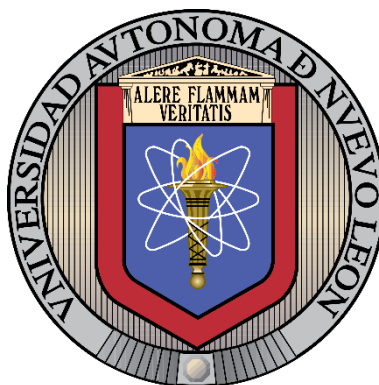


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE QUITINASAS Y
SU EMPLEO EN LA HIDRÓLISIS DE QUITINA EXTRAÍDA DE *Aspergillus sp.* Y
Agaricus bisporus.

Por:

Israel Rodriguez Miranda

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada

Diciembre, 2024

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE QUITINASAS Y
SU EMPLEO EN LA HIDRÓLISIS DE QUITINA EXTRAÍDA DE *Aspergillus sp.* Y
Agaricus bisporus.

Aprobación de la Tesis:

Dr. Julio Silva Mendoza

Director de Tesis

Dra. Alcione García Gonzales

Comité Tutorial

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

Comité Tutorial

Dr. José Rubén Morones Ramírez

Comité Tutorial

Resumen

Israel Rodríguez Miranda

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE QUITINASAS Y SU EMPLEO EN LA HIDRÓLISIS DE QUITINA EXTRAÍDA DE *Aspergillus sp.* Y *Agaricus bisporus*.

Número de páginas:

**Candidato para el Grado
de Maestro en Ciencias con Orientación
en Microbiología Aplicada**

Área de estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y Método de Estudio: A pesar de ser el segundo polisacárido más abundante del planeta, la quitina ha sido infravalorada por su estructura intratable e insolubilidad. Hoy en día su aprovechamiento resulta de los derivados de quitina, como nanoquitina y los quitoligosacáridos. Convencionalmente estos se han obtenido de crustáceos por metodologías químicas y físicas muy costosas y agresivas que generan extensos residuos tóxicos, por lo que se han buscado alternativas sostenibles alternativa sostenible contra el uso de animales como fuente de quitina y contra los métodos convencionales de extracción. En este trabajo se propuso evaluar metodologías con menor uso de reactivos y la aplicación de hidrólisis enzimática con quitinasas para la extracción de quitina y sus derivados en hongos filamentosos. De esta forma el proyecto partió del aislamiento de microorganismos productores de quitinasas y selección de aquellos con mayor índice de potencial y actividad enzimática, para la producción de quitinasas microbianas. Además, se evaluó la extracción de quitina y sus derivados en los hongos *Aspergillus sp.* y *Agaricus bisporus* por metodologías más sostenibles con el uso solamente de H_2O_2 y el empleo de quitinasas microbianas purificadas. Se caracterizaron los productos por microscopía electrónica, espectroscopía de infrarrojo y difracción de rayos X.

Contribuciones y Conclusiones: A partir del tamizaje de 200 microorganismos quitinolíticos aislados del estado de Nuevo León, dos actinobacterias seleccionadas mostraron índice de potencial de degradación de quitina coloidal de 1.7 y 1.6 en placa y por fermentación una actividad de quitinasa de 0.042 y 0.040 U. Se purificó quitina con índices de cristalinidad de 78% en forma de microfibrillas de la pared celular de *A.bisporus* y *Aspergillus sp.* con H_2O_2 y $H_2O_2 + 2\% H_2SO_4$ respectivamente y se observó por microscopía electrónica que la adición de quitinasas semipurificadas degradó completamente a quitoligosacáridos la quitina de *Aspergillus* y a nanofibras la quitina de *Agaricus bisporus*.

Firma del asesor:

Índice

Capítulo	Página
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Quitina.....	1
1.1.1 Estructura y tipos de quitina.....	2
1.1.2 Quitina en los Hongos.....	2
1.1.3 Estado actual y usos de la quitina.....	4
1.2 Nanoquitina	4
1.3 Quito-oligosacáridos.....	7
1.3 Quitinasas	8
1.3.3 Quitinasas de Microorganismos	8
JUSTIFICACIÓN	10
OBJETIVO GENERAL	12
3.1 Objetivos específicos	12
3.2 Hipótesis	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 Medios de cultivo.....	13
4.2 Soluciones y reactivos.....	13
4.3 Aislamiento de microorganismos.....	14
4.3.1 identificación molecular.....	15
4.4 Producción de quitinasas	16
4.4.1 Crecimiento y cinética enzimática	16
4.4.2 Evaluación de fuentes de carbono alternas para la producción de quitinasas	18
4.4.3 Extracción y purificación de quitinasas.....	19
4.5 Evaluación de hidrólisis enzimática de quitina de hongos filamentosos.....	21
4.6.1 Obtención de micelio	21
4.6.2 Extracción de quitina.....	22
4.6.3 Hidrólisis enzimática.	23
4.6 Aplicación. Actividad antimicrobiana contra <i>Candida albicans</i>	23
4.7 Microscopía.....	24
4.8 Difracción de rayos X	24

4.9 FT-IR.....	25
RESULTADOS.....	26
5.1 Microorganismos productores de quitinasas.....	26
5.1.1 Muestreo.....	26
5.1.2 Aislamiento de microorganismos quitinolíticos	27
5.1.3 Primera selección de microorganismos.....	28
5.1.4 Segunda selección por potencial de degradación.	30
5.1.4 Crecimiento y evaluación en medio LB y Agar nutritivo.....	30
5.2 Expresión enzimática	31
5.2.1 Cinética enzimática.....	31
5.2.2 Producción de enzimas en medios de cultivo con quitina fúngica	33
5.3 Identificación molecular	36
5.3 Purificación de endoquitinasas.....	37
5.4 Aplicación de quitinasas para la hidrólisis de quitina fúngica.....	39
5.4.1 Extracción de quitina <i>Agaricus bisporus</i>	39
5.4.2 Extracción de quitina de <i>Aspergillus sp.</i>	42
5.4.3 Hidrólisis enzimática de quitina fúngica.....	45
5.4 Aplicación de quitinasas como control biológico contra <i>Candida albicans</i>	46
DISCUSIÓN	48
6.1 Microorganismos productores de quitinasas.....	48
6.1.1 identificación molecular.....	50
6.2 Expresión enzimática	51
6.2.1 Producción de enzimas en medios de cultivo con quitina fúngica	52
6.3 Purificación de endoquitinasas	53
6.4 Extracción de quitina fúngica.....	53
6.4.1 <i>Agaricus bisporus</i>	54
6.6.2 <i>Aspergillus sp.</i>	55
6.5 Hidrólisis enzimática de quitina	59
6.6 Inhibición del patógeno <i>Candida albicans</i>	60
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFIA	63
APÉNDICE 1.....	71
APÉNDICE 2.....	72

Índice de figuras

Figura 1. Componentes de la pared celular fúngica	3
Figura 2. Jerarquización estructural de la quitina	5
Figura 3. Nanofibras fungicas	6
Figura 4. Nanocristales de quitina.....	7
Figura 5. Toma de muestras	26
Figura 6. Aislamiento de microorganismos	27
Figura 7. Bacterias de la exuvias de cigarras.....	28
Figura 8. Microscopías de las bacterias quitinolíticas selccionadas	29
Figura 9. IP de las bacterias quitinolíticas seleccionadas.....	30
Figura 10. Crecimeinto de bacterias quitinolíticas en medio LB y Agar nutritivo.....	31
Figura 11. Grafica de cinética enzimatica de Bac 1 y Bac 7.....	33
Figura 12. Bacterias quitinolíticas en medio con quitina de champiñón.....	34
Figura 13. Bacterias quitinolíticas en medio con quiitna de Aspergillus sp.	34
Figura 14. Cinética enzimática en medio con quitina de champiñón	35
Figura 15. Electroforesis del genoma y amplificación	36
Figura 16. Árbol filogenetico	37
Figura 17. Cromatograma intercambio iónico	38
Figura 18. Cromatograma exclusión por tamaño	38
Figura 19. Microscopía de quitina de A. bisporus.....	40
Figura 20. Espectro IR de quitina de A. bisporus	41
Figura 21. Difractograma de quitina de A. bisporus	42
Figura 22. Microscopía SEM de la extracción de quitina de Aspergillus sp.	43
Figura 23. Espectro IR de la extracción de quitina en Aspergilllus sp.	44
Figura 24. Difractograma de quitina de Aspergillus.....	45
Figura 25. Hidrolisis enzimática de quitina	46
Figura 26. Prueba de inhibición	47
Figura 27. Comparación de espectros IR, quitina de A. bisporus y Aspergillus.....	57
Figura 28. Comparación de difractogramas, quitina de A. bisporus y Aspergillus	58

Índice de tablas

Tabla 1. UFC de cada dilución sembradas en medio MMQ	27
Tabla 2. Características coloniales de las bacterias seleccionadas	28
Tabla 3. Actividad de quitinasas Bac 7	31
Tabla 4. Actividad de quitinasas Bac 1	32
Tabla 5. Purificación de quitinasas	39

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
AND	Ácido desoxirribonucleico
ChNC	Nanocristales de quitina
ChNF	Nanofibras de quitina
Cm	Centímetros
CrI	Índice de cristalinidad
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo transformada de Fourier
g	Gramos
GLcN	Glucosamina
GlcNAc	N-acetil glucosamina
H ₂ HO ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IR	Espectroscopía de infrarrojo
kDA	Kilo dalton
M	Molar
MM-Q	Medio mínimo de quitina
U	Unidad enzimática
VC	Volumen de la columna

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Con el paso del tiempo, debido a la gran demanda de productos e incontrolable explotación de recursos, la situación actual que sobrelleva nuestro planeta nos induce a la búsqueda y aplicación de materiales renovables, biodegradables, biocompatibles, y sostenibles para minimizar el impacto ambiental y que funcionen como alternativa contra los diversos materiales que no lo son, al grado de poder ser completamente remplazados.

Los materiales naturales que dominan el planeta o también llamados biopolímeros son macromoléculas complejas estructuradas por unidades repetitivas que confieren diversas propiedades y resistencia vital en las células de los organismos. Su abundancia los hace formar gran parte de la biomasa del planeta de los cuales principalmente se encuentra la celulosa, la quitina, la seda y el colágeno, estos biopolímeros han recibido una gran atención científica y comercial en los últimos años entre muchas de sus características gracias a sus propiedades físicas y mecánicas que los vuelven muy resistentes, pero destacan por su disponibilidad en la naturaleza, su sostenibilidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad.

1.1 Quitina

La quitina es uno de los biopolímeros presentes en la naturaleza, está formado por β -(1,4) unidades de N-acetilglucosamina (N-acetil-2-amino-2- desoxi-D-glucopiranos), es el segundo polisacárido más abundante en el planeta seguido únicamente por la celulosa con la que comparte semejanzas jerárquicas a nivel nano y microestructural, ya que ambos polímeros proporcionan soporte estructural resistente en los organismos a partir de la formación de fibrillas diversamente vinculadas y acopladas. Dentro de la forma molecular en la quitina, la estructura de la glucosa a diferencia de la celulosa presenta un grupo acetilamida (hidroxilo en celulosa) enlazado al C-2, lo que permite formar enlaces

específicos y adquirir propiedades únicas para formar biopolímeros, así mismo la quitina presenta mayor accesibilidad química que la celulosa¹

1.1.1 Estructura y tipos de quitina

El polímero dispone en la naturaleza de tres estructuras polimórficas; cadenas antiparalelas (α -quitina), cadenas paralelas (β -quitina) y la combinación entre ambas (γ -quitina). Las distintas estructuras que presenta confieren papeles biológicos específicos y muy diversos que permiten distribuirse ampliamente entre los organismos. Hongos, moluscos y artrópodos como crustáceos e insectos son los principales organismos donde podemos encontrar la quitina, aunque en menor cantidad también se encuentra en algunos otros invertebrados, como los poliquetos y las esponjas incluso en microorganismos como protozoarios y algas². La estructura α -quitina predomina en la naturaleza en animales y hongos, comúnmente se obtiene de crustáceos como los camarones y otros mariscos, ya que en la cutícula de estos organismos contienen altos porcentajes de quitina³, pero los métodos de extracción de quitina a escala utilizados en camarones sufren de alto costo, largos tiempos de reacción y generan extensos productos de desecho tóxicos⁴. Por otro lado la estructura β -quitina es menos abundante en la naturaleza ya que solo se ha encontrado en organismos más especializados como en las conchas al interior de los calamares, dentro de los túneles construidos por el gusano de tubo (*Riftia*) y en las estructuras duras de algunas diatomeas^{5,6}, su extracción resulta deficiente por tratarse de estructuras más especializadas difícil de conseguir. La γ -quitina es una combinación entre las estructuras paralelas y antiparalelas mayormente emparentada con la estructura α -quitina, se encuentra poco caracterizada y se ha descrito en capullos de *Ptinus* y en calamares del género *Loligo*⁷.

1.1.2 Quitina en los Hongos

Aunque el tipo α -quitina se encuentra entre los artrópodos y hongos, la organización y disponibilidad que tiene este tipo de quitina en los hongos no es la misma que en los animales, incluso se encuentran diferencias estructurales de la quitina entre especies distintas. La quitina forma parte estructural de las paredes celulares fúngicas, se acumula

además en los ápices de crecimiento de tejidos vegetales y en el huso mitótico durante la división celular⁸⁻¹⁰. Gracias a la especificidad de los fosfolípidos y las diversas proteínas presentes en la membrana plasmática de las células fúngicas, es posible lograr una base de andamiaje para estructuras externas ordenadas compuestas por una columna de polisacáridos, en la que se incluyen fibras de α -quitina junto a estructuras de quitosano, es decir formas desacetiladas de la propia quitina entre otros glucanos, estos últimos se localizan a partir de la capa base al interior de la pared celular compuesta de quitina¹¹. Por último dentro de esta red de glucanos, estructuras de α/β -glucanos y galacto-mananos adornados con proteínas glicosiladas forman las capas exteriores de la pared celular fúngica¹⁰.

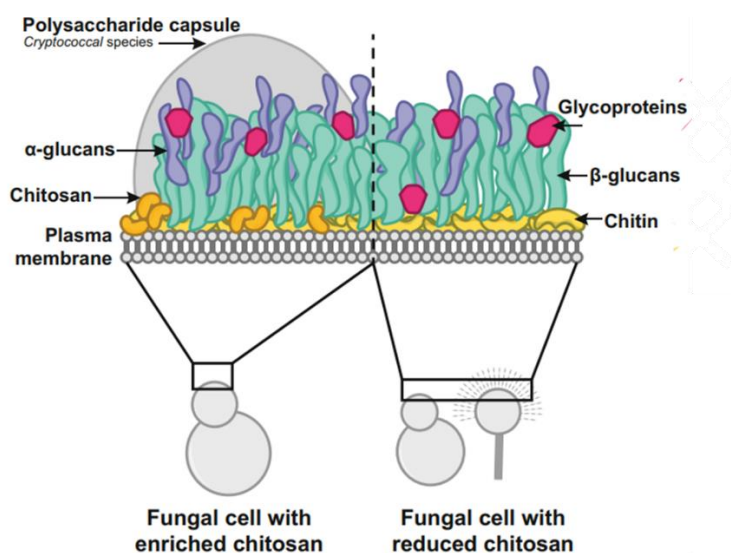


Figura 1. Componentes estructurales de la pared celular fúngica. Adaptada de ref. [10]

Existen porcentajes significantes de quitina en hongos, con intervalos desde el 5% hasta el 27% del peso seco total de una célula fúngica, pero aunque suele tener altos porcentajes en la biomasa celular no siempre es el carbohidrato más abundante, por ejemplo la quitina es menos abundante que los α -glucanos y β -glucanos en muchos casos, incluso se ha encontrado que el quitosano llega a triplicar su concentración dentro de la pared celular en comparación con la quitina como es el caso de muchos zigomicetos, atribuido posiblemente como defensa para contrarrestar la hidrólisis por las quitinasas¹².

El porcentaje de quitina presente en la célula está regulado por las síntesis y el índice de degradación del polímero, ya que una vez sintetizado puede que sea desacetilado a estructuras menores como el quitosano. La síntesis de quitina en los organismos se lleva a cabo por la acción catalizadora de la enzima quitina sintasa, la cual se expresa por la familia de genes CHS, estos genes abundan en el filo blastocladiomycota y en clases de hongos filamentosos^{13,14}. Aunque generalmente se ha preferido obtener quitosano de los hongos, resulta no ser tan sostenible debido a la gran cantidad de residuos que se generan por las reacciones de desacetilación.^{15,16}

1.1.3 Estado actual y usos de la quitina

La quitina es un compuesto atractivo, tiene diversas aplicaciones médicas, industriales y agrícolas¹⁷, pero como ya se había descrito anteriormente, debido a sus propiedades fisicoquímicas entre ellas su solubilidad y falta de biocompatibilidad, resulta no ser uno de los recursos más utilizados, sumando que presenta rigurosos procedimientos de extracción y procesamiento. Se ha buscado aprovechar la quitina aumentando las propiedades del polímero, como su funcionalización, su fragmentación a estructuras más útiles como los quitoooligosacaridos¹⁸ que se han utilizado en aplicaciones biomédicas^{19, 20} y la producción de nanoestructuras²¹. Hoy en día gracias al interés comercial, los estudios de quitina y sus diversas estructuras han evolucionado enormemente.^{22,23}

1.2 Nanoquitina

Recientemente han llamado la atención el polímero en sus estructuras nanométricas semicristalinas, así como sus oligosacáridos o comúnmente denominados quito-oligosacáridos, ya que se amplía el rango de propiedades y aplicaciones, incluso de biocompatibilidad sin perder su estructura biológica y químicamente compatible con las características nativas del polímero, permitiendo formar complejos con otros elementos como los metales o fármacos²⁴⁻²⁶ y adquirir funciones determinadas.

Nanoquitina se denomina al nivel de jerarquización estructural de la quitina a nanoescala, representan las mesoestructuras de construcción a nivel nanométrico biológica y químicamente compatibles con las estructuras superiores. En la naturaleza se derivan nanoestructuras de quitina en forma de fibras y cristales. Las nanofibras resultan ser semicristalinas ya que se componen de quitina amorfa, quitina cristalina y proteínas, contienen a los nanocristales altamente orientados incrustados en una matriz amorfa rodeados de proteínas y esta a su vez se empaqueta en haces formando microfibrillas orientadas unidas por fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno²⁷.

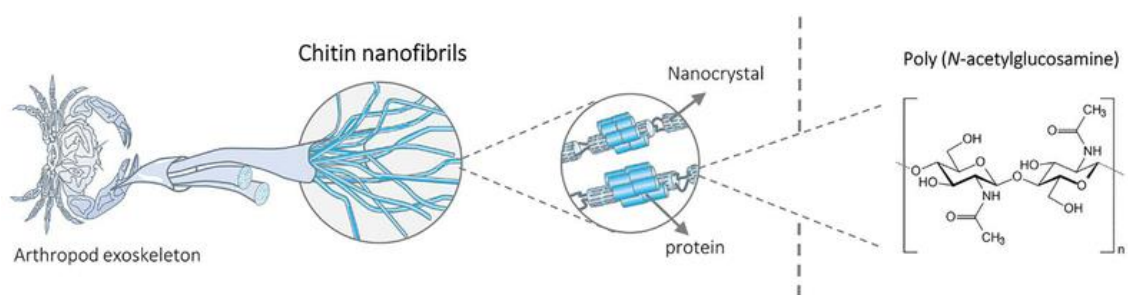


Figura 2. Jerarquización estructural de la quitina. Reimpresión de ref. ²⁷

Hoy se incluye tres modelos estructurales; nanofibras, nanocristales y nanopartículas, los cuales difieren entre sí por el tamaño, estructura, forma, nivel de cristalinidad y método de obtención²⁸. El tamaño y flexibilidad son características propias de las nanoestructuras, las cuales permiten que se acoplen con facilidad a diversos sistemas, de lo que resultan los biopolímeros. Generalmente las nanofibras y nanocristales se obtienen formas de organización nanoestructural de quitina por métodos de arriba hacia abajo, pero también es posible sintetizar de abajo hacia arriba nanopartículas de quitina incluso nanofibras con rasgos determinados para diversas aplicaciones. Las características específicas de la nanoquitina obtenida dependerán de la fuente y estructura inicial, así como de las condiciones y estrategias para obtenerlas²¹. Los métodos de obtención convencionales abarcan principalmente métodos físicos y químicos, pero debido a las complicaciones ambientales antes mencionadas se están empezando a aplicar no solo para la síntesis de nanoquitina si no para cualquier otra nanoestructura denominada síntesis verde o métodos biológicos para su obtención.

