



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Maestría en Biotecnología

“Producción, purificación, caracterización y determinación del mecanismo hidrolítico de extractos enzimáticos con actividad N-acetilhexosaminidasa de *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp* utilizando chapulín y camarón como fuentes de carbono”

Tesis

Para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

Presenta:

IBQ. Xochilt Beatriz Escobar Chaparro

Directora

Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño

San Juan Bautista Tuxtepec, 2017



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2017/MB/040
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 12 de Septiembre de 2017

C. XOCHIL BEATRIZ ESCOBAR CHAPARRO
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. Sandra T. del Moral Ventura	UNPA	Presidente
Dr. Sergio Huerta Ochoa	Depto. de Biotecnología, UAM-I	Vocal
Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	Secretario
Dr. Paul Sánchez Ocampo	Cátedra CONACYT-UNPA	1er Suplente
Dra. Ariana A. Huerta Heredia	Cátedra CONACYT-UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.



DR. MARIO VALERA ZARAGOZA
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi jí jú



M. en C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
Vice-rector Académico
Vo. Bo. VICE-RECTORIA
ACADEMICA

C.c.p. Dra. Laura Patricia Ramirez Coutiño – Directora de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Bamentos Arenal – Jefa 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. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2017/MB/106
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 30 de Noviembre de 2017

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 Maestra en Biotecnología de la **C. Xochilt Beatriz Escobar Chaparro**, matricula 13140006, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Producción, purificación, caracterización y determinación del mecanismo hidrolítico de extractos enzimáticos con actividad N-acetilhexosaminidasa de *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp* utilizando chapulín y camarón como fuentes de carbono**" para su posterior presentación y defensa por parte de la sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

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

Dr. MARIO VALERA ZARAGOZA
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Xochilt Beatriz Escobar Chaparro
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. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

RECONOCIMIENTO

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioprocesos y en el Laboratorio Nacional de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec y en la Planta piloto 4 de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa de la Ciudad de México, bajo la dirección de la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño.

La investigación fue realizada bajo el financiamiento del proyecto CB-2011 CONACyT N° 169477. Asimismo, se contó con la beca CONACyT con número de registro 289737 perteneciente al programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a María Santísima por permitirme vivir nuevas experiencias y nuevos retos, porque siempre me acompañan a pesar de lo difícil y dolorosas que sean las pruebas, mil gracias.

A la Dra. Laura P. Ramírez Coutiño por todo el apoyo y comprensión durante este largo trabajo, por la paciencia compartida, porque creo que juntas logramos grandes cosas, mil gracias.

A la Dra. Jacqueline Capataz Tafur, por siempre impulsarme a terminar con este proyecto, y me brindó de manera desinteresada todo su tiempo y apoyo.

A mis sinodales, el Dr. Sergio Huerta Ochoa, el Dr. Paul Sánchez Ocampo, a la Dra. Sandra Del Moral y a la Dra. Ariana Huerta, por la disponibilidad para concluir este proceso, muchas gracias por sus observaciones.

Al Laboratorio Nacional por todas las facilidades prestadas para realizar los experimentos.

A mis compañeros de laboratorio, Adolfo, Sandra, Elías, Tere, Amílcar, Sosa, Lupita y Pato por todo su apoyo, y por acompañarme en las desveladas cuando hacíamos cinéticas, gracias por todo.

A la química Lety, por siempre estar disponible y apoyarme con el material, siempre de buena manera.

A mis amigos de la maestría por todo el ánimo para seguir adelante Ofelia, Karla, Carmín y Alain.

A mis amigos de la Fábrica de papel, Bio papel Printing por apoyarme desde el inicio hasta el final, el Ing. Martín, el Ing. Emiliano y la Ing. Yadira, mil gracias por siempre estar conmigo.

DEDICATORIA

A mi mami, sé que desde el cielo me está apoyando y está muy orgullosa de mí, ha sido muy difícil estar sin ti, pero al final este logro es para ti. Te amo mami.

A mi papá que siempre me ha apoyado, y ha creído en mí.

A mis hermanos, Rigo y Raque, que han sido unos excelentes amigos, siempre apoyándome y dándome ánimos, los amo mucho.

A mi cuñada Clary, que ha sido como una hermana para mí, por darnos los más hermoso que podemos tener, nuestra sobrina, Fatimita hermosa, quien ha venido a alegrar nuestros días, cuando más lo necesitábamos. Mil gracias.

A Saúl, quien me ha acompañado en los momentos más difíciles, y me ha sostenido para no caer. Gracias infinitas.

No te rindas, por favor no cedas, aunque el frío queme, aunque el miedo muerda, aunque el sol se esconda y se calle el viento, aún hay fuego en tu alma, aún hay vida en tus sueños.

Porque la vida es tuya y tuyo también el deseo, porque cada día es un comienzo nuevo, porque ésta es la hora y el mejor momento, porque no estás solo, ¡porque yo te quiero!

Mario Benedetti

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN DE ESTE TRABAJO

▪ Trabajos presentados

Escobar C. X. B, Nuñez-Gaona. O, Ramírez-Coutiño. L. P. Producción de quitinasas en medio líquido empleando el hongo fitopatógeno *Penicillium sp*, con tres sustratos quitinosos. XXXVII Congreso Nacional de Control Biológico. Mérida, Yucatán, México. Noviembre, 5-7, 2014.

Escobar C. X. B, Pérez-Picaso Lemuel, Nuñez-Gaona. O, Ramírez-Coutiño. L. P. Identificación de pigmentos producidos por *Beauveria bassiana* en Fermentación líquida. IV Encuentro de Biotecnología de la Cuenca del Papaloapan: por un desarrollo sustentable. Tuxtepec, Oaxaca. Octubre, 20-21, 2014.

▪ Participaciones

Participación como asistente al XXXVII Congreso Nacional de Control Biológico. Mérida, Yucatán, México. Noviembre, 5-7, 2014.

Participación en el taller SCATTERING TECHNIQUES, SAXS-MEX 2014. Cinvestav-Mérida, Yucatán, México. Septiembre, 12, 2014.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XVIII
INTRODUCCIÓN	XIX
1. ANTECEDENTES	21
1.1 La quitina y sus características	21
1.1.1 Estructura de la quitina	21
1.1.2 Diferencia entre la quitina y la celulosa.....	23
1.1.3 Fuentes de quitina	23
1.2 Quitinasas	25
1.2.1 Clasificación de las quitinasas	25
1.2.1.1 Por su modo de acción	25
1.3.1.2 Con base en la secuencia de aminoácidos	25
1.3.1.3 Fuente de procedencia. L	26
1.3.1.4 Mecanismo de acción	27
1.3.2 Mecanismo de las quitinasas	28
1.3.2.2 Mecanismo de Retención por doble desplazamiento	29
1.3 Características particulares de hongos filamentosos	31
1.3.1 <i>Beauveria bassiana</i>	31
1.2.1.1 Modo de acción	33
1.3.2 <i>Penicillium sp</i>	34
1.2.2.1 Morfología.....	35
2. JUSTIFICACIÓN	38
3. HIPÓTESIS	39
4. OBJETIVOS	40
4.1 OBJETIVO GENERAL	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
5. ESTRATEGIA DE TRABAJO	41
6. MATERIALES Y MÉTODOS	42
6.1 Sustrato.....	42
6.1.1 Tratamiento de desproteización de sustratos	42

6.2 Producción de N-acetilhexosaminidasas	42
6.2.1 Microorganismo.....	42
6.2.2 Fermentación en medio líquido.....	43
6.2.3 Obtención del extracto enzimático	44
6.3 Purificación de N-acetilhexosaminidasas.....	44
6.3.1 Precipitación	44
6.3.2 Ultrafiltración.....	44
6.3.3 Diálisis	45
6.3.4 Electroforesis	45
6.3.4.1 Desnaturalizante (SDS-PAGE).....	45
6.3.4.2 Ensayo de actividad	45
6.4 Determinaciones Analíticas.....	46
6.4.1 Determinación de proteína.....	46
6.4.2 Determinación de actividad N-acetilhexosaminidasa.....	46
6.4.3 Determinación de azúcares reductores	46
6. 5 Caracterización parcial del extracto enzimático	47
6.5.1 Determinación de pH y temperatura de mayor actividad N-acetilhexosaminidasa.....	47
6.5.2 Determinación del mecanismo hidrolítico de N-acetilhexosaminidasa.....	47
7.5.2.1 Hidrólisis de N-acetilquitin-oligosacáridos (DP 2-3).....	47
6.6 Caracterización de los productos hidrólisis	47
6.6.1 Espectrometría de Masas	47
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
7.1 Identificación morfológica de <i>Penicillium sp</i>	48
7.2 Tratamiento del sustrato	50
7.3 Producción de N-acetilhexosaminidasas	50
7.3.1. Producción de N-acetilhexosaminidasas con <i>Penicillium sp</i> a pH y temperatura óptima.....	51
7.4 Producción enzimática en biorreactor BIOESTAT de 6.6 L	54
7.4.1 Producción de N-acetilhexosaminidasas con <i>Penicillium sp</i>	54
7.4.2 Producción de N-acetilhexosaminidasas con <i>B. bassiana</i> a pH y temperatura óptima.....	57
7.5 Determinación del peso molecular de N-acetilhexosamidadas	60

7.6 Purificación de los extractos enzimáticos de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Penicillium sp</i> con actividad Nhasa.....	62
7.6.1 Análisis electroforético (SDS-PAGE)	67
7.6.2 Ensayo de Actividad con sustratos fluorogénico sintético.....	69
7.6.3 Producción de quitin-oligosacáridos mediante hidrólisis enzimática.....	71
7.6.4 Evaluación del mecanismo hidrolítico.....	74
8. CONCLUSIONES.....	79
9. RECOMENDACIONES	81
10. BIBLIOGRAFÍA	82
11. ANEXOS	90

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular y enlaces de hidrogeno de α -quitina y β -quitina.	22
Figura 2. Estructura química de la quitina y celulosa	23
Figura 3. Estructura tridimensional de enzimas GH.	26
Figura 4. Configuración anomérica de la glucosa.	28
Figura 5. Mecanismo de inversión de las glucosil hidrolasas	29
Figura 6. Mecanismo de retención de las glucosil hidrolasas.....	29
Figura 8. Morfología de <i>B. bassiana</i>	32
Figura 9. Características macroscópicas de <i>B. bassiana</i>	32
Figura 10. Modo de infección de <i>B. bassiana</i> en insectos	33
Figura 11. Morfología de <i>Penicillium sp.</i>	35
Figura 12. Características microscópicas de <i>Penicillium sp</i> observadas a 40X	49
Figura 13. Características macroscópicas de <i>Penicillium sp</i>	50
Figura 14. Producción de Nhasas de <i>Penicillium sp</i> , utilizando como sustrato chapulín y tenebrio.....	52
Figura 15. Azúcares reductores y actividad específica del extracto enzimático producido por <i>Penicillium sp</i> , utilizando chapulín como sustrato.....	53
Figura 16. Azúcares reductores y actividad específica del extracto enzimático producido por <i>Penicillium sp</i> utilizando tenebrio como sustrato.	53
Figura 17. Producción de Nhasas de <i>Penicillium sp</i> en el biorreactor, utilizando como sustrato chapulín y camarón	55
Figura 18. Azúcares reductores y actividad específica del extracto enzimático producido por <i>Penicillium sp</i> en el biorreactor de 6.6 L utilizando chapulín como sustrato.	56
Figura 19. Azúcares reductores y actividad específica del extracto enzimático producido por <i>Penicillium sp</i> en el biorreactor de 6.6 L, utilizando camarón como sustrato.	56
Figura 20. Producción de Nhasas de <i>B. bassiana</i> en el biorreactor, utilizando como sustrato chapulín y camarón	57

Figura 21. Azúcares reductores y actividad específica del extracto enzimático producido por <i>B. bassiana</i> en el biorreactor de 6.6 L utilizando chapulín como sustrato.	58
Figura 22. Azúcares reductores y actividad específica del extracto enzimático producido por <i>B. bassiana</i> en el biorreactor de 6.6 L utilizando camarón como sustrato.	59
Figura 23. Gel de electroforesis (SDS-PAGE). Primer ensayo. Bandas electroforéticas Psp-Ch, Psp-C, Bb-Ch y Bb. Tinción de coomassie.....	60
Figura 24. Ensayo de actividad de los extractos de Psp-Ch, Psp-C, Bb-Ch y Bb-C utilizando un sustrato fluorogénico (4-metilumberiferil- N-acetil-β-D-glucosamina)..	61
Figura 25. Precipitación con sulfato de amonio de Psp-Ch a diferentes porcentajes de saturación con (NH ₄) ₂ SO ₄	63
Figura 26. Precipitación con sulfato de amonio de Bb-Ch a diferentes porcentajes de saturación con (NH ₄) ₂ SO ₄	63
Figura 27. Gel de electroforesis (SDS-PAGE). Bandas electroforéticas Psp-Ch y Bb-Ch antes de la purificación. Tinción de plata. Marcador Thermo.....	67
Figura 28. Gel de electroforesis (SDS-PAGE). Bandas electroforéticas Psp-Ch y Bb-Ch. Tinción de Coomassie. Marcador Thermo.	68
Figura 29. Ensayo de actividad Nhasa de las bandas proteicas utilizando sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil N-acetil-β-D-glucosamina) de Psp-Ch y Bb-Ch.	70
Figura 30. Producción de quitin-oligosacáridos mediante hidrólisis enzimática utilizando extracto enzimático purificado de Psp-Ch y sustrato comercial (N, N', N''-Triacetilquitotriosa) a diferentes pH's (3, 4, 5 y 6).....	71
Figura 31. Producción de quitin-oligosacáridos mediante hidrólisis enzimática utilizando extracto enzimático purificado de Bb-Ch y sustrato comercial (N, N', N''-Triacetilquitotriosa) a diferentes pH's (3, 4, 5 y 6).....	72
Figura 32. Evaluación del mecanismo hidrolítico. a) Estándares de los N-acetil-quitin-oligosacáridos (monómero (GlcNAc), dímero (GlcNAc) ₂ y trímero (GlcNAc) ₃ . b) quitin-oligosacáridos de la hidrólisis enzimática del Psp-Ch con un trímero (GlcNAc) ₃ como sustrato. TOF MS Análisis de formas anoméricas.	75
.....	76

Figura 33. Evaluación del mecanismo hidrolítico. a) Estándares de los N-acetil-quitin-oligosacáridos (monómero (GlcNAc), dímero (GlcNAc) ₂ y trímero (GlcNAc) ₃ . b) quitin-oligosacáridos de la hidrólisis enzimática del Bb-Ch con un trímero (GlcNAc) ₃ como sustrato. TOF MS Análisis de formas anoméricas.	76
Figura 34. Curva estándar de actividad Nhasa por el método de Tronsmo y Harman (1993) empleando una solución madre de p-nitrofenol a una concentración de 100 µg/mL	90
Figura 35. Curva estándar de proteína por el método de micro ensayo de Bradford (1976) usando seroalbúmina bovina (BSA).....	91
Figura 36. Curva estándar de azúcares reductores por el método de Miller (1954) usando N-acetilglucosamina (NAG).	91
Figura 37. Curva estándar para la determinación del Peso Molecular (PM) de proteínas de Quitinasas mediante SDS-PAGE (Laemli, 1970).	92
Figura 38. Intervalos de actividad (mU/mL) vs Tratamiento	95
Figura 39. Intervalos de Horas vs Tratamiento.....	97

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Estudios de mecanismos hidrolíticos de productos anoméricos proveniente de diferentes fuentes.....	30
Tabla 2. Estudios de producción de extractos enzimáticos con actividad quitinasa en <i>B. bassiana</i> y <i>Penicillium sp</i>	36
Tabla 3. Condiciones de producción de N-acetilhexosaminidasas.....	46
Tabla 4. Características microscópicas de <i>Penicillium sp</i>	49
Tabla 5. Purificación de N-acetilhexosaminidasas de <i>Penicillium sp</i> con chapulín como sustrato (Psp-Ch).....	65
Tabla 6. Purificación de N-acetilhexosaminidasas de <i>Beauveria bassiana</i> con chapulín como sustrato (Bb-Ch).....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

‰: porcentaje

°C: grados Celsius

µL: microlitro

µm: micrómetro

BSA: albumina sérica bovina

cm: centímetro

DP: Grado de polimerización de un oligómero (por sus siglas en inglés "degree of polymerization")

E/S: enzima /sustrato

FML: Fermentación en Medio Líquido

ft: pie

GH: Glucosil hidrolasas

h: hora

HCl: Ácido clorhídrico

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

kDa: kilo Dalton

L: Litro

M: marcador

mBar: milibar

min: minutos

mg: miligramo

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

M: molaridad

mU: miliunidades

nm: nanómetro

Nhasa: N-acetilhexosaminidasas

pNAG: p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida

Psi: unidad de presión

p/v: peso / volumen

rpm: revoluciones por minuto

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

V: Volts

v/v: volumen / volumen

RESUMEN

En este estudio se identificó el mecanismo hidrolítico de extractos enzimáticos con actividad Nhasa provenientes de hongos filamentosos como *B. 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 utilizando chapulín como inductor. El proceso de purificación inició con la precipitación con sulfato de amonio al 80% de saturación (0.40 mU/g y 0.46 mU/g para Psp-Ch y Bb-Ch respectivamente) seguida de ultrafiltración con membrana de 30 kDa (para Psp-Ch 0.30 mU/g y para Bb-Ch 0.59 mU/g de actividad específica Nhasa), diálisis y diafiltración (0.45 mU/g y 0.40 mU/g para Psp-Ch y 0.27 mU/g y 0.36 mU/g para Bb-Ch). En las etapas de purificación, la ultrafiltración tuvo el mayor porcentaje de rendimiento de 24 % purificando 1.2 veces para Psp-Ch y de 69 % purificando 2.6 veces para Bb-Ch. Se evaluó el efecto de pH y temperatura en conjunto en los extractos enzimáticos purificados de ambos microorganismos donde se obtuvieron para Psp-Ch 19 mU/mL de actividad Nhasa en un pH de reacción de 6 y a 20 °C, mientras que con el extracto Bb-Ch la mayor actividad Nhasa (16 mU/mL) se obtuvo a pH 5 y 20 °C, siendo para Psp-Ch 1.2 veces mayor.

Los productos de hidrólisis de sustrato utilizando ambas enzimas indicaron (por medio de espectroscopía de masas) que el mecanismo de reacción es de retención. En conclusión, la producción de Nhasas se favorece con chapulín, ya que la interacción hongo-sustrato es más directa debido a la estructura de la cutícula.

ABSTRACT

In this study, the hydrolytic mechanism of enzymatic extracts with Nhasa activity from filamentous fungi such as *B. bassiana* and *Penicillium sp* was identified using two chitin sources: shrimp and grasshopper. It was demonstrated that *B. bassiana* and *Penicillium sp* achieve higher Nhasa activity using grasshopper as inductor. The purification process started with precipitation with 80 % saturated ammonium sulfate (0.40 mU/g and 0.46 mU/g for Psp-Ch and Bb-Ch respectively) followed by ultrafiltration with 30 kDa membrane (for Psp-Ch 0.30 mU/g and Bb-Ch 0.59 mU/g of Nhasa specific activity), finally, dialysis and diafiltration (0.45 mU/g and 0.40 mU/g for Psp-Ch and 0.27 mU/g and 0.36 mU/g for Bb-Ch). In the purification stages, ultrafiltration produced the highest percentage of yield (24 %) purifying 1.2 times for Psp-Ch whilst for Bb-Ch a yield of 69 % was obtained purifying 2.6 times for Bb-Ch. The effect of pH and temperature in the purified enzymatic extracts of both microorganisms were evaluated. In Psp-Ch the maximum Nhasa activity (19 mU/mL) was obtained at pH 6 and 20 ° C, while with the extract Bb-Ch the highest Nhasa activity (16 mU/mL) was obtained at pH 5 and 20 ° C, being for Psp-Ch 1.2 times higher.

Hydrolysis products using both enzymes indicated (by mass spectroscopy) that the reaction mechanism is retention. In conclusion, the production of Nhasas is favored with grasshopper, since the fungus-substrate interaction is more direct due to the structure of the cuticle.

INTRODUCCIÓN

La quitina poli [β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranos], es el segundo polímero más abundante después de la celulosa, desempeña un papel importante ya que por su estructura molecular permite formar auténticos tejidos que confieren resistencia y soporte -como componente estructural- al exoesqueleto de artrópodos, arácnidos, insectos, nemátodos, anélidos y otros invertebrados; a la concha exterior de crustáceos, braquiópodos y moluscos (Pastor, 2004).

Las enzimas quitinolíticas actúan de manera sinérgica o sucesiva para hidrolizar la quitina en mono y oligomonómeros. Éstas son producidas por una amplia gama de organismos, incluyendo bacterias, hongos, insectos, plantas y animales; las cuales tienen diferentes funciones en el organismo productor tales como nutrición, morfogénesis, y defensa contra los patógenos que contienen quitina (Adrangi y Faramarzi, 2013).

Los quitin-oligosacáridos producidos por quitinasas provenientes de hongos filamentosos en hidrólisis enzimática han despertado el interés debido a su amplio rango de aplicaciones en la agricultura, industria alimentaria, farmacéutica o del plástico. Se han desarrollado productos nutracéuticos, nematocidas y funguicidas; algunos tipos de plásticos biodegradables y en el tratamiento de aguas residuales. El interés comercial de la utilización de derivados de quitina ha llevado a la necesidad de buscar fuentes estables, seguras y baratas de enzimas quitinolíticas aisladas de microorganismos, como los hongos.

Estudios realizados han elucidado el mecanismo de los productos de hidrólisis de quitinasas mediante HPLC, revelando que la mayoría de las Nhasas tienen mecanismo de retención indistintamente de la fuente de procedencia (hongos, bacterias y plantas). Aunque los estudios que incluyen hongos, no se han efectuado en quitinasas de *B. bassiana* y *Penicillium sp.*

En este estudio se proponen tres fuentes de quitina de la región: cutícula de chapulín, exoesqueleto de camarón y cutícula de escarabajo harinero (tenebrio) como inductores

de quitinasas de *B. bassiana* y *Penicillium sp.* Así mismo se determinó el mecanismo de acción sobre la quitina de ambas enzimas por métodos espectroscópicos, indicando que las Nhasas analizadas hidrolizan la quitina reteniendo su configuración.

1. ANTECEDENTES

1.1 La quitina y sus características

La quitina, poli [β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa], es un polisacárido básico natural, aislada por primera vez por Braconnot en 1811 a partir de hongos superiores e identificada por primera vez en 1923 por Odier quien le dio el nombre de quitina, del griego χιτών, que significa túnica o cobertura. Sus propiedades únicas incluyen la capacidad para formar películas (formación polioxisales), quelatos de iones metálicos y ópticos con características estructurales (Kumar *et al.*, 2000).

La quitina es altamente hidrófoba, insoluble en agua y a la mayoría de los disolventes orgánicos. Es soluble en hexafluoro isopropanol, hexafluoroacetona, cloroalcoholes en conjugación con soluciones acuosas de ácidos minerales y dimetilacetamida que contienen cloruro de litio al 5%. La hidrólisis de la quitina con ácidos concentrados bajo condiciones drásticas produce solo D-glucosamina (Kumar *et al.*, 2000).

Las fibras de quitina se distinguen de otras por poseer propiedades características como: la biocompatibilidad, la no toxicidad, la biodegradabilidad, etc. (Pillai *et al.*, 2009). Estas propiedades en conjunto con algunas propiedades mecánicas han logrado obtener nuevos materiales biomédicos con aplicación biotecnológica a partir de la quitina, los cuales sirven como suturas, vendajes para heridas en humanos; en plantas sirven para cicatrizar tejidos dañados de la corteza de árboles (Hirano, 1999; Yang *et al.*, 2001). También presentan propiedades físicas como filmógenas, gelificantes y espesantes, lo cual le confiere aplicaciones alimenticias y cosméticas (Rinaudo, 2008).

1.1.1 Estructura de la quitina

Dependiendo de su fuente, la quitina se produce como dos alomorfos α y β , que pueden diferenciarse por métodos infrarrojos, espectroscopía de RMN en estado sólido y difracción de rayos X. Se ha descrito la γ -quitina sin embargo a partir de un análisis detallado, parece que es sólo una variante de la α -quitina (Rinaudo, 2006).

La diferencia entre las quitinas se encuentra en la disposición de sus cadenas en la región cristalina. En la α -quitina, sus cadenas en la región cristalina se presentan en disposición antiparalela (figura 1) (Pastor, 2004).

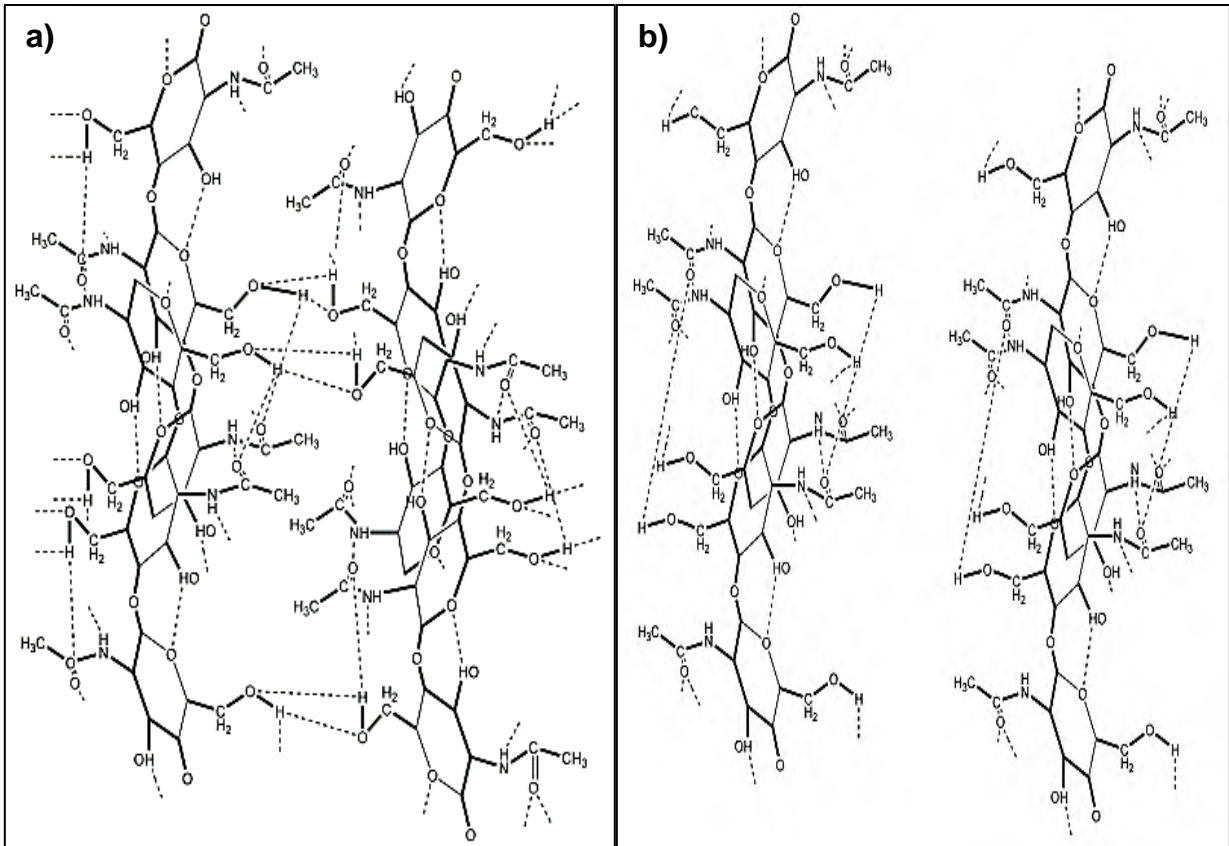


Figura 1. Estructura molecular y enlaces de hidrogeno de a) α -quitina, b) β -quitina. Tomado de Khor, 2001.

