



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Maestría en Biotecnología

**Obtencion de quitinasas con
hongos del género *Psilocybe***

TESIS

**Para obtener el grado de
Maestro en Biotecnologia**

Presenta:

I.B.Q. Demetrio de Jesús Martínez Rosales

Directora de Tesis:

Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño

Tuxtepec, Oaxaca, 2019





UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP 2019/MBT/044
ASUNTO	Jurado de examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 26 de marzo de 2019

C. DEMETRIO DE JESÚS MARTÍNEZ ROSALES
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores,

Dra. Rubí Guadalupe Utrilla Coello	UNPA	Presidente
Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño	UNPA	Vocal
Dra. Alma Xochil Avila Alejandre	UNPA	Secretario
Dr. Miguel Ángel Peña Rico	UNPA	1er Suplente
Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura	Cátedras CONACYT-UV	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji ju



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado



M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico

Vo. Bo. VICE-RECTORIA
ACADEMICA

C.c.p. Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño– Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

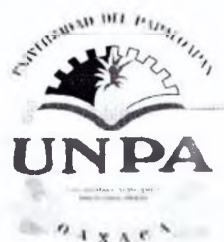
CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S.N. Ciudad universitaria.
C.P. 68000, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(287)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/183
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 26 de marzo de 2019

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del **C. Demetrio de Jesús Martínez Rosales**, matrícula **13140010**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Obtención de quitinasas con hongos del género *Psilocybe***" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jù



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Demetrio de Jesús Martínez Rosales
C.c.p. Archivo

Reconocimientos

Agradezco a la Universidad del Papaloapan por todas las facilidades y apoyo brindado para realizar mis estudios en la Maestría en Biotecnología, por brindarme los materiales y los equipos necesarios para llevar a cabo la parte experimental de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Investigación de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca 296196 que me fue otorgada para realizar el proyecto de Maestría en Biotecnología.

Agradecimientos

A Dios por darme la fuerza y la paciencia, para seguir adelante en esta nueva etapa de mi desarrollo profesional.

A la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño, por ser una excelente directora de tesis, por enseñarme a seguir aprendiendo, que es necesario esforzarse para alcanzar las metas deseadas y obtener buenos resultados. Agradezco sus exigencias y conocimientos transmitidos a lo largo de mi estancia en la UNPA y que fueron plasmados en esta tesis. Por seguir apoyándome durante todo este tiempo y darme la confianza que me están ayudando a mejorar profesionalmente. Gracias por su comprensión y ayuda durante estos años.

A mis compañeros de maestría Francisco, Alain, Luisa, Ofelia, Avenamar, Rigoberto, Nancy, Karina, Jade y Guadalupe.

A mis compañeros del laboratorio Flías, Daniel Arnulfo, Daniel, Sandra, Adolfo, Ivone, Osiris, Rosa, Alan y Marely.

A la química Leticia y el ingeniero Juan.

Dedicatorias

A MIS PADRES

A mis padres por darme la vida para poder crecer como persona y desarrollarme profesionalmente.

A MI HERMANA

A mi hermana por apoyarme y darme consejos para seguir adelante.

I. Índice

1. INDICE

I. Índice.....	I
II. Índice de figuras.....	IV
III. Índice de Tablas	VI
IV. Resumen.....	VIII
IV. Abstract	XI
1. Hongos.....	3
1.1. Generalidades	3
1.2. Estructura de los hongos	6
1.3. Despolimerización de la quitina.....	10
1.4. Hongos Basidiomycota	11
1.4.1. Generalidades de este Filo	11
1.4.2. Reproducción de los hongos Basidiomycota	12
1.4.3. Aplicaciones biotecnológicas de Basidiomycota.....	14
2. Género <i>Psilocybe</i>	16
2.1. Morfología del género <i>Psilocybe</i>	18
2.2. Alcaloides producidos por el género <i>Psilocybe</i>	20
2.3. Biosíntesis de la psilocibina	21
3. Fermentación Líquida.....	23
3.1. Crecimiento microbiano	24
3.2. Parámetros cinéticos asociados a la fermentación	28
3.2.1. Rendimientos.....	28
3.2.2. Formación de productos.....	29
3.2.3. Mantenimiento	30
3.2.4. Consumo de sustrato	31
3.2.5. Fuente de carbono.....	32
3.2.6. Temperatura.....	33
3.2.7. Agitación	34
3.2.8. pH.....	36
3.2.9. Concentración del inóculo.....	37
3.2.10. Micronutrientes	38

3.3.	Producción de enzimas en hongos macroscópicos	44
3.3.1.	Óxido reductasas.....	45
3.3.2.	Hidrolasas	46
3.3.3.	Producción de enzimas en hongos del género <i>Psilocybe</i>	47
4.	ANTECEDENTES.....	48
5.	JUSTIFICACIÓN.....	50
6.	HIPÓTESIS	51
7.	OBJETIVOS.....	51
7.1.	Objetivo general	51
7.2.	Objetivos específicos	51
8.	MATERIALES Y MÉTODOS	52
8.1.	Ubicación	52
8.2.	Microorganismo	52
8.3.	Aislamiento	52
8.4.	Producción de quitinasas.....	53
8.4.1.	Producción del inóculo	53
8.4.1.1.	Detección de alcaloides sobre los aislados fúngicos.....	54
8.4.2.	Fermentación líquida.....	55
8.4.3.	Tratamiento de las muestras de fermentación.....	56
8.5.	Análisis de las muestras de la fermentación	56
8.5.1.	Determinación de proteína soluble	56
8.5.2.	Determinación de biomasa	56
8.5.3.	Determinación de actividad enzimática.....	57
8.5.3.1.	Determinación de N-acetilhexosaminidasa.....	57
8.5.3.2.	Determinación de actividad endoquitinasas.....	57
8.5.3.3.	Determinaciones de otros parámetros enzimáticos.....	57
8.5.4.	Determinación de azúcares reductores	58
8.5.4.1.	Consumo de glucosa	58
8.5.5.	Detección cualitativa de alcaloides.....	59
8.5.5.1.	Análisis colorimétrico de las muestras durante las fermentaciones líquidas.	59
8.5.5.2.	Prueba de Ehrlich modificada de Kovacs	59
8.5.5.3.	Análisis colorimétrico Color Flex (Método HunterLab).....	60

8.5.6. Modelamiento matemático.....	60
8.6. Análisis estadístico.....	60
9. RESULTADOS Y DISCUSIONES	62
9.1. Selección de aislados con mayor presencia de alcaloides.....	62
9.2. Determinaciones de las fermentaciones líquidas con el aislado DMRN1.....	63
9.2.1. Biomasa y tasa de consumo de glucosa.....	63
9.2.1.1. Fermentación con glucosa y fosfato	65
9.2.1.2. Fermentación con glucosa sin fosfato	68
9.2.1.3. Fermentación con quitina.....	71
9.2.1.4 Modelamiento matemático para la fermentación con quitina.	75
9.2.2. Proteína soluble.....	77
9.2.2.1. Fermentación con glucosa y fosfato	77
9.2.2.2. Fermentación con glucosa sin fosfato	78
9.2.2.3. Fermentación con quitina.....	79
9.2.3. Endoquitinasas	81
9.2.3.1. Fermentación con glucosa y fosfato	81
9.2.3.2. Fermentación con glucosa sin fosfato	83
9.2.3.3. Fermentación con quitina.....	85
9.2.4. Exoquitinasas	87
9.2.4.1. Fermentación con glucosa y fosfato	88
9.2.4.2. Fermentación con glucosa sin fosfato	90
9.2.4.3. Fermentación con quitina.....	90
9.2.5. Prueba colorimétrica del aislado DMRN1 realizada en las fermentaciones.....	93
9.3. Determinaciones en las Fermentaciones líquidas con el aislado DMRN2	95
9.3.1. Biomasa.....	95
9.3.1.1. Fermentación con glucosa y fosfato	96
9.3.1.2. Fermentación con glucosa sin fosfato	99
9.3.1.3. Fermentación con quitina.....	102
9.3.2. Proteína soluble.....	107
9.3.2.1. Fermentación con glucosa y fosfato	107

9.3.2.2.	Fermentación con glucosa sin fosfato	108
9.3.2.3.	Fermentación con quitina.....	108
9.3.3.	Exoquitinasas	111
9.3.3.1.	Fermentación con glucosa y fosfato	111
9.3.3.2.	Fermentación con glucosa sin fosfato	112
9.3.3.3.	Fermentación con quitina.....	113
9.3.4.	Endoquitinasas	116
9.3.4.1.	Fermentación con glucosa y fosfato	116
9.3.4.2.	Fermentación con glucosa sin fosfato	118
9.3.4.3.	Fermentación con quitina.....	120
9.3.5.	Prueba colorimétrica del aislado DMRN2 realizada en las fermentaciones.....	122
9.4.	Análisis estadístico para determinar el efecto de la fuente de carbono y del fosfato, sobre las quitinasas de los aislados DMRN1 Y DMRN2.	124
9.4.1	Aislado DMRN1.....	124
9.4.1.1	Efecto de la fuente de carbono.	124
9.4.1.2	Efecto del fosfato.	126
9.4.2	Aislado DMRN2.....	128
9.4.2.1	Efecto de la fuente de carbono.	128
9.4.2.2	Efecto del fosfato.	130
10.	CONCLUSIONES.....	132
11.	PERSPECTIVAS.....	133
12.	REFERENCIAS.....	134
13.	ANEXOS	141

II. Índice de figuras

Fig. 1.	Estructura del talo	5
Fig. 2.	Estructura de la hifa	8
Fig. 3.	Ruta de degradación de la quitina	10
Fig. 4.	Clasificación de los hongos.....	11
Fig. 5.	Ciclo de vida de los hongos basidiomicetos	13
Fig. 6.	Morfología macro y microscópica de los hongos	19

Fig. 7. Estructura de la psilocina, psilocibina modificado de Mahmood	20
Fig. 8. Ruta metabolica de los alcaloides.....	22
Fig. 9. Fases del crecimiento microbiano.....	25
Fig. 10. Concentrado de los aislados DMRN1 y DMRN2.....	53
Fig. 11. Determinacion de alcaloides en los aislados.....	54
Fig. 12. Reaccion del indol.....	59
Fig. 13. Reaccion de la psilocibina.....	59
Fig. 14. Concentrado de los aislados con una mayor coloracion.....	62
Fig. 15. Cinetica de crecimiento y tasa de consumo del aislado DMRN1.....	64
Fig. 16. Cinetica de crecimiento y consumo de quitina del aislado DMRN1.....	75
Fig. 17. Proteína soluble de la cepa DMRN1.....	80
Fig. 18. Endoquitinasas de la cepa DMRN1.....	87
Fig. 19. Exoquitinasas de la cepa DMRN1.....	92
Fig. 20. Cinetica de crecimiento y tasa de consumo del aislado DMRN2.....	95
Fig. 21. Cinetica de crecimiento y consumo de quitina del aislado DMRN2.....	106
Fig. 22. Proteina soluble de la cepa DMRN2.....	110
Fig. 23. Exoquitinasas de la cepa DMRN2.....	115
Fig. 24. Endoquitinasas de la cepa DMRN2.....	121
Fig. 25. Efecto de la fuente de carbono en el aislado DMRN1.....	125
Fig. 26. Efecto del fosfato en el aislado DMRN1.....	127
Fig. 27. Efecto de la fuente de carbono en el aislado DMRN2.....	129
Fig. 28. Efecto del fosfato en el aislado DMRN2.....	131
Fig. 29. Curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA).....	141
Fig. 30. Curva estándar de N-acetilhexosaminidasa.....	141
Fig. 31. Curva estándar de azucares reductores con NAG.....	142
Fig. 32. Curva estándar de azucares reductores con glucosa.....	142
Fig. 33. Determinacion de azucares reductores con el aislado DMRN1.....	144
Fig. 34. Determinacion de azucares reductores con el aislado DMRN2.....	145
Fig. 35. Efecto de la velocidad de agitacion.....	146
Fig. 36. Estructura de la alosamidina.....	150

III. Índice de Tablas

Tabla 1. Productos de interés biotecnológico.....	15
Tabla 2. Rendimientos de biomasa.....	28
Tabla 3. Coeficientes de mantenimiento de microorganismos.....	32
Tabla 4. Ejemplos de fermentación líquida con diferentes hongos.....	39
Tabla 5. Medio Czapeck modificado.....	55
Tabla 6. Concentración de las esporas.....	56
Tabla 7. Parámetros cinéticos con glucosa en el aislado DMRN1.....	68
Tabla 8. Parámetros cinéticos con glucosa sin fosfato en el aislado DMRN1.....	71
Tabla 9. Parámetros cinéticos con quitina en el aislado DMRN1.....	74
Tabla 10. Detección de alcaloides con el aislado DMRN1.....	94
Tabla 11. Parámetros cinéticos con glucosa en el aislado DMRN2.....	99
Tabla 12. Parámetros cinéticos con glucosa sin fosfato en el aislado DMRN2.....	102
Tabla 13. Parámetros cinéticos con quitina en el aislado DMRN2.....	106
Tabla 14. Detección de alcaloides con el aislado DMRN2.....	123
Tabla 15. Relación C/N de los medios de fermentación.....	143
Tabla 16. Modelamiento matemáticos en la fermentación con quitina.....	143
Tabla 17. Tasa de consumo del sustrato	147
Tabla 18. Colorimetría de la fermentación con quitina del aislado DMRN1.....	148
Tabla 19. Colorimetría de la fermentación con glucosa del aislado DMRN1.....	148
Tabla 20. Colorimetría de la fermentación con glucosa sin fosfato del aislado DMRN1.....	148
Tabla 21. Colorimetría de la fermentación con quitina del aislado DMRN2.....	149
Tabla 22. Colorimetría de la fermentación con glucosa del aislado DMRN2.....	149
Tabla 23. Colorimetría de la fermentación con glucosa sin fosfato del aislado DMRN2.....	149
Tabla 24. Anova del efecto de carbono de la actividad enzimática en el aislado DMRN1.....	151
Tabla 25. Anova del efecto de carbono de la actividad específica en el aislado DMRN1.....	151

Tabla 26. Anova del efecto de carbono de la productividad en el aislado DMRN1.....	151
Tabla 27. Anova del efecto del fosfato de la actividad enzimática en el aislado DMRN1.....	152
Tabla 28. Anova del efecto del fosfato de la actividad específica en el aislado DMRN1.....	152
Tabla 29. Anova del efecto del fosfato de la productividad en el aislado DMRN1.....	152
Tabla 30. Anova del efecto de carbono de la actividad enzimática en el aislado DMRN2.....	153
Tabla 31. Anova del efecto de carbono de la actividad específica en el aislado DMRN2.....	153
Tabla 32. Anova del efecto de carbono de la productividad en el aislado DMRN2.....	153
Tabla 33. Anova del efecto del fosfato de la actividad enzimática en el aislado DMRN2.....	154
Tabla 34. Anova del efecto del fosfato de la actividad específica en el aislado DMRN2.....	154
Tabla 35. Anova del efecto del fosfato de la productividad en el aislado DMRN2.....	154

IV. Resumen

La biotecnología es un conjunto de técnicas que se enfoca en usar organismos, células o componentes celulares para producir y desarrollar nuevas tecnologías, herramientas y productos. Una de las herramientas principales es la fermentación. En esta, se han utilizado de manera exitosa desde hace siglos a las bacterias y levaduras, sin embargo, se tienen casos exitosos del empleo de hongos, que son todo un reto por sus diferencias morfológicas y metabólicas durante el curso de las fermentaciones.

Los hongos son organismos de gran importancia porque son los descomponedores primarios en los ecosistemas terrestres; son esenciales para la supervivencia de muchos grupos de organismos; son sistemas de modelos genéticos bien desarrollados para moléculas biológicas; tienen un potencial significativo para la agricultura y muestran por ende un gran potencial para la biotecnología. Dada su asociación con la quitina, el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, durante diferentes etapas de crecimiento y desarrollo de mecanismos de defensa contra patógenos (secreción de enzimas), se consideró de interés estudiar un grupo de hongos poco analizado como biofábricas de enzimas quitinolíticas: los hongos alucinógenos.

El aspecto económico asociado a la comercialización de enzimas fue importante considerarlo en esta investigación. Dentro de las enzimas de origen fúngico (no levaduriformes ni modificadas genéticamente) con alto grado de pureza, comercializadas por la empresa SIGMA-ALDRICH (datos actualizados hasta marzo del 2019), se encuentran las α -amilasas, catalasas, celulasas, lipasas y las quitinasas. Las enzimas más baratas del grupo anterior son las celulasas, aunque cabe mencionar que, dependiendo de la fuente, facilidad de producción y purificación, es el costo, pues el costo de una celulasa de *Aspergillus niger* (un hongo muy común) oscila en \$38 pesos/g proteína, mientras que la celulasa de *Trichoderma reesei* puede cotizarse en \$390 pesos/g proteína. Las enzimas que encabezan el grupo de las más costosas, son las quitinasas de *Trichoderma viride*, cotizadas en \$174,384 pesos/g proteína.

Se cumple aquí que entre más ubicuita y fácil de manejar sea el hongo, mas barato es el costo de la enzima, pues la quitinasa de *Trichoderma harzianum* tiene un costo de \$424 pesos/g proteína. Por esta razón, se consideró que las quitinasas de hongos no tan comunes, como los alucinógenos del género *Psilocybe*, pueden representar un valor agregado, dentro del procesamiento de la quitina y por otra parte, por ser estas especies relativamente abundantes en el estado de Oaxaca, podrían ser una opción no sólo a la investigación, sino una alternativa al uso de los recursos de estas regiones para generar un aporte económico.

En este estudio se analizaron dos aislados de la región de Huautla de Jiménez, Oaxaca. El aislado DMRN1 por dar una prueba positiva al alcaloide psilocibina (coloración azulácea) y el aislado DMRN2, cuya respuesta a la prueba de alcaloides fue atenuada (coloración anaranjada), indicando posiblemente la presencia de alcaloides análogos. Con estos aislados se desarrolló un inóculo de esporas para realizar las fermentaciones líquidas, con el objetivo de determinar la capacidad productora de quitinasas, y cómo se asocia el metabolismo de secreción de estas enzimas con la formación de alcaloides.

Se estudiaron dos fuentes de carbono (quitina y glucosa) en la producción de enzimas quitinolíticas y el efecto que tiene el fosfato en la producción de alcaloides indólicos, los cuales por su toxicidad se trataron de inhibir.

Los resultados que se obtuvieron de este estudio fueron que el aislado DMRN1 tuvo la mayor actividad volumétrica de endoquitinasas (3.92 U/mL) con una fuente de carbono de glucosa sin fosfato, dando una productividad de 40.83 U/mL*hr y una actividad específica de 59333 U/mg.

Mientras la mayor actividad volumétrica de exoquitinasas (0.00027 U/mL) fue con el aislado DMRN2 en la fermentación con glucosa como fuente de carbono, dando una productividad de 0.0019 U/mL*hr y una actividad específica de 23.92 U/mg.

Se concluye que los hongos estudiados del género *Psilocybe* tienen una mayor actividad de endoquitinasas.

En el aislado DMRN1 la **ausencia** de fosfato fue favorable sobre la expresión de ambas enzimas, las cuales se extraerían con mayor productividad a las 48h.

En el aislado DMRN2, la **presencia** de fosfato, fue favorable sobre ambas enzimas, sin embargo las exoquitinasas se extraerían a las 48h y las endoquitinasas a las 72h con mayor productividad.

El fosfato tuvo estadísticamente, un efecto más remarcado y favorable, sobre la expresión de ambas enzimas, en comparación al efecto de la fuente de carbono. El fosfato además tuvo injerencia sobre los alcaloides monitoreados.

IV. Abstract

Biotechnology is a set of techniques that focuses on using organisms, cells or cellular components to produce and develop new technologies, tools and products. One of the main tools is fermentation. In this, bacteria and yeast have been successfully used for centuries, however, there are successful cases of the use of fungi, which are a challenge due to their morphological and metabolic differences during the course of fermentation.

Fungi are organisms of great importance because they are the primary decomposers in terrestrial ecosystems; they are essential for the survival of many groups of organisms; they are systems of well-developed genetic models for biological molecules; They have a significant potential for agriculture and therefore show great potential for biotechnology. Given its association with chitin, the second most abundant biopolymer in nature, during different stages of growth and development of defense mechanisms against pathogens (secretion of enzymes), it was considered of interest to study a group of fungi little analyzed as biofactories of chitinolytic enzymes: the hallucinogenic mushrooms.

The economic aspect associated with the commercialization of enzymes was important to consider in this investigation. Within the enzymes of fungal origin (non-yeast-like or genetically modified) with a high degree of purity, marketed by the company SIGMA-ALDRICH (data updated until March 2019), are α -amylases, catalases, cellulases, lipases and chitinases. The cheapest enzymes of the previous group are the cellulases, although it is worth mentioning that, depending on the source, ease of production and purification, is the cost, since the cost of a cellulase of *Aspergillus niger* (a very common fungus) ranges in \$ 38 pesos / g protein, while *Trichoderma reesei* cellulase can be quoted at \$ 390 pesos / g protein. The enzymes that lead the group of the most expensive are the chitinases of *Trichoderma viride*, quoted at \$ 174,384 pesos / g protein. It is fulfilled here that the more ubiquitous and easy to handle is the fungus, the cheaper the cost of the enzyme, since the chitinase of *Trichoderma harzianum* has a cost of \$ 424 pesos / g protein.

For this reason, it was considered that not very common fungal chitinases, such as the hallucinogens of the genus *Psilocybe*, can represent an added value, within the processing of chitin, and on the other hand, because these species are relatively abundant in the state of Oaxaca, could be an option not only to research, but an alternative to the use of the resources of these regions to generate an economic contribution.

In this study, two isolates from the Huautla de Jiménez region in Oaxaca, were analyzed. The DMRN1 isolate by giving a positive test to the alkaloid psilocybin (bluish coloration) and the DMRN2 isolate, whose response to the alkaloid test was attenuated (orange coloration), possibly indicating the presence of analogous alkaloids. With these isolates, an inoculum of spores was developed to perform the liquid fermentations, in order to determine the production capacity of chitinases, and how the metabolism of secretion of these enzymes is associated with the formation of alkaloids.

Two carbon sources (chitin and glucose) were studied in the production of chitinolytic enzymes and the effect that phosphate has on the production of indole alkaloids, which due to their toxicity they were tried to inhibit.

The results obtained from this study were that the DMRN1 isolate had the highest volumetric activity of endochitinases (3.92 U/mL) with a non-phosphate glucose carbon source, giving a productivity of 40.83 U/mL*h and a specific activity of 59333 U/mg.

While the highest volumetric activity of exochitinases (0.00027 U/mL) was with the DMRN2 isolate it was in the fermentation with a glucose carbon source, giving a productivity of 0.0019 U/mL*h and a specific activity of 23.92 U/mg.

It is concluded that the studied fungi of the *Psilocybe* genus, have a higher activity of endochitinases.

In DMRN1 isolate, the absence of phosphate favored the expression of both enzymes, which would be extracted with greater productivity at 48h. In DMRN2 isolate, the presence of phosphate was favorable over both enzymes, however, the exochitinases would be extracted at 48h, and the endochitinases at 72h with higher productivity.

The phosphate had statistically, a more pronounced and favorable effect on the expression of both enzymes, compared to the effect of the carbon source. The phosphate also had an influence on the monitored alkaloids.

Introducción

El reino Fungi engloba a las levaduras, hongos filamentosos (antes denominados mohos) y hongos formadores de setas. Desde la antigüedad, las levaduras se han utilizado para la fabricación de pan, vino o cerveza, mientras que las setas como remedios medicinales, teniendo cierta importancia económica. Con el desarrollo de la ingeniería genética y más tarde con la biotecnología, se dio paso al mejoramiento de levaduras como *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae* para producción de proteínas recombinantes. De interés particular para la biotecnología, han sido los hongos filamentosos, ya que, con más de 6 millones de especies, representan un recurso importante para aplicaciones y procesos sostenibles en el futuro. Empresas líderes mundiales como AB Enzymes, BASF, Bayer, Chr. Hansen, DSM, DuPont, Novozymes, Puratos y Royal Oy, han usado a los hongos filamentosos como fábricas celulares a gran escala, para la producción de ácidos orgánicos, proteínas, enzimas y fármacos de moléculas pequeñas que incluyen antibióticos, estatinas y esteroides. Como sistemas de producción, estos hongos se consideran superiores a los sistemas basados en bacterias y levaduras, en términos de versatilidad metabólica, robustez y capacidad secretora. De hecho, tan sólo el área de producción de enzimas degradantes de biomasa de plantas, constituye por si sola un mercado de €4.7 mil millones, esperando se duplique en los próximos 10 años. No obstante, existen aspectos en relación con el suministro de alimentos y la seguridad, por la aparición de nuevos aislamientos hipervirulentos y la propagación de patógenos a nuevas áreas geográficas, que deben contemplarse (Meyer y col.2016).

En lo que respecta a los hongos formadores de setas, éstos están incluidos en la división Basidiomycota, la cual abarca más de 25,000 especies y es considerado el grupo más interesante de hongos macroscópicos, por las diferentes formas y tamaños de su cuerpo fructífero, la estructura diferenciada más compleja del reino Fungi (O'Neil y col.1991). Estos hongos, que en su mayoría son saprofitos, tienen la excepcional habilidad de ajustarse a diferentes condiciones ambientales.

Especies de estos hongos son cultivados y comercializados en muchos países como alimentos, alimentos nutricionales y medicinas (Van Driel y col.2007). La producción de enzimas extracelulares a partir de estos hongos ha sido desarrollada extensivamente a través del uso de la fermentación sumergida y fermentación en sustrato sólido (García y Torres, 2003). Casos exitosos de setas de importancia tanto medicinal como alimenticia, son *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum*. Actualmente, se han empleado a hongos comestibles de los géneros *Daedalea*, *Steraceae*, *Pycnoporus* y *Cantharellus*, para la producción de vitaminas, esteroides, antibióticos, aminoácidos y enzimas de interés económico (celulasas, proteasas, amilasas, fenol oxidasas y pectinasas), mostrando la versatilidad metabólica de estos hongos (Souza y col.2008).

Acorde a la literatura, existen pocos estudios respecto a la producción de enzimas por parte de hongos productores de alcaloides, los cuales son de gran abundancia en el estado de Oaxaca, en particular el género *Psilocybe*. Las mismas razones que se han observado en el caso de hongos filamentosos son aplicables a este género: (i) la fisiología asociada a la secreción de enzimas, aún es pobremente entendida, (ii) el conocimiento sobre la secreción mejorada de cierta proteína no necesariamente es transferible a otras proteínas y sistemas fúngicos, (iii) existen limitaciones en la productividad debido a morfologías macroscópicas no óptimas y (iv) producción indeseable de micotoxinas durante la fermentación. Por tal motivo y a fin de ampliar la gama de recursos bióticos para la producción de enzimas, que es un área demandante para la biotecnología, esta investigación se enfocó al estudio de hongos alucinógenos como productores de enzimas, en este caso quitinasas, las cuales se sabe son enzimas constitutivas en la mayoría de los hongos y tiene diversas aplicaciones.

Marco Teórico

1. Hongos

1.1. Generalidades

Los hongos constituyen un grupo heterogéneo. Sus células poseen núcleos verdaderos, donde están encerrados los cromosomas. Además, las células eucariotas suelen ser mayores y más complejas. Normalmente los hongos, suelen presentar muchos núcleos en sus cuerpos. Por supuesto, hay especies microscópicas, con un solo núcleo, como las levaduras. En ocasiones, como en el caso de los animales, el cuerpo está dividido en muchas células, cada una con su correspondiente núcleo. En otras, en cambio, el cuerpo o talo no está dividido en células, y los núcleos están libres en él (Ruan y col. 2006).

Los hongos son ubicuas y cosmopolitas; pueden aparecer prácticamente en cualquier sitio, y alimentarse de lo más insospechado. Se conocen más de 80,000 especies de hongos, aunque probablemente existen más especies aún no descritas (tal vez más de un millón). La mayor parte de los hongos son saprofitos. Por otro lado, hay varios miles de especies, que parasitan a las plantas. En comparación, sólo unas cincuenta especies provocan enfermedades (micosis) en humanos. Otros hongos viven en simbiosis mutualistas, como los líquenes (con algas) y las micorrizas (con las raíces vegetales, casi siempre imprescindibles para la supervivencia de las plantas en ecosistemas naturales). Para el ser humano, los hongos también son muy importantes, debido a la gran diversidad de usos que les ha dado: alimentación, de uso ceremonial, medicinal y biotecnológico, además de que son causantes de enfermedades (Guzmán, 1995). En este trabajo se van a estudiar hongos macroscópicos o del filo Basidiomycota.

Existe confusión entre el término hongo y seta. Para algunos, los hongos son algún tipo de seta, comestible o no. Las setas, son las fructificaciones o cuerpos fructíferos de ciertos hongos macroscópicos (Ruan y col. 2006).

Las setas, han sido empleadas por el hombre desde hace milenios, tanto para la alimentación, como para el tratamiento de diferentes enfermedades, siendo los países del lejano oriente, como Japón, China y Corea, los consumidores más habituales.

Recientemente, se ha incrementado el interés por las setas, como fuente de compuestos activos biológicos. Esta nueva clase de compuestos, denominados nutraceuticos, son extraíbles, ya sea del micelio fúngico o del cuerpo fructífero. De hecho, los metabolitos secundarios, que producen los macromicetos y que les dan características nutraceuticas especiales, han sido en su mayoría aislados del carpóforo (conocido como sombrero, ver figura 1). Investigaciones preliminares, realizadas sobre basidiomicetos, han puesto de manifiesto, que la proporción de estos compuestos, varía tanto con el estado del hongo, como con el medio en que es cultivado (Guzmán, 1995). En las últimas décadas, se ha intensificado a nivel mundial no sólo el cultivo, sino el consumo de este tipo de hongos, debido a la comprobación de las diversas actividades biológicas, exhibidas por sus metabolitos secundarios, entre las que se encuentran, las actividades antioxidantes, hipocolesterolémicas, hipoglucémicas, antibacterianas, antivirales, reguladoras del sistema cardiovascular, anticancerígenas e inmunomoduladoras (Mirca Zotti, 2001).

En la actualidad algunos de estos compuestos, se extraen para ser empleados en la producción de medicamentos comerciales y representan un componente importante, en la expansión de la industria biotecnológica (Chang y Buswell, 1996).

En la figura 1 se observa la estructura del talo (soma o cuerpo vegetativo), de un hongo macroscópico. El talo está cubierto de una pared de quitina (en los hongos típicos) o de celulosa en algunos casos, en otros, el talo no presenta pared. Lo que vemos sobre la superficie, con diversas formas y a veces con “sombrito” y que también llamamos hongos, son los órganos reproductivos de uno de los grupos (Guzmán, 1995).

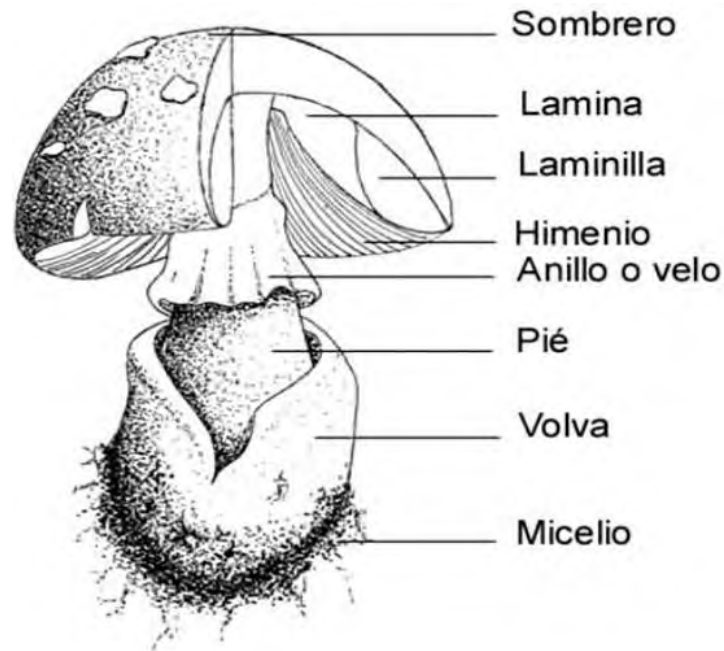


Figura 1. Estructura del talo de un hongo macroscópico (Ruiz, 2001).

Los hongos son esenciales en el reciclamiento de nutrientes, lo que se conoce como osmotrofia, mientras que la digestión, es externa y para ello segregan hidrolasas. La mayoría de los hongos, se nutren de materia orgánica muerta (saprobios), otros son parásitos y algunos son depredadores. Para nutrirse, los hongos primero descomponen la materia muerta, que se encuentra a su alrededor, en pequeñas moléculas, que después absorben, a través de las membranas de sus células. Gracias a su capacidad de descomponer la materia muerta, de animales y plantas, los hongos cumplen un rol importante en los ciclos biogeoquímicos, en todos los hábitats terrestres; contribuyen a regular las poblaciones de las plantas, animales e insectos que parasitan; y forman asociaciones con otros organismos, como son los líquenes y las micorrizas (Guzmán, 1995).

1.2. Estructura de los hongos

La mayoría de los hongos son pluricelulares y sus cuerpos están constituidos por filamentos tubulares microscópicos, denominados hifas, que se ramifican y entrecruzan. Al conjunto de hifas se le conoce como micelio. Sus células poseen una pared gruesa, de un compuesto (polisacárido) llamado quitina, el cual les provee rigidez y resistencia. Durante la reproducción sexual o asexual, los hongos producen esporas, que permiten su dispersión, hacia nuevos lugares o les ayudan a sobrevivir en condiciones adversas, como la deshidratación o la congelación. También pueden desarrollarse a partir de cualquier fragmento de micelio, por pequeño que sea, aunque esto no ocurre frecuentemente (Guzmán, 1995).

Aquellos que fructifican, logran producir esporocarpos (estructuras multicelulares sobre la que se forman otras estructuras), como el caso de las setas (Ruan y col. 2006).

Hay cambios profundos y dinámicos de la composición química y estructura de los polisacáridos de la pared celular, que ocurre en las diferentes etapas morfológicas de las setas y los hongos. Aparte de un cuerpo fructífero y micelio, algunos hongos comestibles, tienen una etapa llamada esclerocio, de un único desarrollo y que no se encuentra en otros hongos, para hacer frente a condiciones ambientales extremas. Mientras que la composición de polisacáridos, de la pared celular de los hongos, ha sido ampliamente estudiada en levaduras y hongos filamentosos, la composición de la pared celular de hongos superiores es relativamente menos conocida, especialmente para los esclerocios. Los principales componentes de la pared celular de los hongos, incluye glucanos, quitina y proteínas. La composición de los polisacáridos es la siguiente: glucosa (80%-90%), manosa (3%-7%), galactosa (2%-6%), xilosa (0.5-1%), arabinosa (0%-1%) y ácidos urónicos (2%-3%) (Lei y col. 2014).

Aunque difiere mucho de la pared celular de las esporas las cuales se componen de la pared de las hifas maduras, también está compuesta de glucanos y manoproteínas y una capa de quitosano que es quitina desacetilada (Smits y col.,2001).

La composición de la pared de los hongos es importante en este trabajo, ya que se busca la secreción de enzimas quitinolíticas que degradan la pared, pero que además se ocuparían en la degradación de la quitina presente en el medio de fermentación.

La membrana plasmática es una barrera, entre la hifa y el ambiente. Se compone de una bicapa de glicerofosfolípidos, en la cual, están anclados otros lípidos y varias proteínas, y difiere de las membranas subcelulares, porque contiene una alta proporción de esteroides y esfingolípidos. La mayoría de los hongos, contienen ergosterol. Debido a su estructura molecular, los esteroides y esfingolípidos están estrechamente aglomerados en dominios insertos en las membranas, que intervienen en procesos dinámicos, tales como ordenamiento de proteínas, secreción, endocitosis y polaridad celular.

Los nutrientes son asimilados, a través de la membrana plasmática, para lo cual los hongos poseen una diversidad de proteínas de transporte específicas. El tamaño, forma y número de las mitocondrias, cambia durante el ciclo celular, en respuesta a las condiciones ambientales. Los microcuerpos, son orgánulos con una membrana simple, entre los cuales se encuentran los cuerpos de Woronin y los peroxisomas. Estos últimos catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno, mediante una peroxidasa oxidando un sustrato. Los quitosomas, son microvesículas que contienen las enzimas que intervienen en la síntesis de las microfibrillas de quitina, que se acumulan en el ápice de las hifas en crecimiento. Las células fúngicas llevan a cabo las funciones “Golgi” en cisternas dispersas por el citoplasma, conectadas a vesículas, como se observa en la figura 2. Las vacuolas son frecuentes y pueden actuar como reguladoras del pH, reunir enzimas líticas, acumular metabolitos o sustancias de reserva, como los polifosfatos y compuestos nitrogenados. La membrana vacuolar, suele tener una bomba de protones o ATPasa, tal como la membrana citoplasmática. Las vacuolas pueden extenderse, por varios compartimientos hifales, constituyendo un sector separado del citoplasma, con alta concentración de solutos, que contribuye al movimiento bidireccional de los mismos. Este traslado es funcionalmente importante, en distancias de milímetros a centímetros.

Como la difusión, depende de la concentración, la dinámica del volumen vacuolar, permite el cambio de la dirección del flujo de los solutos, para proveer suficientes nutrientes al ápice durante el crecimiento y retornar con los recursos recién descubiertos al resto del organismo (Bonfante-Fasolo y col.1990).

La pared hifal puede ser incolora, hialina, u oscura con pigmentos pardos, relacionados a la melanina, que tiene una función de fotoprotección. Sin embargo, muchas veces el color de la colonia, es debido a la pigmentación de las esporas. Otro tipo de pigmentos (ácidos polipróticos, terpenilquinones y cinnabarina) suelen presentarse en algunas estructuras fúngicas, a veces disueltos en el citoplasma. Algunos macromicetos, contienen oxidasas que producen cambio de coloración, cuando es dañado, cortado o expuesto al aire (Bonfante-Fasolo y col.1990).

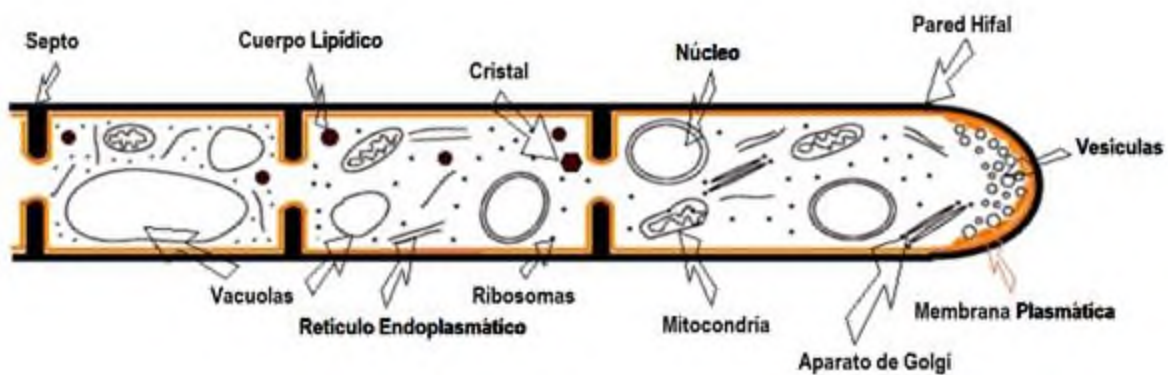


Figura 2. Estructura de la hifa (Ruiz, 2001).

Las paredes celulares de los hongos *Basidiomycota*, están formadas principalmente de β -1, 3-glucano y quitina. Las quitinasas y β -1,3-glucanasas, se localizan en vesículas cercanas al ápice de las hifas o en el sitio de ramificación, participan en la diferenciación de la pared celular y la extensión del micelio. Estas proteínas son secretadas, en el medio de cultivo, para digerir polisacáridos, que luego son asimilados por la célula (Mucha y col.2006).

En hongos filamentosos, la quitina se encuentra, en las capas internas de la pared celular (constituyendo alrededor del 20 % de esta estructura) cerca de la membrana plasmática, enmascarada por capas de otros carbohidratos y proteínas, expresando para su síntesis quitinasas, que no sólo participan en la hidrólisis de quitina exógena, sino también en la renovación y degradación de la pared celular. El contenido de quitina en hongos, varía entre especies y está en función de la concentración de quitinasas expresadas (Hartl y col.2011).

La pared celular de los hongos, juega un papel importante en la morfogénesis y con el medio ambiente. La pared celular cambia continuamente, durante el crecimiento, durante diferentes fases de desarrollo, como el apareamiento o la esporulación, y en respuesta a los cambios en las condiciones en el ambiente. Recientemente, nuevos conocimientos, sobre la biogénesis de la pared celular y la adaptación han surgido. La síntesis y deposición de quitina dependen estrictamente del ciclo celular. (Smits y col.2001).

1.3. Despolimerización de la quitina

La quitina se puede escindir, hasta su monómero NAG, por dos principales clases de quitinasas (Figura 3) : endoquitinasas (EC 3.2.1.14), y exoquitinasas, que pueden dividirse en dos subcategorías, constituidas por quitobiosidasas (EC 3.2.1.29), se debe incluir a las denominadas quitobiasas, ya que estas generan dos moléculas de N-acetilglucosamina, pero tienen mayor especificidad sobre el dímero quitobiosa (Cruz y Rojas, 1996; Deshpande, 1986; Cohen-Kupiec y Chet,1998).

Las endoquitinasas (EC 3.2.1.14), hidrolizan de manera aleatoria, en los enlaces glucosídicos internos β -1-4, liberando oligosacáridos, de diferentes tamaños. Las exoquitinasas hidrolizan, de manera progresiva por el extremo reductor, liberando quitobiosa y N-acetilglucosamina. La quitobiosa es posteriormente hidrolizada por quitobiosidasas (EC 3.2.1.29) y 1,4 - β -N-acetilglucosaminidasas (EC 3.2.1.30) (Ramírez y col.2011).

Se engloban las exoquitinasas (EC 3.2.1.52) en esa nomenclatura ya que hidrolizan los oligosacáridos y la quitobiosa obtenidos de la degradación de la quitina.

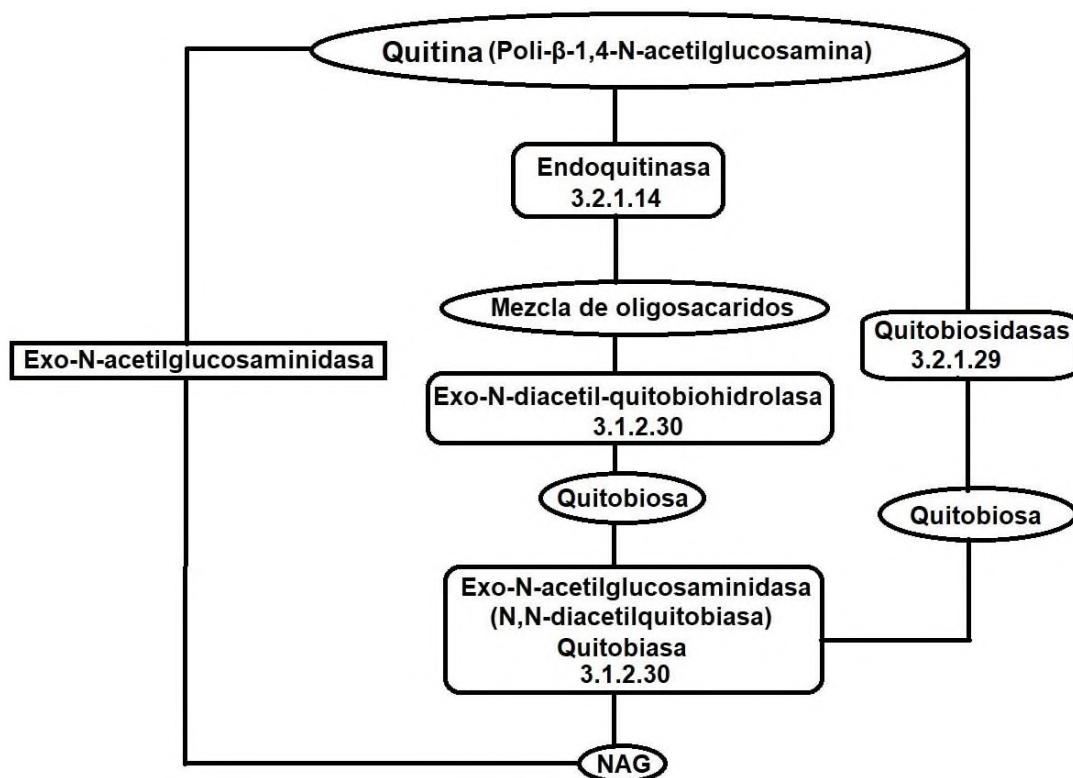


Figura 3. Ruta de degradación de la quitina (Modificado de Ramírez, 2009).

1.4. Hongos Basidiomycota

1.4.1. Generalidades de este Filo

Actualmente, el reino de los Hongos incluye principalmente cuatro filos grandes, es decir, *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*, cuyos miembros tienen principalmente paredes celulares compuestas de quitina, que diferencia claramente los hongos de las plantas que tienen paredes celulares reforzadas de celulosa o hemicelulosa (Zhong y Xiao, 2009).

Aunque existe amplio acuerdo en cuanto a la clasificación de los principales filos de los hongos, hay una variación considerable en los nombres que se han aplicado a estos grupos. En consecuencia, hay una necesidad apremiante para adoptar un consenso de alto nivel para la clasificación de los hongos que se basa en grupos monofiléticos, que pueden ser recomendados para uso general.

La revolución molecular en la taxonomía fúngica comenzó a principio de la década de 1990, con análisis de PCR ribosomal amplificado. Hoy en día, la sistemática molecular de hongos, es una disciplina madura en la que conjuntos de datos multi-locus, muestreo extenso de taxones y enfoques analíticos rigurosos, son estándares para obtener una visión general del estado actual de la clasificación (Hibbett y col., 2007).

En la figura 4 se observa una clasificación de los hongos, de acuerdo a sus características morfológicas, designando a los hongos basidiomicetes como hongos superiores o Eumycota.

Clases de hongos	Mixomycota	Oomycota	Chytridiomycota	Zygomycota	Ascomycota	Basidiomycota
Filo	Mixomycota	Oomycota	Eumycota			
Otros terminos	Hongos inferiores				Hongos superiores	
Hifas típicas		+	-	+	+	+
Septo con poros		-	-	+	+	+
Constituyentes de la pared celular		Glucano y celulosa	Quitina y glucano			

Figura 4. Clasificación de los hongos (Jennings y Lysek, 1996).

1.4.2. Reproducción de los hongos Basidiomycota

Las células de los hongos por ser eucariotas suelen ser mayores y más complejas que las bacterianas, y poseen núcleos verdaderos donde están encerrados los cromosomas. Normalmente son multinucleadas, pero hay especies microscópicas, con un solo núcleo, como las levaduras. En ocasiones, como en el caso de los animales, el cuerpo está dividido en muchas células, cada una con su correspondiente núcleo. En otras, en cambio, el cuerpo o talo no está dividido en células, y los núcleos campan libres por él (Ruan y col. 2006).

En la figura 5 se observa el ciclo de vida de los hongos basidiomicetos, el cual implica la reproducción por medio de esporas variadas, móviles o inmóviles, sexuales o asexuales. Muchos hongos producen sus esporas en estructuras microscópicas, mientras que otros forman cuerpos fructíferos para liberarlas. Las setas son las plataformas lanzadoras de esporas de algunos grupos fúngicos (Ruan y col. 2006).