Las nanofibras de quitina (ChNF) son estructuras alargadas en fibrillas ionizadas que puede extenderse en longitudes de micras, se obtienen generalmente por fibrilación mecánica, desintegrando la quitina nativa sin eliminar las regiones amorfas, es decir conservando las estructuras de haces alargados con quitina cristalina y quitina amorfa. Por otro lado, los nanocristales de quitina (ChNC) se obtienen generalmente de reacciones químicas, por degradación estructural y eliminación de fibrillas, con las que se consigue la eliminación selectiva de quitina desordenada, proteínas y otros compuestos y moléculas que interfieran en la obtención de estructuras cristalinas ordenadas. Los nanocristales comparten una morfología similar a las nanofibras, ambos son bastones largos con relaciones de aspecto, pero los nanocristales son mucho más cortos, tienen hasta cientos de nanómetros de largo.

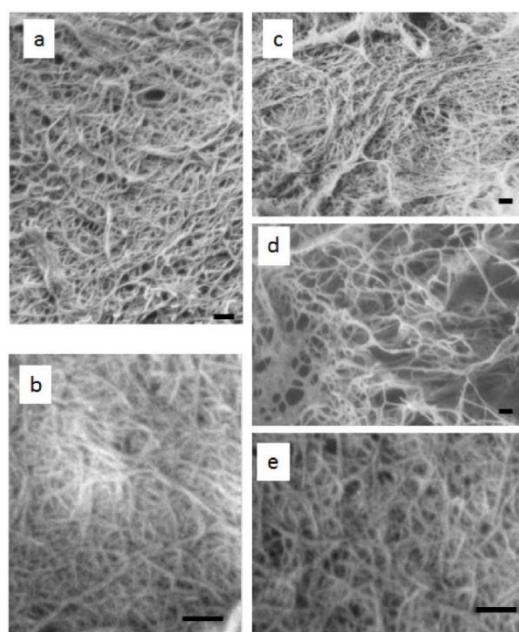


Figura 3. Nanofibras de diferentes hongos macromicetos obtenidas por nanofibrilación y tratamiento ácido (a) *Pleurotus eryngii* (b) *Agaricus bisporus* (c) *Lentinula edodes* (d) *Grifola frondosa* (e) *Hypsizygus marmoreus*. La escala de la barra representa 200 nm. Reimpresa de [29]

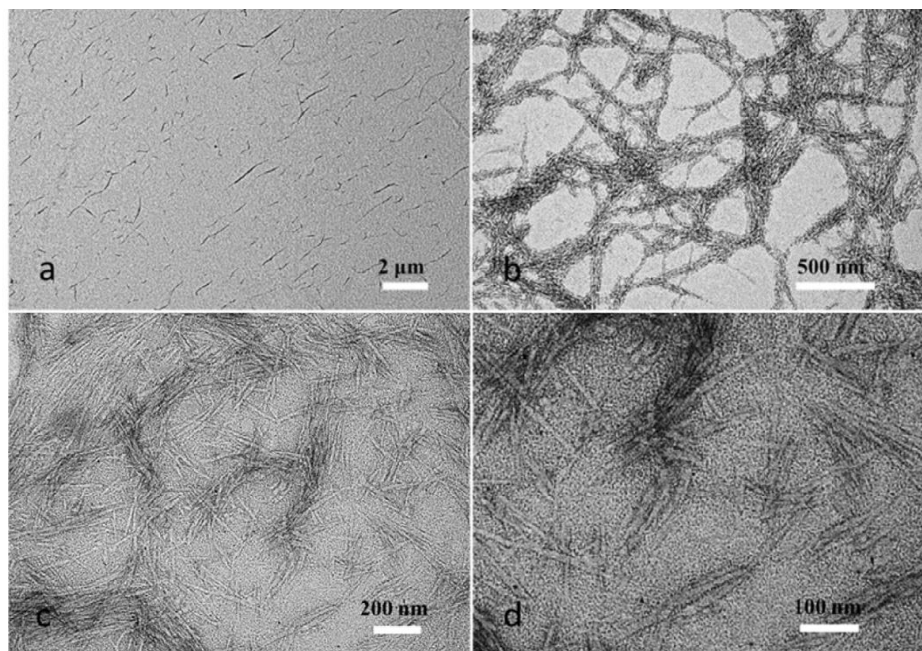


Figura 4. Nanoquitina fúngica. A) y B) nanofibras de quitina fúngica, C) y D) nanocristales con longitudes de 100 a 300 nm y grosor de 5 a 20 nm. Extraídas por hidrólisis química del hongo *Tricholoma gambosum*. Reimpresa de [30]

1.3 Quito-oligosacáridos

Los oligosacáridos son polímeros denominados así por su formación de monómeros unidos por enlaces O-glicosídicos, estos tienen en promedio de unidades monoméricas entre 2 y 10. Si hablamos de la degradación de la quitina típicamente se producen una mezcla de quito-oligosacáridos de diferentes tamaños y estos están formados por N-acetilglucosamina (GlcNAc) y glucosamina (GlcN). Existen diversos métodos a través de tratamientos químicos, físicos o enzimáticos para obtenerlos, además estos compuestos son biodegradables, no tóxicos y presentan una gran cantidad de propiedades biológicas³¹.

1.3 Quitinasas

Contrario a la síntesis, el catabolismo y degradación de quitina se distribuye ampliamente por más sistemas biológicos, desde arqueobacterias hasta mamíferos, entre estos destacan los microorganismos quitinolíticos ya que son considerados especialistas en la degradación de quitina para su aprovechamiento.

Las quitinasas pertenecen al grupo de enzimas de la familia 18 y 19, la familia 18 se encuentra más ampliamente distribuida en la naturaleza. Hidrolizan quitina a componentes oligoméricos y monoméricos, actúan en los enlaces glucosídicos entre los carbonos C1 y C4 de dos N-acetil-glucosaminas, son proteínas monoméricas de peso molecular entre 21kDa y 70kDa³². Las quitinasas hidrolizan la molécula de quitina con diversos propósitos, más allá de utilizarla como fuente de carbono para su nutrición, algunos otros utilizan la enzima como defensa contra patógenos, algunos otros para utilidades fisiológicas muy específicas como en insectos, es por esto por lo que la síntesis de quitinasas se extiende en todos los reinos biológicos incluyendo animales como los mamíferos.

Las quitinasas se clasifican por su actividad catalítica en endo- y exo- quitinasas, ambas degradan el polímero por hidrólisis, pero difieren en la longitud de los productos generados. Las endoquitinasas actúan en los enlaces glucosídicos aleatoriamente en partes dentro de la molécula de la quitina y las exoquitinasas catalizan la degradación de la quitina cristalina desde los extremos reductores liberando quitobiosas o monómeros de GlcNac³³.

1.3.3 Quitinasas de Microorganismos

Bacterias como los estreptomicetos contienen secuencias en sus genomas que codifican enzimas que les permiten utilizar la quitina como fuente de carbono y además de nitrógeno, por lo que es común encontrar estos microorganismos en nichos que contienen abundante quitina. Dichas enzimas principalmente se asocian al grupo de las quitinasas y en algunos casos las β -N-acetilglucosaminidasas, estas en conjunto actúan

hidrolizando la molécula en oligómeros incluso hasta monómeros de GlcNAc, para facilitar la absorción de moléculas más simples a través de las membranas y una vez dentro finalmente ser metabolizadas³⁴. Se han caracterizado quitinasas en géneros como *Serratia*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, y *Vibrio*, principalmente^{35,36}. Las quitinasas bacterianas tienen un rango de peso molecular entre los 20 y los 60 kDa, comparadas con otras quitinasas resultan más pequeñas que las de los animales como los insectos (40-85 kDa), pero de tamaños similares a las quitinasas de las plantas (40-85 kDa)³⁷. Se sabe que dependiendo del microorganismo de donde se han aislado, las quitinasas pueden tener amplios rangos de trabajo de pH y temperatura.

Resulta conveniente reproducir los mecanismos que ya existen en la naturaleza como alternativas para la generación de estructuras digeribles, biocompatibles y amigables con el medio ambiente como es la síntesis de nanoestructuras por vías enzimáticas. Hoy en día la extensa pluralidad de enzimas se ha explotado para uso comercial en diversos sectores, como la industria, farmacéutica y agrícola, gracias a que representa una alternativa más sostenible y amigable con el medio ambiente por tratarse de un producto biológico. Es por lo que se busca implementar estrategias para optimizar su funcionalidad, conseguir periodos de utilidad más largos y fáciles de estandarizar³⁸. Existen métodos complejos de ingeniería genética que ayudan a mejorar las propiedades de las proteínas, pero queda la alternativa de encontrar nuevas entidades biológicas u organismos que codifiquen nuevas quitinasas para su descripción y caracterización, lo que permite abrir oportunidades de investigación con quitinasas de microorganismos salvajes.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

La quitina resulta entonces un compuesto prometedor por su disponibilidad, abundancia y estructura, funciona además como alternativa sostenible contra polímeros sintéticos y se ha contrastado junto a la celulosa para diversas aplicaciones, sin embargo, la quitina destaca por presentar grupos aminos en su estructura y que le confieren capacidades de biocompatibilidad distintas. A pesar de ello, la quitina durante muchos años fue infravalorada, debido a su estructura intratable y baja solubilidad, gracias a los avances en la producción de derivados de quitina, como el quitosano, la nanoquitina o los quito-oligosacáridos se ha podido aprovechar el biopolímero. Comercialmente la quitina se obtiene de crustáceos e insectos, pero a partir de estas fuentes se llegan a generar extensos residuos tóxicos, sumando que los procedimientos físicos y químicos que se utilizan requieren gran cantidad de energía y ocupan muchos reactivos entre ellos ácidos y algunos otros óxidos para la degradación y eliminación de proteínas, sales y minerales presentes en la cutícula del organismo, por lo que su extracción convencional resulta no ser tan sostenible. A pesar de ello y de los análisis de impacto ambiental, se siguen utilizando animales al mismo tiempo que siguen predominando los métodos químicos para la extracción de quitina. Las alternativas para esta complicación se exhiben claramente, el cambio de fuente de extracción de quitina y evitar el uso excesivo de reactivos químicos. La facilidad de cultivo, la rápida proliferación de los hongos y gracias a que la quitina se encuentra empaquetada de manera más accesible en comparación con los animales se puede obtener de manera más sostenible, y de esta manera utilizar métodos que limiten el uso de reactivos, la generación de residuos tóxicos, el gasto de energía y otras variables más dentro del impacto ambiental que pudiera ocasionar. Los métodos más aptos y sostenibles para obtener quitina y sus derivados como nanoestructuras o quito-oligosacáridos pudieran ser los métodos biológico-enzimáticos, pero hoy en día los

avances en estos métodos en quitina son escasos y más aún si se habla de ellos en hongos. En referencia a esto, se busca proyectar el uso de hongos como fuente de obtención de quitina, evaluar métodos más sostenibles, simples y económicos para su producción, así como la aplicación de métodos biológico-enzimáticos para obtener derivados de quitina a partir de enzimas de tipo quitinasas con altos potencial catalítico.

Por otro lado, las enzimas quitinasas tienen diversas aplicaciones sostenibles más allá de la producción de derivados de quitina, tienen utilidad desde la industria farmacéutica, el control de plagas, incluso producción de combustibles, sin embargo, a pesar de su potencial, las quitinasas no han sido explotadas para su aplicación ni para su producción y/o comercialización en comparación con otras enzimas glicosidasas. Los factores que limitan su utilización se deben principalmente a la baja actividad enzimática, la falta de estabilidad, altos costos de producción y el bajo número de organismos con altas tasas de producción de quitinasas. Hoy en días se siguen explorando los organismos y sus quitinasas que mejoren estos factores, organismos que produzcan nuevas quitinasas con mayor potencial, mejor actividad y estabilidad, conjuntamente se buscan alternativas para aumentar la producción y actividad de las quitinasas en medios de cultivo simplificados. En base a la búsqueda de microorganismos y nuevas enzimas quitinasas, se planteó en este proyecto aislar microorganismos quitinolíticos en áreas naturales conservadas no exploradas del estado de Nuevo León en México y explorar su crecimiento, producción de quitinas y actividad enzimática en medios de cultivo más simples como puede ser el uso de quitina fúngica extraída de igual manera por metodologías sencillas y sostenibles.

Con la finalidad de mejorar los factores que limitan la utilización de las quitinasas, se exploran nuevos organismos y quitinasas de una forma simple y sobre todo sostenible, de igual manera fue es lo que se propone para la producción de quitina y sus derivados en fuentes alternas a los animales como son los hongos y el uso de metodologías biológicas.

CAPÍTULO 3

OBJETIVO GENERAL

Aislar microorganismos del estado de Nuevo León potenciales en la producción de quitinasas y evaluar su eficacia para hidrolizar quitina extraída de hongos filamentosos.

3.1 Objetivos específicos

- 1) Aislar e identificar microorganismos con potencial para producir quitinasas
- 2) Producir quitinasas mediante fermentación sumergida y determinar actividad enzimática.
- 3) Evaluar el tratamiento simplificado con H_2O_2 para la extracción de quitina en *Agaricus bisporus* y *Aspergillus sp.*
- 4) Caracterizar la quitina de *Aspergillus sp.* y *Aspergillus* obtenida.
- 5) Evaluar la eficacia de las quitinasas en la hidrólisis de la quitina fúngica extraída.
- 6) Evaluar las quitinasas en el control de hongos patógenos in vitro.

3.2 Hipótesis

Las quitinasas producidas por un microorganismo aislado del estado de Nuevo León, tendrán potencial para hidrolizar quitina fúngica extraída de *A. bisporus* y *Aspergillus sp.*

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Medios de cultivo

Medio Mínimo de Quitina (MM-Q) solido. Para un litro de medio se requirió 10 g de quitina coloidal, 5 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.3 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 5 g de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y 15 g de agar bacteriológico. Se ajustó el pH a 6 – 6.5.

Medio Mínimo de Quitina (MM-Q) liquido. Para un litro de medio se requirió 10 g de quitina coloidal, 5 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.3 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y 5 g de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Se ajustó el pH a 6 – 6.5.

Medio de Quitina de Champiñón Para un litro de medio se requirió 10 g de quitina de champiñón, 5 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.3 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 5 g de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y 5 g de extracto de levadura. Se ajustó el pH a 6 – 6.5.

Medio de Quitina de *Aspergillus*. Para un litro de medio se requirió 10 g de quitina de *Aspergillus*, 5 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.3 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 5 g de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y 5 g de extracto de levadura. Se ajustó el pH a 6 – 6.5.

4.2 Soluciones y reactivos

Quitina coloidal. En 100 ml de ácido clorhídrico (HCl) al 37% se adicionó en agitación y lentamente 10 g de quitina de camarón hasta disolver, por dos horas. La solución se agregó en 500 ml de agua destilada y se dejó reposar por 12 horas. Se lavo con agua

destilada por centrifugación y se filtró con filtro Whatman 1° hasta obtener pH neutro o cercano.

Buffer de acetatos (50mM/L pH 5). Para 200 ml de buffer; se agregó 1.36 g de acetato de sodio trihidratado en 200 ml de agua destilada, se ajustó el pH con ácido clorhídrico 1N, se esterilizó para su almacenamiento.

DNS. Para 200 ml, se disolvió 2 g de hidróxido de sodio (NaOH) y 2 g de ácido 3,5 DNS en 50 ml de agua destilada, por separado en 100 ml disolver 40 g de tartrato de sodio-potasio tetrahidratado, mezclar ambas soluciones y aforar a 200 ml. Conservar en frasco ámbar.

4.3 Aislamiento de microorganismos

Se tomaron tres muestreos para el aislamiento de microorganismos quitinolíticos: muestras de tierra superficial por debajo de las hojarascas del Cerro de la Silla en Monterrey Nuevo león, del Cerro Agujerado en Juárez Nuevo león y de exoesqueletos (exuvias) liberados por temporada de muda de insectos cicádidos conocidos comúnmente como cigarras, el manejo de las muestras se empleó bajo medidas de asepsia y esterilidad en frascos estériles de esta forma asegurar contaminación externa al lugar de muestreo. Se colocaron 5 g de las dos muestras de tierra y los exoesqueletos molidos en mortero en suspensión de solución salina con cloruro de sodio al 0.85% y se agitaron para dispersar los microorganismos presentes. A partir de estas tres suspensiones correspondientes se realizaron diluciones seriadas y se sembraron por dispersión en placa en medio mínimo de quitina MM-Q por 6 a 8 días a 34°C.

Una vez evaluada la actividad quitinolítica de forma cualitativa en los medios de aislamiento, se resembraron en medio MM-Q de forma individual las colonias de microorganismos entre hongos y bacterias que presentaron mayor zona de aclaramiento alrededor de la colonia por la degradación de la quitina coloidal, previamente se realizaron tinciones simples y por microscopía se clasificaron en principio que las colonias seleccionadas fueran bacterias y no levaduras. Posteriormente se resembraron por estría

cruzada para obtener colonias axénicas en medio de cultivo sólido MM-Q a 34°C durante 5 días y de forma particular se determinó el índice de potencial de degradación de quitina coloidal. El índice de potencial IP se determinó por la ecuación 1. El IP es un valor cualitativo que indica la actividad quitinolítica en los microorganismos estudiados.

$$IP = \frac{\text{diámetro halo de hidrólisis (mm)}}{\text{diámetro de la colonia (mm)}}$$

Finalmente se describió la morfología colonial como es la apariencia, el pigmento, la textura, el tipo de elevación y borde, entre otra. Además, se realizaron tinciones de contraste y tinción gram en fresco para observar la morfología microscópica de los microorganismos, así como su clasificación según su color después de la tinción Gram. Debido a que se pretendía trabajar con los microorganismos con mayor IP para la producción de quitinas, se evaluó el desarrollo de dichos microorganismos en medio de cultivo sólido LB y agar nutritivo, se sembraron por estría a lo largo de la placa y se incubaron a 34°C evaluados a 24h y 48h de desarrollo.

4.3.1 identificación molecular

Los microorganismos con mayor potencial en la hidrólisis de la quitina y así mismo en la producción de quitinasas fueron identificados molecularmente mediante secuenciación del gen correspondiente a la subunidad ribosomal 16s en las bacterias.

Para la extracción genómica, se cultivo la actinobacteria en matraces de 50 ml con caldo nutritivo a 37°C a 160 rpm durante 5 días o hasta obtener la biomasa suficiente para su posterior trabajo. Las bacterias obtenidas se rescataron en tubos eppendorf y se lavaron por centrifugación con agua desionizada estéril. Posteriormente se realizó la ruptura mecánica de la pared por sonicación, la extracción genómica y lavado con buffer siguiendo las indicaciones de kit de extracción genómica; Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit. El genoma obtenido se almacena en refrigeración hasta su uso.

Después de la extracción, se determinó su concentración y se verificó la pureza del genoma con el equipo Quant-iT además de verificar la calidad del genoma mediante electroforesis para posteriormente realizar la amplificación de la secuencia correspondiente a al gen de la subunidad ribosomal 16s mediante PCR. Se prepara el Mix

PCR correspondiente para llevar a cabo la amplificación, el cual para un volumen final de 50 µl consistió en: 10 µl de Buffer 5x (adicionado con MgCl), 1 µl de dNTPs, 2.5 µl de forward primers (27f), 2.5 µl reverse primers (1492r), alrededor de 18 ng del DNAg obtenido, 0.5 µl de la phusion DNA polimerasa y aforar a 50 µl con agua. Una vez preparado el Mix, se colocó dentro del equipo para su amplificación, las condiciones para la PCR fueron de 30 ciclos con; 1 min a 98°C, 10s a 98°C, 10s a 55°C, 45s a 72°C y 5 min a 72°C. Posterior a la secuenciación se determinó la pureza y concentración de la secuencia amplificada, así mismo se tomó una muestra de alrededor de 10 ng y se realizó la confirmación y calidad de la secuencia obtenida por la observación de la banda característica mediante electroforesis. Una vez determinado esto, se prosiguió con la purificación de la secuencia; primero por electroforesis y recortado de la banda del gel de agarosa, se disolvió y recupero por cromatografías y centrifugación de acuerdo con el protocolo del kit de purificación genómica para secuenciación. La solución con la secuencia amplificada y purificada se almaceno en congelación hasta su uso y posterior secuenciación.

Para la identificación del género y especie, el gen purificado se secuenció por el método de Sanger por electroforesis capilar, de las que resultaron secuencias correspondientes al forward y reverse y con ayuda de los electroferogramas se obtuvo una secuencia consenso, posteriormente se realizó un alineamiento de la secuencia en NCBI para su identificación, así mismo realizó un árbol filogenético con las funciones de Clustal omega, PhyML + SMS y Newick display que arroja NGphylogeny.fr y modificado en Fig Tree v1.4.4. con las especies con porcentajes más cercanos, intermedios y lejanos.

4.4 Producción de quitinasas

4.4.1 Crecimiento y cinética enzimática

Los microorganismos con índices de potencial de degradación (IP) significativo se cultivaron por fermentación sumergida en matraces con MM-Q adicionado con 0.5% de extracto de levadura para evaluar el aumento diario de la actividad enzimática en un

periodo de 7 días. Además de evidenciar y verificar el potencial de los microorganismos seleccionados para producir quitinasas más que de forma cualitativa, se pudo determinar el microorganismo óptimo para la producción de quitinasas y su posterior purificación enzimática.