La α -quitina es la más abundante, posee una estructura compacta la cual se debe a su cristalinidad, en la cual su cadena antiparalela favorece un fuerte enlace o puente de hidrógeno (Al Sagheer *et al.*, 2009).

La β -quitina muestra mayor solubilidad, reactividad y mayor afinidad hacia solventes e hinchamiento en comparación con α -quitina (Hajji *et al.*, 2014). Estas características se deben a los puentes de hidrógeno débiles atribuible a la disposición paralela de las cadenas principales (Rinaudo, 2008). Se produce también en invertebrados, así como

en la lorica de algunas algas o protozoos. Una forma particularmente pura de β -quitina se encuentra en las espinas monocristalinas excretados por los *Thalassiosira fluviatilis* diatomeas. Hasta hoy, no ha sido posible obtener β -quitina por biosíntesis *in vitro* (Roberts, 1992).

1.1.2 Diferencia entre la quitina y la celulosa

La quitina es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa (Al Sagheer *et al.*, 2009). La diferencia entre ellas se encuentra en el carbono 2 (figura 2) donde la quitina contiene un grupo acetamido y la celulosa uno hidroxilo (Pastor, 2004).

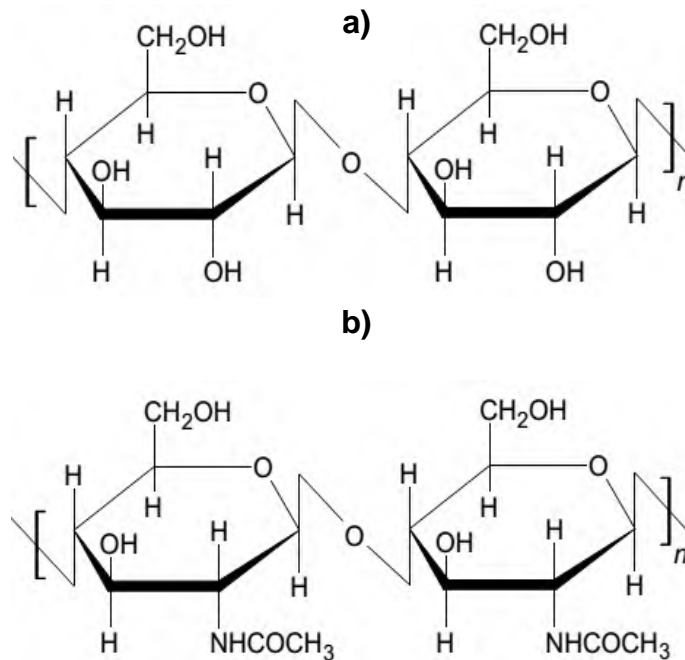


Figura 2. Estructura química de la quitina (a) y celulosa (b)
Modificado de Kumar *et al.*, (2000)

1.1.3 Fuentes de quitina

Dada la naturaleza de la quitina, está se puede aislar de exoesqueletos de crustáceos, moluscos, insectos y hongos con excepción de los oomicetos, artrópodos y nemátodos (Al Sagheer, 2009).

1.1.3.1 La quitina de crustáceos

En crustáceos, la quitina se produce en sus conchas y se presenta como material fibroso embebido en una hélice proteica de seis hilos (Pillai *et al.*, 2009). La α -quitina se encuentra en hongos y paredes celulares de levadura, en langosta, tendones y conchas de cangrejo, en cáscaras de camarón (Rinaudo, 2008). La fermentación de crustáceos puede facilitar la extracción de quitina (Liu *et al.*, 2014).

La cáscara de camarón contiene 15-40 % de quitina, proteínas (20-40 %) y carbonato de calcio (20-50 %); los pigmentos y sales metálicas son componentes menores. El rendimiento de las conchas de camarón seco es de 30-35 %, el rendimiento de la cascara de cangrejo es menor debido al alto contenido de carbonato de calcio (Kurita, 2005).

1.1.3.1 La quitina de insectos

En insectos, la quitina funciona como material de andamiaje con las cutículas de la epidermis y la tráquea, así como las matrices peritróficas que recubren el epitelio intestinal. El crecimiento de los insectos y la morfogénesis son estrictamente dependientes de la capacidad de remodelar estructuras quitinosas, para este propósito, producen continuamente quitin-sintasas y enzimas quitinolíticas en diferentes tejidos (Merzendorfer *et al.*, 2003). La quitina en el insecto representa del 3-13 % (p/p) de su peso seco (Muthukrishnan *et al.*, 2012).

En la degradación de la quitina participan enzimas, estas enzimas se denominan quitinasas, las cuales son enzimas hidrolíticas que rompen enlaces glucosídicos de la molécula de la quitina.

1.2 Quitinasas

Las quitinasas son enzimas pertenecientes al grupo de las glucosil hidrolasas (GH) responsables de la degradación biológica de la quitina, se encuentran ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales superiores. Sin embargo, la mejor producción se observa en los microorganismos (Fortuna, 2009).

1.2.1 Clasificación de las quitinasas

Las quitinasas se pueden clasificar por su modo de acción, con base en su secuencia de aminoácidos (familia), por su fuente de procedencia y por el tipo de mecanismo.

1.2.1.1 Por su modo de acción. Se clasifican en 2 categorías: a) endoquitinasas (E.C. 3.2.1.14) que escinden la cadena de quitina en sitios internos de una manera aleatoria dando como productos principales el disacárido compuesto de N-acetilglucosamina (NAG) denominado N-diacetilquitobiosa o quitobiosa, algo de quitotriosa y pequeñas cantidades de otros oligosacáridos; b) exoquitinasas como: las exo-quitobiasas (E.C.3.2.1.29) que actúan principalmente sobre la quitobiosa, para dar dos moléculas de NAG; las N-acetilhexosaminidasas (Nhasa) (E.C.3.2.1.52) que separan una a una las moléculas de NAG a partir de la quitina; las exo-N-diacetil-quitobiohidrolasas que catalizan la liberación, una a una, de N-diacetil-quitobiosa a partir de los productos liberados por las endoquitinasas; y c) exoquitinasas (sacarificantes) que liberan moléculas de quitobiosa proveniente de la quitina; estas tres últimas separan las moléculas a partir del extremo no reductor (Cruz y Rojas, 1999)

1.3.1.2 Con base en la secuencia de aminoácidos. Estas enzimas se clasifican en las familias 3, 18, 19, 20, 23, 48 y 84 de las glucosil hidrolasas (tomado de la base de datos Carbohydrate-Active enzymes, 2017, <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). Las familias GH18, GH20 y GH84 tienen una estructura de barril (β/α)₈. Las familias GH19 y GH23 adoptan una estructura de sándwich $\beta+\alpha$, es decir, regiones alfa y betas separadas. La familia GH48 tiene una estructura de barril (α/α)₆ formada por un centro de 6 α -hélices rodeado en sus extremos por otras 6. La familia GH3 tiene una estructura de barril bipartida (β/α)₈ + (α/β)₆ (Adrangi y Faramarzi, 2013) figura 6.

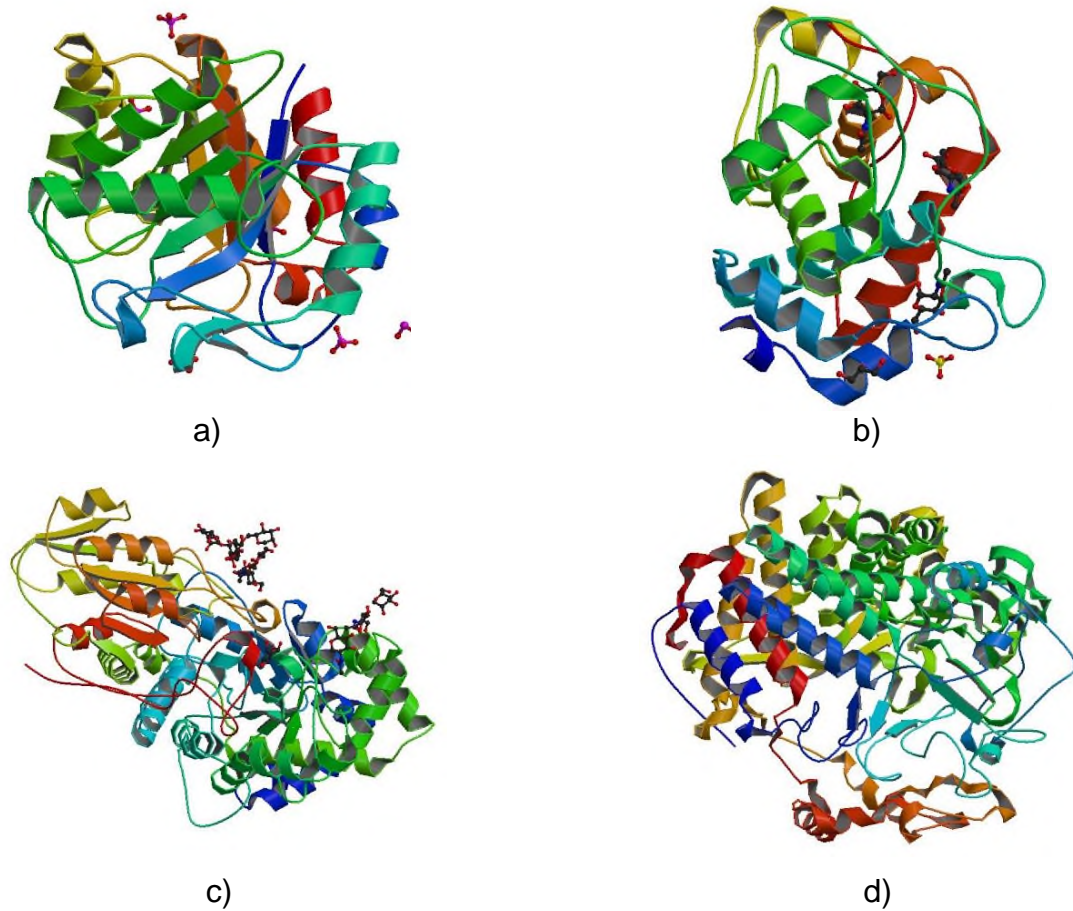


Figura 3. Estructura tridimensional de enzimas GH.

a) Quitinasa de *Aspergillus fumigatus* de la familia GH18, estructura de barril (β/α)₈. b) Quitinasa de *Carica papaya* de la familia GH19, estructura de cristal $\alpha + \beta$. c) Glucohidrolasa de *Hordeum vulgare* de la familia GH3, dominio bipartido que contiene una estructura de barril (β/α)₈ y sándwich (α/β)₆. d) Celobiohidrolasa de *Clostridium thermocellum* de la familia GH48, estructura de barril (α/α)₆.

1.3.1.3 Fuente de procedencia. Las quitinasas también se pueden clasificar considerando fuente de procedencia y la secuencia de los dominios catalíticos.

- En plantas se dividen en 7 clases (I-VII). Las clases I, II, IV, VI y VII pertenecen a la familia 19 mientras que las clases III y V son miembros de la familia 18 (Sarma *et al.*, 2012).

- En insectos, con base a su secuencia homóloga y la arquitectura del dominio, la mayoría de las quitinasas pertenecen a la familia 18, la cual se subdivide en 8 grupos (I-VIII), excepto para la quitinasa de *Gastrophysa atrocyanea* que se ha clasificado en la familia 48 (Zhang *et al.*, 2011).
- En hongos, las quitinasas pertenecen a la familia GH18 y se subdividen en 3 subgrupos (A-C). El subgrupo A contiene un solo dominio catalítico y no tiene CBM (Modulo de unión-carbohidrato), son enzimas procesadoras debido a que tienen una hendidura profunda en el sitio de unión al sustrato. El subgrupo B no son procesadoras y además, en su dominio catalítico comprenden un CBM con C-terminal o un dominio no estructurado rico en serina/treonina. El subgrupo C consiste en CBMs con N-terminal enlazados a un dominio catalítico C-terminal. Tanto el subgrupo A como el C, tienen una hendidura profunda y estrecha en el sitio de unión al sustrato indicando su naturaleza procesadora (Hartl *et al.*, 2012). La familia GH18 con estructura de barril puede ser típico de porinas, las cuales atraviesan membranas o se unen a ligandos hidrofóbicos, lo cual en el caso de hongos filamentosos es requisito para su unión con otras proteínas y pigmentos (Guitierrez *et al.*, 2000).
- Las quitinasas bacterianas se encuentran en las familias 18, 19 y 23, la mayoría de ellas en la familia 18. Con base en la homología de secuencias, las de esta familia (18) se clasifican en tres subfamilias: A, B y C (Li y Greene, 2010). La distribución de la familia 19 parece estar restringida a actinobacterias y bacterias púrpuras. Actualmente, solo se ha identificado una quitinasa de la familia 23 aislada de *Ralstonia* sp. A-471 y contiene un dominio N-terminal que enlaza quitina y que está unido a un dominio catalítico C-terminal (Prakash *et al.*, 2010).

1.3.1.4 Mecanismo de acción. La catálisis se puede presentar en dos formas, mediante un mecanismo de retención de doble desplazamiento y/o uno de inversión de desplazamiento sencillo (Fortuna, 2009). En bacterias, las quitinasas de las familias 19, 23 y 48 tienen un mecanismo de inversión de desplazamiento sencillo, mientras que en la familia 18 de bacterias y hongos se presenta un mecanismo de retención de

doble desplazamiento. Las quitinasas de plantas de las familias 3 y 18 tienen mecanismo de retención de doble desplazamiento, las de la familia 19 presentan de inversión de desplazamiento sencillo (Adrangi y Faramarzi, 2013).

1.3.2 Mecanismo de las quitinasas

Las quitinasas catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico, el cual está mediado por la acción de dos residuos catalíticos presentes en el centro activo, uno de los cuales actúa como donador de protones y el otro como nucleófilo o base.

Para poder entender el mecanismo es necesario recordar algunos conceptos, como que un nucleófilo es un donador de electrones y que una configuración anomérica se refiere a la orientación espacial determinada por el átomo del carbono anomérico (α o β) situado en la posición 1 de la molécula (Polaina, 2004) (figura 7). La hidrólisis de la quitina, como se ha mencionado puede ser por vía retención o inversión de la configuración.

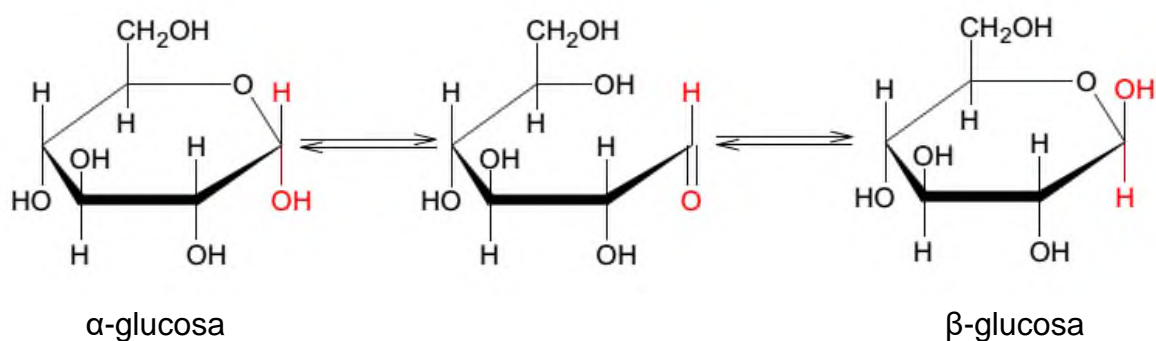


Figura 4. Configuración anomérica de la glucosa.

(Wade, 2004)

1.3.2.1 Mecanismo de inversión de desplazamiento sencillo. Éste presenta una inversión de la configuración anomérica partiendo del sustrato inicial, donde una molécula de agua actúa como nucleófilo y consta de una sola etapa mediante un proceso catalítico ácido-base (figura 8). Uno de los dos residuos catalíticos opera como base, facilitando el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico y el otro, como ácido, asistiendo la separación del oxígeno (Polaina, 2004). Lo anterior se sustenta a partir de estudios de cristalografía de rayos X (Fortuna, 2009).

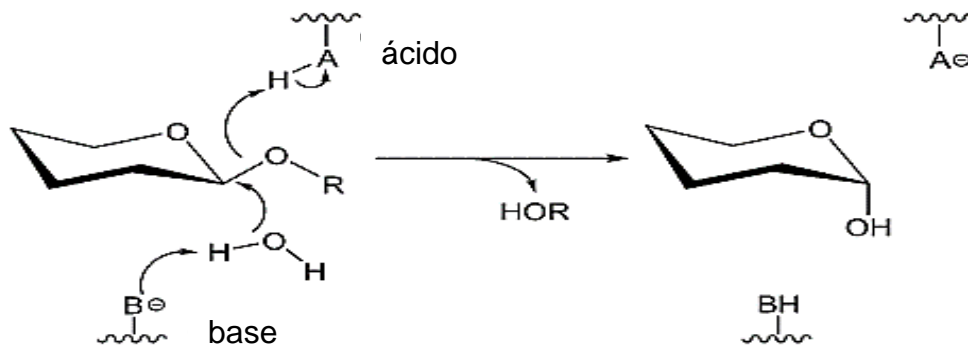


Figura 5. Mecanismo de inversión de las glucosil hidrolasas

AH: sitio catalítico ácido, B: sitio catalítico base, HOR: nucleófilo de oxígeno, a menudo una molécula de agua (Modificado de Vuong, 2010).

1.3.2.2 Mecanismo de Retención por doble desplazamiento. En este proceso tiene lugar el ataque del residuo nucleófilo al carbono anomérico, dando como resultado la formación transitoria de un enlace covalente entre la enzima y el glucósido. Este enlace es lo suficientemente estable como para permitir la separación del centro activo de la parte liberada y su reemplazamiento por una molécula de agua, con asistencia de un segundo residuo catalítico ácido/base que actúa en la primera etapa como ácido, protonando el oxígeno glucosídico, y como base en la segunda, sustrayendo un protón de una molécula de agua que escinde el enlace covalente transitorio y regenera a la enzima, como se observa en la figura 9 (Polaina, 2004).

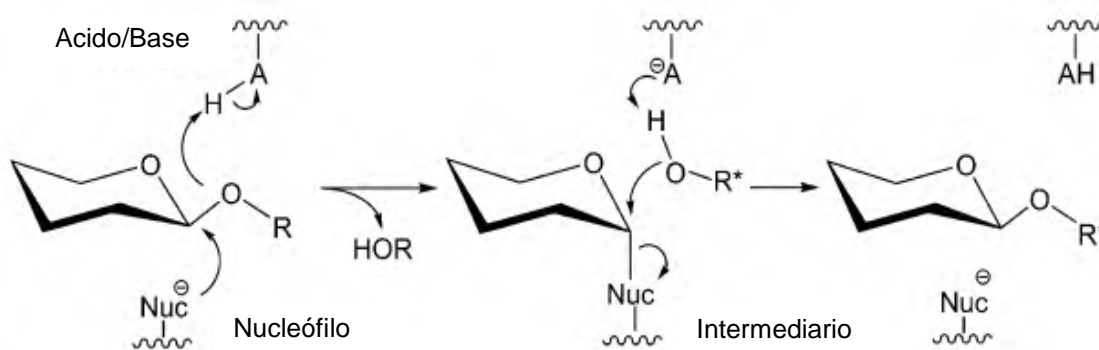


Figura 6. Mecanismo de retención de las glucosil hidrolasas.

AH: un sitio catalítico ácido, B: un sitio catalítico base, R: derivado de un carbohidrato, HOR: nucleófilo de oxígeno, a menudo una molécula de agua (Modificado de Vuong, 2010).

Según los mecanismos de reacción de las quitinasas mostrados anteriormente, se puede observar que los hongos pertenecen específicamente a la familia de las GH18 y presentan un mecanismo de retención. En han realizado varios estudios referentes a estos mecanismos (tabla 1), donde se muestran diferentes fuentes de procedencias de las quitinasas, mostrando con esto que, dependiendo de la fuente y la familia, mostraran el tipo de mecanismo.

Tabla 1. Estudios de mecanismos hidrolíticos de productos anoméricos provenientes de diferentes fuentes.

Fuente	Enzima	Familia	Sustrato	Mecanismo hidrolítico	Autor
Clara de Huevo	Lisozima	GH19	N-acetilhexasácaridos (anomerismo α)	Inversión	Koga et al., 1998
Ñame	Quitinasa E	GH19		Retención	
Arroz expresado <i>Pichia pastoris</i>	OsChib1a	GH19	Hexasácarido (anomerismo β)	Inversión	Sasaki et al., 2002
	OsChib1b	GH18		Retención	
<i>Bacillus circulans</i> WL-12 expresadas en <i>E. coli</i>	ChiA1	Gh18		Retención	
Hoja de piña (<i>Ananas comosus</i>)	PL Chi-A	GH18	Pentasácarido (anomerismo β) Hexasácarido (anomerismo β)	Retención	Taira, 2005
	PL Chi-B	GH19		Inversión	
	PL Chi-C	GH19		Inversión	
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Quitinasa liberadora de LN ₂ (N-acetil-lactosamina)	GH18	Tetrámero de Galactosa y N-acetilglucosamina enlazado al <i>p</i> -nitrofenil (anomerismo α)	Retención	Murata et al., 2005
<i>Serratia marcescens</i>	ChiB	GH18	Tetrasácarido (anomerismo α)	Retención	Sørli et al., 2007
<i>Aspergillus niger</i>	Cfcl-MBP (Representación filogenética de Clado de <i>A. niger</i> - Proteína de unión a la maltosa)	GH18	Tetrasácarido (anomerismo β)	Retención	Maarel et al., 2012
Estómago del pez <i>Pennahia argentatus</i>	Quitinasa	GH18	hexasácarido (anomerismo β)	Retención	Ikeda et al., 2013

1.3 Características particulares de hongos filamentosos

El análisis de más de 25 genomas de hongos hasta ahora ha demostrado que las quitinasas fúngicas pertenecen exclusivamente a la familia GH 18.

Los hongos por su gran adaptabilidad a diferentes variables ambientales poseen estructuras diversas y maquinarias metabólicas impresionantes, por lo que han sido empleados en muchas áreas biotecnológicas. Dentro de los cuatro filos principales en que se divide este reino, los Ascomycota y Basidiomycota han sido empleados ampliamente por la biotecnología. En este trabajo se estudiaron dos especies fúngicas del primer filo, los cuales se caracterizan por ser filamentosos.

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariotas, aerobios facultativos, se producen de forma sexual o asexual mediante esporas. Los hongos tienen ausencia de clorofila, no pueden realizar fotosíntesis y dependen de materia orgánica ya elaborada para nutrirse. Estos poseen una pared celular formada por quitina, por lo que deben absorber nutrientes simples y solubles, al contrario de fagocitar los alimentos (Arias *et al.*, 2008).

1.3.1 *Beauveria bassiana*

Los hongos entomopatógenos son agentes de control biológico de insectos y artrópodos, frecuentemente causan epizootias y reducen significativamente las poblaciones plaga (Maranhão, 2013).

B. bassiana es un hongo entomatógeno cosmopolita que infecta a más de 700 especies de insectos y ha sido evaluado a nivel laboratorio contra un gran número de insectos plaga (Peteira *et al.*, 2011).

El género *Beauveria* también conocido como la forma imperfecta del anamorfo *Cordyceps bassiana*. Tiene una alta variabilidad genética, lo que permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales y así atacar a distintas poblaciones de insectos (López *et al.*, 2015).

B. bassiana ramifica su micelio para formar conidióforos que son simples e irregulares, los cuales terminan en vértices en forma de racimos, la base de la célula conidiógena es globosa presentando un adelgazamiento en el área donde se insertan los conidios, los cuales son hialinos, de redondos a ovoides, sus medidas van de 2-3 x 2 μm ., éstos se insertan sobre conidióforos curvados en forma irregular o dispuestos en zig-zag (figura 3). El hongo se caracteriza por presentar una apariencia polvosa, blanca algodonosa o amarillenta cremosa en cajas Petri (Tanada y Kaya, 1993) (figura 4).

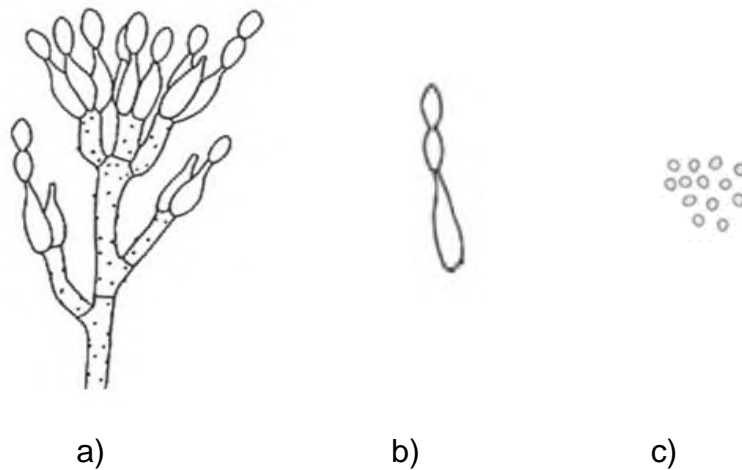


Figura 8. Morfología de *B. bassiana*

a) Conidióforos, b) Fiálide, c) Conidios. Modificado de Tanada y Kaya, 1993



Figura 9. Características macroscópicas de *B. bassiana*

Modificado de Mourão, 2002.