Existen diferentes formas de reproducción en los hongos: la asexual, sexual, y parasexual. A la reproducción asexual también se le conoce como somática o vegetativa, debido a que no involucra fusión de núcleos. Se puede dar por fragmentación de micelio, el cual, al colocarse bajo condiciones adecuadas de temperatura, humedad y substrato, da origen a un nuevo individuo. Esta forma de reproducción es muy utilizada para reproducir hongos en laboratorio.

La reproducción sexual no es rápida e implica somatogamia (unión de hifas o gametos), cariogamia (fusión de núcleos) y la producción de gametos por meiosis. En los hongos, las hifas que forman el micelio actúan como gametos y su sexualidad está determinada por genes nucleares, que confieren un carácter genético conocido como compatibilidad sexual. Esto hace que sólo aquellas hifas provenientes de micelios compatibles, se fusionen y den origen por somatogamia, a un comportamiento hifal con dos tipos de núcleos diferentes.

A partir de este compartimento se produce la dicarionización del micelio para dar origen al micelio heterocariótico (diferentes tipos de núcleos). La cariogamia generalmente se presenta tiempo después de la somatogamia, por lo que el micelio heterocariótico se multiplica y mantiene sin dificultad. La fusión de núcleos solo se da en los basidios, la cual originará por meiosis la espora de origen sexual (basidióspora). La reproducción sexual en hongos permite la variación genética. La mayoría de los hongos presenta ciclos alternos de reproducción asexual y sexual como parte de su desarrollo.

La reproducción parasexual es un mecanismo raro, en el que las hifas se unen sin fusión nuclear posterior y da lugar a un heterocarión de núcleos haploides. En algunas ocasiones pueden conjugarse los núcleos y aparece un núcleo diploide heterocigótico (Guerreo y col. 2007).

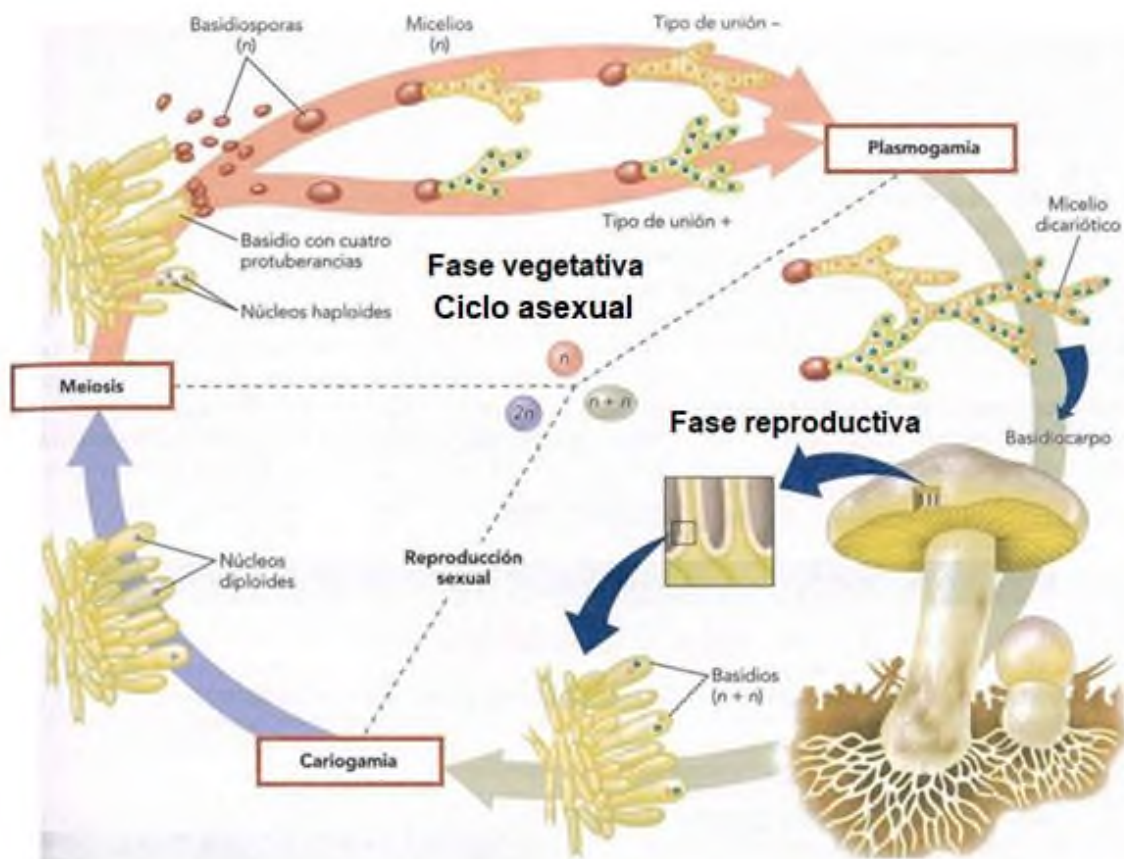


Figura 5. Ciclo de vida de los hongos basidiomicetos modificado (Ruiz, 2001).

1.4.3. Aplicaciones biotecnológicas de Basidiomycota

El filo Basidiomycota es muy relevante en biotecnología, por las aplicaciones diversas que tienen en la industria. Los hongos son ampliamente explotados, como fábricas celulares eficientes, en la producción de metabolitos bioactivos, sustancias y proteínas nativas o heterólogas (Krulla y col.2013).

El cultivo de hongos, promueve beneficios económicos, ecológicos y sociales. Actualmente, la mayoría de las cepas utilizadas en el cultivo comercial provienen de regiones de América del Norte, Europa y el sur de Asia. Las cepas son mantenidas bajo métodos convencionales o depositadas en colecciones, para su preservación, y son utilizadas en investigaciones orientadas al cultivo de especies comestibles, incremento de la colección de cepas, mejoramiento de los sistemas de cultivo, producción de enzimas y adaptación fisiológica de los hongos. Algunos géneros con los que se ha trabajado son: *Pleurotus*, *Lentinula*, *Neolentinus*, *Volvariella*, *Agaricus*, *Auricularia*, *Flammulina*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Hypsizygus*, *Lepista* y *Morchella*. Algunas de estas especies se consideran con alto potencial de cultivo, por ser saprobias y apreciadas localmente para autoconsumo (Arana y col.2014).

También se han utilizado en la regeneración del suelo desértico los hongos micorrícicos *Suillus bovinus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria bicolor*, *Laccaria fraterna*, *Laccaria laccata*, *Lactarius rufus*, *Pisolithus albus*, *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon vinicolor*, *Scleroderma spp.*, *Pisolithus spp.*, *Endogone ssp.* y *Suillus luteus* (Duponnois y col.2009). Como se observa en la tabla 1, se muestran los compuestos de mayor interés biotecnológico, producidos por los hongos basidiomicetos.

Tabla 1. Productos de interés biotecnológico de hongos Basidiomycota (Chambergo y Valencia, 2016)

Producto	Hongo
Aromáticos policíclicos hidrocarbonados (PAH)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Alternaria tenuis</i>
Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX)	<i>P. chrysosporium</i> y <i>Cladophialophora</i> sp.
Clorofenol	<i>Coriolus versicolor</i> , <i>Trametes villosa</i> , <i>Panus tigrinus</i> , <i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Trametes versicolor</i> y <i>P. Chrysosporium</i>
Desechos	<i>P. chrysosporium</i> , <i>Acremonium</i> sp., <i>Acremonium</i> , <i>Cylindrocarpon</i> y <i>Gliocladium</i> .
Pesticidas	<i>P. chrysosporium</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>Phellinus weirii</i> , <i>C. versicolor</i> , <i>Hypholoma fasciculare</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Sordaria superba</i>
Metales pesados	<i>Alternaria</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Rhizopus</i> , y <i>Monilia</i>
Aceites	<i>Rhodosporidium</i> , <i>Rhodotorula</i> y <i>Trichosporon</i>
Radionúclido	<i>Hormoconis resinae</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i>
Farmacéuticos y productos personales (PPCPs)	<i>Bjerkandera</i> sp. R1, <i>Bjerkandera adusta</i> y <i>Phanerochaete chrysosporium</i>

2. Género *Psilocybe*

La palabra *Psilocybe* se deriva de las raíces griegas *psilos* y *kube*, que significan “cabeza calva o cabeza pelada”. Este género se clasifica en el reino *Fungi*, en el filo *Basidiomycota*, en la clase de los *Agaricomycetes*, del orden de los *Agaricales*, de la familia *Strophariaceae*. Los hongos que contienen psilocina y psilocibina, pertenecen principalmente a los géneros *Psilocybe* y *Panaeolus*, contando con más de 50 especies (Maruyama y col.2005).

Geográficamente, las especies de *Psilocybe*, se encuentran en todo el mundo, en casi todos los biomas, en una variedad de hábitats y sustratos, con la excepción de los desiertos. La mayor diversidad de especies, parece estar en el Neotrópico, desde Mesoamérica a través de Brasil y Chile. Muchas de las especies, se encuentran en las regiones templadas. Otras especies, se encuentran en hábitats tales como suelos de musgo, cubiertas de hierba, o humus forestal (Alarcón y col.2006).

Existen otros géneros y más de 200 especies, que producen alcaloides indólicos, siendo los más representativos: *Agrocybe*, *Conocybe*, *Coperandia*, *Galerina*, *Gerronema*, *Gymnopilus*, *Hypholoma*, *Inocybe*, *Mycena*, *Panaeolus*, *Pluteus* y *Psilocybe*, este último engloba la mayor parte de las especies, productoras de alcaloides (Guzmán, 1998).

Generalmente, se encuentran en lugares con un clima húmedo y de 10,000 especies de hongos que crecen en todo el mundo, sólo alrededor de 50-100 son conocidos por ser tóxicos (Gopinath y col.2011).

En el estado de Oaxaca, se conocen las siguientes especies: *Panaeolus sphinctrinus*, *Panaeolus campanulatus*; *Psilocybe mexicana*, *Psilocybe caerulescens* variedad *nigripes*, *Psilocybe caerulescens* variedad *mazatecorum*, *Psilocybe cubensis*, *Psilocybe yungensis*, *Psilocybe isauri* así como *Stropharia cubensis* (Díaz, 1977; Guzmán, 2006).

Ecológicamente, todas las especies de *Psilocybe*, son saprotróficos, que crecen en diversos tipos de materia orgánica en descomposición, por lo que su hábitat común es sobre estiércol vacuno o equino, en potreros de zonas tropicales y/o subtropicales, suelo de praderas subtropicales, con pastos rasantes y con fuerte influencia de ganado equino, humus en bosques mesófilos de montaña o de pino-encino muy húmedos, suelo arcilloso recién removido y sin vegetación herbácea o en bosque subtropical xerófilo.

A nivel laboratorio, este hongo crece en los medios agar papa dextrosa (PDA), agar harina de maíz y extracto de malta a una temperatura entre 22-30°C dependiendo de la especie. También crece en medios preparados a base de estiércol de vaca con 1.3% de nitrógeno, 0.034 % de fósforo, 0.06 % de potasio, y materia orgánica del 15.1%; en subproductos de frutas y verduras con 0.3 % de nitrógeno, 1 % de fósforo, 0.5 % de potasio y 8.3 % de materia orgánica (Gaitán y col.,2006; Montiel y col., 2008).

2.1. Morfología del género *Psilocybe*

De la literatura consultada sobre los hongos del género *Psilocybe*, se han propuesto tres clasificaciones diferentes, con respecto a su morfología, la de Guzmán (1983), la de Singer (1986) y la de Noordeloos (2011). Guzmán (1983), publicó una clasificación, basada en la reacción del color azulado del basidiocarpio, la forma del píleo, la presencia y el tipo de anillo, el crecimiento en sustrato, la forma, el color y el grosor de la pared de las basidiosporas y el color del contenido de pleurocistidio y cheilocistidio (Cistidio situado en la arista de la lámina, también llamado Queilocistidio). Bajo esta clasificación hasta ahora se han reconocido 19 secciones en *Psilocybe*. Singer (1986) señaló la presencia de crisocistidia (células estériles, diferenciadas y localizadas en el himenio), que poseen una inclusión dorada-amarilla en soluciones alcalinas, aspecto que ha resultado importante para la clasificación del género *Psilocybe*, además de muchas de las características mencionadas anteriormente. Las características morfológicas (forma y grosor de la pared) de las basidiosporas, han sido ampliamente utilizadas para diferenciarlos. Las basidiosporas tienen dos puntos de vista: frontal y lateral. En vista frontal, la forma varía de hexagonal, romboide a subromboides, o sin ángulos (Figuras 6 g-j). En vista lateral, los ángulos no son aparentes. Algunas basidiosporas de las especies *Deconica* y *Psilocybe*, tienen una forma inusual, son de perfil más estrecho, que en la vista frontal. Tal forma de espora inusual, fue referida por Singer (1986) como "lentiforme". Sin embargo, en forma lentiforme las esporas también ocurren en especies no relacionadas de *Conocybe* y *Coprinellus*, géneros de *Psathyrellaceae* (Ramírez y col., 2013).

Actualmente los hongos del género *Psilocybe*, se caracterizan molecularmente, basándose en la combinación de las características macroscópica y microscópica (Linacre y col., 2001). La identificación molecular se basa en la determinación del nucleótido de la secuencia del gen rRNA (espaciador transcrito interno y la subunidad grande (ITS y LSU por sus siglas en inglés respectivamente)). Se ha encontrado la secuencia específica, para estos hongos en la región LSU, desarrollándose un sistema de identificación utilizando la PCR Taq-Method Man (Maruyama y col. 2005).

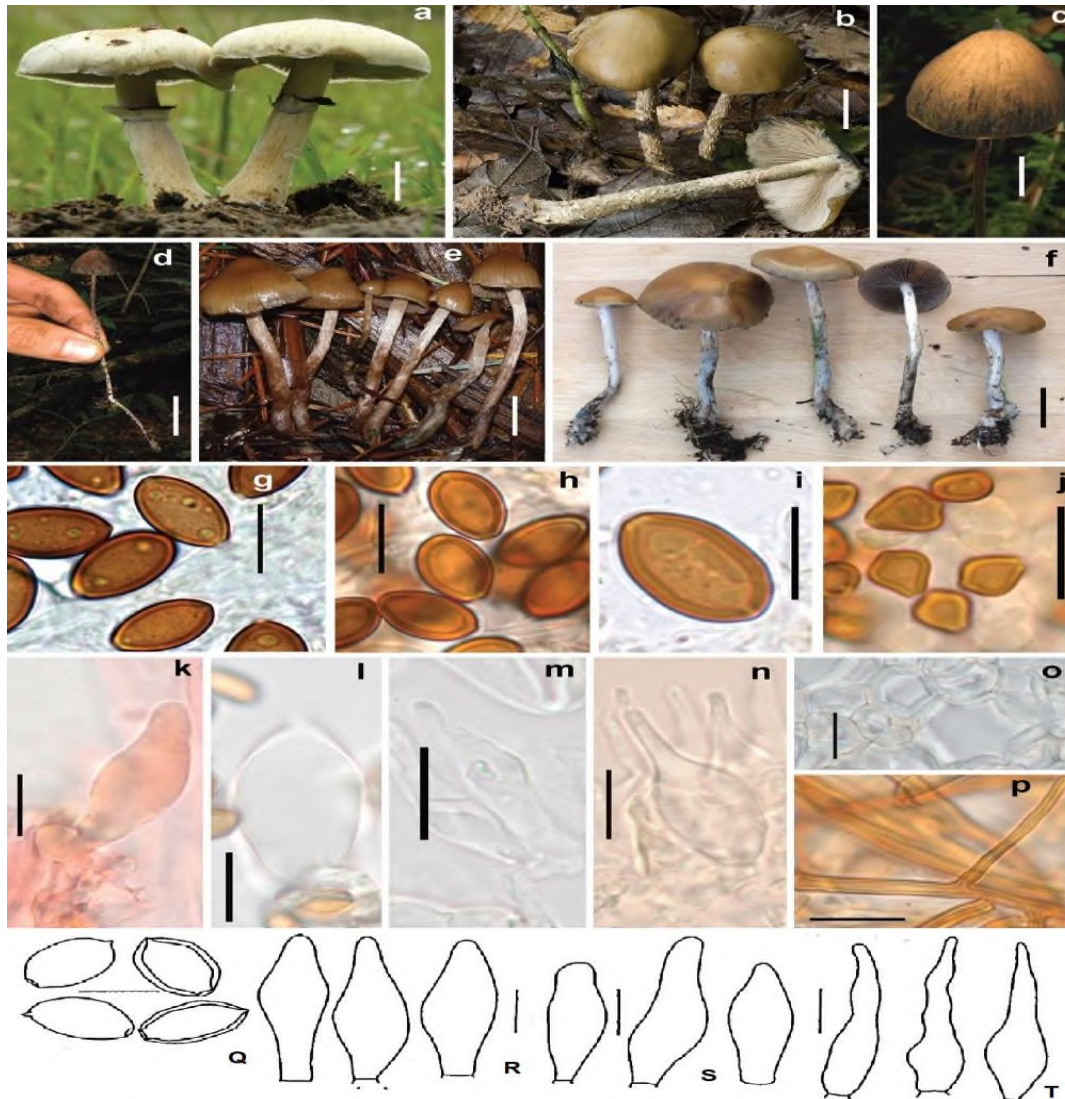


Figura 6. Morfología macro (a-f) y microscópica (g-p) de hongos del género *Psilocybe*: (a) *P. cubensis*; (b) *P. zapotecorum*; (c-d) *P. fagicola*; (e) *Psilocybe* sp.; (f) *P. subaeruginosa*; (g-p) Morfología microscópica (g) basidiosporas sin ángulos, *P. hispanica*; (h) basidiosporas hexagonales, *P. mexicana*; (i) basidióspora hexagonal, *P. cubensis*; (j) basidiosporas subromboides, *P. neoxalapensis*; (k) pleurocistidio (deuterocistidio) en rojo Congo, *P. zapotecorum*; (l) pleurocistidio (deuterocistidio) en KOH, originado a partir de trama himenoforal, *P. zapotecorum*; (m) pleurocistidio en KOH, *P. zapotecorum*; (n) cheilocistidio, *P. hispanica*; (o) píleo de trama radial, *P. yungensis*; (p) hifas septoides, *P. yungensis*. (Q) esporas, *P. coprophila*; (R) pleurocistidio, *P. coprophila*; (S) cheilocistidio; *P. coprophila* (T) cheilocistidio; *P. argentina*. Barras de escala: (a) 20 mm; (b) 15 mm; (c) 3 mm; (d) 10 mm; (e) 25 mm; (f) 30 mm; (g-p) 10 μ m. Modificado de Ramírez y col. (2013).

2.2. Alcaloides producidos por el género *Psilocybe*

Los alcaloides derivados del indol producidos por hongos del género *Psilocybe* son en este caso derivados del triptófano. Los principales alcaloides reportados son psilocibina y psilocina y en menor proporción, baeocistina y norbaeocistina, los cuales tienen propiedades alucinógenas. La psilocibina es un profármaco, que es un indol unido a una sustituyente etilamina, su estructura se observa en la figura 7. Estructuralmente, la psilocibina tiene un estrecho parecido con el neurotransmisor serotonina. La psilocibina es de naturaleza zwitteriónica, insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos (tales como cloroformo, benceno, etc.) pero esta insolubilidad se mejora a pH alcalinos, ligeramente soluble en etanol, moderadamente soluble en metanol y soluble en agua a pH ligeramente ácidos. La producción de alcaloides junto con la de metabolitos secundarios, se ha observado que acontece durante la fase de micelio dicariótico maduro (Estébanez y col.2008).

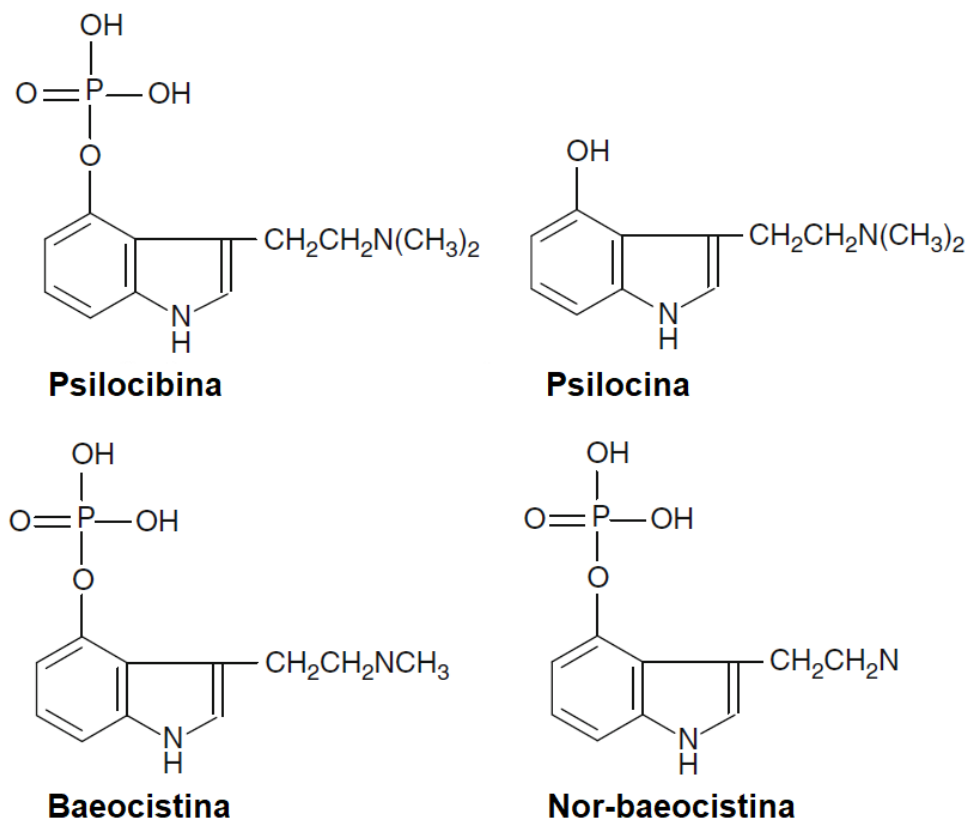


Figura 7. Estructura de la psilocina, psilocibina, baeocistina y nor-baeocistina (Modificado de Mahmood, 2013).

2.3. Biosíntesis de la psilocibina

La biosíntesis de la psilocibina observada en la figura 8, es regulada en el citosol de las células fúngicas y empieza con la formación de ácido corísmico, producido a su vez por el ácido shikímico. Los dos compuestos de inicio del ácido shikímico son el fosfoenolpiruvato, un producto de la glicólisis y la eritrosa 4-fosfato, un producto de la ruta de las pentosas fosfato, los cuales son donadores de fosfato. La glucosa es fosforilada vía ATP, el cual al perder un grupo fosforil se convierte en ADP. La glucosa-6-fosfato procede a entrar a diferentes rutas: a la glicólisis y a la pentosa fosfato, produciendo los compuestos necesarios para la producción de ácido corísmico, un sustrato del ácido antranílico precursor del triptófano (Mahmood, 2013).

Se tienen reportes sobre el contenido de psilocibina y psilocina en los hongos del género *Psilocybe*. Heim y Hofmann (1958), reportaron que hongos del género *Psilocybe* tienen 0.25% de psilocibina y 0.15% de psilocina con relación a su contenido de humedad. Las diferencias en el contenido de psilocina y psilocibina en los cuerpos fructíferos, dependen de factores tales como las especies, las etapas de desarrollo, las condiciones climáticas y la disponibilidad de nitrógeno soluble y fósforo en el suelo (Kenji y col. 2003).

3. Fermentación Líquida

Existen varias definiciones de lo que es una fermentación, la más antigua es la “producción de alcohol o ácido láctico usando como sustrato glucosa”. Otra definición acorde al diccionario del Nuevo Colegiado Webster (1977), es “una transformación de un compuesto orgánico enzimáticamente controlada” (Dutta Rajiv, 2008).

Otra definición de fermentación desde un punto de vista bioquímico es: “un proceso de generación de energía en el que los compuestos orgánicos actúan tanto como donadores como aceptores terminales de electrones”. Una definición más amplia, es la de “cualquier proceso utilizado para la producción de metabolitos a partir del cultivo de microorganismos, produciendo principalmente biomasa, enzimas microbianas, metabolitos microbianos, productos recombinantes o modificación de compuestos que se adicionan”. La fermentación líquida se ha convertido en el método preferido de fermentación para aplicaciones comerciales. Debido a que es menos problemático (la transferencia de masa y de calor es mucho mejor, y por tanto la homogeneidad del cultivo suele ser superior), es más confiable y reproducible, más fácil de controlar los parámetros operativos clave, y más flexible. Otra justificación del cultivo de hongos macroscópicos mediante este tipo de proceso, es porque coadyuva en el desarrollo de sabor y valor nutritivo en el caso de hongos comestibles, mientras que en los hongos medicinales sus propiedades farmacológicas son desarrolladas. La fermentación líquida ofrece el potencial de producir estos compuestos más rápida y asépticamente, y por lo tanto garantizar su suministro confiable no influenciado por variaciones estacionales. Se han realizado investigaciones para establecer procesos de cultivos sumergidos para hongos en una escala industrial (Shirai y Malpica, 2013).

En resumen, el diseño de los procesos biotecnológicos, donde el objeto de estudio está constituido por un organismo, se ve influenciado por la naturaleza del organismo, la disponibilidad del sustrato y las características fisicoquímicas del proceso, tomando en cuenta la temperatura, pH y estabilidad del organismo, así como otros factores estrechamente relacionados con su supervivencia (Chambergó y Valencia, 2016).

3.1. Crecimiento microbiano

En el diseño de biorreactores se asume que el organismo tiene un comportamiento cinético sencillo, obedeciendo a un modelo como la ecuación de Monod (ecuación 1), que explica la velocidad de crecimiento en función del sustrato limitante, esta se muestra a continuación:

$$r_N = \frac{dC_N}{dt} = \mu C_N \dots(1)$$

Despejando μ nos da:

$$\mu = \frac{1}{C_N} \frac{dC_N}{dt} = \frac{d \ln C_N}{dt} \dots(2)$$

Integrando con las condiciones iniciales nos da:

$$\int_{C_{N_0}}^{C_N} \frac{dC_N}{C_N} = \int_{t_0}^t \mu dt \dots(3)$$

Esto nos da

$$C_N = C_{N_0} e^{\mu(t-t_0)} \dots(4)$$

Donde:

r_N = Velocidad de incremento de población celular en un tiempo dado.

μ = Velocidad de crecimiento específica, en h^{-1} , la cual es constante con el tiempo durante un periodo de crecimiento exponencial.

C_N = Densidad de bacterias presente en un tiempo.

C_{N_0} = Densidad de bacterias presente en tiempo 0.

Este modelo se planteó para representar el comportamiento del crecimiento de microorganismos a través del tiempo. Con base a ello, se determina cuándo se produce la mayor cantidad de biomasa o de metabolitos ya sean primarios o secundarios dependiendo del tipo de metabolismo desarrollado (Fazenda y col., 2008). Cuando se monitorea el crecimiento, se logran observar diferentes fases, las cuales son:

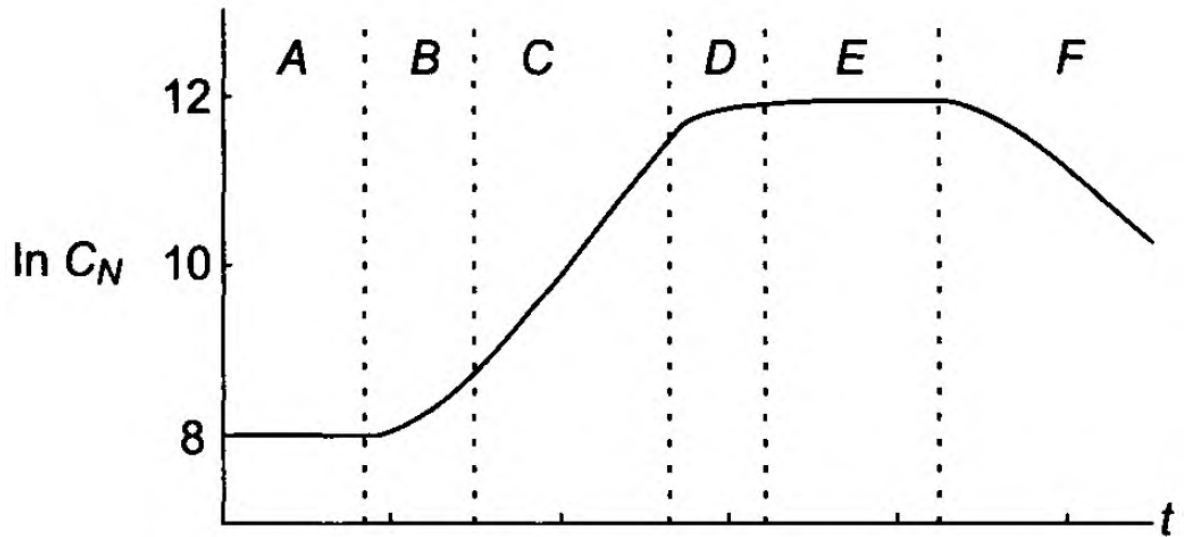


Figura 9. Fases de crecimiento microbiano. Tomado de Dutta (Rajiv Dutta, 2008).

A. Fase de latencia: La fase de retraso (estacionaria inicial o latente) es un período inicial de cultivo durante el cual el número de células no aumenta, las células pueden crecer en tamaño durante este período. La duración de este período de retraso depende de muchos factores, como el tipo y la edad de los microorganismos, el tamaño del inóculo y las condiciones de cultivo. El retraso generalmente ocurre porque las células deben ajustarse al nuevo medio antes de que el crecimiento pueda comenzar. Si los microorganismos son inoculados de un medio con una baja concentración de nutrientes a un medio con una alta concentración, la duración del período de retraso suele ser larga.

Esto es porque las células deben producir las enzimas necesarias para metabolizar los nutrientes disponibles. Si se mueven desde un medio de alta a baja concentración de nutrientes, generalmente no hay fase de latencia. Otro factor importante que afecta la duración de la fase de retardo es el tamaño del inóculo. Si se inocula una pequeña cantidad de células a un gran volumen, tendrán una fase de latencia larga. Para inocular un fermentador grande, se emplea una serie de tanques de semillas (inóculo fresco) progresivamente más grandes para minimizar el efecto de la fase de retraso.

- B. Fase de crecimiento acelerado:** Al final de la fase de retraso, cuando comienza el crecimiento, la tasa de división aumenta gradualmente y alcanza un valor máximo en el período exponencial del crecimiento. Este período de transición se conoce comúnmente como la fase de crecimiento acelerado y a menudo se incluye como parte de la fase de retraso. En organismos unicelulares, la duplicación progresiva del número de células resulta en una tasa de crecimiento continuamente creciente en la población. Por lo tanto, la tasa de la población celular aumenta en cualquier momento y el tiempo es proporcional a la densidad numérica del microorganismo presente en ese momento. La velocidad de crecimiento en esta etapa se puede calcular como la pendiente de la curva de crecimiento.
- C. Fase de crecimiento exponencial:** El micelio aumenta exponencialmente a medida que las células comienzan a dividirse. Se multiplican a la máxima velocidad y su crecimiento puede ser cuantificado con base en el número de células que se producen por unidad de tiempo o por el aumento de biomasa por unidad de tiempo. La velocidad de crecimiento durante este periodo permanece constante y es independiente de la concentración del sustrato, siempre y cuando éste se encuentre en exceso. La tasa de crecimiento aumenta durante esta fase, pero la tasa de división que es proporcional es constante en su valor máximo.
- D. Fase de crecimiento desacelerado:** Después de que la tasa de crecimiento alcanza un máximo, este es seguido por la desaceleración de ambas tasas de crecimiento y la tasa de división, por lo que se observa en el gráfico como un cambio de pendiente y curvatura cóncava hacia abajo.
- E. Fase estacionaria:** En esta fase la velocidad de crecimiento del micelio es igual a la velocidad de deceso y esto implica un equilibrio celular.
- F. Fase de muerte:** Después de que los nutrientes disponibles para el micelio están agotándose, comienza a morir y disminuye la producción de micelio, pues los nutrientes que están en el medio de cultivo no son suficientes para que el microorganismo pueda reproducirse. Otro de los motivos por los cuales empieza esta etapa es la producción de sustancias tóxicas que impiden la multiplicación de las células (Dutta R., 2008).

La fase de retraso (estacionaria inicial o latente) es un período inicial de cultivo durante el cual al inicio de la producción celular es cero o despreciable. Aunque el número de células no aumenta, las células pueden crecer en tamaño durante este período. La duración de este período de retraso depende de muchos factores, como el tipo y edad de los microorganismos, el tamaño del inóculo y condiciones de cultivo. El retraso generalmente ocurre porque las células deben ajustarse al nuevo medio antes de que el crecimiento pueda comenzar. Si los microorganismos son inoculados de un medio con una baja concentración de nutrientes a un medio con una alta concentración, la duración del período de retraso suele ser larga. Esto es porque las células deben producir las enzimas necesarias para metabolizar los nutrientes disponibles. Si se mueven desde un medio de alta a baja concentración de nutrientes, generalmente no hay fase de latencia. Otro factor importante que afecta la duración de la fase de retardo es el tamaño del inóculo. Si se inocula una pequeña cantidad de células en un gran volumen, tendrán una fase de latencia larga. Al final de la fase de retraso, cuando comienza el crecimiento, la tasa de división aumenta gradualmente y alcanza un valor máximo en el período exponencial del crecimiento. Este período de transición se conoce comúnmente como la fase de crecimiento acelerado y a menudo se incluye como parte de la fase de retraso. En organismos unicelulares, la duplicación progresiva del número de células, durante una tasa de crecimiento continuamente creciente, en un cultivo bacteriano sometido a un crecimiento equilibrado, por lo tanto, la tasa de la población celular aumenta en cualquier momento el tiempo es proporcional a la densidad numérica de las bacterias presentes en ese momento (Dutta, 2008).

3.2. Parámetros cinéticos asociados a la fermentación

3.2.1. Rendimientos

Durante una fermentación, los rendimientos más frecuentemente reportados se expresan usando coeficientes o factores de rendimientos. Estos coeficientes de rendimientos permiten cuantificar los requerimientos de nutrientes y producción, característicos de los microorganismos u organismos. Los más comunes son:

- $Y_{X/S}$, se refiere a la masa o moles de biomasa producida por unidad de masa o moles de sustrato consumido.
- $Y_{P/S}$, se refiere a la masa o moles de producto formado por unidad másica o molar de sustrato consumido.
- $Y_{P/X}$, se refiere a la masa o moles de producto formado por unidad másica o molar de biomasa formada.

Los rendimientos pueden ser globales o instantáneos, por lo que se debe indicar para qué tiempo o periodo fueron determinados. Por ejemplo, el rendimiento instantáneo de biomasa respecto al sustrato consumido es:

$$Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{\text{tasa volumétrica de crecimiento o producción de biomasa}}{\text{tasa de consumo de sustrato}} \dots (5)$$

Algunos valores de rendimientos de biomasa para diferentes tipos de microorganismos y sustratos empleados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Rendimientos de biomasa [$g_{\text{biomasa}} * g_{\text{sustrato consumido}}^{-1}$]

Microorganismo	Sustrato	$Y_{X/S} [g_{\text{biomasa}} * g_{\text{sustrato}}^{-1}]$
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Glucosa	0.43
<i>Candida utilis</i>	Glucosa	0.51
	Ácido acético	0.36
	Etanol	0.68
<i>Pseudomonas sp.</i>	Metanol	0.41
<i>Methylococcus sp.</i>	Metano	1.01

En un cultivo por lotes, durante el crecimiento y fase de muerte, la velocidad o tasa de crecimiento celular se puede obtener como una ecuación de una reacción autocatalítica de primer orden, en el caso de ser un sistema cerrado, en donde el crecimiento es el único proceso que afecta la concentración celular, se expresaría como:

$$r_X = \mu X = \frac{dX}{dt} = \textit{pendiente} \dots (6)$$

Existe una condición denominada crecimiento balanceado, la cual se da cuando hay un ambiente favorable para el crecimiento y las células regulan su metabolismo ajustando las velocidades de las reacciones internas. Durante éste, la composición de la biomasa permanece constante, esto significa que la célula es capaz de modular los efectos de perturbaciones externas (cambios en condiciones ambientales) y mantener la composición de la biomasa estable. La velocidad específica de producción de cada componente en el cultivo debe ser igual a la tasa específica de crecimiento (μ) de la siguiente forma:

$$r_Z = \mu Z \dots (7)$$

Donde z es el *constituyente celular* como una proteína, RNA o un polisacárido; r_z es la *tasa volumétrica de producción* de z y Z es la *concentración de ese componente en el volumen de reactor*. En la mayoría de los cultivos, el crecimiento balanceado ocurre al mismo tiempo que el crecimiento exponencial.

3.2.2. Formación de productos

Los productos de bajo peso molecular de una fermentación, se clasifican por su relación como (i) Productos de Síntesis, (II) Productos de generación de energía y (III) Productos en donde no es claro el acoplamiento directo o indirecto a la generación de energía. Los primeros se forman directamente y como subproductos o productos finales del metabolismo energético, por lo que se sintetizan usando rutas que producen ATP, ejemplos de éstos son el etanol y otros alcoholes, así como ácidos acético y láctico. La segunda clase de productos se relacionan parcialmente o indirectamente con la generación de energía, pero requieren energía adicional para su síntesis, ejemplos son los aminoácidos y sus productos (péptidos y proteínas), ácido cítrico y nucleótidos.

Independientemente de la clase de producto, la tasa o velocidad de formación de un producto en un cultivo microbiano, puede expresarse como una función de la concentración de biomasa mediante:

$$r_p = q_p X \dots (8)$$

Donde r_p es la *tasa volumétrica de formación de producto* (unidades $\text{kgm}^{-3}\text{s}^{-1}$ o $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$), X es la *concentración de biomasa* y q_p es la *tasa específica de formación de producto* (unidades h^{-1} o s^{-1}). Esta tasa se puede evaluar en cualquier tiempo durante la fermentación como el cociente de la velocidad de producción y la concentración de biomasa, por lo que en un cultivo por lotes no es constante.

3.2.3. Mantenimiento

Cuando los productos se forman usando rutas que generan ATP, la velocidad de producción se relaciona con la demanda energética celular. El crecimiento es generalmente la principal función que requiere energía, por lo que, si la producción está acoplada al metabolismo energético, los productos se formarán siempre que exista crecimiento. Sin embargo, el ATP se requiere también para otras actividades llamadas *mantenimiento*, el cual incluye la motilidad celular, el ajuste del pH interno y el potencial de membrana y el recambio de los componentes celulares. El mantenimiento se puede llevar a cabo incluso en la ausencia de crecimiento.

Las expresiones cinéticas para la velocidad de formación de producto deben considerar un crecimiento y mantenimiento asociados a la producción, de la siguiente manera:

$$r_p = Y_{p/x} r_x + m_p X \dots (9)$$

En esta, r_x es la *tasa volumétrica de formación de biomasa*, $Y_{p/x}$ es el *rendimiento teórico o verdadero de producto respecto a la biomasa*, m_p es la *tasa específica de formación de producto debida al mantenimiento* (en h^{-1} o s^{-1} , aunque apropiadamente deben ser $\text{g}_{\text{producto}} \cdot \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) y X es la concentración de la biomasa. Si sustituimos la definición de r_x de la ecuación 2, obtenemos:

$$r_p = (Y_{p/x} \mu + m_p) X \dots (10)$$

Sustituyendo la definición de la ecuación 4 en la anterior:

$$q_p = (Y_{p/x} \mu + m_p) \dots (11)$$

3.2.4. Consumo de sustrato

Las células consumen el sustrato del ambiente externo y lo canalizan a diferentes rutas metabólicas. Algo del sustrato se dirige al crecimiento y síntesis de productos, mientras que otra fracción se usa para generar energía para actividades de mantenimiento. Los requerimientos de sustrato para mantenimiento varían dependiendo del organismo y de las condiciones de cultivo. A la *velocidad específica de consumo de sustrato para actividades de mantenimiento*, se le conoce como *coeficiente de mantenimiento* m_s , y tiene las mismas unidades que m_p (h^{-1} o s^{-1}).

En algunos cultivos existe poca o nula formación de productos, tal es el caso en las fermentaciones encaminadas a la formación de biomasa y ésta constituye el producto de interés. En la ausencia de síntesis de producto extracelular, se asume que todo el sustrato entra a la célula para crecimiento y funciones de mantenimiento. Las velocidades de estas actividades se expresan como:

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{X/S}} + m_s X \dots (12)$$

En la ecuación anterior, $Y_{X/S}$ es el rendimiento verdadero de biomasa respecto al sustrato consumido, m_s es el coeficiente de mantenimiento y x es la concentración de biomasa. Cabe mencionar que cuando el sustrato se ha agotado, la energía de mantenimiento es generalmente proporcionada por metabolismo endógeno. También es importante mencionar que, para un mismo microorganismo, la presencia de sales, iones y aminoácidos, conduce a cambios sustanciales de este coeficiente (Ver Tabla 3, por ejemplo, en la levadura *S.cerevisiae* al agregar NaCl 1M bajo condiciones anaeróbicas, el coeficiente m_s es 10 veces mayor. En el hongo filamentoso *P.chrysogenum* bajo condiciones aeróbicas, este coeficiente es 38% menor al de la levadura antes mencionada (Doran, P., 2013).

Tabla 3. Coeficientes de mantenimiento de algunos microorganismos usando glucosa como fuente de energía y bajo diferentes condiciones de crecimiento

Microorganismo	Condiciones de cultivo	m_s [kg sustrato*kg célula ⁻¹ h ⁻¹]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Anaeróbico	0.036
	Anaeróbico, 1M NaCl	0.360
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Anaeróbico, triptófano limitado, 2gL⁻¹ NH₄Cl	2.88
	Anaeróbico, triptófano limitado, 4gL⁻¹ NH₄Cl	3.69
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Aeróbico	0.022

3.2.5. Fuente de carbono

La fuente de carbono en la producción de metabolitos y enzimas, se puede analizar desde cuatro puntos de vista:

- El efecto de la fuente de carbono en cantidades o concentraciones adecuadas a las necesidades de crecimiento de los microorganismos, o al propósito de la fermentación. Esto ha sido comprobado en la optimización de la producción de exopolisacáridos en el cultivo sumergido de *Morchella esculenta* con cinco fuentes de carbono (fructuosa, glucosa, lactosa, sacarosa y xilosa). La mayor producción de exopolisacáridos (2,301 mg/L) se obtuvo con glucosa y la mayor producción de biomasa (7.5 g/L) se obtuvo en un medio con xilosa (Meng y col.2010).
- La relación C/N. Esta relación implica la asociación de la fuente de carbono con la fuente nitrogenada. Puesto que los hongos son heterótrofos, esta relación toma importancia para evaluar su nivel de catabolismo. Se ha estudiado la relación C/N en un medio de cultivo basal para el crecimiento de *Ganoderma lucidum*. En este medio, se varió la concentración de la fuente de carbono, probando glucosa a 10g/L y 50g/L y en el caso del nitrógeno, se probó peptona entre 3g/L y 15g/L, obteniéndose relaciones C/N entre 2/1 y 50/1. La mejor relación C/N fue 5/1, con un crecimiento de 35g/L (Torres y col.2011).

En otro artículo se ha estudiado una especie de *Cordyceps cicadae* en medio sumergido, con seis fuentes de carbono (glucosa, galactosa, sacarosa, manitol, maltosa y fructuosa) y cuatro fuentes de nitrógeno (extracto de levadura, peptona, NaNO_2 *(NH_4) $_2\text{SO}_4$ y L-arginina), para la producción de exopolisacáridos e intrapolisacáridos, obteniéndose relaciones C/N de 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 y 1:40. La mejor relación C/N se obtuvo con una relación C/N de 10:1 con una producción de exopolisacáridos de 0.29517 g/L y una producción de intrapolisacáridos de 0.23211 g/L (Kumar y col.,2015). También se menciona el efecto de cuatro fuentes de carbono (glucosa, fructuosa, maltosa y sacarosa), y cinco fuentes de nitrógeno (extracto de levadura, peptona, urea, KNO_3 , y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), en la fermentación de *Agaricus brasiliensis*, demostrando que la mejor fuente de carbono fue la sacarosa, con la cual se tuvo una producción de exopolisacáridos de 0.17355 g/mL y la mejor fuente de nitrógeno fue extracto de levadura obteniendo una producción de exopolisacáridos de 0.4734 g/mL. (Fan y col.,2007).

3.2.6. Temperatura

Los microorganismos crecen en rangos estrechos de temperatura. En general a temperaturas mayores de 40 °C el crecimiento de los microorganismos decae debido a la desnaturalización de enzimas y proteínas. A temperaturas cercanas a los 0°C el crecimiento se detiene. El efecto de la temperatura en los hongos durante su desarrollo y crecimiento, es que los afecta desarrollando mecanismos de supervivencia (G. Ayerst, 1969). Por ejemplo, *Psathyrella spadicea*, *Floccularia aff. luteovirens*, *Clitocybe squamulosa*, *Flammulina mexicana* y *Lyophyllum aff. shimeji* presentaron un crecimiento favorable a 18°C de incubación, con respecto al intervalo de temperaturas (-3 °C a 18°C) de la zona endémica del Nevado de Toluca (Arana y col.,2014).

En la literatura, en el cultivo sumergido del hongo macroscópico *Ganoderma lucidum*, al evaluar el efecto de la temperatura, se observó que, de 20°C a 35°C, el perfil de la producción de micelio forma la rama izquierda de una parábola, mostrando una concentración máxima de micelio (3.5 g/L) a los 35°C, descendiendo abruptamente a los 40°C.

Lo anterior implica que *G.lucidum* mostró un intervalo estrecho de temperatura (30°C a 35°C) para su crecimiento favorable (Yang y Liao, 1998).

La temperatura más común a la que se han incubado los hongos del género *Psilocybe* es 20°C (Gottlieb, 1976; Gartz, 1986; Chilton y col.,1979). Por otra parte, Chang y Mills (1992), reportan esta misma temperatura para la producción de enzimas (lacasas, peroxidasas, fosfatasas ácidas, pectinesterasas y poligalacturonasa) y la detección de su actividad, en diferentes aislados del género *Psilocybe*.

3.2.7. Agitación

La agitación en los biorreactores es ampliamente utilizada para el desarrollo de bioprocesos. En medio líquido, la agitación ayuda a la solubilización de solutos y a una mejor dispersión de los gases. Los frascos que contienen caldo de cultivo se colocan en mesas de agitación o en incubadoras agitadas; el movimiento de sacudida es responsable de la mezcla y la transferencia de masa en el matraz. La sacudida se puede realizar usando un movimiento orbital, que también se llama vibración giratoria o un movimiento recíproco lineal (hacia adelante y hacia atrás). Los agitadores orbitales son cada vez más comunes que las máquinas recíprocas (Maier y Buchs, 2001). Sin embargo, la transferencia de oxígeno en los cultivos microbianos puede llegar a ser limitante, si la demanda de oxígeno supera la capacidad de transferencia de oxígeno a través de la interfaz gas-líquido. Este aspecto es de suma importancia en el cultivo líquido de hongos. La transferencia de masa gas-líquido en biorreactores agitados está influenciada por la resistencia del tapón del matraz y la resistencia en la interfaz gas-líquido. Debido a la resistencia del tapón del matraz, la presión parcial de oxígeno dentro del matraz es inferior a la presión parcial de oxígeno del entorno. La tasa de transferencia de oxígeno es proporcional al coeficiente de transferencia de masa (k_L). El coeficiente de transferencia de masa (k_L) depende del coeficiente de difusión, que a su vez depende de la concentración de los solutos y la viscosidad del líquido. El área de intercambio específica (a) en un matraz agitado, es definida por la interfase gas-líquido fácilmente identificada y sólo se ve afectada por la viscosidad de la solución.