Para la estandarización de inóculos bacterianos en el caso de las actinobacterias, se sembraron por en matraces con 75ml de caldo nutritivo durante 3 días en agitación y de esta forma partir con bacterias en crecimiento. Se lavaron las bacterias mediante centrifugación y se resuspendieron en 30 ml de agua destilada esteril y tween 80 al 0.05%, la absorbancia se ajustó a un valor de 0.25 a una longitud de onda de 650nm (equivalente a 3×10^8 UFC).

Se tomaron 10 ml de cada inóculo bacteriano y se sembraron por triplicado en matraces de 250 ml con 110 ml de medio de cultivo MM-Q adicionado con 0.5% de extracto de levadura ajustado a un pH de 6, se incubaron a 30°C a 170 rpm durante 7 días, de cada matraz en condiciones de esterilidad se tomaron muestras de 1ml en tubos eppendorf estériles por cada día a la misma hora durante el periodo de la fermentación y con ellas medir la actividad enzimática, el tiempo cero del día cero también se tomó en cuenta. La actividad enzimática de las quitinasas se determinó espectrofotométricamente, según el método de Miller³⁹, con ácido 3',5'-dinitrosalicílico (DNS) gracias a la reacción colorimétrica con azúcares reductores liberados (GlcNAc) por la degradación de la quitina coloidal suspendida en buffer de acetato de 50 mM pH 5. Para la reacción se tomaron 300µL de enzima cruda en 900µL de buffer de acetatos (50 mM a pH 5) y 100µg de quitina coloidal dentro de tubos eppendorf, como blanco se preparó un tubo adicional con las proporciones anteriores, pero con la inactivación de las enzimas por desnaturalización a 100°C, justamente para tener de referencia los azúcares reductores que estuvieran presentes ya en el medio de cultivo y de esta manera restarlos a los valores obtenidos después de la reacción enzimática. Los tubos preparados se incubaron a 50°C durante 40 minutos, pasado el tiempo de reacción, las enzimas se desnaturalizaron hirviendo a 100°C. Los tubos resultantes se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos y del sobrenadante se tomaron 200µL para reaccionar en tubos nuevos con 200µL del reactivo DNS, se hirvió durante 5 min e inmediatamente se colocó en hielo, una vez bajara la temperatura los tubos

se aforaron a 1,5 ml con agua desionizada y se midió absorbancia a 540 nm. Los valores obtenidos para cada muestra se extrapolaron de acuerdo a la curva de calibración preparada y se calculó la cantidad de azúcares reductores liberados de acuerdo con la curva de calibración del monómero (GlcNAc). Una unidad de actividad de quitinasa se definió como la cantidad que produce 1µmol de azúcar reductor (GlcNAc) por minuto utilizando la cantidad de enzima descrita.

La curva de calibración para el azúcar reductor N-acetilglucosamina (GlcNAc) se preparó según las siguientes especificaciones; se preparó en matraz de aforación una solución madre con 1 gr de N-acetilglucosamina disuelta en 100 ml de agua HPLC para obtener una concentración de 10 mg/ml, a partir de esta se prepararon los estándares para la curva en 10 tubos eppendorf diluyendo la concentración inicial de 10 mg/ml - 1 mg/ml y un tubo solamente con agua HPLC como blanco. Los estándares se prepararon por triplicado con un total de 33 tubos eppendorf. Posteriormente de cada estándar en un tubo nuevo se colocaron 200 µL y 200 µL del reactivo DNS, se calentaron a 100°C para reaccionar durante 5 min e inmediatamente se colocaron en hielo hasta enfriar, se aforo a 2ml cada tubo y se midió absorbancia a 540 nm, el tubo que no tenía N-acetilglucosamina fue el blanco. Los valores se graficaron y se determinó la ecuación de la recta para poder cuantificar azúcares reductores en soluciones problema como de las reacciones resultantes de la actividad enzimática (apéndice 1).

4.4.2 Evaluación de fuentes de carbono alternas para la producción de quitinasas

Se utilizaron fuentes de carbono alternas distintas a la quitina de camarón para producir quitinasas y evaluar mediante cinética enzimática su actividad. Se evaluaron medios de cultivo con quitina de *Aspergillus sp.* y quitina de *Agaricus bisporus* preparadas según la metodología del punto 4.6.1 y 4.6.2. Una vez determinado el porcentaje de humedad con varias muestras de las pastas de quitina obtenida, se calcularon los gramos de cada muestra en peso seco para preparar los medios de cultivo con el porcentaje específico en de quitina como única fuente de carbono. Primeramente, se evaluó el desarrollo en medio sólido, para determinar que las bacterias pudieran crecer y aprovechar la quitina fúngica antes de

realizar la cinética enzimática. Se sembraron las 3 bacterias con mayor índice de potencial de degradación IP en placas con tres tipos de medio de cultivo alternos, medio MM-Q adicionado con extracto de levadura y quitina de *Aspergillus sp.* tratada con ácido sulfúrico, sin ácido sulfúrico y otro con quitina de *A. bisporus*, las placas se incubaron durante 3 días a 34°C.

Una vez observado el desarrollo de las bacterias en los diferentes medios de cultivo y los halos de decoloración atribuidos a la hidrólisis de la quitina correspondiente, se prosiguió con la cinética enzimática por fermentación sumergida en cada medio de cultivo distinto. Se sembraron 10 ml de cada inóculo en matraces de 250 ml con 110 ml de medio de cultivo MM-Q con cada tipo de quitina distinta ajustado a un pH de 6, se incubaron a 30°C a 170 rpm por un periodo de 7 días, durante el transcurso de la fermentación se tomaron muestras de 1 ml cada día a la misma hora y se midió actividad enzimática por el método de azúcares reductores con ácido 3',5'-dinitrosalicílico (DNS) bajo las mismas condiciones y curva de calibración del azúcar reductor GlcNAc descritas en el punto 4.4.1.

4.4.3 Extracción y purificación de quitinasas

El microorganismo seleccionado se cultivó por fermentación sumergida en matraces de 125ml con 50 ml de caldo MM-Q adicionado con 0.5% de extracto de levadura y se incubaron a 37°C en agitación de 170 rpm durante cuatro días. Posteriormente se mezclaron los matraces cultivados para recuperar el medio soluble en el cual se incluían las enzimas crudas, se centrifugaron en tubos falcón limpios por 1 hora a 4000 rpm para separar las células y restos de mayor tamaño. Se determinó el volumen total del sobrenadante crudo recuperado.

Se realizó la precipitación de las proteínas en el medio crudo siguiendo las siguientes especificaciones; por cada 100 ml del extracto se adicionó 45 g de sulfato de amonio para su saturación al 70%, lentamente se fue adicionando el sulfato de amonio en agitación hasta disolverlo en el medio, después de disolver se mantuvo la agitación lenta durante 2 horas hasta completar la precipitación de las proteínas. Posteriormente de todo el medio se recuperó el precipitado formado en tubos falcón de 50 ml mediante centrifugación a

4000 rpm por 40 min, todo el precipitado fue recolectado y concentrado en un solo tubo para posteriormente ser resuspendió en un volumen mínimo con buffer de acetatos (50 Mm pH 5).

El precipitado en el buffer se depositó dentro de una membrana (8000 D) para eliminar los residuos de sales y moléculas pequeñas, la membrana se colocó sumergida dentro de un vaso con 300 ml del mismo buffer con remplazo de al menos dos veces durante 12 horas para optimizar la diálisis. La solución con las proteínas se mezcló y se centrifugo en tubos eppendorf limpios a 10000 rpm durante 15 minutos para eliminar el material insoluble. De ser necesario el pH de la solución resultante, se ajustó a 6 para introducirlo en la columna de cromatografía.

Terminada la diálisis, las enzimas se sometieron a separación por cromatografía de intercambio iónico en columna, empacada con CM Sheparosa con un volumen total de 25 ml (17 x 1.5cm), se lavó la columna con un volumen de columna VC (25ml) con agua esteril para eliminar los residuos de etanol que dejo la matriz como fase estacionaria, posteriormente la columna se equilibró adicionando 3 VC de buffer de acetatos (50mM pH 6). La muestra a separar, previamente se ajustada en concentraciones menores a 50mg/ml de proteína medidas por el método de Bradford, con la respectiva elaboración de una cuerva de calibración (apéndice 2) y un pH de 6, se colocó lentamente por las paredes de la columna al ras del adsorbente sin perturbarlo, posteriormente se corrió la muestra adicionando 2 VC de buffer de acetatos para que las proteínas con afinidad se retengan en la matriz y las que no se eliminen, la total liberación de las proteínas sin afinidad se comprobó mediante lectura de absorbancia a 280nm hasta obtener valores de lectura menores a 0.010. Para llevar a cabo la elución de las proteínas retenidas, se adicionó 4 VC con buffer de elución con un gradiente de 0 – 0.05 M de NaCl e ir lavando las proteínas de acuerdo con los cambios en su fuerza iónica, se recuperaron en fracciones de 3 ml en un caudal de 40ml/h. Finalmente, para lavar la columna se adicionó 2 VC de solución salina NaCl al 2 M y de esta manera eluyir las proteínas remanentes. Para su almacenamiento se lavó con 3 VC de NaOH 1M seguido de 3 VC con NaCl 2M y 2 VC con agua destilada diluido con etanol al 20%. Terminada la cromatografía, se determinó por absorbancia a 280nm y actividad enzimática las fracciones con mayor cantidad de

quitinas, se mezclaron y de ser el caso se concentraron por liofilización para la siguiente etapa de purificación.

Las muestras obtenidas se resuspendieron en 2 ml de buffer y se colocaron dentro de la columna cromatográfica para purificarlas por exclusión por tamaño empaquetada con Shephadex G-75 con un volumen total de 27ml (18 x 1.5 cm). La columna se equilibró con 2 VC de buffer de acetatos (50 mM pH 6), se colocó la muestra al ras del adsorbente sin perturbarlo y se eluyó con 3 VC de buffer, se recuperaron fracciones de 2ml en un caudal de _ ml/h. finalmente la columna se lavó con 2 VC de solución salina NaCl 2M y 2 VC de agua. Terminada la cromatografía, se determinó por absorbancia a 280nm y actividad enzimática las fracciones con mayor cantidad de quitinas, se mezclaron y de ser el caso se concentraron por liofilización para la siguiente etapa de purificación

Todo paso de purificación a partir de la obtención del extracto crudo hasta las cromatografías se llevó a cabo a 4°C, se trabajó con soluciones y reactivos estériles filtrados con filtros de 0.45 µm para el uso en cromatografías y se cuantificaron proteínas por el método de Bradford (Apéndice 2).

4.5 Evaluación de hidrólisis enzimática de quitina de hongos filamentosos

4.6.1 Obtención de micelio

La extracción de quitina partió de la biomasa de hifas de los hongos *Agaricus bisporus* y *Aspergillus*. La biomasa de *Agaricus bisporus* o champiñón común, se adquirió de marcas comerciales en supermercados, por otro lado, *Aspergillus* se cultivó a partir de una cepa proporcionada por el laboratorio de biotecnología de la facultad. Para la producción de biomasa de *Aspergillus* se siguieron las siguientes indicaciones; la cepa se resembró en medio sólido PDA en placas hasta su esporulación, posteriormente se tomaron esporas con el asa estéril y se cultivó por fermentación sumergida en 200 ml de caldo Dextrosa Sabouraud en matraces de 500ml durante 5 días a 37°C con 170 rpm, pasado el tiempo de incubación, se rescató el micelio formado en pelotitas de cada matras y se lavó por

filtración con bomba de vacío sobre papel filtro Wathman 1° con agua desionizada, se pesó y se determinó el porcentaje de humedad.

4.6.2 Extracción de quitina

Para los champiñones se siguió la metodología previamente descrita en investigaciones anteriores con diferentes porcentajes de peróxido de hidrógeno H_2O_2 ⁴⁰, las setas fueron secadas y licuadas antes de iniciar con el tratamiento. La metodología para la extracción de quitina en *A. bisporus* se realizó bajo las mismas instrucciones referenciadas las cuales describen que; por cada 10 g de muestra fúngica, en un frasco con taparosca se adicionaron 100 ml de peróxido de hidrógeno al 30% y se calentó a temperatura controlada de 80°C en baño maría durante una hora y observar el blanqueamiento de la biomasa, acabada la reacción la solución se dejó reposar durante un día para que precipitara la biomasa en el fondo y poder eliminar el sobrenadante por decantación, a la masa obtenida se le realizaron lavados por centrifugación a 4000 rpm durante 25 min., hasta obtener pH cercano a 7, la quitina obtenida se pesó y se determinó el porcentaje de humedad, también se caracterizó mediante espectroscopía de infrarrojo FT-IR, difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido.

Para el hongo filamentoso *Aspergillus sp.* una vez lavado el micelio y triturado, se evaluó el tratamiento para la extracción de quitina con tres pruebas distintas, una consistía en seguir la misma metodología descrita para *Agaricus*; por cada 10 g de muestra de micelio, en un frasco se reaccionó con solo 100 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % durante una hora, en otra prueba además de adicionar 100 ml de peróxido de hidrógeno y pasada una hora de reacción, se adicionó 1% del volumen total de ácido clorhídrico concentrado y se dejó una hora extra en agitación a 80°C, y en la última prueba también se dejó pasar una hora con solo peróxido de hidrógeno pero se adicionó 2% de ácido clorhídrico y se dejó en agitación por una hora más a 80°C. Terminadas las reacciones, se dejaron reposar durante un día para que precipitara la quitina en el fondo y poder eliminar el sobrenadante por decantación, se recuperó la quitina con la menor cantidad de líquido y se realizaron 6 lavados por centrifugación con agua desionizada a 4000 rpm durante 25

min o hasta obtener pH neutro, la pasta obtenida en cada caso se le determinó el rendimiento en pesos seco y finalmente se evaluó por espectrofotometría de infrarrojo FT-IR, difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido.

El rendimiento de quitina obtenida se determinó por peso seco para *Aspergillus sp.* y *Agaricus bisporus* gracias a que antes y después de cada tratamiento se determinó el peso total y de igual manera el porcentaje de humedad. Para determinar el porcentaje de humedad de las muestras de micelio o quitina, primeramente, se tomaron pizcas de las muestras de micelio o quitina de *Aspergillus* y de los champiñones antes y después del tratamiento, y se sometieron a temperatura de 65°C para su deshidratación, la pérdida del peso se fue registrando cada 20 min hasta observar peso constante. Una vez obtenido el porcentaje de humedad para los micelios antes y de la quitina después del tratamiento, y en base al peso total se calculó el rendimiento en peso seco de la quitina obtenida en cada caso.

4.6.3 Hidrólisis enzimática.

Las enzimas resultantes y semi purificadas se diluyeron en buffer de acetatos y se efectuaron para degradar tres tipos de quitina distintos; quitina de camarón comercial, quitina de *Aspergillus* y quitina de champiñones (*A. bisporus*). La reacción se llevó a cabo en vasos de precipitado de 50 ml con 5 ml de buffer, 500 mg de quitina coloidal y 1 ml de enzimas quitinasas concentradas (U 0.5), se incubaron durante 24h a 40°C en agitación de 150 rpm. Una vez terminada la reacción enzimática, se tomaron muestras del producto en rejillas para su observación por microscopía electrónica de barrido (SEM).

4.6 Aplicación. Actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*

Se probó la actividad antifúngica contra el hongo patógeno *Candida albicans* de las enzimas quitinasas semi purificadas de la actinobacteria mediante la técnica por gota a partir de un concentrado de enzimas liofilizadas 26 mg/ml y sus diluciones 1:10 y 1:100

del concentrado inicial. En principio el patógeno se cultivó por punto con un palillo esteril en un tubo de 50 ml con 5 ml de caldo YPD durante 24h a 37°C 150rpm, posteriormente se contabilizo en cámara de Neubauer para determinar la concentración de células por ml. Se inocularon 2×10^6 células en 4 tubos eppendorf con 100 μ L de caldo YPD, el primer tubo fue el control negativo donde solo se adicionó 10 μ L de buffer, al segundo tubo se le adicionó 10 μ L de la solución enzimática concentrada (26 mg/ml), en el tercer tubo y cuarto tubo eppendorf se adicionó 10 μ L de la dilución 1:10 y 1:100 del concentrado enzimático respectivamente. Los tubos se inocularon por 24h a 37°C en agitación a 150rpm.

Pasado el tiempo de incubación cada condición se diluyo con agua esteril hasta obtener la dilución 1×10^{-3} . Se inocularon 10 μ L en orden de todas las diluciones de las cuatro condiciones sobre placas YPD y se incubó a 37°C por 24h para observar su inhibición.

4.7 Microscopía

Para la microscopía ópticas se utilizaron microscopios de campo claro y toda nuestra fue colocada y fijada en portaobjetos, de ser el caso se cubrió con cubreobjetos y se realizaron tinciones para contrastar o definir alguna estructura o características especifica.

Para la microscopía electrónica de barrido se prepararon las muestras previamente diluidas sin restos de contaminación y se fijaron en laminillas de silicio, previo a su observación, las muestras de quitina se observaron bajo microscopía confocal invertida para asegurar la correcta fijación de las muestras, posteriormente las muestras se cubrieron superficialmente con polvo de oro y se observaron al SEM.

4.8 Difracción de rayos X

Las muestras se liofilizaron y trituraron hasta obtener un polvo fino, este se colocó dentro de las rejillas correspondientes de forma aleatoria para su lectura en el equipo con

ánodo metálico de cobre, se leyó su difracción de grados 2θ en un rango de $5-40^\circ$ con un voltaje de operación de 45kV y un orden de longitud de onda de 40 mA.

El índice de cristalinidad CrI para la quitina se determinó de acuerdo con la ecuación 2.

$$CrI\ 110 = \left[\frac{I_{110} - I_{am}}{I_{101}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Donde I_{110} es la intensidad máxima del plano cristalino 110 aproximadamente en el valor 2θ de 20° y I_{am} es la intensidad de la difracción amorfa a 2θ de 16° .

4.9 FT-IR

Preferentemente las muestras se trataron dentro del equipo liofilizadas o lo más secas posibles para evitar interferencias de humedad o liquido retenido.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Microorganismos productores de quitinasas

5.1.1 Muestreo

Se aislaron los microorganismos quitinolíticos correspondientes a cada una de las muestras recolectadas, como se muestra en la figura 5, las imágenes que se observan fueron tomadas de las regiones de cada muestra correspondiente, así como una vista al medio y ubicación circundante donde fueron recolectadas; Cerro de la Silla en Monterrey y Cerro Agujerado en Juárez Nuevo León.

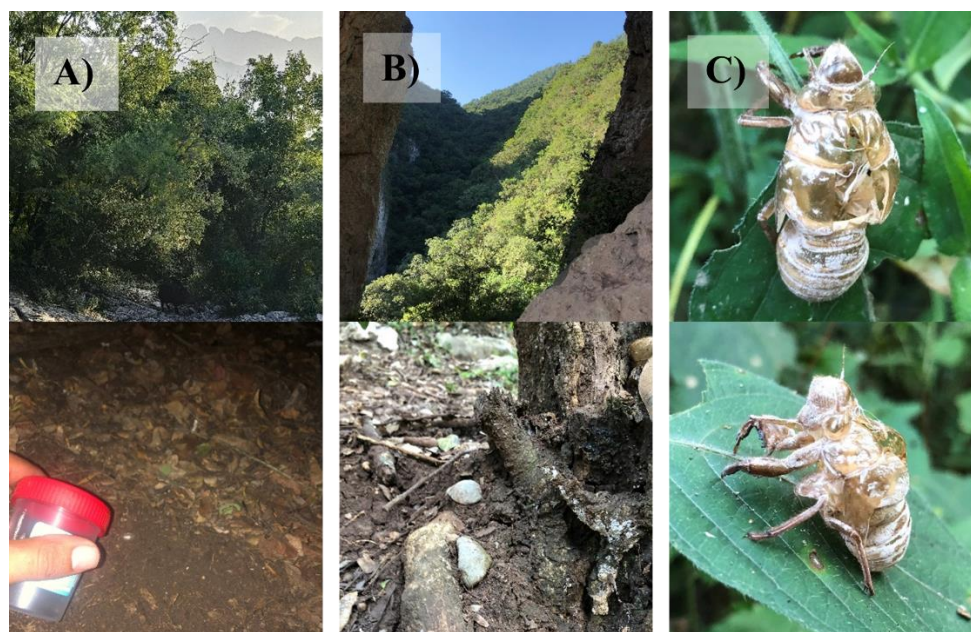


Figura 5. Toma de muestras. A) y B) vistas del panorama y suelo donde se tomó la muestra en el Cerro de la Silla y Cerro Agujerado respectivamente, C) Exuvias de cigarras (*Quesada sp.*)

5.1.2 Aislamiento de microorganismos quitinolíticos

Gracias a las diluciones de las muestras y la siembra en placa MM-Q se lograron observar las colonias aisladas de los microorganismos quitinolíticos (figura 6 y 7). Se reportaron por cada muestra las colonias de microorganismos entre hongos y bacterias diferentes en UFC (Tabla 1).