1.2.1.1 Modo de acción

A diferencia de otros patógenos, los hongos entomopatógenos infectan insectos no sólo a través del intestino, sino también a través de la cutícula por espiráculos y principalmente mediante penetración activa; esta propiedad le ofrece la posibilidad de infectar huéspedes independientemente de los hábitos alimenticios del insecto (Nicholls, 2008).

La penetración de la cutícula se logra utilizando una combinación de presión mecánica de puntas de hifas en crecimiento y degradación enzimática. La penetración puede ser directa, o a través de placas penetrantes que pueden fracturar la cutícula (Hajek y St Leger, 1994).

La cutícula de los insectos está formada por proteínas y quitina asociada con lípidos y compuestos fenólicos, los cuales tienen actividades antifúngicas, pero se ha demostrado que *B. bassiana* posee enzimas lipolíticas que los degradan. El consorcio enzimático es capaz de degradar el complejo proteína-quitina (Ferron, 1978).

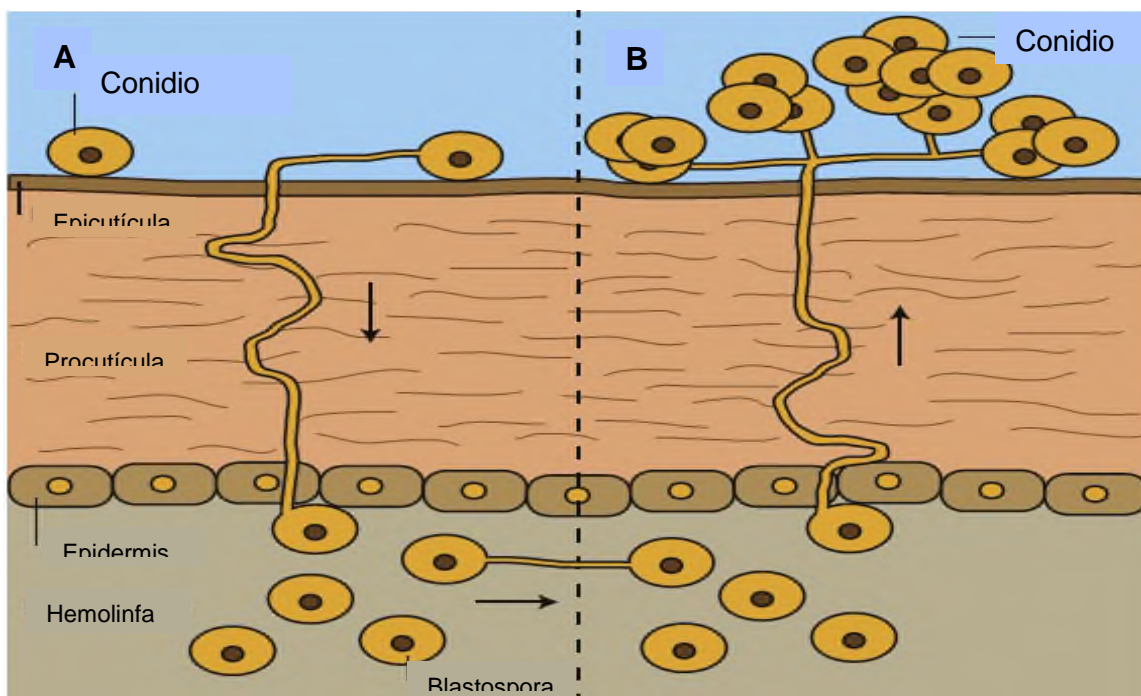


Figura 10. Modo de infección de *B. bassiana* en insectos. A) penetración, adhesión, degradación, defensa y liberación de toxinas. B) liberación de toxinas, invasión, muerte del insecto, ruptura de la cutícula del interior al exterior y esporulación del insecto. Modificado (Valero et al., 2016).

El ciclo de infección de *B. bassiana* en insectos se puede dividir en siete pasos. 1) La principal barrera para el patógeno, son las diferentes cutículas de los insectos, para permitir la infección es necesario que los conidios se adhieran a la cutícula del huésped, esto se puede hacer a través de corrientes de aire, por la dispersión de gotas de agua y el crecimiento saprofitico del hongo en el insecto (Holder *et al.*, 2005). 2) Una vez que los conidios se adhieren a la cutícula, éstos geminan y forman tubos germinales, que penetran perforando la cutícula para invadir el huésped (Wagner y Lewis, 2000). 3) Quitina, proteínas de soporte y lípidos son los principales componentes de la cutícula, para lograr su ruptura es necesario ejercer presión mecánica sobre ella y la actuación de algunas enzimas (quitinasas y proteasas) para degradarla (Charnley *et al.*, 1991). 4) Al romper la cutícula, se permite el crecimiento de las hifas hasta invadir el hemocel, donde estas producen células *in vivo* semejantes a levaduras llamadas blastosporas (cuerpos de hifas) que evitan el sistema de defensa del insecto y se expanden en la hemolinfa (Wanchoo *et al.*, 2009). 5) Estas blastosporas circulan dentro del hemocel, donde liberan toxinas (algunas de las toxinas aisladas de *Beauveria* son: beauvericina, beauverolides, bassianolide, isarolides, ácido oxálico y los pigmentos tenellina y bassianina (Roberts, 1981)) y se alimentan de la hemolinfa. 6) El éxito de la invasión consiste en desviar la respuesta inmune del insecto. 7) Una vez que el insecto muere, los conidios rompen la cutícula desde el interior y esporulan en el insecto; así comienzan una nueva invasión (Valero *et al.*, 2016) (figura 4).

1.3.2 *Penicillium* sp

En 1809 se describió por primera vez el género *Penicillium* (Link). Las especies de *Penicillium* ubicuas son de amplia distribución en la naturaleza y abundantes, por lo que son consideradas comunes (Martínez *et al.*, 2004).

Las especies de *Penicillium* se desarrollan en la superficie de materias orgánicas húmedas, feculentas, azucaradas, pectínicas. Son aerobios, y aunque poco exigentes en este aspecto, su micelio es superficial, rara vez las hifas penetran 4 o 5 mm en el sustrato (Loustau, 1950).

1.2.2.1 Morfología

Penicillium se caracteriza por formar conidios en forma ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. Existen diferentes tipos de conidióforos de *Penicillium* cuyas ramificaciones forman verticilos (figura 5). Entre los tipos de conidióforos se encuentra el de pincel monoverticilado, el cual se caracteriza por tener un verticilo de fiálide; el pincel poliverticilado tiene ramificaciones como ramas, rámulas, métulas y fiálides; y los fialoconidios son conidios generados en fiálides (Carrillo, 2003).

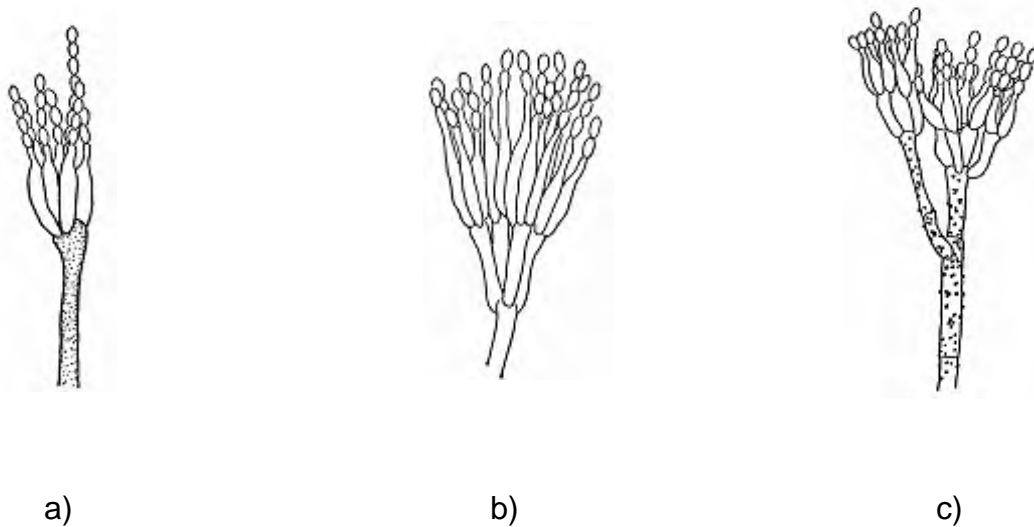


Figura 11. Morfología de *Penicillium* sp.
a) monoverticilado, b) biverticilado, c) terverticilado.
Modificado de Carrillo, 2003

En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende paralelamente el extremo apical y posteriormente se estrangula separando a la espora recién formada, a su vez formando cadenas mediante el conectivo, el cual es la porción de pared que une entre sí a los conidios.

Los filamentos o hifas alcanzan un diámetro entre 2 o 3 μm y tienen septos con un poro central. Las paredes del estípe, las ramas o las métulas pueden ser lisas, rugosas o equinuladas. La pared de las fiálides es siempre lisa. Las fiálides pueden tener forma de ánfora o ser casi cilíndricas con la porción apical en forma de cono. El tamaño máximo de las fiálides es de 15 μm y la parte terminal no supera los 3 μm de largo.

Los conidios son esféricos o elipsoidales, unicelulares, hialinos que en masa se ven de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris. La pared de los conidios es lisa o rugosa según las especies (Carillo, 2003).

En la naturaleza, la biodegradación de los sustratos sólidos como los quitino-proteicos, se realiza generalmente por un consorcio microbiano. Por su insolubilidad, tamaño, complejidad molecular y composición heterogénea, estos sustratos no son degradados dentro de la célula, si no que los organismos recurren a la secreción de enzimas con diferente especificidad, para transformarlos o hidrolizarlos en el entorno circundante. Los compuestos solubles que resultan pueden ser incorporados por las células y servir, de acuerdo con su composición, como fuentes de nitrógeno, carbono y energía (Cruz y Rojas, 1999).

Los reportes acerca la producción de extractos enzimáticos con actividad quitinasa, en particular de Nhasas en *B. bassiana* y *Penicillium sp* en fermentación líquida son escasos. En la tabla 2 se muestra que la mayoría se han realizado a nivel de matraz alcanzado actividades enzimáticas entre 0.42-700 mU/ µg.

Tabla 2. Estudios de producción de extractos enzimáticos con actividad quitinasa en *B. bassiana* y *Penicillium sp*

Fuente	Sustrato	Enzima	Sistema	Condiciones de trabajo	Actividad específica (mU/µg)	Autor
<i>B. bassiana</i> 881.2	tenebrio molitor	Nhasas	FML, matraz	5 días a 28 °C	41.00	Montesinos, 2012
<i>B. bassiana</i> 885.2	chapulín	Nhasas	FML, matraz	pH 3, por 2 días a 25 °C	2.00	Jiménez, 2015
<i>B. bassiana</i> 885.2	camarón	Nhasas	FML, matraz	pH 3, por 2 días a 25 °C	1.88	Jiménez, 2015
<i>Penicillium sp</i> LYG 0704	quitina coloidal	Quitinasas	FML, matraz	pH 7, por 3 días a 30 °C	700.00	Lee <i>et al.</i> , 2009

<i>Penicillium ochrochloron</i> MTCC 517	quitina coloidal	Quitinasas	FML, matraz	pH 7, por 4 días a 30 °C	340.90	Jadhav <i>et al.</i> , 2013
<i>Penicillium</i> <i>sp</i>	chapulín	Nhasas	FML, matraz	pH 6, por 2 días a 25 °C	0.56	Jiménez, 2015
<i>Penicillium</i> <i>sp</i>	camarón	Nhasas	FML, matraz	pH 6, por 2 días a 25 °C	0.42	Jiménez, 2015

2. JUSTIFICACIÓN

Las quitinasas son enzimas que depolimerizan la quitina, sus productos de hidrólisis son muy importantes en la industria farmacéutica, alimentaria, así como en el área de ecología. Dentro de la clasificación de las quitinasas se encuentran las Nhasas, las cuales cortan solo el extremo no reductor liberando monómeros de NAG, siendo estas de gran importancia debido a la especificidad que presentan. Estas enzimas son producidas por hongos, bacterias, plantas y escasamente animales; sin embargo, existe poca información sobre la producción de Nhasas y su mecanismo anomérico a partir de hongos, por lo que en este trabajo se estudiaron dos hongos filamentosos: *B. bassiana* (el cual es un hongo entomopatógeno, que provoca patogénesis en insectos, crustáceos y arácnidos) y *Penicillium sp* (que es un hongo fitopatógeno, que provoca enfermedades a plantas), ambos productores de quitinasas con diversas aplicaciones. Aunque *B. bassiana* y *Penicillium* son productores de Nhasas, la recuperación (en gramos) de esta producción a nivel matraz es baja. Tomando en cuenta todo lo anterior en este trabajo se propuso proporcionar información específica sobre Nhasas de *B. bassiana* y *Penicillium sp*; y el tipo de conformación anomérica de sus productos. Consecuentemente, una vez elucidando este mecanismo, permitirá identificar la aplicación adecuada de estas enzimas. También se implementaron estrategias para mejorar la recuperación de estas enzimas, basándonos en el volumen de producción y la utilización de distintos sustratos lo cual favorece la purificación y caracterización de estos extractos.

3. HIPÓTESIS

La producción y la actividad enzimática de N-acetilhexosaminidasas en *B. bassiana* y *Penicillium sp* en fermentación líquida se incrementarán al utilizar chapulín como fuente de carbono, así mismo, se obtendrán quitin-oligosacáridos los cuales presentarán un mecanismo de retención.

4. OBJETIVOS

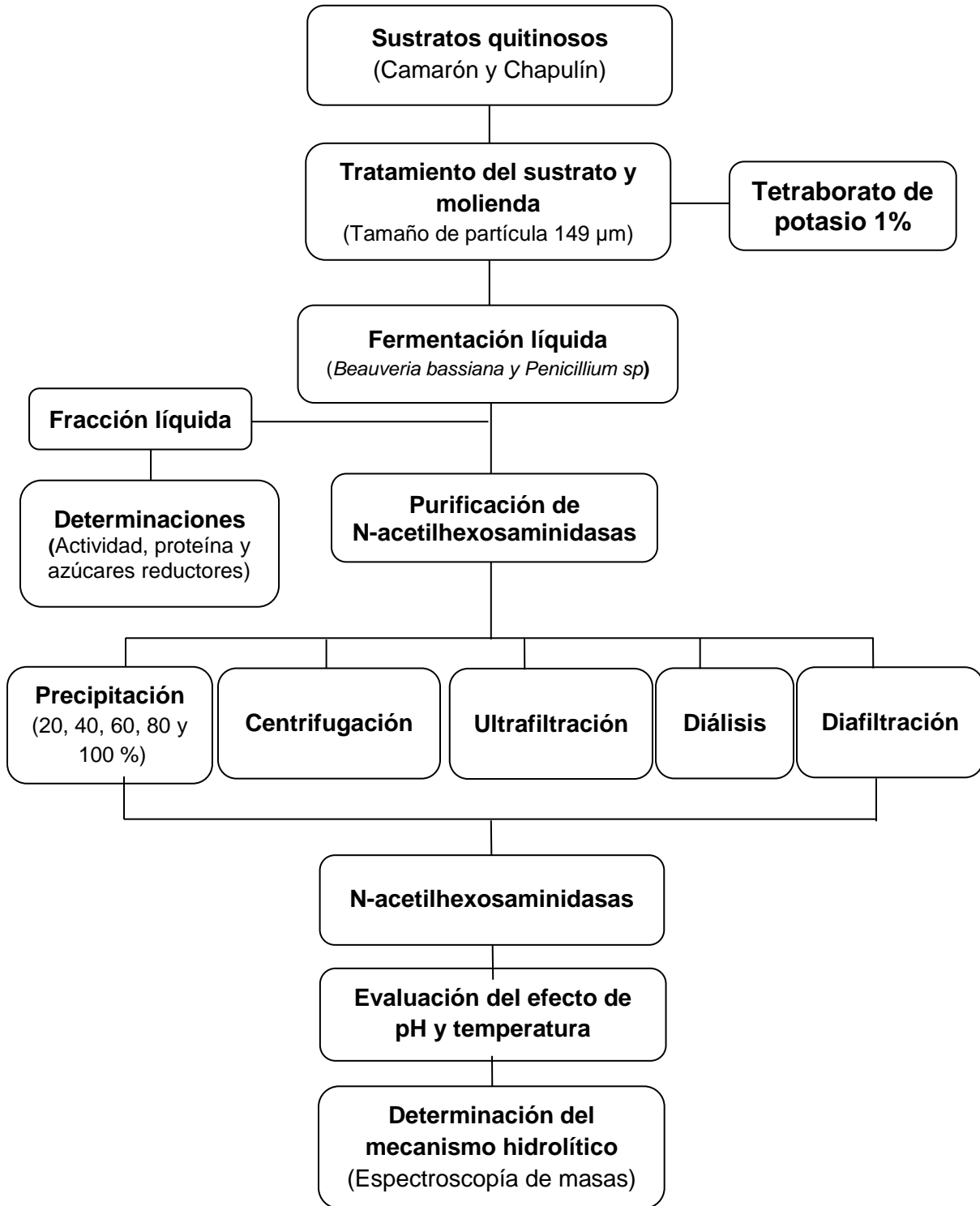
4.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Producir, purificar, caracterizar y determinar el mecanismo hidrolítico de extractos con actividad N-acetilhexosaminidasa de *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp* utilizando chapulín y camarón como fuentes de carbono.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar mediante análisis morfológico a *Penicillium sp*
- ✓ Cuantificar la producción de N-acetilhexosaminidasas a partir de dos hongos filamentosos: *B. bassiana* y *Penicillium sp*; y dos sustratos quitinosos: chapulín y camarón
- ✓ Evaluar la purificación enzimática de los extractos de N-acetilhexosaminidasas mediante métodos de purificación y separación.
- ✓ Evaluar el efecto del pH y la temperatura de los extractos enzimáticos parcialmente purificados.
- ✓ Determinar el mecanismo hidrolítico de los extractos con actividad N-acetilhexosaminidasas de *B. bassiana* y *Penicillium sp*.

5. ESTRATEGIA DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sustrato

Se utilizaron tres fuentes de residuos quitinosos, exoesqueleto de camarón (*Penaeus*) provenientes de la embalsadera en la ciudad de Alvarado Veracruz; cutícula de chapulín (*Sphenarium purpurascens*) de la comunidad de Santo Tomas Jalieza, Ocotlán, Oaxaca y cutícula de escarabajo harinero (*Tenebrio molitor*) perteneciente al insectario de la Universidad del Papaloapan (donada por el Dr. Oscar Núñez Gaona).

6.1.1 Tratamiento de desproteización de sustratos

Los sustratos quitinosos se sometieron a un tratamiento de desproteización con tetraborato de potasio al 1% a 180 rpm durante 1 h, realizando lavados con agua destilada hasta neutralizar (Jiménez *et al*, 2013), después de la desproteización las muestras se secaron en un horno (Scorpion scientific® modelo: A62060, US) a 65 °C durante 24-48 h. Posteriormente se realizó la reducción del tamaño de partícula, moliendo el sustrato en una licuadora industrial (Oster, modelo: 4090), y por último se hizo pasar por un tamiz (Test Sieve®, Alemania) estándar malla 100 (tamaño de partícula 149 µm). Una vez tratado el sustrato se conservó en bolsas herméticas con cierre dentado marca Ziploc hasta su uso.

6.2 Producción de N-acetilhexosaminidasas

6.2.1 Microorganismo

Se utilizaron dos cepas: *B. bassiana* 885.2 perteneciente a la colección de cepas de la Universidad del Papaloapan, donada por el Dr. Oscar Núñez Gaona y *Penicillium sp.* aislado de papaya en Tuxtepec, Oaxaca, ambas fueron propagadas en medio Agar Dextrosa Sabouraud al 4% en una incubadora (Prendo modelo: INO 650V-7, MX) a 25 °C. Transcurridos 8 días se realizó la extracción de esporas mediante agitación en una campana de flujo laminar (Veco, MX), utilizando Tween 80 estéril al 0.02 % p/v, al final de la extracción se obtuvo una solución a una concentración de 1×10^7 esporas/mL.

Dicha solución se conservó a 4 °C para utilizarla posteriormente de manera inmediata como inóculo en la fermentación líquida.

6.2.2 Fermentación en medio líquido.

Se llevó a cabo las fermentaciones del cultivo sumergido según las condiciones de mayor producción reportadas por Jiménez, (2015) (tabla 3), las cuales fueron escaladas a dos sistemas: matraz Erlenmeyer 2 L y biorreactor (Biostat® B, Sartorius, Alemania) de 6.6 L a las condiciones previamente reportadas. El medio de cultivo empleado fue Czapeck modificado (Cira *et al.*, 2002) (anexo 1).

Tabla 3. Condiciones de producción de Nhasas (Jiménez, 2015).

Condiciones		<i>B. bassiana</i>	<i>Penicillium sp</i>
pH		3	6
Temperatura (°C)		25	25
Velocidad (rpm)		180	180
Mayor producción (h)		48	48
Volumen (L)	matraz	1	1
	biorreactor	5	5

El medio se esterilizó por calor húmedo a 121 °C por 15 minutos y posteriormente se inoculó 1×10^7 esp/mL en campana de flujo laminar.

Para la producción de Nhasas se utilizaron 4 tratamientos, los cuales se describen a continuación:

Penicillium sp – Chapulín (Psp-Ch)

Penicillium sp – Camarón (Psp-C)

Beauveria bassiana – Chapulín (Bb-Ch)

Beauveria bassiana – Camarón (Bb-C)

No se utilizó la quitina del tenebrio, debido a que la reproducción del insecto es muy lenta y eso no permitía el escalamiento en biorreactor.

6.2.3 Obtención del extracto enzimático

La separación del extracto crudo de la biomasa se realizó mediante filtración al vacío utilizando filtros de rayón-poliéster 50-50 % de 15 x 15 cm, puestos a peso constante previamente. La fracción sólida se secó a 65 °C por 24 h en un horno (Scorpion scientific® modelo: A62060, US) y la fracción líquida se centrifugó a 5500 rpm (5585 g's) por 15 minutos a 4 °C en una centrifuga (Thermo Scientific modelo: Sorvall™ Legend™ X1 rotor: TX-200 Swinging Bucket), separando la biomasa restante del sobrenadante. El sobrenadante (centrifugado) se filtró con filtros Whatman no. 41 y se conservó por congelación.

6.3 Purificación de N-acetilhexosaminidasas

El extracto enzimático congelado se liofilizó empleando una liofilizadora (Labconco modelo: FreeZone® 4.5, US) a presión de vacío 0.016 mBar y temperatura de -49°C.

6.3.1 Precipitación

El extracto liofilizado se resuspendió en amortiguador de actividad Nhasa (citrato-fosfatos 0.2 M, pH 5.6) y se sometió a precipitación con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), evaluando porcentajes de saturación (20,40,60,80 y 100 %) a 0 °C a 200 rpm en un agitador magnético digital (IKA modelo: RO10, Alemania). Una vez lograda la homogenización total del extracto con la sal, se centrifugó a 5500 rpm (5585 g's) por 20 min obteniendo el precipitado, al cual se le determinó actividad Nhasa y proteína soluble.

6.3.2 Ultrafiltración

El precipitado enzimático se resuspendió en amortiguador de actividad Nhasa (citrato-fosfatos 0.2 M, pH 5.6) y posteriormente se ultrafiltró con un sistema de filtración tangencial (Millipore modelo: Labscale™, US) utilizando membranas con tamaño corte

de 30 y 60 kDa (Millipore modelo: Pellicon XL, US), obteniendo el retenido, al cual se le determinó actividad Nhasa y proteína.

6.3.3 Diálisis

El retenido se dializó utilizando membranas de celulosa de 33 mm de ancho con capacidad de 110 mL/ft y un corte de peso molecular de 14 kDa (Sigma modelo: D9652, US). El proceso se realizó en baño de hielo en agua desionizada, cambiándola cada dos horas por 12 h en agitación constante.

6.3.4 Electroforesis

6.3.4.1 Desnaturalizante (SDS-PAGE)

Los pesos moleculares de las proteínas presentes en cada extracto enzimático se determinaron mediante electroforesis desnaturalizante a voltaje constante 150 V de 60 a 74 min por la técnica modificada de Laemmli (1970). Las concentraciones de los geles fueron de 12 % para el separador y de 4 % para el concentrador. Se utilizó un marcador (Thermo Scientific™ modelo: PageRuler™ Prestained Protein Ladder) de una mezcla de diez proteínas recombinantes con pesos moleculares de: 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130 y 170 kDa (anexo 6). Se realizaron dos tipos de tinciones, la primera con azul de Coomassie (Bio rad, R-250) y la segunda con tinción de plata modificada por Ramírez-Coronel (2000).

6.3.4.2 Ensayo de actividad

Las bandas de las proteínas con actividad Nhasa se determinaron mediante un ensayo de actividad utilizando el sustrato fluorogénico. Se cortaron las bandas del gel proveniente de la electroforesis desnaturalizante y se trituraron con un pistilo plástico para homogenizar. Los homogeneizados de cada banda se depositaron en pozos de una placa de ELISA (Thermo Scientific™ modelo: MicroWell™), a los cuales se les adicionó Tritón 100X (Sigma modelo: T8787) al 1 % para renaturalizar por 24 h a 4 °C. Posteriormente a los pozos correspondientes de cada banda se le adicionó el sustrato fluorogénico (4-metilumbiferil- N-acetil-β-D-glucosamina; Sigma, M2133) al 0.03 % p/v (Omero *et al.*, 2001). La presencia de actividad enzimática se visualizó por la

presencia de una coloración fluorescente blanquecina en el pozo correspondiente bajo iluminación ultravioleta utilizando un Transiluminador (UVP modelo: LMW-20) a 302 nm (Rocha-Pino, 2009).

6.4 Determinaciones Analíticas

6.4.1 Determinación de proteína

A los sobrenadantes de las muestras parcialmente purificadas se le cuantificó el contenido proteico soluble mediante microensayo de Bradford (1976), este contenido se determinó a 595 nm (Lector de microplacas Bio-rad modelo: iMark, US). La concentración de proteína se determinó empleando una curva patrón de seroalbúmina bovina como estándar (anexo 3).