Los parámetros operacionales que afectan a la tasa de transferencia de oxígeno en matraces agitados, son los siguientes:

- Forma y tamaño del matraz.
- Frecuencia de agitación.
- Diámetro de agitación.
- Volumen de llenado.
- Propiedades superficiales del material del matraz: hidrofóbico / hidrofílico
- Propiedades fisicoquímicas del líquido (viscosidad, oxígeno, solubilidad y difusividad).

En matraces agitados, la velocidad de transferencia de oxígeno aumenta de manera lineal al incrementar la velocidad de agitación desde 50rpm hasta 250rpm, sin embargo, si el matraz es de material hidrofílico, la tasa de transferencia (obtenida como la pendiente) es 4.4 veces mayor, que la observada para matraces de materiales hidrofóbicos (Belozerskaya y Geesler, 2006).

En tanque agitado, manteniendo la velocidad de gasificación constante, se observó que al variar los valores de velocidad de agitación (N_i) desde $5s^{-1}$ hasta $10s^{-1}$, los valores de k_{La} se incrementaban linealmente a una razón de 0.003, en fluidos Newtonianos con viscosidades desde $0.91mPa\cdot s$ hasta $13.3mPa\cdot s$, pero si la viscosidad era mayor o igual a $70.2mPa\cdot s$, el k_{La} dejaba de comportarse linealmente. Cabe mencionar que, a menor viscosidad, los valores de k_{La} fueron mayores que en los fluidos con una mayor viscosidad (Auro y col., 1957).

Fenice y colaboradores (2012) han reportado el efecto de la agitación sobre la actividad de enzimas quitinolíticas y la transferencia de oxígeno, esta última en términos de k_{La} (coeficiente volumétrico de transferencia de masa, t^{-1}), con el hongo *Lecanicillum muscarium*. En el caso de las enzimas, se observaron bajas actividades (92 U/L) a 200 RPM, y altas actividades (383.7 U/L) al incrementar la agitación a 300 RPM.

En cuanto a la transferencia de oxígeno, se obtuvo un mayor k_{La} ($0.018s^{-1}$) con una agitación de 500 RPM, mientras que, con una agitación de 400 RPM, tuvo un k_{La} ($0.017 s^{-1}$), con una agitación de 300 RPM, tuvo un k_{La} ($0.0015 s^{-1}$) y con una agitación de 200 RPM se tuvo un k_{La} de $0.0094 s^{-1}$.

Esto nos indica que la agitación es un factor importante en la transferencia de oxígeno al microorganismo de interés, y por tanto afecta la producción de enzimas, en este caso de enzimas quitinolíticas.

3.2.8. pH

Los hongos tienen un sistema para la regulación de genes que codifican enzimas extracelulares, donde ellas puedan funcionar dependiendo del pH del ambiente extracelular, teniendo la capacidad de producir permeasas y metabolitos que se producen bajo condiciones de pH. Este sistema se ha identificado en *Aspergillus nidulans*, así como en otros hongos, incluyendo *Penicillium chrysogenum*, *Yarrowia lipolytica* y *Verticillium fungicola* (Denison, 2000).

El efecto que el pH ejerce sobre la expresión de enzimas y la producción de biomasa (crecimiento del micelio) en fermentaciones de *Ganoderma lucidum*, se ha estudiado por Yang y Liao (1998). En un medio con glucosa y extracto de malta se evaluó el pH en un intervalo de 5 a 7, mientras que en un medio con glucosa y cloruro de amonio el intervalo probado de pH fue de 3 a 6. El rendimiento de *Ganoderma lucidum* en glucosa-NH₄Cl fue de 0.025 g/L, mientras en glucosa-extracto de malta fue de 0.038 g/L. En la literatura se ha estudiado la influencia del pH inicial del medio sobre el crecimiento del micelio en ausencia de luz, utilizando un medio de agar trigo y dextrosa y la temperatura óptima previamente determinada de 25°C. El pH 4.0 demostró ser demasiado ácido y disminuyó la tasa de crecimiento. Este efecto de inhibición del crecimiento micelial a pH 4 se observó para *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus eryngii*, presentó la misma tasa de crecimiento micelial para valores de pH en el rango de 5.0 ± 1.4. El pH inicial del medio no afectó el crecimiento micelial de *Lentinus edodes*. Para otras cepas, la tasa de crecimiento aumentó con el pH. Solo la cepa de *Lentinus edodes* tuvo una tasa de crecimiento óptima a bajo pH (pH 4.0). El pH 5.0 fue el óptimo para el crecimiento de las cepas *Stropharia rugosoannulata* y *Pleurotus ostreatus* y las mayores tasas de crecimiento para este valor de pH se lograron en la cepa de *Stropharia rugosoannulata* (Furlan y col., 1997).

Ramírez y col. (2010) evaluaron el papel del pH en la producción de enzimas quitinolíticas (quitinasas y β -N-acetilhexosaminidasas o HexNase), mediante el crecimiento de *Verticillium fungicola* en presencia de quitina como fuente de carbono. Aumentando las actividades de quitinasa y N-acetilhexosaminidasa en cultivos sumergidos de *Verticillium fungicola* entre 5 veces y 2.5 veces, respectivamente, cuando el pH del medio de cultivo se elevó de 5 a 8.

3.2.9. Concentración del inóculo

La concentración del inóculo tiene efecto sobre la morfología de los hongos, Carmichael y Pickard, (1989) probaron inóculos con las siguientes concentraciones de esporas (1×10^8 – 1×10^9 de esporas/mL), se midieron niveles menores de oxígeno disuelto lo que llevó al desarrollo del micelio en morfologías dispersas. Para *Caldariomyces fumago*, se informó que la concentración de los pellets es de 0.375-0.5 g biomasa húmeda / 200 mL medio PFS después de una semana de incubación.

Para *Penicillium chrysogenum*, se informó que con una baja concentración de esporas ($3\text{-}6 \times 10^5$ esporas/mL), sólo algunas aglomeraciones de hifas conducen a pellets con pequeños diámetros. En muy altas concentraciones de esporas (1×10^8 esporas/mL), el tamaño del elemento hifal es pequeño y aglomerado, respectivamente la formación de pellets no se produce. (Nielsen y col., 1995).

En los últimos años, la estrategia de dispersión de pellets ha tenido resultados prometedores para el cultivo de semillas de *A. niger* (Wang y col. 2017). De este modo se utilizaron pellets para sustituir esporas durante la inoculación. Tradicionalmente, largos períodos de tiempo son necesarios para la preparación de esporas del cultivo de semillas. Este inconveniente se evitó a través del desarrollo de un novedoso proceso de reciclaje de semillas. La estructura morfológica mostró un incremento de las hifas densamente entrelazadas de los pellets. Un inóculo de pellets de 48h también fue ventajoso para el crecimiento de un hongo nitrificante recién aislado definido como *Penicillium sp. L1* (Liu y col., 2017).

3.2.10. Micronutrientes

Las sales que se disuelven en el medio de fermentación tienen un efecto en la supervivencia, crecimiento y metabolismo de los hongos. Se ha estudiado el efecto de la salinidad en hongos como *Pisolithus tinctorius*, *Suillus luteus*, *Rhizopogon rubescens* y *Cenococcum geophilum*. Se hicieron crecer en altas concentraciones de NaCl (0, 20, 50, 100 y 200mM) por 30 días, se evaluó el diámetro de la colonia, la producción de biomasa y el contenido de proteína (Matsuda y col., 2006).

En cuanto al efecto de las sales sobre el metabolismo de algunos hongos del género *Psilocybe*, Gartz (1990) observó que la síntesis de psilocibina y los derivados de indol, está influenciada por la presencia de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) durante la fructificación. Los alcaloides estuvieron ausentes en los hongos cultivados en medios que no tenían sales de fosfato, observándose sin coloración.

Tabla 4. Ejemplos de fermentación líquida con diferentes hongos

Hongos Microscópicos

Hongo	Condiciones de operación	Variables de Respuesta	Referencias
<i>Trichoderma harzianum</i>	(A) 30g/L de glucosa + 0.94g/L NH_4SO_4 + sales minerales (pH 3.0). (B) Medio A + 1.5g/L de extracto de levadura (C) Medio B+ alimentación a las 72h con 10g/L de glucosa (pH 5.6) e incremento de agitación a 350rpm. Biorreactores con turbina Rushton (D/T=0.3), agitación a 200rpm (excepto se indique lo contrario), un volumen de trabajo 14L con 0.5 vvm de aireación inicial (difusor puntual).	La mayor concentración de biomasa (13g/L) se obtuvo en el medio C.	Flores y col., 2002.
<i>Trichoderma reesei</i>	Se obtuvo una suspensión de esporas de 7×10^5 esporas/mL del hongo filamentoso <i>Trichoderma reesei</i> QM9414. Se empleo un volumen de inóculo del 10% respecto al volumen final del matraz. Se partió de un matraz de 250mL conteniendo 135mL de medio de cultivo con una agitación orbital a 250RPM durante 48hrs.	Se obtuvo una μ de 0.086 con un pH de 5.0 y otra μ de 0.062 con un pH de 5.5.	Marquina, 1991.

Hongos Macroscópicos

<i>Pleurotus ostreatus</i>	Se evaluó el efecto de cuatro fuentes de carbono con dos concentraciones a las vinazas tequileras sobre la producción de biomasa:	La mayor producción de biomasa (135mg/matraz) se obtuvo con almidón a 20g/L.	Motolinía y col., 2002.
----------------------------	---	--	-------------------------

	• Glucosa, almidón, xilosa y sacarosa. • Concentración (10, 15 y 20g/L). Se mantuvieron a 20° durante 7 días con una agitación de 150rpm, 0.2(v/v) y una concentración de transferencia de oxígeno de 0.01 mmol/lh.		
<i>Ganoderma lucidum</i>	Se evaluó el efecto de la fuente de nitrógeno y el efecto de la concentración inicial de glucosa sobre la producción de biomasa: • Peptona y extracto de levadura (0, 1.5, 1.25, 2.5, 5 y 10 g/L). • Glucosa (20, 35, 50, 65 g/L). A una temperatura de 30°, pH 5.5, agitación a 120rpm durante 7 días, un inóculo de 2% de suspensión, un cociente de volumen del medio de 0.18 (v/v) y una concentración de transferencia de oxígeno de 0.01 mmol/L*h.	La mayor producción de biomasa se obtuvo con una combinación de peptona y extracto de levadura (50/50) con 1.25g/L, mientras con una fuente de carbono de glucosa de 50g/L se obtuvo una producción de 16.7±0.09g/L de biomasa.	Fang y Zhong, 2001.
<i>Grifola frondosa</i>	Se evaluó el medio de sales (MS) con dos variaciones y con siete diferentes fuentes de carbono sobre la producción de biomasa: • Medio de sales simple y Medio de sales con peptona con licor de maíz. • FC₁, FC₂, FC₃, FC₄, FC₅, FC₆, FC₇	La mayor producción de biomasa se obtuvo en el medio de sales (MS) simple con 19.21g/L, mientras que con la mejor fuente de carbono se obtuvo en el medio de sales (MS) con FC ₂ , con 16.62±0.82g/L.	Zapata y col., 2007.

	A una temperatura de 26°, con un pH de 5.5, durante 10 días, a una luminosidad de 1,700 luxes, una agitación de 100rpm, un cociente de volumen del medio de 0.48(v/v) y una concentración de transferencia de oxígeno de 0.01 mmol/L*h.	Para la producción de exopolisacáridos el mejor medio es el medio de sales con una fuente de carbono de FC₄, con 6.53±0.14g/L.	
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Trametes maxima</i>	Se evaluaron dos cepas de hongos (<i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Trametes maxima</i>) para la producción de biomasa en dos tipos de fermentación: • Fermentación sumergida en caldo peptona (15g/L). • Fermentación en estado sólido con sustrato de pulpa de café. A una temperatura de 25°C, tiempo 15 días, una agitación a 120rpm, un cociente de volumen del medio de 0.2 (v/v) y una concentración de transferencia de oxígeno de 0.05 mmol/L*h.	En la fermentación sumergida la mayor producción de biomasa seca (1.38±0.01g/L) se obtuvo con <i>Trametes maxima</i> a los 12 días. Mientras en la fermentación en estado sólido a los 20 días se obtuvo un mayor crecimiento para <i>Pleurotus ostreatus</i>, alcanzando valores de 300.50±2.38g/L.	Rodríguez y col., 2007.
<i>Ganoderma lucidum</i> <i>Laetiropus sulphureus</i>	Se evaluó la mayor concentración de biomasa micelial y exopolisacáridos de cinco hongos diferentes en seis diferentes medios	La mayor producción de crecimiento micelial (16.7g/L) se obtuvo en medio YADA con hongos del género <i>Pleurotus</i>, en comparación con el medio PLDA tuvo un crecimiento	Manoni y col., 2009.

	• <i>Ganoderma lucidum</i>, <i>Laetiporus sulphureus</i>, <i>Pleurotus flabellatus</i>, <i>Pleurotus HK-37</i> y <i>Pleurotus sp.</i> • YADA (Agar yam dextrosa), CADA (Agar cassava dextrosa), PMPDA (Agar dextrosa extracto de malta peptona papa), SPDA (Agar de dextrosa de batata), PLDA (Agar dextrosa de plátano) y CATDA (Agar dextrosa rizoma cattail). A una temperatura de 30°C, durante 15 días, una agitación a 100rpm, un cociente de volumen del medio de 0.2 (v/v) y una concentración de transferencia de oxígeno de 0.02 mmol/L*h.	micelial menor (7.5 g/L) en fermentación sumergida.	
<i>Grifola frondosa</i>	Se evaluó el efecto de la fuente de carbono, de la fuente de nitrógeno, del volumen del inóculo, del pH inicial, la temperatura y de la agitación, en la morfología de los hongos para la producción de exopolisacáridos (EPS) y biomasa: • Fuentes de carbono: almidón, sacarosa, maltosa, glucosa y galactosa. • Fuentes de nitrógeno: cloruro de amonio, nitrato de amonio, fosfato de amonio, peptona de carne, poli peptona y extracto de levadura.	Entre menos compleja la fuente de carbono, mayor fue la producción de biomasa (3.5 g/L) y de EPS (4 g/L), siendo la glucosa a 30g/L la mejor fuente de carbono. Las fuentes más complejas de nitrógeno, produjeron mayor biomasa y EPS. El extracto de levadura a 6g/L, produjo la mayor biomasa (4.5g/L) y EPS (1.5g/L). En cuanto al volumen del inóculo, el valor óptimo fue de 3%(w/v), obteniéndose	Lee y col., 2003.

	A una temperatura de 25°C, un inóculo al 3%(w/v), durante 13 días, una agitación a 120rpm, un cociente de volumen del medio de 0.2(v/v) y concentración de transferencia de oxígeno de 0.08 mmol/L*h. En biorreactores de 5L con tanque agitado y tanque alimentado.	aprox. 3.75 g/L de biomasa y 2 g/L de EPS. Los perfiles de biomasa y EPS fueron similares con este parámetro, así como con el pH inicial y temperatura. Un pH 5 produjo (3.9 g/L) de biomasa y (2.1 g/L) de EPS y una temperatura de 25 produjo (3.5 g/L) de biomasa y (1.9 g/L) de EPS.	
<i>Pleurotus sp.</i>	Se evaluó el hongo del género <i>Pleurotus</i> de la cepa IE200 crecido en medio líquido (extracto de malta-sacarosa), utilizando 20g/L de extracto de malta, suplementado con una concentración de 20g/L de sacarosa. Con un inóculo que contenía 50mL de agua estéril se colocaron 2/3 partes de micelio con agar de una caja Petri, y se homogenizó por 1 minuto. Se tomaron 3mL del homogenizado para inocular un matraz que contenían extracto de malta-sacarosa, en un matraz de 50mL con 30mL de medio de cultivo, se incubaron a 28°C durante 15 días.	Se obtuvo una μ de 0.023 a las 288h de cultivo en medio EMS (Extracto de malta-sacarosa). Tuvo una producción de biomasa de 8.6g/L y un rendimiento de 0.41g de biomasa/ g de glucosa.	Aguilar, 2007.

<i>Pleurotus ostreatus</i>	Se utilizó un inóculo de tres fragmentos de micelio del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> de 4 mm de diámetro cortados de la periferia de la colonia. De la fermentación sumergida en matraces de Erlenmeyer de 125mL con 50mL de medio de cultivo. Se incubaron a 25°C con una agitación orbital a 120RPM.	Se obtuvo una μ de 0.037 con un pH de 3.5 pero sin extracto de levadura y otra μ de 0.034 con un pH de 4.5 con 5 g/L de extracto de levadura, se ajustó el pH con HCl al 1N.	Díaz, 2009.
----------------------------	--	--	-------------

3.3. Producción de enzimas en hongos macroscópicos

Los hongos también se utilizan en muchos otros procesos industriales, como la producción de enzimas, vitaminas, polisacáridos, alcoholes polihídricos, pigmentos, lípidos y glicolípidos. Algunos de estos productos se producen comercialmente, mientras que otros son potencialmente valiosos en biotecnología. Los metabolitos secundarios de hongos son extremadamente importantes para la salud y la nutrición y tienen un tremendo impacto económico. Los hongos son extremadamente útiles en la realización de procesos de biotransformación y se están convirtiendo en esenciales para la fina industria química. La industria de la biotecnología molecular ha tenido un gran impacto en el mundo de los negocios pues los productos biofarmacéuticos (proteínas recombinantes, vacunas y anticuerpos monoclonales) tienen un mercado de 15 mil millones de dólares. La tecnología del ADN recombinante, que incluye levaduras y otros hongos como anfitriones, también ha producido una revolución en la agricultura y ha tenido un marcado incremento de los mercados de enzimas microbianas.

Se han añadido manipulaciones moleculares a técnicas de mutación como medio para aumentar los títulos y rendimientos de procesos microbianos y el descubrimiento de nuevos fármacos. Hoy en día, la biología fúngica es un importante participante en la industria global (Zhiqiang, 2005).

3.3.1. Óxido reductasas

En la literatura ha habido reportes de producción de óxido reductasas por hongos macroscópicos de que se tiene reporte son las manganeso-peroxidasas extracelulares, por *Agaricus bisporus* (Hildén y col.2013), producción de etanol con altas concentraciones de celulosa con *Flammulina velutipes* (Maheara y col.2013), con sustratos lignocelulósicos con *Mrakia blollopis* (Tsuji y col., 2013) y con los hongos *Peniophora cinerea* y *Trametes suaveolens* (Okamoto y col.2010).

Hay reportes de la producción del péptido α -amanitina con *Galerina marginata* (Luo y col.2012), producción de una peroxidasa decolorante (DyP) con *Thanatephorus cucumeris*, producción de enzimas lacasas y ligninolíticas del hongo *Pleurotus ostreatus* (Ardon y col., 1996), bajo condiciones salinas por tres hongos *Tinctoporellus sp.*, *Marasmiellus sp.*, y *Peniophora sp.* (Bonugli-Santos y col.2012).

Se ha reportado la inhibición de endoglucanasas y actividades de endoxilanasas empleando glucosa con los hongos *Antrodia macra*, *A. pulvinascens*, *Ceriporiopsis aneirina*, *C. resinascens* y *Dichomitus albidofuscus* (Tomosovsky y col.2009).

Se reporta la producción de manganeso peroxidasa en cultivo sumergido con manitol con los hongos *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* (Elisashvili y col., 2010), en fermentación sólida con fuentes de nitrógeno adicionales con los hongos *Funalia trogii*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus dryinus* y *P. tuberregium* (Kachlishvili y col., 2006), con inductores específicos con *Pseudotremella gibbosa*, *Fomes fomentarius* y *T. pubescens* (Elisashvili y col.2009).

Hay reportes de la producción de metabolitos triterpenoides del hongo comestible *Ganoderma lucidum* (Adams y col., 2010), producción de poligalacturonasa del hongo *Moniliophthora pernicioso* (Santos y col., 2013), producción de oxalacetato con los hongos *Coriolus versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium* (Dutton y col.1993).

Se reporta la producción de tetracloro-4-metoxifenol y tetracloro-1,4-dimetoxibenceno con cepas de *Bjerkandera*, *Peniophora* y *Phellinus fastuosus* (Teunissen y col., 1997), producción de enzimas oxidativas con los hongos

Trametes maxima, *Pholiota highlandensis*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea* (Shamolina y col.2008).

Se ha reportado la producción de hidroxipireno, 4-ácido fenantroico, 1-hidroxi-2-naftoico, ácido ftálico y ácido protocatecuico con el hongo *Armillaria sp.* (Hadibarata y Kristanti, 2013), producción de peptidasas con *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium italicum*, *P. viridicatum* y *P. glabrum* (Santos y col., 2004), además de *Agaricus*, *Auricularia*, *Flamminula*, *Grifolia*, *Hypsizygus*, *Lentinus*, *Pholiota*, *Pleurotus*, *Tremella*, *Tricholoma* y *Volvariella* (Kûes y Liu,2000).

3.3.2. Hidrolasas

En la literatura se encontraron reportes de hidrolasas producidas con los hongos basidiomicetos y zigomicetos superiores: *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus*, *Schizophyllum comuna*, *Rhizopus arrhizus* y *Mucor sp.* sobre la biosíntesis de celulasas, amilasas y proteasas. Se seleccionaron cuatro pares óptimos de cultivos de hongos. De éstos, tres parejas pertenecían a hongos superiores y un par estaba constituido por hongos de distintos grupos ecológicos, un macromiceto y un micromiceto. Las actividades de amilasa y proteasa fueron 1,5-2 veces más altas y las actividades de las celulasas fueron menores durante el crecimiento de asociaciones de hongos superiores. La asociación mixta del macromiceto *Schizophyllum comuna* y el micromiceto *Mucor sp.* fue el productor más activo de enzimas hidrolíticas. Durante el crecimiento de esta asociación mixta, se observaron incrementos de 4 y 1,5 veces en la actividad de endoglucanasas y proteasa, respectivamente, en paralelo con la estimulación de la formación de amilasa (Vinogradova y Kushnir, 2003).

3.3.3. Producción de enzimas en hongos del género *Psilocybe*

En la literatura ha habido reportes de las enzimas producidas con *Psilocybe castanella* son lacasas y oxidasas (Amaral y col., 2007), Chang y Mills (1992), realizaron estudios comparativos de morfología y análisis de isoenzimas para investigar las relaciones entre *Psilocybe subaeruginosa*, *P. australiana*, *P. tasmaniana* y *P. eucalypta*. Las actividades peroxidasa y oxidasa de *Psilocybe castanella* var. *subhyperella* (Sing.) y *Psilocybe singeriana* se han evaluado en placas con agar mediante la oxidación del colorante Azul Brillante de Remazol R (RBBR) y guayacol, mientras que las actividades lacasas y peroxidasa se evaluaron empleando una solución de α -naftol y pirogalol (Kimie y col.2000).

Hay reportes de las actividades enzimáticas de lacasas y peroxidasas de *Psilocybe castanella* se evaluaron mediante la decoloración in vitro de RBBR determinando la efectividad (Moreira y col.; 2009). La actividad manganeso peroxidasa se determinó por la oxidación de rojo de fenol en *Psilocybe castanella* (Machado y col.2005).

Se han encontrado reportes de la actividad enzimática de lacasas (879.9U/L) en *Psilocybe castanella* se determinó por el aumento de la absorbancia durante un período de 10 min y se caracterizó en sustrato sólido (bagazo de caña de azúcar, almidón y harina de soja) (Ballaminut y Matheus, 2006).

4. ANTECEDENTES

La producción de quitinasas en hongos se ha reportado principalmente en hongos filamentosos como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Lecanicillium* (Dahiya y col. 2005). Se han obtenido endoquitinasas de *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium aculeatum*, *Penicillium funiculosum*, y *Penicillium pinophilum* con quitina coloidal como sustrato obteniéndose un incremento de la producción de 3.5 a 12.53 U/g del peso seco de la muestra (Binod y col. 2006).

En otro estudio con *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata*, *Suillus bovinus*, y *S. luteus* en diferentes sustratos tales como quitina coloidal, micelio de *Trichoderma harzianum*, *T. virens* y *Mucor hiemalis*, se reportó que *A. muscaria* tuvo una producción de quitinasas de 1.9 y 1.8 mU en presencia de quitina coloidal y micelio de *M. hiemalis* respectivamente (Mucha y col., 2006).

En hongos macroscópicos los estudios se han enfocado a la detección de quitinasas más que a su producción. Se ha usado la metodología de superficie de respuesta para examinar la regulación de quitinasas en el basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*. La mayor secreción de quitinasas (52.14 UA ng⁻¹ proteína h⁻¹) ocurrió con N-acetil-glucosamina y extracto de levadura a 20 días de cultivo y se reprimió en presencia de quitina (López y col. 2008).

En otro estudio cuyo objetivo fue generar materiales contra hongos patógenos, se reportó la detección de quitinasas durante la autólisis de *Coprinellus congregatus* (Lim y Choi, 2009).

La producción de enzimas, entre ellas N-acetilglucosaminidasas, se estudió en los hongos basidiomicetos *Phanerochaete velutina*, *Resinicium bicolor* e *Hypholoma fasciculare*, por estimulación de microorganismos heterotróficos que intervienen en la descomposición de madera (Crowther y col. 2011).

Se han examinado hongos saprotróficos como *Agaricus campestris*, *Boletinus merulioides*, *Leucopaxillus tricolor*, *Lycoperdon perlatum* y *Morganella pyriformis* y hongos ectomicorrizales como *Phylloporus rhodoxanthus*, *Xerocomus chrysenteron*, *Inocybe sp.* y *Russula sp.*, en términos de la producción de enzimas extracelulares, principalmente quitinasas.

Esto durante el cultivo en medio modificado Melin Norkrans, con un hongo del género *Lycoperdon* tuvo una mayor actividad β -1,4-N-acetilglucosaminidasa ($3300 \text{ nmolhr}^{-1}\text{cm}^{-2}$) (Burke y col. 2014).

Debido a que la información relacionada a la producción de quitinasas con hongos del género *Psilocybe* es prácticamente nula, como consecuencia de los usos tradicionales (producción y consumo de alcaloides), los reportes anteriores servirán como base para definir las condiciones de fermentación adecuadas, considerando que los hongos macroscópicos descritos comparten características taxonómicas englobadas en el filo Basidiomycota.

En el área de biotecnología de la UNPA se han desarrollado proyectos con hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Penicillium* sp. utilizando como sustrato dos fuentes quitinosas: camarón y chapulín. Se demostró que *B. bassiana* y *Penicillium* sp. logran mayor actividad Nhasa (16 mU/mL y 19 mU/mL , respectivamente) utilizando chapulín como inductor (Escobar, 2017). En otro estudio Azamar (2016), utilizando chapulín como inductor a una concentración de 5 g/L , produjo una actividad específica de $0.987 \text{ mU}/\mu\text{g}$ proteína.

En la literatura hay reportes de producción de quitinasas con *Tricholoma matsutake*, *Lyophyllum shimeji*, *S. bovinus*, *L. hatsudake*, *Lentinus edodes*, *Flammulina Velutipes* y *Pleurotus ostreatus*, para estudiar el potencial de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares por hongos micorrícicos, donde las productividades del micelio se determinaron en medio líquido de dextrosa-patata. *Tricholoma matsutake* ha producido 70 U/g de celulasas en todas las cepas de prueba (Deswal y col.2011).

También se encontró la clonación y expresó una enzima quitinolítica (Chi2), del sistema de expresión de *Pichia pastoris* en *Coprinellus congregatus*. El pH óptimo y la temperatura de Chi2 fueron de pH 4.0 y 35°C respectivamente, utilizando el sustrato 4-nitrofenilo N, N'-diacetil- β -D-chitobiósido. El valor K_m y V_{max} usando este sustrato fue de 0.175 mM y $0.16 \text{ OD min}^{-1} \text{ *unidad}^{-1}$, respectivamente (Kang y col.2012).

5. JUSTIFICACIÓN

La investigación asociada a la producción de quitinasas empleando hongos es amplia, la razón principal es el poder utilizar tales catalizadores para hidrolizar su sustrato, la quitina, el cual es el segundo biopolímero más abundante en todos los biomas. Actualmente se busca aumentar la producción de estas enzimas, desarrollando diferentes métodos para lograrlo. Una estrategia es controlando los diferentes parámetros involucrados en la fermentación y que son de importancia para los hongos.

Otra estrategia es investigar nuevas especies productoras, existiendo interés por otros hongos, entre ellos los del género *Psilocybe*, ya que de este no existen reportes de la expresión de enzimas y en especial de quitinasas, además de ser abundante en el estado de Oaxaca. La problemática asociada al uso de estos hongos es la posible producción de alcaloides o sustancias psicoactivas (psilocibina o psilocina), por lo cual fue uno de los objetivos, el evaluar el efecto del ión fosfato dada su injerencia en la ruta metabólica que conduce a la producción de estos alcaloides.

De esta manera se propuso realizar una investigación relacionada con la producción de quitinasas, evaluando la fuente de carbono y la inclusión de fosfato sobre la actividad quitinolítica (enzimas endo y exoquitinasas) así como el efecto de estos en la síntesis de psilocibina y psilocina, de dos aislados de hongos del género *Psilocybe*, en fermentaciones líquidas.

6. HIPÓTESIS

En la fermentación de hongos del género *Psilocybe* en medio líquido utilizando quitina como inductor, fuente de carbono y una concentración nula de fosfato, se aumentará la producción de quitinasas, sin embargo, se modificará el tipo de alcaloide producido.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Estudiar el efecto del tipo de fuente de carbono y la inclusión de fosfato sobre la actividad quitinolítica y la síntesis de alcaloides indólicos, de dos aislados de hongos del género *Psilocybe*, en fermentaciones líquidas.

7.2. Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de una fuente de carbono compleja (quitina) y una fuente de carbono simple (glucosa), sobre la actividad quitinolítica (endo y exoquitinasas) y la síntesis de psilocina y/o psilocibina en dos aislados de hongos del género *Psilocybe*.
- Estudiar el efecto del ión fosfato (fosfato de potasio monobásico) sobre la actividad quitinolítica (endo y exoquitinasas) en dos aislados de hongos del género *Psilocybe*.
- Determinar estadísticamente, el efector (fuente de carbono, ión fosfato, o la combinación) de mayor injerencia sobre la actividad quitinolítica.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Ubicación

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec.

8.2. Microorganismo

Los hongos fueron recolectados en la Región de Huautla de Jiménez (18°07'50"N 96°50'35"O) y de la Región de la Sierra Norte de Oaxaca (17°19'50"N 96°29'14"O).

Se recolectaron hongos con características del género *Psilocybe*, de la región de Huautla de Jiménez y otros hongos con características del género *Psilocybe* recolectados en la región de la Sierra Norte de Oaxaca. Se removió al hongo de la tierra con una espátula para su posterior análisis en el laboratorio de bioprocesos.

8.3. Aislamiento

Se diseccionaron los hongos en talo y sombrero para su cultivo en medio Murashige y Skoog, incubándose a 22°C y una humedad de 80%, durante 2 semanas.

El micelio obtenido se resembró en matraces de 125mL y en cajas Petri con medio agar extracto de malta y se incubaron a las mismas condiciones antes descritas. Los matraces resembrados se ocuparon para obtener el inóculo para las fermentaciones posteriores.

8.4. Producción de quitinasas

8.4.1. Producción del inóculo

Se recuperaron esporas de 6 matraces de 125 mL, que se mantuvieron a una temperatura de 22 °C, con una humedad de 80% y en presencia de luz natural.

Se separó la biomasa (micelio y esporas) del medio agar extracto de malta con un asa bacteriológica en esterilidad y se almacenó en tubos Falcon de 50 mL, adicionando agua destilada, se agitó manualmente y se centrifugó a 5500 RPM durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante (esporas) se almacenó en tubos Falcon de 50 mL, bajo refrigeración (4°C) y resguardando de la exposición de la luz cada tubo con papel aluminio, para el conteo de esporas en cámara de Neubauer. El volumen del inóculo representó el 5% del volumen de trabajo en el matraz, lo que fue equivalente a la concentración de esporas mostradas en la tabla 3.

Por otra parte, el sólido (micelio) se recuperó con 100 mL de agua destilada estéril y se almacenó en frascos de vidrio con tapa, a temperatura ambiente (24°C) y luz tenue natural.



Figura 10. Concentrados de los aislados DMRN1 y DMRN2

8.4.1.1. Detección de alcaloides sobre los aislados fúngicos.

Para la detección de alcaloides se puso a secar biomasa de los aislados DMRN1 y DMRN2, recuperada de los tubos falcón y se llevó a sequedad. A éstas se les realizó la Prueba de Marquis: se pesó un gramo de cada muestra y se le añadió una gota de solución A (8-10 gotas al 40% de una solución de formaldehído con 10 mL de ácido acético glacial) y tres gotas de solución B (Ácido sulfúrico conc. H_2SO_4). Un color naranja indicó la presencia de psilocibina y un color marrón verde indicó la presencia de psilocina. El límite de detección es aproximadamente 10 μg (Mahmood, 2013).

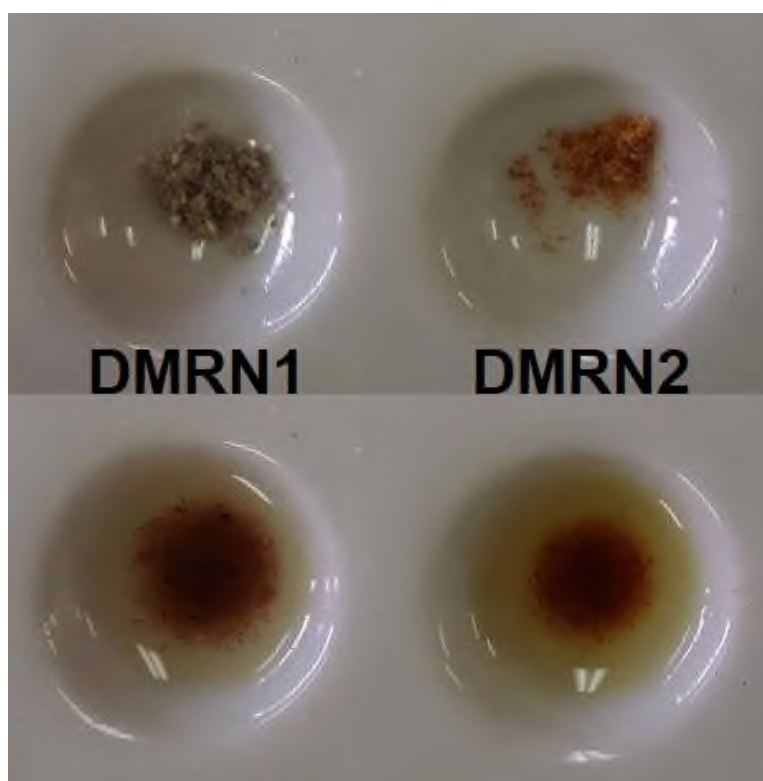


Figura 11. Determinación de alcaloides sobre los aislados fúngicos

8.4.2. Fermentación líquida

El medio de cultivo líquido empleado para la detección de actividad quitinolítica, fue el medio Czapeck modificado, con las concentraciones descritas en la Tabla 4, para evaluar los efectos de la fuente de carbono y de fosfato.

El medio se esterilizó durante 15 min a 121 °C. Se inocularon bajo condiciones asépticas con los inóculos presentados en la tabla. Los cultivos se incubaron a 22 °C por una semana, bajo agitación a 180rpm y con luz. Se emplearon matraces Erlenmeyer de 2 L, en los cuales el cociente de volumen de trabajo sobre el volumen nominal (V_T/V_N) fue de 0.5.

Durante las fermentaciones se tomaron muestras cada 48h en las que se realizaron las siguientes determinaciones: biomasa, proteína en sobrenadante, actividades quitinolíticas (endoquitinasas y N-acetilhexosaminidasa) y azúcares reductores.

Tabla 5. Medio Czapeck modificado para evaluar el efecto de la fuente de carbono y de fosfato.

Reactivo	Fuente de carbono		Efecto del fosfato	
	Quitina	Glucosa	Con Fosfato	Sin Fosfato
Quitina Comercial SIGMA®™	10	0	0	0
Glucosa Comercial SIGMA®™	0	10	10	10
NaNO₃	1	1	1	1
*MgSO₄*7H₂O	0.5	0.5	0.5	0.5
*KCl	0.5	0.5	0.5	0.5
*K₂HPO₄*3H₂O	1	1	1	0
*FeSO₄*7H₂O	0.01	0.01	0.01	0.1

Notas: Todos los valores están en [g/L]

*Los reactivos marca J.T. Baker

Tabla 6. Concentración de esporas en las fermentaciones líquidas.

Aislado	Fermentación	Inóculo	En matraz
		[esporas/mL]	[esporas/mL]
DMRN1	Con Quitina	6.39×10^9	3.19×10^7
	Con Glucosa	5.74×10^9	2.8×10^7
	Con Glucosa s/Fosfato	6.98×10^9	3.49×10^7
	Promedio	$6.37 \times 10^9 \pm 6.22 \times 10^8$	$5.88 \times 10^9 \pm 2.17 \times 10^8$
DMRN2	Con Quitina	6.06×10^9	3.03×10^7
	Con Glucosa	5.64×10^9	2.82×10^7
	Con Glucosa s/Fosfato	5.94×10^9	2.97×10^7
	Promedio	$5.88 \times 10^9 \pm 3.11 \times 10^6$	$2.94 \times 10^7 \pm 1.08 \times 10^6$

8.4.3. Tratamiento de las muestras de fermentación

Cada muestra obtenida de la fermentación se centrifugó a 5500RPM a 4 °C por 15 min y se filtró con papel filtro Whatman N° 41 (retención de partículas de poro de 20 a 25 micrómetros), previamente pesado y tarado para poder determinar la biomasa por peso seco y al filtrado se le realizaron las determinaciones descritas en el siguiente apartado.

8.5. Análisis de las muestras de la fermentación

8.5.1. Determinación de proteína soluble

A la fracción líquida (filtrado) se le determinó la proteína mediante el método de Bio Rad (Bio Rad, 1987) que se basa a su vez en la técnica de micro ensayo de Bradford (Bradford, 1976). La concentración de proteína se determinó empleando una curva patrón de seroalbúmina bovina como estándar (Anexo A. a).

8.5.2. Determinación de biomasa

El retenido se puso en horno a 60 °C hasta alcanzar peso constante, la biomasa se determinó gravimétricamente.

8.5.3. Determinación de actividad enzimática

8.5.3.1. Determinación de N-acetilhexosaminidasa

A 200 μ L de filtrado, se le adicionaron 200 μ L de amortiguador de citratos-fosfatos (0.2 M, pH 5.6) y posteriormente, 200 μ L de solución de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida (pNAG) 1.0 mg/mL.

La mezcla de reacción se incubó a 37 °C y 180 rpm durante una hora, la reacción se detuvo adicionando 1 mL de NaOH (0.02 M) y se le midió la absorbancia a 400 nm.

La cuantificación de p-nitrofenol se efectuó mediante una curva estándar (Anexo A. b). La actividad N-acetilhexosaminidasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto (Tronsmo y Harman 1993).

8.5.3.2. Determinación de actividad endoquitinasas

La actividad endoquitinasas se determinó midiendo el cambio en la turbidez de 500 μ L de una suspensión de quitina coloidal al 1 %(p/v) en solución amortiguadora de fosfatos (5 mM, pH 6.7). Para ello se prepararon muestras y testigos que se hicieron reaccionar con proporciones iguales de sustrato, incubando a 30 °C por 24 horas y 180 rpm para las muestras, y sin incubar los testigos. Al finalizar la reacción, muestras y testigos se llevaron a un volumen de 6 mL con agua destilada, se agitaron y se leyó la absorbancia a 510 nm.

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir la turbidez de la suspensión de quitina coloidal en un 5 % bajo las condiciones de reacción (Tronsmo y Harman 1993).

8.5.3.3. Determinaciones de otros parámetros enzimáticos.

Se determinó la actividad específica, a partir del cociente de la actividad enzimática volumétrica (U/mL) entre la concentración de proteína soluble (μ g/mL), con el objetivo de determinar qué tanto de la proteína secretada al medio, correspondía a la producción de enzimas quitinolíticas.

Por otra parte, se obtuvo la productividad a partir del cociente de la actividad enzimática volumétrica (U/mL) entre el tiempo de producción (h). Esto para determinar el tiempo en el que el proceso sería más rentable, para cada tipo de enzima.

8.5.4. Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores en cada muestra se determinaron mediante la reacción con ácido dinitrosalicílico (Miller 1959) empleando una curva patrón de N-acetilglucosamina en la fermentación con una fuente de carbono de quitina y de una curva patrón de glucosa para determinar azúcares reductores en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa (Anexos A. c y A.d).

8.5.4.1. Consumo de glucosa

Considerando que la glucosa es un azúcar reductor, en las fermentaciones con este azúcar como fuente de carbono, su consumo se cuantificó sustrayendo a la concentración inicial (10g/L) la concentración de azúcares reductores detectados para cada intervalo de muestreo. La tasa de consumo (rs) se determinó dividiendo el consumo de glucosa entre el tiempo evaluado.

Para las fermentaciones con quitina, cabe mencionar que el consumo de este sustrato no fue posible monitorearlo mediante azúcares reductores, ya que la quitina no se comporta como tal, por lo que los azúcares reductores cuantificados en estas fermentaciones, representan los quitin oligosacaridos producidos por la hidrólisis de la quitina externa (o la agregada como sustrato) e interna (la que se sintetizó para formar biomasa).

8.5.5. Detección cualitativa de alcaloides

8.5.5.1. Análisis colorimétrico de las muestras durante las fermentaciones líquidas.

Las muestras resultantes de cada tiempo de fermentación se separaron de la biomasa y fueron centrifugadas. Al sobrenadante se le realizaron las pruebas colorimétricas que a continuación se mencionan.

8.5.5.2. Prueba de Ehrlich modificada de Kovacs

En esta prueba se utilizó una placa de porcelana multipozos y el reactivo de Ehrlich-Kovacs (HYCEL), el cual contiene p-dimetilaminobenzaldehído 5% (p/v), alcohol amílico 75% (v/v) y ácido clorhídrico concentrado al 25% (v/v).

Esta prueba se modificó diluyéndose en agua destilada a una proporción 1:10, utilizando una placa de porcelana multipozos, se colocó una gota de la muestra y se adicionaron dos gotas del reactivo de Ehrlich-Kovacs modificado.

Esta prueba dio una coloración azul-violeta como indicativo de la producción de psilocibina y un color amarillo como respuesta negativa.

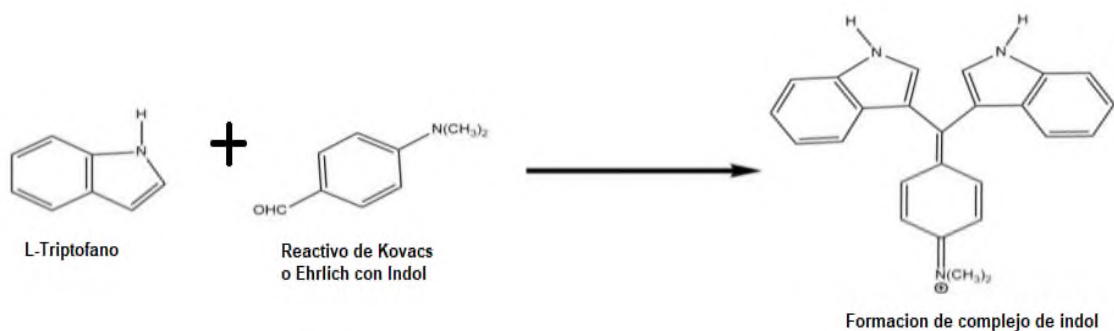


Figura 12. Reacción de indol (Fernández y col., 2010)

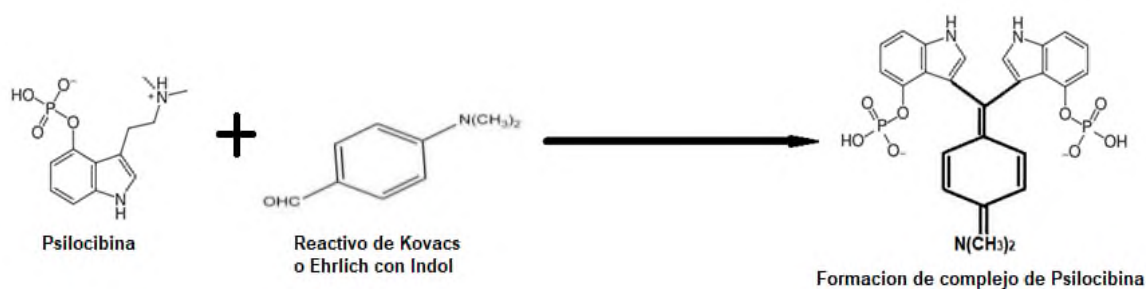


Figura 13. Reacción de la psilocibina (Fernández y col., 2010)

8.5.5.3. Análisis colorimétrico Color Flex (Método HunterLab).

El análisis de color se realizó con un colorímetro Color Flex EZ (Color Flex Hunter Lab®, modelo DIFUSE, USA), en el líquido resultante de la reacción con reactivo de Ehrlich-Kovacs. El cual contiene una solución A (8-10 gotas al 40% de una solución de formaldehído con 10 ml de ácido acético glacial) y una solución B (Ácido sulfúrico conc. H_2SO_4). La calibración se realizó con un blanco de agua destilada usando recipientes especiales, los cuales se llenaron posteriormente con un mililitro de muestra. Los valores resultantes de los parámetros L, a^* y b (L=luminosidad, a^* = cromaticidad rojo-verde y b= cromaticidad amarillo-azul) se introdujeron en dos softwares de acceso libre en internet, el primero para convertir a valores de RGB (easyRGB.com, 2018) y obtener un código de color, que se introdujo en el segundo software (colorhexa.com, 2018), para encontrar mediante comparación con cartillas, el color específico. Lo anterior, ya que, por ser hongos macroscópicos, la producción de metabolitos (alcaloides) a intensidades fácilmente detectables a simple vista, puede ser tardada y dependiente del observador.

8.5.6. Modelamiento matemático

Para el modelamiento matemático se partió de la ecuación de Monod (ecuación 1), la cual se describe como un modelo primario. Se utilizó el software Origin versión 8, para obtener diferentes modelos de los resultados que se obtuvieron de la cinética de crecimiento del aislado DMRN1 con quitina.

8.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza con el programa MINITAB (Versión 2018) visualizando mediante gráficas de cajas.

Se realizaron diversos análisis de varianza de dos factores para cada aislado (DMRN1 y DMRN2) y tipo de enzima (Endoquitinasas y Exoquitinasas). Cuando se consideró evaluar el efecto de la fuente de carbono (C1 con dos niveles, Quitina y Glucosa), el fosfato se dejó fijo. Cuando se consideró evaluar el efecto del fosfato (C1 con dos niveles, Con o Sin fosfato), la fuente de carbono se fijó. El otro factor (C2) en ambos análisis, fue el tiempo de fermentación (con 7 u 8 niveles según el aislado estudiado).