Tabla 1. UFC de cada dilución sembradas en medio MMQ

<i>Inóculos de 200μL</i>	Directo de la solución	Tubo 1 (x10 ⁻¹)	Tubo 2 (x10 ⁻²)	Tubo 3 (x10 ⁻³)	Tubo 4 (x10 ⁻⁴)
Cerro Agujerado	132	61	18	3	0
Cerro de la Silla	~200	155	52	11	1
Exoesqueleto	<300*	<300*	<300*	~250*	

Se aislaron alrededor de 200 microorganismos quitinolíticos con fenotipos diferentes de las dos muestras de tierra recolectadas en el estado de Nuevo León, destacando gran número de bacterias y hongos de la muestra del “Cerro de la silla” ya que presentó mayor cantidad y variabilidad de UFC con fenotipos distintos como se muestra en la figura 6.

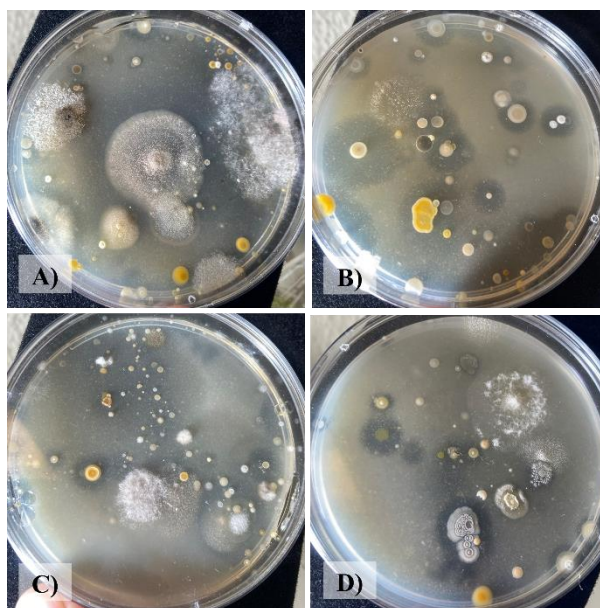


Figura 6. Aislamiento de microorganismos por dilución y siembra en placa. De izquierda a derecha dilución 10⁻¹ y 10⁻². A) - B) microorganismos del Cerro de la Silla y C) - D) del Cerro Agujerado.

Por otro lado, del exoesqueleto del insecto *Quesada sp.* o conocida comúnmente como chicharra, a pesar de la gran cantidad de bacterias en el medio de aislamiento, se observaron colonias bacterianas con un mismo morfotipo, pero por microscopía se encontró una asociación de diversas bacterias, de las cuales se lograron obtener al menos tres colonias axénicas distintas con morfologías en cocos y bacilos como se muestra en la figura 7.

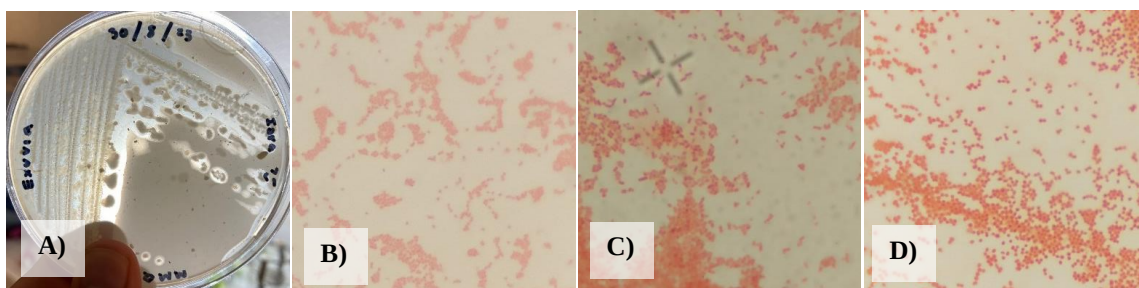


Figura 7. Bacterias del exoesqueleto de chicharras (*Quesada sp.*). A) Estría cruzada de las bacterias, B) - D) algunas de las bacterias aisladas con morfología de cocos y bacilos, vistas en aumento 100x.

5.1.3 Primera selección de microorganismos

Fueron seleccionadas las colonias de microorganismos que produjeron una zona mayor de aclaramiento por la hidrólisis de la quitina en los medios de aislamiento con quitina coloidal después del séptimo día de incubación. Un total de 7 bacterias y 3 hongos fueron seleccionados, dentro de las cepas bacterianas, 3 se tomaron de las placas de la muestra del cerro de la silla, otras 3 del cerro agujerado y una del exoesqueleto de las chicharras. Los hongos se seleccionaron de las muestras del Cerro de la Silla y del Cerro Agujerado con mayor halo de degradación visible. Sus características macroscópicas y microscópicas se describen a continuación.

Tabla 2. Características coloniales de las bacterias seleccionadas

Bac	Tamaño	Superficie	Elevación	Borde	Color	Consistencia
1	Mediano	Rugosa	Convexa	Arrizado	Amarillo	Rugosa
2	Pequeño	Lisa	Plana	Entero	Blanco	Mucoide

3	Grande	Rugosa	Pulvinada	Ondulado	Gris	Rugosa
4	Grande	Rugosa	Elevada	Entero	Rosa	Compacta
5	Mediano	Rugosa	Convexa	Lobulado	Gris oscuro	Mucoide
6	Pequeño	Lisa	Plana	Entero	Transparente	Mucoide
7	Mediano	Lisa	Convexa	Entero	Blanco	Compacta

Las bacterias seleccionadas denominadas Bac 1-7, presentaban pigmentaciones en la colonia como colores opacos, crema y rosados, algunas otras liberaban pigmentación al medio como fue el caso de la bacteria 1,3,5 y 7, desde colores marrones, amarillos y oscuros.

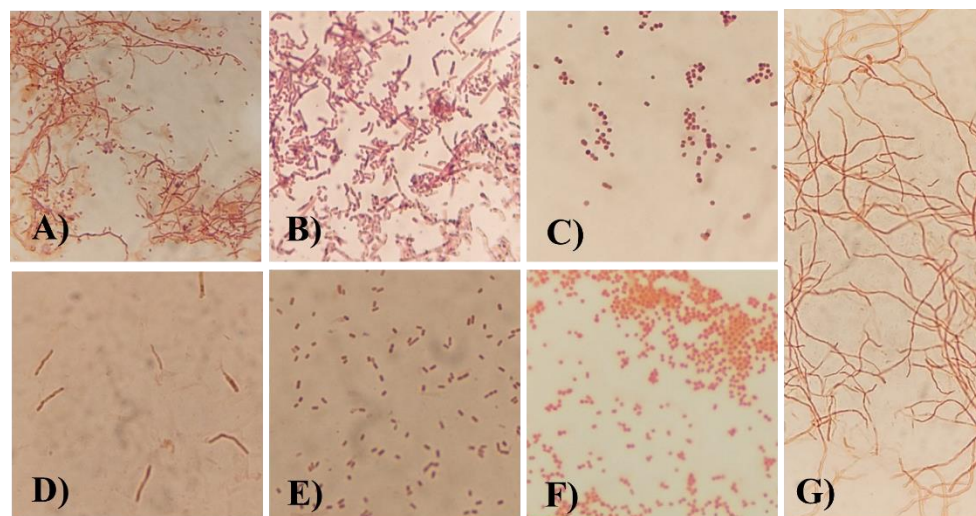


Figura 8. Tinción Gram de las 7 Bacterias seleccionadas. En orden de la A)-G) Bac 1 a la 7, observadas por microscopia óptica aumento del objetivo 100x.

Las bacterias seleccionadas se observaron por microscopía por tinción simple y tinción de Gram (Figura 8). Además de determinar su clasificación Gram, se determinó su morfología celular, entre cocos y bacilos, pero destacaron la bacteria 1,4 y 7, con morfologías filamentosas, figura 8 A), D) y G), esta morfología es característica taxonómica del filo de las actinobacterias.

5.1.4 Segunda selección por potencial de degradación.

El Índice de Potencial de degradación IP se obtuvo para cada microorganismo (figura 9) de acuerdo con su fórmula. Las bacterias 1,3 y 7 fueron las que resultaron con mayores valores, las cuales fueron seleccionadas como microorganismos potenciales para la producción de quitinasas y evidenciar su actividad quitinolítica.

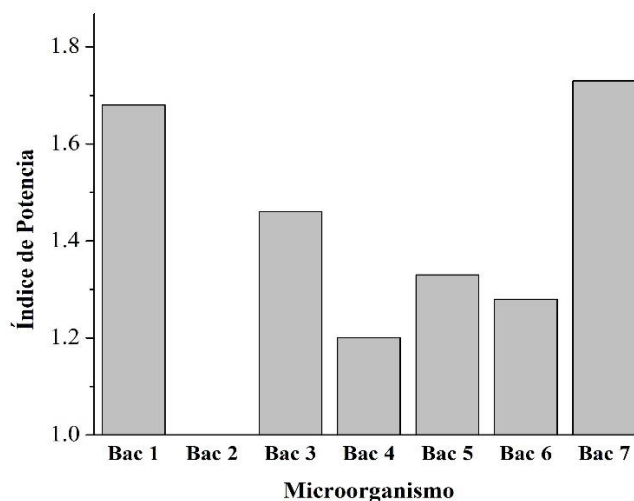


Figura 9. IP de las 7 bacterias seleccionadas.

5.1.4 Crecimiento y evaluación en medio LB y Agar nutritivo

Se determinó ambos medios de cultivo, Lb y Agar nutritivo como medios enriquecidos para el crecimiento de las bacterias seleccionadas, ya que en ambos se presentó desarrollo con ligeras distinciones para las tres bacterias (Bac 1, Bac 3 y Bac 7). En ambos medios de cultivo, las bacterias seleccionadas presentaron en su mayoría similitudes de crecimiento y características al comparar su desarrollo en medio LB y agar nutritivo. Como se muestra en la figura 10, ambas bacterias tuvieron un ligero aumento de crecimiento en agar nutritivo y la bacteria 7 libero pigmentación con coloración café oscura que no se observó en el medio LB.

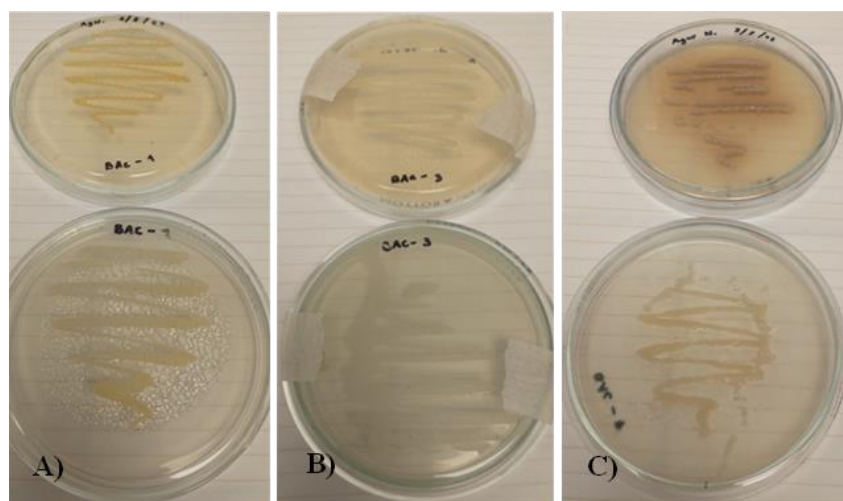


Figura 10. Crecimiento de las 3 bacterias seleccionadas en medio enriquecido. Las placas superiores son medio agar nutritivo y las inferiores medio solido LB. A) crecimiento de la Bac 1, B) crecimiento de Bac 3 y D) crecimiento de Bac 7.

5.2 Expresión enzimática

5.2.1 Cinética enzimática

Al determinar el aumento en la cantidad de enzimas producidas en cultivos por fermentación sumergida durante un periodo de 7 días mediante la lectura de actividad enzimática como se muestra en la figura 11, se encontró que la bacteria aislada del cerro de la silla (Bac 7) tenía mayor actividad enzimática que la bacteria seleccionada del cerro agujerado (Bac 1).

Tabla 3. Actividad de quitinasas Bac 7

<i>Día</i>	<i>GlcNAc producida (mg/ml)</i>	<i>Actividad enzimática (U)</i>
0	-	-
1	-	-
2	0.1327	0.0149

3	0.1732	0.0195
4	0.3640	0.0411
5	0.2625	0.0296
6	0.3559	0.0402
7	0.3721	0.0420

Tabla 4. Actividad de quitinasas Bac 1

<i>Día</i>	<i>GlcNAc producida</i> <i>(mg/ml)</i>	<i>Actividad enzimática</i> <i>(U)</i>
0	-	-
1	-	-
2	0.1327	0.0149
3	0.1286	0.0145
4	0.1651	0.0186
5	0.2057	0.0232
6	0.3153	0.0356
8	0.3559	0.0402

Ya que ambas bacterias se cultivaron bajo las mismas condiciones, se puede definir que, si bien la actividad enzimática máxima no es tan variable entre ellas, el tiempo en la producción enzimática si lo fue, la bacteria 7 empezó a elevar sus unidades de actividad enzimática a partir del tercer día de la fermentación. La cinética enzimática se reporta para su entendimiento en la siguiente grafica.

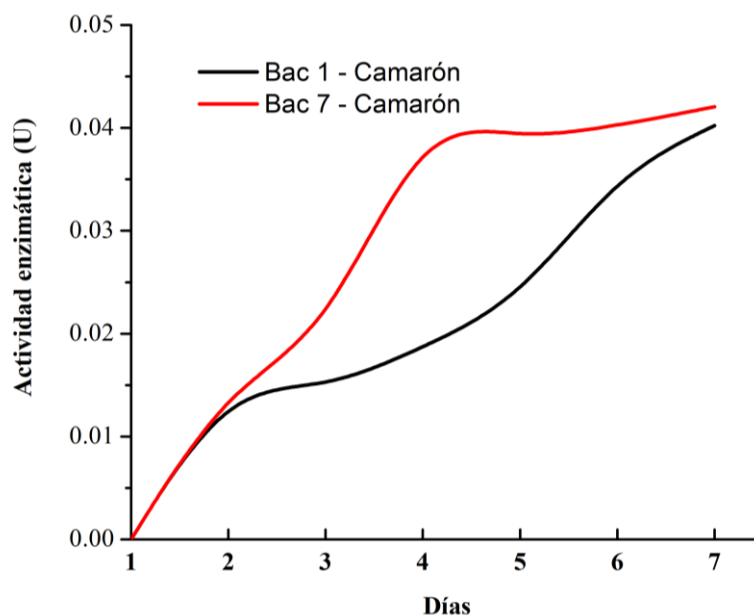


Figura 11. Grafica de cinética enzimática de las actinobacterias 1 y 7. Representa la actividad enzimática U a lo largo del tiempo en un periodo de 7 días.

5.2.2 Producción de enzimas en medios de cultivo con quitina fúngica

A partir de los resultados obtenidos en la sección 4.4.2 y al probar la quitina extraída de *Agaricus bisporus* y *Aspergillus sp.* como fuente de carbono en los medios de cultivo de microorganismos quitinolíticos, se encontró que las bacterias aisladas tienen la capacidad de aprovechar la quitina de hongos como *A. bisporus* y *Aspergillus sp.* producida en el laboratorio en medio sólido, figura 12 y 13.

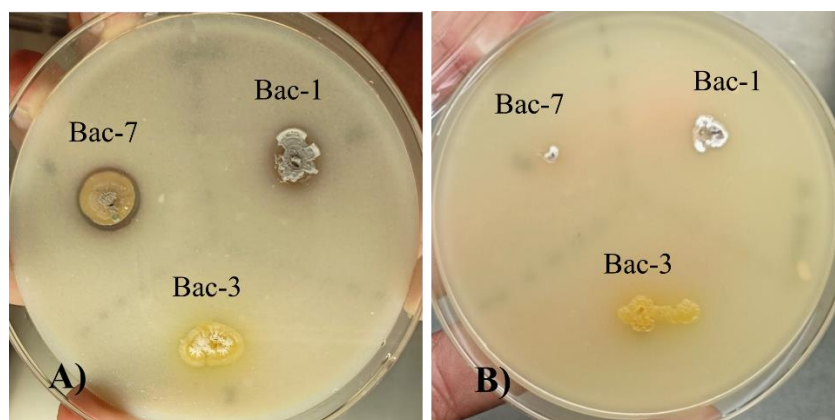


Figura 12. Bacterias quitinolíticas en medio con Champiñones como fuente de carbono. Medios de cultivo MMQ con quitina de A) Camarón como control y B) de champiñones (*A. bisporus*).

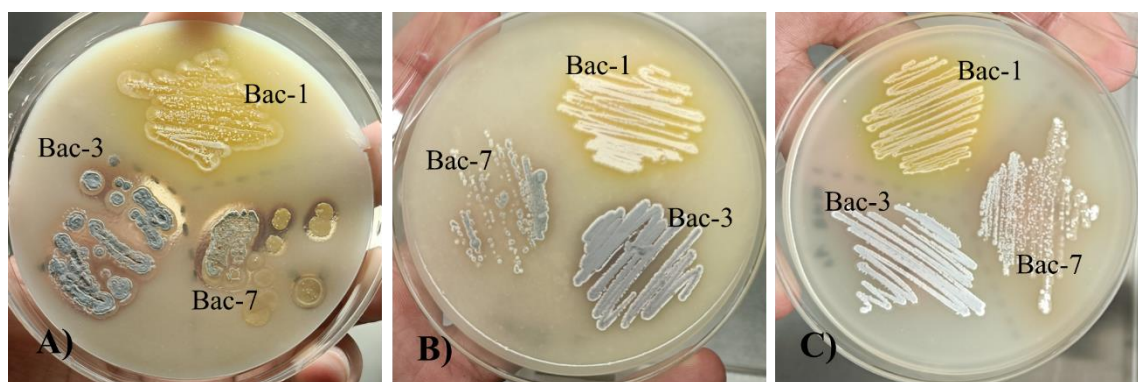


Figura 13. Bacterias quitinolíticas en medio con *Aspergillus* como fuente de carbono. A) Control con quitina de camarón, B) y C) con quitina de *Aspergillus* extraída sin y con ácido sulfúrico respectivamente.

Después de su desarrollo en medio sólido, las tres bacterias con mayor IP descritas presentaron crecimiento en los tres tipos de medio de cultivo alternos conservando sus características coloniales, pero al paso del tiempo se hizo evidente que su crecimiento era más lento y limitado en comparación con los medios con quitina de camarón, ya que como se observa en las figuras 13 A, las colonias se extendían más en el medio control. Otro distintivo que se identificó fue que las bacterias quitinolíticas cultivadas en el medio con quitina de *Aspergillus* tratada sin ácido sulfúrico (figura 13.B) presentaron esporulación.

En medio líquido la actividad enzimática a lo largo del tiempo también fue variable en comparación con los medios con quitina de camarón. Ya que después de evaluar la

actividad enzimática durante el mismo periodo y bajo las mismas condiciones que en los medios de cultivo con quitina de camarón, para las actinobacterias 1 y 7 se observaron altas y bajas en las unidades de actividad enzimática a lo largo del tiempo (figura 14) en los medios de cultivo con quitina de champiñón, dicho comportamiento posiblemente se atribuye a las etapas de adaptación que pueden llegar a tener los microorganismos al medio de cultivo y en conjunto al aprovechamiento de fuentes de carbono presentes.

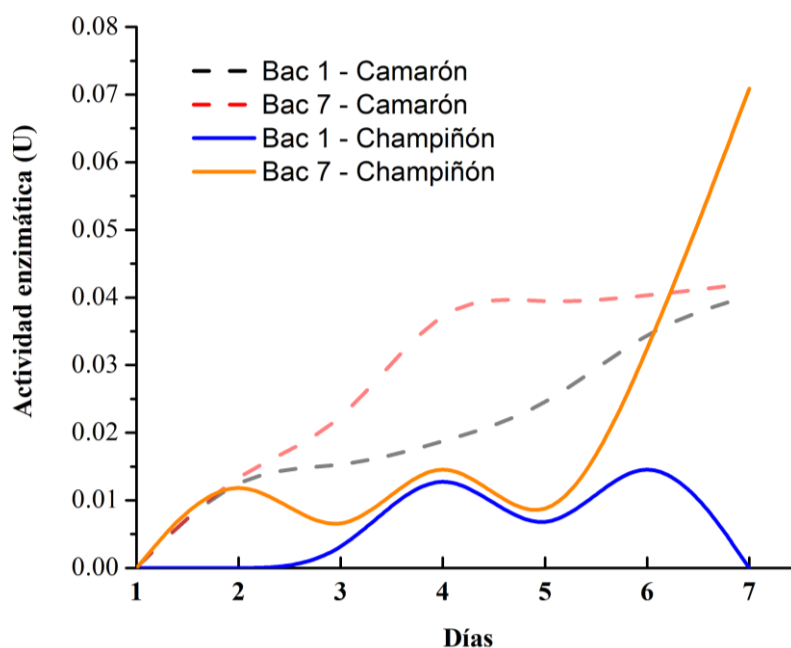


Figura 14. Grafica de cinética enzimática en medio con quitina de champiñón.