6.4.2 Determinación de actividad N-acetilhexosaminidasa

A 200 μ L de la enzima parcialmente purificada se le adicionaron 200 μ L de amortiguador de citratos-fosfatos (0.2 M, pH 5.6) y 200 μ L de solución de p -nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina 1.0 mg/mL (pNAG); esta mezcla se incubó a 37°C bajo agitación (180 rpm) durante una hora, la reacción se detuvo adicionando 1 mL de NaOH 0.02 M. Posteriormente se midió la absorbancia a 400 nm (Espectrofotómetro Jenway modelo: 6700, US). La actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p -nitrofenol por mL de enzima, por minuto bajo las condiciones de reacción (Tronsmo y Harman 1993). La liberación de p -nitrofenol se determinó mediante una curva patrón (anexo 2).

6.4.3 Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se determinaron en los sobrenadantes mediante el método del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959) empleando una curva patrón de N-acetilglucosamina, a una longitud de onda de 540 nm (Espectrofotómetro Jenway modelo: 6700, US) (anexo 4).

6. 5 Caracterización parcial del extracto enzimático

6.5.1 Determinación de pH y temperatura de mayor actividad N-acetilhexosaminidasa

La determinación de pH de mayor actividad se efectuó evaluando la actividad Nhasa (Tronsmo y Harman, 1993) en intervalos entre 4.0 - 6.0, con incrementos de 1. Se utilizó amortiguador acetato de sodio 4.0 mM. La temperatura se determinó evaluando la misma actividad Nhasa en un intervalo de 10 a 55 °C, con incrementos (5 – 10 °C) a 800 rpm (Eppendorf® modelo: Thermomixer R, Alemania).

6.5.2 Determinación del mecanismo hidrolítico de N-acetilhexosaminidasa

7.5.2.1 Hidrólisis de N-acetilquitin-oligosacáridos (DP 2-3)

La determinación de la concentración de los productos de hidrólisis empleando el extracto enzimático parcialmente purificado, se llevó a cabo utilizando 100 µL de 0.11 mM de N-acetilquitin-oligosacáridos (N, N', N''-Triacetilquitotriosa, Sigma modelo: D1523) como sustrato en amortiguador 4.0 mM de acetato de sodio a pH y temperatura diferentes a 800 rpm (Eppendorf® modelo: Thermomixer R, Alemania). La reacción se detuvo poniendo las muestras en baño de hielo para su posterior análisis (Koga, 2000).

6.6 Caracterización de los productos hidrólisis

Se utilizaron filtros pirinola de celulosa regenerada (Millipore, Sterile Syringe Filters, US) 0.22 µm para separar los quitin-oligosacáridos de la enzima.

6.6.1 Espectrometría de Masas

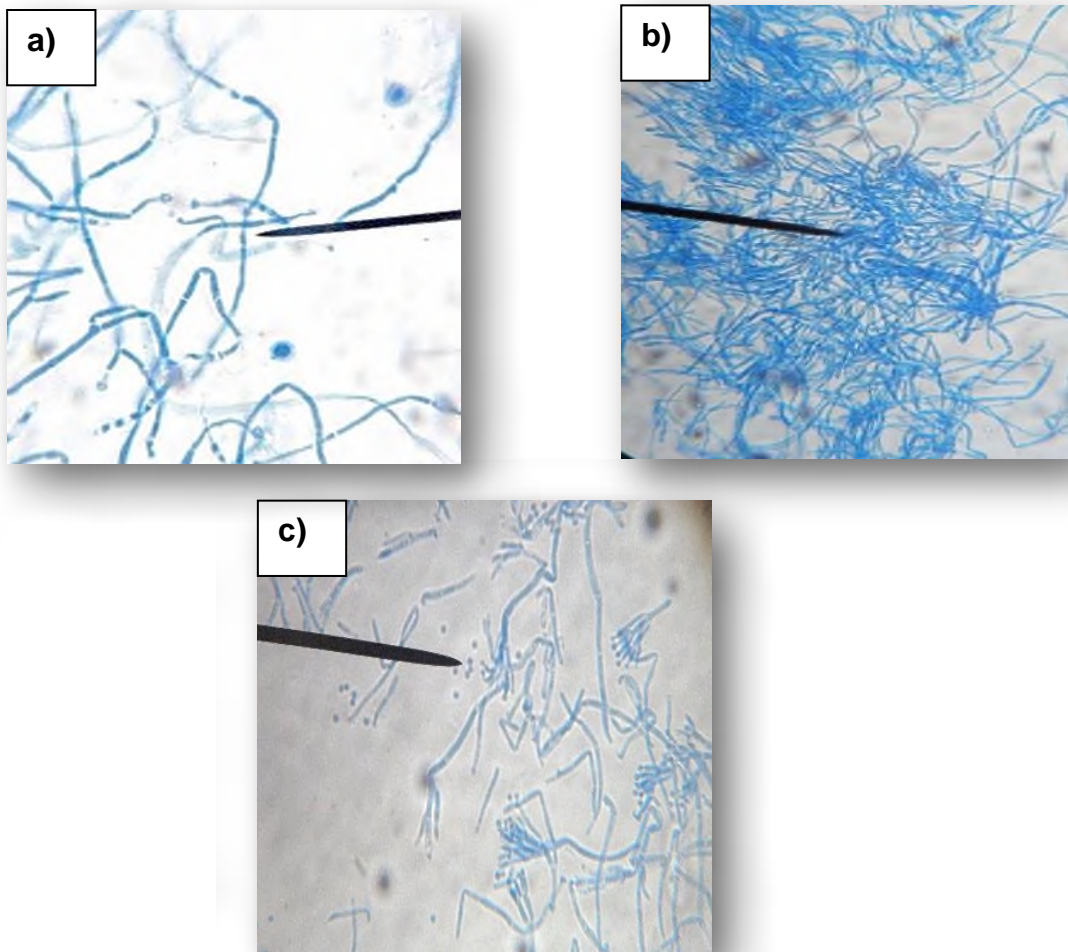
Los productos de hidrólisis y los estándares de quitin-oligosacáridos (N-acetil-D-glucosamina, N, N'-diacetilquitobiosa, N, N', N''-Triacetilquitotriosa) , se determinaron por Espectroscopía de Masas (LC Acquity UPCL-I-Class y como detector el MS Synapt G2-Si). Se analizó en una columna C18 (130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm) marca Acquity UPLC® Beh. El método de Ionización ESI- Negativo. El horno se utilizó a 28 °C. La elución de quitin-oligosacáridos se hizo empleando una solución acuosa de ácido fórmico a 1 ppm a un flujo de 200 µL. La fase móvil utilizada fue agua + ácido fórmico 0.1% (v/v). El volumen de inyección fue 10 µL (modificado de Koga, 2000).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Identificación morfológica de *Penicillium sp*

La identificación morfológica de *Penicillium sp* se realizó mediante la técnica de microcultivo de Ridell, en el cual se puede observar el crecimiento del micelio aéreo, al generarse cultivos sobre portaobjetos (Salazar *et al.*, 2013). En esta técnica se evaluó el ciclo de desarrollo y las características micro y macroscópicas para al final compararlas con claves taxonómicas.

Las características microscópicas observadas durante el microcultivo se compararon con las claves taxonómicas (Barnett y Barry 1998), dando como resultado *Penicillium sp* (ver figura 12). El crecimiento de *Penicillium sp* en el microscopio se monitoreo cada 2 h.



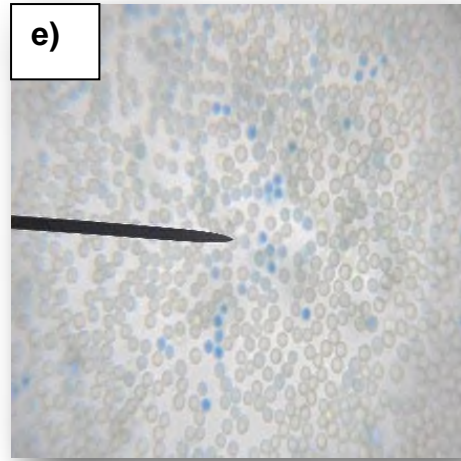
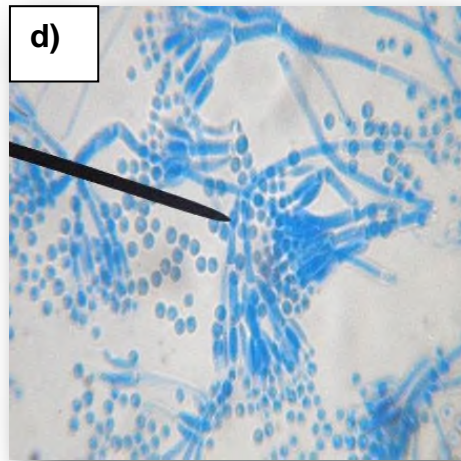


Figura 12. Características microscópicas de *Penicillium sp* observadas a 40X (Microscopio Motic). a) hifas segmentadas. b) hifas segmentadas formando superficies. c) formación de *Penicillium sp*. d) *Penicillium sp*. Fiálides, hifas aéreas, conidióforo, conidios, aspecto biverticilado. e) esporas de *Penicillium sp*.

Las características macroscópicas de *Penicillium sp* se describen en la tabla 4 (figura 13).

Tabla 4. Características macroscópicas de *Penicillium sp*

<i>Forma</i>	Definida
<i>Aspecto</i>	Algodonosa
<i>Color</i>	Primero blanco y después verde olivo
<i>Temperatura de esporulación</i>	25 °C
<i>Días de incubación</i>	De 5 a 8 días

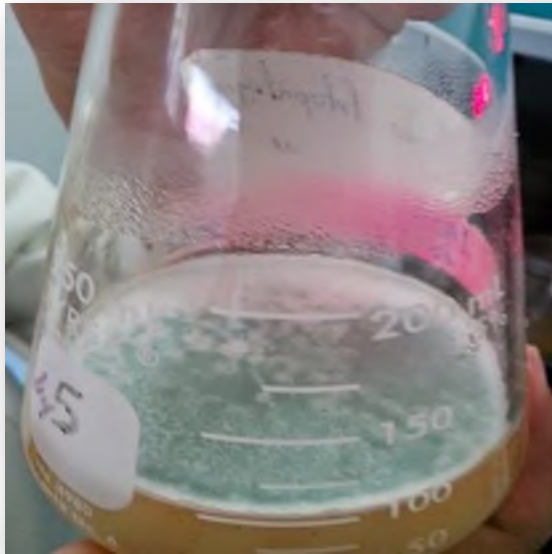


Figura 13. Características macroscópicas de *Penicillium sp*

7.2 Tratamiento del sustrato

Los sustratos (chapulín, camarón y tenebrio) se trataron con tetraborato de potasio al 1 % para lograr una desproteínización parcial, y así impedir que proteínas contenidas en los sustratos interfieran en la producción de Nhasas. La desproteínización se realizó según la técnica modificada de Jiménez, (2015); la que alcanza un 90% de desproteínización en el camarón, 85% para chapulín y 70 % para el tenebrio.

7.3 Producción de N-acetilhexosaminidasas

La fermentación en medio líquido (FML) o Fermentación Sumergida (FS) fue empleada en este trabajo ya que es una técnica que logra un producto más homogéneo y es más sencillo el control de los factores de la fermentación, como temperatura, oxígeno disuelto, aireación, agitación y pH (Doran,1995). En estos experimentos, se utilizaron el pH y la temperatura de mayor actividad Nhasa, reportados por Jiménez, (2015).

7.3.1. Producción de N-acetilhexosaminidasas con *Penicillium sp* a pH y temperatura óptima.

En la purificación de enzimas se requiere gran cantidad de extracto enzimático crudo para realizar varios experimentos y réplicas; por lo que se realizó un escalamiento, tomando como referencia el volumen (125 mL) y las condiciones utilizadas por Jiménez (2015). Para el escalamiento se calculó el espacio vacío en el matraz de 125 mL (46 %) y el de 2000 mL (45 %) (anexo 10). El estudio de Jiménez (2015) muestra que para alcanzar la mayor actividad volumétrica durante la producción de Nhasas con el hongo fitopatógeno *Penicillium sp* se requiere un pH constante de 3 y una temperatura de 25°C y finalizar la fermentación a las 48 horas.

Para la producción de quitinasas en matraces de 2 L se utilizó como fuente de carbono cutícula de chapulín y cutícula de tenebrio desproteínizado, con los cuales se obtuvieron las concentraciones volumétricas de Nhasas de 0.786 y 1.670 mU/mL respectivamente (figura 14), esto indica que con tenebrio se obtuvo 2.12 veces más actividad volumétrica que empleando Psp-Ch, lo cual arroja que chapulín alcanzó el 30.81% y tenebrio 45.14 % de actividad volumétrica comparado con lo reportado con Jiménez (2015). Aunque fue mayor la actividad Nhasa en tenebrio, cabe mencionar que chapulín también mostró actividad Nhasa, lo cual es un dato importante ya que existen escasos estudios donde se utilicen insectos para la producción de Nhasas con el hongo *Penicillium sp*.

La liberación y producción del monómero NAG se cuantifica midiendo los azúcares reductores y la actividad volumétrica Nhasa en el extracto enzimático. En este experimento se están comparando los azúcares reductores con la actividad específica Nhasa; estas 2 determinaciones van de la mano, aunque todo depende del sustrato que se utilice, ya que en el caso de los insectos (chapulín y tenebrio) tienen mayor contacto con el hongo y el contenido de quitina varía en cada uno (3 - 13 %). En la figura 15 se puede observar que utilizando chapulín como sustrato los valores de los azúcares reductores y la actividad específica Nhasa tienen la misma tendencia llegando a encontrarse a las 48 h, lo que quiere decir que se está liberando y produciendo el monómero NAG en ambos casos.

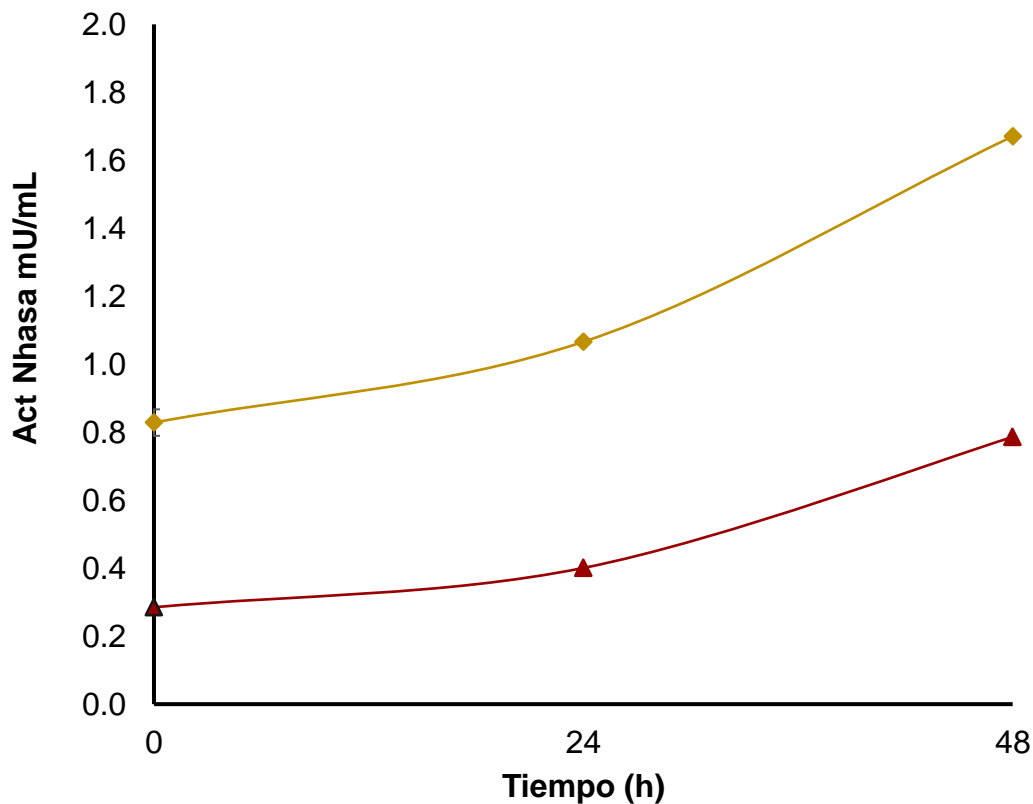


Figura 14. Producción de Nhasas de *Penicillium sp.*, utilizando como sustrato chapulín [▲] y tenebrio [◆].

En la figura 16 se observa que los azúcares reductores liberados fueron menor en el caso de la cutícula tenebrio obteniendo 0.037 mg /mL, lo cual es 2.8 veces menor comparándolo con chapulín, esto se puede deber a la interacción del sustrato con el hongo, ya que pueden existir sustancias que interfieran en la liberación de estos y retomando lo descrito anteriormente con la cutícula de tenebrio solo alcanzó 70 % en la desproteínización. En el caso de la actividad específica Nhasa se observa que existe un descenso a las 24 h, esto se puede deber a la inhibición de proteínas contenidas en el medio ya que como mencione anteriormente no se logró la desproteínización total del sustrato y existen proteínas capaces de interferir en la cuantificación de la actividad específica.

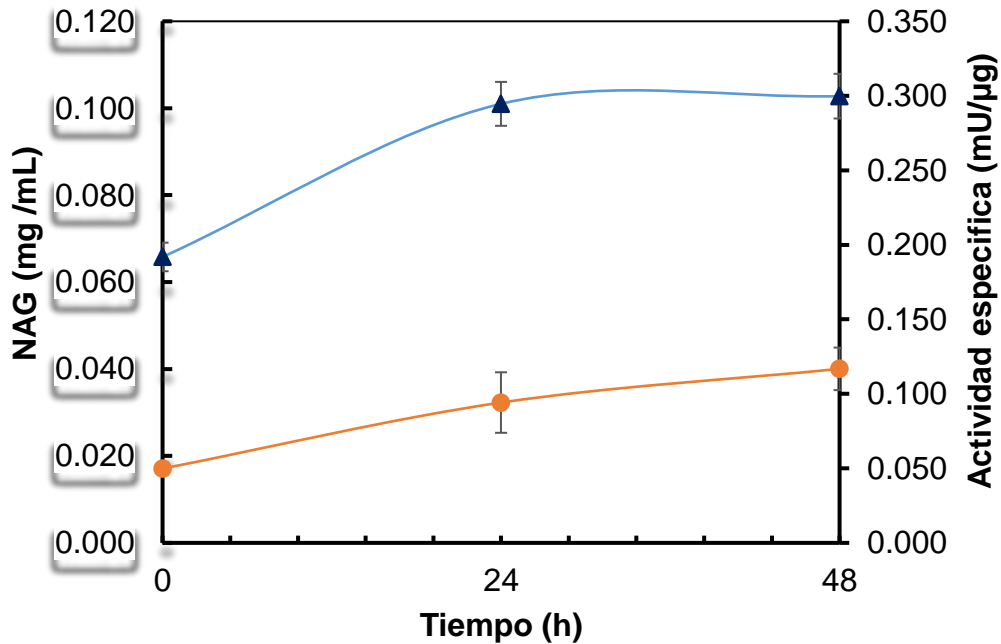


Figura 15. Azúcares reductores [▲] y actividad específica [●] del extracto enzimático producido por *Penicillium sp*, utilizando chapulín como sustrato.

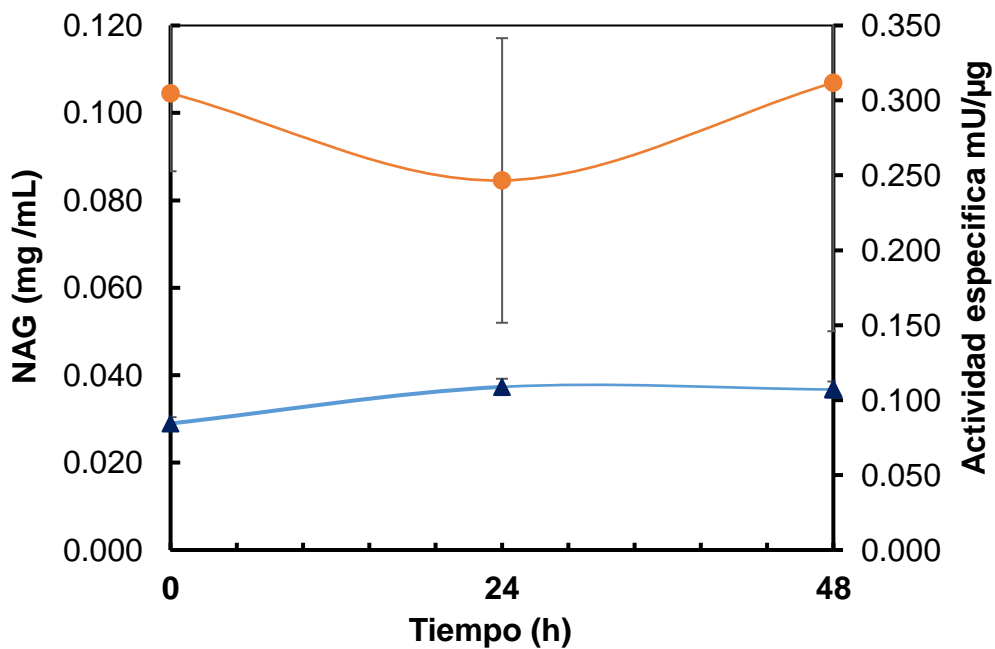


Figura 16. Azúcares reductores [▲] y actividad específica [●] del extracto enzimático producido por *Penicillium sp* utilizando tenebrio como sustrato.

7.4 Producción enzimática en biorreactor BIOESTAT de 6.6 L

Se realizó un escalamiento en biorreactor a un volumen de 5 L. Considerando para ello, el espacio vacío de aire contenido en los matraces de 125 mL y 2 L (anexo 10) y las condiciones de operación para lograr la máxima producción de actividad enzimática.

7.4.1 Producción de N-acetilhexosaminidasas con *Penicillium sp*

En las fermentaciones realizadas en el biorreactor, se utilizó chapulín y camarón desproteinizados como fuente de carbono, se obtuvo 1.67 y 1.04 mU/mL respectivamente. A diferencia de las fermentaciones realizadas en matraces de 2 L, la actividad incrementó 2.12 veces en el caso de chapulín (ver figura 17). La producción de Nhasas reportada por Jiménez (2015) utilizando exoesqueleto de camarón fue de 4.29 mU/mL, 4 veces mayor a la obtenida en el biorreactor; esto se puede deber a varias razones, entre ellas esta: la edad del inóculo, el lote del sustrato, el tipo de sistema de cultivo (Rocha-Pino., *et al* 2011).

Por otra parte, la actividad Nhasa de la fermentación en biorreactor Aplikon, reportada por Ramírez (2009) fue de 6.83 mU/mL a las 144 h utilizando el hongo *Verticillium fungicola* y cutícula de camarón fermentada como inductor con un pH controlado de 5 a 24 °C. En este estudio se puede observar que la actividad reportada por Ramírez fue 4.08 veces mayor a la reportada y se atribuye al tratamiento del camarón antes de la fermentación.

La producción de actividad Nhasa está medida por la capacidad que tienen las N-acetilhexosaminidasas de reconocer el extremo no reductor del sustrato liberando unidades de NAG. Cabe mencionar que, según Jiménez (2015) quien utilizó los hongos: *B. bassiana* y *Penicillium sp*, la producción de endoquitinasas era predominantemente mayor a la cantidad producida de Nhasas. En este estudio, se decidió trabajar con Nhasas, aunque su producción es menor presentan mayor especificidad, por lo que resulta menos compleja la purificación y la elucidación del mecanismo hidrolítico.

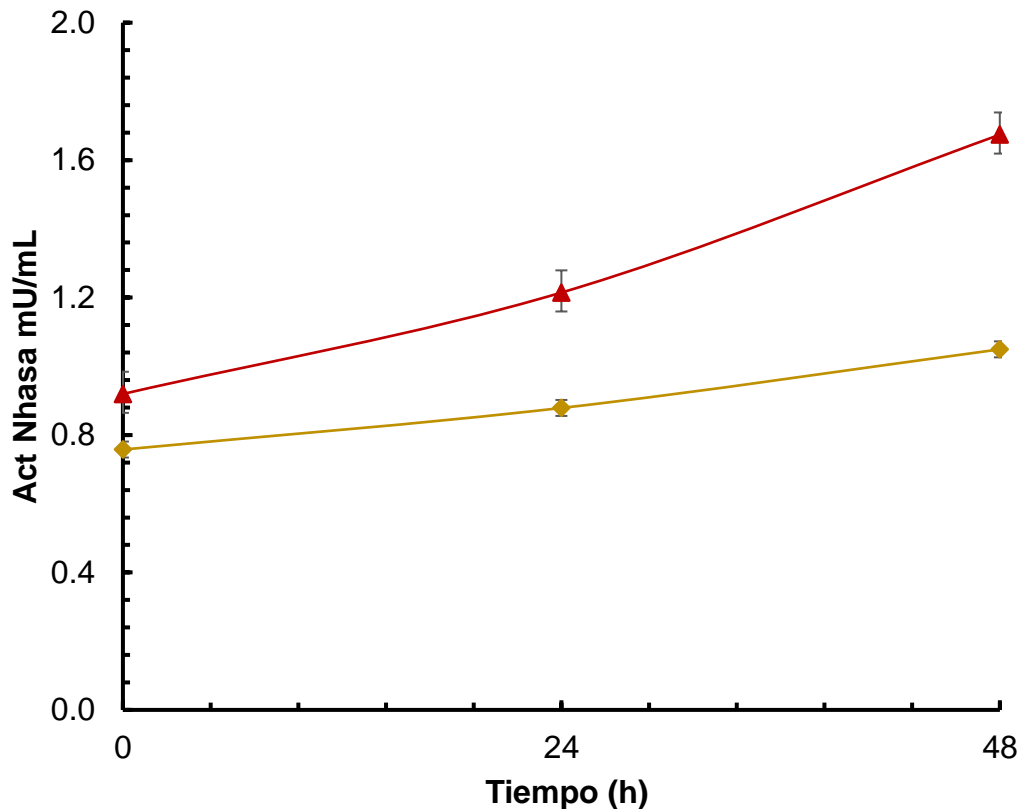


Figura 17. Producción de Nhasas de *Penicillium sp* en el biorreactor, utilizando como sustrato chapulín [▲] y camarón [◆].

En el biorreactor de 6.6 L se observó que utilizando chapulín los azúcares reductores liberados fueron de 0.152 mg /mL a las 0 h, llegando a 0.195 mg /mL a las 48 h, y la actividad específica fue de 0.049 mU/μg a las 0 h y de 0.068 mU/μg a las 48 h; en la gráfica se puede ver que en las dos determinaciones existe un aumento, lo que es similar a lo descrito en los matraces de 2 L (figura 18).