Se construyeron tablas (Anexo J) donde la variable respuesta fue la actividad quitinolítica volumétrica o Actividad enzimática (tablas 24,27,30 y 33), en otras la variable respuesta fue la Actividad Específica (tablas 25,28,31 y 34) y en otras la variable respuesta fue la Productividad (tablas 26,29,32 y 35). En dichas tablas, el concenso de los valores permitió mediante la prueba de F, evaluar el efecto de la fuente de carbono o del fosfato sobre las enzimas, con un valor de α de 0.05.

9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1. Selección de aislados con mayor presencia de alcaloides.

Los concentrados de los aislados DMRN1 y DMRN2 obtenidos después de la centrifugación, se utilizaron en todas las fermentaciones, por tener una coloración más intensa (Figura 14), en comparación a los otros aislados de la región de Huautla de Jiménez, Oaxaca.

Debido a que el aislado DMRN1 presentó una coloración azul intenso, se atribuye que produjo el alcaloide psilocibina, mientras que el aislado DMRN2, tuvo una coloración naranja-rojiza intenso, que puede atribuirse a la presencia del alcaloide psilocina o un análogo de la psilocibina.



Figura 14. Concentrados de los aislados DMRN1 y DMRN2

9.2. Determinaciones de las fermentaciones líquidas con el aislado DMRN1.

9.2.1. Biomasa y tasa de consumo de glucosa

La determinación de biomasa, se hizo para observar el crecimiento de los aislados, con respecto a la fuente de carbono y entre las fermentaciones con glucosa, comparar si el fosfato tuvo un efecto significativo en este parámetro.

De manera general, con el aislado DMRN1 y la fuente de carbono de quitina, se observó una mayor producción de biomasa.

Si analizamos las Fig. 15 y Fig. 16 en el periodo de 0-24h, pareciera que los tres perfiles de biomasa tienen la misma pendiente, sin embargo, el de la fermentación con glucosa y fosfato, obtuvo una mayor velocidad de producción de biomasa (0.0988 g/L*h) en ese breve periodo, respecto a los valores de las fermentaciones con glucosa sin fosfato (0.0817g/L*h) y quitina (0.0683 g/L*h), esto a partir de los valores estimados, de las pendientes (Anexo C) para las tres fermentaciones.

Debido a que no hubo una fase lag en las tres fermentaciones, las causas probables a las que atribuye la bibliografía son: tipo y edad del microorganismo, el tamaño del inóculo y las condiciones de cultivo, de éstas, las de mayor injerencia fueron:

- (a) El tamaño del inóculo. Dutta (2008) establece que, si se inocula una menor cantidad de células en un gran volumen de fermentación, la fase lag es prolongada, por lo tanto, lo opuesto tendría el efecto de reducir dicha fase. En este caso, las esporas provenientes del extracto de malta en el inóculo, tenían una concentración promedio aproximadamente 200 veces mayor a la concentración de esporas en los matraces de fermentación (ver tabla 3). Lo anterior fue favorable, pues se permitió una mejor dispersión del microorganismo al medio de fermentación y tuvo el mismo efecto, a que si se inoculara el fermentador con el producto de una serie de cultivos semilla.

(b) Se sabe que, si se inocula un microorganismo de una baja concentración de nutrientes a una de alta concentración, la fase lag se prolonga (Dutta, 2008). En este trabajo, nuevamente se tuvo una relación opuesta, ya que el contenido de nutrientes (suma de la masa de carbono y del nitrógeno) fueron 7.33 veces mayor en el extracto de malta que en el medio Czapeck. Se esperaba que el medio Czapeck con quitina proporcionara más C y N y se evidenciara fase lag, pero esto no tuvo este efecto, ya que la quitina por ser un sustrato polimérico insoluble, no fue asimilado en su totalidad de las 0-24h. El C y N de las sales del medio fueron suficientes para lograr el mismo efecto que el medio con glucosa.

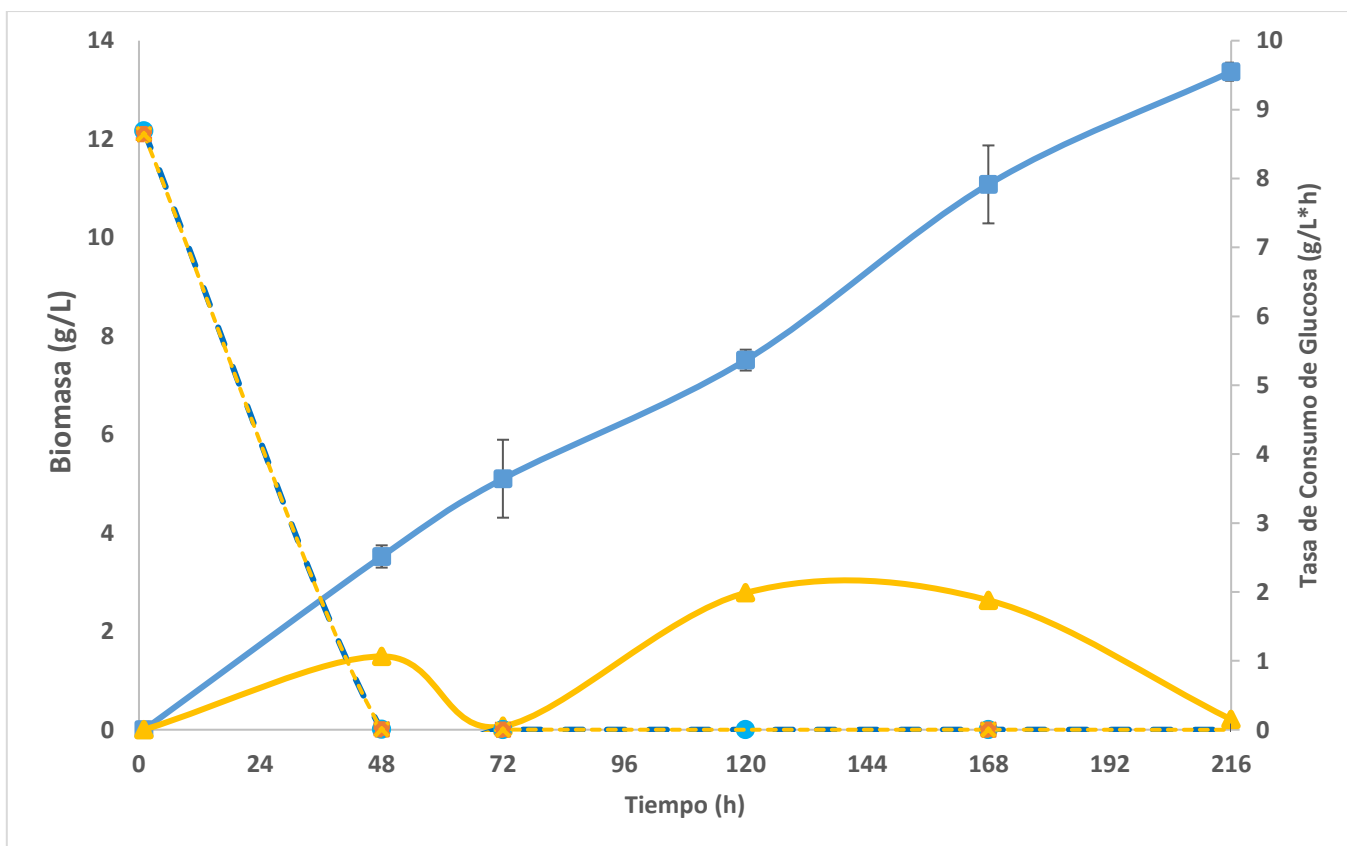


Figura 15. Cinética de crecimiento y tasa de consumo del sustrato para el aislado DMRN1.

■ Producción de biomasa con glucosa y fosfato. ▲ Producción de biomasa con glucosa sin fosfato. ● Tasa de consumo de glucosa con fosfato. ■ Tasa de consumo de glucosa sin fosfato. Los valores mostrados representan el promedio de dos repeticiones (Promedio±SD).

9.2.1.1. Fermentación con glucosa y fosfato

En el perfil de biomasa que se observa en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 15, línea azul continua), la ausencia de una fase de adaptación (fase lag) probablemente ocurrió, porque las esporas del hongo al cambiar de un medio sólido a un medio líquido se estresaron por la falta de oxígeno en el medio, adaptándose rápidamente al medio de fermentación, también como consecuencia del tamaño del inóculo y el cambio favorable de nutrientes de la solución del inóculo al medio de fermentación, aspectos antes discutidos.

Por otra parte, al emplear la sal dibásica de fosfato de potasio ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$), se proporcionaron al medio mediante su disociación, iones fosfato y potasio, lo cual permitió que participara el ión potasio en la bomba Na-K y el ión fosfato, ingresando en la célula para la fosforilación de la glucosa. Además, esta disociación de la sal se vio favorecida por su alta solubilidad (1600 g/L), en comparación a si se usara la sal monobásica (www.ctr.com.mx).

En la misma gráfica de la fermentación con glucosa y fosfato, se visualizaron otras cinco regiones de producción de biomasa con diferentes pendientes. En la segunda región, de las 48-72h, se contempló una velocidad de producción de biomasa (0.0658 g/L*h) respecto a la primera región, probablemente porque el micelio entró en un estado de estrés, empezándose a expresar genes y desarrollando formas para poder crecer y desarrollarse.

Se considera que la disminución en la velocidad de crecimiento, se debió a que su metabolismo se derivó en la síntesis y reparación de la pared celular, consumiendo gran parte de su energía de reserva. Con respecto a la tasa de consumo de glucosa mostrada en la Fig. 15 (línea azul punteada), en la primera región de las 0-48h, su valor se estimó en 0.0043 mg/mL*h (tabla 7), esto probablemente ocurrió debido a que se empezó a consumir la glucosa a una mayor velocidad con respecto a la producción de proteínas solubles y proporcional al consumo de glucosa utilizada como energía para el hongo, disminuyendo la tasa de consumo de glucosa en una segunda región de las 48-72h (0.0015 mg/mL*h). Esto probablemente ocurrió porque el hongo empezó a producir oligosacaridos debido a la lisis de la pared de quitina de los hongos.

Con respecto a la tercera región de biomasa, de las 72-120h, se notó un ligero descenso en la velocidad de producción de biomasa cuantificada en 0.0502 g/L*h, esto probablemente ocurrió porque se expresaron enzimas quitinolíticas como las exoquitinasas que lisaron el micelio y se liberaron glicosil hidrolasas (Fig.18), las cuales, por referencias bibliográficas, fueron necesarias para la degradación de la pared compuesta de quitina. Por otra parte, se sabe que los hongos durante su crecimiento, pasan por procesos alternados de degradación y de síntesis de nueva pared, por lo que, para esto último, son necesarias quitin-sintasas y oligosacáridos de quitina. Esto se constata con el descenso gradual de los azúcares de las 0-48h, y posteriormente a las 72h se mantiene constante la concentración.

En la cuarta región, de las 120-168h, se detectó una velocidad de producción de biomasa (0.0744 g/L*h) en comparación con las otras regiones. Aunque la tasa de consumo de glucosa sigue descendiendo de las 72-120h, esto nos indica que se secretaron enzimas para la síntesis y a su vez para la degradación, lo cual se puede justificar advirtiendo la disminución de endoquitinasas y un ligero incremento de exoquitinasas (Fig. 17 y Fig. 18), así como con la gráfica de proteína soluble (Fig.16), la cual se mantiene constante en este periodo, indicando que otras enzimas como las quitin sintasas, debieron estar presentes en el medio.

Con respecto a tasa de consumo de glucosa esto probablemente ocurrió porque el hongo empezó a producir oligosacaridos debido a la lisis de la pared de quitina de los hongos, descendiendo en la tercera región de las 72-120h con una velocidad de consumo menor (0.00029 mg/mL*h).

Para el periodo de las 168-216 con respecto a la producción de biomasa (quinta región), se notó una velocidad de producción estimada en 0.0477 g/L*h. En esta región se considera que el hongo entró a un estado de latencia, consumiendo sus reservas energéticas disponibles.

En la cuarta región se observa un aumento en la tasa de consumo mayor de glucosa de las 120-168h (0.0009mg/mL*h). Esto probablemente se notó por la gradual disminución de oligosacaridos de quitina de la lisis de la pared de los hongos, indicando que se dejó de reparar y remodelar la pared de los hongos.

Con respecto a la tasa de consumo de glucosa en la quinta región de las 120-216h (-0.0001 mg/mL*h) la velocidad de producción casi imperceptible la cual se observaría como una fase de mantenimiento. Esto probablemente se debió a que se empezaron a producir oligosacaridos de la lisis de la pared de quitina de los hongos en una cantidad mínima contrarrestado por la tasa de consumo de glucosa. Contrastando con la tabla 7 se observa que el periodo de tiempo no corresponde con una etapa de mantenimiento debido a que el m_s es negativo esto nos indica que a partir de este punto se detuvo el crecimiento del hongo empezando a haber una lisis del micelio producido.

Esto probablemente ocurrió debido a que el hongo agotó las reservas energéticas, consumiendo los remanentes de glucosa libre que se encontraban en el medio de fermentación o por que el hongo no logró desarrollar cuerpo fructífero, entrando en un estado de latencia o reserva energética, aunque se empezaron a sintetizar alcaloides para la formación del triptófano obtenido de la degradación de las proteínas de la pared del micelio.

Aunque la velocidad de producción de biomasa disminuye ligeramente, el descenso de la biomasa en etapas tardías de la fermentación, se asoció a que el inóculo inicial se encontraba en su fase de esporulación, así los perfiles de proteína soluble y quitinasas indican que se produjeron otras proteínas para producir la pared celular de las esporas entre las que se encontraban las quitin-sintasas y desacetilasas (Pastor de Abram e Higuera, 2004). Respaldando esto, se tiene la investigación de Smits y col. (2001) quienes, analizando la composición de las esporas, encontraron la presencia de una capa de quitosano o quitina desacetilada, siendo necesaria la actividad de desacetilasas y quitosanasas.

Los rendimientos obtenidos en la fermentación con glucosa son mostrados en la tabla 7, obtenidos de las fórmulas presentadas en el marco teórico

Los rendimientos obtenidos en los diferentes periodos mostrados en la tabla 7, muestran altos valores atípicos respecto a los consultados en las referencias, esto se pudo deber de acuerdo a la ecuación (5) a un incremento de la biomasa o a que el consumo de sustrato cada vez era menor. De las 0-48h se incrementó la tasa de consumo de glucosa al máximo y el rendimiento de biomasa fue menor

Observando la tabla 7, se aprécia que los diferentes parámetros cinéticos obtenidos durante cinco periodos, los fueron muy altos debido a que la tasa de consumo de glucosa fue alta mientras la producción de biomasa fue baja. Aunque no se muestra ninguna fase de mantenimiento, se observa de las 160-216h valores negativos esto nos dice que hubo una disminución de la producción de biomasa al final de la fermentación. Estos valores son el resultado de la división, se nota que el rendimiento de biomasa/consumo de sustrato en este caso es mayor con respecto a la producción de biomasa. Esto se observa en la figura 15 de la cinética de crecimiento y tasa de consumo de sustrato, mostrandose que se consumió el sustrato al principio de la fermentación y hubo una rápida producción de biomasa, aunque no hubo una tasa de mantenimiento prolongada solo por periodos cortos, esto nos indica que el micelio siguió creciendo con una fuente de carbono mínima. Aunque los valores por periodos son mayores de lo normal el rendimiento global son normales comparándose con la tabla 2 de los diferentes rendimientos de biomasa reportados.

Tabla 7. Parámetros cinéticos para la fermentación con glucosa con el aislado DMRN1

PERIODOS	Biomasa/ Sustrato $Y_{X/S}$	TASA VOLUMÉTRICA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA r_x	TASA ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO q_s	TASA VOLUMÉTRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO r_s	COEFICIENTE DE MANTENIMIENTO m_s
	Valor $\left[\frac{g_{biomasa}}{g_{glucosa}}\right]$	Valor $\left[\frac{g_{biomasa}}{L \cdot h}\right]$	Valor $[L^{-1}]$	Valor $\left[\frac{g}{L \cdot h}\right]$	Valor $\left[\frac{g_{glu\ cons.}}{g_{Biom} \cdot h}\right]$
<i>Periodo</i> _(0-48h)	25.65	0.074	0.0012	0.0043	9.96E ⁻²⁰
<i>Periodo</i> _(48-72h)	73.56	0.065	0.0008	0.0014	0
<i>Periodo</i> _(72-120h)	167.09	0.050	0.0001	0.00029	9.61E ⁻²¹
<i>Periodo</i> _(120-160h)	103.42	0.074	0.0002	0.00091	0
<i>Periodo</i> _(160-216h)	-371.896	0.047	-6.16E ⁻⁵	-0.00012	-1.30E ⁻²⁰
<i>Global</i> _(0-216h)	1.48	0.062	0.00010	0.0013	-0.0030

9.2.1.2. Fermentación con glucosa sin fosfato

En la fermentación con una fuente de carbono de glucosa sin fosfato (Fig. 15, línea amarilla continua), se evidencian cinco regiones, en la primera región de las 0-48h, empezó a aumentar la producción de biomasa, con una velocidad de 0.0817 g/L*h, esto se debió a que el hongo empezó a expresar genes por la falta de

oxígeno presente en el medio de fermentación líquido, empezando a tener una elevada producción de micelio vegetativo con la energía de sus reservas, cuantificándose como biomasa. Posteriormente, la producción de biomasa disminuye debido a la falta de fosfato requerido en su metabolismo, esto se contempló en la segunda región que ocurre a las 48-72h con una velocidad de producción de $-0.0394 \text{ g/L}\cdot\text{h}$.

Se percibió un aumento en la velocidad de producción de biomasa en $0.0565 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ hasta la tercera región (72-120h), debido a que el hongo se encontraba estresado y empezó a desarrollar una sobreproducción de micelio.

A partir de este punto, empieza a incrementar la velocidad de producción de biomasa, consumiendo la glucosa presente en el medio de fermentación, aunque vuelve a tener una velocidad de producción negativa, debido a que no logró mantener la producción de biomasa por la falta de fosfato, esto se percibió en la cuarta región de las 120-168h con una producción de $-0.0025 \text{ g/L}\cdot\text{h}$. En la quinta región (168-216h) sigue descendiendo la velocidad de producción ($-0.051 \text{ g/L}\cdot\text{h}$), esto atribuible a la falta de fosfato. Este perfil se debe a que probablemente el hongo mantuvo una producción baja, pero relativamente constante de biomasa, por la fuente de carbono de glucosa, pero por la ausencia del fosfato ocasionó poca asimilación de esta misma fuente de carbono.

En el perfil expuesto en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa sin fosfato (Fig. 19, línea amarilla punteada), se presentaron cinco regiones que se evidenciaron en esta gráfica, empezando a monitorear la tasa de consumo de glucosa de las 0-48h ($-0.0030 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$), donde se reveló la primera región, esto se debió a que por la falta de fosfato en el medio de fermentación mostró una tasa elevada de consumo de glucosa al principio de la fermentación, disminuyendo ligeramente la velocidad de consumo de glucosa en la segunda región a las 48-72h ($0.0015 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$). Esto es debido a que por la falta de fosfato su metabolismo fue lento en el interior del hongo, concentrándose la glucosa en el interior de la célula, aumentando ligeramente la velocidad de consumo de glucosa a las 72-120h ($-0.00032 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$), donde se muestra la tercera región. Empezándose a producir azúcares reductores en la cuarta región de las 120-168h ($0.00038 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$), Esto

probablemente ocurrió por la lisis de la pared de quitina de los hongos, debido a la falta de fosfato para la síntesis de la pared de los hongos, concentrándose los oligosacaridos en el medio de fermentación, los cuales se cuantificaron como azúcares reductores por el carbón anomérico presente en su estructura.

A partir de la quinta región de las 168-216h ($-0.0011 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$) empezó a ver una tasa de consumo de glucosa. Esto probablemente ocurrió porque se empezó a sintetizar micelio joven para el crecimiento del hongo, consumiendo la fuente de carbono disponible en este caso glucosa y cuantificándose como biomasa.

También es probable que la glucosa presente en el medio no fue adsorbida totalmente sino se mantuvo en el exterior de la célula, debiéndose a la falta de fosfato presente en el medio de fermentación, debido a que la glucosa no pudo entrar a la ruta de la biosíntesis de la quitina por la falta de fosfato requerido para poder ser fosforilado, obligando al hongo a encontrar otras rutas, consiguiendo energía para crecer, uno de esas rutas llevan al hongo a degradar la pared celular, esto se observó en la gráfica de endoquitinasas un aumento en la producción de endoquitinasas aunque no se observa ningún aumento en la producción de exoquitinasas esto es debido a que las exoquitinasas no se produjeron debido a la falta de fosfato. Como se han investigado los diferentes mecanismos que puede generar los hongos para sobrevivir y poder crecen en las condiciones más adversas (Smits y col., 2001).

De la tabla 8, se aprécia los diferentes parámetros cinéticos obtenidos durante cinco periodos, los fueron altos debido a que la tasa de consumo de glucosa fue alta mientras la producción de biomasa fue baja mostrándose como dos regiones, la primera region de las. 0-48h y la segunda región de las 72-168h. Esto probablemente ocurrió por la falta de fosfato, aunque se consumio la glucosa al mínimo, probablemente se mantuvo en el interior del micelio.

Esto se observa en la figura 15 de la cinética de crecimiento y tasa de consumo de sustrato, notándose que se consumió este sustrato al principio de la fermentación y hubo una rápida producción de biomasa, aunque no hubo una tasa de mantenimiento prolongada solo por periodos cortos, esto nos indica que el micelio siguió creciendo.

Aunque los valores por periodos son mayores de lo normal al rendimiento global son normales comparándose con la tabla 2 de los diferentes rendimientos de biomasa reportados.

Tabla 8. Parámetros cinéticos para la fermentación con glucosa sin fosfato con el aislado DMRN1

PERIODOS	Biomasa/ Sustrato $Y_{X/S}$	TASA VOLUMÉTRICA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA r_x	TASA ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO q_s	TASA VOLUMÉTRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO r_s	COEFICIENTE DE MANTENIMIENTO m_s
	Valor $\left[\frac{g_{biomasa}}{g_{glucosa}}\right]$	Valor $\left[\frac{g_{biomasa}}{L \cdot h}\right]$	Valor $[L^{-1}]$	Valor $\left[\frac{g}{L \cdot h}\right]$	Valor $\left[\frac{g_{glu\ cons.}}{g_{Biom} \cdot h}\right]$
<i>Periodo</i> _(0-48h)	10.33	0.031	0.0020	0.0030	0
<i>Periodo</i> _(48-72h)	-39.95	-0.059	-0.0010	0.0015	9.71E ⁻²¹
<i>Periodo</i> _(72-120h)	196.63	0.056	-0.0012	-0.00032	0
<i>Periodo</i> _(120-160h)	-3.045	-0.003	-0.0076	0.00038	0
<i>Periodo</i> _(160-216h)	-18.465	-0.050	0.00051	-0.00115	0
<i>Global</i> _(0-216h)	0.023	0.00097	0.0032	0.00060	-0.21

9.2.1.3. Fermentación con quitina

El perfil mostró en la fermentación con una fuente de carbono de quitina (Fig. 15, línea roja), la ausencia de una fase lag, debido a que tuvo una mayor habilidad para adaptarse rápidamente en el medio de fermentación. El gráfico presento siete regiones que se describen a continuación. El perfil evidencio como aumento la producción de biomasa a las 0-48h con una velocidad de producción de 0.0683 g/L*h, esto atribuible a que desde el inicio de la fermentación el inóculo empezó a estresarte, empezando a mostrar un crecimiento rápido. Para la segunda región (48-72h), empezó a disminuir ligeramente la producción de biomasa, a una velocidad de 0.0333 g/L*h, debido a que no tenía suficientes nutrientes para mantener su crecimiento.

Se mostró cinco regiones que se describen en esta grafica a continuación, empezando a aumentar la velocidad de hidrolisis para la producción de azúcares reductores a las 0-48h (-0.00089 mg/mL*h), donde se evidencio la primera región, esto probablemente ocurrió porque se empezaron a sintetizar quitinasas las cuales degradaron la quitina presente en el medio de fermentación, produciendo

oligosacaridos los cuales se cuantificaron como azúcares reductores, aumentando la velocidad de hidrólisis para la producción de azúcares reductores en la segunda región a las 48-72h ($-0.0011 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$), probablemente la concentración de quitinasas llegó a un límite liberando oligosacaridos los cuales se cuantificaron como azúcares reductores.

A partir de este punto, en la tercera región (72-120h), se mantuvo constante la velocidad de producción de biomasa en un valor de $0.059 \text{ g/L}\cdot\text{h}$. En esta fase de formación de biomasa a una velocidad constante, hubo secreción de proteínas, entre las que se encontraban las glicosil hidrolasas como las quitinasas (endo y exo) y quitin sintasas las cuales suelen asociarse a la síntesis y reparación de la pared celular del hongo, respaldado esto por la concentración de proteínas solubles (Fig. 16), al igual que en la fermentación con glucosa (Smits y col. 2001).

Aumentó la velocidad de consumo de azúcares reductores en la tercera región a las 72-120h ($0.0015 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$), esto probablemente ocurrió porque se empezó a sintetizar la pared de los hongos a partir de los oligosacaridos obtenidos de la hidrólisis de la quitina presentes en el medio de fermentación.

Posteriormente en la cuarta región (120-168h), se incrementó la velocidad de producción de biomasa al mayor valor, cuantificado en $0.16625 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, debido a que el hongo se lisó liberando exoquitinasas que degradaron la quitina del medio de fermentación y obtuvo energía para producir biomasa para crecimiento micelial.

Aunque vuelve a aumentar la velocidad de hidrólisis para la producción de azúcares reductores en la cuarta región a las 120-168h ($-0.00069 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$), esto probablemente ocurrió porque se siguieron produciendo oligosacaridos y N-acetil-glucosamina de la quitina presente en el medio de fermentación,

En la quinta región (168-216h) aunque se analizó un ligero aumento de la velocidad de producción de biomasa respecto a la región anterior ($0.0108 \text{ g/L}\cdot\text{h}$), en términos de concentraciones de biomasa se puede decir que esta es una etapa relativamente constante, en la que las enzimas y proteínas detectadas, fueron necesarias para el mantenimiento de las células, pero no para regeneración de pared celular o formación de hifas.

Aumentando ligeramente la velocidad de consumo de los oligosacáridos y el NAG obtenido de la hidrólisis de la quitina en la quinta región a las 168-216h (0.000375 mg/mL*h) para la síntesis de la pared de quitina y el crecimiento y desarrollo de los hongos.

En estas últimas dos regiones se considera que hubo fuertes limitaciones en la fermentación, para poder asimilar la quitina, lo cual se constata por el hecho de que las quitinasas se mantuvieron en valores mínimos y la concentración de proteínas en el medio descendió drásticamente, sobre todo en este último periodo. Esta concentración de biomasa es comparable a la obtenida por los hongos macroscópicos *Pleurotus ostreatus* (16.62 g/L de biomasa), en medio líquido con peptona, como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono (Rodríguez y col. 2016) y *Grifolla frondosa* (19.21 g/L de biomasa), en sacarosa y peptona (Zapata y col. 2007). Cabe mencionar que esta fermentación fue la única que presentó fase exponencial, de las 72h hasta las 144h (Smits y col., 2001), por lo que a continuación se muestra el modelamiento matemático realizado.

En el perfil presentado en la fermentación con una fuente de carbono de quitina (Fig. 19, línea roja), se percibió una cantidad basal de 0.08 mg/mL de NAG al inicio de la fermentación, lo que se atribuye a la acción de las exoquitinasas que también fueron detectadas en cantidades mínimas, como resultado de su capacidad de generarse constitutivamente para romper la pared celular, pero también para hidrolizar algunos residuos producto de la reacción de las endoquitinasas. Cabe mencionar que se monitoreó la hidrólisis de la quitina, aunque esta técnica de detección no es específica, otros azúcares reductores como glucosa, glucosamina, quitobiosa, quitotriosa, y otros oligosacáridos de mayor grado de polimerización pudieron ser detectados.

Esto se debió a que empezó a ocupar sus reservas de energía para crecer y desarrollarse. Comparando con los perfiles de endoquitinasas y exoquitinasas se observa cómo se mantuvo una producción al inicio de la fermentación observándose una correspondencia entre la producción de endoquitinasas y exoquitinasas y los azúcares reductores producidos los cuales se forman monómeros de NAG los cuales se sintetizan para la formación de la pared celular del hongo. Se ha estudiado

los oligosacaridos producidos por la degradación de la quitina usando quitinasas de *Lecanicillum fungicola* (Ramírez y col., 2006).

Los rendimientos obtenidos en la fermentación con glucosa son mostrados en la tabla 7, obtenidos de las fórmulas presentadas en el marco teórico

Los rendimientos obtenidos en los diferentes periodos mostrados en la tabla 9, muestran altos valores, aunque estos valores son el resultado de la división, se nota que el rendimiento de biomasa/sustrato el consumo de sustrato en este caso es mayor con respecto a la producción de biomasa. Esto se observa en la figura 16 de la cinética de crecimiento y tasa de consumo de sustrato, en este caso el sustrato fue quitina, aunque se consumió lentamente, se mostró un mantenimiento, esto nos indicaría que se consumió el sustrato obtenido de la lisis de la pared de quitina del hongo, manteniendo una síntesis y degradación mantenida.

Tabla 9. Parámetros cinéticos para la fermentación con quitina con el aislado DMRN1

PERIODOS	Biomasa/ Sustrato $Y_{X/S}$	TASA VOLUMÉTRICA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA r_x	TASA ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO q_s	TASA VOLUMÉTRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO r_s	COEFICIENTE DE MANTENIMIENTO m_s
	Valor $\left[\frac{g_{biomasa}}{g_{glucosa}}\right]$	Valor $\left[\frac{g_{biomasa}}{L \cdot h}\right]$	Valor $[L^{-1}]$	Valor $\left[\frac{g}{L \cdot h}\right]$	Valor $\left[\frac{g_{glu\ cons.}}{g_{Biom} \cdot h}\right]$
<i>Periodo</i> _(0-48h)	-42.85	0.038	-0.011	-0.00089	1.52E ⁻²⁰
<i>Periodo</i> _(48-72h)	-6.81	0	1.96E ⁻⁵	-0.0011	3.40E ⁻²⁰
<i>Periodo</i> _(72-120h)	37.36	0.058	0.0017	0.0015	2.25E ⁻¹⁹
<i>Periodo</i> _(120-160h)	-68.88	0.064	5.80E ⁻⁵	-0.00069	-1.819E ⁻²⁰
<i>Periodo</i> _(160-216h)	-22.5	-0.042	6.20E ⁻⁶	0.000375	0
<i>Global</i> _(0-216h)	0.57	0.026	-7.82E ⁻⁶	0.00060	-0.21

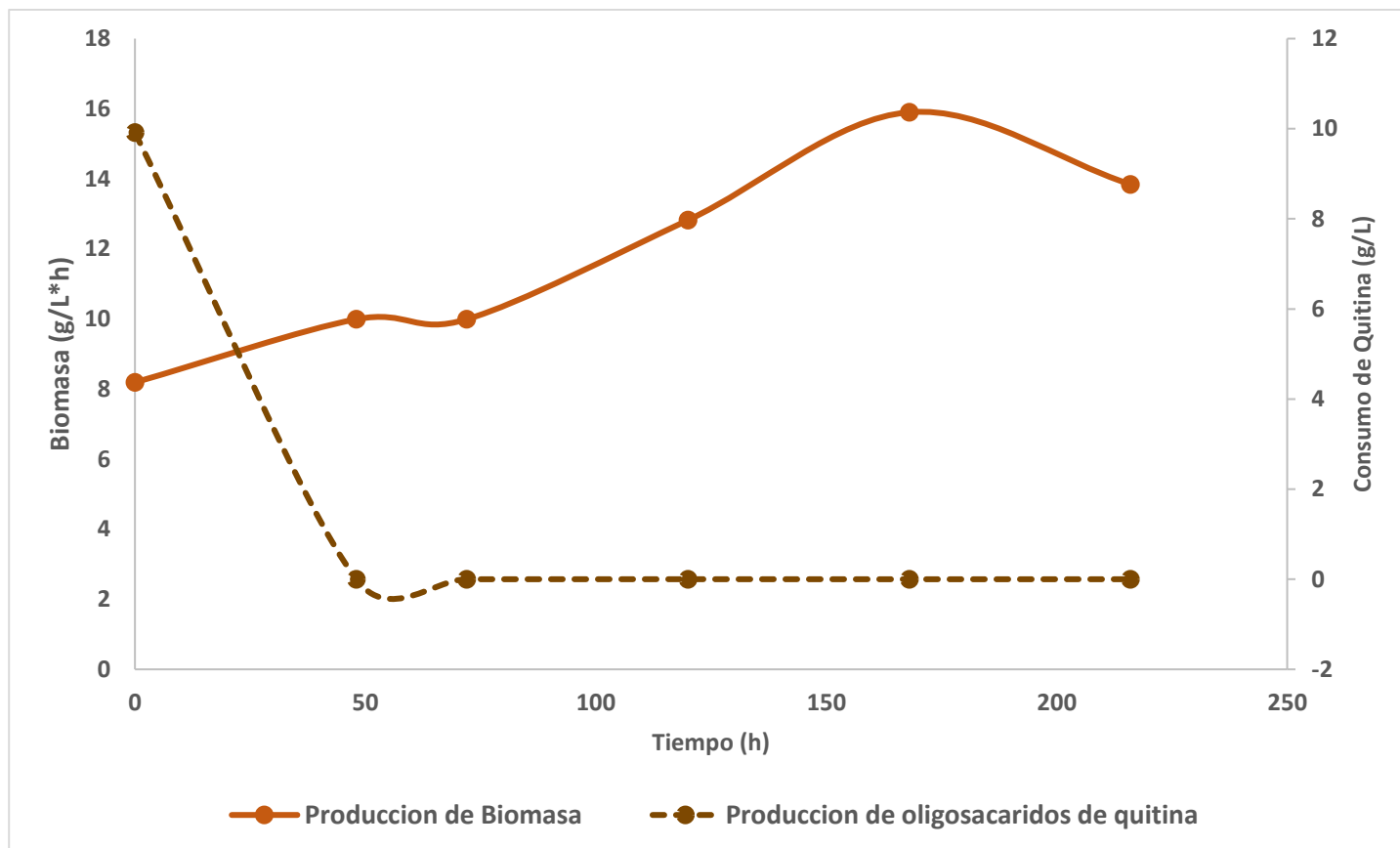


Figura 16. Cinética de crecimiento del aislado DMRN1 por efecto de la fuente de carbono de quitina y de fosfato. Los valores mostrados representan el promedio de dos repeticiones (Promedio $\pm$ SD).

9.2.1.4 Modelamiento matemático para la fermentación con quitina.

En el anexo D se muestran los 5 modelos matemáticos empleando el software Origin versión 8, realizados a las cinéticas de crecimiento del aislado DMRN1 con quitina. De éstos, los mejores modelos fueron el 2, 3 y 5, con base al valor de R^2 (0.99642), que es el grado de ajuste para cada ecuación, así como los valores de $\mu_{\max}$. Estos modelos se pueden considerar como modelos primarios de crecimiento microbiano, los cuales describen la relación del tamaño de la población (N) con el tiempo (t), no obstante, estos modelos no consideran variables ambientales, como los modelos secundarios, por lo que el modelo podría describir inapropiadamente el proceso (Pérez y col.2016).

Por lo general conforme se van incrementando parámetros en un modelo matemático, se suele aumentar el grado de explicación y de ajuste (aunque en modelos biológicos esto no es una regla) y el error suele menor (Pérez, 2016). El modelo 2 muestra una forma menos compleja con respecto a las ecuaciones 3 y 5, además de que se asemeja más al modelo de crecimiento en la ecuación (4) de la sección 3.1.

El valor de μ de 0.0347h^{-1} obtenido en este trabajo, fue muy similar a los reportados por Díaz en el 2009, con el hongo macroscópico comestible *Pleurotus ostreatus*, obteniéndose una μ de 0.034h^{-1} a un pH de 3.5 y otra μ de 0.037h^{-1} con un pH de 4.5. Debido a que no se monitoreó el pH en este trabajo, y otros parámetros ambientales como agitación y temperatura, no se puede establecer una correlación con los parámetros estudiados por Díaz (2009), como agentes causales de similitud o bien de variabilidad, entre los valores de μ y estos parámetros.

Con el mismo hongo *Pleurotus*, Aguilar (2007) obtuvo un valor de $\mu=0.000958\text{h}^{-1}$, el cual es 35.49 veces menor al reportado en este trabajo. A pesar de ser ambos hongos macroscópicos (*Psilocybe* y *Pleurotus*), los factores que hicieron que en un caso la velocidad específica de crecimiento fuera muy similar al valor de este trabajo, y en otro reporte fuera menor, se atribuyen más a la fuente de carbono y nitrógeno. Se obtuvieron en medio líquido (extracto de malta-sacarosa), con 20g/L de extracto de malta y 20g/L de sacarosa con una relación C/N de 7.74 con respecto al medio con quitina utilizado en este trabajo el cual fue de 6.39.

Por último, en otro trabajo se obtuvo una μ de 0.086-0.062 reportado por Marquina en 1991, este valor es 2.53 veces mayor al obtenido en este trabajo, esto se pudo deber al tipo de hongo utilizado el cual fue un hongo filamentoso, que por sus características morfológicas puede crecer más rápidamente y tiene una gran patogenicidad con respecto al medio.

Otro factor que pudo haber afectado fue el pH inicial el cual era de 5.0-5.5, comparando con este trabajo los parámetros más parecidos que se ocuparon fueron la velocidad de agitación de 180RPM, con respecto a la velocidad de agitación orbital a 250RPM durante 48 horas del trabajo de Marquina (1991). (Ver Tabla 2).

9.2.2. Proteína soluble

La determinación de proteína soluble, se hizo para observar la secreción de proteínas o enzimas con respecto a la fuente de carbono y entre las fermentaciones con glucosa, comparar si el fosfato tuvo un efecto significativo en este parámetro, pero también para relacionar la formación de biomasa con proteínas de síntesis de pared celular.

Considerando la fuente de carbono, con quitina se observó una mayor concentración de proteína soluble.

9.2.2.1. Fermentación con glucosa y fosfato

En el perfil presentado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 16, línea azul), se notó que la concentración de proteínas solubles no fue detectada desde el inicio de la fermentación, sino que se incrementó gradualmente. Este incremento gradual se reveló en tres regiones en esta gráfica, que se describen a continuación. En la primera región de las 0-48h, la tasa con la que se incrementó la concentración de proteínas fue relativamente baja (7×10^{-6} mg_{proteína}/L*h), esto debido a que el hongo estaba estresado empezando a expresar genes para la síntesis de proteínas globulares como enzimas para la síntesis de la pared celular (quitin-sintasas). Mensajeros químicos como derivados del ergosterol (ver Tabla 5) y moléculas asociadas como aminoácidos (triptófano o transportadores de moléculas), todos ellos pudieron estar en cantidades muy pequeñas en comparación a las proteínas, pero interactuar con el reactivo de Bradford, afectando la detección (Bradford, 1976).

En la segunda región de las 48-72h, la tasa de variación de la concentración de proteínas llegó a un valor máximo (4×10^{-5} mg_{proteína}/L*h), ya que se dio, primeramente, la secreción paralela de quitin-sintasas y endoquitinasas encargadas de la degradación de la quitina. Por otra parte, se observó un cambio de color a las 72h, como consecuencia no tanto de que los alcaloides indólicos producidos incrementaron su concentración, sino que se formaron otro tipo de alcaloides (Ver Anexo F) como resultado de las enzimas encargadas en la síntesis de psilocibina, las cuales también pudieron ser detectadas por esta técnica.

Por lo anterior, la concentración de proteínas a las 72h fue elevada. En la tercera región de las 72-216h, la concentración proteica aumenta ligeramente y alcanza su valor máximo ($0.0017 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{mL}$) a las 216h, lo que se vio reflejado en una ligera disminución en la tasa de variación de tal concentración ($2 \times 10^{-6} \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{L} \cdot \text{h}$), esto se debió a que una vez que llegó a una elevada concentración de proteínas (principalmente enzimas) en el medio de fermentación, probablemente se reguló la producción y secreción de la mismas, produciéndose glucosamina intracelularmente como consecuencia del consumo de glucosa (figura 19) y formación continua de biomasa (figura 15), por tanto, las proteínas asociadas a esta región sirvieron más para el mantenimiento del hongo que para síntesis de quitinasas. A pesar de que el hongo estaba estresado por la baja tasa de transferencia de oxígeno al medio (Ver Anexo E), el hongo se adaptó rápidamente a la fuente de carbono de glucosa, manteniendo relativamente estable (de las 72h-216h) la producción de proteínas para su crecimiento como las quitin-sintasas, empleadas en la síntesis y reparación de la pared celular.

9.2.2.2. Fermentación con glucosa sin fosfato

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa, pero sin fosfato (Fig. 16, línea amarilla), se observó, un retraso en la producción de proteínas hasta las 72h (valores nulos desde el inicio). Comparando con el perfil de producción de biomasa, se observa un ligero incremento en este parámetro, pero no se asocia a la secreción de proteínas, por lo que se considera que las quitin-sintasas se mantuvieron en el interior del micelio.

Posterior a este tiempo, la producción es de tipo Gaussiana o parabólica, por lo que la concentración de proteínas se incrementa a una tasa de $7 \times 10^{-6} \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{L} \cdot \text{h}$, alcanzando su máximo ($0.00032 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{mL}$) hasta las 120h y después disminuye (con la misma tasa, pero con signo contrario) a valores cercanos a cero. Esto se debió a que se empezaron a producir proteínas gradualmente (ver la sección de enzimas), aunque por la falta de fosfato en el medio de fermentación, el hongo no pudo establecer homeostasia, no se pudo mantener la tasa producción de proteínas y el decaimiento se prolongó hasta el final de la fermentación (216h).

El máximo valor obtenido en esta fermentación en comparación al valor detectado para la fermentación con glucosa y fosfato en el mismo tiempo, fue 4.875 veces menor. Esto se atribuyó a la falta de este ión, necesario para la síntesis de ciertas moléculas dependientes de fosfato como el gliceraldehído-3-fosfato, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP+) o el piridoxal-fosfato, implicados en la glucólisis.

Como consecuencia, el hongo no logró adaptarse a la ausencia del fosfato, aunque contaba con una fuente de carbono suficiente. La máxima concentración de proteínas en este tipo de fermentación, fue 6 y 8 veces más baja en comparación con los valores máximos obtenidos en las fermentaciones con glucosa y con quitina respectivamente.

9.2.2.3. Fermentación con quitina

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de quitina (Fig. 16, línea roja), se detectaron cuatro regiones que se describen a continuación.

En la primera región de las 0-48h, es notorio que la concentración de proteínas se mantiene en 0.001 mg_{proteína}/mL, a diferencia de las fermentaciones con glucosa en donde la concentración inicial de proteínas es cero. Esto se debió a que el hongo activó un mecanismo de reconocimiento del substrato quitinoso, empezando a secretar proteínas como quitolectinas, como corroboran las de Xu y col. (2011) y de Liu y col. (2006) con diversas especies de hongos macroscópicos.

Estos nos indicaría que se secretaron al medio otras proteínas para hidrolizar el sustrato (endo y exoquitinasas), entre otras proteínas y biomoléculas que pudieron secretarse fueron glicoproteínas, exopolisacáridos ligados a las proteínas, las cuales fueron necesarias para el mantenimiento del hongo y poder desarrollar la pared celular (Smits y col., 2001).

Posteriormente, de las 48h a las 72h (segunda región) se observa un descenso de la concentración de proteína soluble a una velocidad de $-1 \times 10^{-5} \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{L} \cdot \text{h}$, que puede atribuirse a que la síntesis de quitolectinas ya no era necesaria y se dio paso a la síntesis de enzimas como endoquitinasas y quitinasas. Lo anterior se corrobora, porque en la tercera región (72-120h), la velocidad con la que se incrementó la concentración de proteínas solubles fue máxima y cuantificada en $3 \times 10^{-5} \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{mL} \cdot \text{h}$.

Una vez alcanzado el máximo, la concentración de proteínas solubles disminuyó a una tasa de $-1 \times 10^{-5} \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{mL} \cdot \text{h}$ en la cuarta región (120-216h), asociándose esto a la disminución de la producción de biomasa. Se ha estudiado la relación de la producción de biomasa con respecto a la producción de proteínas, en varios hongos de importancia comercial (Falanghe, 1962).

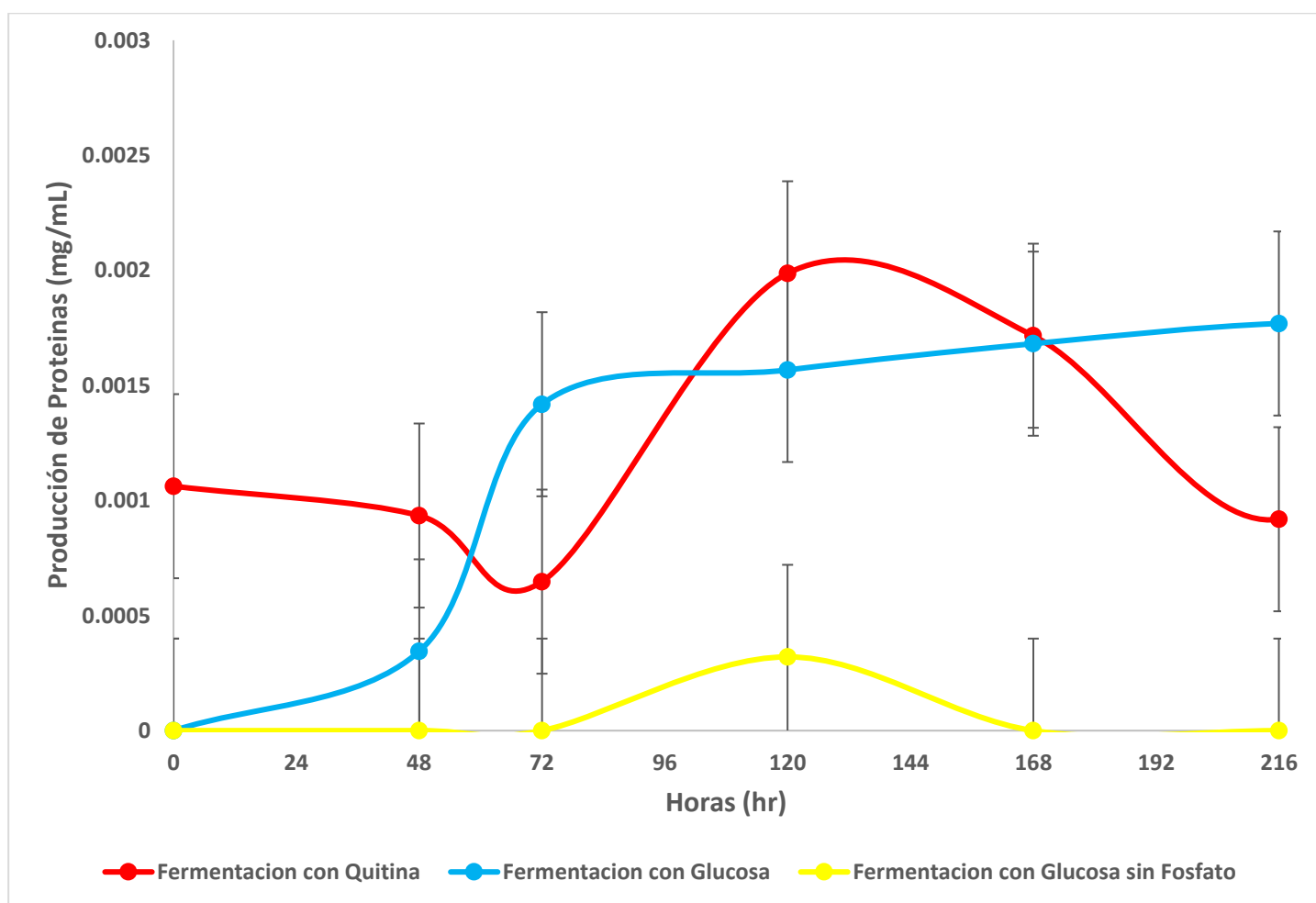


Figura 17. Proteína soluble de la cepa DMRN1. Los valores mostrados representan el promedio de dos repeticiones (Promedio $\pm$ SD).