En la actividad enzimática de la actinobacteria 1 no se observó aumento exponencial durante los 7 días que duro la fermentación, pero en la actinobacteria 7 se observó un impulso de actividad después del día 5, alcanzando al séptimo día una actividad de 0.075 U sobrepasando incluso las unidades de actividad enzimática máximas de las bacterias en medio con quitina de camarón.

5.3 Identificación molecular

La bacteria con mayor actividad enzimática caracterizada en un principio por su morfología como actinobacteria (Bac 7) se identificó molecularmente del género *Streptomyces* y en propuesta de una nueva especie. Gracias a la correcta extracción del genoma (figura 15A) de la bacteria Gram positiva, por ruptura celular de forma mecánica con perlas y con ayuda del kit de extracción, se amplificó la región correspondiente al gen ribosomal 16 s mediante PCR. Como se observa la figura 15B, se logró una amplificación exitosa y la banda correspondiente se empareja al peso molecular de 1.5kpb, según los marcadores en el primer carril.

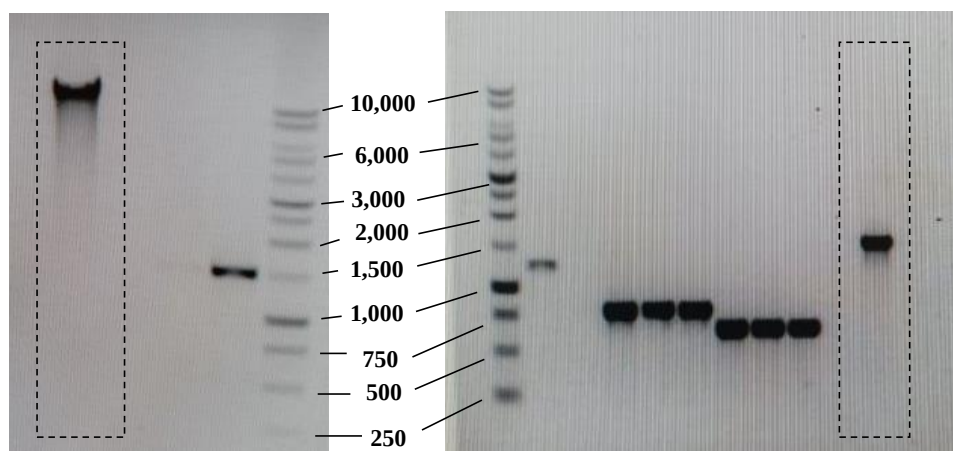


Figura 15. Electroforesis del A) genoma y B) amplificación del gen 16s, de la actinobacteria.

Después de la secuenciación, la secuencia fue analizada y recortada hasta obtener una secuencia nucleotídica consenso con un total de 1083 pb, la cual se presenta en la parte de apéndice 3

El árbol filogenético confirmó que las dos especies con mayor porcentaje de similitud según el alineamiento; *Streptomyces roseolus* y *Streptomyces filamentosus* forman parte del mismo clado, pero no se relacionan directamente con la especie descrita, siendo el ancestro común entre ellas el que se relaciona directamente con esta nueva especie (Figura

16). Las demás bacterias marcadas también obtuvieron alto porcentaje de similitud después del alineamiento; *S. cinereoruber*, *S. hirsutus*, *S. violaceorectus*, *S. rubiginosohelvolus* y *S. tanashiensis* sin embargo, como se observa en el árbol filogenético estas se diversificaron mucho antes, por lo que no tienen directa relación filogenética.

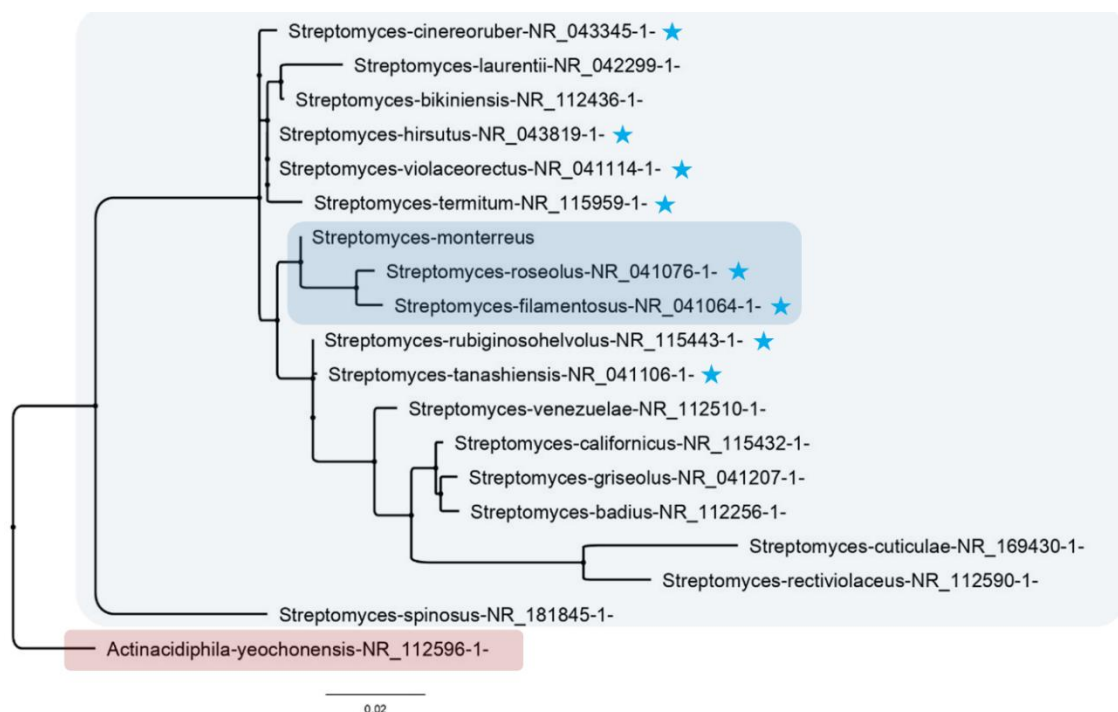


Figura 16. Árbol filogenético de la bacteria aislada y propuesta de nueva especie, denominada en este caso *Streptomyces monterreus*. Los recuadros representan un clado distinto y las estrellas las especies con porcentajes de similitud más altos según el alineamiento en NCBI.

5.3 Purificación de endoquitinasas

Las cromatografías se llevaron a cabo monitoreando las fracciones obtenidas, estimando la cantidad de proteínas por espectroscopía a 280 nm y por el método de Bradford, así mismo se midió la actividad enzimática y se reportó por unidad de actividad enzimática.

Se preparó la muestra de proteínas una vez terminada la fase de diálisis para la cromatografía en columna de intercambio iónico de acuerdo con sus especificaciones. Se

obtuvieron 24 fracciones con ayuda del gradiente de elución preparado y se graficó el cromatograma correspondiente (figura 17). Se identificaron las fracciones con actividad enzimática, pero era poco significativa a comparación de la actividad en fases anteriores. El proceso de purificación concluyó después de realizar la cromatografía, ya que la cantidad de enzimas recolectada era muy poca, como alternativa se optó por realizar la cromatografía de exclusión por tamaño posterior a la fase de diálisis y antes de la cromatografía de intercambio iónico. Se obtuvo de igual manera el cromatograma (figura 18) pero al analizar las fracciones obtenidas no se lograron identificar las fracciones con las enzimas purificadas.

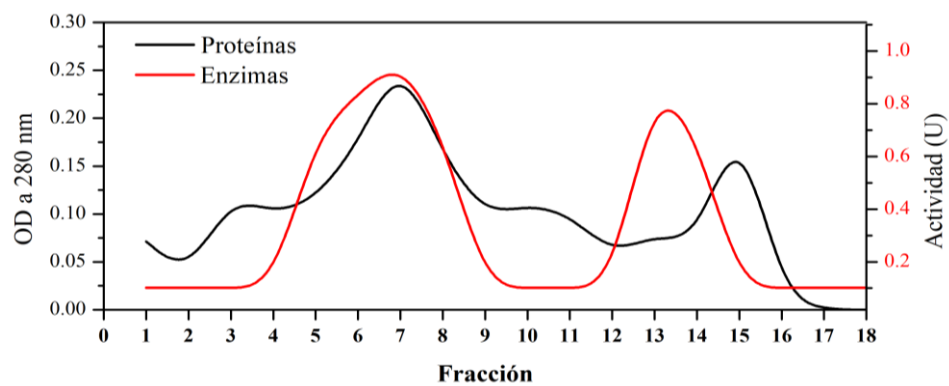


Figura 17. Cromatograma intercambio iónico

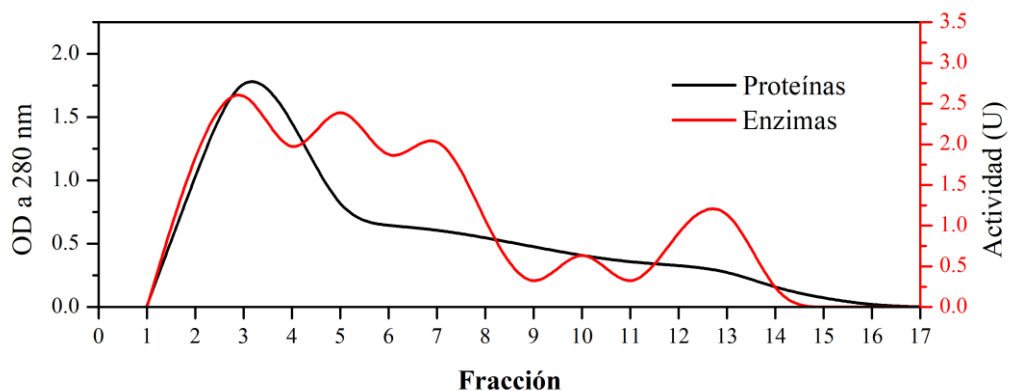


Figura 18. Cromatograma exclusión por tamaño, sin separación específica de las quitinasas.

Con los datos obtenidos y parte de la primera cromatografía de intercambio iónico se determinó el índice de purificación en cada una de las fases que se realizaron durante el proceso de purificación (tabla 5).

Tabla 5. Purificación de quitinasas

	Volumen (ml)	Proteínas (mg/ml)	Proteínas totales (mg)	Actividad [mg/ml]	Actividad [U/ml]	Actividad total U	Actividad especifica (u/mg)	Purificación	Recuperación (%)
Centrifugación	360.00	0.11	37.80	0.13	1.48	531.68	14.06	1.00	100.00
Precipitación	10.00	1.60	15.99	2.22	25.12	251.21	15.71	0.90	47.25
Diálisis	10.00	0.98	9.83	2.99	33.84	338.36	34.41	2.45	63.64
Cromatografía I. iónico	6.00	0.03	0.15	0.18	1.98	11.89	78.15	5.56	2.24

Como se observa en la tabla 5, la actividad enzimática específica fue en aumento, pero el rendimiento de recuperación de 2.24 % hasta la cromatografía de intercambio iónico, ya era muy poco.

5.4 Aplicación de quitinasas para la hidrólisis de quitina fúngica

A pesar de que las fases de purificación en cromatografía fueron ineficaces y las endoquitinasas no fueron purificadas, se evaluó de igual manera la hidrólisis de quitina con las enzimas quitinasas de forma general y semi purificadas en quitina de hongos filamentosos. En principio se obtuvo quitina de forma de dos hongos filamentosos, *Agaricus bisporus* y *Aspergillus sp.* y se utilizaron como fuente en la producción de derivados de quitina por hidrólisis enzimática.

5.4.1 Extracción de quitina *Agaricus bisporus*

Se utilizó como antecedente directo el método de extracción de quitina en champiñones de Chávez Leonardo⁴⁰, realizado previamente en nuestro laboratorio como una metodología sostenible descrita además en la sección de métodos y reactivos (4.6.2).

Al tratarse de una metodología completamente nueva, para su autenticidad la quitina obtenida se tuvo que caracterizar. Después del tratamiento en los champiñones (*Agaricus bisporus*), se obtuvo un rendimiento de producto del 18.5 % en peso seco. La pasta obtenida se esterilizó y se trató a partir de la técnica posterior para su caracterización, los resultados se mencionan a continuación y para cada técnica se hace una comparación antes y después del tratamiento de extracción.

Por microscopía óptica de campo claro las muestras se tiñeron con azul de lactofenol para facilitar la observación celular, se observó una pérdida estructural de las hifas del champiñón a masas amorfas aglomeradas después del tratamiento como se observan en las imágenes de la figura 16.A. Al definir estas estructuras con mayor resolución en microscopía electrónica de barrido, se logró observar que estas estructuras representaban la matriz de microfibrillas de la pared celular como se observa en la figura 16, B, C y D. Se observaron fibras de tamaños entre 500 y 800 nm en longitud y entre 7 y 15 nm de ancho, lo que refiere a microfibrillas y nanofibrillas.

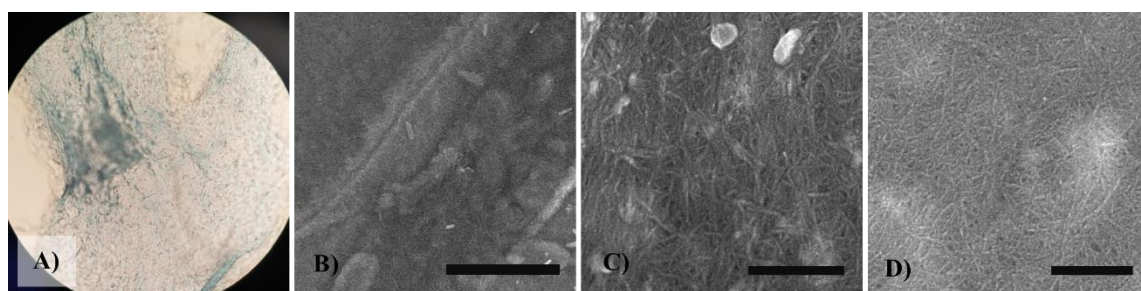


Figura 19. Microscopías de quitina de *A. bisporus*. A) Microscopía óptica de campo claro aumento 10x, y observación de microfibrillas por microscopía electrónica de barrido, la barra representa B) 3 μ m y C) y D) 500nm.

Se comprobó por espectroscopía de infrarrojo transformada de Fourier que las fibrillas observadas eran de quitina gracias a que se identificaron los grupos funcionales representativos de la molécula y su ubicación específica en cm^{-1} el espectro de infrarrojo (Figura 18).

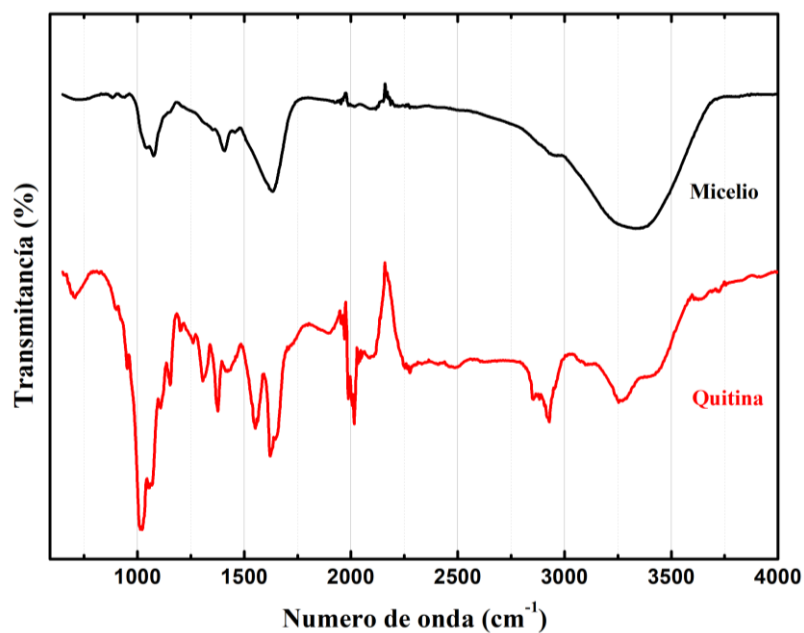


Figura 20. Espectro IR de quitina de *A. bisporus*.

Se determino de igual manera los planos cristalinos de la red en la conformación ortorrómbica de la quitina, identificando sus picos de difracción en 9.2°, 12.4°, 19.2° y 26.3° con relación a sus planos (020), (021), (110) y (130) respectivamente, figura 19. Los picos de los planos marcados en azul (020) y (110) definen el arreglo cristalino de las cadenas del polímero que corresponde al tipo α -quitina.

La quitina obtenida en este caso tuvo un índice de cristalinidad de 78.4, según la ecuación

$$CrI\ 110 = \left[\frac{195-42}{195} \right] \times 100$$

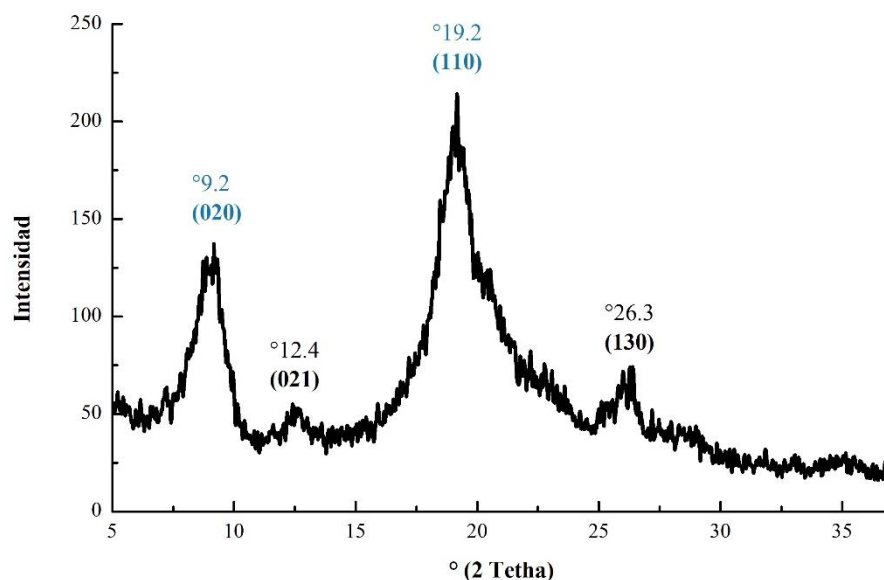


Figura 21. Difractograma de quitina de *A. bisporus*. Se marcaron de azul los 2 picos mayores derivados de los planos (020) y (110) y de negro los 2 picos menores derivados de los planos (021) y (130).

5.4.2 Extracción de quitina de *Aspergillus sp.*

La metodología de extracción de quitina anterior se probó además en el hongo como modelo *Aspergillus sp.* para ampliar la metodología a más tipos de hongos filamentosos. De acuerdo con las tres pruebas que se sometió el micelio triturado, según la metodología descrita anteriormente (4.6.2) las características antes y después de cada tratamiento fueron observadas por microscopía óptica y electrónica de barrido. Como se muestra en la figura 20, las hifas no sufrían cambios morfológicos visibles al utilizar solamente H_2O_2 , pero al adicionar las concentraciones mínimas de H_2SO_4 se lograba la destrucción celular y degradación de los componentes de la pared celular, permitiendo así obtener la matriz de microfibrillas de quitina.

