (Muestra)}}{\text{Absorbancia (Blanco)}} \times 1000$$

Absorbancia del Blanco = Abs. de Blanco reactivo + Abs. de Blanco muestra.
Absorbancia de Muestra = Absorbancia de cada eluido enzimático.

RESULTADOS

En la Tabla 1, se observa que el promedio de las Unidades Amilolíticas producido en pH 5 es de 614.94 UA/dL, la cual es visiblemente mayor que los producidos por pH 7 y pH 9 que

presentaron resultados de 508.77 y 488.86 UA/dL respectivamente como promedio de Unidades Amilolíticas producidas, indicando rendimiento óptimo de *P. lilacinus* para producir Amilasa a pH5.

Tabla 1. Unidades Amilolíticas producidas por *P. lilacinus* en cada uno de los experimentos en los cuales se cultivó al hongo en Salvado de Trigo en un respectivo pH; empleándose Botellas planas de 250 mL, temperatura de 30°C y un tiempo de 5 días.

Tratamientos	Unidades de enzima (UA/dL)			Promedio de las unidades de enzima en los 3 experimentos
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	
pH 5	620.69	603.44	620.69	614.94
pH 7	508.77	526.32	491.23	508.77
pH 9	483.3	500.0	483.3	488.86

En la Tabla 2, según la prueba Post-ANOVA DHS de Tukey, se observa que existe diferencia altamente significativa entre los pares de medias de: pH 5-pH 7 y pH 5- pH 9, en tanto no hay diferencia en las medias entre pH 7 y pH 9, por ende podemos aseverar que el nivel de pH 5 es el que optimiza la producción de amilasa.

Tabla 2. Técnica Post – ANOVA DHS de Tukey para determinar que nivel de pH maximiza la producción de amilasa.

	(I) Nivel de pH	(J) Nivel de pH	Diferencia entre medias (I - J)	Significación
DHS de Tukey	pH 5	pH 7	106.16667(*)	0,000
		pH 9	126.07333(*)	0,000
	pH 7	pH 9	19.90667(**)	0,222

Basado en las medias observadas.

(*) La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

(**) No hay diferencia significativa.

En la fig. 1, se aprecia la diferencia de promedios de las Unidades Amilolíticas en los 3 experimentos realizados por pH utilizado. Podemos apreciar cómo la producción a pH 5 es altamente significativa comparado a lo producido a pH 7 y pH 9, en cambio, entre estos dos últimos la diferencia no es significativa.

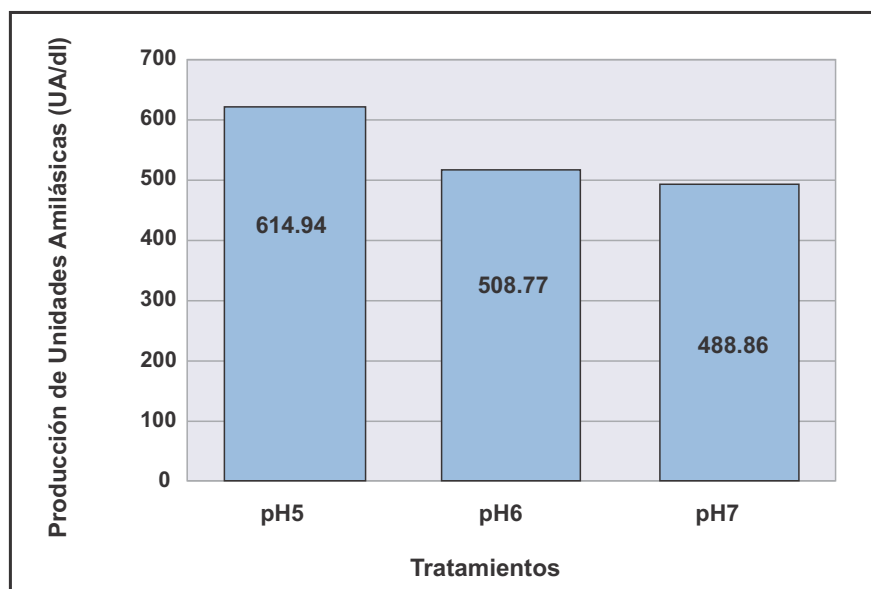


Fig. 1. Producción promedio de Unidades Amilolíticas por *P. lilacinus* cultivado en medio sólido con diferentes pH.

En la fig. 2, 3 y 4 se observa el crecimiento de *P. lilacinus* en las botellas planas de 250 mL conteniendo salvado de trigo con su respectivo tampón, en las tres botellas hubo crecimiento, pero en las que contenían los tampones de pH 5 y pH 7 el crecimiento fue mayor.