9.2.3. Endoquitinasas

La determinación de actividad volumétrica de las endoquitinasas (endo) en los aislados, se hizo para observar el efecto que tuvo la fuente de carbono en la expresión de estas enzimas y entre las fermentaciones con glucosa, comparar si el efecto del fosfato fue significativo en este parámetro.

9.2.3.1. Fermentación con glucosa y fosfato

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 17, línea azul), se exponen cuatro regiones de actividad volumétrica endoquitinasas, que se describen a continuación. En la primera región de las 0-48h, se percibe que la actividad volumétrica de estas enzimas aumentó a una tasa de 0.0143 U/mL*h. Esto se debió a que el hongo expresa genes para la síntesis de enzimas quitinolíticas encargadas del rompimiento de la quitina de la pared celular, liberando presumiblemente oligosacáridos y quitodextrinas al medio de fermentación. En el hongo macroscópico *Amanita muscaria*, se ha descrito la liberación de oligosacáridos a partir de la escisión de la pared celular, evidenciándose la presencia de éstos en el medio de fermentación, mediante el método de Miller (Mucha y col.,2006). Sin embargo, en este trabajo, consideramos que dos cosas pudieron suceder, los oligosacáridos se liberaron a concentraciones menores al mínimo detectable por la técnica, o bien, estos productos de degradación de la pared, se encontraban acetilados y fueron utilizados en el remodelamiento de la misma, percibiendo un descenso en la concentración de azúcares reductores. Se han encontrado reportes de la liberación de oligosacáridos durante la maduración de las hifas en *Aspergillus nidulans*, demostrando que la síntesis de quitina tiene un rol importante en la maduración (Yamazaki y col.,2008).

La propuesta del remodelamiento se constata, además, con el aumento en la producción de biomasa durante las primeras 24h, esto se corrobora con el consumo de azúcares reductores desde el principio de la fermentación, se atribuye a que la glucosa es consumida para el desarrollo de la pared celular de los hongos, reduciéndose en el medio líquido a una concentración relativamente constante.

La actividad volumétrica de endoquitinasas en la segunda región de las 48-72h disminuyó a una tasa de $-0.024 \text{ U/mL}\cdot\text{h}$. Para explicar este descenso, se parte de la idea de que las endoquitinasas requieren una secuencia mínima de unidades acetiladas en un oligosacárido o substrato, así como una longitud mínima de dicho oligosacárido para ser considerado como substrato y ser activas. De acuerdo a la literatura consultada en línea en la base de datos BRENDA (The comprehensive Enzyme Information System), estas enzimas en *Trichoderma harzianum* requieren por lo menos dos secuencias acetiladas y una longitud mínima de tres unidades para tener actividad (De la Cruz y col., 1992). Corroborando esto, se ha estudiado la capacidad inhibitoria de la alosamidina (ver Anexo G) en las quitinasas (recombinante y natural) de *Saccharomyces cerevisiae* ($K_i=0.61\pm0.02\mu\text{M}$), atribuyéndose la inhibición a que posee dos secuencias acetiladas unidas a una alfa-D-glucopiranososa unida a un delta dos primas tiazolin (Hurtado y van Aalten, 2007). Por tanto, en esta etapa la disminución de la actividad volumétrica se atribuye a la presencia de oligosacáridos de dos unidades los cuales estuvieron acetilados y estaban ocupando el sitio activo en estas enzimas. Otra causa es que, los oligosacaridos producidos por la lisis de la pared si tenían la longitud adecuada pero no había una secuencia dimérica acetilado.

Cabe recalcar que en esta etapa los azúcares reductores siguieron disminuyendo, porque la glucosa se asimiló para la síntesis de la pared celular (la biomasa se siguió incrementando), pero dicha asimilación no ocurrió por parte de las endoquitinasas.

En la tercera región de las 72-168h, se notó un ligero aumento en la actividad volumétrica de las endoquitinasas a una tasa de $0.003 \text{ U/mL}\cdot\text{h}$, debido a que se secretaron al medio de fermentación para el mantenimiento y reparación de la pared celular, lisando las hifas más maduras, liberando nuevamente quitodextrinas u oligosacáridos de quitina al medio de fermentación y utilizándolos para la síntesis y remodelamiento para alcanzar un nuevo estado de maduración.

A partir de este punto hubo una desaceleración ($-0.0038 \text{ U/mL}\cdot\text{h}$) en la actividad volumétrica de endoquitinasas en la cuarta región de las 168-216h, aunque la producción de biomasa se incrementó hasta las 172h alcanzando su máximo, la baja concentración de endoquitinasas fue para mantenimiento de la pared celular, pues de las 172-216 h la biomasa llegó a un estado estacionario, esto se corrobora con el perfil de azúcares reductores.

9.2.3.2. Fermentación con glucosa sin fosfato

El perfil de la fermentación con una fuente de carbono de glucosa sin fosfato (Fig. 17, línea amarilla), presenta características notables con respecto a las del perfil de glucosa con fosfato. La primera es que ambos perfiles son semejantes, y el segundo aspecto es que en esta fermentación se obtuvo la mayor actividad endoquitinasas.

Se identificaron cinco regiones. En la primera región de las 0-48h, el valor de la pendiente (tasa de cambio de la actividad volumétrica = $0.0617 \text{ U/mL}\cdot\text{h}$) fue 4.3 veces mayor con respecto a la fermentación con glucosa con fosfato. Es notorio que, en la fermentación sin fosfato, la actividad volumétrica al inicio de la fermentación no es cero (0.68 U/mL), y esto se atribuyó a la heterogeneidad del inóculo, es decir, en la solución del inóculo había hifas jóvenes, hifas maduras y esporas, y las endoquitinasas se activaron muy probablemente porque detectaron en la pared celular de esas hifas o en las esporas, presencia de quitina o regiones acetiladas, en mayor proporción que en el inóculo empleado en la fermentación con glucosa y fosfato. Por otra parte, estas enzimas escindieron dichas paredes, para renovación de las mismas intentando alcanzar un grado diferente de madurez, sin embargo, por la falta de fosfato no se logró formar adecuadamente la pared celular, esto se evidencia en la producción de biomasa, la cual fue menor que con las otras fermentaciones.

En la segunda región de las 48-72h, aunque este perfil fue 5.29 veces mayor con respecto a la fermentación con glucosa con fosfato, se determinó un descenso de la actividad volumétrica a una tasa de $-0.0267 \text{ U/mL}\cdot\text{h}$. No obstante, esta disminución no fue tan drástica como para considerar estas enzimas inactivas, pero

se atribuye a que como no se pudo formar pared celular o micelio, el hongo recurrió a la formación de esporas. Cabe mencionar que como las esporas están compuestas de una capa externa de quitosano (menos del 50% de grupos acetilados), el pequeño porcentaje acetilado pudo haber tenido las características necesarias de longitud y secuencias acetiladas, para ser detectado por el sitio activo de estas enzimas y por ende seguir activas. En este periodo se percibió la disminución de la biomasa a valores cercanos a cero, lo que confirmaría la formación de esporas, las cuales no se pudieron detectar por la técnica de biomasa, por el tamaño de poro del filtro empleado (las esporas tenían un diámetro aproximado de $1\mu\text{m}$ y el tamaño de corte del filtro fue de $20\text{-}25\mu\text{m}$).

En la tercera región de las 72-120h, la actividad volumétrica permanece prácticamente constante, pues la tasa de cambio de actividad fue de $4.16 \times 10^{-4} \text{ U/mL}\cdot\text{h}$. Considerando que se habían producido esporas desde la etapa anterior, se supone además que éstas estaban en estado de dormancia, el cual procede por condiciones adversas (falta de fosfato y de potasio) y se caracteriza por no presentar gastos energéticos. Esto probablemente se debió a que el hongo empezó a formar la pared celular, pero por la falta de fosfato no se logró formar adecuadamente, dejando oligosacaridos en el medio de fermentación y cuantificándose como azúcares reductores, esto se ha demostrado en la lisis con hongos macroscópicos del género *Amanita*, *Laccaria* y *Suillus* para la determinación de endoquitinasas con el método de Miller (Mucha y col.,2006).

La actividad volumétrica de endoquitinasas en la cuarta región de las 168-216h, disminuyó a una tasa de $-0.0242 \text{ U/mL}\cdot\text{h}$, este valor fue 13 veces mayor, con respecto al intervalo final del perfil con glucosa y fosfato.

Por efecto de la ausencia del fosfato en el medio se atribuye una mayor actividad volumétrica de endoquitinasas, permitiendo su secreción, probablemente, porque son dependientes de fosfato, y en el interior celular su actividad hidrolítica sobre la pared celular fue inhibida, por lo tanto, al ser constitutivas se produjeron, pero por la falta de fosfato fueron secretadas al medio de fermentación, lo cual fue evidente, porque se observa una correspondencia entre los perfiles de biomasa y el de actividad de esta enzima.

En consecuencia, la actividad volumétrica de endoquitinasas se mantuvo a un valor relativamente constante de 3.64 U/mL (considerando valores promedio y desviaciones estándar), desde las 48h hasta las 168h.

Este valor comparado con los máximos obtenidos en las fermentaciones con quitina y glucosa que sí incluyeron al ión fosfato, fue 3.13 y 5.29 veces mayor respectivamente. A partir de las 168h empezó a disminuir la actividad volumétrica de estas enzimas al igual que la biomasa, debido a que hubo un periodo prolongado de escasez del ión fosfato, estas enzimas probablemente adquirieron una configuración tridimensional de mínima energía y se mantuvieron activas, pero a un valor como el inicial. Esto se constata también apreciando el perfil de azúcares reductores, debido a que se consumió la glucosa como energía para mantener la actividad volumétrica de endoquitinasas a niveles constitutivos.

Cabe la posibilidad que el hongo consiguió el fosfato de la ruta biosintética de los alcaloides, los cuales produjeron un colorante diferente al que producen, manteniendo una elevada concentración y expresión de endoquitinasas en el medio de fermentación, funcionando como un mensajero químico que promueve el crecimiento del hongo.

9.2.3.3. Fermentación con quitina

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de quitina (Fig. 17, línea roja), se observa que la actividad volumétrica de endoquitinasas, desde el tiempo inicial se detectó en 0.54 U/mL, confirmando su carácter constitutivo y su dependencia a este ion. Por la presencia de quitina, el hongo reconoció mediante proteínas de reconocimiento este sustrato, empezando a expresar y secretar al medio endoquitinasas, las cuales se encargaron de hidrolizar de manera aleatoria la quitina en fragmentos, sobre los cuales las exoquitinasas se hidrolizaron secuencialmente dando energía al hongo para poder mantener a la célula. Esto se muestran en cinco regiones que se describen en esta grafica a continuación, la actividad volumétrica de las endoquitinasas empezó a aumentar de las 0-48h a una tasa de 0.0004 U/mL*h, donde se muestra la primera región, esto probablemente ocurrió debido a la concentración de la quitina que

estimulo la producción y excreción de endoquitinasas al medio de fermentación, las cuales probablemente lisaron las paredes de quitina del hongo, la actividad volumétrica aumento a una tasa mayor de 0.0108 U/mL*h en una segunda región, (48-72h), probablemente esto ocurrió porque las endoquitinasas se ocuparon para la reparación y mantenimiento del micelio del hongo, aunque la actividad volumétrica de endoquitinasas disminuye en la tercera región a las 72-120h a una tasa de 0.0071 U/mL*h, esto se ve como una etapa de mantenimiento con respecto a la actividad volumétrica de las exoquitinasas. La actividad volumétrica disminuyo en la cuarta región de las 120-168 a una tasa de -0.0025 U/mL*h. Probablemente esto ocurrió porque las exoquitinasas se inactivaron por la presencia de oligosacaridos con menos del 40% de regiones acetiladas o la formación de inhibidores como la alosamidina las cuales pudieron haber interferido en las actividades de las exoquitinasas. La tasa siguió disminuyendo en una quinta región de las 168-216 a una tasa menor de -0.0021 U/mL*h en comparación a la región anterior, esto probablemente ocurrió debido a que la actividad volumétrica de endoquitinasas se inhibieron por la producción de oligosacaridos con menos del 40% de regiones acetiladas que afectaron los sitios activos de las endoquitinasas.

Hay reportes de la actividad volumétrica de endoquitinasas de *Coprenillus congregatus* la cual fue de 0.55 U/mL (Lim y Choi, 2009). Comparando con el perfil de producción de biomasa, se observa una fase de latencia hasta las 24h, mientras la actividad volumétrica de endoquitinasas, empezó a las 48h (0.687 U/mL), con relación a la producción de biomasa, llegando a su maxima producción a las 144h (16.81 g/L), manteniéndose a las 192h (16.16 g/L) donde empezó a disminuir, comparando con la concentración de endoquitinasas llega a su maxima producción a las 120h (1.16 U/mL), manteniéndose al final de la fermentación, esto nos indicaría que la actividad volumétrica de endoquitinasas tuvo una relación con la producción de biomasa al principio de la fermentación.

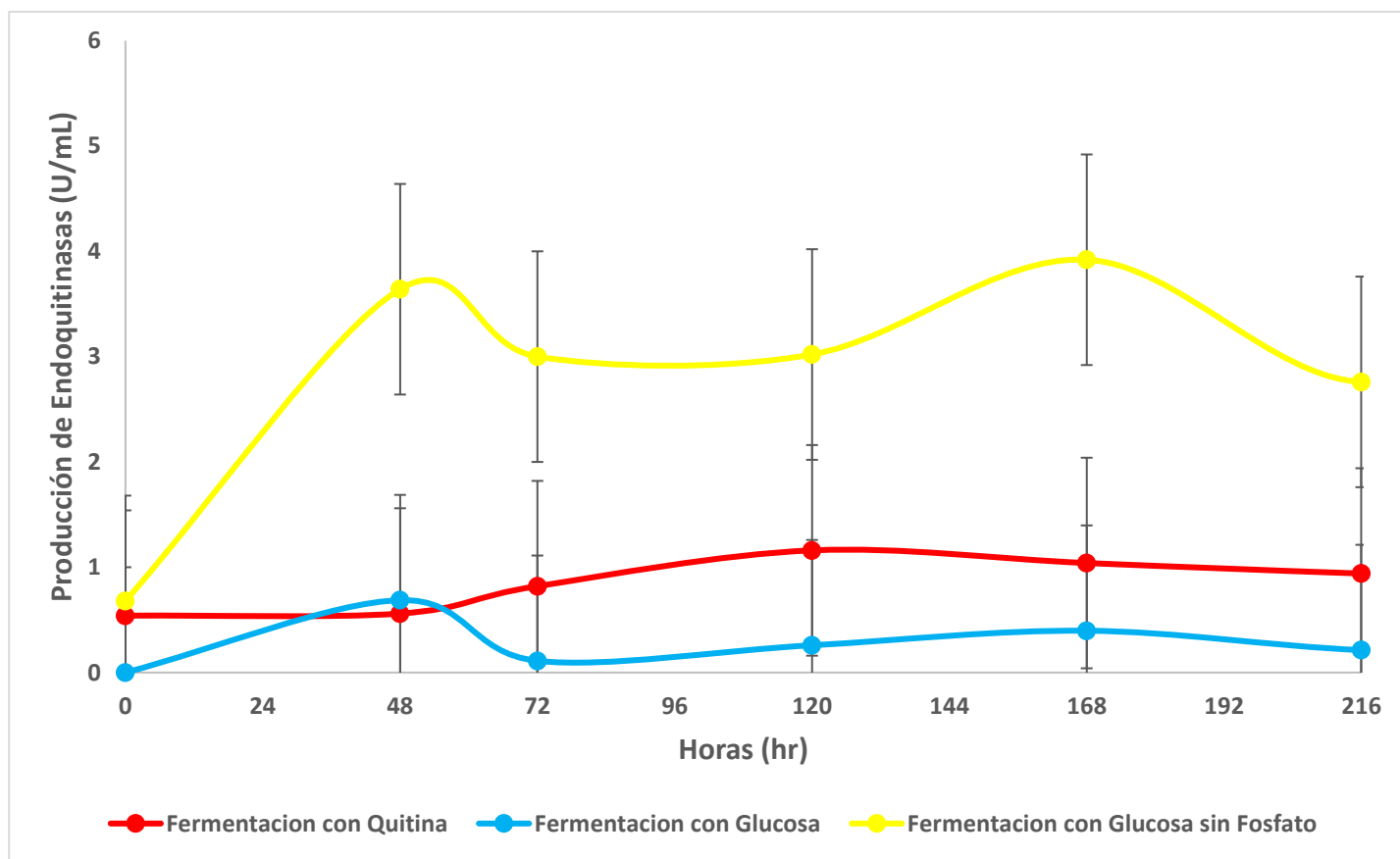


Figura 18. Endoquitinasas de la cepa DMRN1. Los valores mostrados representan el promedio de dos repeticiones (Promedio $\pm$ SD).

9.2.4. Exoquitinasas

La actividad volumétrica de exoquitinasas, se hizo para observar el efecto de la fuente de carbono en la expresión de estas enzimas y entre las fermentaciones con glucosa, comparar si el fosfato tuvo un efecto significativo en este parámetro.

De manera generalizada, la actividad volumétrica de las exoquitinasas fue ligeramente mayor en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato. La actividad volumétrica de estas enzimas en todas las fermentaciones en comparación con las endoquitinasas, fue 10,000 veces menor, esto se pudo deber a la especificidad de la técnica utilizada, así como de los residuos en los que actúa las exoquitinasas.

9.2.4.1. Fermentación con glucosa y fosfato

En la literatura consultada las exoquitinasas pueden ser de dos tipos: las quitobiosidasas (3.2.1.29) las que catalizan la liberación de la quitobiosa desde el extremo reductor de la quitina y las β -1,4-N-acetilglucosaminidasas (3.2.1.30), las cuales actúan sobre los oligómeros de las endoquitinasas y las quitobiosidasas, generando monómeros de N-acetilglucosamina (Ramírez, 2009).

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 18, línea azul), se presentaron cinco regiones descritas a continuación, en la primera región de las 0-48h, la actividad volumétrica de exoquitinasas se detectó desde el inicio con un valor de 0.0002 U/mL, este nivel basal fue apenas entre 0.25 y 0.33 veces mayor al de las fermentaciones restantes. El valor anterior, aumentó a una tasa de 1×10^{-7} U/mL*h, para las 48h, por lo que la actividad volumétrica permaneció en este periodo constante.

Como se ha comentado existen dos tipos de exoquitinasas, las que actúan sobre la fibra de la quitina y otras sobre los oligosacáridos producidos por las endoquitinasas. En las primeras 48h se piensa que las exoquitinasas fueron de tipo quitobiosidasas y empezaron a hidrolizar regiones de quitina con extremos reductores presentes en las paredes de las hifas maduras, las cuales no eran en concentración muy abundantes, por tanto, las enzimas sólo se mantuvieron activas mientras la concentración de las regiones quitinasas estuvo accesible.

Como resultado de su actividad, los dímeros formados no se acumularon en el medio de fermentación (pues no se muestra un incremento en la concentración de azúcares reductores), sino que, de manera sinérgica, actuaron sintasas utilizando dichos dímeros para regenerar la pared. Esto se constata por el incremento de la biomasa. Se cumple también que el perfil de la actividad volumétrica de las exoquitinasas se mantiene en niveles mínimos respecto al de las endoquitinasas, ya que éstas se detectaron a concentraciones de actividad volumétrica creciente hasta las 48h.

La actividad volumétrica de las exoquitinasas en la segunda región de las 48-72h aumentó a una tasa de 1×10^{-6} U/mL*h, alcanzando una alta concentración a las 72h (2.3×10^{-6} U/mL). Se atribuye que en este periodo el tipo de exoquitinasas

expresadas fue de tipo β -1,4-N-acetilglucosaminidasas (3.2.1.30). Esto se debió a la lisis de la pared celular bajo acción de las endoquitinasas, liberando más oligosacáridos, sin embargo, éstos fueron reutilizados por las exoquitinasas que tienen acción sinérgica y secuencial.

En la tercera región, de las 72-120h las exoquitinasas tuvieron una actividad volumétrica constante entre las que se encontraban las β -1,4-N-acetilglucosaminidasas (3.2.1.30), esto se debió a que solo hubo mantenimiento sin degradación ni mantenimiento de la pared de los hongos.

Esto se corrobora con la literatura consultada, la cual menciona la actividad de las exoquitinasas en presencia de N-acetilglucosamina a 3mM con una activación del 38% (Mayer y col.,2006).

La actividad volumétrica de las exoquitinasas en la cuarta región de las 120-168h (-9×10^{-7} U/mL*h) probablemente disminuyo, esto se debió a que se inactivaron las exoquitinasas por la ausencia de dímeros disponibles, uniéndose a trímeros que impidan la adecuada hidrólisis e inactivando a las exoquitinasas.

Esto se asoció a que las exoquitinasas pudieron ser dependientes del ión fosfato induciéndose de manera positiva su actividad volumétrica, pero nuevamente como resultado de su producto de hidrólisis (o por glucosa), la presencia del monómero N-acetilglucosamina (NAG) pudo haber alcanzado concentraciones inhibitorias para estas enzimas (Jones y Kosman, 1980).

Otro factor que probablemente afectó pudo haber sido la concentración de KCl, la cual fue de 6.70×10^{-3} mol/L, inactivando la actividad volumétrica de las exoquitinasas, esto se corrobora con la literatura consultada en línea en la base de datos BRENDA (The comprehensive Enzyme Information System), la cual menciona el efecto de inhibición del KCl en concentraciones de 1 mM, donde permanece el 80% de su actividad y con 2 mM permanece el 50% de la actividad volumétrica de las exoquitinasas en la bacteria *Vibrio furnissi* (Keyhant y Roseman, 1996).

La actividad volumétrica de las exoquitinasas aumento en la quinta región de las 168-216h (3×10^{-7} U/mL*h), secretando enzimas al medio de fermentación, esto probablemente ocurrió porque se lisó la pared de las hifas maduras, ocupando

los oligosacáridos para el crecimiento y desarrollo de las hifas jóvenes presentes en el medio de fermentación.

9.2.4.2. Fermentación con glucosa sin fosfato

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa sin fosfato (Fig. 18, línea amarilla), se enseñaron cinco regiones que se describen en esta grafica a continuación, la actividad volumétrica de las exoquitinasas empezó a aumentar en la primera región de las 0-48h (1×10^{-8} U/mL*h), esto se debió probablemente a que se secretaron exoquitinasas en el medio de fermentación, las cuales son enzimas constitutivas, degradando la quitina de los hongos y por la falta de fosfato no se logró formar adecuadamente la pared de quitina manteniéndose la concentración de oligosacaridos o quitobiosa en el medio de fermentación, los cuales se cuantifican como azucares reductores, la actividad volumétrica de las exoquitinasas se incrementaron en la segunda región de las 48-72h (9×10^{-8} U/mL*h). Esto se debió probablemente a que se liso la pared de los hongos aumentando la actividad volumétrica de las exoquitinasas en el medio de fermentación. La actividad volumétrica de las exoquitinasas se incrementó en la tercera región de las 72-120h (1×10^{-7} U/mL*h), hasta alcanzar una elevada actividad volumétrica en la cuarta región de las 120-168h (6×10^{-7} U/mL*h).

A partir de una quinta región de las 168-216h (-9×10^{-7} U/mL*h), la actividad volumétrica de las exoquitinasas disminuyo debido a que fueron ocupados por trómeros, los cuales inactivaron la actividad volumétrica de las exoquitinasas.

Otra causa probable fue que las exoquitinasas son constitutivas y por su acción sinérgica a las endoquitinasas, las cuales cabe mencionar, se incrementaron linealmente desde inicio de la fermentación hasta las 48h. Posteriormente, podemos ver de manera importante y sinérgica dos efectos, primero el efecto del ión fosfato, observándose un retraso en estas enzimas hasta las 168h. Este valor máximo es muy similar al alcanzado en la fermentación con quitina.

9.2.4.3. Fermentación con quitina

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de quitina (Fig. 18, línea roja), la actividad volumétrica de las exoquitinasas se detectó desde el tiempo inicial a una concentración de 0.00016 U/mL, esto se atribuyó a la actividad

volumétrica de las exoquitinasas. Probablemente su actividad es secuencial al de las endoquitinasas, por lo que, considerando el perfil de éstas, se observaron comportamientos opuestos, es decir, en el máximo de actividad volumétrica de las endoquitinasas, corresponde a un descenso de actividad volumétrica de las exoquitinasas.

Se muestran cinco regiones que se describen en esta grafica a continuación, la actividad volumétrica de las exoquitinasas, aumento de las 0-48h (5×10^{-7} U/mL*h) en la primera región, hasta una alta actividad volumétrica de las exoquitinasas de las 48-72h (7×10^{-7} U/mL*h) en la segunda región, esto probablemente se debió a que la actividad volumétrica de las exoquitinasas son enzimas constitutivas produciéndose para la degradación de la quitina de las hifas jóvenes y formar hifas maduras, manteniendo una producción constante de biomasa, disminuyendo ligeramente la actividad volumétrica de las exoquitinasas en la tercera región de las 72-120h (-9×10^{-7} U/mL*h), debido a que fueron inactivadas por la concentración de oligosacaridos con un 40% o menos de acetilación, inhibiendo su actividad quitinolítica, aumentando ligeramente la actividad volumétrica de las exoquitinasas en la cuarta región de las 120-168h (4×10^{-7} U/mL*h). Esto se debió a que se secretaron enzimas para el crecimiento y desarrollo del hongo, degradando la quitina en oligosacaridos con las exoquitinasas, disminuyendo la actividad volumétrica de las exoquitinasas en la quinta región de las 168-216h (-2×10^{-7} U/mL*h), esto es debido a que se inactivaron las exoquitinasas por la concentración de oligosacaridos con menos de un 40% de acetilación presentes en el medio de fermentación.

Desde inicio de la fermentación y hasta las 48h hay un nivel constante de actividad volumétrica de las endoquitinasas, por lo tanto, conforme fueron hidrolizándose residuos de quitina y con secuencias adecuadas de unidades acetiladas, la actividad volumétrica de las exoquitinasas presentó un incremento lineal hasta alcanzar la maxima actividad volumétrica de exoquitinasas (0.0002 U/mL) a las 72h, tiempo a partir del cual empieza a disminuir, llegando a una mínima actividad volumétrica de exoquitinasas (0.00015 U/mL) a las 120h observándose una meseta prolongada,

hasta el final de la fermentación (216h). Se han encontrado actividad volumétrica de de endoquitinasas en *Lecanicillium fungicola* de 410 U/mg (Ramírez y col., 2006). No se observó una relación directa entre el perfil de esta actividad volumétrica y el de la biomasa, sin embargo, no podemos decir que no se asocie esta actividad volumétrica con el rompimiento y remodelamiento de la pared celular del hongo.

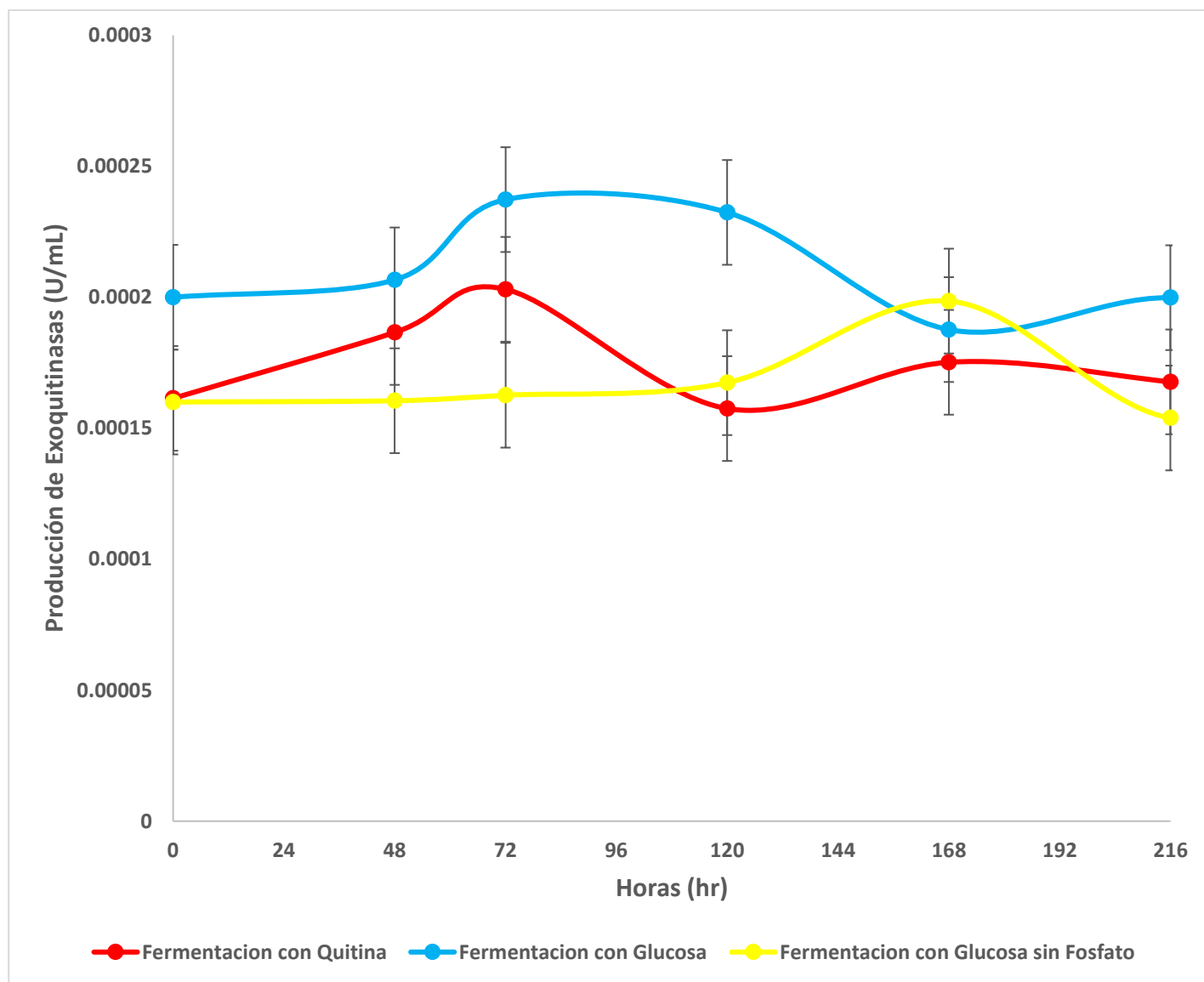


Figura 19. Exoquitinasas de la cepa DMRN1. Los valores mostrados representan el promedio de dos repeticiones (Promedio $\pm$ SD).

9.2.5. Prueba colorimétrica del aislado DMRN1 realizada en las fermentaciones

Se mostro en la tabla 5 la producción de alcaloides indolicos producidos durante nueve días. Cabe destacar que los alcaloides indolicos son secretados por los hongos del género *Psilocybe*, cualquier cambio de color denotaría la producción de un alcaloide diferente demostrando un cambio en la ruta metabólica de los alcaloides indolicos y por ende demostraría el efecto de la fuente de carbono o el efecto del fosfato contenido en el medio de fermentación.

Se observo una mayor coloración en la prueba colorimétrica con el aislado DMRN1, cómo se observó en la tabla 5 se ve una producción de alcaloides índicos a partir de las 24h empezando a aumentar la velocidad de producción de los alcaloides indolicos mostrando una coloración más intensa en comparación a las otras dos fermentaciones, considerando que la psilocibina dio una coloración azulácea, mientras en la fermentación con glucosa sin fosfato se produjo un análogo de la psilocibina a partir de las 120h manteniéndose la producción hasta las 216h. Mientras en la fermentación con quitina no hubo un cambio aparente el cual muestre la producción de algún tipo de alcaloide indolico. Esto nos indica que la fuente de carbono de quitina afecto en la síntesis de los alcaloides, indicando una inhibición o ausencia de la producción de los alcaloides indolicos presente en el medio de fermentación.

En la literatura se han estudiado los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos (Sánchez y col., 2013). Estos se han estudiado como pigmentos producidos por diferentes hongos teniendo diferentes estructuras que les confieren características únicas las cuales se han estudiado y que pueden ser alcaloides, quinonas, flavonoides, antocianinas, flavonoides, carotenoides, terpenos u otros pigmentos los cuales dan coloraciones características.

Tambien se ha mejorado la producción de pigmentos optimizando las diferentes condiciones requeridas para el crecimiento y desarrollo de los hongos.

Como ejemplo se tiene la producción de pigmentos con hongos del género *Monascus sp.* en medio agar papa dextrosa (PDA) y agar extracto de malta (MEA), aunque la producción de pigmentos depende de las condiciones de cultivo, también produce citrinina la cual es una toxina fúngica (Atenas, 2014).

Se ha mejorado la producción de pigmentos con el hongo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* en medio solido variando la fuente de carbono siendo la mayor producción en agar papa dextrosa (Cruz y col.2015).

Esto nos da la pauta para decir que los diferentes pigmentos obtenidos durante la fermentación son alcaloides indolicos los cuales presentan similitudes entre ellos. Dándonos diferentes colores que son mostrados a continuación.

Tabla 10. Detección de alcaloides por la prueba colorimétrica en las fermentaciones realizadas con el aislado DMRN1 durante nueve días.

0	24	48	72	96	120	144	168	192	216	
										Con glucosa y fosfato
										Con glucosa sin fosfato
										Con quitina

9.3. Determinaciones en las Fermentaciones líquidas con el aislado DMRN2

9.3.1. Biomasa

El monitoreo de biomasa, permitió observar el efecto de la fuente de carbono y del fosfato durante el crecimiento. Al igual que con el aislado DMRN1, en las fermentaciones con glucosa no se observó fase de latencia y la mayor producción de biomasa fue con glucosa.

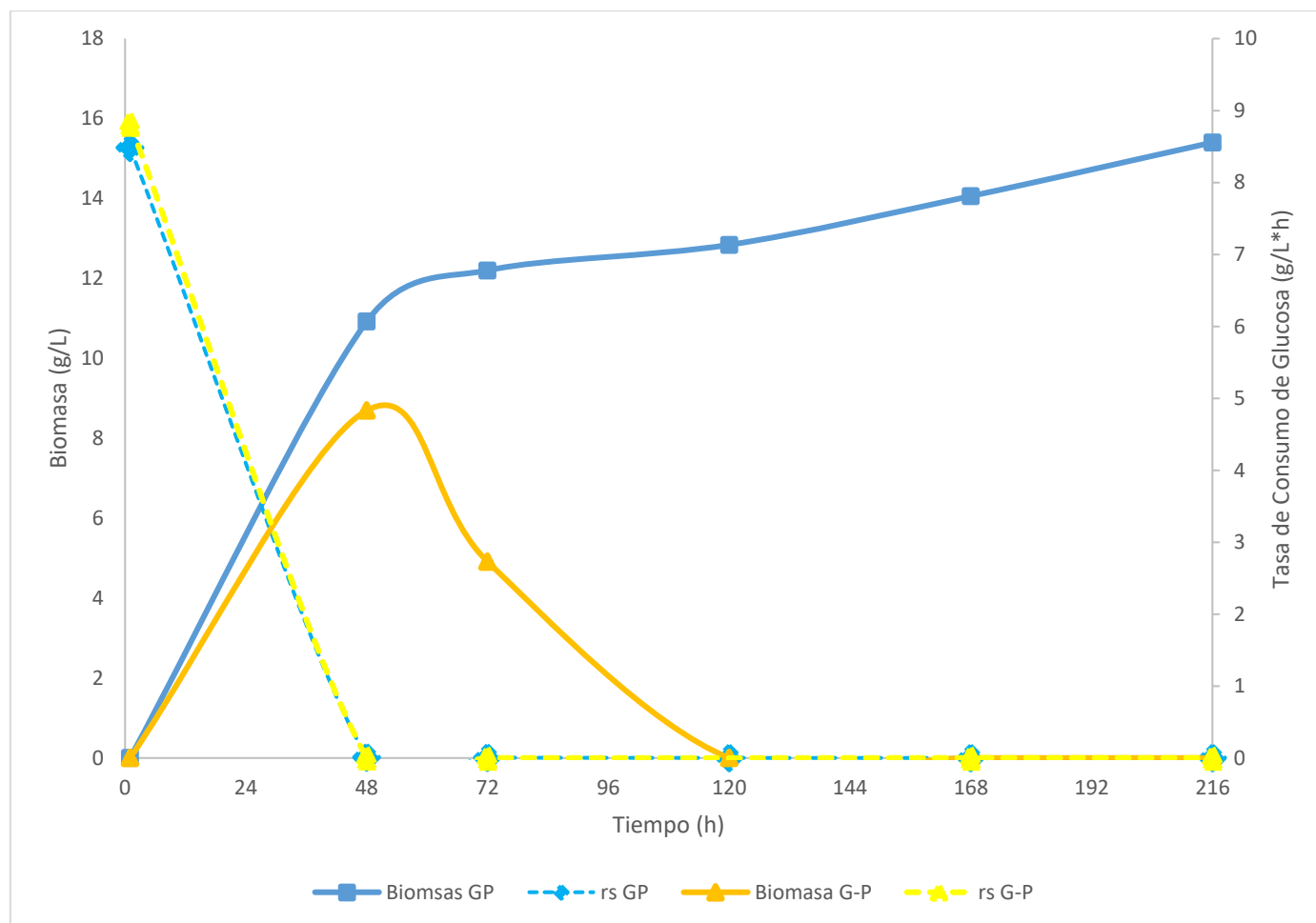


Figura 20. Cinética de crecimiento del aislado DMRN2 para la fermentación con glucosa y de fosfato. —■— Producción de biomasa con glucosa y fosfato. —▲— Producción de biomasa con glucosa sin fosfato. —●— Tasa de consumo de glucosa con fosfato. —▲— Tasa de consumo de glucosa sin fosfato. Los valores mostrados representan el promedio de dos repeticiones (Promedio±SD).

9.3.1.1. Fermentación con glucosa y fosfato

En el perfil expuesto en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 20, línea azul continua), se observan cinco regiones con respecto a la producción de biomasa, mostrándose una primera región de las 0-48h con una velocidad de producción de biomasa de $0.2275 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, esto probablemente ocurrió debido a que la producción de biomasa empezó desde las 0 horas y no se observó una fase de adaptación (fase lag). Esto se debió a que el hongo estaba en estrés adaptándose rápidamente al medio de fermentación, revelando una mayor velocidad de producción desde el inicio de la fermentación. Analizando un comportamiento lineal dentro de las primeras 24h, que permitió estimar, a partir del valor de la pendiente, la velocidad de producción de biomasa en un valor de $0.340 \text{ g/L}\cdot\text{h}$.

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 24, línea azul), se exponen cinco regiones que se describen en esta grafica a continuación, la tasa de consumo de glucosa empezó a partir de las 0-48h ($-0.0025 \text{ g/L}\cdot\text{h}$), donde se manifestó la primera región, esto se debió a que se empezó a consumir la glucosa, observándose una curva más pronunciada esto se debió a que se consumió la glucosa a una mayor velocidad con respecto a la producción de proteínas solubles fue proporcional al consumo de glucosa utilizada como energía para el hongo teniendo una mayor velocidad de consumo en una segunda región de las 48-96h ($-0.0049 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$).

En la segunda región que comprende de las 48-96h se indicó una velocidad en la producción de biomasa de $0.0471 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, percibiéndose un incremento gradual de las 48h (13.18 g/L) hasta las 96h, pero con una menor velocidad, en la tercera región de las 96-144h estimada en $-0.0119 \text{ g/L}\cdot\text{h}$. En este tiempo, se notó una coincidencia con la máxima producción de proteínas (figura 21) y con la producción de endoquitinasas (figura 23). Estas enzimas resultan de interés que se expresaron en un medio sin sustrato quitinoso, ya que son las encargadas de escindir la quitina en fragmentos de longitudes más pequeñas. En este caso, la secreción de endoquitinasas serviría para degradar la pared celular, liberando proteínas al ambiente, esto se debe probablemente a la edad del micelio tratando de generar

micelio joven del micelio maduro y poder aumentar el consumo de glucosa del medio de fermentación. Detectando la glucosa y asimilándola en tiempos muy cortos, como se puede observar en la gráfica de azúcares reductores.

Además, esto se atribuyó probablemente a que el fosfato coadyuvó en la asimilación de la glucosa en la ruta biosintética de la quitina dando como resultado una mayor producción de biomasa.

En la cuarta región de las 144-192h se muestra una velocidad de producción de biomasa de $0.0517\text{g/L}\cdot\text{h}$, esto se manifestó como una fase estacionaria prolongada (considerando valores promedio y desviaciones estándar) desde las 96h hasta las 168h, tiempo a partir del cual se percibió otro incremento de biomasa, en la quinta región de las 192-216h hasta su valor máximo cuantificado en 15.4 g/L (216h) a una velocidad de $0.0129\text{g/L}\cdot\text{h}$. En esta fase estacionaria, como se verá más adelante por la concentración de proteínas solubles (Fig. 21), se piensa que hubo secreción de proteínas asociadas a la forma esporulada, al igual que en la fermentación con quitina (Smits y col. 2001).

Con respecto a la velocidad de consumo de azúcares reductores llega a una velocidad de consumo límite en la tercera región de las 96-144h con una velocidad de consumo ($-0.0059\text{ mg/mL}\cdot\text{h}$). Esto probablemente se debió a que se consumió la glucosa para la síntesis y reparación de la pared del hongo.

Disminuyendo la tasa de consumo de azúcares reductores manteniéndose constante en una cuarta región de las 144-192h ($-0.0006\text{mg/mL}\cdot\text{h}$). Aunque la producción de biomasa sigue aumentando en la región en la que se mantiene, probablemente es una etapa de mantenimiento en la cual se produjeron oligosacáridos, los cuales se cuantificaron como azúcares reductores.

Esto se corrobora con los rendimientos globales obtenidos con las fórmulas dándonos un resultado positivo.

Volviendo a aumentar la tasa de consumo de glucosa en la quinta región de las 192-216h ($-0.004\text{ mg/mL}\cdot\text{h}$). Debido a que ya no se produjeron oligosacáridos para el mantenimiento y reparación de la pared del hongo. El perfil observado en la fermentación con glucosa se deduce que fue consumida en su totalidad para la síntesis de quitina necesaria para el crecimiento del hongo.

Comparando con los perfiles de endoquitinasas y exoquitinasas se observa como hubo un descenso de la producción al inicio de la fermentación, cabe mencionar que en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa se tiene una concentración de 55Mm.

Aunque se observa un aumento en la producción de azúcares reductores serían de los oligómeros de quitina que se formaron con la glucosa empezando a disminuir a las 192h esto se debió a que dejó de producir azúcares reductores aumentando la concentración de endoquitinasas y exoquitinasas las cuales se inactivaron por la alta concentración de sustrato., cabe mencionar que en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa se tiene una concentración de 55 Mm. Los cuales tuvieron que haber entrado a la ruta biosintética de la quitina, disminuyendo la concentración de glucosa y formándose oligómeros de quitina. Se ha estudiado los diferentes oligosacaridos que se pueden encontrar en la hidrólisis de la quitina ideándose diferentes mecanismos de síntesis y degradación (Fukamizo y Kramer, 1984).

Los rendimientos obtenidos en la fermentación con glucosa son mostrados en la tabla 10, donde se muestra como el valor obtenido de r_x global es menor al obtenido de las 0-48h el cual es el más alto de 0.071 gbiom/L*h.

La Δ_x global es mayor con respecto a los diferentes periodos siendo la mayor de las 0-48h el cual es de 10.92 gbiom/L.

Con respecto al q_s global es menor a los diferentes periodos siendo el mayor al obtenido de las 160-216h el cual es de 0.0029h⁻¹ disminuyendo con respecto al tiempo.

En relación a los rendimientos de crecimiento ($Y_{x/s}$) el rendimiento global es menor al obtenido en los diferentes periodos siendo el mayor de las 0-48h el cual es de 33.077gbiom/g de glucosa consumida.

Por último, el m_s global es menor al obtenido en las diferentes regiones siendo la mayor de las 120-160h con un valor de 5.50×10^{-18} g glucosa consumida/g biomasa*h.

Tabla 11. Parámetros cinéticos para la fermentación con glucosa y fosfato con el aislado DMRN2

PERIODOS	Biomasa/ Sustrato $Y_{X/S}$	TASA VOLUMÉTRICA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA r_x	TASA ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO q_s	TASA VOLUMÉTRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO r_s	COEFICIENTE DE MANTENIMIENTO m_s
	Valor $\left[\frac{g_{biomasa}}{g_{glucosa}}\right]$	Valor $\left[\frac{g_{biomasa}}{L \cdot h}\right]$	Valor $[L^{-1}]$	Valor $\left[\frac{g}{L \cdot h}\right]$	Valor $\left[\frac{g_{glu\ cons.}}{g_{Biom} \cdot h}\right]$
<i>Periodo</i> _(0-48h)	33.077	0.23	0.00069	0.0075	0
<i>Periodo</i> _(48-72h)	4.14	0.053	-0.01	0.0118	-2.89E ⁻¹⁹
<i>Periodo</i> _(72-120h)	-10.26	0.013	0.00058	0.0026	0
<i>Periodo</i> _(120-160h)	9.87	0.025	-0.047	0.0022	5.50E ⁻¹⁸
<i>Periodo</i> _(160-216h)	9.90	0.027	0.0029	0.0022	0
<i>Global</i> _(0-216h)	-28.86	0.071	0.000296	0.0045	0.00045

9.3.1.2. Fermentación con glucosa sin fosfato

En la fermentación con una fuente de carbono de glucosa sin fosfato (Fig. 20, línea amarilla punteada), la producción de biomasa empezó a partir de las 0h, no presentó fase de adaptación (fase lag), debido a que el hongo estaba estresado, adaptándose rápidamente al medio de fermentación, evidencio una mayor velocidad de producción de biomasa, llegando a su punto máximo a las 24h (4.58 g/L), se mantuvo hasta las 48h (4.83 g/L), se contempló una fase exponencial, dentro de las primeras 48h, que permitió estimar, a partir del valor de la pendiente, la velocidad de producción de biomasa en un valor de 0.2275 g/L*h.

Se observan otras cuatro regiones en la gráfica de producción de biomasa a partir de las 48-96h a una velocidad de 0.04471g/L*h. Con respecto a la tasa de consumo de azúcares reductores mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa sin fosfato (Fig. 24, línea amarilla), se presentaron cinco regiones que se evidenciaron en esta gráfica, empezando a consumirse lentamente aunque se muestra como una etapa de mantenimiento la tasa de consumo de azúcares reductores de las 0-48h (-0.0009 mg/mL*h), donde se revelo la primera región, esto se debió a que por la falta de fosfato en el medio de fermentación mostro una baja tasa de consumo de glucosa al principio de la fermentación.