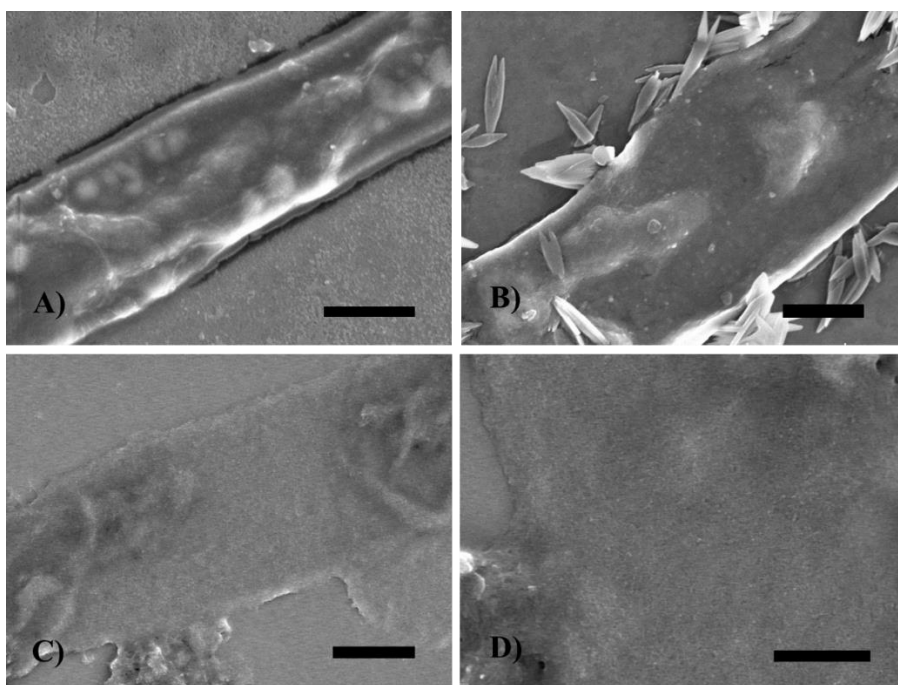


Figura 22. Microscopía electrónica de barrido de la extracción de quitina de *Aspergillus*. A) Hifa de micelio sin ningún tratamiento, barra escala de 3μm, B) después del tratamiento solamente con H₂O₂, barra escala de 3μm, C) y D) después del tratamiento con H₂O₂ + 2% de H₂SO₄, barra escala de 3μm y 800nm respectivamente.

Después de evaluar por espectroscopía de infrarrojo, el micelio tratado con solo H₂O₂ presentó bandas en la longitud de onda de 1641 cm⁻¹, 1615 cm⁻¹ y 1541 cm⁻¹ características de las amidas I y II, pero no se observaron las bandas características de los demás grupos representativos de la quitina como los alcoholes, las aminas y las amidas III, (figura 21). Por otro lado, los espectros de las fibras de quitina obtenidas con la adición de 1% y 2 % de H₂O₂ presentaron bandas alrededor de 3400 cm⁻¹, 3200 cm⁻¹, 3100 cm⁻¹, 1555 cm⁻¹, 1665 cm⁻¹, 1625 cm⁻¹, 1375 cm⁻¹, 1320 cm⁻¹ y 1154 cm⁻¹ representativos de los alcoholes, aminas, carbonilo, amida I, II y II, respectivamente (figura 21), los cuales son representativos de la molécula de la quitina. A continuación, se representa el espectro IR de cada tratamiento distinto para la extracción de quitina de micelio de *Aspergillus*.

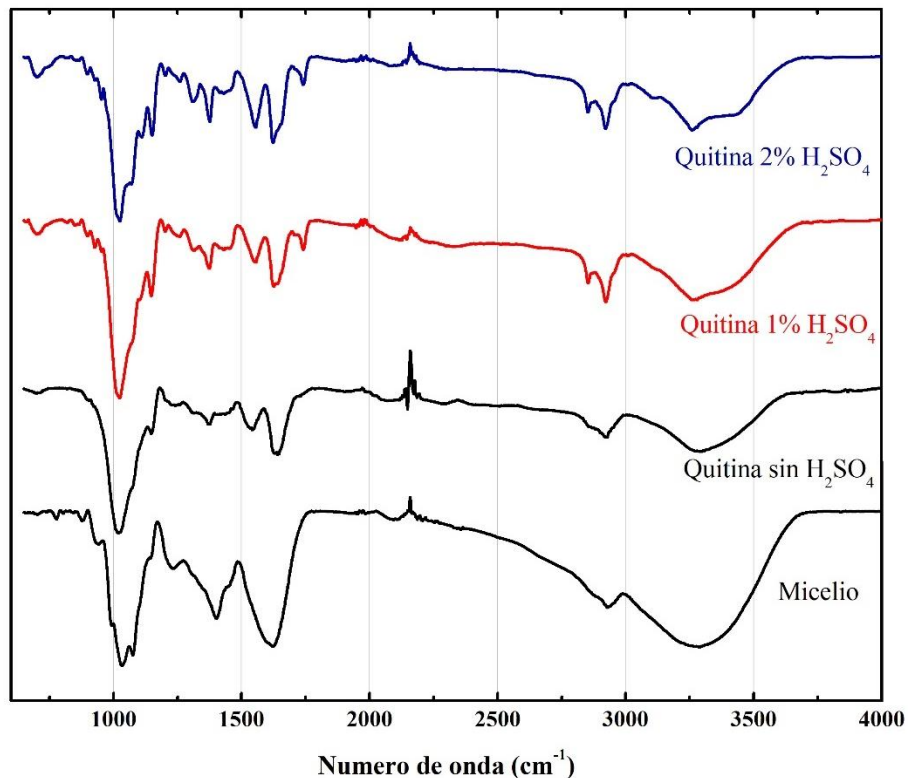


Figura 23. Espectro IR de la extracción de quitina de *Aspergillus*. Se identifican las bandas características de la quitina con forme el tratamiento en el micelio.

Se determino de igual manera los planos cristalinos de la red en la conformación ortorrómbica de la quitina, se identificaron 4 planos representativos (020), (110), (120) y (013) con picos de difracción en el ángulo 2θ de 9.4° , 19.4° , 21.0° y 26.1° respectivamente. Como se observa en la figura 22, en comparación con el difractograma del micelio amorfo, posterior al tratamiento con H_2O_2 se logró identificar los dos picos mayores correspondientes a los planos (110) y (120), pero al aumentar el tratamiento con ácido sulfúrico H_2SO_4 estos mismos planos se definieron aumentando su índice CrI además de la visualización de dos planos menores (020) y (013) en el difractograma.

La quitina obtenida en este caso tuvo un índice de cristalinidad de 79.0, según la ecuación

$$CrI_{110} = \left[\frac{330 - 69}{330} \right] \times 100$$

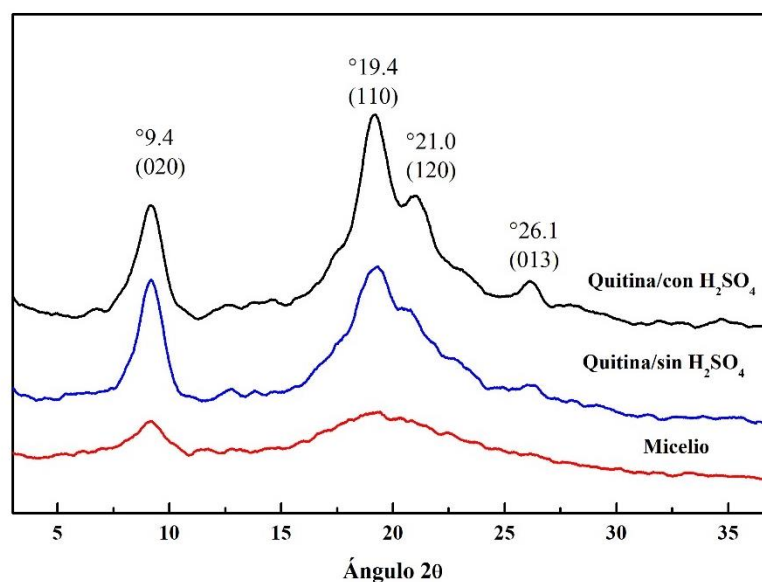


Figura 24. Difractograma de la extracción de quitina en *Aspergillus*. Los planos cristalinos ya se visualizaban con el tratamiento con H_2O_2 , sin embargo, se eliminaron interferencias y aumento el índice CrI al adicionar H_2SO_4 .

5.4.3 Hidrólisis enzimática de quitina fúngica

Se aplicaron las enzimas semi purificadas, para hidrolizar la quitina fúngica extraída y la quitina comercial de camarón. Cada tipo de quitina se evaluó por microscopía electrónica de barrido antes y después de la hidrólisis (Figura 23) la quitina de *A.bisporus* que en un inicio se encontraba formada por microfibrillas entrelazadas, posterior al tratamiento se observó la liberación de micro y nanofibrillas de quitina (Figura 23 A y B). En la quitina de *Aspergillus* posterior al tratamiento se observaron zonas focalizadas de hidrólisis en las que se degradó por completo (Figura 23 C y D). Por otro lado, en la quitina de camarón solo se observó fragmentación de las escamas de quitina comercial, de las que resultaron pequeñas estructuras granulares (Figura 23 E y F).

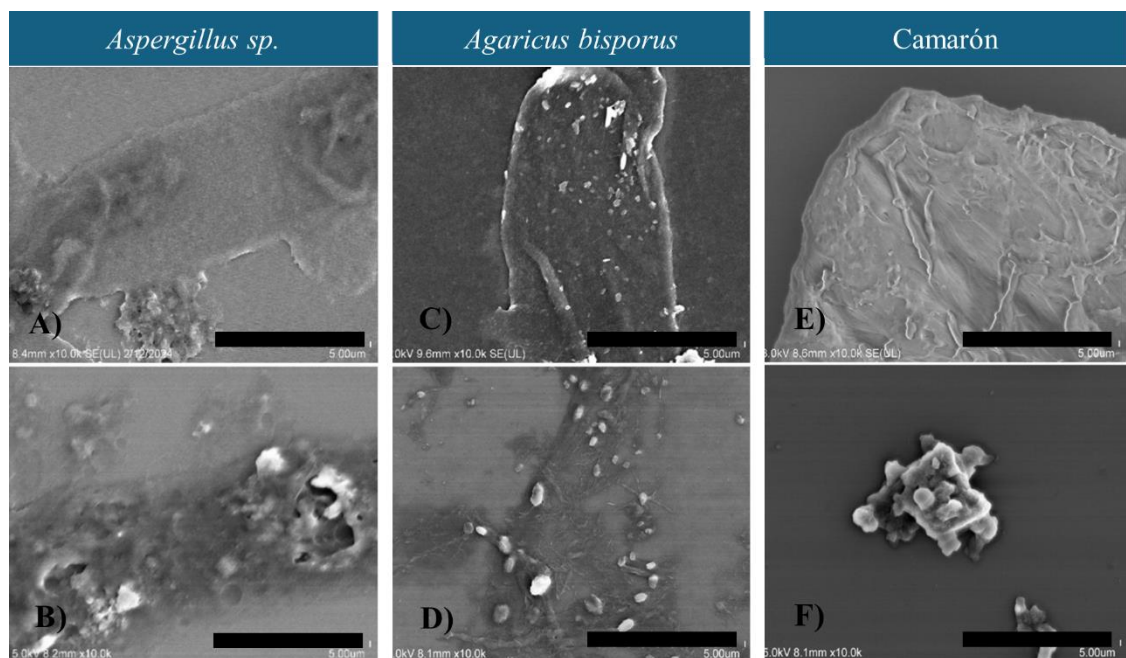


Figura 25. Hidrólisis enzimática de quitina. A) y B) quitina de *Aspergillus* antes y después del tratamiento con enzimas, C) y D) quitina de *A. bisporus* antes y después del tratamiento enzimático y E) y F) quitina de camarón comercial antes y después del tratamiento. Las barras son escala de 5 µm.

5.4 Aplicación de quitinasas como control biológico contra *Candida albicans*

Después de realizar la prueba de inhibición por gota en medio sólido, no se observó inhibición de por parte de las enzimas liofilizadas y reactivadas en buffer contra *Candida albicans*. Como se observa en la figura 24, las colonias del patógeno crecieron en todas las condiciones y diluciones realizadas, en caso contrario se esperaría una disminución o ausencia total en el desarrollo de colonias del patógeno.

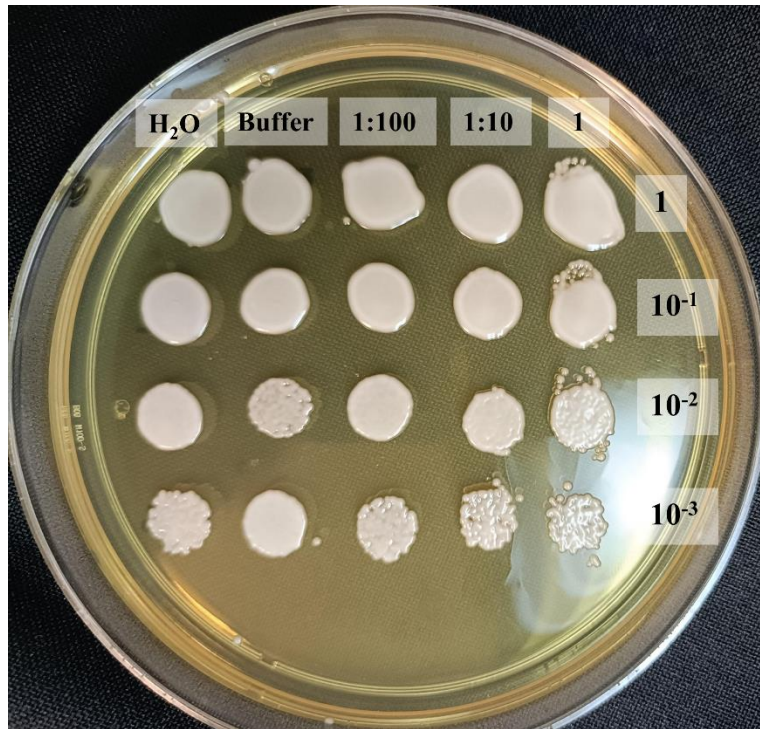


Figura 26. Prueba de inhibición por gota en placa contra *Candida albicans*. De izquierda a derecha por columna; Controles con agua y buffer, enzimas diluidas 1:100, 1:10 y concentradas (26 mg proteínas/ml).

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

6.1 Microorganismos productores de quitinasas

Se ha demostrado en la naturaleza y específicamente en suelos, que las bacterias son los principales mediadores en la hidrólisis de la quitina, pero dependiendo de otros factores como el pH y la temperatura los hongos también se vuelven organismos relevantes en la degradación del polímero^{41,42}.

Al tratarse de un medio mínimo con única fuente de carbono quitina coloidal de camarón en el que se aislaron los microorganismos de las tres diferentes muestras, era de esperar que solo crecieran microorganismos quitinolíticos de forma selectiva, ya que solo los microorganismos con la fisiología para degradar y metabolizar la quitina mediante la producción de quitinasas pudieran desarrollarse en este medio de cultivo, descartando todos aquellos microorganismos que no tuvieran esta fisiología. A pesar de esto, no todos los microorganismos al paso de una semana de incubación presentaron zonas de aclaramiento del medio de cultivo, que se atribuye a una prueba cualitativa por la hidrólisis de la quitina coloidal, esto debido principalmente al tiempo de incubación. El halo de hidrólisis era más perceptible alrededor de las colonias bacterianas aisladas que en los hongos filamentosos que llegaron a crecer en el medio.

En las placas de aislamiento obtenidas, se encontraron mayor diversidad de bacterias en comparación con los hongos para las muestras del Cerro de la Silla y Cerro Agujerado, pero la diferencia en la cantidad y diversidad de microorganismos entre estos dos lugares puede estar influenciada debido a diversos factores, entre ellos, la conservación del área

natural, la flora y fauna circundante, la profundidad a la que se tomó la muestra, la humedad, el pH y entre otros factores fisicoquímicos. El área natural Cerro de la Silla, es un área natural protegida en donde la flora y fauna es más abundante, los bosques de encino abarcan más hectáreas y no presentan parches de deforestación como el área del Cerro Agujerado, por lo que se conservan microambientes con mayor humedad. Se esperaba así que debajo de los bosques del Cerro de la Silla existieran mayor cantidad y diversidad de microorganismos, incluyendo los quitinolíticos.

Los reportes de microorganismos y más aún productores de quitinasas están limitados en el estado de Nuevo León, pero se han reportado microorganismos en el aire y en suelo como géneros de *Streptomyces*⁴³. Por otro lado en insectos se han encontrado microorganismos en el exoesqueleto de *Tenebrio molitor* involucrados en la liberación de la quitina por proteólisis e hidrólisis en la cutícula del insecto, géneros como *Serratia*, *stenotrophomonas*, *Chryseobacterium* bacteria psicrótrófica y *Brevibacterium* que son actinobacterias, son algunos de que se han encontrado y descrito⁴⁴, en exoesqueletos de crustáceos también se han reportado de forma común microorganismos quitinolíticos del género *Vibrio* y *Bacillus*⁴⁵ por otro lado en insectos frecuentes y plaga dentro de ambientes urbanos como polillas, trips y gorgojos se han encontrado de forma común entre sus exoesqueletos géneros como *Methylobacterium* y *Pseudomonas*⁴⁶. Estos, así como muchos otros microorganismos quitinolíticos se encargan de descomponer la quitina del ambiente, procesarla y convertirla en una fuente de energía para su aprovechamiento. Es probable que las bacterias aisladas del insecto *Quesada sp.* (Figura 7) tuvieran relación con alguno de los microorganismos mencionados y de la misma forma se encargan de degradar los exoesqueletos de los diversos artrópodos, estos también participan en el reciclaje de los compuestos del exoesqueleto de las cigarras.

El aprovechamiento de la quitina en los medios de cultivo se basa en la producción extracelular de enzimas para degradar la quitina en oligómeros, dímeros y monómeros para poder integrarla al citoplasma dentro de la ruta metabólica del carbono y del nitrógeno⁴⁷ de esta forma los microorganismos quitinolíticos procesan la quitina y en los medios de cultivo es posible hacer evidente dicho proceso, al observar las zonas de aclaramiento o halos transparentes, las enzimas extracelulares de los microorganismos

actúan hidrolizando la estructura nativa del polímero circundante hasta oligómeros de menor tamaño incluso dímeros o monómeros, visualizando así una zona transparente que evidencia la acción cualitativa de las quitinasas. Las colonias de los microorganismos quitinolíticos se caracterizan por liberar una serie significativa de metabolitos al medio de los que destacan las quitinas. Algunas bacterias además liberan diversos componentes al medio gracias a su extenso metabolismo secundario, las actinobacterias clasificadas como gram positivas y con morfologías filamentosas, son reconocidas por la producción de antibióticos y metabolitos secundarios, así como la producción de ciertos pigmentos⁴⁸. Precisamente gracias a estas características se identificaron que, dentro de las colonias seleccionadas, tres de ellas pertenecen al orden de los actinomycetales. Algunas actinobacterias ya se han descrito y aislado en zonas del estado de Nuevo León y en zonas de en el Norte del país⁴³, pero no se habían descrito en el Cerro de la silla y Cerro Agujerado.

Se han encontrado bacterias quitinolíticas con índices de potencial (IP) mayores a 2.0 en géneros con *Bacillus* cultivados en agar enriquecido con 2% de quitina⁴⁹ y valores de IP de 2.05 en bacterias quitinolíticas del género *Aeromonas* en medio mínimo con 1% de quitina coloidal incubadas durante 10 días⁵⁰. Estos valores de potencial para degradar la quitina coloidal en placa son mayores que los reportados en este proyecto, sin embargo, en el primer caso la prueba se realizó en medio enriquecido y no mencionan el tiempo de incubación y en la segunda referencia el tiempo de incubación fue el doble del que se empleó en este proyecto. Se puede decir que los valores IP obtenidos en este proyecto en 5 días de incubación superiores a 1.5 de al menos tres bacterias aisladas (Bac 1, Bac 3 y Bac 7) son considerados altos, tomando en cuenta además que el valor puede aumentar considerablemente si se utilizan medios enriquecidos y se prolonga el tiempo de la incubación.

6.1.1 identificación molecular

Para la identificación molecular de la actinobacteria aislada y con mayor potencial en la producción y actividad enzimática, se secuenció el gen que corresponde a la subunidad

ribosomal 16s debido a que es una secuencia muy conservada durante la evolución de las bacterias en general, ya que se trata de un gen universal en toda bacteria y arqueas. A pesar de ello existen variaciones suficientes para distinguir a las bacterias entre especies distintas, a lo que se les conoce como mutaciones.

Después del alineamiento el género se hizo evidente *Streptomyces* por el alto porcentaje de similitud, pero se encontró una falta de similitud para determinar una especie en concreto. Después de analizar los alineamientos de la secuencia con las especies más cercanas según NCBI, se encontraron al menos 6 mutaciones entre cambios de base, inserciones y deleciones. Este número de diferencias y tomando en cuenta su filogenia, sugiere que se trata de una nueva especie del género, en este caso denominada *Streptomyces monterreus* que además logra estar muy emparentada con el ancestro común de las especies *Streptomyces roseolus* y *Streptomyces filamentosus*.