En la producción de NAG y actividad específica utilizando exoesqueleto de camarón desproteínizado como sustrato se tiene 0.235 mg /mL y 0.044 mU/μg, a las 0 h; 0.318 mg /mL y 0.067 mU/μg a las 48 h (figura 19), en los dos casos existe un aumento, notable, esto se atribuye al porcentaje de desproteínización alcanzado en este sustrato que fue del 90 %. Aunque la cutícula de camarón presenta menor interacción con el hongo debido a la cantidad de minerales que contiene, en el caso de *Penicillium sp* presenta un buen contacto.

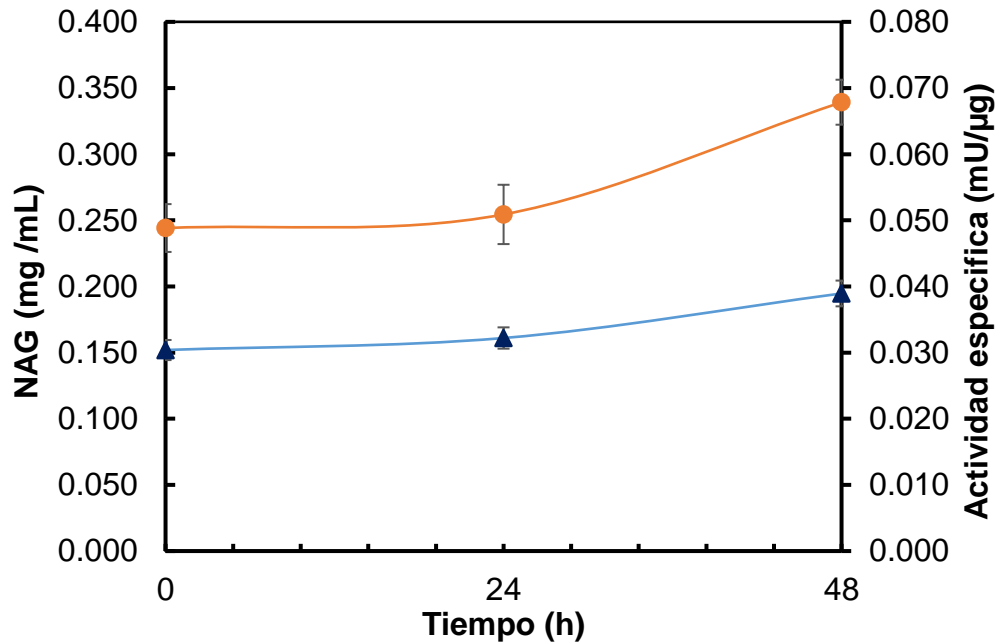


Figura 18. Azúcares reductores [▲] y actividad específica [●] del extracto enzimático producido por *Penicillium sp* en el biorreactor de 6.6 L utilizando chapulín como sustrato.

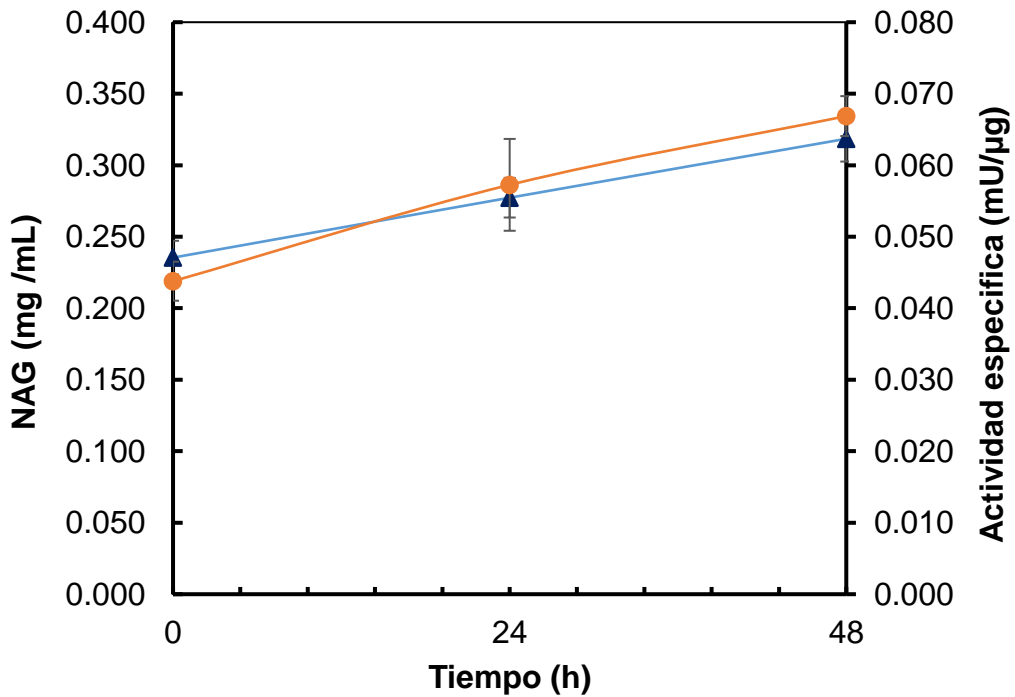


Figura 19. Azúcares reductores [▲] y actividad específica [●] del extracto enzimático producido por *Penicillium sp* en el biorreactor de 6.6 L, utilizando camarón como sustrato.

7.4.2 Producción de N-acetilhexosaminidasas con *B. bassiana* a pH y temperatura óptima.

En el biorreactor de 6.6 L se observó que en las fermentaciones de *B. bassiana* con chapulín y camarón se obtuvieron 3.230 y 3.765 mU/mL a las 48 h (figura 20), según el análisis de las fermentaciones *B. bassiana* es el mejor productor de Nhasas utilizando camarón desproteinizado como sustrato, esto se atribuye al tratamiento de desproteinización, en el cual el camarón alcanzó el 90 % y al contenido de quitina en el camarón que es de 20 % (peso seco) (Cira *et al.*, 2002), esto es mayor al contenido de quitina en el chapulín pues contiene del 3-13 % (peso seco). Aunque la actividad enzimática en el camarón y el chapulín son muy similares, esto se puede deber al contacto a la interacción hongo-sustrato que presentan.

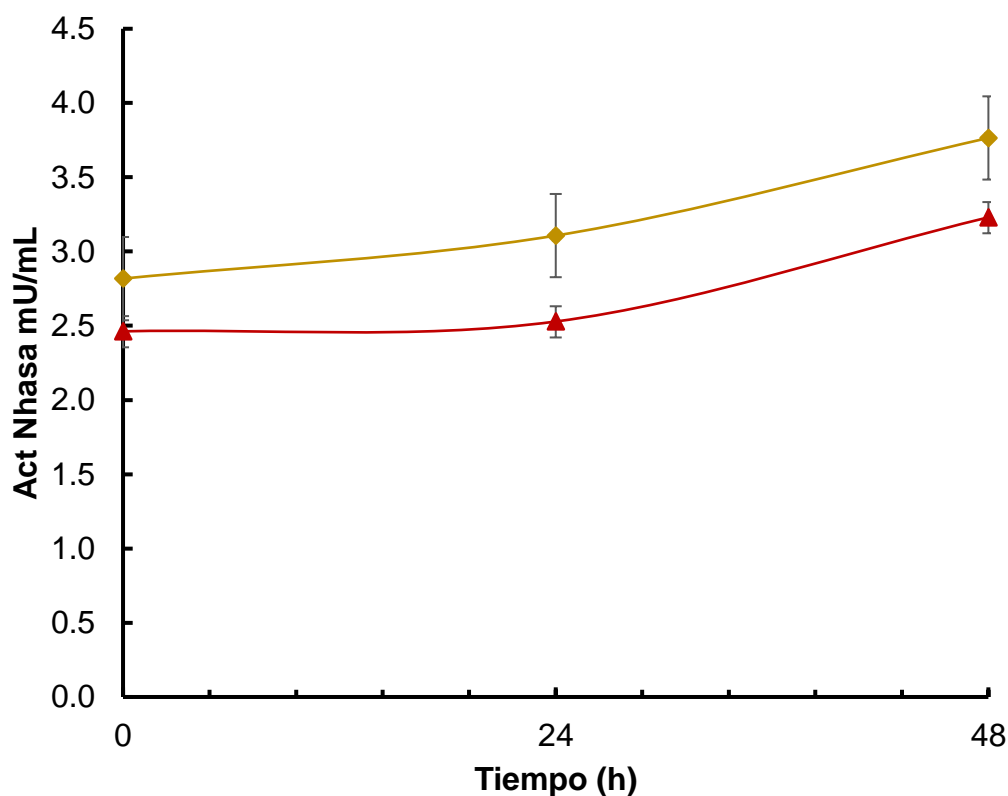


Figura 20. Producción de Nhasas de *B. bassiana* en el biorreactor, utilizando como sustrato chapulín [▲] y camarón [◆]

Matsumoto *et al.*, 2004 realizó fermentaciones en cultivos sumergidos utilizando esporas y micelio como inóculo del hongo *Verticillium lecanii* (ATCC 26854) y como sustrato desechos de cabezas de camarón fermentadas, obteniendo una actividad específica Nhasa de 418.5 y 732.8 U/mg de proteína respectivamente, siendo esto mayor a lo obtenido en este trabajo utilizando esporas de *B. bassiana* y camarón desproteinizado como sustrato (figura 22).

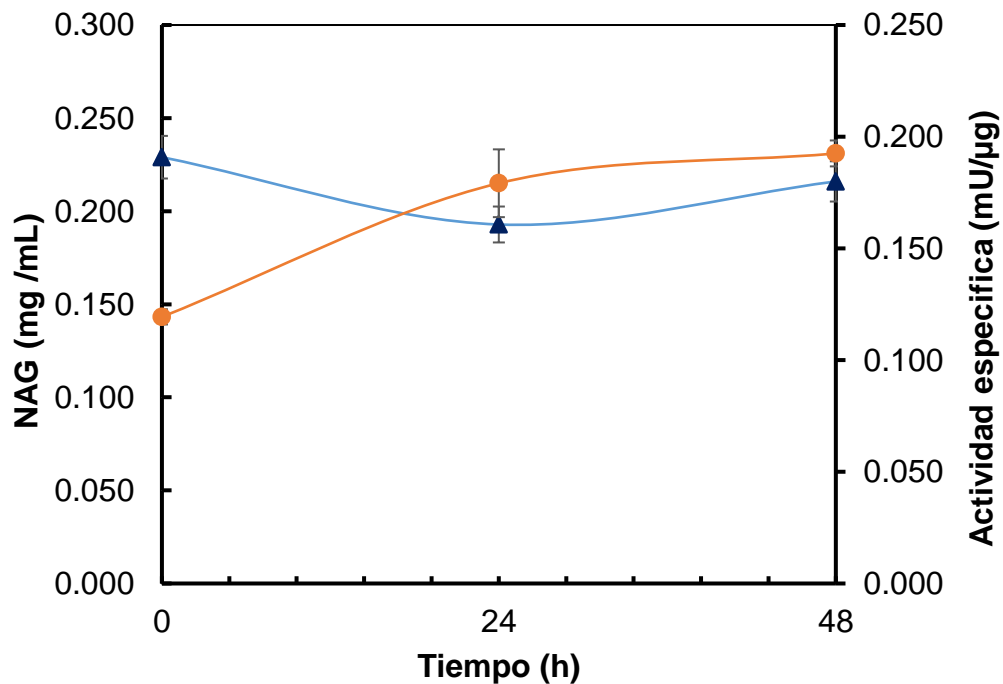


Figura 21. Azúcares reductores [▲] y actividad específica [●] del extracto enzimático producido por *B. bassiana* en el biorreactor de 6.6 L utilizando chapulín como sustrato.

En la figura 21 se puede observar que utilizando chapulín desproteinizado no hubo azúcares reductores presentes, esto se puede deber a que la desproteinización de la quitina no fue total en el chapulín por lo tanto debe de haber otros compuestos presentes en la fermentación, los cuales impiden la liberación de estos azúcares; entre

ellos pueden encontrarse proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos (Merzendorfer *et al.*, 2003).

En cuanto a la actividad específica Nhasa con *B. bassiana* solo hubo crecimiento con chapulín desproteinizado, siendo nula con camarón desproteinizado. Este comportamiento es muy similar al que se tuvo con *Penicilium sp*, como ya se mencionó anteriormente el camarón en algunos casos dificulta el contacto con el hongo debido a la gran cantidad de minerales que contiene; aunado a esto recordemos que no se logró la desproteinización total en ninguno de los sustratos, y por lo tanto pueden existir otros compuestos que interfieren en la producción de Nhasas, azúcares reductores y actividad específica Nhasa.

Algo que es importante mencionar, es que independientemente de los resultados de las determinaciones, se logró producir Nhasas con sustratos no comerciales (chapulín y tenebrio), siendo camarón desproteinizado con *B. bassiana* el mejor productor de Nhasas.

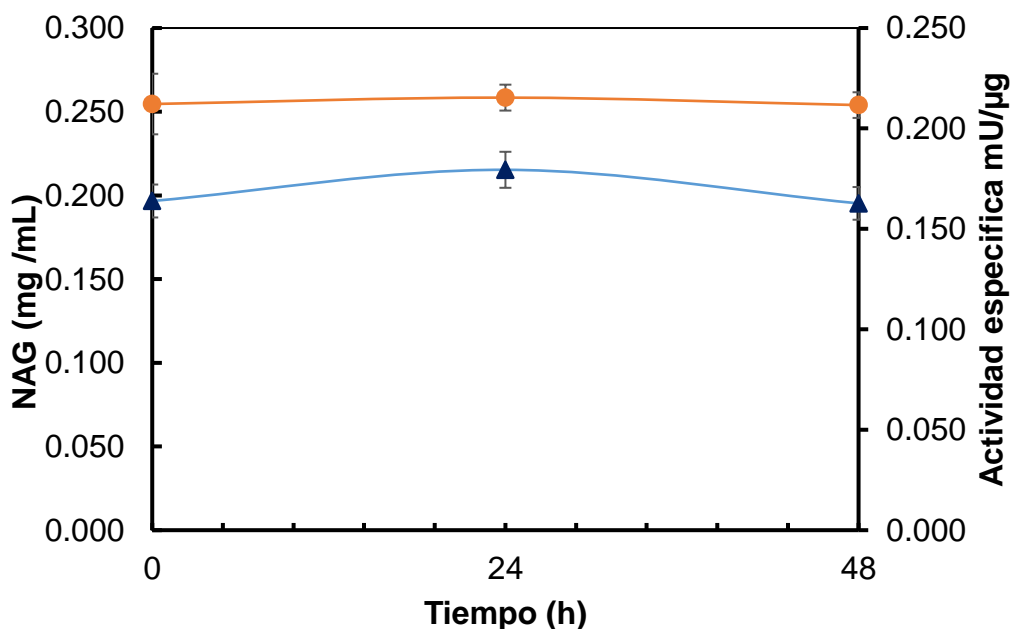


Figura 22. Azúcares reductores [▲] y actividad específica [●] del extracto enzimático producido por *B. bassiana* en el biorreactor de 6.6 L utilizando camarón como sustrato.

7.5 Determinación del peso molecular de N-acetilhexosamidasa

Para la detección de las quitinasas se realizó un análisis empírico de todas las fermentaciones. El extracto liofilizado se resuspendió en amortiguador citrato-fosfato pH 5.6 y se dializó. Después se realizaron geles de poliacrilamida (figura 23), se detectaron las bandas, cortaron y se homogenizaron para realizar el ensayo de actividad en placas de Elisa.

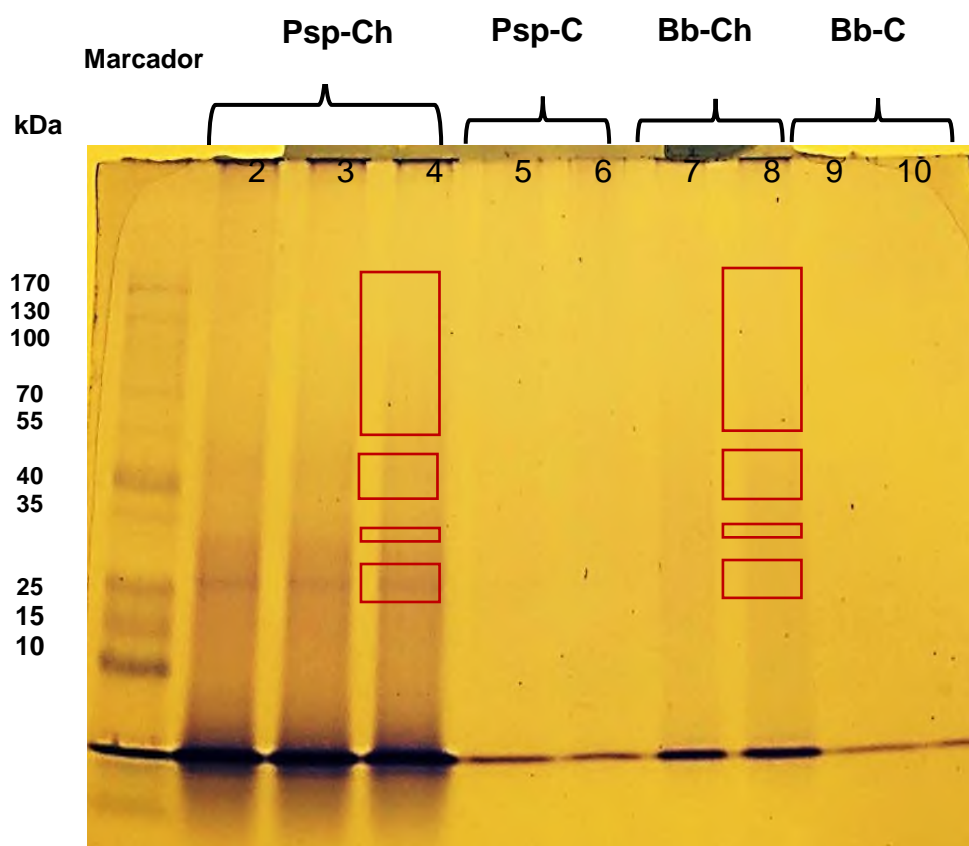


Figura 23. Gel de electroforesis (SDS-PAGE). Primer ensayo. Bandas electroforéticas Psp-Ch, Psp-C, Bb-Ch y Bb. Tinción de Coomassie. Marcador Thermo. Carril 2,3 y 4: Psp-Ch; Carril 5 y 6: Psp-C; Carril 7 y 8: Bb-Ch; Carril 9 y 10; Bb-C.

En el ensayo de detección de Nhasas (SDS-PAGE) donde se analizaron todas las fermentaciones se observaron varias bandas de los extractos provenientes de Psp-Ch y el Bb-Ch, mientras que en los extractos de Psp-C y la Bb-C no se observaron bandas visibles que pudieran tener relación con las quitinasas, como se observa en la figura

23. Debido a esto se realizó un ensayo de actividad Nhasa (método fluorogénico) de todas las fermentaciones (figura 24) para corroborar que efectivamente los carriles de Psp-C y Bb-C no tuvieran esta actividad; dicho ensayo arrojó que los extractos con actividad Nhasa fueron los que dieron una fluorescencia color azul intensa al observarse con luz ultravioleta. Los extractos con actividad Nhasa fueron Psp-Ch y Bb-Ch, los cuales fueron purificados posteriormente.

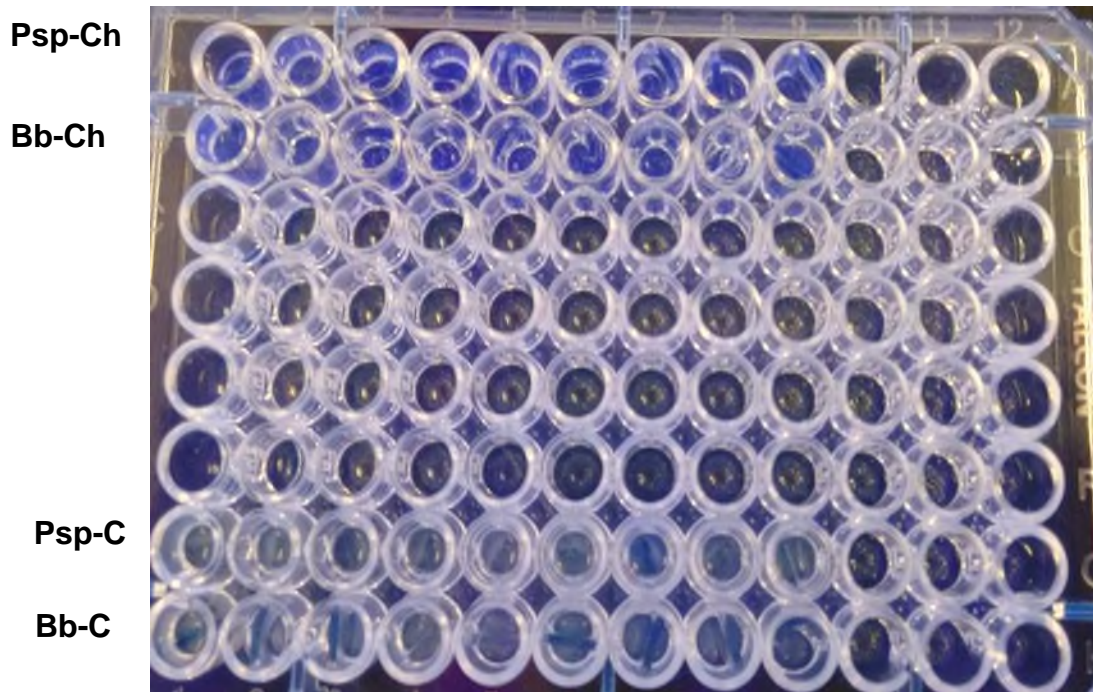


Figura 24. Ensayo de actividad de los extractos de Psp-Ch, Psp-C, Bb-Ch y Bb-C utilizando un sustrato fluorogénico (4-metilumberiferil- N-acetil- β -D-glucosamina).

7.6 Purificación de los extractos enzimáticos de *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp* con actividad Nhasa.

Una vez detectada la actividad Nhasa mediante el ensayo previo de actividad y por gel, se procedió a la purificación de los extractos crudos de Psp-ch y Bb-ch; ya que solo estos mostraron dicha actividad.

Los extractos liofilizados (Psp-Ch y Bb-Ch) se resuspendieron en amortiguador de actividad citrato fosfato pH 5.6, obteniendo una actividad específica Nhasa de 0.25 mU/ μ g para Psp-Ch y de 0.5 mU/ μ g Bb-Ch. Después de la liofilización del extracto enzimático (Psp-Ch y Bb-Ch), se tomó una porción y se resuspendió en amortiguador de actividad Nhasa; posteriormente se precipitó con sulfato de amonio a diferentes porcentajes de saturación (20, 40, 60, 80 y 100%).

En los extractos de Psp-Ch se observó que con la saturación de 20 y 40 %, no se forma el precipitado, por lo tanto, se tomó la actividad del sobrenadante la cual fue de 0.688 y 0.878 mU/mL respectivamente. La tendencia de la curva fue incrementando hasta obtener la mayor actividad en el precipitado de 11.331 mU/mL al 80 % de saturación como se observa en la figura 25.

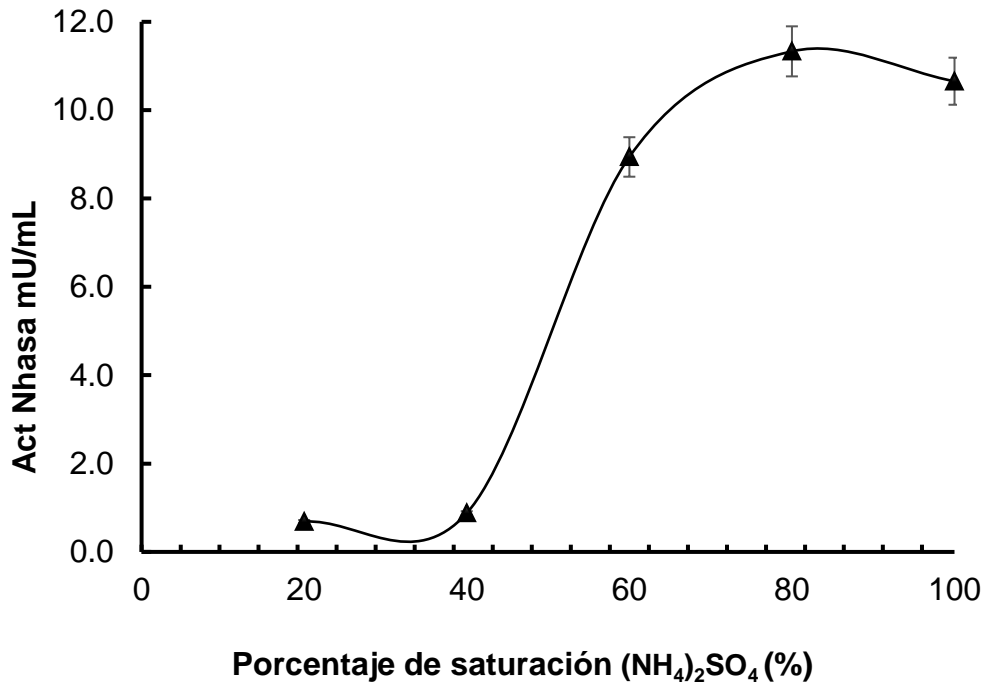


Figura 25. Precipitación con sulfato de amonio de Psp-Ch a diferentes porcentajes de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

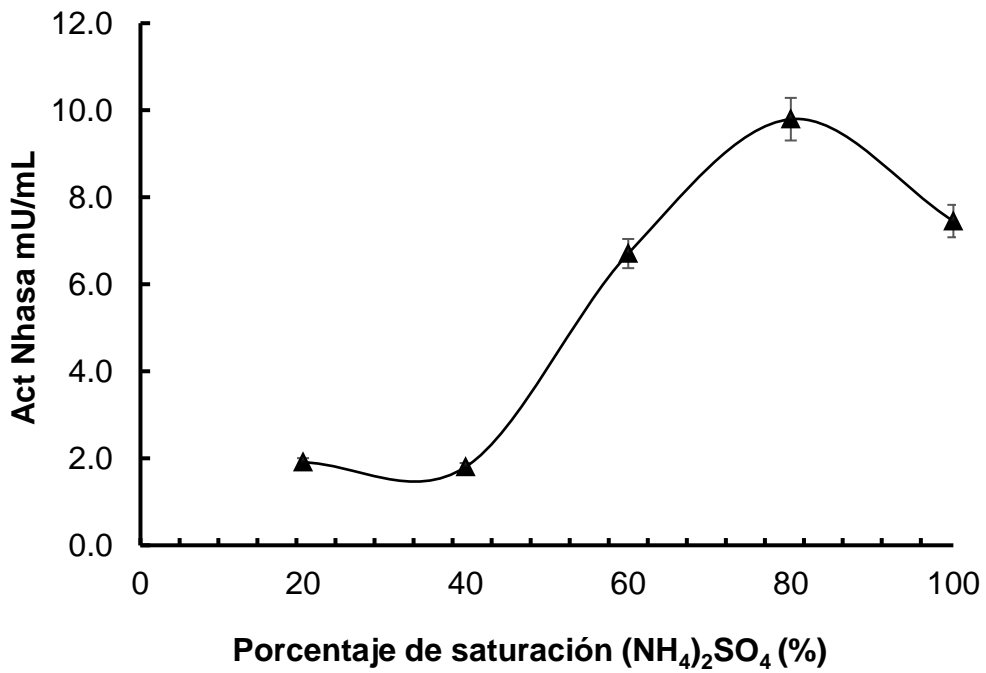


Figura 26. Precipitación con sulfato de amonio de Bb-Ch a diferentes porcentajes de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Para la Bb-Ch (figura 26) no se obtuvo precipitado en la saturación de 20 % por lo que de igual forma se tomó del sobrenadante obteniendo 1.907 mU/mL. Aunque al 40 % de saturación hubo una ligera baja, la tendencia de la curva después de este punto siguió incrementando hasta obtener la mayor actividad al 80 % de saturación con 9.794 mU/mL.