En la segunda región de las 48-96h se mostró una velocidad de producción de biomasa de 0.0471g/L*h, aumentando la tasa de consumo de azúcares reductores

en la segunda región a las 48-96h ($-0.0042 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$). Esto es debido a que por la falta de fosfato su metabolismo fue lento en el interior del hongo concentrándose la glucosa en el interior de la célula.

En la tercera región de las 96-144h se mostró una velocidad de producción menor con respecto a la producción de biomasa de $-0.0119\text{g/L}\cdot\text{h}$, disminuyendo y llegando a su punto final a las 120h, esto se debe a la falta de fosfato presente en el medio de fermentación, debido a que la glucosa no pudo entrar a la ruta de la biosíntesis de la quitina por la falta de fosfato requerido para poder ser fosforilada, debiendo a que el hongo encontró otras rutas para conseguir energía para crecer y desarrollarse, percibiéndose en la gráfica de endoquitinasas y exoquitinasas un aumento, esto es debido a que las endoquitinasas y exoquitinasas se inactivaron por la concentración de glucosa. Aunque no hubo concentración de alcaloides que afectara la producción de biomasa. Comparando con la tabla 4 se deduce que la producción de biomasa, aunque menor a la que se produce con la cepa DMRN1 ocurre con altas concentraciones de carbono siendo la glucosa ideal para la producción de biomasa en comparación con otras fuentes de carbono con mayor contenido de nitrógeno presente en el medio.

En consecuencia, no hubo una completa asimilación de glucosa en el hongo debido a la falta de fosfato, el cual es necesario para la ruta biosintética de la quitina y la producción de alcaloides.

Empezando a aumentar la tasa de consumo de azúcares reductores a las 96-144h ($0.0049 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$), donde se muestra la tercera región, esto probablemente se debió a la lisis de la pared celular para el remodelamiento y reparación del micelio.

En la cuarta región de las 144-192h se observó una velocidad de producción de biomasa de $0.0517\text{g/L}\cdot\text{h}$. Volviéndose a consumir los azúcares reductores en la cuarta región de las 144-192h ($-0.0026 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$), esto se debió a que los azúcares reductores en el medio de fermentación eran oligosacaridos de la síntesis y reparación de la pared del hongo, empezando a sintetizar la pared de los hongos, utilizando los azúcares reductores presentes en el medio de fermentación.

En la quinta región de las 192-216h se observó una velocidad de producción de biomasa de $0.0129\text{g/L}\cdot\text{h}$. Aumentando la tasa de consumo de azúcares reductores

en la quinta región de las 192-216h (-0.0042 mg/mL*h), probablemente esto se debió a que el hongo utilizó los azúcares reductores presentes en el medio de fermentación para la síntesis y reparación de la pared del hongo, consumiendo la glucosa en el medio de fermentación. Este perfil observado se debe a que la glucosa presente en el medio no fue adsorbida totalmente sino se mantuvo en el exterior de la célula para la reparación y mantenimiento de la pared del hongo, probablemente a la falta de fosfato presente en el medio de fermentación, no logrando entrar a la ruta de la biosíntesis de la quitina por la falta de fosfato requerido para poder ser fosforilado, debiendo el hongo encontrar otras rutas de conseguir energía para crecer.

Cabe la posibilidad que el hongo consiguió fosfato de la ruta biosintética de los alcaloides los cuales produjeron un colorante diferente al que producen manteniendo una elevada producción y expresión de endoquitinasas en el medio, funcionando como un mensajero químico que promueve el crecimiento del hongo. Este perfil se debe a que el hongo empezó a sintetizar algún azúcar reductor con carbón anómérico como consecuencia de la falta de fosfato no pudiendo completar la síntesis de quitina regresando a su forma inicial como azúcar y siendo ocupado como una fuente de reserva de energía para el desarrollo y crecimiento del hongo. También es probable que la glucosa presente en el medio no fue adsorbida totalmente sino se mantuvo en el exterior de la célula, debiéndose a la falta de fosfato presente en el medio de fermentación, debido a que la glucosa no pudo entrar a la ruta de la biosíntesis de la quitina por la falta de fosfato requerido para poder ser fosforilado, obligando al hongo a encontrar otras rutas de conseguir energía para crecer, uno de esas rutas llevan al hongo a degradar la pared celular observándose en la gráfica de endoquitinasas un aumento en la producción de endoquitinasas aunque no se observa ningún aumento en la producción de exoquitinasas esto es debido a que las exoquitinasas no se produjeron debido a la falta de fosfato. Como se han investigado los diferentes mecanismos que puede generar los hongos para sobrevivir y poder crecer en las condiciones más adversas (Smits y col., 2001).

Los rendimientos obtenidos en la fermentación con glucosa son mostrados en la tabla 10, donde se muestra como el valor obtenido de r_x global es menor al obtenido de las 0-48h el cual es el más alto de 0.102 gbiom/L*h.

La Δ_x global es mayor con respecto a los diferentes periodos siendo la mayor de las 0-48h el cual es de 4.83 gbiom/L.

Con respecto al q_s global es menor a los diferentes periodos siendo el mayor al obtenido de las 72-120h el cual es de 0.00088h⁻¹ disminuyendo con respecto al tiempo.

En relación a los rendimientos de crecimiento ($Y_{x/s}$) el rendimiento global es menor al obtenido en los diferentes periodos siendo el mayor de las 72-120h el cual es de 31.028gbiom/g de glucosa consumida.

Por último, el m_s global es menor al obtenido en las diferentes regiones siendo la mayor de las 72-120h con un valor de 3.45x10⁻²⁰g glucosa consumida/g biomasa*h.

Tabla 12. Parámetros cinéticos para la fermentación con glucosa sin fosfato con el aislado DMRN2

PERIODOS	Biomasa/ Sustrato $Y_{x/s}$	TASA VOLUMÉTRICA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA r_x	TASA ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO q_s	TASA VOLUMÉTRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO r_s	COEFICIENTE DE MANTENIMIENTO m_s
	Valor $\left[\frac{g_{biomasa}}{g_{glucosa}}\right]$	Valor $\left[\frac{g_{biomasa}}{L \cdot h}\right]$	Valor $[L^{-1}]$	Valor $\left[\frac{g}{L \cdot h}\right]$	Valor $\left[\frac{g_{glu\ cons.}}{g_{Biom} \cdot h}\right]$
<i>Periodo</i> _(0-48h)	26.41	0.102	0.00082	0.0039	0
<i>Periodo</i> _(48-72h)	-34.104	-0.0875	-0.0014	0.0025	0
<i>Periodo</i> _(72-120h)	31.028	-0.056	0.000888	-0.0022	3.45E ⁻²⁰
<i>Periodo</i> _(120-160h)	0	0	0	0.0049	0
<i>Periodo</i> _(160-216h)	0	0	0	0.006	0
<i>Periodo</i> _(48-72h)	0.49	0.102	0.00082	0.0039	-0.039
<i>Periodo</i> _(72-168h)	-0.34	-0.028	-0.0005	0.0013	0.035
<i>Global</i> _(0-216h)	0	0	0	0.003	0

9.3.1.3. Fermentación con quitina

En la fermentación con quitina como fuente de carbono (Fig. 21 línea café), la producción de biomasa empezó desde las 0h presentando una ligera fase de adaptación (fase lag), luego a su punto máximo a las 24h (0.99 g/L). De hecho, se percibió un comportamiento lineal dentro de las primeras 24h, que permitió estimar,

a partir del valor de la pendiente, la velocidad de producción de biomasa en un valor de 0.0412 g/L*h. Se observan cinco regiones, empezando la producción de biomasa en la primera región de 0-48h a una velocidad de 0.0115g/L*h. Esto se atribuyó a la producción de biomasa y al consumo de la quitina, esto se debió a que tuvo una adaptación lenta al medio de fermentación, esto se notó en la gráfica de proteínas, evidenciándose una producción enzimas que son ocupadas para degradar sustrato en el medio, en este caso quitina, corroborándose con la producción de exoquitinasas las cuales son las encargadas de desarrollar la pared celular y una ligera producción de endoquitinasas las cuales se encargan de consumir el sustrato debido a la posible concentración de quitina, particularmente que este es un sustrato complejo. Inmediatamente se dio un descenso de biomasa a las 48h (0.55 g/L). Coincidiendo con el descenso de endoquitinasas las cuales han sido estudiadas por su función de degradar quitina en oligómeros (Ramírez y col., 2006).

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de quitina (Fig.24, línea roja), se observan cinco regiones que se describen en esta grafica a continuación, se comenzó una producción de azúcares reductores a las 0-48h (0.0019 mg/mL*h), donde se evidencio la primera región en la producción de azúcares reductores.

En la segunda región de las 48-96h se observa una velocidad de producción de biomasa de 0.0531g/L*h, disminuyendo la velocidad de producción de azúcares reductores en la segunda región a las 48-96h (0.0018 mg/mL*h), probablemente esto se debió a que la quitina fue hidroliza por quitinasas liberadas al medio de fermentación para la reparación y mantenimiento de la pared del hongo, esto se constata en la tercera región donde empieza a haber un descenso en la producción de azúcares reductores.

En la tercera región de las 96-144h se observa una velocidad de producción de biomasa de 0.0188g/L*h, a partir de este tiempo se contempló un aumento considerable de la biomasa, llego a su valor máximo a las 96h (3.1 g/L), se advirtió una probable meseta, donde se mantiene constante hasta las 216h en la fermentación con quitina. Esto se debe probablemente por la síntesis de oligómeros necesarias para el desarrollo de la pared celular los cuales por su estructura son

sintetizados de la quitina presente en el medio, estos oligómeros han sido estudiados (Hans Paulsen, 1982) y (Richard R. Schmidt, 1986).

En la cuarta región de las 144-192h se observa una velocidad de producción negativa de biomasa de $-0.0058\text{g/L}\cdot\text{h}$, esto es debido probablemente a que la pared de quitina de los hongos se liso para reparación y mantenimiento, indicando la síntesis de la pared del hongo de las 96-144h ($-0.0018\text{ mg/mL}\cdot\text{h}$), aumentando la velocidad de consumo de azúcares reductores en la cuarta región a las 144-192h ($-0.0023\text{ mg/mL}\cdot\text{h}$), para la reparación y mantenimiento de la pared del hongo.

En la quinta región de las 192-216h se observa una velocidad de producción de biomasa de $0.015\text{g/L}\cdot\text{h}$, con una producción de azúcares reductores en la quinta región de las 192-216h ($0.0029\text{ mg/mL}\cdot\text{h}$), probablemente se liberaron oligosacáridos de la quitina. Se percibió una cantidad basal de 0.2 mg/mL de NAG al inicio de la fermentación, lo que se atribuye a la acción de las exoquitinasas que también fueron detectadas en cantidades mínimas, como resultado de su capacidad de generarse constitutivamente para romper la pared celular, pero también para hidrolizar algunos residuos producto de reacción de las endoquitinasas. Cabe mencionar que como esta técnica de detección no es específica, otros azúcares reductores como glucosa, glucosamina, quitobiosa, quitotriosa, y otros oligosacáridos de mayor grado de polimerización pudieron ser detectados. Esto se debió a que empezó a ocupar sus reservas de energía para crecer y desarrollarse. Comparando con los perfiles de endoquitinasas y exoquitinasas se observa cómo se mantuvo una producción al inicio de la fermentación observándose una correspondencia entre la producción de endoquitinasas y exoquitinasas y los azúcares reductores producidos los cuales se forman monómeros de NAG los cuales se sintetizan para la formación de la pared celular del hongo.

Se ha estudiado los oligosacáridos producidos por la degradación de la quitina usando quitinasas de *Lecanicillum fungicola* (Ramírez y col., 2006).

También se pudo deber a que se empezó a producir esporas donde se mantuvo, esto se atribuye a que está en su fase de esporulación, así los perfiles de proteína soluble y quitinasas indican que se produjeron otras proteínas para producir la pared celular de las esporas, entre las que destaca la quitin sintetasa proteínas β quitin

desacetilasas, debido a que la composición de las esporas implica la presencia de una capa de quitosano o quitina desacetilada. En esa fase estacionaria, como se verá más adelante por la concentración de proteínas solubles (Fig. 21), se piensa que hubo secreción de proteínas necesarias para el mantenimiento de las células entre las que se encuentran proteasas, hidrolasas, lipasa y glucanasas, pero no para regeneración de pared celular o formación de hifas, en este periodo la producción de biomasa se ve relacionada con la producción de quitina presente en la pared celular del hongo siendo constante, esto nos indicaría que la ruta de la biosíntesis de la quitina afecta en la producción de biomasa debido a que las enzimas muestran una inhibición por concentración de producto. Aunque no hubo producción de alcaloides que afectaran la producción de biomasa solo hubo un ligero cambio de color amarillento el cual se mantuvo hasta el final de la fermentación. Esto es debido a que probablemente se sintetizó un alcaloide indólico, aunque no afectó en la producción de biomasa. Los rendimientos obtenidos en la fermentación con glucosa son mostrados en la tabla 10, donde se muestra como el valor obtenido de r_x global es menor al obtenido de las 48-72h el cual es el más alto de 0.065 gbiom/L*h. La Δ_x global es mayor con respecto a los diferentes periodos siendo la menor de las 48-72h el cual es de 1.57 gbiom/L. Con respecto al q_s global es menor a los diferentes periodos siendo el mayor al obtenido de las 72-120h el cual es de 0.0067h⁻¹ disminuyendo con respecto al tiempo. En relación a los rendimientos de crecimiento ($Y_{x/s}$) el rendimiento global es menor al obtenido en los diferentes periodos siendo el mayor de las 72-120h el cual es de 11.23 gbiom/g de glucosa consumida. Por último, el m_s global es menor al obtenido en las diferentes regiones siendo la mayor de las 72-120h con un valor de 1.18×10^{-18} g glucosa consumida/g biomasa*h.

Tabla 13. Parámetros cinéticos para la fermentación con quitina con el aislado DMRN2

PERIODOS	Biomasa/ Sustrato $Y_{X/S}$	TASA VOLUMÉTRICA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA r_x	TASA ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO q_s	TASA VOLUMÉTRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO r_s	COEFICIENTE DE MANTENIMIENTO m_s
	Valor $\left[\frac{g_{biomasa}}{g_{glucosa}}\right]$	Valor $\left[\frac{g_{biomasa}}{L \cdot h}\right]$	Valor $[L^{-1}]$	Valor $\left[\frac{g}{L \cdot h}\right]$	Valor $\left[\frac{g_{glu\ cons.}}{g_{Biom} \cdot h}\right]$
Periodo _(0-48h)	-8.25	0.011	-0.0065	-0.0019	0
Periodo _(48-72h)	-18.72	0.065	-0.0023	-0.0035	1.17E ⁻¹⁹
Periodo _(72-120h)	11.23	0.012	0.0067	0.0017	1.18E ⁻¹⁸
Periodo _(120-160h)	10.71	0.013	-0.0010	0.0022	0
Periodo _(160-216h)	-10.64	0.014	-0.0020	-0.0014	-1.35E ⁻¹⁹
Global _(0-216h)	0.41	0.018	-5.65E ⁻⁵	-0.00023	-0.011

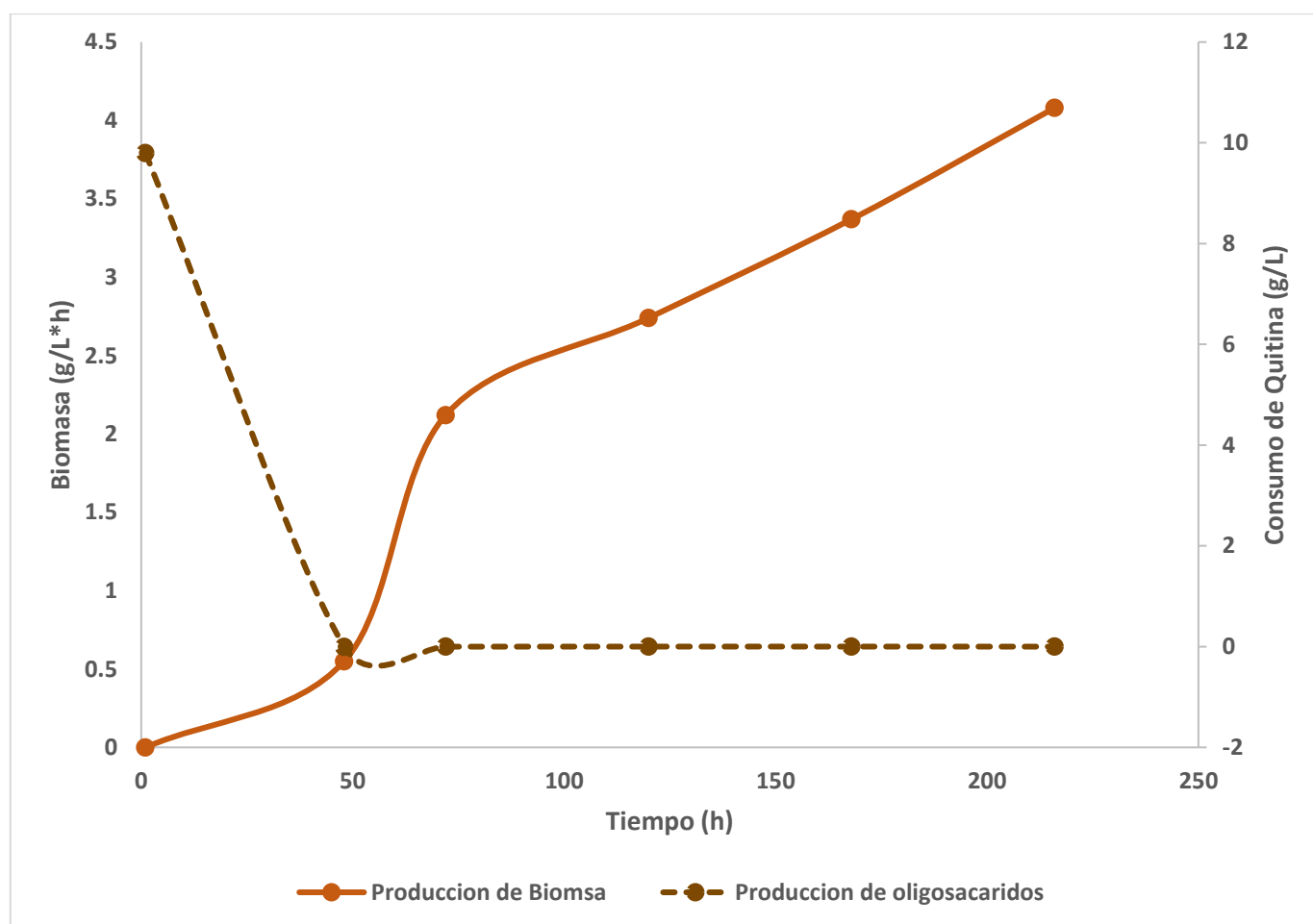


Figura 21. Biomasa del aislado DMRN2 por efecto de la fuente de carbono quitina y de fosfato. Los valores mostrados representan el promedio de dos repeticiones (Promedio±SD).

9.3.2. Proteína soluble

La determinación de proteína, se hizo para observar la producción de proteína soluble de los aislados, con respecto a la fuente de carbono y entre las fermentaciones con glucosa, comparar si el fosfato tuvo un efecto significativo en este parámetro. Considerando la fuente de carbono de glucosa se observa una mayor producción de proteína soluble.

9.3.2.1. Fermentación con glucosa y fosfato

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 21, línea azul), se observan tres regiones en la gráfica, mostrando en la primera región una concentración de proteínas (0.0008mg/mL) desde el inicio de la fermentación, llegando a su valor máximo (0.00403mg/mL) a las 96h. Esto es debido a que el reactivo de Bradford detecta proteínas globulares entre la que destacan las enzimas necesarias para la síntesis o degradación de la pared del hongo o la producción de glicerol. Esto implica que, ante la detección de un sustrato de fácil asimilación, no era necesaria la expresión de ciertas proteínas. Sin embargo, la secreción de enzimas quitinolíticas si es evidente desde este tiempo (Fig. 23 y Fig. 24), puesto que son constitutivas y necesarias para la síntesis de la pared celular del hongo se esperaría su expresión, pero la falta de detección de éstas por parte del reactivo de Bradford podría indicar que los residuos aminoácidos de éstas no son aromáticos o no contenían arginina.

En una segunda región se muestra que la velocidad de producción de proteínas empieza a disminuir hasta llegar a su máxima velocidad de producción a las 96h (4.03mg/mL) coincidiendo con la máxima velocidad de producción de biomasa (13.18mg/mL), donde empieza a disminuir hasta las 144h (12.61mg/mL), mientras la producción de proteínas empieza a descender llegando a su velocidad de mínima producción a las 168h (0.50mg/mL), aunque en la producción de biomasa vuelve a aumentar llegando a su punto máximo a las 192h (15.09mg/mL), la producción de proteínas llega a su punto máximo a las 216h (1.55 mg/mL), esto nos indica que la producción y secreción de proteínas entre las que destaca las quitinasas fue para la síntesis de los componentes de la pared celular.

9.3.2.2. Fermentación con glucosa sin fosfato

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 21, línea amarilla), se observa una velocidad de producción lenta en la concentración de proteínas solubles, siendo la máxima velocidad de producción a las 96h (1.12 mg/mL). Esto se atribuye a la falta del ion fosfato, necesario para la expresión de ciertas enzimas y proteínas, como el gliceraldehído-3-fosfato, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP+) o el piridoxal-fosfato, implicados en la glucólisis. Esto se debió a que se empezaron a producir proteínas gradualmente (ver la sección de enzimas), aunque por la falta de fosfato en el medio de fermentación, el hongo no pudo establecer homeostasia, no se pudo mantener la tasa producción de proteínas y el decaimiento se prolongó hasta las 192h.

Comparando con el perfil de producción de biomasa, se observa que la velocidad de producción de biomasa empezó a descender a partir de las 0h llegando a su punto final a las 120h, aunque en la producción de proteínas se observa que empezó a ver una producción de proteínas a partir de las 0 horas llegando a su velocidad máxima de producción a las 96h (1.12mg/mL), donde empieza a disminuir y llega a su mínima expresión a las 168h (0.35mg/mL). A partir de este punto empieza a aumentar la velocidad de producción de proteína soluble llegando a su punto máximo a las 216h (1.11mg/mL). Esto nos indicaría que la biomasa presente en el medio se fue degradando en sus componentes estructurales los cuales fueron ocupados por las enzimas presente en el medio disminuyendo la producción de biomasa y manteniendo una producción de proteínas.

9.3.2.3. Fermentación con quitina

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de quitina (Fig.21, línea roja), se detectó una concentración (0.61mg/mL) de proteínas solubles a partir de las 0h. Esto se atribuyó a la posible secreción de proteínas que reconocieron el sustrato, ya que éstas son proteínas necesarias (por lo que se expresan en tiempos cortos y cuando un organismo está en fase de adaptación) para reconocer el sustrato, particularmente con este sustrato complejo.

Esto dio paso a la secreción de quitinasas, pues estas son enzimas constitutivas y fueron necesarias para hidrolizar la quitina. Esto se constata por el aumento gradual de proteína soluble desde el inicio y hasta las 96h. A partir de este tiempo se observó un aumento considerable de la concentración de proteína soluble, llegando a su máxima velocidad de producción a las 120h (1.57mg/mL).

Comparando con la producción de biomasa se observa un descenso al principio de la fermentación llegando a su velocidad de mínima producción a las 48h (0.55mg/mL), mientras en la producción de proteínas empieza a aumentar la velocidad de producción llegando a su máxima velocidad a las 120h (1.57mg/mL). Esto nos indica que fueron liberadas proteínas contenidas en la célula disminuyendo el volumen de la biomasa, se atribuyó a que las proteínas secretadas, algunas enzimas presumiblemente pudieron acomplejarse con residuos de quitina, no dejando expuestos residuos de aminoácidos sensibles al reactivo de Bradford. Estas llegan a su máxima velocidad de producción a las 120h (1.57mg/mL), coincidiendo con la producción de biomasa donde se mantiene constante aunque en la producción de proteínas empieza a descender hasta las 216h (0.98mg/mL), donde se mantiene constante pues el hongo se mantuvo en etapa de latencia o mantenimiento, esto nos indicaría que producción de biomasa está relacionada con la producción de proteínas en el hongo, entre las proteínas secretadas se ratifica que la concentración de proteínas se debe a la presencia de lectinas, pues el hongo estaba en fase de adaptación, otras proteínas y biomoléculas que pudieron secretarse fueron glicoproteínas, exopolisacáridos ligados a proteínas, las cuales fueron necesarias para el mantenimiento del hongo.

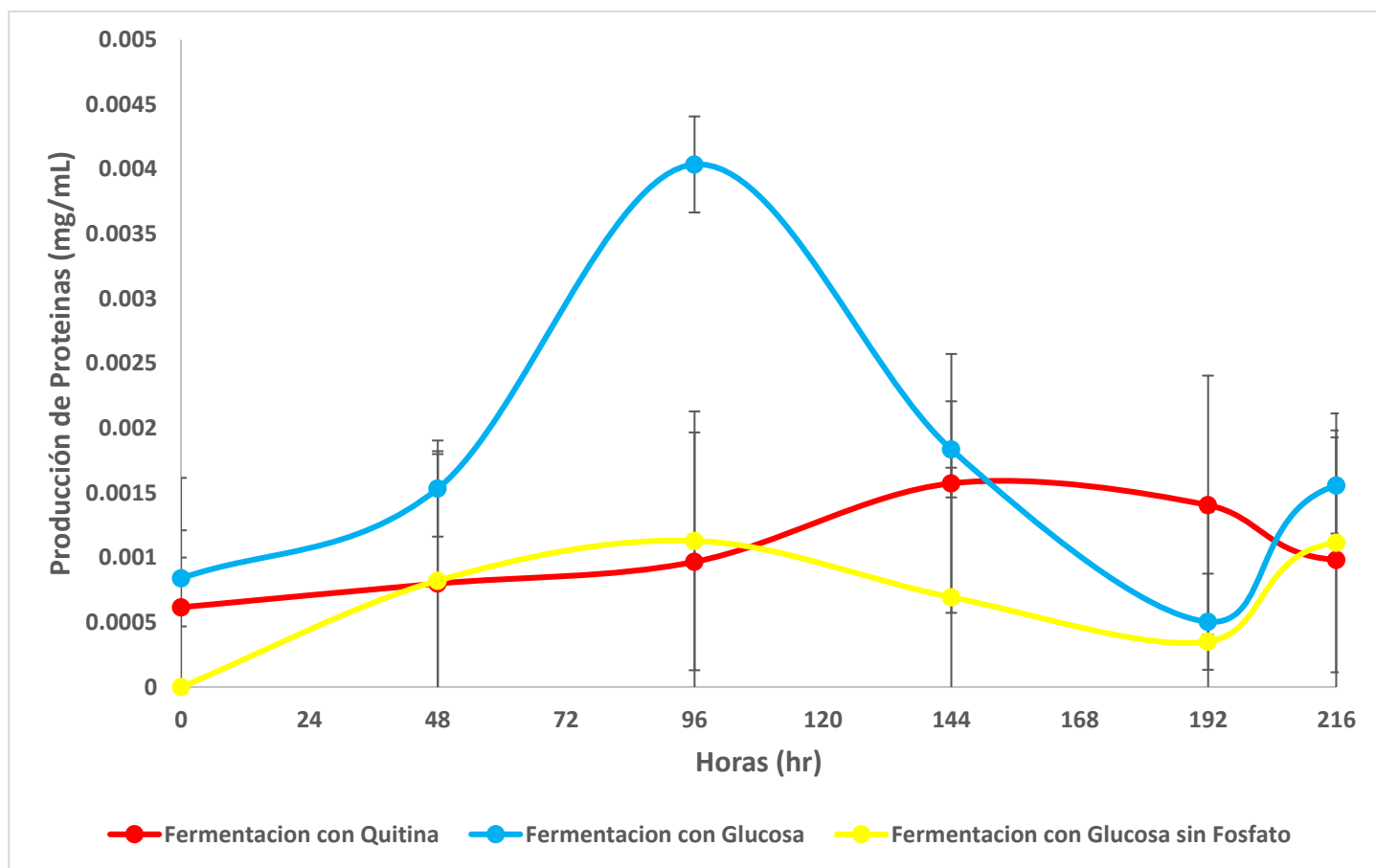


Figura 22. Proteína soluble de la cepa DMRN2. Los valores mostrados representan el promedio de dos repeticiones (Promedio $\pm$ SD).

9.3.3. Exoquitinasas

La determinación de exoquitinasas, se hizo para observar la producción de exoquitinasas de los aislados, con respecto a la fuente de carbono y entre las fermentaciones con glucosa, comparar si el fosfato tuvo un efecto significativo en este parámetro.

Por efecto de la fuente de carbono de glucosa y el efecto del fosfato se observa una mayor producción de exoquitinasas.

9.3.3.1. Fermentación con glucosa y fosfato

En la literatura consultada las exoquitinasas pueden ser de dos tipos: las quitobiosidasas (3.2.1.29) las que catalizan la liberación de la quitobiosa desde el extremo reductor de la quitina y las β -1,4-N-acetilglucosaminidasas (3.2.1.30), las cuales actúan sobre los oligómeros de las endoquitinasas y las quitobiosidasas, generando monómeros de N-acetilglucosamina (Ramírez, 2009).

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 22, línea azul), se observa cómo empezó la producción de exoquitinasas desde el tiempo inicial se detectó una concentración (0.16U/mL) de exoquitinasas, esto se atribuyó a la concentración de glucosa en el medio de fermentación. Como se ha comentado existen dos tipos de exoquitinasas, las que actúan sobre la fibra de la quitina y otras sobre los oligosacáridos producidos por las endoquitinasas.

Empezando a aumentar la velocidad de producción de exoquitinasas llegando a su máxima velocidad (0.28U/mL) a las 144h, se piensa que las exoquitinasas fueron de tipo quitobiosidasas y empezaron a hidrolizar regiones de quitina con extremos reductores presentes en las paredes de las hifas maduras, las cuales no eran en concentración muy abundantes, por tanto, las enzimas sólo se mantuvieron activas mientras la concentración de las regiones quitinosas estuvo accesible. Como resultado de su actividad, los dímeros formados no se acumularon en el medio de fermentación (pues no se muestra un incremento de azúcares reductores), sino que, de manera sinérgica, actuaron sintasas utilizando dichos dímeros para regenerar la pared. Esto se constata en la producción de la biomasa.

Se cumple también que el perfil de la actividad volumétrica de las exoquitinasas se mantiene en niveles mínimos respecto al de las endoquitinasas, ya que éstas se detectaron a concentraciones de actividad volumétrica creciente hasta las 48h.

A partir de este punto empezó a disminuir la velocidad de producción, esto se atribuye a que la concentración de exoquitinasas disminuyó debido a la concentración de glucosa la cual se empezó a producir en el medio de fermentación. Llegando a su valor mínimo (0.15U/mL) a las 216h.

Comparando con el perfil de azúcares reductores se observa como la concentración de glucosa empezó a disminuir con respecto a la producción de exoquitinasas deduciendo que la glucosa se consume con respecto a la producción de exoquitinasas debido a que se ocuparon para formar la pared celular del hongo, la cual está compuesta de oligosacaridos los cuales son moléculas complejas.

Otro factor que probablemente afectó pudo haber sido la concentración de KCl, la cual fue de 6.70×10^{-3} mol/L, inactivando la actividad volumétrica de las exoquitinasas, esto se corrobora con la literatura consultada en línea en la base de datos BRENDA (The comprehensive Enzyme Information System), la cual menciona el efecto de inhibición del KCl en concentraciones de 1 mM, donde permanece el 80% de su actividad y con 2 mM permanece el 50% de la actividad volumétrica de las exoquitinasas en la bacteria *Vibrio furnissi* (Keyhant y Roseman, 1996).

9.3.3.2. Fermentación con glucosa sin fosfato

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 22, línea amarilla), desde el tiempo inicial se detectó una concentración (0.005U/mL) de exoquitinasas.

Esto probablemente ocurrió debido a que aumento la actividad volumétrica de las exoquitinasas en el medio de fermentación, las cuales son enzimas constitutivas, degradando la quitina de los hongos y por la falta de fosfato no se logró formar adecuadamente la pared de los hongos manteniéndose la concentración de

oligosacaridos o quitobiosa en el medio de fermentación, estos se cuantifican como azúcares reductores, aumentando la actividad volumétrica de las exoquitinasas. Esto se atribuyó probablemente a que las exoquitinasas son las encargadas de sintetizar los oligosacáridos y fijarlos a la pared de la hifa, aunque en el medio de fermentación no hay fosfato para mantener los oligosacaridos en la pared de la hifa hay una expresión de exoquitinasas los cuales tratan de fijar los oligosacaridos a la pared de hifa sin tanto éxito.

Llegando a su maxima velocidad de producción (0.03U/mL) a las 192h, se observa una meseta prolongada (considerando valores promedio y desviaciones estándar), desde las 192h hasta las 216h donde empieza a disminuir la velocidad de producción de exoquitinasas, debido a que la concentración osmótica del medio de fermentación es mayor en el exterior de la célula que en el interior, obligando a la célula a absorber las enzimas al interior de la célula, comparando con el perfil de azúcares reductores se observa un consumo en la glucosa, debido a que se consumió la glucosa como energía para mantener la producción de exoquitinasas. Otra causa probable fue que las exoquitinasas son constitutivas y por su acción sinérgica a las endoquitinasas, las cuales cabe mencionar, se incrementaron linealmente desde inicio de la fermentación.

9.3.3.3. Fermentación con quitina

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 22, línea roja), se detectó desde el tiempo inicial de 0h, una concentración (0.16U/mL) de exoquitinasas, relativamente alta, a comparación de la fermentación con glucosa. Esto se atribuyó a la concentración de quitina, ya que el hongo reconoció el sustrato con proteínas que reconocieron el sustrato quitinoso, empezando a producir y expresar exoquitinasas al medio de fermentación, las cuales se encargan de degradar la quitina a sus monómeros más simples para una fácil asimilación del micelio, con los que consiguió energía para poder mantenerse a la célula fúngica, manteniéndose la producción de exoquitinasas.

Probablemente su actividad es secuencial al de las endoquitinasas, por lo que, considerando el perfil de éstas, se observaron comportamientos opuestos, es decir,

en el máximo de actividad volumétrica de las endoquitinasas, corresponde a un descenso de actividad volumétrica de las exoquitinasas.

Llegando a su máxima velocidad de producción de exoquitinasas aumentado la concentración a las 48h (0.18U/mL), se observa una meseta prolongada (considerando valores promedio y desviaciones estándar), desde las 48h hasta las 216h donde empieza a disminuir ligeramente la velocidad de producción, comparando con el perfil de azúcares reductores se observa que el consumo de quitina disminuye en relación con la producción de exoquitinasas demostrando que la quitina se degrada en relación con la concentración de exoquitinasas.

Comparando con la producción de biomasa se observa cómo empezó a disminuir la velocidad de producción a partir de las 0h (2.38g/L) llegando a su mínima producción a las 48h (0.55g/L), aunque en la producción de exoquitinasas empieza a aumentar a partir de las 0 horas (0.16µg/mL), llegando a su máxima velocidad de producción a las 96h (0.18mg/mL) donde se mantiene constante, mientras en la producción de biomasa empieza a aumentar la velocidad de producción llegando a su punto máximo a las 144h donde disminuye y llega a su punto mínimo a las 168h (3.37g/L) donde se mantiene constante. Estos nos indicaría que hubo una producción de exoquitinasas que fueron secretadas al medio de fermentación con respecto a la producción de proteínas en el medio de fermentación.

Se han encontrado actividad volumétrica de endoquitinasas en *Lecanicillium fungicola* de 410 U/mg (Ramírez y col., 2006).

No se observó una relación directa entre el perfil de esta actividad volumétrica y el de la biomasa, sin embargo, no podemos decir que no se asocie esta actividad volumétrica con el rompimiento y remodelamiento de la pared celular del hongo.

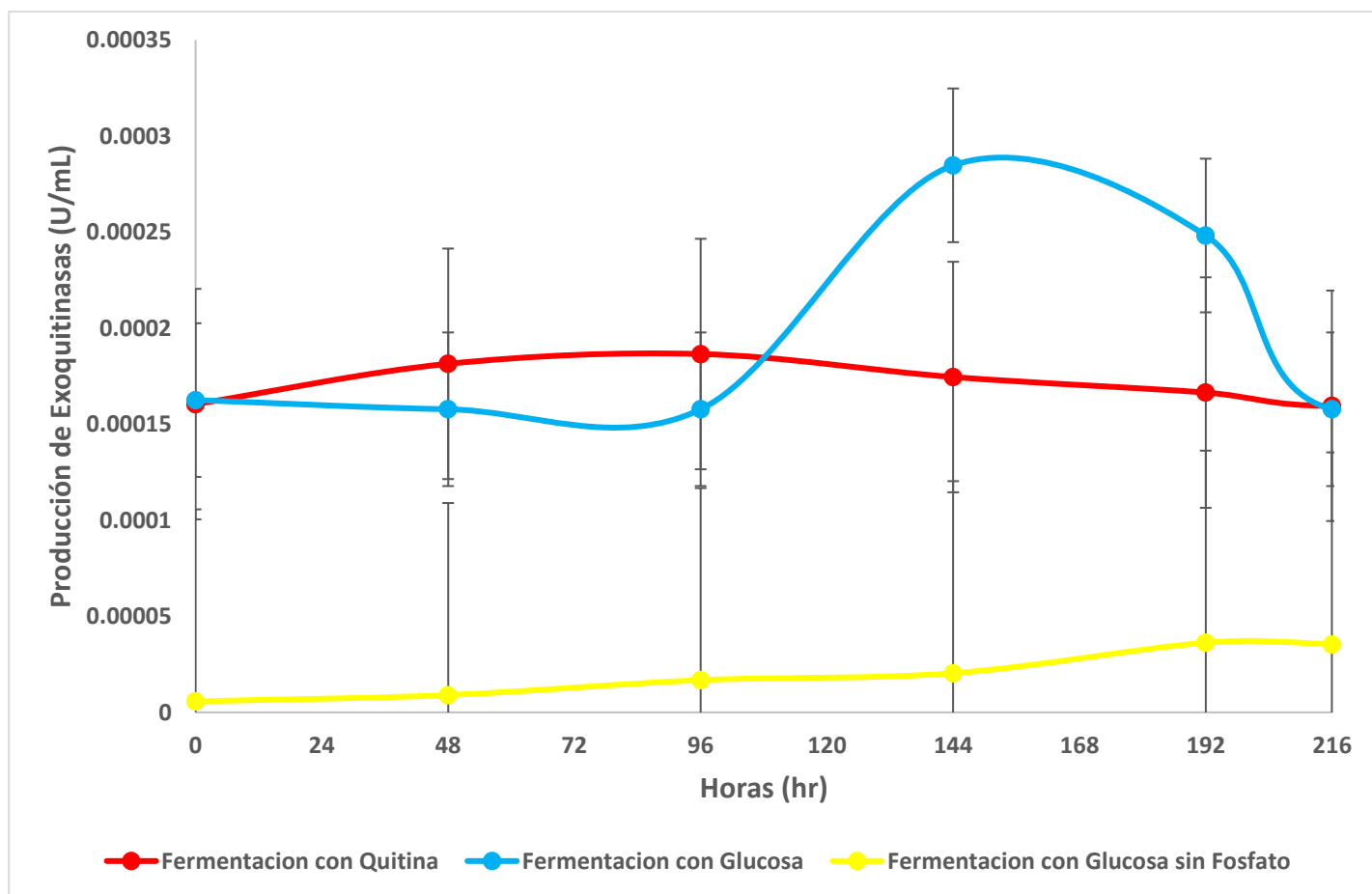


Figura 23. Exoquitinasas de la cepa DMRN2. Los valores mostrados representan el promedio de dos repeticiones (Promedio $\pm$ SD).

9.3.4. Endoquitinasas

La determinación de endoquitinasas, se hizo para observar la producción de endoquitinasas de los aislados, con respecto a la fuente de carbono y entre las fermentaciones con glucosa, comparar si el fosfato tuvo un efecto significativo en este parámetro.

Por efecto de la fuente de carbono de glucosa se observa una mayor producción de endoquitinasas.

9.3.4.1. Fermentación con glucosa y fosfato

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 23, línea azul), se observa que desde las 0h se detectó una concentración (1060U/mL) de endoquitinasas, relativamente alta, donde empieza a disminuir la velocidad de producción de endoquitinasas, debido a que la concentración osmótica del medio de fermentación es mayor en el exterior de la célula que en el interior, obligando a la célula a absorber las enzimas al interior de la célula por la concentración osmótica presente en el medio de fermentación, comparando con el perfil de azúcares reductores se observa un consumo en la glucosa, debido a que se consume la glucosa como energía para mantener la producción de endoquitinasas.

Esto se debió a que el hongo empezó a expresar genes para la síntesis de enzimas quitinolíticas encargadas del rompimiento de la quitina de la pared celular, liberando presumiblemente oligosacáridos y quitodextrinas al medio de fermentación. En el hongo macroscópico *Amanita muscaria*, se ha descrito la liberación de oligosacáridos a partir de la escisión de la pared celular, evidenciándose la presencia de éstos en el medio de fermentación, mediante el método de Miller (Mucha y col.,2006). Sin embargo, en este trabajo, consideramos que dos cosas pudieron suceder, los oligosacáridos se liberaron a concentraciones menores al mínimo detectable por la técnica, o bien, estos productos de degradación de la pared, se encontraban acetilados y fueron utilizados en el remodelamiento de la misma, observándose un descenso en la concentración de azúcares reductores.

Se han encontrado reportes de la liberación de oligosacáridos durante la maduración de las hifas en *Aspergillus nidulans*, demostrando que la síntesis de quitina tiene un rol importante en la maduración (Yamazaki y col.,2008).

La propuesta del remodelamiento se constata, además, con el aumento en la producción de biomasa durante las primeras 24h, esto se corrobora con el consumo de azúcares reductores desde el principio de la fermentación, se atribuye a que la glucosa es consumida para el desarrollo de la pared celular de los hongos, reduciéndose en el medio líquido a una concentración relativamente constante.

Llegando a su velocidad mínima a las 48h (80U/mL), esto se atribuyó a la concentración osmótica del medio de fermentación siendo mayor en el exterior de la célula que en el interior, obligando a la célula a absorber las enzimas al interior de la célula debido a la concentración osmótica presente en el medio de fermentación, comparando con el perfil de azúcares reductores se observa un consumo en la glucosa, debido a que se consume la glucosa como energía para mantener la producción de endoquitinasas.

Para explicar este descenso, se parte de la idea de que las endoquitinasas requieren una secuencia mínima de unidades acetiladas en un oligosacárido o sustrato, así como una longitud mínima de dicho oligosacárido para ser considerado como sustrato y ser activas. De acuerdo a la literatura consultada en línea en la base de datos BRENDA (The comprehensive Enzyme Information System), estas enzimas en *Trichoderma harzianum* requieren por lo menos dos secuencias acetiladas y una longitud mínima de tres unidades para tener actividad (De la Cruz y col., 1992). Corroborando esto, se ha estudiado la capacidad inhibitoria de la alosamidina (ver Anexo G) en las quitinasas (recombinante y natural) de *Saccharomyces cerevisiae* ($K_i=0.61\pm0.02\mu\text{M}$), atribuyéndose la inhibición a que posee dos secuencias acetiladas unidas a una alfa-D-glucopiranososa unida a un delta dos primas tiazolin (Hurtado y van Aalten, 2007). Por tanto, en esta etapa la disminución de la actividad volumétrica se atribuye a la presencia de oligosacáridos de dos unidades los cuales estuvieron acetilados y estaban ocupando el sitio activo en estas enzimas.

Otra causa es que, los oligosacaridos producidos por la lisis de la pared si tenían la longitud adecuada pero no había una secuencia dimérica acetilado.

Cabe recalcar que en esta etapa los azúcares reductores siguieron disminuyendo, porque la glucosa se asimiló para la síntesis de la pared celular (la biomasa se siguió incrementando), pero dicha asimilación no ocurrió por parte de las endoquitinasas.

Empezando a aumentar la velocidad de producción de endoquitinasas a las 96h (3700U/mL), llegando a su maxima concentración en el medio de fermentación. A partir de este punto empieza a disminuir, esto se atribuye a que la concentración de endoquitinasas disminuyo debido a la concentración de glucosa la cual se empezó a producir en el medio de fermentación, llegando a su mínima velocidad de producción a las 144h (240U/mL).

Volviendo a aumentar la velocidad de producción de endoquitinasas llegando a su máxima velocidad a las 216h (4700U/mL). Empezando a disminuir, esto se atribuye a que la concentración de endoquitinasas disminuyo debido a la concentración de glucosa la cual se empezó a producir en el medio de fermentación.

Comparando con el perfil de azucares reductores se observa como la concentración de glucosa empezó a disminuir con respecto a la producción de endoquitinasas deduciendo que la glucosa se consume con respecto a la producción de endoquitinasas debido a que se ocuparon para formar la pared celular del hongo.

9.3.4.2. Fermentación con glucosa sin fosfato

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 23, línea amarilla), se observa que la velocidad de producción de endoquitinasas fue lenta desde la hora 0. Llegando a su maxima velocidad de producción a las 240h (700U/mL) donde empieza a disminuir la concentración, esto se atribuyó a la heterogeneidad del inóculo, es decir, en la solución del inóculo había hifas jóvenes, hifas maduras y esporas, y las endoquitinasas se activaron muy probablemente porque detectaron en la pared celular de esas hifas o en las esporas, presencia de quitina o regiones acetiladas, en mayor proporción que en el inóculo empleado en la fermentación con glucosa y fosfato.

Por otra parte, estas enzimas escindieron dichas paredes, para renovación de las mismas intentando alcanzar un grado diferente de madurez, sin embargo, por la falta de fosfato no se logró formar adecuadamente la pared celular, esto se evidencia en la producción de biomasa, la cual fue menor que con las otras fermentaciones.

Debido a que la concentración osmótica del medio de fermentación es mayor en el exterior de la célula que en el interior, obligando a la célula a absorber las enzimas al interior de la célula debido a la concentración osmótica presente en el medio de fermentación, comparando con el perfil de azúcares reductores se observa un consumo en la glucosa, debido a que se consume la glucosa como energía para mantener la producción de endoquitinasas, no logrando sintetizar los oligosacáridos complejos para la pared celular.

A partir de este punto empieza a disminuir hasta su mínima velocidad de producción a las 96h donde no se produce, empezando una velocidad de mínima producción a las 144h (100 U/mL), empezando a aumentar la velocidad de producción a su máxima velocidad a las 216h (700 U/mL).

No obstante, esta disminución no fue tan drástica como para considerar estas enzimas inactivas, pero se atribuye a que como no se pudo formar pared celular o micelio, el hongo recurrió a la formación de esporas. Cabe mencionar que como las esporas están compuestas de una capa externa de quitosano (menos del 50% de grupos acetilados), el pequeño porcentaje acetilado pudo haber tenido las características necesarias de longitud y secuencias acetiladas, para ser detectado por el sitio activo de estas enzimas y por ende seguir activas. En este periodo se observó disminución de la biomasa a valores cercanos a cero, lo que confirmaría la formación de esporas, las cuales no se pudieron detectar por la técnica de biomasa, por el tamaño de poro del filtro empleado (las esporas tenían un diámetro aprox de 1 μ m y el tamaño de corte del filtro fue de 20-25 μ m).