6.2 Expresión enzimática

Las quitinasas (EC 3.2.1.14) se encuentran en todos los reinos biológicos clasificadas dentro de las familias GH-18, GH-19 y GH-48, pero abundan en microorganismos quitinolíticos especializados en degradar la quitina presente en el medio y utilizarla como fuente de energía, algunas de los géneros bacterianos más conocidos son; *Aeromonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Streptomyces* y *Bacillus*⁵¹ y una forma cuantitativa para evidenciar el potencial de degradación de quitina o específicamente la producción de quitinas, es por medio de la actividad enzimática. Se han reportado y caracterizado quitinasas de microorganismos aislados del suelo como *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Ligilabacillus* y *Aeromonas*, que tuvieron valores con mayor actividad enzimática de 625 µg/mL, 553 µg/mL, 309 µg/mL y 310µg/mL respectivamente⁵². Algunos otros reportes presentan actividades máximas del microorganismo aislado *Alcaligenes faecalis* de 258 U/ml después de 48 h cultivado a 37°C⁵³ y del género *Bacillus* se han reportado actividades por encima de 79 U/100 ml después de 8 días de incubación⁵⁴. En comparación con estos reportes en los cuales se utilizó el mismo método para valorar la actividad enzimática a través de la producción de azúcares reductores y su lectura con DNS, se

puede decir que los valores de la actividad enzimática de las bacterias seleccionadas en esta sección son altas . En este proyecto para las bacterias seleccionadas 1 y 7 se obtuvieron actividades de 355 y 372 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, estas unidades comparadas con la referencia 625 $\mu\text{g/mL}$, 553 $\mu\text{g/mL}$ ⁵² son menores, sin embargo, cabe recalcar que en estos trabajos reportaron las unidades de actividad enzimática por ml de solución enzimática en la reacción, es decir utilizaron 1000 microlitros de solución de enzimas para realizar la hidrólisis de la quitina coloidal y posteriormente leer azúcares reductores y la cantidad de enzimas utilizadas para llevar a cabo la reacción en este proyecto fue de 300 microlitros. Los valores ya eran cercanos a los reportados, pero tomando en cuenta esto, y posibles las conversiones requeridas, podría decirse que los valores obtenidos son incluso mayores a los reportados anteriormente.

En base a los resultados se puede decir que la actinobacteria 7 aislada del Cerro de la Silla en Monterrey esta más especializada en hidrolizar la quitina del medio comparada con la bacteria 1 aislada y seleccionada del Cerro Agujerado, ya que fue capaz de aumentar su actividad enzimática a partir del tercer y cuarto día de la fermentación en medio líquido con quitina coloidal de camarón.

6.2.1 Producción de enzimas en medios de cultivo con quitina fúngica

Se ha tomado por desapercibido que para la producción y aplicación industrial de las enzimas quitinasas existe un elevado gasto en los medios de cultivo representando hasta el 40% de los costos totales de producción⁵⁵. Para el desarrollo, crecimiento y más específicamente la producción de quitinasas en microorganismos quitinolíticos como las actinobacterias, los medios de cultivo con quitina de hongos como es el caso de *A. bisporus* es una alternativa a los medios de cultivos definidos con quitina de camarón, ya que como se observa en los resultados de la sección (5.2.2) es posible obtener actividades enzimáticas similares que en medios de cultivo comunes con quitina de camarón, incluso mejores si se trata en una alta producción enzimática.

Se han reportado trabajos donde utilizan champiñones tratados químicamente como fuente de carbono para medios de cultivo más sencillos para la producción enzimática de

organismos quitinolíticos comúnmente utilizados en la industria para la producción de quitinasas, se reportaron actividades de quitinasas a los 7 días de fermentación de 1.6, 1.2 y 0.6 U/L para, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* y *Bacillus licheniformis* respectivamente⁵⁶, donde la unidad de actividad U se definió como la cantidad de enzima para producir 1 mg/ml de azúcar reductor durante 1 h a 37°C. Por otro lado, en este proyecto se obtuvo para la actinobacteria 7 actividad de 0.075 U a los 7 días de fermentación, en este caso la unidad de actividad U se definió como la cantidad de enzima para producir 1μM/ml de azúcar reductor por minuto a 45°C. Considerando lo anterior, la actividad reportada por los investigadores es menor si se considera la actividad U por minuto en lugar de por hora, como es el caso de la actividad reportada en este proyecto.

6.3 Purificación de endoquitinasas

Las condiciones ideales en la purificación de proteínas, se espera que la cantidad de proteínas disminuya con cada etapa de purificación y que la actividad enzimática se mantenga o aumente en proporción a la cantidad de proteínas, pero en este caso, la actividad de las quitinasas en la fase de cromatografías disminuye considerablemente.

Gracias a que se evaluó la actividad enzimática de la muestra antes y después de procesarla en la columna, se puede discutir que las enzimas de interés durante el proceso de cromatografía de intercambio iónicos, no se retuvieron en la columna como debería, ya que en las fracciones de prelavado y afinidad donde se deberían retener las enzimas con carga negativa y no dar lecturas de actividad, tenían actividad enzimática. Por otro lado, en la cromatografía de exclusión por tamaño, las proteínas fueron se concentraron en las primeras fracciones recolectadas, así mientras aumentaba el tiempo de elución las proteínas iban disminuyendo, lo que podría referirse a que la mayoría de las proteínas tenían pesos moleculares mayores. Sin embargo, la actividad enzimática se presentó a lo largo de toda la cromatografía, sin bandas asociadas a la separación de quitina.

6.4 Extracción de quitina fúngica

6.4.1 *Agaricus bisporus*

En células fúngicas, la quitina puede llegar a abarcar hasta el 27% del peso seco total¹², sin embargo, en macromicetos como *Agaricus bisporus*, se han obtenido rendimientos de 5.9 a 14.3 % en peso seco de quitina extraída por hidrólisis química^{57,58}. En este proyecto los porcentajes de rendimiento están ligeramente por encima de los valores reportados, lo que significa que se obtienen mayor cantidad de producto que las referencias en este mismo género de hongo.

El microscopio electrónico nos permite visualizar las fibrillas de quitina entrelazada, que como se ha descrito, estas permanecen unidas unas con otras por enlaces débiles y representan la matriz de basal y estructural de la pared celular en los hongos. Las fibras que se apreciaron en la figura 17 D y E, estaban entrelazadas unas con otras conservando su estructura original, debido a que son el soporte estructural en la pared celular incluso de la célula completa estas bajo microscopia se podía aun apreciar la estructura geométrica de las hifas como si de un caparazón se tratara. A partir de estas observaciones se puede decir que se eliminaron todos aquellos componentes fuera y dentro de la matriz de fibrillas de quitina, como son los organelos intracelulares, biomoléculas como lípidos, proteínas, así como glucanos presentes en la pared celular.

Para confirmar lo anterior se identificaron los grupos funcionales característicos en la molécula de la quitina los cuales representan en este caso; los alcoholes (OH) con longitudes de onda de 3400 cm^{-1} , las aminas (N-H) con vibraciones de estiramiento identificadas en longitudes de onda de 3200 y 3100 cm^{-1} , Amida I con dos bandas de vibración de estiramiento en 1665 cm^{-1} y 1625 cm^{-1} , Amida II con banda de vibración de flexión alrededor de 1550 cm^{-1} y Amina III con bandas de estiramiento en 1320 cm^{-1} . Estos resultados se pueden comparar con los espectros de infrarrojo de quitina obtenida por hidrólisis química en hongos comestibles³⁰, con lo que coinciden en longitud de onda específica. Así mismo el tipo α -quitina se pudo distinguir del tipo β -quitina gracias al modo de vibración de estiramiento de las amidas I, por la presencia de las bandas alrededor de 1600 y 1627 cm^{-1} características del tipo α -quitina ya que el tipo β -quitina solo presenta una sola banda alrededor de 1656 cm^{-1} ⁵⁹. Por último, es posible verificar la capacidad de

la metodología para extraer quitina con la ausencia o presencia de proteínas en el producto. la ausencia de bandas de absorción de 1540 cm^{-1} y a $1700 - 1740\text{ cm}^{-1}$ asignadas a la vibración de estiramiento de las proteínas, confirma que la quitina obtenida en este caso está libre de proteínas⁶⁰.

También se determinó la naturaleza cristalina de estas microfibrillas, arrojando patrones cristalinos específicos solamente para la quitina. Ya que en la naturaleza la quitina tiene tres formas cristalinas diferentes: α , β y γ , y entre estos tipos la orientación de las microfibrillas de quitina es distinta, se puede identificar el morfotipo cristalino de la quitina de acuerdo con la ubicación de sus planos correspondiente. Según referencias, las fibras de quitina exhiben picos de difracción en el ángulo 2θ característicos que dependiendo de la especie pueden llegar a variar, en *Agaricus* se han descrito los planos cristalinos (020), (110), (120) y (130) con picos de difracción alrededor de 9.4° , 19.3° , 20.6° y 22.5° ²⁹ los cuales se cumplen en el difractograma obtenido en este proyecto pero con la ausencia del plano (120), sin embargo, en otras referencias reportan planos distintos (020), (021), (110) y (130) que corresponden a los picos 9.1° , 12.6° , 19.3° y 26.3° respectivamente, además se recalca que la ausencia de los picos de difracción alrededor de 9.6° y 20.4° representativos de la β -quitina, confirma que la quitina en este caso corresponde al tipo α -quitina ya que además exhiben la presencia de los picos alrededor de los 9.2° y 19.0° reportados en investigaciones previas⁵⁷ los cuales coinciden con variaciones mínimas de 0.1° con los planos obtenidos en este caso.

6.6.2 *Aspergillus sp.*

Después del tratamiento con H_2O_2 , solo se observó un adelgazamiento de la pared celular de las hifas del micelio, figura 20 B, del mismo modo no fue posible identificar las fibras de quitina que deberían localizarse en la base de la pared celular, si no que solo se observó una superficie lisa a lo largo de todo el micelio y en algunas zonas desprendimiento escamoso. Es posible que el tratamiento con peróxido no desprendiera e hidrolizara los glucanos presentes sobre las fibras de quitina, sin embargo, al adicionar los distintos porcentajes de ácido sulfúrico H_2SO_4 el cual permitió hidrolizar dichos

componentes celulares y eliminar todo aquello dentro y fuera de las fibras de quitina, como los organelos internos, biomoléculas como proteínas, lípidos y glucanos presentes en la pared celular. Figura 20 C y D.

Debido a que el espectro de cada molécula presente en una muestra arroja bandas características a sus tipos de enlaces covalentes clasificados dentro de sus grupos funcionales, es fácil determinar cuándo una muestra está o no pura, pues una muestra con diversos compuestos arroja señales varias, que dependiendo de la intensidad cubren la señal de otras menos intensas. Esto se pudo evaluar mediante espectroscopia de infrarrojo, pues las bandas características de la quitina no eran visibles por las interferencias de otros compuestos o moléculas presentes de mayor intensidad, como se observó en la figura 21 la quitina sin H₂SO₄, no fue sino hasta la adición de ácido y más específicamente al 2% que se eliminaron los compuestos de interferencia y se observaron las bandas características de la quitina. También se evaluó a partir del espectro, la presencia o ausencia de proteínas en la quitina extraída, dos bandas características asignadas a las vibraciones de estiramiento de las proteínas deben de estar ausentes, una de ellas alrededor de 1540 cm⁻¹ no se logró identificar, pero la banda a 1700 – 1740 cm⁻¹ asignadas a las vibraciones de estiramiento si se observó pero de baja intensidad, sin embargo esta banda no fue visible si no hasta la adición de 2% H₂SO₄ ya que no se observaba con el tratamiento solamente con H₂SO₄.

Haciendo una comparación entre los espectros IR obtenidos en *A. bisporus*, es posible identificar las mismas bandas en *Aspergillus* en las regiones de los grupos funcionales correspondientes a la quitina, como se observa en la imagen 25, de las diferencias significativas se observa que en *A. bisporus* si estuvo completamente ausente la banda a los 1740 cm⁻¹ y la presencia de bandas agudas en los 2000 – 2020 cm⁻¹, probablemente atribuidos a señales residuales o background del ambiente.

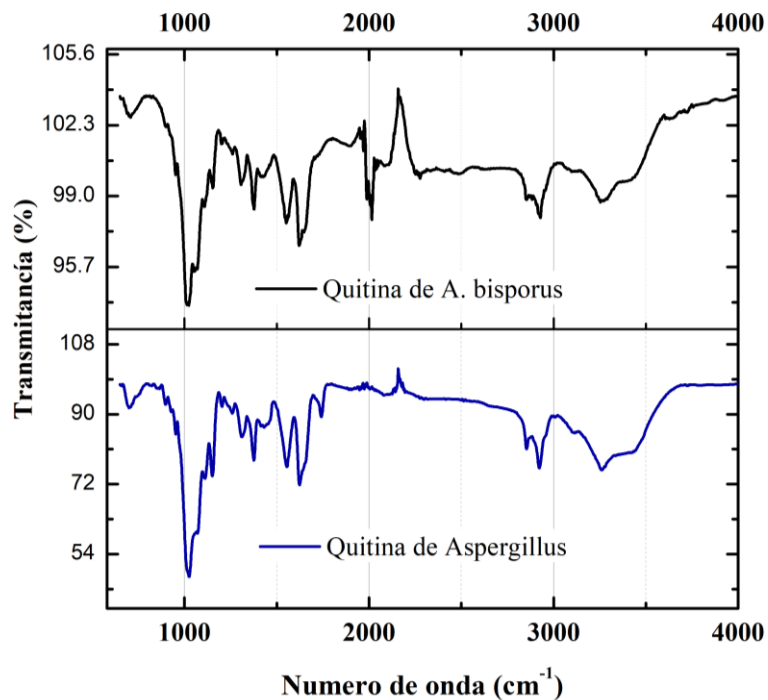


Figura 27. Espectros de infrarrojo de quitina de *A. bisporus* y *Aspergillus sp.*

Al comparar los difractogramas de ambos hongos, se logran identificar que los dos tipos de quitina obtenida comparten los planos cristalinos (020), (110) y (130), sin embargo, la quitina de *Aspergillus* presentó el plano (120) a los 21° posiblemente opacado en la quitina de *A. bisporus* por algunas otras interacciones de glucanos distintas, se encontró además la ausencia del plano (021) observado con una mínima intensidad en *A. bisporus* alrededor de los 12° que no se logra diferenciar en *Aspergillus*.

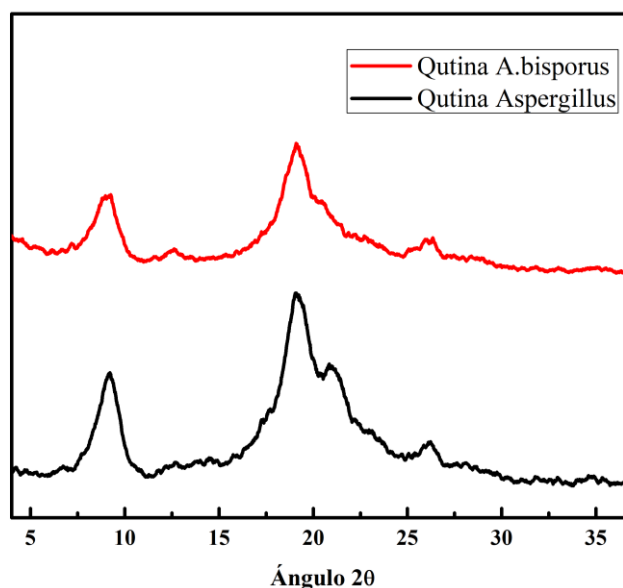


Figura 28. Comparación de difractogramas de quitina de *A. bisporus* y *Aspergillus* sp.

La disrupción de la pared celular y de sus componentes se lleva a cabo generalmente en condiciones alcalinas, en temperaturas y tiempos de reacción específicas y de los productos finales posterior a la reacción, son fracciones solubles que contienen α -glucanos, algunos β -glucanos y glicoproteínas desprendidas de la pared celular y unas fracciones insolubles que contiene principalmente quitina, quitosano, β -glucanos y complejos entre quitina-glucanos⁶¹.

En la pared celular de *Agaricus bisporus* existen polisacáridos en la capa de mucilago como glucosa y galactosa, y en la segunda fracción de la pared celular se reportan xilomananos asociados a glucanos y diversos glucanos con diferentes sitios de unión, como la quitina y los α - β -glucanos⁶², en *Aspergillus*, se han descrito en la parte externa de la pared celular los exopolisacáridos galactosaminogalactanos, y en partes internas los α - β -glucanos, galactomananos y quitina⁶³. Con respecto a lo anterior, se sabe que los componentes en la pared celular de los hongos y más específicamente los tipos de enlaces y ramificaciones que pueden tener son dependientes de la especie específica, es así como se discute que la extracción de quitina en *Agaricus* es más sencilla en comparación con la quitina de *Aspergillus*, en este último fue necesaria la adición de porcentajes mínimos de

H₂SO₄ para la extracción de quitina, atribuido posiblemente a los componentes varios que conforman su pared celular entre ellos los galactosaminogalactanos y glactomananos.

6.5 Hidrólisis enzimática de quitina

En diferentes microorganismos ya se han identificado diferentes quitinasas y a partir del modo de acción se han clasificado en tres tipos, las endoquitinasas y las exoquitinasas. Se sabe que las endoquitinasas hidrolizan la quitina en sitios aleatorios dentro del polímero específicamente en zonas amorfas y generar oligómeros solubles de GlcNAc de bajo peso molecular. Las exoquitinasas actúan en los extremos reductores y no reductores de las cadenas del polímero de forma progresiva, estas a su vez se pueden subcategorizar en quitobiosidasas liberando dímeros de GlcNAc de los cuales la N-acetilglucosaminidasa se encarga de dividirlos en monómeros.⁶⁴

Para la hidrólisis de los distintos tipos de quitina se aplicaron enzimas quitinasas inespecíficas, ya que como se presentó en los resultados de la sección 5.3, las enzimas no estaban del todo purificadas, pero fueron las que se utilizaron para la evaluación de la degradación de la quitina fúngica. Dentro de las enzimas utilizadas debido a la falta de purificación se esperaba que tuvieran las tres categorías de quitinasas de acuerdo con su tipo catalítico, en las que se incluyen las de actividad exoquitinasas y endoquitinasas, las cuales actuaron en conjunto para degradar la quitina a quitooligosacáridos, dímeros y monómeros de GluNAc. Más allá de las enzimas presentes en la solución semipurificadas, existen otros factores que influyen en las hidrólisis independientes del tipo de quitinasas, como la afinidad de la enzima que puede llegar a tener con el sustrato específico, impedimentos estéricos o inhibición de ciertas enzimas. En base a esto, puede que las quitinasas con actividad endocatalítica actúen preferentemente en ciertos tipos de quitina que en otros y como se observó en la figura 23, cada tipo de hidrólisis fue distinta, en el caso de *Aspergillus*, debido a que se observó una hidrólisis más activa es posible que se obtuvieran mayor cantidad de quitooligosacáridos de menor grado de polimerización incluso dímeros y monómeros, los cuales se les pudiera dar seguimiento mediante su caracterización. Por otro lado, en *Agaricus*, es posible que las enzimas aplicadas

principalmente hidrolizaran la quitina que mantenía unidas a las microfibras, liberando así las nanofibras semicristalinas de la matriz original.

6.6 Inhibición del patógeno *Candida albicans*

Las enzimas semipurificadas que se aplicaron para la evaluación antifúngica contra *Candida albicans* previamente se determinó su actividad catalítica con el sustrato específico de quitina coloidal, se liofilizaron para su concentrado y almacenamiento, posteriormente se resuspendieron en buffer y se diluyeron según la metodología correspondiente de la sección 4.6. En los resultados se reportó ausencia de inhibición del patógeno en todas las distintas concentraciones preparadas y una de las explicaciones es que probablemente al volverlas a resuspender las enzimas liofilizadas estas perdieran actividad enzimática por desnaturalización, el error fue no volver a medir actividad de las enzimas antes de realizar la prueba de inhibición contra el patógeno. La otra posibilidad es que simplemente las enzimas utilizadas no inhiben el crecimiento de *Candida albicans*, en el caso de que las enzimas si conservaran su actividad.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Este trabajo es el primer informe con respecto al aislamiento y determinación de actividad enzimática de microorganismos quitinolíticos del estado, en muestras del suelo en áreas naturales y de exuvias de insectos cicádidos. A partir de ello se lograron aislar 3 bacterias potenciales candidatas para la producción de quitinasas, con índices de potencial de degradación elevados (superiores a 1.5 IP después del quinto día), dos de las cuales pertenecen al filo de Actinobacterias y una gram negativa con morfología en cocos. Las de mayor actividad fueron las actinobacterias denominadas por la clave Bac 1 y Bac 7 con unidades de actividad enzimática U de 0.042 y 0.040 respectivamente.

(Identificación molecular), propuesta de nueva especie. Bajo el segmento secuenciado (16s)

La extracción de las fibras de quitina del hongo *Aspergillus sp.* se complica más en comparación con *Agaricus bisporus*, atribuido posiblemente a la estructura de los α - β -glucanos y componentes varios que conforman la pared celular. En *A. bisporus* fue suficiente el tratamiento con peróxido de hidrógeno H_2O_2 para la extracción de quitina, por otro lado, en *Aspergillus sp.* fue necesario agregar al menos 1% de H_2SO_4 . El uso de reactivos para la extracción de quitina en estos casos tiene un menor impacto ambiental y a pesar del uso de ácido en comparación de los procesos convencionales la cantidad es mínima.