Debido a las actividades volumétricas obtenidas en la precipitación, se pudo observar que las mayores actividades fueron al 80 % de saturación por lo que esta parte de la purificación se realizó de esta manera a lo largo del experimento. Aunque a diferencia de lo descrito por Nguyen *et al.*, (2015), quien precipitó con sulfato de amonio y obtuvo la mayor actividad quitinasa al 65 % de saturación, la saturación obtenida en nuestro experimento es alta debido a que a las regiones hidrofóbicas de las proteínas contenidas en el extracto enzimático son pocas y precipitan más lentamente, de igual forma soportan cierta cantidad de sales hasta la saturación completa donde ya no existen regiones hidrofóbicas expuestas para interaccionar.

Una vez obtenido el precipitado de los extractos enzimáticos, se procedió a la realizar una ultrafiltración para concentrar y separar por peso molecular las Nhasas, en donde se obtuvo para Psp-Ch 0.30 mU/ μ g y para Bb-Ch 0.23 mU/ μ g. La ultrafiltración es una técnica altamente definida, debido a las membranas poliméricas que utiliza para separar por peso molecular. En esta técnica se utilizó una membrana de 30 kDa, ya que en el ensayo de actividad Nhasa los pesos moleculares de las enzimas fueron entre 30 y 50 kDa. La presión utilizada en la ultrafiltración fue de 2.07 bar (30 psi) para el medidor de presión de alimentación y de 0.69 Bar (10 psi) para la válvula de retención.

Después de la ultrafiltración, el retenido mayor a 30 kDa se dializó en una membrana de 12 kDa para eliminar las sales del extracto. El dializado se concentró por diafiltración en filtros para centrífuga Amicon con tamaño de corte de 10 kDa. La enzima se lavó y recuperó para posteriormente conservarla y realizar experimentos de hidrólisis enzimática.

El extracto enzimático Psp-Ch tratado en los diferentes pasos de purificación mostró un rendimiento final 7 % y un factor de purificación final de 1.6, esto se muestra en la

tabla 5. El Bb-Ch obtuvo un rendimiento final de 9 % y un factor de purificación de 1.6, como se observa en la tabla 6.

Debido a los resultados obtenidos en el tren de purificación no se recomienda dializar, ya que se pierde actividad y rendimiento en algunos casos, después de la diálisis, existen varios factores que pueden afectar en esta técnica, como por ejemplo utilizar algún amortiguador distinto, aunque en algunos estudios es necesario para mantener la estabilidad de la proteína, también puede afectar el tipo de membrana utilizada y el llenado de la bolsa de diálisis; por lo que se sugiere después de la ultrafiltración, realizar lavados en los tubos para centrifuga hasta obtener mayor actividad o probar con diferentes tipos de membranas y marcas así como cuidar la solución con que se dializa.

Tabla 5. Purificación de Nhasas de *Penicillium sp* con chapulín como sustrato (Psp-Ch).

Fracción	Proteína total (μg de proteína soluble/ml)	Actividad total (mU/mL)	Actividad específica (mU/g)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	5778.61	1446.35	0.25	1.0	100
Precipitación 80 % saturación	645.24	257.63	0.40	1.6	18
Ultrafiltración (retenido) 30 kDa	1157.23	343.79	0.30	1.2	24
Diálisis	453.95	204.43	0.45	1.8	14
Diafiltración	252.49	101.28	0.40	1.6	7

Tabla 6. Purificación de Nhasas de *B. bassiana* con chapulín como sustrato (Bb-Ch).

Fracción	Proteína total (μg de proteína soluble/ml)	Actividad total (mU/mL)	Actividad específica (mU/μg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	5995.33	1341.90	0.23	1.0	100
Precipitación 80 % saturación	628.74	287.74	0.46	2.0	21
Ultrafiltración (retenido) 30 kda	1583.26	931.12	0.59	2.6	69
Diálisis	655.67	178.71	0.27	1.2	13
Diafiltración	329.42	117.15	0.36	1.6	9

7.6.1 Análisis electroforético (SDS-PAGE)

Los resultados de las bandas proteicas antes de la purificación en los geles se observan en la figura 27. En esta figura se pueden observar todas las bandas antes de proseguir con la purificación, estas se encuentran teñidas con tinción de plata. Los pesos moleculares del marcador son: 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130 y 170.

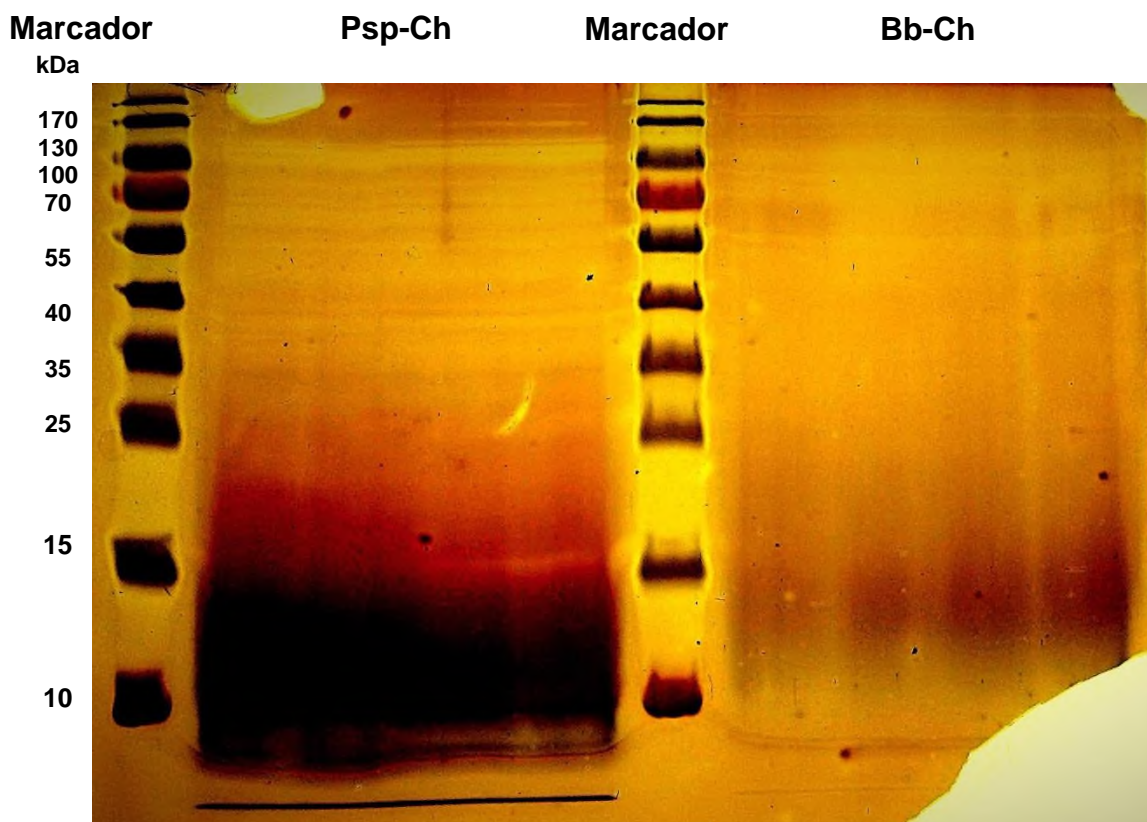


Figura 27. Gel de electroforesis (SDS-PAGE). Bandas electroforéticas Psp-Ch y Bb-Ch antes de la purificación. Tinción de plata. Marcador Thermo

En el caso del Psp-Ch, se obtuvieron más de 6 bandas activas (figura 28), pero solo 6 fueron legibles debido a que aún faltaba parte de la purificación, las bandas observadas tuvieron pesos moleculares de 13.84, 27.87, 36.47, 47.74, 62.48 y 77.48 kDa. Para la Bb-Ch también fueron 6 bandas con peso moleculares de 13.84, 19.12, 40.62, 42.87, 73.42 y 81.77 kDa. Las bandas de peso molecular menor a 30 kDa se

atribuyen a lectinas y proteasas según la literatura. Aunque se encontraron bandas menores a 10 kDa, no se identificaron y se despreciaron en la purificación. Estas bandas se pueden observar en la figura 28.

Lee *et al.*, (2009) purificó una quitinasa de *Penicillium sp.* LYG 0704 aislada del suelo de cultivo de la Universidad Nacional de Chonnam, el peso molecular de la quitinasa se estimó en 47 kDa mediante SDS-PAGE. Otro estudio, como el de Patil *et al.*, (2013) quien trabajó con una cepa altamente quitinolítica proveniente de *Penicillium ochrochloron* MTCC 517, adquirida de MTCC, Chandigarh, India. La quitinasa purificada mediante SDS-PAGE tuvo un peso molecular de 64 kDa. Los estudios anteriores demuestran que las bandas de 47.74 y 62.48 kDa observadas en el Psp-Ch coinciden con la producción de quitinasas del género *Penicillium*.

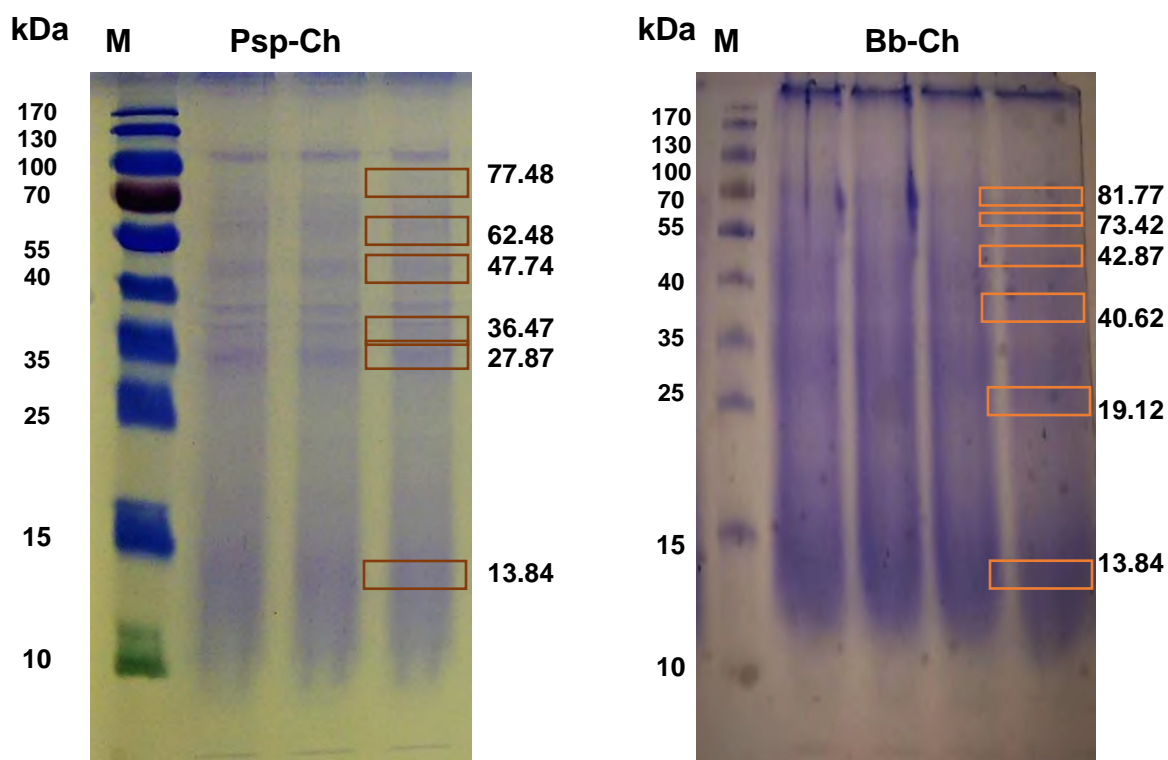


Figura 28. Gel de electroforesis (SDS-PAGE). Bandas electroforéticas Psp-Ch y Bb-Ch. Tinción de Coomassie. Marcador Thermo.

7.6.2 Ensayo de Actividad con sustratos fluorogénico sintético.

Una vez obtenidos los pesos moleculares de las proteínas, se realizó un ensayo para determinar la actividad Nhasa de las bandas con peso molecular similar a las reportadas en algunos trabajos, usando un sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosamina). Las bandas con actividad Nhasa presentaron mayor fluorescencia, los extractos enzimáticos tuvieron los siguientes pesos moleculares: 36.47, 47.74, 62.48, 77.48 kDa para el extracto de Psp-Ch y; 40.62, 42.87, 73.42 81.77, kDa para el extracto de Bb-Ch (figura 29). Los pesos moleculares de las bandas con actividad concuerdan con las quitinas citadas por algunos autores. En el 2012 Xiayun *et al.*, purificó una quitinasa de la bacteria *Streptomyces roseolus*, la cual pertenece a la familia GH18, a esta familia también pertenecen los hongos, la quitinasa purificada tuvo un peso molecular de 40 kDa y presentó actividad antifúngica.

Ramírez (2009) mencionó que bandas proteicas con pesos moleculares de 23 a 45 kDa corresponderían a enzimas con actividad quitinolítica, utilizando *V. lecanii*. En otro estudio Nguyen *et al.*, (2015) purificó quitinasas a partir de *Lecanicillium lecanii*, obteniendo una quitinasa con peso molecular 33 kDa y utilizando una placa de agar que contenía 0.5 % de quitina coloidal para determinar actividad quitinasa.

Comparando los estudios anteriores podemos decir que la actividad quitinolítica encontrada producida por microorganismos pertenecientes a la familia GH18 tienen un rango entre 30 y 40 kDa. Sin embargo, en este estudio, se puede llegar a la conclusión de que las bandas encontradas con actividad Nhasa están entre 30 a 50 kDa, y las bandas mayores a 70 kDa pueden pertenecer a enzimas con actividad proteolítica.

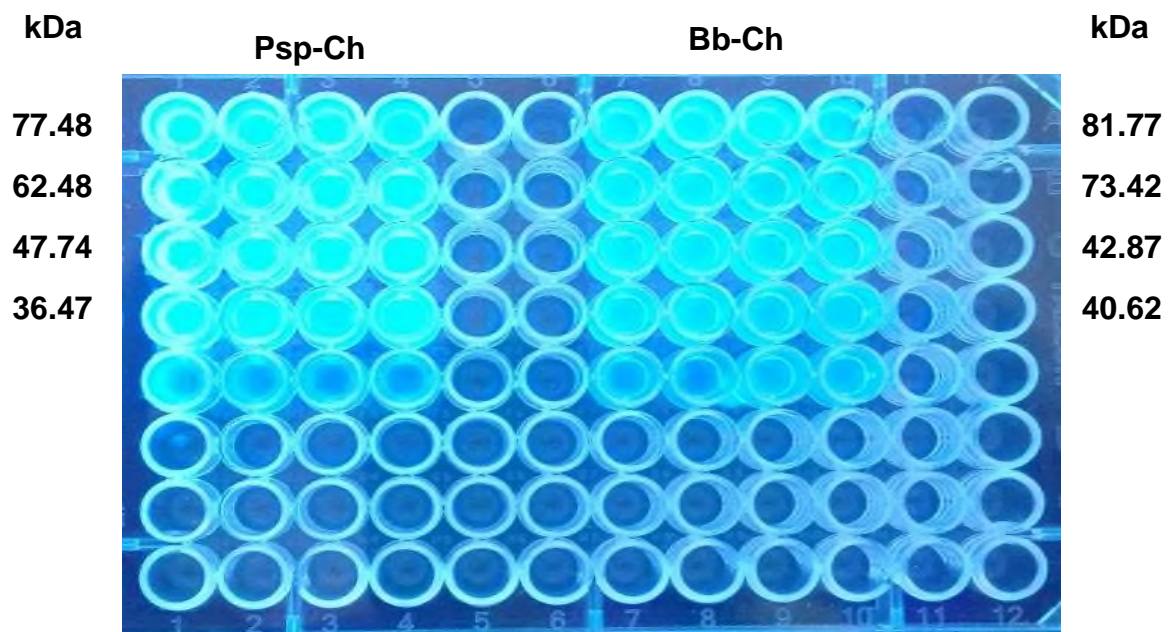


Figura 29. Ensayo de actividad Nhasa de las bandas proteicas utilizando sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosamina) de Psp-Ch y Bb-Ch.

7.6.3 Producción de quitin-oligosacáridos mediante hidrólisis enzimática

Las quitinasas de la familia GH18 catalizan la hidrólisis de la quitina, esto da lugar a la producción de los quitin-oligosacáridos, los cuales son parte esencial de este trabajo. Para ello, se evaluó el efecto del pH y temperatura para la producción de quitin-

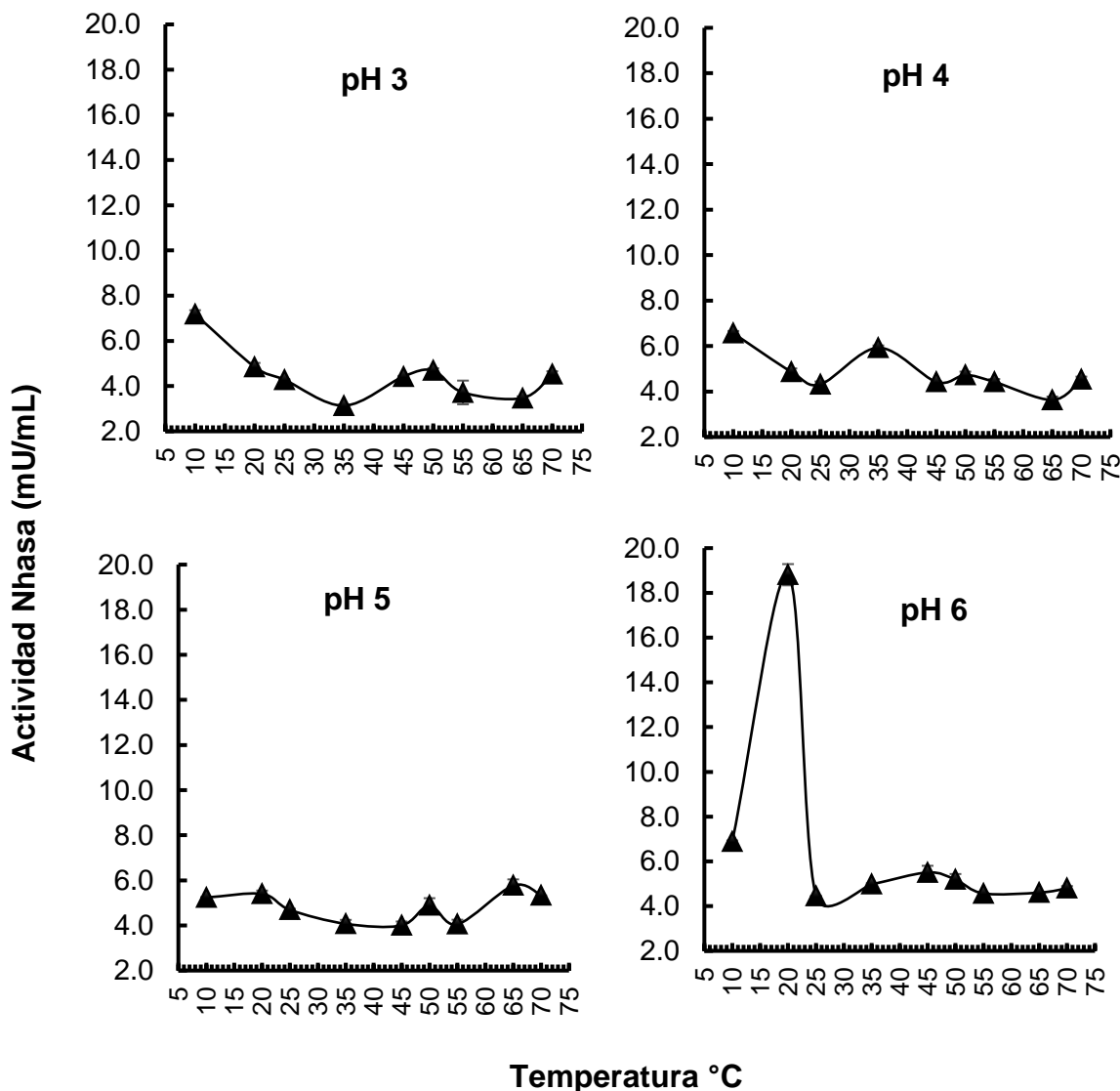


Figura 30. Producción de quitin-oligosacáridos mediante hidrólisis enzimática utilizando extracto enzimático purificado de Psp-Ch y sustrato comercial (N, N', N''-Triacetilquitotriosa) a diferentes pH's (3, 4, 5 y 6).

oligosacáridos, realizando experimentos de hidrólisis utilizando los extractos

purificados de Psp-Ch y Bb-Ch, siguiendo el protocolo de Koga en el 2000 y 2002, en el cual se utilizaron 100 μ L a 0.11 y 0.125 mM de quitooligosacáridos en amortiguador de acetato de sodio 4.0 y 4.4 mM, pH 4.0 - 6.0, temperatura 25 $^{\circ}$ C, por 20 y 30 min con una relación E/S (1:10). En este trabajo se utilizó como sustrato un trímero (N, N', N''-Triacetilquitotriosa) en amortiguador acetato de sodio 4.0 mM, pH 3 – 6, temperatura 10- 70 $^{\circ}$ C por 25 min y una relación E/S (1:10), figura 30 y 31.

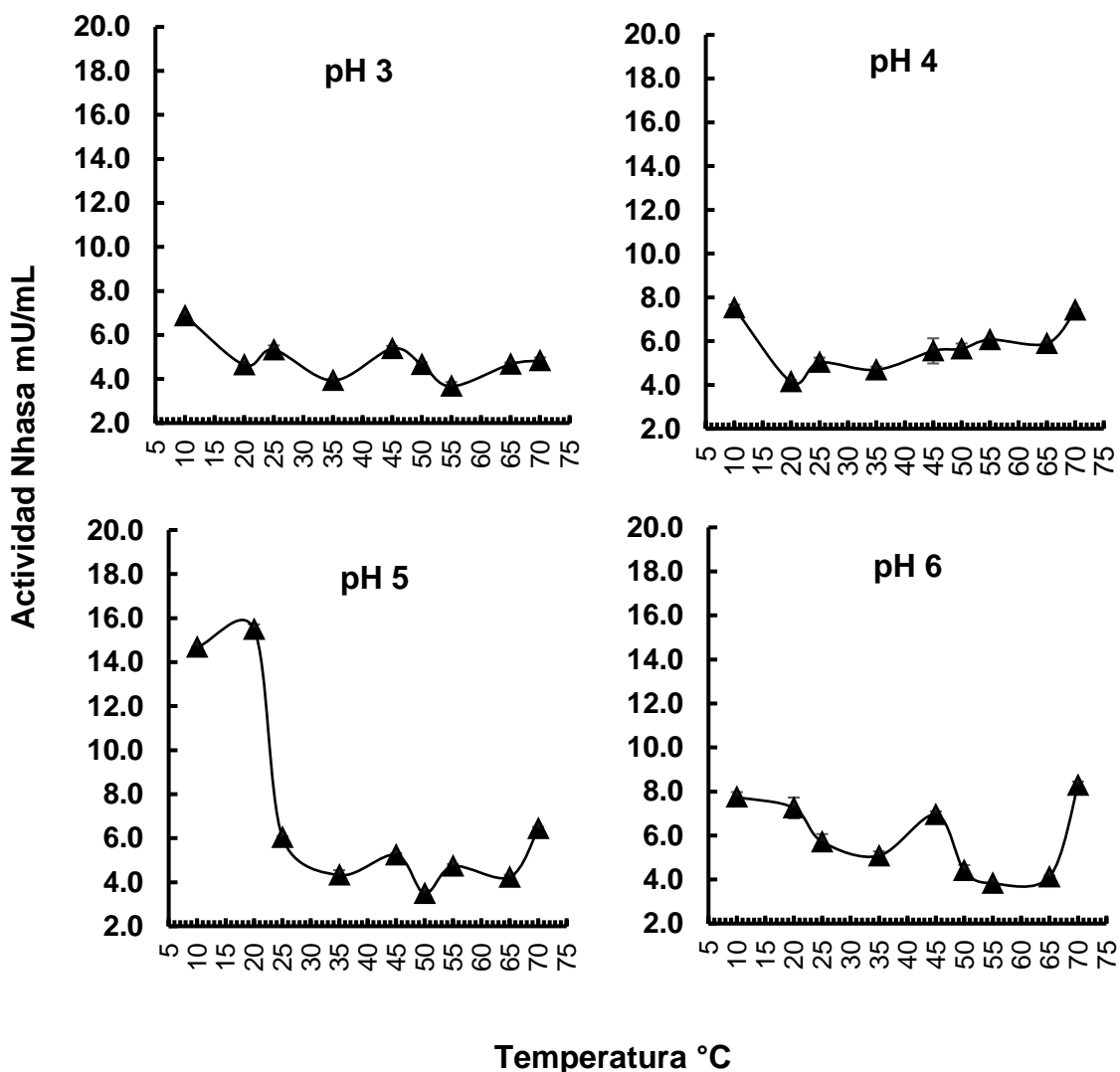


Figura 31. Producción de quitin-oligosacáridos mediante hidrólisis enzimática utilizando extracto enzimático purificado de Bb-Ch y sustrato comercial (N, N', N''-Triacetilquitotriosa) a diferentes pH's (3, 4, 5 y 6).