Considerando que se habían producido esporas desde la etapa anterior, se supone además que éstas estaban en estado de dormancia, el cual procede por condiciones adversas (falta de fosfato y de potasio) y se caracteriza por no presentar gastos energéticos.

Esto probablemente se debió a que el hongo empezó a formar la pared celular, pero por la falta de fosfato no se logró formar adecuadamente, dejando oligosacaridos en el medio de fermentación y cuantificándose como azúcares reductores, esto se ha demostrado en la lisis con hongos macroscópicos del género *Amanita*, *Laccaria* y *Suillus* para la determinación de endoquitinasas con el método de Miller (Mucha y col.,2006).

Por efecto de la ausencia del fosfato en el medio se atribuye una mayor actividad volumétrica de endoquitinasas, permitiendo su secreción, probablemente, porque son dependientes de fosfato, y en el interior celular su actividad hidrolítica sobre la pared celular fue inhibida, por lo tanto, al ser constitutivas se produjeron, pero por la falta de fosfato fueron secretadas al medio de fermentación, lo cual fue evidente, porque se observa una correspondencia entre los perfiles de biomasa y el de actividad de esta enzima. Esto se constata también apreciando el perfil de azúcares reductores, debido a que se consumió la glucosa como energía para mantener la actividad volumétrica de endoquitinasas a niveles constitutivos. Cabe la posibilidad que el hongo consiguió el fosfato de la ruta biosintética de los alcaloides, los cuales produjeron un colorante diferente al que producen, manteniendo una elevada concentración y expresión de endoquitinasas en el medio de fermentación, funcionando como un mensajero químico que promueve el crecimiento del hongo.

9.3.4.3. Fermentación con quitina

En el perfil mostrado en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato (Fig. 23, línea roja), se observa que la concentración de endoquitinasas, desde el tiempo inicial se detectó una concentración (380U/mL) de endoquitinasas, relativamente alta, en comparación de la fermentación con glucosa. Esto se atribuyó a la concentración de quitina, ya que el hongo reconoció el sustrato con lectinas, expresando endoquitinasas degradando la quitina a sus monómeros más simples para ser absorbidos por la célula fúngica con los que consiguió energía para poder mantener a la célula, empezando a aumentar la velocidad de producción de endoquitinasas llegando a su maxima concentración a las 48h (800U/mL) observándose una meseta prolongada (considerando valores promedio y

desviaciones estándar), desde las 48h hasta las 216h donde empieza una velocidad de producción lenta tendiendo a disminuir, comparando con el perfil de azúcares reductores se observa que el consumo de quitina disminuyó en relación a la producción de endoquitinasas demostrando que la quitina se degradó en relación a la concentración de endoquitinasas. Por la presencia de quitina, el hongo reconoció mediante proteínas de reconocimiento este sustrato, empezando a expresar y secretar al medio endoquitinasas, las cuales se encargaron de hidrolizar de manera aleatoria la quitina en fragmentos, sobre los cuales las exoquitinasas se hidrolizaron secuencialmente dando energía al hongo para poder mantener a la célula. Hay reportes de la actividad volumétrica de endoquitinasas de *Coprenillus congregatus* el cual fue de 0.55 U/mL (Lim y Choi, 2009).

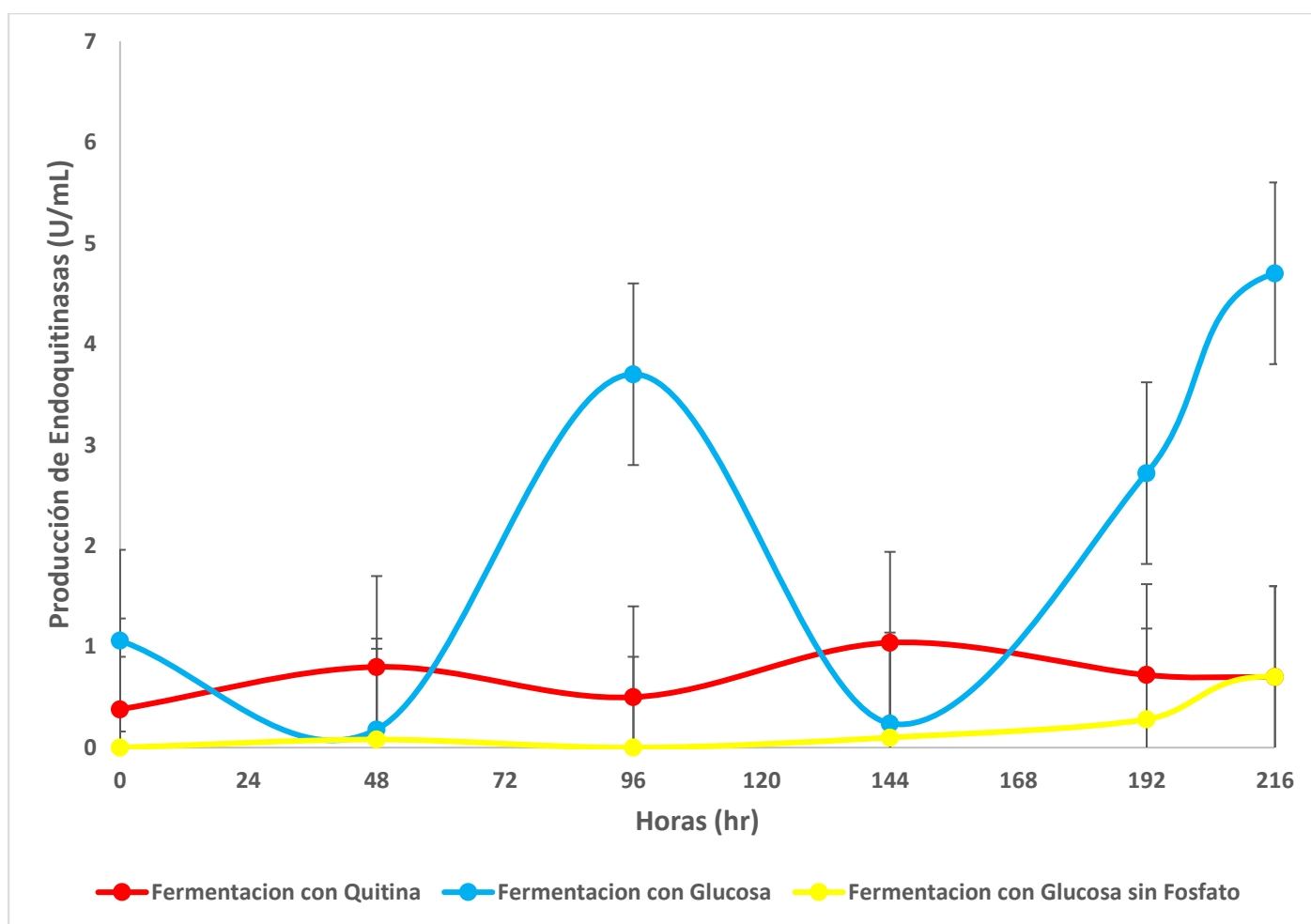


Figura 24. Endoquitinasas de la cepa DMRN2. Los valores mostrados representan el promedio de dos repeticiones (Promedio $\pm$ SD).

9.3.5. Prueba colorimétrica del aislado DMRN2 realizada en las fermentaciones

Se observa en la tabla 14 la producción de alcaloides indólicos producidos durante nueve días. Cabe destacar que los alcaloides indólicos son producidos por los hongos del género *Psilocybe*, cualquier cambio de color demostraría la producción de un alcaloide diferente mostrando un cambio en la ruta metabólica de los alcaloides indólicos y por ende se demostraría el efecto de la fuente de carbono o el efecto del fosfato contenido en el medio de fermentación.

Como se observa en la tabla 14, en la fermentación con una fuente de carbono de glucosa se ve una producción de alcaloides indólicos a partir de las 0h manteniéndose hasta las 48h, empezando a aumentar la producción de los alcaloides indólicos mostrando un cambio de color a las 72h, el cual vuelve a cambiar a las 120h y volviendo a cambiar a las 168h, mostrando una coloración más intensa en comparación a las otras dos fermentaciones, se considera la producción de un análogo de la psilocibina por el aislado DMRN2 considerando que la psilocibina dio una coloración azulácea, mientras en la fermentación con glucosa sin fosfato no hubo un cambio de color aparente solo se observa que se mantuvo hasta las 216h, esto nos indica que la falta de fosfato afectó en la ruta metabólica de la psilocibina inhibiendo su producción. Mientras en la fermentación con quitina no hubo un cambio aparente el cual muestre la producción de algún tipo de alcaloide indólico. Esto nos indica que la fuente de carbono de quitina afectó la síntesis de los alcaloides, indicando una inhibición o ausencia de la producción de éstos en el medio de fermentación.

En la literatura se han estudiado los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos (Sánchez y col., 2013). Estos se han estudiado como pigmentos producidos por diferentes hongos teniendo diferentes estructuras que les confieren características únicas las cuales se han estudiado y que pueden ser alcaloides, quinonas, flavonoides, antocianinas, flavonoides, carotenoides, terpenos u otros pigmentos los cuales dan coloraciones características.

También se ha mejorado la producción de pigmentos optimizando las diferentes condiciones requeridas para el crecimiento y desarrollo de los hongos.

Como ejemplo se tiene la producción de pigmentos con hongos del género *Monascus sp.* en medio agar papa dextrosa (PDA) y agar extracto de malta (MEA), aunque la producción de pigmentos depende de las condiciones de cultivo, también produce citrinina la cual es una toxina fúngica (Atenas, 2014).

Se ha mejorado la producción de pigmentos con el hongo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* en medio sólido variando la fuente de carbono, siendo la mayor producción en agar papa dextrosa (Cruz y col.2015).

Esto nos da la pauta para decir que los diferentes pigmentos obtenidos durante la fermentación son alcaloides indólicos, los cuales presentan similitudes entre ellos, dándonos diferentes colores que son mostrados a continuación.

Tabla 14. Detección de alcaloides por la prueba colorimétrica en las fermentaciones realizadas con el aislado DMRN2 durante nueve días.

0	24	48	72	96	120	144	168	192	216	
										Con glucosa y fosfato
										Con glucosa sin fosfato
										Con quitina

9.4. Análisis estadístico para determinar el efecto de la fuente de carbono y del fosfato, sobre las quitinasas de los aislados DMRN1 Y DMRN2.

En este análisis, se muestran gráficas de cajas (Box Plot) con el objetivo de visualizar mejor los efectos. El ANOVA (ver Anexo J) permitió reforzar y definir la magnitud de dichos efectos.

9.4.1 Aislado DMRN1.

9.4.1.1 Efecto de la fuente de carbono.

En el caso de las Endoquitinasas (Figs. 25 a, b y c), fue contundente y favorable, el efecto de utilizar quitina como fuente de carbono, ya que no se detectó actividad cuando se empleó glucosa. Respecto a la actividad volumétrica (Fig. 25a), se observó un perfil de tipo sigmoide, con un valor máximo cercano a 1.2U/mL obtenido a las 96h (considerando el valor medio de las cajas). Transformados los datos a actividad específica (Fig. 25b), el perfil fue de incremento gradual hasta las 96 h, un descenso a las 120h y un nuevo incremento para alcanzar el mayor valor (7000U/mg) a las 144h, lo que indicaría que la proteína total disminuyó en este tiempo, cabe mencionar que este valor es el que más dispersión tuvo (amplitud de la caja). Al transformar a datos de productividad (Fig. 25c), se observó un perfil tipo gaussiano de decrecimiento, con el máximo valor ($\approx 12\text{U/mL}\cdot\text{h}$) a las 48h, esto indicaría que a este tiempo sería conveniente hacer el proceso de extracción. En el caso de las Exoquitinasas, la actividad volumétrica y la productividad (Figs. 25 d y f) se vieron favorecidas empleando glucosa en el medio. Los valores máximos alcanzados para éstas fueron $2.375 \times 10^{-4} \text{ U/mL}$ y $0.0046\text{U/mL}\cdot\text{h}$ respectivamente y a las 48h. Es notable que son idénticos los perfiles de productividad de exoquitinasas con quitina o con glucosa (Fig.25f). También es notorio que, el perfil de actividad específica de exoquitinasas (Fig.25e) con quitina, es muy similar al obtenido para endoquitinasas con esta fuente de carbono.

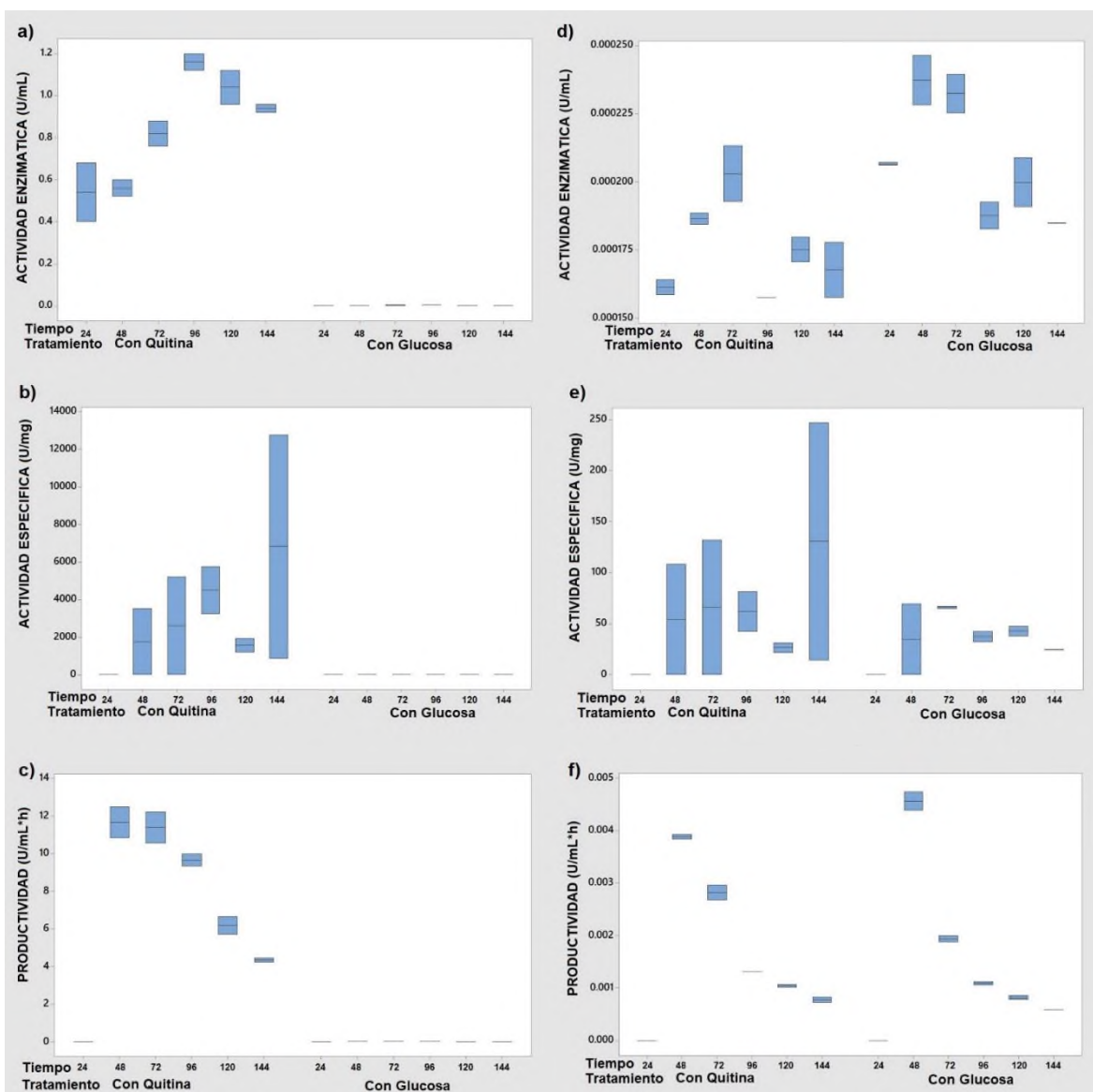


Figura 25. Efecto de la fuente de carbono sobre enzimas quitinolíticas en el aislado DMRN1. (a) Actividad volumétrica, (b) Actividad Específica y (c) Productividad de **Endoquitinasas**; (d) Actividad volumétrica, (e) Actividad Específica y (f) Productividad de **Exoquitinasas**.

Del análisis de varianza (ver Anexo J), se deduce que la fuente de carbono tuvo mayor efecto sobre la Productividad y sobre las Endoquitinasas, esto considerando los valores de F y R^2 , mostrados en las tablas 24-26. La mejor fuente de carbono para extraer Exoquitinasas fue glucosa, mientras que para Endoquitinasas fue quitina. En ambas, el mejor tiempo fue a las 48h.

9.4.1.2 Efecto del fosfato.

La ausencia de fosfato en el medio de fermentación (con glucosa) produjo en ambas enzimas un efecto marcadamente positivo. En el caso de las Endoquitinasas, la mayor actividad volumétrica ($\approx 4 \text{ U/mL}$) se detectó a las 120h (Fig. 26a), sólo se detectó actividad específica (Fig.26b) a las 96h ($60,000 \text{ U/mg}$) y la mayor productividad ($\approx 150 \text{ U/mL}\cdot\text{h}$) se cuantificó nuevamente a las 48h (Fig.26c). Estos valores máximos comparados con los mejores obtenidos en la fermentación con quitina (Figs.25 a, b y c), fueron 3 veces mayor para la actividad volumétrica, 10 veces mayor para la actividad específica y 12.5 veces mayor para la productividad. No hubo un perfil característico en estas tres imágenes.

Respecto a las Exoquitinasas, la mayor actividad volumétrica ($2.6 \times 10^{-4} \text{ U/mL}$) se cuantificó a las 48h (Fig.26 d), sólo se detectó actividad específica ($\approx 2500 \text{ U/mg}$) a las 96h (Fig.26e) y la mayor productividad ($0.011 \text{ U/mL}\cdot\text{h}$) se detectó a las 48h (Fig.26f). Es notable que los perfiles de productividad de exoquitinasas con y sin fosfato, son idénticos entre sí, y también con respecto al efecto de la fuente de carbono (Fig. 25f), pues son de decrecimiento exponencial.

Cabe mencionar que los valores de actividad volumétrica, actividad específica y de productividad para las Exoquitinasas en ausencia de fosfato, fueron 1.1, 20 y 2.4 veces mayores respectivamente, a los valores máximos obtenidos evaluando el efecto de la fuente de carbono sobre estas enzimas.

Del análisis de varianza, se deduce que en este aislado, la ausencia del fosfato tuvo mayor efecto sobre las Exoquitinasas y en particular sobre la Actividad Específica. Igualmente, para determinar cuál efecto (fuente de carbono o del fosfato) fue más remarcado, comparamos nuevamente los valores de F y R^2 , mostrados en las tablas 27-29 del Anexo J, considerándose que la Ausencia del Fosfato sobre la actividad específica fue más preponderante y efectiva.

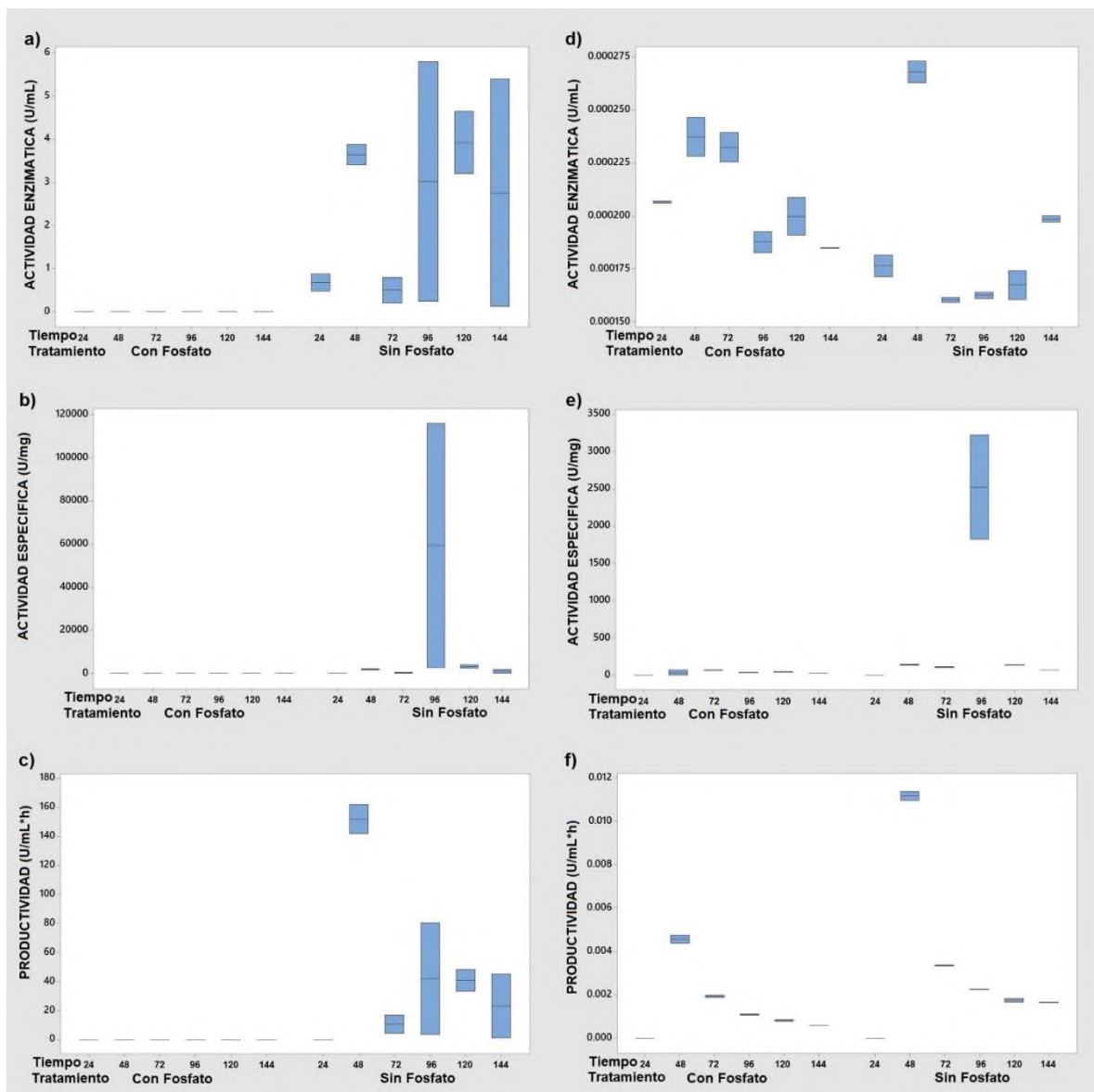


Figura 26. Efecto del fosfato sobre enzimas quitinolíticas en el aislado DMRN1.

(a) Actividad volumétrica, (b) Actividad Específica y (c) Productividad de **Endoquitinasas**; (d) Actividad volumétrica, (e) Actividad Específica y (f) Productividad de **Exoquitinasas**.

9.4.2 Aislado DMRN2.

9.4.2.1 Efecto de la fuente de carbono.

Con este aislado, la Actividad Enzimática y la Productividad de las Endoquitinasas se vieron favorecidas por el empleo de glucosa como fuente de carbono, particularmente a partir de las 72h. La actividad enzimática (Fig. 27a) desde las 96h sigue un perfil logarítmico, alcanzando el valor máximo (5.5 U/mL) a las 192h. La Productividad de Endoquitinasas (Fig. 27c) no tiene un perfil característico, pero alcanza el máximo ($\approx 37.5 \text{ U/mL} \cdot \text{h}$) a las 72h, pudiendo ser éste el tiempo recomendable para la extracción de estas enzimas. Los valores máximos de Actividad enzimática y de Productividad obtenidos con glucosa, fueron 5.5 y 2.1 veces mayores que los máximos obtenidos con quitina.

Respecto a las Exoquitinasas, el empleo de quitina como fuente de carbono tuvo un efecto favorable, particularmente sobre la Actividad Específica (Fig. 27e) alcanzando el valor máximo ($\approx 500 \text{ U/mg}$) a las 72h y sobre la Productividad (Fig. 27f), la cual alcanzó su máximo valor ($\approx 0.00325 \text{ U/mL} \cdot \text{h}$) a las 48h, aunque los valores en este último parámetro fueron muy cercanos a los obtenidos con glucosa en el medio. Los valores máximos de actividad específica y productividad de exoquitinasas en el medio con quitina, fueron 33.3 y 1.125 veces mayores respectivamente a los obtenidos en el medio con glucosa. En contraste, el valor máximo de Actividad volumétrica o enzimática (Fig. 27d) empleando glucosa fue 1.5 veces mayor respecto al máximo obtenido con quitina. Cabe mencionar que, el perfil obtenido para la productividad de las Exoquitinasas con este aislado, es exponencial decreciente, independientemente de la fuente de carbono que se trate, y es el mismo al observado para las Exoquitinasas del aislado DMRN1.

Del análisis de varianza (tablas 30-32), la fuente de carbono afectó preponderantemente a la Actividad Enzimática, Actividad Específica y Productividad de Endoquitinasas, mientras que el tiempo de fermentación (C2), fue la variable que más afectó favorablemente a las Exoquitinasas en lo que a Actividad específica se refiere (Tabla 31), todo esto comparando los valores de F y R^2 .

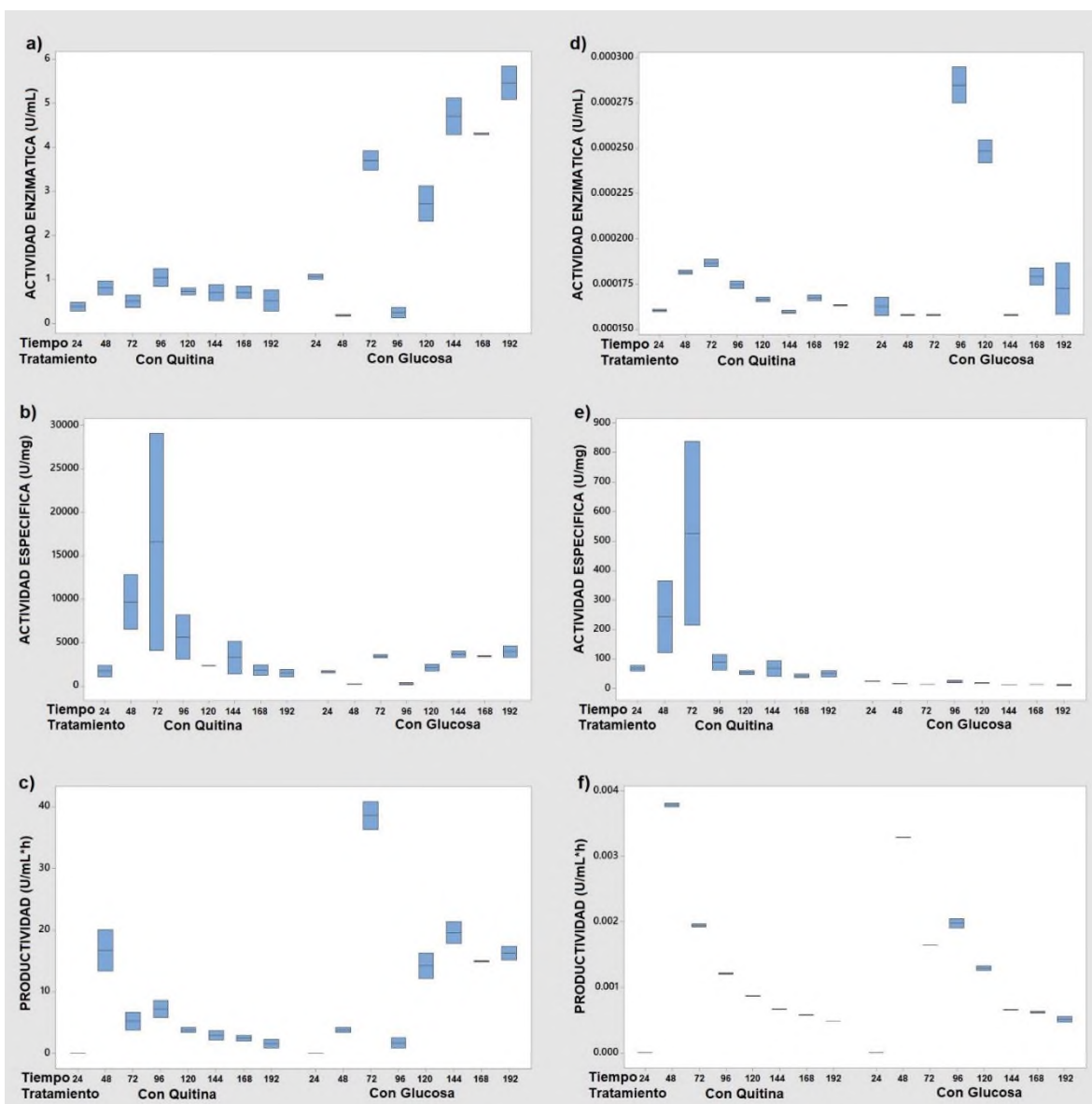


Figura 27. Efecto de la fuente de carbono sobre enzimas quitinolíticas en aislado DMRN2. (a) Actividad volumétrica, (b) Actividad Específica y (c) Productividad de **Endoquitinases**; (d) Actividad volumétrica, (e) Actividad Específica y (f) Productividad de **Exoquitinases**.

9.4.2.2 Efecto del fosfato.

La presencia de fosfato en el medio, fue favorable para la expresión de Endoquitinasas y Exoquitinasas. En el caso de las Endoquitinasas, en la Figura 28a se observa que no hay un perfil definido para la Actividad Enzimática en el medio con fosfato y el valor máximo alcanzado ($\approx 5.5 \text{ U/mL}$) a las 192h, fue 11 veces mayor al máximo alcanzado a las 144h en el medio sin fosfato, en este medio el perfil parece ser tipo gaussiano. En lo que a Actividad específica de Endoquitinasas se refiere, tampoco hay perfil identificable y el máximo ($\approx 4000 \text{ U/mg}$) coincide en alcanzarse a las 192h. Este valor máximo fue apenas 1.3 veces mayor al máximo obtenido en el medio sin fosfato a las 120h. Para la Productividad de endoquitinasas (Fig. 28c), el valor máximo alcanzado a las 72h en el medio con fosfato, fue 5 veces mayor al máximo alcanzado a las 144h en el medio sin fosfato.

En las Exoquitinasas, la presencia de fosfato sobre la Actividad enzimática (Fig. 28d) fue favorable y notoria, el máximo alcanzado (0.00028 U/mL) a las 96h, fue 7 veces mayor que el máximo alcanzado en el medio sin fosfato a las 144h. La Productividad (Figura 28f) también se vió favorecida por la presencia de fosfato, el máximo ($0.00325 \text{ U/mL}\cdot\text{h}$) alcanzado a las 48h, fue 8 veces mayor al máximo alcanzado a las 144h en el medio sin fosfato. Cabe mencionar en el caso de la Actividad específica de exoquitinasas, que aunque la gráfica de caja muestra un valor medio mayor en el medio sin fosfato, hay que considerar la dispersión de los resultados (por la amplitud de la caja), por lo que la prueba de Fisher (valor F) es más indicativa del efecto.

Del análisis de varianza, la presencia de fosfato tuvo mayor efecto sobre la Actividad Enzimática, la Actividad Específica y la Productividad de Exoquitinasas, considerando los valores de F y R^2 (tablas 33-35). Para determinar cuál efecto (fuente de carbono o fosfato) fue más remarcado, comparamos nuevamente los valores de F y R^2 , tablas 30-35 (Anexo J), estableciendo que la Presencia del Fosfato sobre la Actividad enzimática y la Productividad fue más preponderante y efectiva.

Fue notorio en las gráficas de cajas, a lo largo de todo el análisis estadístico para los dos aislados, que los valores referentes a Productividad de Exoquitinasas, presentaron un mismo patrón de decrecimiento exponencial y los valores mostrados fueron los menos dispersos. Este parámetro (Productividad) resulta un mejor indicativo sobre en qué tiempo y bajo qué medios, se puede producir una enzima en particular.

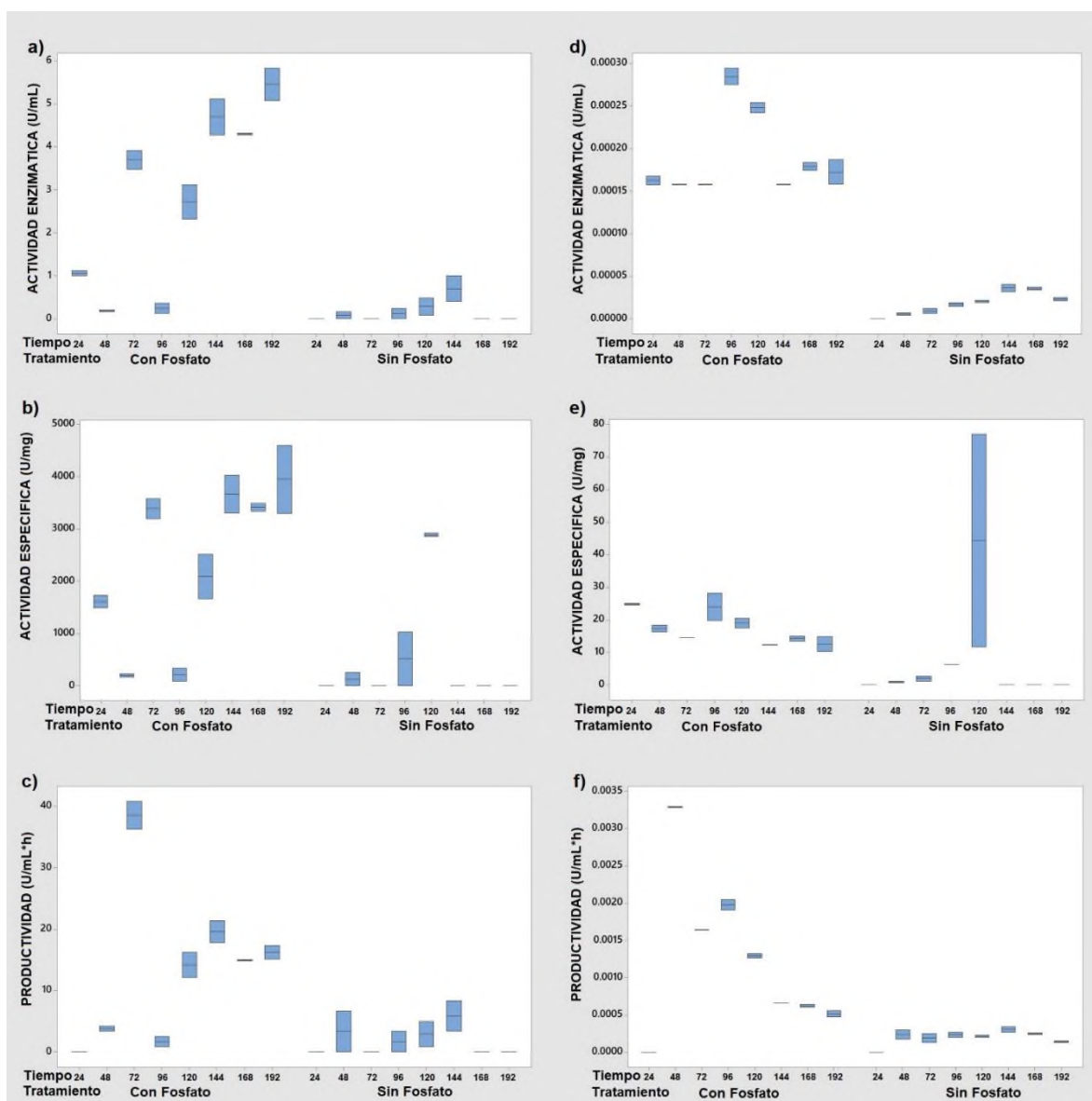


Figura 28. Efecto del fosfato sobre enzimas quitinolíticas en aislado DMRN2. (a) Actividad volumétrica, (b) Actividad Específica y (c) Productividad de **Endoquitinasas**; (d) Actividad volumétrica, (e) Actividad Específica y (f) Productividad de **Exoquitinasas**.

10. CONCLUSIONES

De los seis aislados obtenidos, dos mostraron colorimétricamente, una mayor concentración de alcaloides indólicos (DMRN1 y DMRN2), mismos que fueron utilizados en las fermentaciones líquidas para evaluar el efecto de dos fuentes de carbono y el efecto del fosfato sobre la expresión de quitinasas y alcaloides.

En el aislado DMRN1 la fuente de carbono tuvo mayor efecto sobre la Productividad y sobre las Endoquitinasas. La mejor fuente de carbono para extraer Exoquitinasas fue glucosa, mientras que para Endoquitinasas fue quitina. En ambas enzimas, el mejor tiempo de extracción serían las 48h. En este aislado, la **ausencia** del fosfato tuvo un mayor efecto favorable sobre las Exoquitinasas y en particular sobre la Actividad Específica. En **ausencia** de fosfato ambas enzimas se extraerían con mayor productividad a las 48h.

En el aislado DMRN2, la Actividad Enzimática y la Productividad de Endoquitinasas se vieron favorecidas por el empleo de glucosa como fuente de carbono, en tanto que el empleo de quitina, tuvo un efecto favorable, en las Exoquitinasas, particularmente sobre la Actividad Específica y la Productividad. Ambas enzimas se pueden extraer a las 48h. La **presencia** de fosfato tuvo mayor efecto sobre la Actividad Enzimática, la Actividad Específica y la Productividad de Exoquitinasas. En **presencia** de fosfato, las exoquitinasas se extraerían a las 48h y las endoquitinasas a las 72h con mayor productividad.

El fosfato tuvo estadísticamente, un efecto más remarcado y favorable, sobre la expresión de ambas enzimas, en comparación al efecto de la fuente de carbono.

11. PERSPECTIVAS

Las perspectivas generadas durante la elaboración de este proyecto son: la generación de conocimiento que se tiene con respecto a los hongos basidiomicetos y de forma particular a los hongos del género *Psilocibe* los cuales por su uso clandestino e indiscriminado como drogas alucinógenas son mal vistos por la sociedad, generando un temor y desconocimiento de las posibles aplicaciones que podría tener la investigación de estos hongos.

Además, se plantea la optimización del medio de fermentación para obtener la máxima producción posible de quitinasas (endoquitinasas y exoquitinasas) y de otras enzimas de interés industrial.

Así como estudiar el sustrato a diferentes concentraciones para el medio de fermentación líquido para la producción de quitinasas y otras enzimas.

También sería necesario estudiar los diferentes factores que afecten el desarrollo del hongo como el tipo de agitación, humedad, aireación, pH, luz, temperatura, presión y oxígeno que modifique la cinética de crecimiento.

Estudiar la producción de quitinasas y otras enzimas de interés industrial en los diferentes estadios de crecimiento en los hongos del género *Psilocybe* entre los que destaca el micelio monocariótico y micelio dicariótico, aplicando ciertas estrategias. Se estudiaría la inhibición de alcaloides en los hongos del género *Psilocybe* con diferentes inhibidores a diferentes concentraciones.

Se purificarían las endoquitinasas y exoquitinasas obtenidas en la fermentación, para poder estudiar con más detalle su estructura y función, así como las cinéticas enzimáticas y de inhibición.

12. REFERENCIAS

1. Adams, M., Christen, M., Plitzko, I., Zimmermann, S., Brun, R., Kaiser, M. & Hamburger, M. (2010). Antiplasmodial Lanostanes from the *Ganoderma lucidum* Mushroom, *Journal Nat. Prod.*, 73(5), 897-900.
2. Amaral, C. L. C., Gomes, M. K. M., Matheus, D. R. & Cardoso, A. V. (2007).
3. Immobilization of *Psilocybe castanella* on ceramic (slate) supports and its potential for soil bioremediation, *World J Microbiol Biotechnol*, 23, 1479–1483.
4. Anastos, N., Barnett, N. W., Pfeffer, F.M. (2006). Investigation into the temporal stability of aqueous standard solutions of psilocin and psilocybin using high performance liquid chromatography, *Science & Justice*, 46, 91-96.
5. Ardon, O., Kerem, Z. & Bonugli-Santos, Y. (1996). Enhancement of lactase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract, *Journal of Biotechnology*, 51, 201-207.
6. Basil, B. X., Vivian P. W. M., Zophonias, O. J., Olafur, S. A. (2012). Mitochondrial genomes from the lichenized fungi *Peltigera membranacea* and *Peltigera malacea*: Features and phylogeny, *Fungal Biology*, 116, 802-814.
7. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 722, 248-254.
8. Bremner, J. M. (1960). Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *The Journal of Agricultural Science*, 55, 11-33.
9. Binod, P., Pusztahelyi, T., Nagy, V., Sandhya, C., Szakács, G., Pócsi, I. & Pandey, A. (2005). Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 880-887.
10. Bonfante-Fasolo P., Faccio A., Perotto S. & Schubert A. (1990). Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycological Research*, 94, 157-165.
11. Bonugli-Santos, R. C., Durrant, L. R. & Sette, L. D. (2010). Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived Basidiomycetes, *Fungal Biology*, 114, 863-872.

12. Buswell, J. & Chang, S. (1994). Biomass and extracellular hydrolytic enzyme production by six mushroom species grown on soybean waste, *Biotechnology Letters*, 1317-1322.
13. Buswell, J.A., Cai, Y.J., Chang, S.T., Peberdy, J.F., Fu, S.Y. & Yu, H.S. (1996). Lignocellulolytic mushroom fungi enzyme profiles of edible, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 537-542.
14. Calonje, M., Garcia, M. C., Galan, B. & Novaes-Ledieu, M. (1997). Enzymic activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *Agaricus bisporus* fruit body cell walls, *Microbiology*, 143, 2999-3006.
15. Chang, Y. S. & Mills, A. K. (1992). Re-examination of *Psilocybe subaeruginosa* and related species with comparative morphology, isozymes and mating compatibility studies. *Mycol. Res.*, 96, 429-441.
16. Crowther, T. W., Jones, T. H., Boddy, L. & Baldrian, P. (2011). Invertebrate grazing determines enzyme production by basidiomycete fungi, *Soil Biology & Biochemistry*, 46, 2060-2068.
17. Deshpande, M. V. (1986). Enzymatic degradation of chitin and its biological applications, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 45, 273-281.
18. Dragt, J., W., Gells, F. P., De brujin, C. & Van Griensven, L. J. D. (1996). Intracellular infection of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* by the mycoparasite *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Mycol. Res.*, 100, 1082-1086.
19. Dutta Rajiv, (2008). Fundamentals of Biochemical Engineering, *Springer*, India, 2008. ISBN 6-7.
20. Dutton, M. V., Evans, C. S., Atkey, P. T. & Wood, D. A. (1993). Oxalate production by Basidiomycetes, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 39, 5-10.
21. Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Khardziani, T. & Agathos, S. N. (2010). Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes, *Journal and Microbiology Biotechnology*, 37, 1091–1096.
22. Fazenda, M. L., Seviour, R., McNeil, B. & Harve, L. M. (2008). Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: *The Macrofungi. Advances in Applied Microbiology*, 63, 33-103.

23. Felse, P. A. & Panda, T. (2010). Production of microbial chitinases – A review, 27, 127-134.
24. Garcia, M. C. (2005). El micoparasitismo de *Verticillium fungicola* sobre los carpóforos de *Agaricus bisporus*: la verticiliosis o mole seca del champiñón. *Anal. Real. Acad. Nac. Farm.* , 71, 571-586.
25. Guzmán, G., Ramírez, F., Tapia, F. & Navarro, P. (1999). Las especies del género *Psilocybe* (Fungi, Basidiomycotina, Agaricales) conocidas de Veracruz (México). *Acta Botánica Mexicana*, 35-46.
26. Hadibarata, T. & Kristanti R. A. (2014). Potential of a white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032 for degradation and transformation of fluorine. *Fungal biology*, 118, 222-227.
27. Halder, S. K., Maity, Ch., Jana, A., Ghosh, K., Das, A., Paul, T., Mohapatra, P. K. D., Pati, B. R., & Mondal, K. C. (2013). Chitinases biosynthesis by immobilized *Aeromonas hydrophila* SBK1 by prawn shells valorization and application of enzyme cocktail for fungal protoplast preparation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, 170-177.
28. Hartl, L., Zach, S. & Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied Microbiology Biotechnology*, 93, 533-543.
29. He, P., He, X. & Zhang, C. (2006). Interactions between *Psilocybe fasciata* and its companion fungus *Acremonium strictum*. *Ecol Res.*, 21(), 387–395.
30. Herrera, T. & Ulloa, M. (2005). El reino de los hongos: micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica

31. Hibbet, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lucking, R., Thorsten-Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y., Gams, W., Geiser, D. M., Griffth, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Koljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schubler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. & Zangh, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111, 509-547.

32. Hildén, K., Mäkelä, M. R., Lankinen, P. & Lundell, T. (2013). *Agaricus bisporus* and related *Agaricus* species on lignocellulose: Production of manganese peroxidase and multicopper oxidases. *Fungal Genetics and Biology*, 55, 32-41.

33. Jaszek, M., Grzywnowicz, G., Malarczyk, E. & Leonowicz, A. (2006). Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85, 147-154.

34. Jennigs, D.H., y Lysek, G. (1996). *Fungal Biology: Understanding the fungal lifestyle*. BIOS Scientific Publishers, 2, 1-154.

35. Jones C.S y Kosman D.J. (1980). Purification, Properties, Kinetics, and Mechanism of β -N Acetylglucosamidase from *Aspergillus niger*. *The Journal of Biological Chemistry*, 255 (24), 11861-11869.

36. Kachlishvili, E., Penninckx, M. J., Tsiklauri, N. & Elisashvili, V. (2006). Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 391–397.

37. Kreuzer, M., Schmutzler, K., Waage, I., Thomm, M., & Hausner, W. (2013). Genetic engineering of *Pyrococcus furiosus* to use chitin as a carbon source. *BMC Biotechnology*, 13, 1472-6750.

38. Krulla, R., Wucherpfennig, T., Esfandabadia, M., Waliskoa, R., Melzera, G., Hempela, D., Kampenb, I., Kwadeb, A. & Wittmann, C. (2013). Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 163, 112-123.

39. Kûes, U. & Liu, Y. (2000). Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 54, 141-152.
40. Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
41. Lang, C. A. (1958). Simple Microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. *Analytical Chemistry*, 30, 1692-1693.
42. Lu, Z., Hea, Z., Lia, H., Gonga, J., Genga, Y., Xua, H., Xub, G., Shia, J. & Xu, Z. (2014). Modified arthroconidial inoculation method for the efficient fermentation of *Antrodia camphorata* ATCC 200183. *Biochemical Engineering Journal*, 87, 41-49.
43. Luo, H., Hallen-Adams, H. E., Scott-Craig, J. S. & Walton, J. D. (2012). Ribosomal biosynthesis of α -amanitin in *Galerina marginata*. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 123-129.
44. Lowry, O.H. (1951). Rosenbrough, N.J.; Farr, A. L. and Randall, U.L. "Protein measurement with the Folin Phenol Reagent". *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
45. Napolitano, M. J. & Shain, D. H. (2005). Distinctions in adenylate metabolism among organisms inhabiting temperature extremes. *Extremophiles*, 9, 93–98.
46. Molitoris, H.P., (1994). Mushrooms in Medicine. *Folia Microbiol.* , 39, 91- 98.
47. Montiel, E., Barragán, J. C., Tello, I., Mora, V. M., León, I. & Martínez, D. (2008). Characterization and cultivation of *Psilocybe barrerae*. *Micología Aplicada International*, 20, 69-74.
48. Mucha, J., Dahm, H., Strzelczyk, E. & Werner, A. (2006). Synthesis of enzymes connected with mycoparasitism by ectomycorrhizal fungi. *Arch Microbiol*, 185, 69–77.
49. Musshoffa, F., Madeaa, B. & Beikeb, J. (2000). Hallucinogenic mushrooms on the German market: simple instructions for examination and identification. *Forensic Science International*, 113, 389-395.
50. Muggia, L., Pérez, S. O., Fryday, A., Spribille, T. & Grube, M. (2014). Global assessment of genetic variation and phenotypic plasticity in the lichen-forming species *Tephromela atra*. *Fungal Diversity*, 64, 233-251.