Fig. 2. Crecimiento micelial de *P. lilacinus* en salvado de trigo a pH 5



Fig. 3. Crecimiento micelial de *P. lilacinus* en salvado de trigo a pH 7



Fig. 4. Crecimiento micelial de *P. lilacinus* en salvado de trigo a pH 9

DISCUSIÓN

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. La capacidad de *P. lilacinus* para degradar el almidón fue empleada en esta investigación como un criterio para determinar el potencial de producir enzimas de tipo amilolítico¹⁹.

Sin duda alguna, la expresión de esta enzima digestiva por parte de este hongo entomopatógeno que crece en medios líquidos o bien sólidos dependerá en gran medida de la composición del mismo. Hongos como *Bauberia bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* spp. y *Verticillium lecanii*, producen altas cantidades de proteasas y quitinasas en medios de cultivos que estimulen su expresión²⁰.

Las amilasas presentes en el complejo enzimático obtenido del cultivo de *P. lilacinus* sobre el salvado de trigo, fueron activas en el desdoblamiento de la molécula del almidón, esto nos demuestra el uso que se le puede dar a este producto de desecho como medio sólido para el crecimiento de *P. lilacinus*, bien para su propagación y posterior obtención de esporas, pues se observó un abundante crecimiento micelial, o bien para optimizar un sistema a base de salvado de trigo para producir y obtener amilasa para uso industrial^{8,13}.

Según los resultados obtenidos, se registró una mayor producción de amilasas por *P. lilacinus* en el sistema experimental cuyo tratamiento fue a pH 5.0 con un valor promedio de 614.94 UA/dL en contraste con la producción a pH 7 y pH 9 que fueron de 508.77 y 488.86 UA/dL respectivamente, demostrando la preferencia del hongo de crecer en medios débilmente ácidos, así como también el pH ideal para la producción de amilasa¹³.

El pH del medio de cultivo es uno de los factores más importantes que influye sobre el crecimiento de los microorganismos.

Como ejemplo Eng y colaboradores evaluaron el crecimiento del hongo *Botryodiplodia theobromae* RC1 hongo fitopatógeno de zonas tropicales, en pH de un rango de 5 a 10, encontrando mayor crecimiento en pH 5 y pH 7, esto demuestra el carácter débilmente ácido de ciertos hongos, especialmente fitopatógenos, que tienen un mejor funcionamiento de su maquinaria enzimática en esos ambientes²¹.

Se evidencia claramente que en general los hongos tienen un pH óptimo cercano a 5, en el comercio se encuentran diversas preparaciones derivadas de hongos de los grupos *Aspergillus* y *Rhizopus* donde su actividad es máxima entre pH 4 y pH 5²².

Cayrol y Col., en un estudio de las propiedades nematocidas de *P. lilacinus* encontraron que a pH 5 hubo una mayor producción de enzimas y toxinas que permitieron una mejor acción nematocida del hongo, confirmando la influencia del pH

en la enzimática de *P. lilacinus*²³.

Pero no solo *P. lilacinus* alcanza su mayor potencial a pH débilmente ácidos, también se evidencia la mayor estabilidad de la enzima amilasa a pH 5. Las amilasas estables en medio ácido pueden ser encontradas en *A. niger*, también se han encontrado en *A. awamori*, donde se describió que esta amilasa, específicamente la alfa-amilasa era estable entre pH 3,5 y 6,5²⁴.

Es evidente a partir de trabajos anteriores, que la alfa-amilasa estable en medio ácido de *A. niger*, o de otras especies de *Aspergillus* que producen alfa-amilasa estable en medio ácido, es de potencial importancia industrial^{23, 24}.

Otros factores tales como la concentración óptima de inóculo, propician una mayor actividad de la enzima y acortan notablemente 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 sustrato¹⁹.

El contenido de humedad del sustrato también afecta el buen desenvolvimiento de la enzima,

ya que el agua puede afectar la reactividad química a través de distintos mecanismos, actuando como solvente, reactivo, o afectando a las reacciones enzimáticas debido a su influencia sobre la viscosidad del sistema, en el caso de la presente investigación el factor humedad afectó positivamente la acción de la amilasa, es por ello que se proporcionó 56% de humedad en el salvado de trigo²⁵.

En base a los resultados obtenidos, 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 *P. lilacinus*, 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 el aislamiento, la evaluación y selección de aislamientos de hongos entomopatógenos por su potencial para el control de insectos plaga²⁶.