En la figura 30, se puede observar que la hidrólisis con Psp-Ch utilizando el sustrato comercial trímero (N, N', N''-Triacetilquitotriosa) a pH 3, pH 4 y pH 5 tuvieron el mismo comportamiento, variando la actividad Nhasa entre 4 y 7 mU/mL; mientras que a pH 6 se mostró la mayor actividad Nhasa con 19 mU/mL a 20 °C (figura 30).

Tomando en cuenta los datos anteriores para el extracto enzimático purificado Psp-Ch, se dedujo que el pH y la temperatura óptima fue 6 y 20 °C. Lo descrito anteriormente concuerda con lo reportado por Del Pino *et al.*, (1999) quienes obtuvieron la mayor actividad hexosaminidasa a pH 6 y una temperatura de 65 °C a partir larvas de *B. microplus* a 1 h de reacción, la variación de temperatura se puede atribuir al tiempo de reacción y a la fuente de donde provienen las enzimas; aunado a esto, el pH de mayor actividad Nhasa coincide con el pH de mayor de producción para *Penicillium sp.*

Como se puede observar en la figura 31, la hidrólisis de Bb-Ch con el trímero (N, N', N''-Triacetilquitotriosa), tuvo con pH 3 y pH 4 el mismo comportamiento variando la actividad Nhasa entre 3.5 a 8 mU/mL, con pH 6 la actividad Nhasa se mostró muy inestable variando la actividad Nhasa de 3 a 8 mU/mL, esto se atribuye a que la enzima no se encontraba en un ambiente idóneo para su producción; la mayor actividad fue de 15 mU/mL con un pH y temperatura óptima 5 y 20 °C.

Las curvas de actividad utilizando una quitinasa del estómago de *Pennahia argentatus* mostraron mayor actividad utilizando un trímero (GlcNAc)₃ como sustrato, obteniendo así un pH óptimo de 4.5; también esta enzima mostró actividad utilizando quitina coloidal como sustrato, obtuvo un pH óptimo entre 5.5 y 4.4. La temperatura óptima se obtuvo a los 60 °C con el dímero como sustrato (GlcNAc)₂.

En el estudio de Koga (2000), donde se utilizó un quitinasa de ñame obtuvo un pH óptimo de 4 ocupando N-acetilquitin-oligosacáridos.

Comparando los extractos enzimáticos podemos observar que Psp-Ch tuvo la mayor producción de Nhasas con 18.810 mU/mL, a una temperatura de 20 °C a pH óptimo de 6; mientras que Bb-Ch alcanzó 15.488 mU/mL a 20 °C a un pH óptimo de 5; en ambos casos utilizando un trímero (GlcNAc)₃ como sustrato. A partir de estos

resultados podemos se puede concluir que las Nhasas de la familia GH18 perteneciente a hongos, encuentran su estabilidad a temperaturas cálidas y a pH's ácidos. Lo anterior su sustenta con lo establecido en la base de datos de Brenda según el microorganismo del que provienen.

7.6.4 Evaluación del mecanismo hidrolítico.

Koga en el 2000, analizó mediante HPLC las formas anoméricas de los quitin-oligosacáridos, deduciendo que las formas anoméricas α eran las primeras en eluir y de acuerdo con la relación establecida por el área bajo la curva, las que tenían mayor área era la forma anomérica predominante.

En este trabajo se determinaron las formas anoméricas de los quitin-oligosacáridos mediante hidrólisis de quitinasas fúngicas con sustratos desproteinizados. En los espectros de Psp-Ch y Bb-Ch se comparan los estándares del monómero, dímero y trímero (GlcNAc , $(\text{GlcNAc})_2$, $(\text{GlcNAc})_3$) con los resultados de la hidrólisis enzimática.

En la figura 32a y 33a se observan los estándares de los quitin-oligosacáridos, se aprecia que los primeros en eluir fueron los α -anómeros y después los β -anómeros, siendo predominante los β -anómeros. También se puede observar en la figura 32b, los quitin-oligosacáridos provenientes de la hidrólisis del extracto purificado de Nhasas de Psp-Ch con el sustrato (trímero). Durante la hidrólisis se produjeron formas β -anoméricas del monómero (N-acetil-D-glucosamina) con una proporción de $2.55e^3$ y del dímero (N, N'-diacetilquitobiosa) $2.66e^4$; también se puede observar en el espectro que el sustrato trímero (N, N', N''-Triacetilquitotriosa) no se logró hidrolizar totalmente, ya que aparece en los espectros de la hidrólisis con una proporción alta ($3.37e^5$).

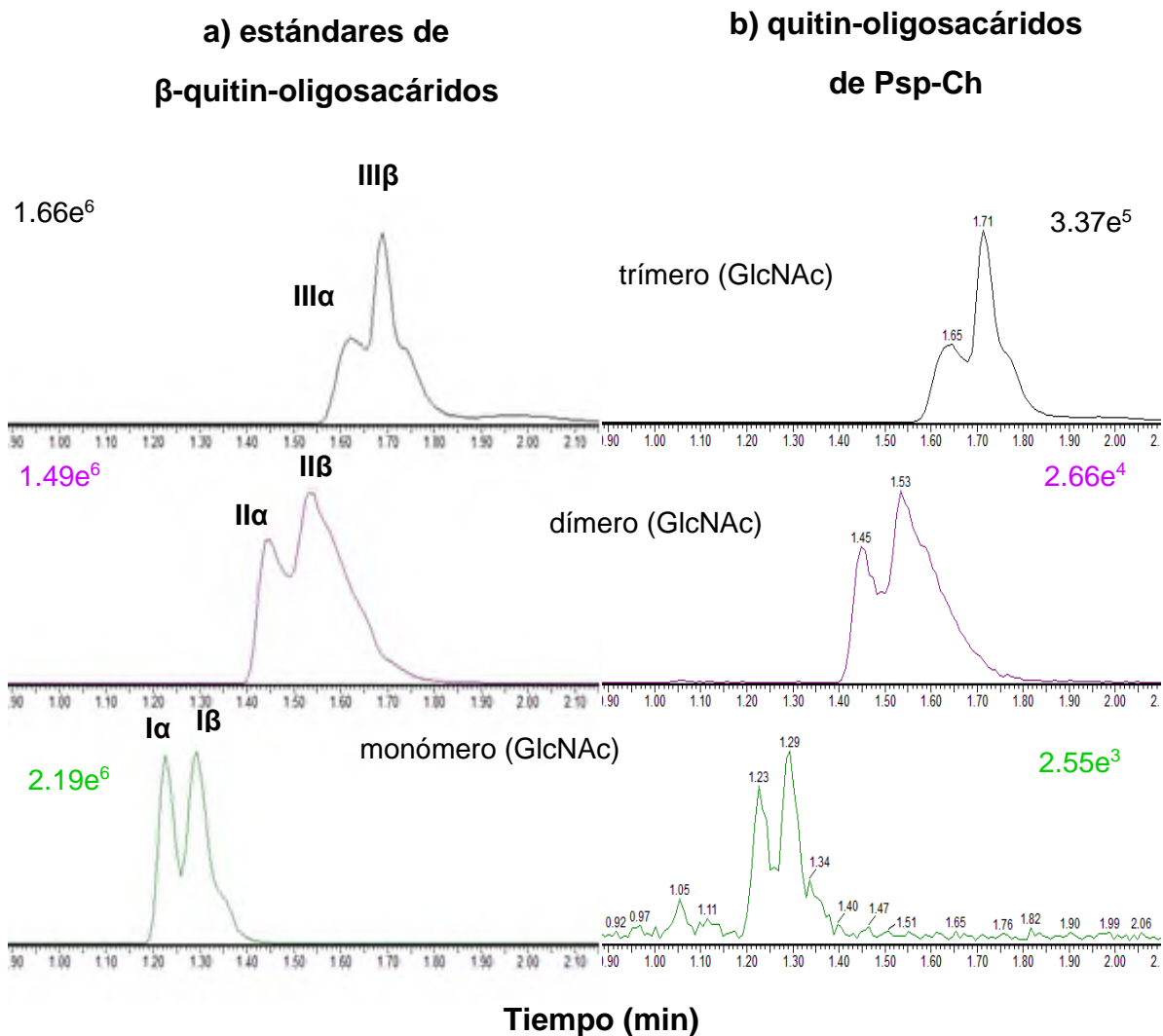


Figura 32. Evaluación del mecanismo hidrolítico. a) Estándares de los N-acetil-quitin-oligosacáridos (monómero (GlcNAc), dímero (GlcNAc)₂ y trímero (GlcNAc)₃. b) quitin-oligosacáridos de la hidrólisis enzimática del Psp-Ch con un trímero (GlcNAc)₃ como sustrato. TOF MS Análisis de formas anoméricas.

Los quitin-oligosacáridos de la hidrólisis del extracto purificado de Nhasas de Bb-Ch con el sustrato (trímero) se observan en la figura 33b, en donde se pueden apreciar el monómero (N-acetil-D-glucosamina) con una proporción de $1.32e^4$ y el dímero (N, N'-diacetilquitobiosa) con una proporción de $4.95e^4$; pero también en este espectro se

aprecia el trímero, lo cual al igual que con Psp-Ch no se logró hidrolizar totalmente y tiene un proporción alta de $1.22e^4$.

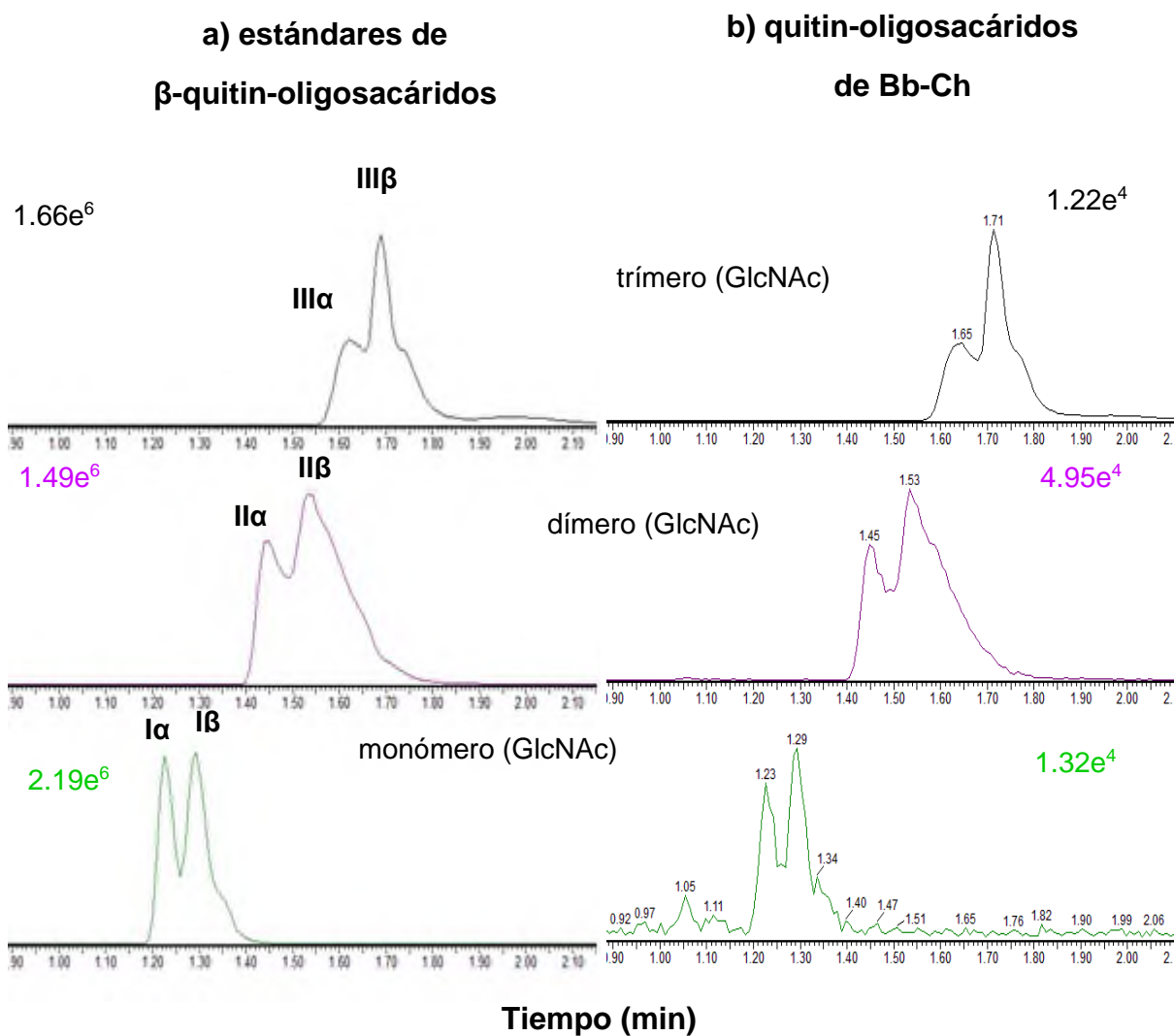


Figura 33. Evaluación del mecanismo hidrolítico. a) Estándares de los N-acetil-quitin-oligosacáridos (monómero (GlcNAc), dímero (GlcNAc)₂ y trímero (GlcNAc)₃). b) quitin-oligosacáridos de la hidrólisis enzimática del Bb-Ch con un trímero (GlcNAc)₃ como sustrato. TOF MS Análisis de formas anoméricas.

Existen varios estudios donde se determina el mecanismo anomérico, entre ellos se encuentra el de Murata *et al.*, 2005 quien trabajó con la hidrólisis enzimática de un sustrato cromogénico sintético Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β -pNP (tetrámero de Galactosa y N-acetilglucosamina enlazado al *p*-nitrofenil) utilizando una quitinasa producida por la bacteria *Amycolatopsis orientalis*, que liberó unidades repetitivas de N-acetil-lactosamina (Galb1,4GlcNAcb1,3Galb1,4GlcNAc, LN₂). Durante este estudio se observó mediante RMN ¹H la diferencia en el desplazamiento químico de los hidrógenos anoméricos a diferentes tiempos de incubación (0-40hr) a partir de un α -anómero. De acuerdo con las señales emitidas del H-1', H-1'', H-1''' y H-1, las cuales se observaron de 4.4 a 5.4 ppm se observó la formación inicial de un β -anómero que mutarrotó espontáneamente; con esto se demostró que la hidrólisis enzimática del sustrato se produjo con retención de la configuración anomérica. Los resultados sugirieron que la quitinasa liberadora de LN₂ puede pertenecer a la familia GH18.

También Sørli *et al.*, (2007) determinó el mecanismo hidrolítico de quitinasas (ChiB) de *Serratia marcescens* mediante HPLC, utilizando un sustrato natural (GlcNAc)₄. Los aportes relevantes de este estudio fueron: el empleo de un sustrato natural y el mejoramiento de la resolución mediante parámetros geométricos de la columna (reducción del diámetro) y condiciones de operación. Los resultados confirman los hallazgos de Koga *et al.*, (2000) en cuanto al orden de elución de los anómeros.

Otro estudio es el de Maarel *et al.*, 2012, en el cual se hidrolizó un tetrasacárido (GlcNAc)₄ con enlaces β -1-4, empleando la enzima Cfcl-MBP (Representación filogenética de Clado de *A. niger* - Proteína de unión a la maltosa) mediante HPLC. Los productos de hidrólisis fueron (GlcNAc)₂ y (GlcNAc); ambos presentaron la forma anomérica β . Considerando estos resultados la proteína Cfcl-MBP tiene un mecanismo de retención.

Comparando los estudios antes descritos con los resultados obtenidos en este trabajo podremos concluir que efectivamente los primeros productos en eluir son los α -anómeros y que el mecanismo depende de la fuente de procedencia de las enzimas. Además, que con esto confirmamos que efectivamente durante la fermentación se produjeron Nhasas y también algunas exoquitinasas, esto se pudo observar en los

espectros de los quitin-oligosacáridos dado que la Nhasas que liberan monómeros de N-acetilglucosamina y las exoquitinasas dímeros de N-diacetilquitobiosa y ambos quitin-oligosacáridos fueron productos de la hidrólisis. Aunado a esto podemos suponer que las Nhasas provenientes de los hongos *Penicillium sp* y *B. bassiana* pertenecientes a la familia GH 18 poseen un mecanismo de reacción de retención ya que conservan el anomerismo inicial del sustrato, lo cual concuerda a lo citado por Adrangi y Faramarzi en el 2013.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo con los experimentos de morfología micro y microscopía realizados a la cepa aislada de papaya se determinó que es una especie de *Penicillium sp*, sin embargo, se requiere de una caracterización molecular.

Los estudios de actividad Nhasa con el sustrato fluorogénico indicaron que solo el chapulín promovió la expresión de proteínas con actividad Nhasa en ambos microorganismos con un peso molecular entre 30 y 60 kDa; mientras que el camarón no activó la producción de enzimas con actividad Nhasa, lo cual se puede atribuir a la sensibilidad de la técnica usada y a la composición química del camarón, así como a la disponibilidad de la quitina en este sustrato. El peso molecular de las Nhasas observado corresponde con el tamaño molecular reportado para Nhasas provenientes de hongos en la familia GH18.

Se logró incrementar el rendimiento en la purificación 1.2 y 5.3 veces para Psp-Ch y BB-Ch; sin embargo, al realizar la diálisis se perdió actividad Nhasa, lo cual provocó una baja en el rendimiento.

El estudio del efecto de pH y temperatura en la actividad con sustrato N, N', N''-Triacetilquitotriosa indicaron que la mayor actividad se presenta a pH 6 y 5 a 20 °C para ambos extractos enzimáticos de Psp-Ch y Bb-Ch respectivamente.

El análisis de los productos de hidrólisis del sustrato N, N', N''-Triacetilquitotriosa con anomerismo β por medio del extracto enzimático de *B. bassiana* y *Penicillium sp*, reveló que durante la hidrólisis se obtuvieron el monómero, dímero y trímero (parte de este no se logró hidrolizar) con anomerismo β . Esto indica que efectivamente se purificaron Nhasas, aunque también otras exoquitinasas. El anomerismo de las Nhasas fue β y por lo tanto su mecanismo fue de retención. Dado estos resultados se puede decir que las Nhasas son idóneas para elaboración de formulados biológicos para el control de plagas y para evaluar la inhibición de rutas metabólicas de patógenos; y los quitin-oligosacáridos se pueden utilizar para elaboración de microfibras que sirven como soporte en columnas de separación.

Con todo lo anterior se aceptan las hipótesis, ya que con chapulín se logró incrementar la producción y la actividad Nhasa; así mismo se obtuvieron quitin-oligosacáridos a través de un mecanismo de retención.

9. RECOMENDACIONES

1. Debido a la reproducción lenta de tenebrio no se recomienda para fermentaciones en volúmenes grandes.
2. Aunque la diálisis es un muy buen método para la separación de sales en ocasiones se pierde actividad, por lo cual se recomienda probar con diferentes membranas y soluciones para la diálisis.
3. Para la determinación del mecanismo anomérico se recomienda utilizar una columna más larga para la mejor elución de los productos de hidrólisis, y utilizar una columna de amida, ya que tiene mayor afinidad por el grupo acetamido de los productos de hidrólisis de quitinasas.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Adrangi, S., & Faramarzi, M. A. (2013). From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. *Biotechnology advances*, 31(8), 1786-1795.
2. Al Sagheer, F. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S., & Elsabee, M. Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 410-419.
3. Arias Cifuentes, E. L., Espinosa, P., & Andera, P. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestra de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde (Bachelor's thesis).
4. Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi (No. Ed. 4). *American Phytopathological Society* (APS Press).
5. Benítez, E. M. (2004). Estudio de especies micotoxígenas del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum* Dierckx (Doctoral dissertation, Universitat Autònoma de Barcelona).
6. Bortone, K., Monzingo, A. F., Ernst, S., & Robertus, J. D. (2002). The structure of an allosamidin complex with the *Coccidioides immitis* chitinase defines a role for a second acid residue in substrate-assisted mechanism. *Journal of molecular biology*, 320(2), 293-302.
7. Bradford M. Marion (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254
8. Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina, 118.
9. Charnley, A. K., & Leger, R. S. (1991). The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. *In The fungal spore and disease initiation in plants and animals* (pp. 267-286). Springer US.
10. Cira, L. A., Huerta, S., Hall, G. M., & Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37(12), 1359-1366.

11. Cruz Camarillo Ramón y Rojas Avelizapa L.I. (1999). Las quitinasas bacterianas y sus posibles aplicaciones biotecnológicas. Avances en purificación y aplicaciones de enzimas en biotecnología. Ed. UAM-Iztapalapa, 1ra. Edición, México D.F. pp 288-324
12. Cruz Martínez, L. C. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto (Bachelor's thesis).
13. De Albuquerque Maranhão, E. A., & de Albuquerque Maranhão, E. H. (2013). Hongos entomopatógenos: importante herramienta para el control de “moscas blancas” (Homoptera: Aleyrodidae). *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 5, 209-242.
14. Doran, P. M. (1995). Bioprocess engineering principles. *Academic press*.
15. Del Pino, F. A., Brandelli, A., Termignoni, C., Gonzales, J. C., Henriques, J. A., & Dewes, H. (1999). Purification and characterization of β -N-acetylhexosaminidase from bovine tick *Boophilus microplus* (Ixodidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 123(2), 193-200.
16. Ferron, P. (1978). Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual review of entomology*, 23(1), 409-442.
17. Fortuna, J. (2009). Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *B. thuringiensis*. Tesis de Maestro en Ciencias en Biotecnología Genómica. Reynosa (México): Instituto Politécnico Nacional.
18. Gutiérrez, S., Casqueiro, J., & Martín, J. F. (2000). Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, 554-560.
19. Hajek, A. E., & St. Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual review of entomology*, 39(1), 293-322.
20. Hajji, S., Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M., & Jellouli, K. (2014). Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International journal of biological macromolecules*, 65, 298-306.

21. Hartl, L., Zach, S., & Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(2), 533-543.
22. Hirano, S. (1999). Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer international*, 48(8), 732-734.
23. Holder, D. J., & Keyhani, N. O. (2005). Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5260-5266.
24. Ikeda, M., Miyauchi, K., Mochizuki, A., & Matsumiya, M. (2009). Purification and characterization of chitinase from the stomach of silver croaker *Pennahia argentatus*. *Protein expression and purification*, 65(2), 214-222.
25. Jiménez, S (2015). Producción de quitinasas en cultivo líquido con hongos entomo y fitopatógenos, utilizando tres fuentes de quitina como inductor. Tesis de Maestro en Ciencias en Biotecnología. Tuxtepec (México): Universidad del Papaloapan.
26. Koga Daizo. (2000) Kinetic behavior of chitinases isozymes. *Advan. Chitin Sci.*, Vol. 4 (pp 511-515).
27. Koga, D., Yoshioka, T., & Arakane, Y. (1998). HPLC analysis of anomeric formation and cleavage pattern by chitinolytic enzyme. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(8), 1643-1646.
28. Krokeide, I. M., Synstad, B., Gåseidnes, S., Horn, S. J., Eijsink, V. G., & Sørli, M. (2007). Natural substrate assay for chitinases using high-performance liquid chromatography: a comparison with existing assays. *Analytical biochemistry*, 363(1), 128-134.
29. Kumar, M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1), 1-27.
30. Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203.
31. Laemmli Ulrich K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

32. Lee, Y. G., Chung, K. C., Wi, S. G., Lee, J. C., & Bae, H. J. (2009). Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. *Protein expression and purification*, 65(2), 244-250.
33. Li, H., & Greene, L. H. (2010). Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding. *PLoS one*, 5(1), 8654.
34. Liu, P., Liu, S., Guo, N., Mao, X., Lin, H., Xue, C., & Wei, D. (2014). Cofermentation of *Bacillus licheniformis* and *Gluconobacter oxydans* for chitin extraction from shrimp waste. *Biochemical Engineering Journal*, 91, 10-15.
35. Lopez-Perez, M., Rodriguez-Gomez, D., & Loera, O. (2015). Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(3), 334-341.
36. Loustau Gómez de Membrillera, J. (1950). Clave determinativa de las especies del género *Penicillium*. In *Anales de la Universidad de Murcia*. Murcia: Universidad de Murcia, Servicio de Publicaciones.
37. Matsumoto, Y., Saucedo-Castañeda, G., Revah, S., & Shirai, K. (2004). Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry*, 39(6), 665-671.
38. Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206(24), 4393-4412.
39. Miller Gail Lorenz (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Biochemistry*. 31: 426-428
40. Mourão, S. A. (2002). Penetração da broca (*Hypothenemus hampei*)(Coleoptera: Scolytidae) em frutos de café em diferentes fases de crescimento e seletividade de defensivos agrícolas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*.
41. Murata, T., Amarume, S., Hattori, T., Tokuyama, S., Tokuyasu, K., Kawagishi, H., & Usui, T. (2005). Purification and characterization of a chitinase from *Amycolatopsis orientalis* with N-acetyllactosamine-repeating unit releasing activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 336(2), 514-520.

42. Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H., Arakane, Y., & Kramer, K. J. (2012). Chitin metabolism in insects. *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, 193-235.
43. Nguyen, H. Q., Quyen, D. T., Nguyen, S. L. T., & Van Hanh, V. U. (2015). An extracellular antifungal chitinase from *Lecanicillium lecanii*: purification, properties, and application in biocontrol against plant pathogenic fungi. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 6-14.
44. Nicholls, C. I. (2008). Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Universidad de Antioquia.
45. Omero, C., Horwitz, B. A., & Chet, I. (2001). A convenient fluorometric method for the detection of extracellular N-acetylglucosaminidase production by filamentous fungi. *Journal of microbiological methods*, 43(3), 165-169.
46. Pastor de Abram, A. (2004). Quitina y quitosano obtención, caracterización y aplicaciones (No. 574.192482 QU5).
47. Patil, N. S., Waghmare, S. R., & Jadhav, J. P. (2013). Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation. *Process Biochemistry*, 48(1), 176-183.
48. Peteira, B., González, I., Arias, Y., Fernández Turro, A., Miranda, I., & Martínez, B. (2011). Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (BALSAMO) Vuillemin. *Revista de Protección Vegetal*, 26(1), 16-22.
49. Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer science*, 34(7), 641-678.
50. Polaina, J. (2004). Estructura, función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
51. Prakash, N. U., Jayanthi, M., Sabarinathan, R., Kanguane, P., Mathew, L., & Sekar, K. (2010). Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. *Journal of molecular evolution*, 70(5), 466-478.