51. Okamoto, K., Imashiro, K., Akizawa, Y., Onimura, A., Yoneda, M., Nitta, Y., Maekawa, N. & Yanase, H. (2010). Production of ethanol by the white-rot basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*. *Biotechnology Letters*, 32, 909–913.
52. Pastor de Abram, A e Higuera I, (2004). Generalidades, En: Quitina y quitosano, obtencion, caracterizacion y aplicaciones. Ed: Pastor de Abram. A. Editorial: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Catolica de Peru.
53. Pérez, A., Larrosa, J.A., Escámez, P.S., (2016). Modelos matematicos para la descripcion del crecimiento de microorganismos patogenos en alimentos. *Anuario de Jovenes Investigadores*, 161, 160-163.
54. Reyes, E. M., M., Hereida A. G. & Gamboa A. M. M. (2008). Perfil biológico de hongos anamórficos del sureste de México, *Revista Mexicana de Micología*, 28, 49-56.
55. Ruiz, J. (2001). El asombroso reino de los hongos, 65, 53-87.
56. Santos, C. H. A., Silva, E. M. A., Santos, S. C. & Micheli, F. (2013). Polygalacturonases from *Moniliophthora perniciosa* are regulated by fermentable carbon sources and possible post-translational modifications. *Fungal Genetics and Biology*, 60, 110-121.
57. Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E., Hiraga, K., Oda & K., Aiba, S. (2002). Production of N-acetyl-d-glucosamine from α -chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330. *Carbohydrate Research*, 337, 761-763.
58. Shamolina, I. I., Romanova, A. N., Gavrilova, V. P., Yakovleva, N. S. & Belova, N. V. (2008). Basidiomycetes biotechnical processing of unusable wastes from the production of woolen cloths, *Fibre Chemistry*, 40, 386-391.
59. Shirai, K. M., Malpica, S. F. P. (2013). Manual de practicas de laboratorio, Tecnologia de fermentaciones alimentarias, Universidad Autonoma Metropolitana, 11.
60. Smits, G.J., Herman van den Ende and Klis, F.M. (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast,

61. Teunissen, P. J. M., Swarts, H. J. & Field, J. A. (1997). The de novo production of drosophilin A (tetrachloro-1,4-dimethoxybenzene) by ligninolytic basidiomycetes. *Applied Microbiology Biotechnology*, 47, 695-700.
62. Tronsmo, A. & Harman, G. E. (1993). Detection and quantification of n-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Anal. Biochem.*, 208, 74-79.
63. Tsuji, M., Goshimaa, T., Matsushika, A., Kudohb, S. & Hoshino, T. (2013). Direct ethanol fermentation from lignocellulosic biomass by Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis* under a low temperature condition. *Cryobiology*, 67, 241-243.
64. Valencia, L. E., Cuéllar, R. I., Rodríguez, A. I., Alcocer, S. A. & Casasola F. R. (2012). Implementación del método de Biuret para la determinación de proteína residual en lactosuero. *Revista Sistemas Ambientales*, 5, 21-24.
65. Wang, S., Chen, S. & Wang, Ch. (2008). Purification & characterization of chitinases and chitosanases from a new species strain *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as a substrate. *Carbohydrate Research*, 343, 1171-1179.

13. ANEXOS

ANEXO A. CURVAS ESTÁNDAR

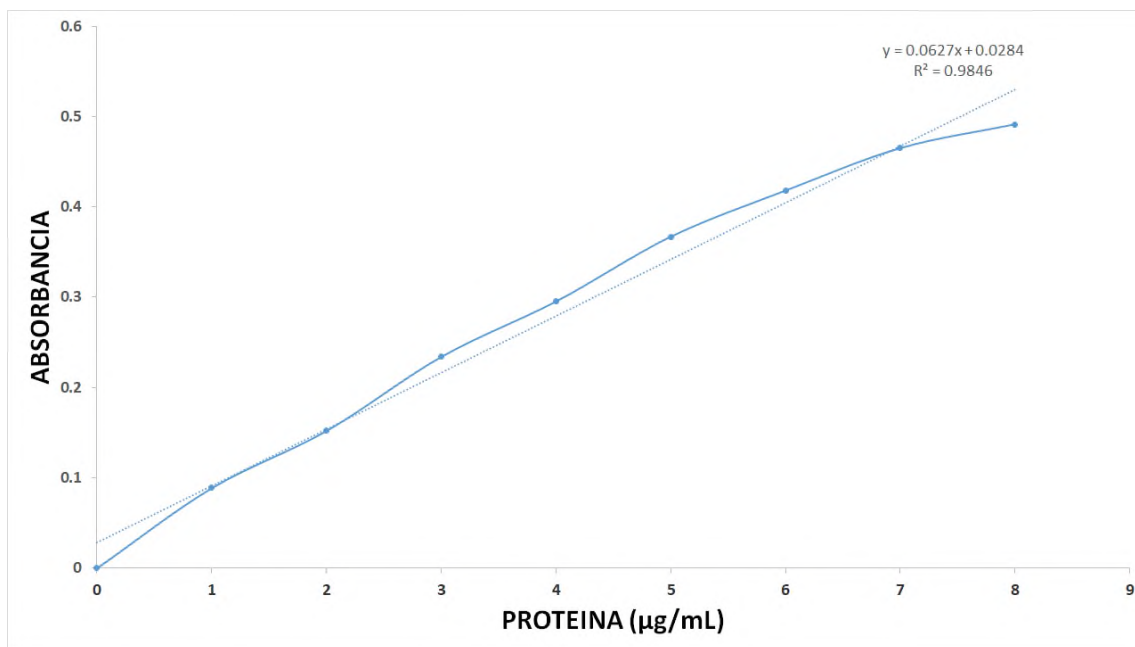


Figura 29. Curva estándar de proteína empleando seroalbúmina bovina (BSA) por el método de micro ensayo de Bradford (1976).

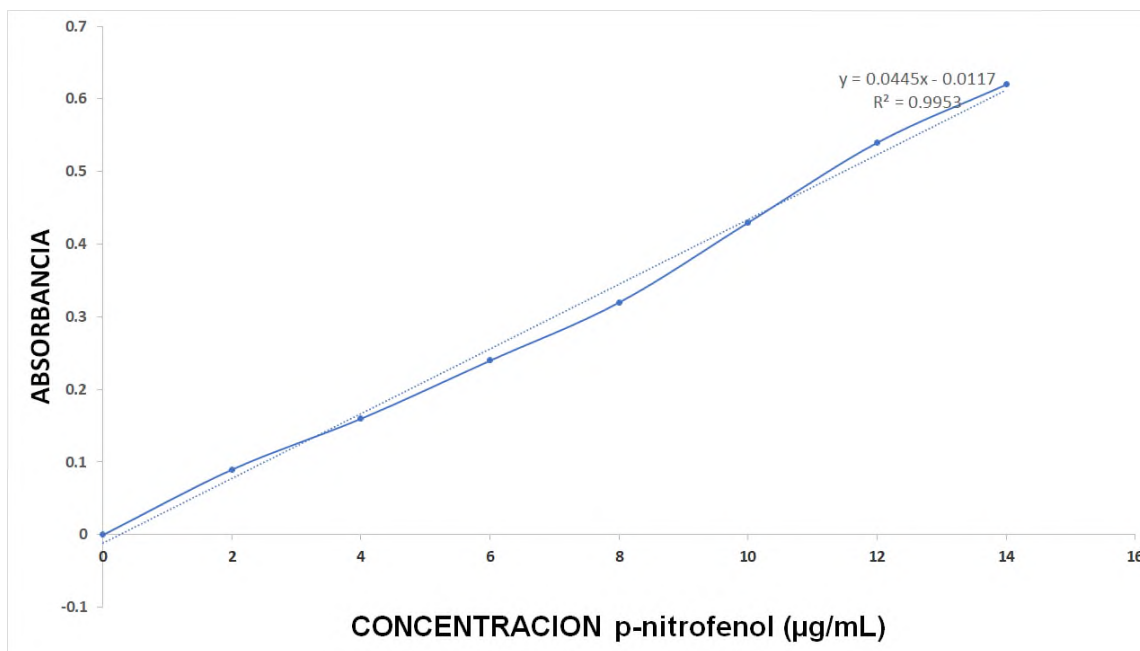


Figura 30. Curva estándar de N-acetilhexosaminidasa por el método de Tronsmo y Harman (1993) empleando una solución madre de p-nitrofenol a una concentración de $100\mu\text{g/mL}$.

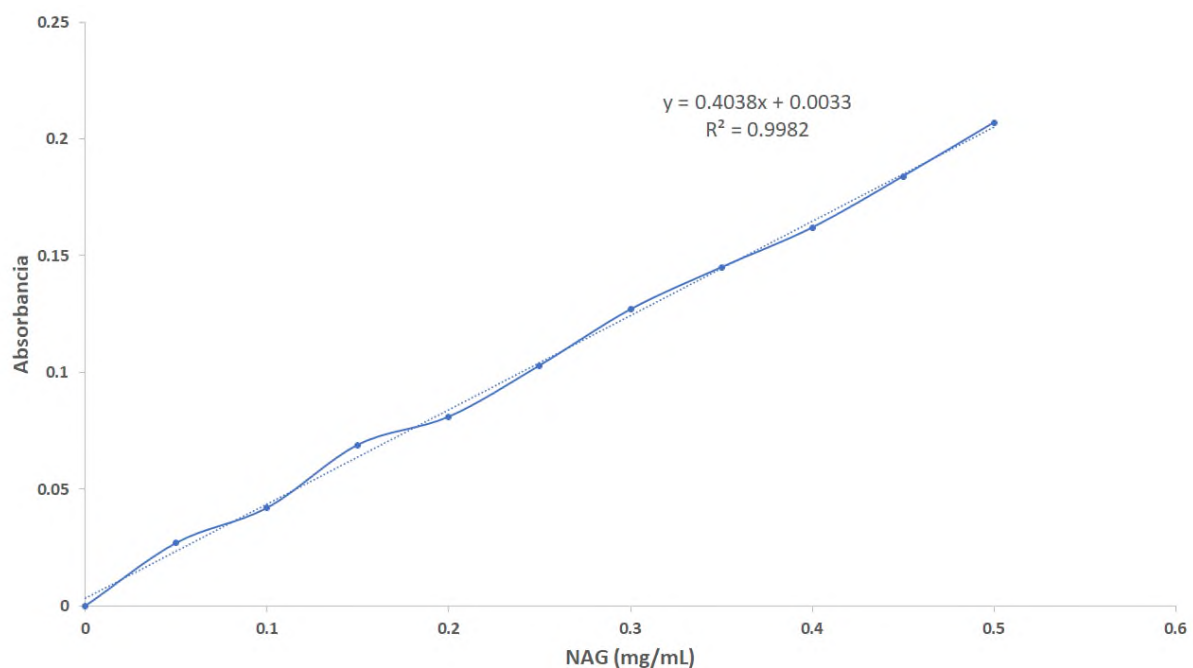


Figura 31. Curva estándar de azúcares reductores por el método de Miller (1954) empleando N-acetilglucosamina (NAG) como estándar.

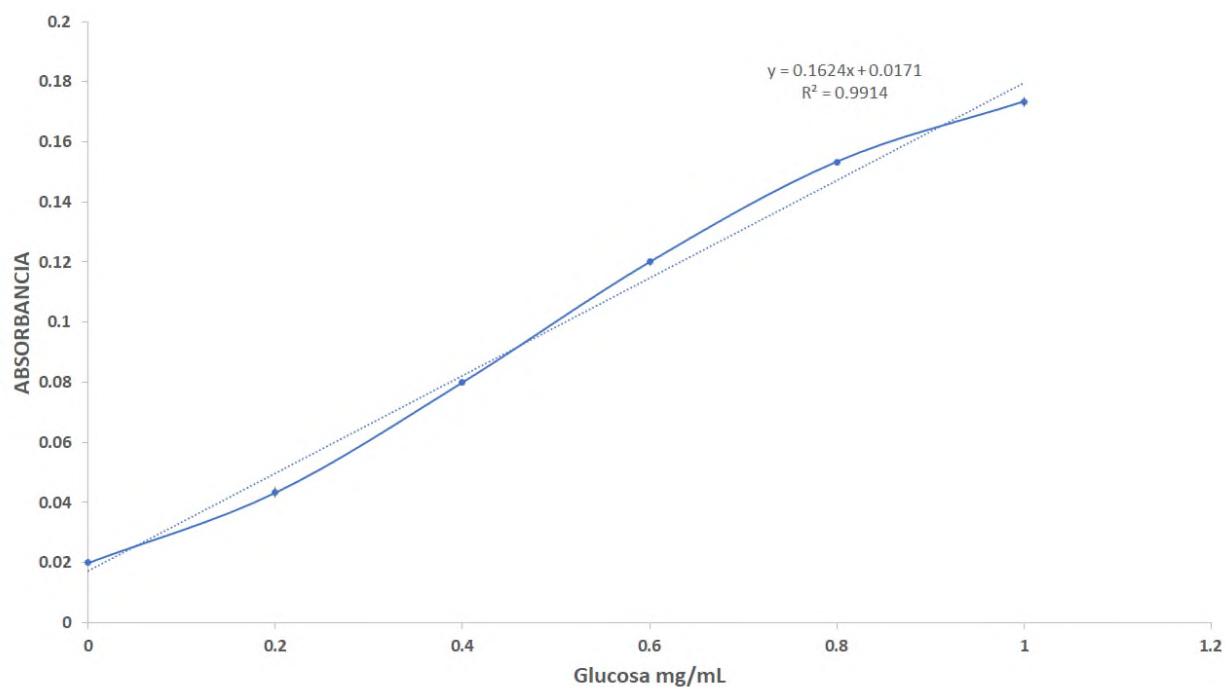


Figura 32. Curva estándar de azúcares reductores por el método de Miller (1954) empleando glucosa como estándar.

ANEXO B. ANÁLISIS ELEMENTAL

Tabla 15. Relaciones C/N de los medios de fermentación empleados.

Medio	Relación C/N calculado	Relación C/N analizador elemental*
Medio Extracto de Malta	7.63	8.45
Medio Czapeck Con Glucosa	24.29	23.46

*Analizador Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O, Connecticut, EUA.

ANEXO C. MODELAMIENTO MATEMÁTICO

Tabla 16. Modelamiento matemático aplicados a la biomasa producida durante la fermentación con quitina para DMRN1.

No	Modelo (Ecuación)	Valores de las variables	R ²	Variables Asociadas
1	$N = \exp(a + b * t + c * x^2)$	a=2.41269h b=-0.00592h ⁻¹ c=6.04773E-5h ⁻²	0.98882	b= μmax
2	$N = N0 + A * \exp(R0 * t)$	N0=9.64714g/L A=0.04853g/L R0=0.0347h ⁻¹	0.99642	R0=μmax
3	$N = A1 * \exp\left(-\frac{t}{t1}\right) + N0$	N0=9.64714g/L A1=0.04853g/L t1=-28.81833h	0.99642	t1=1/ μmax
4	$N = 2A * \exp\left(-\frac{t}{t1}\right) + N0$	N0=9.64714g/L A=0.02426g/L t=-28.81833h	0.98927	t=1/ μmax
5	$N = a + b * (\exp(k * t) - 1)/k$	a=9.69567g/L b=0.00168g/L*h k=0.0347h ⁻¹	0.99642	k=μmax

ANEXO D. MONITOREO DE AZÚCARES REDUCTORES EN LAS FERMENTACIONES CON LOS AISLADOS DMRN1 y DMRN2.

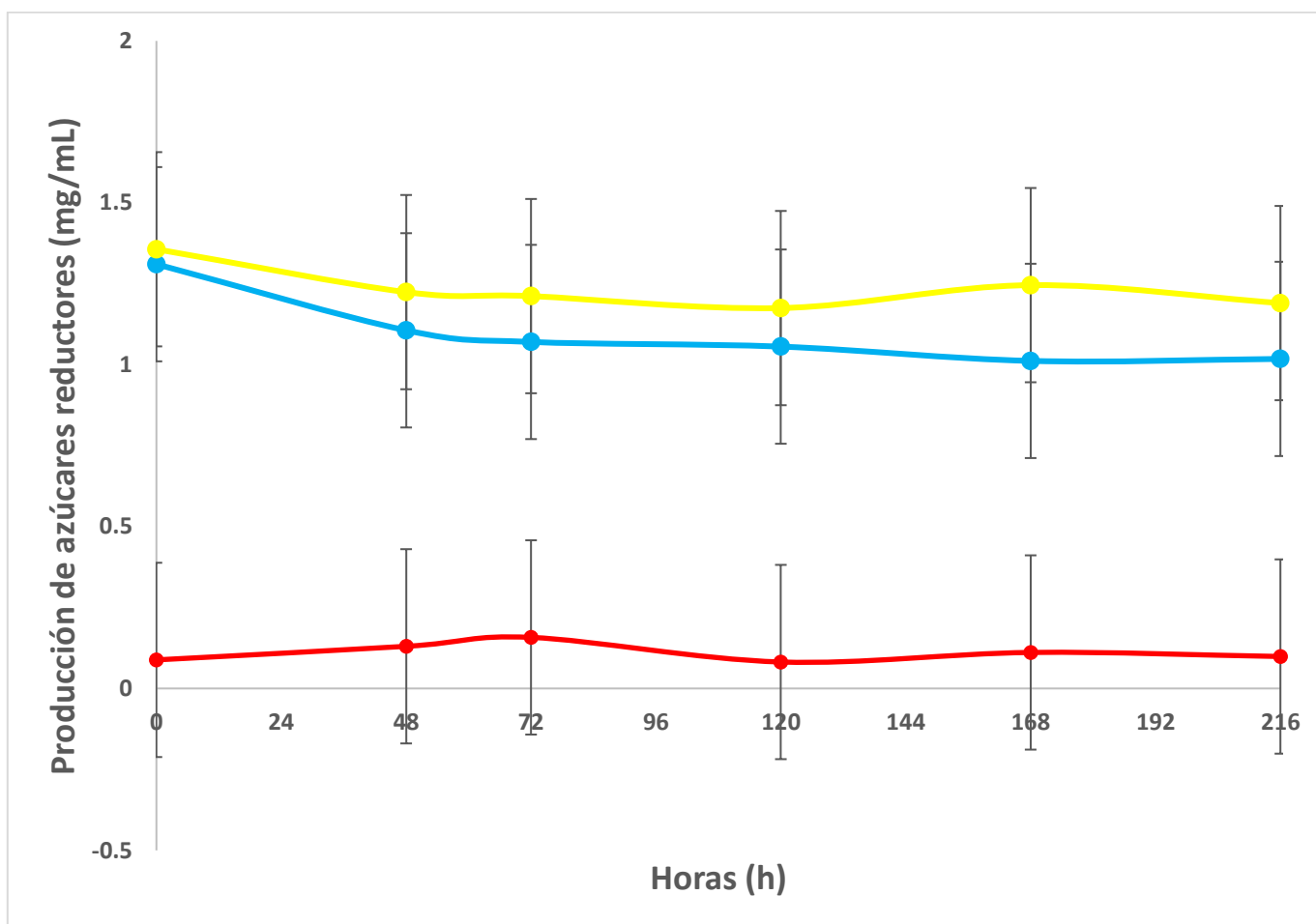


Figura 33. Determinación de azúcares reductores en las fermentaciones con DMRN1.

Fermentación con glucosa y fosfato. ● Fermentación con glucosa sin fosfato. ● Fermentación con quitina y fosfato. Los valores mostrados representan el promedio de dos repeticiones (Promedio $\pm$ SD).

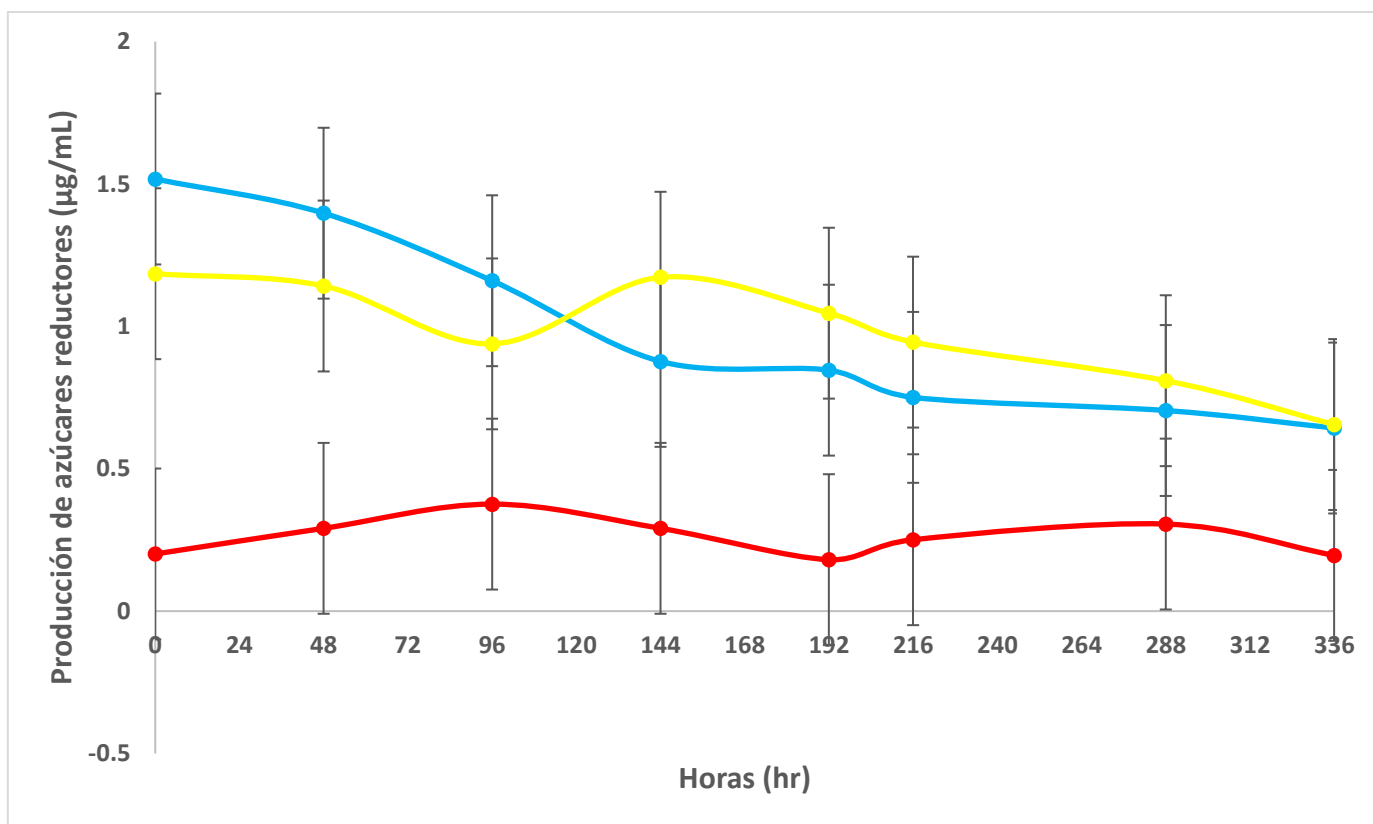


Figura 34. Determinación de azúcares reductores en las fermentaciones con DMRN2.

● Fermentación con una fuente de carbono de glucosa y fosfato. ● Fermentación con una fuente de carbono de glucosa sin fosfato. ● Fermentación con una fuente de carbono de quitina y fosfato. Los valores mostrados representan el promedio de dos repeticiones (Promedio $\pm$ SD).

ANEXO E. DATOS EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL k_{La} .

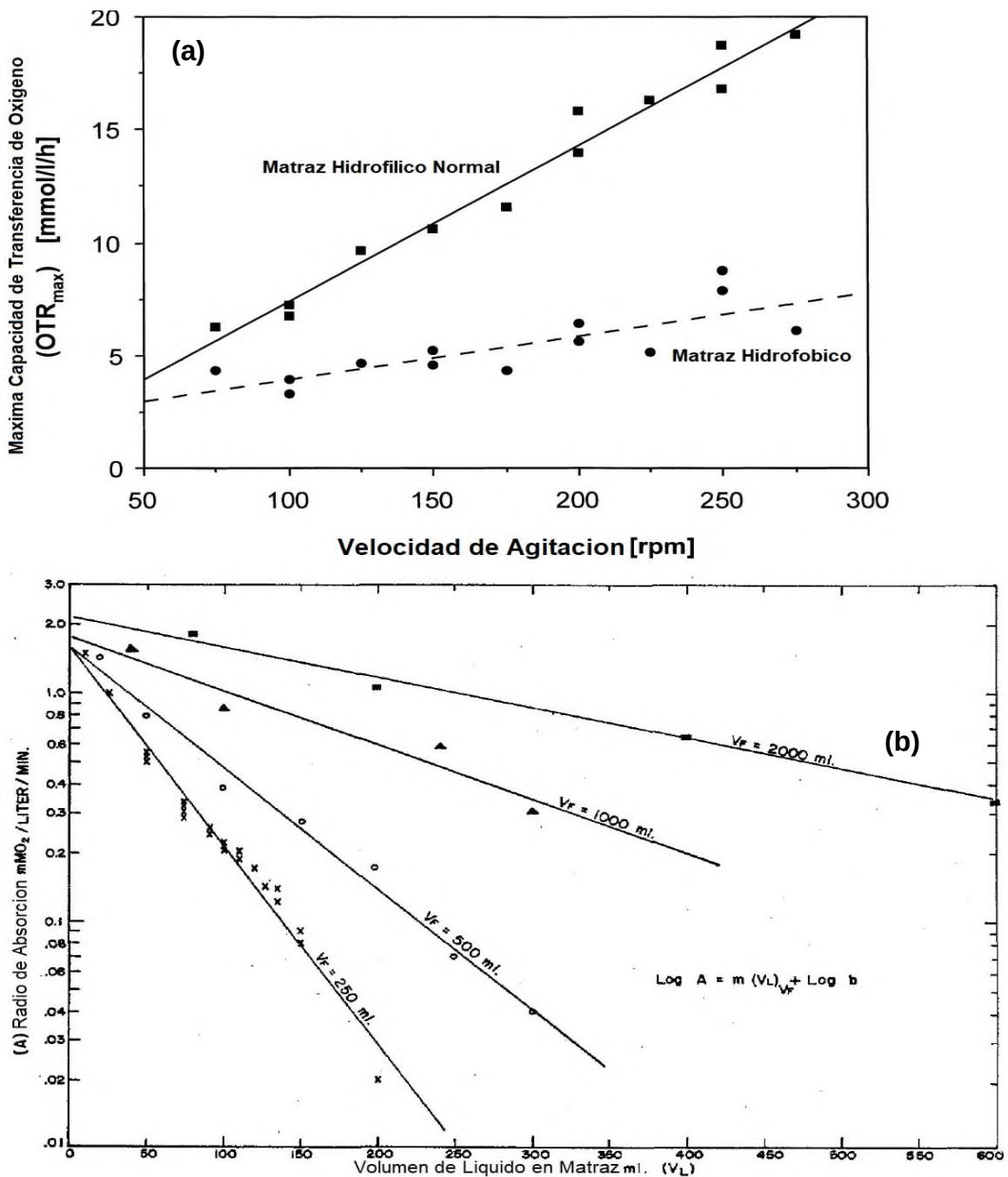


Figura 35. Efecto de la velocidad de agitación, tipo de matraz y volumen de líquido en matraces, sobre el k_{La} . Doran (Bioprocess Engineering Principles, 1995)

ANEXO F. CÁLCULOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL K_La EN LOS MATRACES AGITADOS EMPLEADOS DURANTE LA FERMENTACIÓN.

$$n_{O_2} = 21 \text{ mol } O_2 / 100 \text{ mol aire} * 1 \text{ mol aire} / 29 \text{ gr aire} * 1.196 \text{ Kg aire} / \text{m}^3 \text{ aire} * 1000 \text{ gr aire} / 1 \text{ Kg aire} * 1 \text{ m}^3 \text{ aire} / 1000 \text{ L aire} = 8.66 \text{ Exp}^{-3} \text{ mol } O_2$$

$$n_{O_2} = 8.66 \text{ Exp}^{-3} \text{ mol } O_2 = 8 \text{ mmol } O_2$$

$$KLa = n_{O_2} = 5 \text{ mmol } O_2$$

ANEXO G. TASAS DE CONSUMO DEL SUSTRATO DURANTE LAS FERMENTACIONES

Tabla 17. Tasa de consumo en las fermentaciones con glucosa, con y sin fosfato.

Fermentación	Tiempo [h]	Consumo de Glucosa [g/L]	Tasa de consumo [g/L*h]
Glucosa con Fosfato	0	8.69	0
	48	8.9	4.37×10^{-3}
	72	8.93	1.25×10^{-3}
	120	8.95	4.16×10^{-4}
	168	8.99	8.33×10^{-4}
	216	8.99	0
Glucosa sin Fosfato	0	8.65	0
	48	8.78	2.708×10^{-3}
	72	8.79	4.16×10^{-4}
	120	8.26	-0.011
	168	8.76	0.0104
	216	8.81	1.04×10^{-3}

ANEXO H. ANÁLISIS COLORIMÉTRICO (MÉTODO HUNTER LAB)

Tabla 18. Colorimetría de la fermentación con quitina del aislado DMRN1

HORA	L	a	b	Color
0	94.395	-14.715	38.695	amarillo pálido
24	94.645	-14.505	38.675	amarillo pálido
48	94.54	-14.64	38.48	amarillo pálido
72	94.595	-14.58	38.13	amarillo pálido
96	93.695	-14.65	38.5	amarillo pálido
120	94.67	-14.105	37.785	amarillo pálido
144	94.075	-13.575	37.43	amarillo pálido
168	93.05	-13.55	37.445	amarillo pálido
192	92.15	-12.735	36.705	amarillo pálido

Tabla 19. Colorimetría de la fermentación con glucosa del aislado DMRN1

HORA	L	a	b	Color
0	93.4316667	-15.3983333	44.4233334	Amarillo muy claro
24	36.3966667	45.2366667	-130.695	Azul claro
48	36.09	45.22	-130.62	Azul claro
72	36.3933334	45.3283334	-130.55	Azul claro
96	11.3533333	24.4016667	-67.375	Azul oscuro
120	11.3283334	24.52	-67.4066667	Azul oscuro
144	11.2616667	24.345	-67.5516667	Azul oscuro
168	8.08999999	14.96	-42.58	Azul muy oscuro
192	4.475	5.40833334	-17.1666667	Azul muy oscuro

Tabla 20. Colorimetría de la fermentación con glucosa sin fosfato del aislado DMRN1.

HORA	L	a	b	Color
0	91.57	-16.65	51.525	amarillo claro
24	91.525	-16.83	51.55	amarillo claro
48	91.435	-15.83	51.58	amarillo claro
72	90.99	-16.415	51.51	amarillo claro
96	74.76	16.53	29.88	naranja muy ligero
120	74.76	16.53	29.88	naranja muy ligero
144	74.76	16.53	29.88	naranja muy ligero
168	74.76	16.53	29.88	naranja muy ligero
192	74.76	16.53	29.88	naranja muy ligero

Tabla 21. Colorimetría de la fermentación con quitina del aislado DMRN2

HORA	L	A	b	Color
0	96.465	-24.705	39.555	amarillo pálido
24	96.6	-24.44	39.705	amarillo pálido
48	96.375	-24.645	39.725	amarillo pálido
72	96.705	-24.45	39.825	amarillo pálido
96	96.37	-24.685	39.76	amarillo pálido
120	96.61	-24.325	39.51	amarillo pálido
144	96.685	-24.6	39.33	amarillo pálido
168	96.51	-24.61	39.795	amarillo pálido
192	96.675	-24.505	39.74	amarillo pálido

Tabla 22. Colorimetría de la fermentación con glucosa del aislado DMRN2

HORA	L	a	b	Color
0	28.005	-0.80666667	7.51166667	Amarillo grisáceo muy oscuro
24	25.1666667	-0.54833334	5.38833333	Naranja grisáceo muy oscuro
48	28.01	-0.74166667	8.075	Naranja grisáceo muy oscuro
72	27.27	-0.23333334	5.115	Naranja grisáceo muy oscuro
96	26.445	-1.03166667	6.83	Amarillo grisáceo muy oscuro
120	26.005	-0.38	7.12666667	Naranja grisáceo muy oscuro
144	27.2316667	0.16166667	7.05	Naranja grisáceo muy oscuro
168	26.0266667	0.63	4.14	Naranja grisáceo muy oscuro
192	24.25	0.85333334	5.27	Naranja grisáceo muy oscuro

Tabla 23. Colorimetría de la fermentación con glucosa sin fosfato del aislado DMRN2

HORA	L	a	b	Color
0	60.66	0.23	0.365	violeta grisáceo oscuro
24	61.885	0.315	0.04	violeta grisáceo oscuro
48	61.865	-0.155	0.245	violeta grisáceo oscuro
72	62.18	0.52	-0.13	violeta grisáceo oscuro
96	61.405	0.075	0.33	violeta grisáceo oscuro
120	61.83	0.205	0.085	violeta grisáceo oscuro
144	62.145	0.08	0.095	violeta grisáceo oscuro
168	61.725	-0.005	-0.035	magenta grisáceo oscuro
192	61.995	0.175	-0.195	violeta grisáceo oscuro
216	61.935	0.59	-0.245	violeta grisáceo oscuro

ANEXO I. ESTRUCTURA DE INHIBIDOR DE QUITINASAS

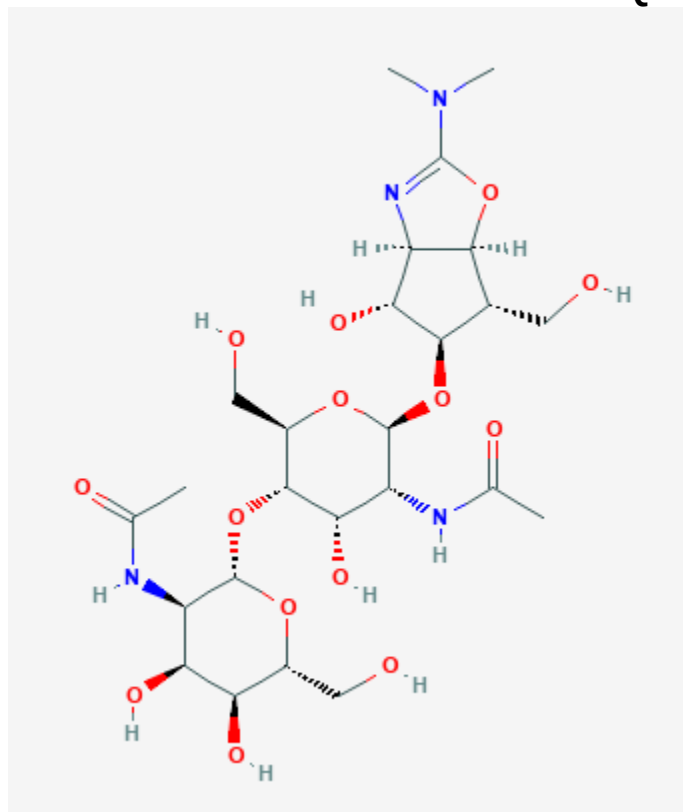


Figura 36. Estructura de la alosamidina (Tomado de Pubchem)

ANEXO J. ANÁLISIS DE VARIANZA

AISLADO DMRN1.EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO

Tabla 24. ANOVA DE DOS FACTORES. Variable Respuesta Actividad Enzimática.

Actividad	Fuente	GL	SC	MC	F	P	S	R ²	R ² _{ajustado}
Endoquitinasas	C1	1	8493237	8493237	2302.37	0.000	60.74	98.66	98.25
	C2	5	647328	129466	35.10	0.000			
	Interac	5	637233	127447	34.55	0.000			
	Error	36	132801	3689					
	Total	47	9910598						
Exoquitinasas	C1	1	0.0129870	0.0129870	245.20	0.000	0.0073	93.77	91.87
	C2	5	0.0141108	0.0028222	53.28	0.000			
	Interac	5	0.0016035	0.0003207	6.05	0.000			
	Error	36	0.0019068	0.0000530					
	Total	47	0.0306081						

Factores: C1 =Fuente de carbono (2 niveles, Quitina y Glucosa)

C2= Tiempo de fermentación (6 niveles)

Tabla 25. ANOVA DE DOS FACTORES. Variable Respuesta Actividad Específica.

Actividad	Fuente	GL	SC	MC	F	P	S	R ²	R ² _{ajustado}
Endoquitinasas	C1	1	621.62	621.621	3223.92	0.000	0.4391	99.34	99.13
	C2	5	209.98	41.996	217.80	0.000			
	Interac	5	208.23	41.647	215.99	0.000			
	Error	36	6.94	0.193					
	Total	47	1046.78						
Exoquitinasas	C1	1	0.0000002	0.0000002	34.98	0.000	82.31 E-06	99.74	99.66
	C2	5	0.0000920	0.0000184	2716.25	0.000			
	Interac	5	0.0000025	0.0000005	74.10	0.000			
	Error	36	0.0000002	0.0000000					
	Total	47	0.0000950						

Factores: C1 =Fuente de carbono (2 niveles, Quitina y Glucosa)

C2= Tiempo de fermentación (6 niveles)

Tabla 26. ANOVA DE DOS FACTORES. Variable Respuesta : Productividad.

Actividad	Fuente	GL	SC	MC	F	P	S	R ²	R ² _{ajustado}
Endoquitinasas	C1	1	2.4891E+10	2.4891E+10	4038.57	0.000	2483	99.43	99.26
	C2	5	7.0452E+09	1.4090E+09	228.62	0.000			
	Interac	5	6.9673E+09	1.3934E+09	226.09	0.000			
	Error	36	2.2188E+08	6.1633E+06					
	Total	47	3.9125E+10						
Exoquitinasas	C1	1	27.294	27.294	107.66	0.000	0.504	99.06	98.77
	C2	5	922.461	184.492	727.72	0.000			
	Interac	5	9.267	1.853	7.31	0.000			
	Error	36	9.127	0.254					
	Total	47	968.149						

Factores: C1 =Fuente de carbono (2 niveles, Quitina y Glucosa)

C2= Tiempo de fermentación (6 niveles)

AISLADO DMRN1.EFECTO DEL FOSFATO

Tabla 27. ANOVA DE DOS FACTORES. Variable Respuesta Actividad Enzimática.

Actividad	Fuente	GL	SC	MC	F	P	S	R ²	R ² _{ajustado}
Endoquitinasas	C1	1	70158203	70158203	40.99	0.000	1308	64.89	54.16
	C2	5	21861538	4372308	2.55	0.045			
	Interac	5	21850489	4370098	2.55	0.045			
	Error	36	61616001	1711556					
	Total	47	17548623						
Exoquitinasas	C1	1	0.0044326	0.0044326	116.42	0.000	61.7 E-04	97.23	96.39
	C2	5	0.0303943	0.0060789	159.66	0.000			
	Interac	5	0.0133546	0.0026709	70.15	0.000			
	Error	36	0.0013706	0.0000381					
	Total	47	0.0495522						

Factores: C1 = Fosfato (2 niveles: Con Fosfato y Sin Fosfato)
C2= Tiempo de fermentación (6 niveles)

Tabla 28. ANOVA DE DOS FACTORES. Variable Respuesta Actividad Específica.

Actividad	Fuente	GL	SC	MC	F	P	S	R ²	R ² _{ajustado}
Endoquitinasas	C1	1	23902.2	23902.2	99.13	0.000	15.53	90.67	87.82
	C2	5	30222.8	6044.6	25.07	0.000			
	Interac	5	30212.1	6042.4	25.06	0.000			
	Error	36	8680.5	241.1					
	Total	47	93017.6						
Exoquitinasas	C1	1	0.0000416	0.0000416	4280.44	0.000	98.6 E-06	99.91	99.89
	C2	5	0.0003128	0.0000626	6435.11	0.000			
	Interac	5	0.0000563	0.0000113	1158.60	0.000			
	Error	36	0.0000003	0.0000000					
	Total	47	0.0004111						

Factores: C1 = Fosfato (2 niveles: Con Fosfato y Sin Fosfato)
C2= Tiempo de fermentación (6 niveles)

Tabla 29. ANOVA DE DOS FACTORES. Variable Respuesta : Productividad.

Actividad	Fuente	GL	SC	MC	F	P	S	R ²	R ² _{ajustado}
Endoquitinasas	C1	1	4.1633E+13	4.1633E+13	7.08	0.012	24.25 E+05	48.61	32.91
	C2	5	7.9359E+13	1.5871E+13	2.70	0.036			
	Interac	5	7.9352E+13	1.5870E+13	2.70	0.036			
	Error	36	2.1180E+14	5.8835E+12					
	Total	47	4.1215E+14						
Exoquitinasas	C1	1	179627	179627	33.19	0.000	73.57	72.68	64.33
	C2	5	174207	34841	6.44	0.000			
	Interac	5	164492	32898	6.08	0.000			
	Error	36	194854	5413					
	Total	47	713180						

Factores: C1 = Fosfato (2 niveles: Con Fosfato y Sin Fosfato)
C2= Tiempo de fermentación (6 niveles)

AISLADO DMRN2. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO

Tabla 30. ANOVA DE DOS FACTORES. Variable Respuesta Actividad Enzimática.

Actividad	Fuente	GL	SC	MC	F	P	S	R ²	R ² _{ajustado}
Endoquitinasas	C1	1	72250000	72250000	1141.99	0.000	251.5	98.46	97.98
	C2	7	56033200	8004743	126.52	0.000			
	Interac	7	65930800	9418686	148.87	0.000			
	Error	48	3036800	63267					
	Total	63	197250800						
Exoquitinasas	C1	1	0.0064677	0.0064677	190.09	0.000	0.00583	97.89	97.24
	C2	7	0.0349985	0.0049998	146.95	0.000			
	Interac	7	0.0344378	0.0049197	144.59	0.000			
	Error	48	0.0016332	0.0000340					
	Total	63	0.0775372						

Factores: C1 =Fuente de carbono (2 niveles, Quitina y Glucosa)

C2= Tiempo de fermentación (8 niveles)

Tabla 31. ANOVA DE DOS FACTORES. Variable Respuesta Actividad Específica.

Actividad	Fuente	GL	SC	MC	F	P	S	R ²	R ² _{ajustado}
Endoquitinasas	C1	1	1195.32	1195.32	456.00	0.000	1.619	98.05	97.44
	C2	7	2187.88	312.55	119.24	0.000			
	Interac	7	2939.70	419.96	160.21	0.000			
	Error	48	125.82	2.62					
	Total	63	6448.73						
Exoquitinasas	C1	1	0.0000001	0.0000001	67.87	0.000	27.89 E-06	99.95	99.93
	C2	7	0.0000684	0.0000098	12554.48	0.000			
	Interac	7	0.0000022	0.0000003	395.20	0.000			
	Error	48	0.0000000	0.0000000					
	Total	63	0.0000706						

Factores: C1 =Fuente de carbono (2 niveles, Quitina y Glucosa)

C2= Tiempo de fermentación (8 niveles)

Tabla 32. ANOVA DE DOS FACTORES. Variable Respuesta Productividad.

Actividad	Fuente	GL	SC	MC	F	P	S	R ²	R ² _{ajustado}
Endoquitinasas	C1	1	2.4406E+11	2.4406E+11	830.06	0.000	17147	98.18	97.61
	C2	7	2.6104E+11	3.7291E+10	126.83	0.000			
	Interac	7	2.5623E+11	3.6605E+10	124.50	0.000			
	Error	48	1.4113E+10	2.9402E+08					
	Total	63	7.7545E+11						
Exoquitinasas	C1	1	26.33	26.327	80.08	0.000	0.5734	98.69	98.28
	C2	7	1027.22	146.746	446.34	0.000			
	Interac	7	132.03	18.861	57.37	0.000			
	Error	48	15.78	0.329					
	Total	63	1201.36						

Factores: C1 =Fuente de carbono (2 niveles, Quitina y Glucosa)

C2= Tiempo de fermentación (8 niveles)

AISLADO DMRN2. EFECTO DEL FOSFATO

Tabla 33. ANOVA DE DOS FACTORES. Variable Respuesta Actividad Enzimática.

Actividad	Fuente	GL	SC	MC	F	P	S	R ²	R ² _{ajustado}
Endoquitinasas	C1	1	112148100	112148100	1925.84	0.000	241.3	98.82	98.45
	C2	7	64411900	9201700	158.01	0.000			
	Interac	7	58038300	8291186	142.38	0.000			
	Error	48	2795200	58233					
	Total	63	237393500						
Exoquitinasas	C1	1	0.472062	0.472062	12894.0	0.000	60.51 E-04	99.68	99.58
	C2	7	0.037125	0.005304	144.86	0.000			
	Interac	7	0.034439	0.004920	134.38	0.000			
	Error	48	0.001757	0.000037					
	Total	63	0.545383						

Factores: C1 = Fosfato (2 niveles: Con Fosfato y Sin Fosfato)
C2= Tiempo de fermentación (8 niveles)

Tabla 34. ANOVA DE DOS FACTORES. Variable Respuesta Actividad Específica.

Actividad	Fuente	GL	SC	MC	F	P	S	R ²	R ² _{ajustado}
Endoquitinasas	C1	1	2262.85	2262.85	691.20	0.000	1.809	97.73	97.02
	C2	7	2183.08	311.87	95.26	0.000			
	Interac	7	2313.63	330.52	100.96	0.000			
	Error	48	157.14	3.27					
	Total	63	6916.71						
Exoquitinasas	C1	1	0.0000178	0.0000178	11424.8	0.000	39.48 E-06	99.85	99.80
	C2	7	0.0000167	0.0000024	1530.8	0.000			
	Interac	7	0.0000143	0.0000020	1309.2	0.000			
	Error	48	0.0000001	0.0000000					
	Total	63	0.0000489						

Factores: C1 = Fosfato (2 niveles: Con Fosfato y Sin Fosfato)
C2= Tiempo de fermentación (8 niveles)

Tabla 35. ANOVA DE DOS FACTORES. Variable Respuesta Productividad.

Actividad	Fuente	GL	SC	MC	F	P	S	R ²	R ² _{ajustado}
Endoquitinasas	C1	1	3.707E+11	3.707E+11	1319.34	0.000	16764	98.50	98.03
	C2	7	2.711E+11	3.873E+10	137.82	0.000			
	Interac	7	2.426E+11	3.466E+10	123.34	0.000			
	Error	48	1.348E+10	2.810E+08					
	Total	63	8.980E+11						
Exoquitinasas	C1	1	1356.13	1356.13	4595.61	0.000	0.5432	99.35	99.14
	C2	7	453.94	64.85	219.76	0.000			
	Interac	7	344.52	49.22	166.79	0.000			
	Error	48	14.16	0.30					
	Total	63	2168.76						

Factores: C1 = Fosfato (2 niveles: Con Fosfato y Sin Fosfato)
C2= Tiempo de fermentación (8 niveles)