CONCLUSIONES

- *P. lilacinus*, produce amilasa en medio de cultivo sólido.
- La mayor producción de Unidades amilolíticas por parte de *P. lilacinus* se presentó a pH 5, con un valor promedio de 614.94 UA/dL.
- El salvado de Trigo resultó ser un excelente sustrato sólido para el crecimiento del hongo y la producción de amilasa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cabanillas E, Barker K, Daykin M. Histology of the interactions of *Paecilomyces lilacinus* with *Meloidogyne incognita* on tomato. *J. Nematol.* 1988; 20 (3): 362-365.
2. Gómez E, Álvarez R., San Juan A, Zayas

- M, Hernández Y, Lernes T, Croche G, Cruz X. Nematicida a partir del hongo *Verticillium lecanii*. *Revista Terralia.* 2001; 24: 30-1.
3. Jatala P, Salas R, Kaltenbach R, Bocangel M. Multiple application and long-term effect of *Paecilomyces lilacinus* in controlling *Meloidogyne incognita* under field conditions. *Journal Nematol.* 1981; 13:445.
4. Álvarez M, Rodríguez J, Lemes T, Díaz A, Fernandez E. Procedimiento de obtención de un nematicida a partir del hongo *Paecilomyces lilacinus*. 1999.
5. López M. *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson: Caracterización, Reproducción y Obtención de un biopreparado con efecto nematicida. Tesis de Doctor en Ciencias Agrícola. INISAV. La Habana, Cuba, 80. 1995.
6. Alamgir M, Holland R, Williams K. Recent studies on *Paecilomyces lilacinus* as a bionematicide. Suppression of *Heterodera avenae* populations, infection of *Meloidogyne javanica* eggs, females and juveniles in a pot trial and *Radopholus similis* eggs in laboratory studies. 1997. En línea: [Http://cwpp.slq.qld.gov.au/aanju/ly97/pilac;nus-july97.html](http://cwpp.slq.qld.gov.au/aanju/ly97/pilac;nus-july97.html).
7. Pandey A, Soccol C, Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I – bioprocesses and products. *Process Biochem.* 2000; 35: 1153-1169.
8. Childress A, Bennett J, Connick W, Daigle D. Formulation of filamentous fungi for bioremediation. *Biotechnol Tech.* 1998; 12(3):211-214.
9. Leger R, Staples R, Roberts D. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology.* 1993; 61:81-84.
10. Bidochka M, Kachaturians G. Purification and properties of an extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental*

- Microbiology. 1987; 53: 1679-1684.
11. Micales J, Bonde M, Peterson G. The use of isozymes analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon*. 1986; 27: 405-449.
 12. Whiteburst R. *Enzymes in food Technology*. Editorial Sheffield Academic Press. Nueva York, USA. 2002; 225p.
 13. Fennema O. *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 2000; 1258p.
 14. Park Y, Zenin C, Tueda S, Martins C, Martins N. Microflora in beiju and their biochemical characteristics. *Journal of Fermentation Technology*. 1982; 60(1): 1-4.
 15. Buendía G, Mendoza G, Bárcena R, Ortega M, Solís J, Lara A. Efecto de la amilasa de *Aspergillus Níger* en la digestibilidad in Vitro de maíz y sorgo. *Agrociencia*. 2003; 37(4), 317-322.
 16. Michikatsu S, Rokuro O, Teruhiko B. Enhanced Production of Antibiotics by *Paecilomyces lilacinus* under Alkaline Conditions Associated with Morphological Change. *Agric. Biol. Chem.* 1990; 55 (2): 555-562.
 17. Cullison A. *Alimentos y Alimentación de animales*. Primera Edición. Editorial Diana S.A. México D.F. México. 1983.
 18. Sidney P, Nathan O. *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc. New York. USA. 1955.
 19. Hankin L, Anagnostakis S. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology*. 1975; 67: 597-607.
 20. Gillespie A. Use of fungi to control pest of agricultural importance. In: Burge, M. *Fungi in biological control systems*. Manchester University Press, Manchester, England. 1988; 269 p.
 21. Eng F, Gutierrez M, Favela E. Efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodiatheo bromae* RC1. Instituto de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. La Habana. Cuba. 2003.
 22. Carrera J. Módulos de Biotecnología, “Enzimas Industriales, Birreactores, Variables de Control, Guías de Laboratorio y Biotecnología Agrícola y Vegetal” Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca. 2002.
 23. Cayrol J, Djian C, Pijarowski L. Study of the nematocidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Recherches de Nématologie et de Génétique Moléculaire des InverteZvés*. Meilland-France. Vercauteren, R. 2001.
 24. Dendooven E, Heylen A. Alfa-amilasa purificada de origen fúngico estable en ácido. La Sas van Gent, Holanda. 1998.
 25. González J, Molina M. Estudio de los factores que afectan la hidrólisis enzimática y el proceso fermentativo para la producción de alcohol a partir de papa: (*Solanum tuberosum*). Universidad de Costa Rica. 2006.
 26. Flórez M, López C, Valencia A. Actividad de [alfa]-amilasas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cultivado en medio líquido. (Sección Agrícola). *Revista Colombiana de Entomología*. 2005; 35: 1153-1169.

Correspondencia:

Julio Arellano Barragán

Dirección:San Francisco 386 - San Salvador
Trujillo - Perú**Teléfono:** 948244621**E-mail:** jcab442@hotmail.com