52. Ramírez Coronel, M.A. Purificación y caracterización de una tanasa de *Aspergillus niger* Aa20, producida por fermentación en medio sólido. Tesis de maestría en Biología Experimental. Francia -México, 2000.
53. Ramírez Coutiño Laura P. (2009). Producción de quitinasas y proteasas de *Verticillium fungicola* y su evaluación en la hidrólisis de quitina para la producción de quitin-oligómeros. Tesis de doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D.F, 2009.
54. Riddell, R. W. (1950). Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, 42(2), 265-270.
55. Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632.
56. Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 57(3), 397-430.
57. Roberts, D. W. (1981). Toxins of entomopathogenic fungi. *Microbial control of pests and plant diseases*, 1970-1980.
58. Roberts, G. A. (1992). Structure of chitin and chitosan. In Chitin Chemistry (pp. 1-53). Macmillan Education UK.
59. Rocha-Pino Z. Estudio de la producción de quitinasas, proteasas e hidrofobinas de *Lecanicillium lecanii* en cultivo líquido y sólido utilizando diversas fuentes de carbono. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, 2009.
60. Salazar, Loaiza, A. M., & Ordoñez Guerrero, C. A. (2013). Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (Bachelor's thesis, Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira).
61. Sarma, K., Dehury, B., Sahu, J., Sarmah, R., Sahoo, S., Sahu, M.,... & Barooah, M. (2012). A comparative proteomic approach to analyse structure, function and evolution of rice chitinases: a step towards increasing plant fungal resistance. *Journal of Molecular Modeling*, 18(11), 4761-4780.
62. Sasaki, C., Yokoyama, A., Itoh, Y., Hashimoto, M., Watanabe, T., & Fukamizo, T. (2002). Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes. *The Journal of Biochemistry*, 131(4), 557-564.

63. Taira, T., Noriko, T. O. M. A., & Ishihara, M. (2005). Purification, characterization, and antifungal activity of chitinases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(1), 189-196.
64. Tanada, Y., & Kaya, H. K. (1993). *Insect Pathology*. Academic Press. San Diego, 589-666.
65. Tronsmo, A., y Harman, GE. (1993) Detection and quantification of N-acetil- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry*. 208: 74-79.
66. Valero-Jiménez, C. A., Wieggers, H., Zwaan, B. J., Koenraadt, C. J., & van Kan, J. A. (2016). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133, 41-49.
67. Van Munster, J. M., van der Kaaij, R. M., Dijkhuizen, L., & van der Maarel, M. J. (2012). Biochemical characterization of *Aspergillus niger* Cfcl, a glycoside hydrolase family 18 chitinase that releases monomers during substrate hydrolysis. *Microbiology*, 158(8), 2168-2179.
68. Vega, K., & Kalkum, M. (2011). Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. *International Journal of Microbiology*.
69. Villa Lerma A. Guadalupe. "Modificación estructural de quitina mediante métodos físicos y químicos para su hidrólisis enzimática mediante quitinasas de *Lecanicillium lecanii*". Tesis de doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D.F, 2015.
70. Vuong, T. V., & Wilson, D. B. (2010). Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnology and bioengineering*, 107(2), 195-205.
71. Wagner, B. L., & Lewis, L. C. (2000). Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3468-3473.
72. Wanchoo, A., Lewis, M. W., & Keyhani, N. O. (2009). Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in in vitro and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, 155(9), 3121-3133.

73. Xiayun, J., Chen, D., Shenle, H., Wang, W., Chen, S., & Zou, S. (2012). Identification, characterization and functional analysis of a GH-18 chitinase from *Streptomyces roseolus*. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2409-2415.
74. Yang, A., & Wu, R. (2001). Mechanical properties and interfacial interaction of a novel bioabsorbable chitin fiber reinforced poly (prolactone) composite. *Journal of Materials Science Letters*, 20(11), 977-979.
75. Zhang, J., Zhang, X., Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Ma, E., & Zhu, K. Y. (2011). Comparative genomic analysis of chitinase and chitinase-like genes in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *PloS One*, 6(5), e19899.

Páginas de Internet

76. <http://www.sigma-aldrich.com>
77. <http://www.brenda-enzymes.info>
78. <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>

11. ANEXOS

Anexo 1

Composición del medio Czapeck modificado (Cira *et al* 2002)

Composición	Cantidad (g/L)
<i>Cutícula</i>	10
<i>NaNO₃</i>	1
<i>MgSO₄ · 7H₂O</i>	0.5
<i>KCl</i>	0.5
<i>K₂HPO₄ · 3H₂O</i>	0.5
<i>FeSO₄ · 7H₂O</i>	0.01

Anexo 2

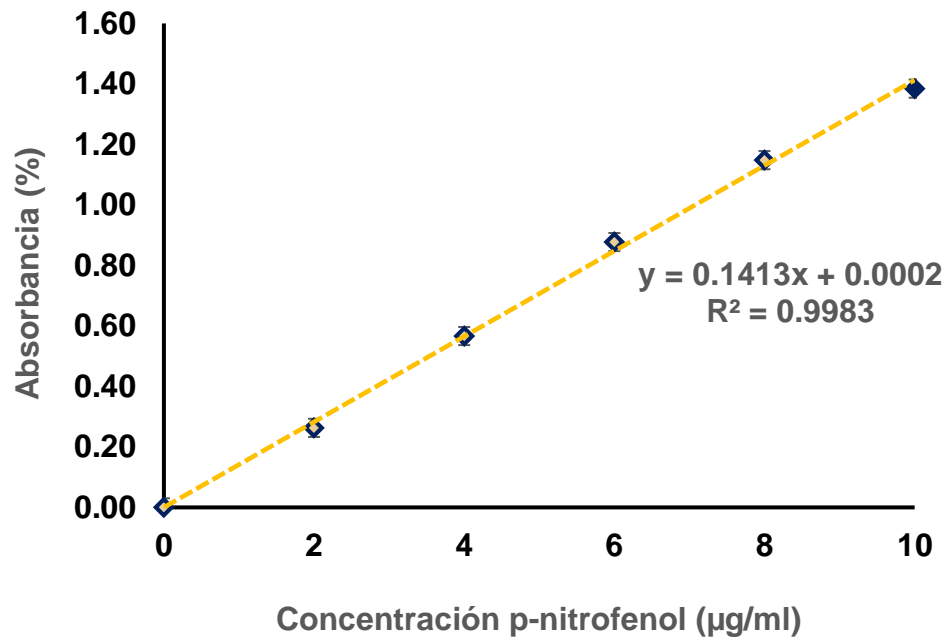


Figura 34. Curva estándar de actividad Nhasa por el método de Tronsmo y Harman (1993) empleando una solución madre de p-nitrofenol a una concentración de 100 µg/mL.

Anexo 3

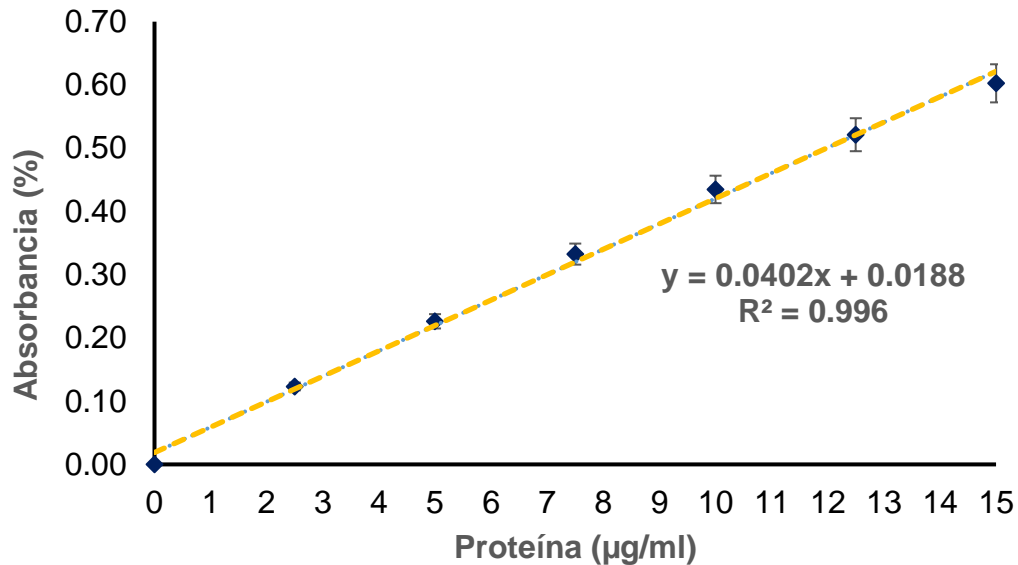


Figura 35. Curva estándar de proteína por el método de micro ensayo de Bradford (1976) usando seroalbúmina bovina (BSA).

Anexo 4

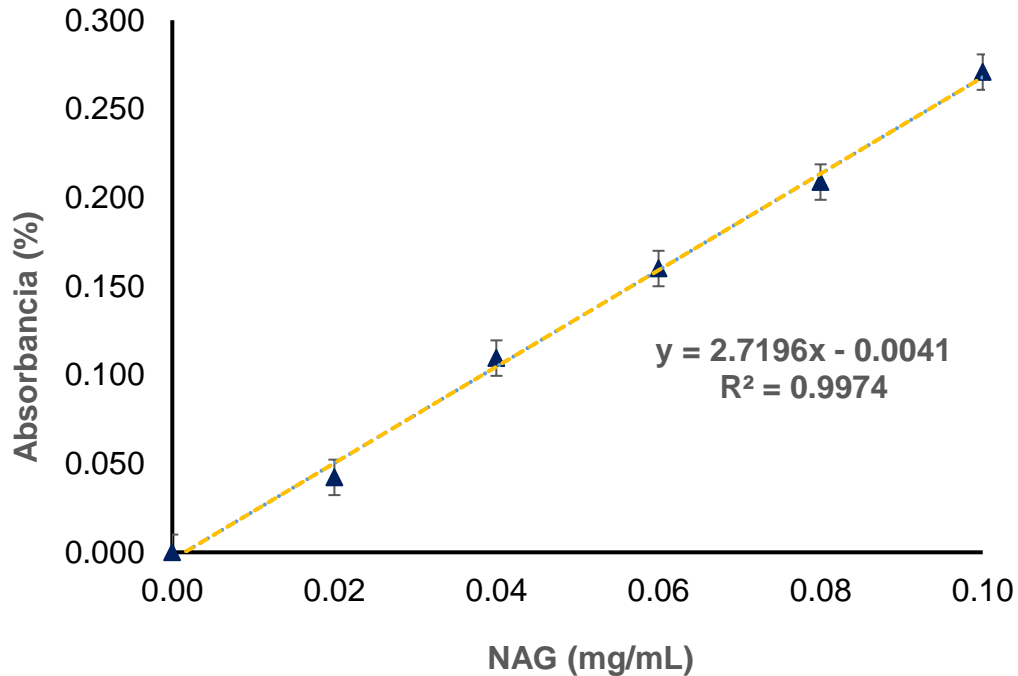


Figura 36. Curva estándar de azúcares reductores por el método de Miller (1954) usando N-acetilglucosamina (NAG).

Anexo 5

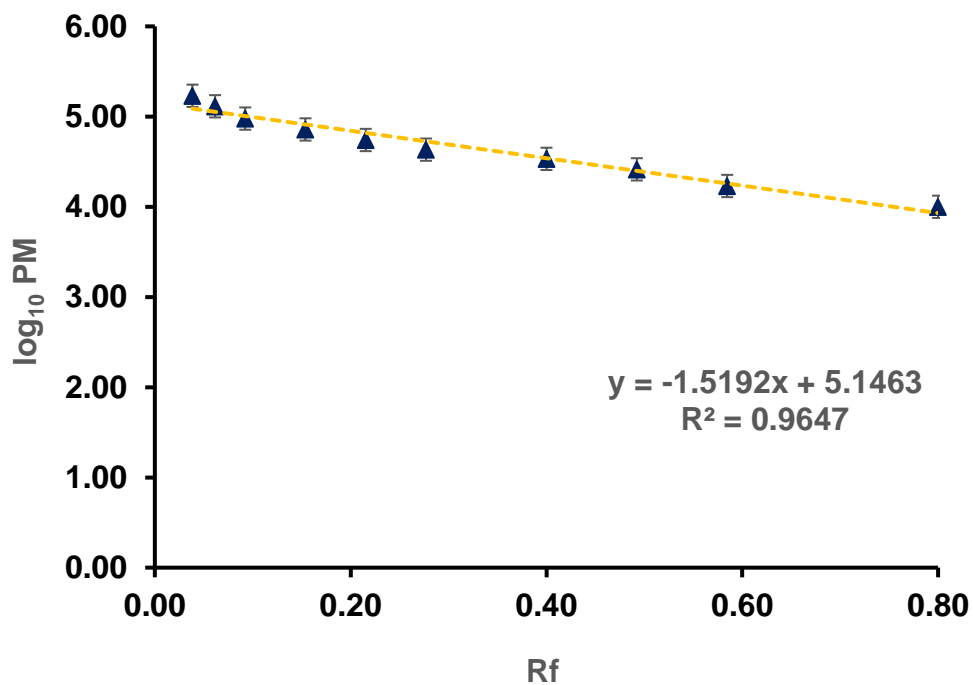
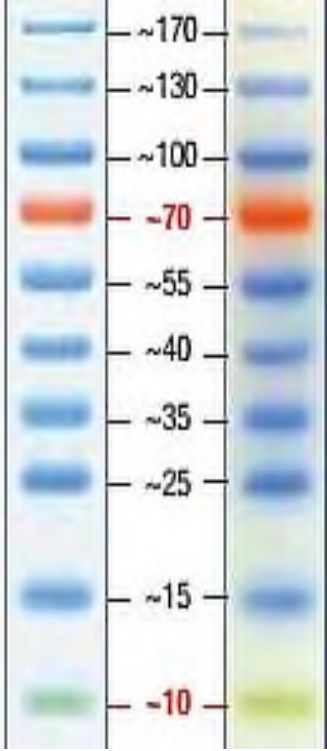


Figura 37. Curva estándar para la determinación del Peso Molecular (PM) de proteínas de Quitinasas mediante SDS-PAGE (Laemli, 1970). Se emplearon los valores de movilidad relativa (Rf) de proteínas recombinantes (tabla 8) presentes en marcador de cromóforo (Thermo scientific).

Anexo 6

Valores de peso molecular (pm) y movilidad relativa (rf) de las proteínas presentes en marcador cromóforo (Thermo scientific).

<i>PROTEÍNA</i>	<i>PM (KDA)</i>	<i>RF</i>
PROTEÍNAS RECOMBINANTES		0.038
		0.062
		0.092
		0.154
		0.215
		0.277
		0.400
		0.492
		0.585
		0.800

Anexo 7

ANOVA unidireccional: Actividad mU/mL vs. Tratamiento

Tratamiento	Descripción
1	<i>Penicillium sp</i> - Chapulín
2	<i>Penicillium sp</i> - Camarón
3	<i>Beauveria bassiana</i> - Chapulín
4	<i>Beauveria bassiana</i> - Camarón

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	4	1, 2, 3, 4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	12.277	4.0924	17.94	0.000
Error	23	5.245	0.2281		
Total	26	17.523			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.477558	70.07%	66.16%	61.64%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	6	1.255	0.262	(0.851, 1.658)
2	3	0.8834	0.1068	(0.3130, 1.4538)
3	9	2.581	0.406	(2.252, 2.910)
4	9	2.506	0.667	(2.177, 2.836)

Desv.Est. agrupada = 0.477558

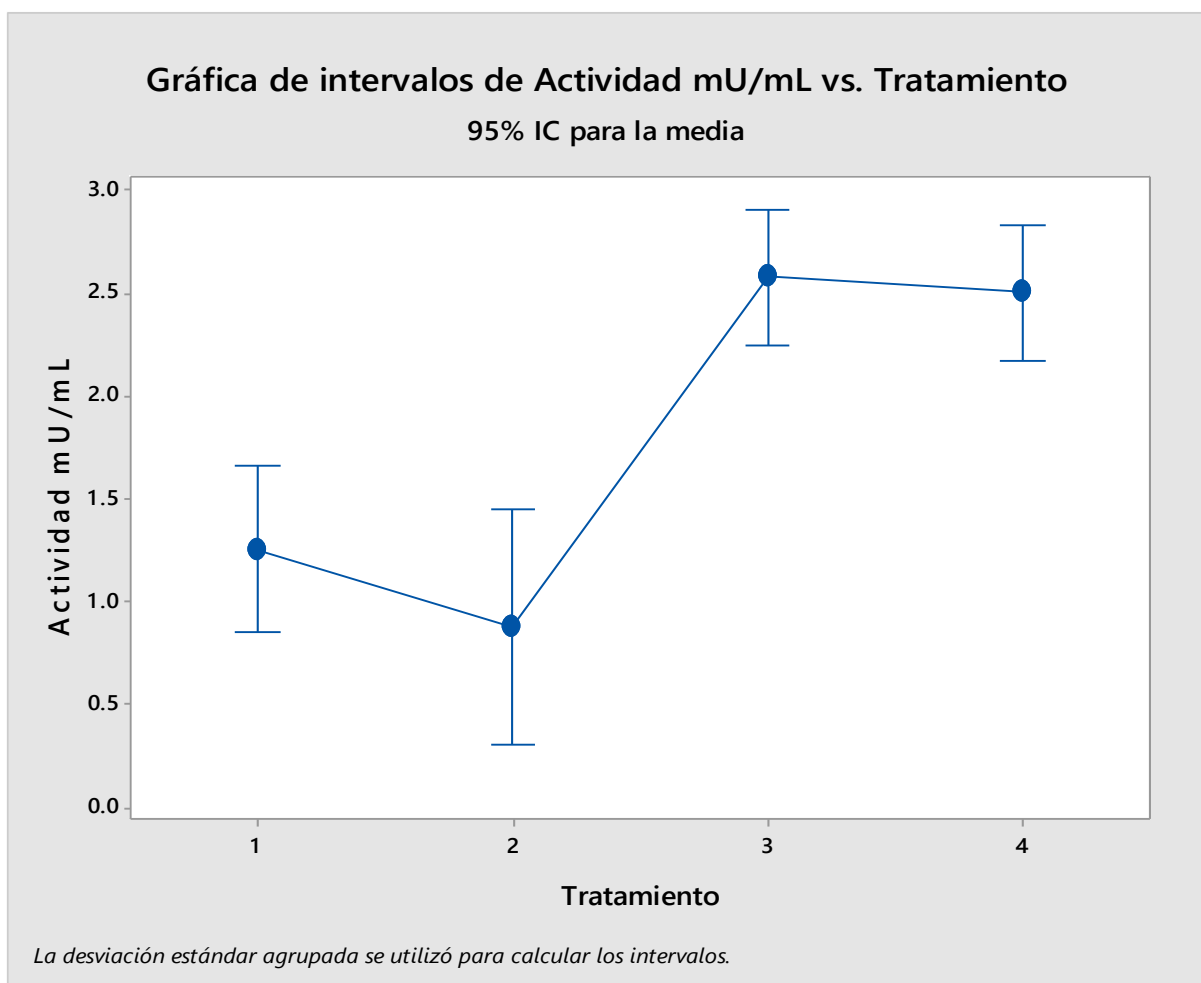


Figura 38. Intervalos de actividad (mU/mL) vs Tratamiento

Anexo 8

ANOVA unidireccional: Horas vs. Tratamiento

Tratamiento	Descripción
1	<i>Penicillium sp</i> - Chapulín
2	<i>Penicillium sp</i> - Camarón
3	<i>Beauveria bassiana</i> - Chapulín
4	<i>Beauveria bassiana</i> - Camarón

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	4	1, 2, 3, 4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0.0	0.000	0.00	1.000
Error	23	10368.0	450.783		
Total	26	10368.0			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
21.2316	0.00%	0.00%	0.00%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	6	24.00	21.47	(6.07, 41.93)
2	3	24.0	24.0	(-1.4, 49.4)
3	9	24.00	20.78	(9.36, 38.64)
4	9	24.00	20.78	(9.36, 38.64)

Desv.Est. agrupada = 21.2316

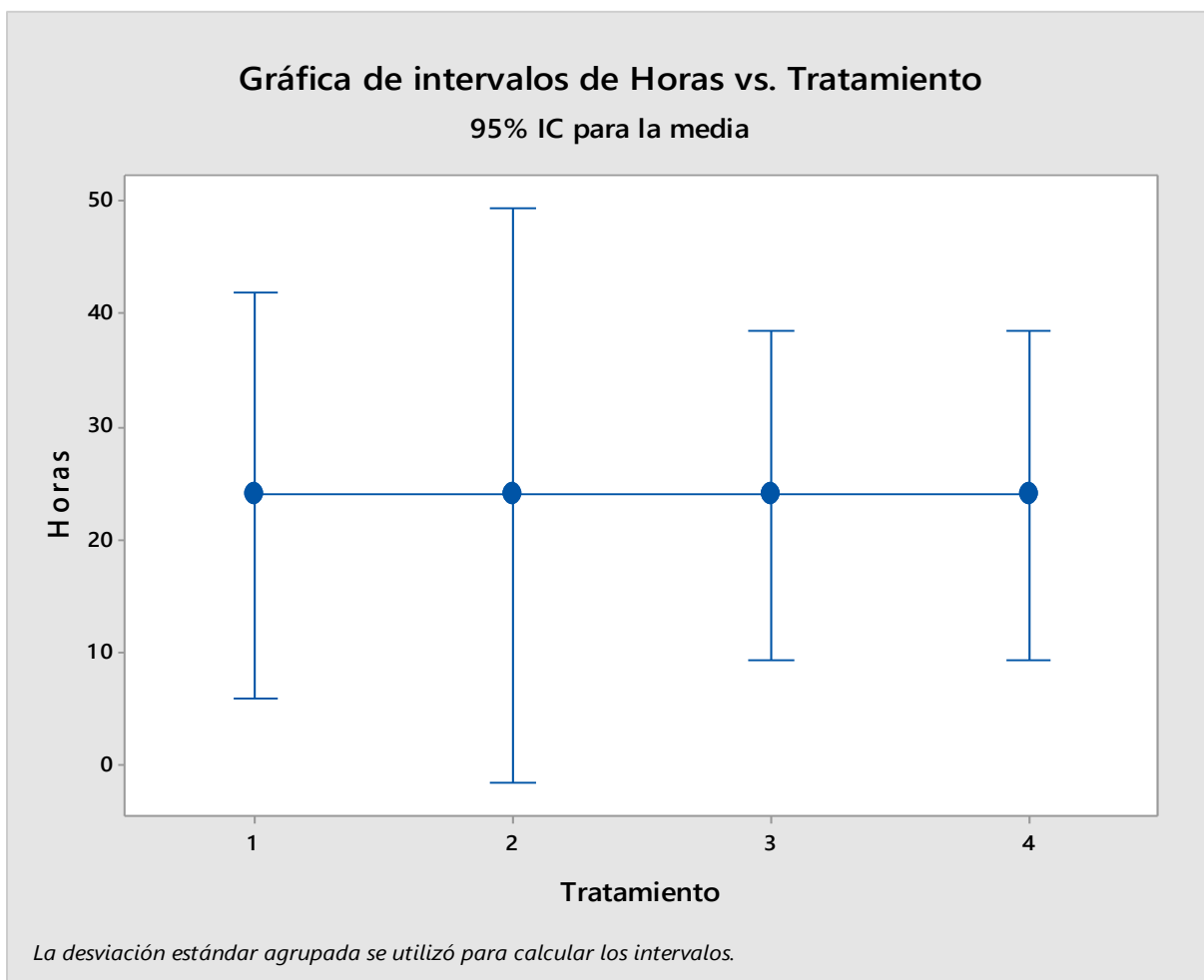


Figura 39. Intervalos de Horas vs Tratamiento.

Anexo 9

Fórmulas para tablas de purificación.

Actividad específica

Actividad específica es el cociente de actividad enzimática (expresada en unidades enzimáticas) y la cantidad total de proteínas.

$$Ae = \frac{\text{Unidades totales en la fracción } i}{\text{Total de proteínas en la fracción } i}$$

Ejemplo:

$$Ae = \frac{1446.350 \text{ mU/ml}}{5778.617 \text{ } \mu\text{g de proteína soluble/ml}} = 0.250 \text{ mU}/\mu\text{g}$$

Factor de purificación

Número de veces que se incrementa la actividad específica después de cada paso de purificación.

$$\text{Factor de purificación} = \frac{AE \text{ en la fracción } i}{AE \text{ en la fracción original}}$$

Ejemplo:

$$\text{Factor de purificación} = 0.25 / 0.25 = 1.0$$

Rendimiento

Porcentaje de la cantidad inicial de proteína de interés que queda después de cada paso de purificación.

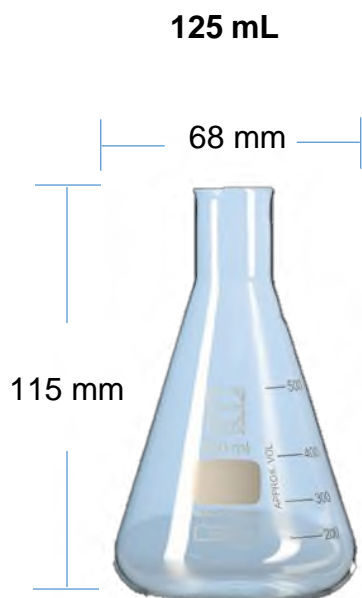
$$R = \frac{\text{Unidades totales en la fracción } i}{\text{Unidades totales en la fracción original}} \times 100$$

Ejemplo:

$$\text{Rendimiento} = 343.796 / 1446.350 \times 100 = 24 \%$$

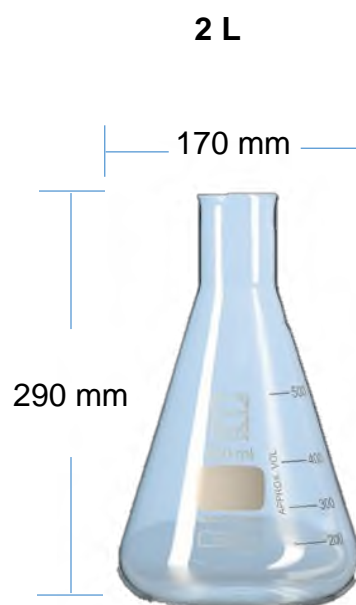
Anexo 10

Cálculo del espacio de aire vacío en matraces de 125 mL y 2 L



Volumen total: 139 mL

Espacio vacío: 46 %



volumen total: 2,194 mL

espacio vacío: 45 %