La quitina extraída se caracterizó por espectroscopía de infrarrojo para morfotipo α -quitina con porcentajes mínimos de proteínas para *Aspergillus sp.* y ausentes en la quitina de *Agaricus bisporus*, con porcentajes de cristalinidad de 78% y de 79% para *Agaricus bisporus* y *Aspergillus sp.* respectivamente y planos cristalinos (020) y (110) correspondientes a la conformación ortorrómbica de la α -quitina en los hongos.

Las bacterias quitinolíticas Bac 1, Bac 3 y Bac 7 desarrollaron crecimiento en los medios de cultivo solido con quitina de *Aspergillus* y de *A. bisporus*. En medio liquido se logró un aumento en la actividad enzimática de la actinobacteria Bac 7, aumentando de 0.042 U en medio con quitina de camarón comercial a 0.075 U en medio con quitina de champiñón.

Por medio de la hidrólisis enzimática se encontraron variaciones en la estructura superficial de la quitina y la posible producción de derivados del polímero como quitoligosacáridos y nanofibras.

Las enzimas semi purificadas del microorganismo identificado como *Streptomyces* y en propuesta de una nueva especie, no inhibieron el crecimiento del hongo patógeno *Candida albicans*.

Mas allá de abordar la aplicación de la hidrólisis enzimática en quitina y abrir panoramas para la producción de derivados como los quitoligosacáridos y nanoquitina, en este proyecto se englobaron trabajos completamente sostenibles, desde empezar a utilizar hongos como fuente de extracción de quitina y sus derivados, el desarrollo de metodologías simples con menor impacto ambiental que además reducen los reactivos químicos, así como la evaluación de medios de cultivo alternos simples con quitina fúngica para una mayor producción enzimática.

BIBLIOGRAFIA

1. Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000;46(1):1-27. doi:10.1016/S1381-5148(00)00038-9
2. Pohl N. The Sugar Code: Fundamentals of Glycosciences. Edited by Hans-Joachim Gabius. *ChemBioChem.* 2010;11(8):1147-1147. doi:10.1002/cbic.201000171
3. Hossin MA, Al Shaqsi NHK, Al Touby SSJ, Al Sibani MA. A review of polymeric chitin extraction, characterization, and applications. *Arabian Journal of Geosciences.* 2021;14(18):1870. doi:10.1007/s12517-021-08239-0
4. Kozma M, Acharya B, Bissessur R. Chitin, Chitosan, and Nanochitin: Extraction, Synthesis, and Applications. *Polymers (Basel).* 2022;14(19):3989. doi:10.3390/polym14193989
5. Gaill F, Shillito B, Ménard F, Goffinet G, Childress J. Rate and process of tube production by the deep-sea hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Mar Ecol Prog Ser.* 1997;148:135-143. doi:10.3354/meps148135
6. Sawada D, Nishiyama Y, Langan P, Forsyth VT, Kimura S, Wada M. Water in Crystalline Fibers of Dihydrate β -Chitin Results in Unexpected Absence of Intramolecular Hydrogen Bonding. *PLoS One.* 2012;7(6):e39376. doi:10.1371/journal.pone.0039376
7. Jang M, Kong B, Jeong Y, Lee CH, Nah J. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *J Polym Sci A Polym Chem.* 2004;42(14):3423-3432. doi:10.1002/pola.20176
8. Treitschke S, Doehlemann G, Schuster M, Steinberg G. The Myosin Motor Domain of Fungal Chitin Synthase V Is Dispensable for Vesicle Motility but

- Required for Virulence of the Maize Pathogen *Ustilago maydis* . *Plant Cell*. 2010;22(7):2476-2494. doi:10.1105/tpc.110.075028
9. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*. 2006;28(8):799-808. doi:10.1002/bies.20441
 10. Brown HE, Esher SK, Alspaugh JA. Chitin: A “Hidden Figure” in the Fungal Cell Wall. In: ; 2019:83-111. doi:10.1007/82_2019_184
 11. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr*. 2017;5(3). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016
 12. Freitas F, Roca C, Reis MAM. Fungi as Sources of Polysaccharides for Pharmaceutical and Biomedical Applications. In: *Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies*. Wiley; 2015:61-103. doi:10.1002/9781119041450.ch3
 13. Liu R, Xu C, Zhang Q, Wang S, Fang W. Evolution of the chitin synthase gene family correlates with fungal morphogenesis and adaption to ecological niches. *Sci Rep*. 2017;7(1):44527. doi:10.1038/srep44527
 14. Lenardon MD, Munro CA, Gow NA. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(4):416-423. doi:10.1016/j.mib.2010.05.002
 15. Sashiwa H, Aiba S ichi. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Prog Polym Sci*. 2004;29(9):887-908. doi:10.1016/j.progpolymsci.2004.04.001
 16. Philibert T, Lee BH, Fabien N. Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers. *Appl Biochem Biotechnol*. 2017;181(4):1314-1337. doi:10.1007/s12010-016-2286-2
 17. Shen X, Shamshina JL, Berton P, Gurau G, Rogers RD. Hydrogels based on cellulose and chitin: fabrication, properties, and applications. *Green Chemistry*. 2016;18(1):53-75. doi:10.1039/C5GC02396C

18. Li J, Wang D, Chang SC, et al. Production of Structurally Defined Chito-Oligosaccharides with a Single *N*-Acetylation at Their Reducing End Using a Newly Discovered Chitinase from *Paenibacillus pabuli*. *J Agric Food Chem*. 2021;69(11):3371-3379. doi:10.1021/acs.jafc.0c06804
19. de Oliveira PN, Moussa A, Milhau N, et al. In situ synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles coated by chito-oligosaccharides: physico-chemical characterizations and cytotoxicity evaluation for biomedical applications. *Nanotechnology*. 2020;31(17):175602. doi:10.1088/1361-6528/ab68f9
20. Kumar M, Brar A, Vivekanand V, Pareek N. Bioconversion of Chitin to Bioactive Chitoooligosaccharides: Amelioration and Coastal Pollution Reduction by Microbial Resources. *Marine Biotechnology*. 2018;20(3):269-281. doi:10.1007/s10126-018-9812-x
21. Bai L, Liu L, Esquivel M, et al. Nanochitin: Chemistry, Structure, Assembly, and Applications. *Chem Rev*. 2022;122(13):11604-11674. doi:10.1021/acs.chemrev.2c00125
22. Jin T, Liu T, Lam E, Moores A. Chitin and chitosan on the nanoscale. *Nanoscale Horiz*. 2021;6(7):505-542. doi:10.1039/D0NH00696C
23. Lossada F, Hoenders D, Guo J, Jiao D, Walther A. Self-Assembled Bioinspired Nanocomposites. *Acc Chem Res*. 2020;53(11):2622-2635. doi:10.1021/acs.accounts.0c00448
24. Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res*. 2004;339(16):2693-2700. doi:10.1016/j.carres.2004.09.007
25. Dev A, Mohan JC, Sreeja V, et al. Novel carboxymethyl chitin nanoparticles for cancer drug delivery applications. *Carbohydr Polym*. 2010;79(4):1073-1079. doi:10.1016/j.carbpol.2009.10.038
26. Zarghani M, Akhlaghinia B. Magnetically separable Fe₃O₄@chitin as an eco-friendly nanocatalyst with high efficiency for green synthesis of 5-substituted-1H-

- tetrazoles under solvent-free conditions. *RSC Adv.* 2016;6(38):31850-31860. doi:10.1039/C6RA07252F
27. Ling S, Chen W, Fan Y, et al. Biopolymer nanofibrils: Structure, modeling, preparation, and applications. *Prog Polym Sci.* 2018;85:1-56. doi:10.1016/j.progpolymsci.2018.06.004
 28. Ling S, Kaplan DL, Buehler MJ. Nanofibrils in nature and materials engineering. *Nat Rev Mater.* 2018;3(4):18016. doi:10.1038/natrevmats.2018.16
 29. Ifuku S, Nomura R, Morimoto M, Saimoto H. Preparation of Chitin Nanofibers from Mushrooms. *Materials.* 2011;4(8):1417-1425. doi:10.3390/ma4081417
 30. Lin N, Zhao S, Gan L, Chang PR, Xia T, Huang J. Preparation of fungus-derived chitin nanocrystals and their dispersion stability evaluation in aqueous media. *Carbohydr Polym.* 2017;173:610-618. doi:10.1016/j.carbpol.2017.06.016
 31. Li J, Wang D, Chang SC, et al. Production of Structurally Defined Chito-Oligosaccharides with a Single *N*-Acetylation at Their Reducing End Using a Newly Discovered Chitinase from *Paenibacillus pabuli*. *J Agric Food Chem.* 2021;69(11):3371-3379. doi:10.1021/acs.jafc.0c06804
 32. Ueda M, Kojima M, Yoshikawa T, et al. A novel type of family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. *Eur J Biochem.* 2003;270(11):2513-2520. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03624.x
 33. Arnold ND, Brück WM, Garbe D, Brück TB. Enzymatic Modification of Native Chitin and Conversion to Specialty Chemical Products. *Mar Drugs.* 2020;18(2):93. doi:10.3390/md18020093
 34. Filho BPD, Lemos FJA, Secundino NFC, Páscoa V, Pereira ST, Pimenta PFP. Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2002;32(12):1723-1729. doi:10.1016/S0965-1748(02)00112-1
 35. Filho BPD, Lemos FJA, Secundino NFC, Páscoa V, Pereira ST, Pimenta PFP. Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti*.

- Insect Biochem Mol Biol.* 2002;32(12):1723-1729. doi:10.1016/S0965-1748(02)00112-1
36. Du J, Duan S, Miao J, Zhai M, Cao Y. Purification and characterization of chitinase from *Paenibacillus* sp. . *Biotechnol Appl Biochem.* 2021;68(1):30-40. doi:10.1002/bab.1889
 37. Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. Bacterial Chitinases: Properties and Potential. *Crit Rev Biotechnol.* 2007;27(1):21-28. doi:10.1080/07388550601168223
 38. Oyeleye A, Normi YM. Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. *Biosci Rep.* 2018;38(4). doi:10.1042/BSR20180323
 39. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem.* 1959;31(3):426-428. doi:10.1021/ac60147a030
 40. Chávez L. Método de obtención de nanoestructuras bidimensionales de quitina utilizando hifas de hongos, las nanoestructuras y su uso. Published online July 12, 2022.
 41. Manucharova NA, Vlasenko AN, Men'ko E V., Zvyagintsev DG. Specificity of the chitinolytic microbial complex of soils incubated at different temperatures. *Microbiology (N Y).* 2011;80(2):205-215. doi:10.1134/S002626171102010X
 42. Kielak AM, Cretoiu MS, Semenov A V., Sørensen SJ, van Elsas JD. Bacterial Chitinolytic Communities Respond to Chitin and pH Alteration in Soil. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(1):263-272. doi:10.1128/AEM.02546-12
 43. Maldonado maria. Aislamiento y evaluación de actinomicetos contra bacterias fitopatógenas y transmitidas por alimentos. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimento.* Published online 2020:73-77.
 44. da Silva FKP, Brück DW, Brück WM. Isolation of proteolytic bacteria from mealworm (*Tenebrio molitor*) exoskeletons to produce chitinous material. *FEMS Microbiol Lett.* 2017;364(17). doi:10.1093/femsle/fnx177

45. Omokanwaye T, Owens D, Wilson O. Identification of Bacteria and Sterilization of Crustacean Exoskeleton Used as a Biomaterial. In: ; 2010:418-421. doi:10.1007/978-3-642-14998-6_106
46. Yamoah E, Jones EE, Weld RJ, et al. Microbial population and diversity on the exoskeletons of four insect species associated with gorse (*Ulex europaeus* L.). *Aust J Entomol.* 2008;47(4):370-379. doi:10.1111/j.1440-6055.2008.00655.x
47. Tsujibo H, Kubota T, Yamamoto M, Miyamoto K, Inamori Y. Characterization of Chitinase Genes from an Alkaliphilic Actinomycete, *Nocardiopsis prasina* OPC-131. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(2):894-900. doi:10.1128/AEM.69.2.894-900.2003
48. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2016;80(1):1-43. doi:10.1128/MMBR.00019-15
49. Like Ginti E, Poluan GG, L. Wantani L, et al. Screening and Identification of Sponge-Associated Chitinolytic Bacteria by Forming Chitosan from Manado Bay, Indonesia. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2021;24(2):227-234. doi:10.3923/pjbs.2021.227.234
50. Halder SK, Maity C, Jana A, Pati BR, Mondal KC. Chitinolytic enzymes from the newly isolated *Aeromonas hydrophila* SBK1: study of the mosquitocidal activity. *BioControl.* 2012;57(3):441-449. doi:10.1007/s10526-011-9405-3
51. Cody RM. Distribution of chitinase and chitobiase in bacillus. *Curr Microbiol.* 1989;19(4):201-205. doi:10.1007/BF01570162
52. Gonfa TG, Negessa AK, Bulto AO. Isolation, screening, and identification of chitinase-producing bacterial strains from riverbank soils at Ambo, Western Ethiopia. *Heliyon.* 2023;9(11):e21643. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e21643
53. Annamalai N, Veeramuthu Rajeswari M, Vijayalakshmi S, Balasubramanian T. Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes faecalis* AU02 by

- utilizing marine wastes and its antioxidant activity. *Ann Microbiol.* 2011;61(4):801-807. doi:10.1007/s13213-011-0198-5
54. Tasharrofi N, Adrangi S, Fazeli M, Rastegar H, Khoshayand MR, Faramarzi MA. Optimization of Chitinase Production by *Bacillus pumilus* Using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. *Iran J Pharm Res.* 2011;10(4):759-768.
 55. Gessesse A. The use of nug meal as a low-cost substrate for the production of alkaline protease by the alkaliphilic *Bacillus* sp. AR-009 and some properties of the enzyme. *Bioresour Technol.* 1997;62(1-2):59-61. doi:10.1016/S0960-8524(97)00059-X
 56. Urbina-Salazar A del R, Inca-Torres AR, Falcón-García G, et al. Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* Grown on a Chitin-Rich Mushroom Byproduct Formulated Medium. *Waste Biomass Valorization.* 2019;10(10):2915-2923. doi:10.1007/s12649-018-0328-4
 57. Hassainia A, Satha H, Boufi S. Chitin from *Agaricus bisporus*: Extraction and characterization. *Int J Biol Macromol.* 2018;117:1334-1342. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.172
 58. Praveen Kumar GN, Bhat SK. Preparation of Chitin Nano Whiskers from Mushrooms. *International Journal of Scientific and Research Publications (IJSRP).* 2018;8(8). doi:10.29322/IJSRP.8.8.2018.p8017
 59. Cárdenas G, Cabrera G, Taboada E, Miranda SP. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ¹³ C cross polarization/mass angle spinning NMR. *J Appl Polym Sci.* 2004;93(4):1876-1885. doi:10.1002/app.20647
 60. Majtán J, Bíliková K, Markovič O, Gróf J, Kogan G, Šimúth J. Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). *Int J Biol Macromol.* 2007;40(3):237-241. doi:10.1016/j.ijbiomac.2006.07.010
 61. Bzducha-Wróbel A, Kieliszek M, Błażej S. Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with

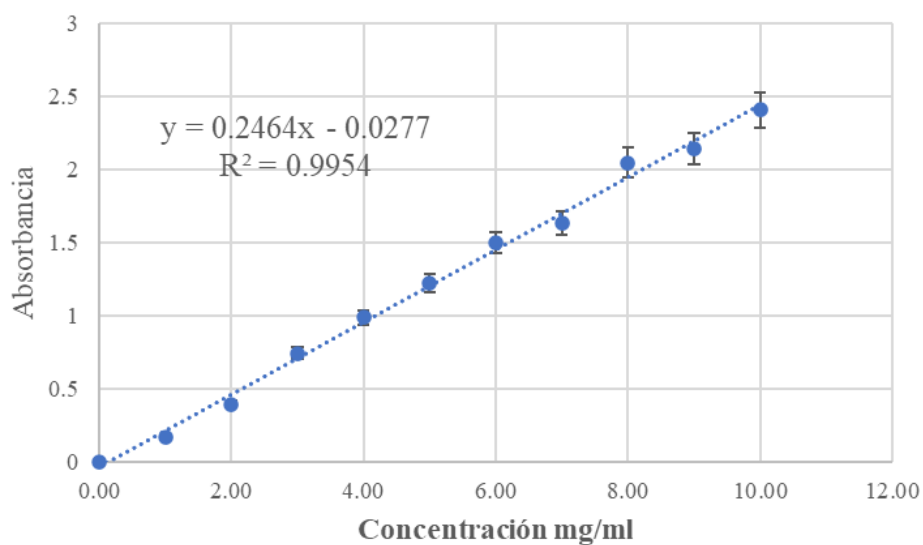
- glycerol as a carbon source. *European Food Research and Technology*. 2013;237(4):489-499. doi:10.1007/s00217-013-2016-8
62. Tian Y, Zeng H, Xu Z, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Carbohydr Polym*. 2012;88(2):522-529. doi:10.1016/j.carbpol.2011.12.042
63. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr*. 2017;5(3). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016
64. Wang X, Zhao Y, Tan H, et al. Characterisation of a chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6, a marine psychrophilic bacterium. *Int J Biol Macromol*. 2014;70:455-462. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.07.033

APÉNDICE 1. CURVA DE CALIBRACIÓN, CUANTIFICACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES

A partir de una solución stock de GluNAc de 10 mg/ml se prepararon los siguientes estándares;

<i>Estándar (mg/ml)</i>	<i>Volumen de stock (μL)</i>	<i>Volumen de agua (μL)</i>
1	100	900
2	200	800
3	300	700
4	400	600
5	500	500
6	600	400
7	700	300
8	800	200
9	900	100
10	1000	0

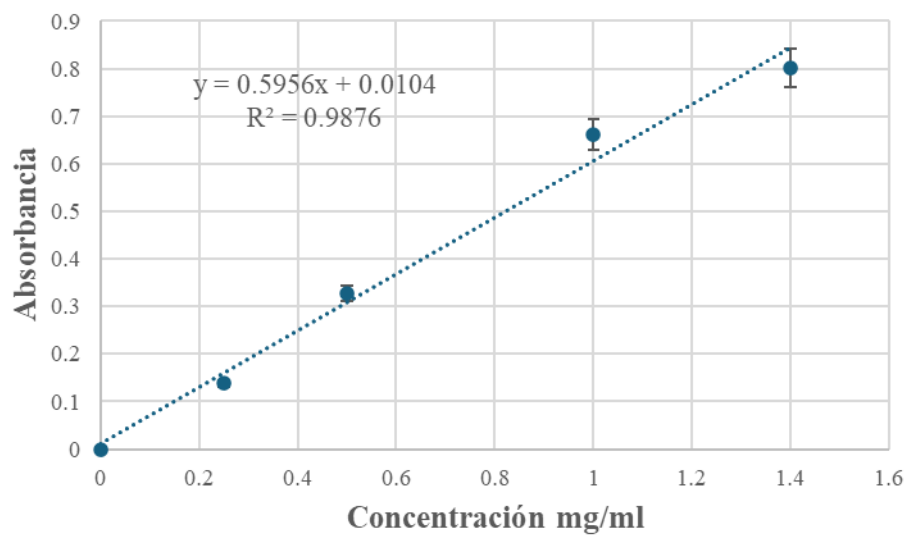
A partir de estos estándares se siguieron los pasos descritos en la metodología 4.4.1 según el método de DNS para la cuantificación de azúcares reductores, se obtuvo la siguiente tabla.



APÉNDICE 2. CURVA DE CALIBRACIÓN CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Los contenidos de proteína total se determinaron según el método de Bradford (1976) utilizando estándares de albumina de suero bovino entre 0-1.4 mg/ml.

Se tomaron 50 microlitros de cada estándar en reacción con 1.5ml de reactivo Bradford durante 15min y se leyó a una absorbancia de 595nm.



APÉNDICE 3. SECUENCIA CONSENSO DEL GEN 16S DE LA ACTINOBACTERIA AISLADA DEL CERRO DE LA SILLA

La secuencia de la actinobacteria aislada del cerro de la silla obtenida por el método de Sanger se trató hasta la siguiente secuencia consenso:

CATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGT
GAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACG
GGGTCTAATACCGGATACGAGTTCGGGAGGCATCTCCCGGGCTGGAAAGCT
CCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATG
GCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGC
CTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCT
GCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGT
CACGTCGGGTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATCCGATACG
GGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCA
TTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGT
CGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCAT
GTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACC
GGAAAGCGCCAGAGATGGTGCCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTGTCCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCAC
AGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAT
CATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGA
GCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCG
ATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGA
TCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGA
GGGAGC